



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
«Βιοτεχνολογία–Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

**Επίδραση συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων  
στη δομή και την αφθονία  
των νιτροδωποποιητικών βακτηρίων και αρχαίων**

Μεταπτυχιακή Εργασία

**ΡΟΥΣΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

Επίδραση συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων  
στη δομή και την αφθονία  
των νιτροδωποποιητικών βακτηρίων και αρχαίων

**Επιβλέπων:** Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας - Βιοτεχνολογία Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία για την επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθειά του και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Γιαννακού, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την παροχή των δειγμάτων εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ευχαριστώ τον Dr. Brajesh Singh υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων μας σε αυτόματο DNA αλληλουχητή στο Ερευνητικό Ινστιτούτο The Macaulay Land Use Research Institute στο Aberdeen. Ευχαριστώ τον Δρ. Κωνσταντίνο Δελή για την πολύτιμη βοήθεια του στην πραγματοποίηση του πειράματος με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου.

Ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Λέκτορα κ. Μόσιαλο Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Τέλος, οφείλω ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την συνεχή υποστήριξη που μου παρείχε.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
1.1. Τύχη γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον .....	8
1.2. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους .....	9
1.3. Επιδράσεις βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	10
1.4. Γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	11
1.5. Τεχνικές για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.....	13
1.6. Κύκλος του αζώτου .....	17
1.7. Μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την οξείδωση της αμμωνίας.....	19
1.7.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria).....	19
1.7.2 AOB στο περιβάλλον.....	22
1.7.3 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea) .....	23
1.7.4 AOA στο περιβάλλον.....	24
1.7.5 Βακτήρια του φύλου Planctomycetes .....	25
1.8. Στόχοι της παρούσας εργασίας .....	26
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	27
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός .....	27
2.2. Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου T-RFLP για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων....	28
2.3. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους.....	28
2.3.1 Θεωρητικό μέρος .....	28
2.3.2 Πειραματικό μέρος .....	29
2.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	29
2.4.1 Θεωρητικό μέρος .....	29
2.4.2 Υλικά.....	30
2.4.3 Πειραματικό μέρος .....	30
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	31
2.5.1 Θεωρητικό μέρος .....	31
2.5.2 Υλικά.....	32

2.5.3 Πειραματικό μέρος .....	32
2.6. Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση προϊόντων PCR .....	35
2.7. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού.....	35
2.7.1 Θεωρητικό μέρος .....	35
2.7.2 Πειραματικό μέρος .....	36
2.8. Ανάλυση του μεγέθους των ακραίων τμημάτων περιορισμού σε DNA αλληλουχητή .....	37
2.9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης T-RFLP .....	38
2.10. Ποσοτικοποίηση των <i>amoA</i> γονιδίων των AOB και των AOA με PCR πραγματικού χρόνου.....	38
2.10.1 Θεωρητικό μέρος.....	38
2.10.2 Πειραματικό μέρος .....	40
2.11. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς .....	41
2.11.1 Υλικά.....	41
2.11.2 Πειραματικό μέρος .....	42
2.12. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου .....	43
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	45
3.1. Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα εδάφους.....	45
3.2. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	45
3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης T-RFLP.....	46
3.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην αφθονία των AOB και AOA με PCR πραγματικού χρόνου .....	58
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	63
4.1. Επίδραση στην δομή της κοινότητας των AOA και AOB .....	63
4.2. Επίδραση στην αφθονία των AOA και AOB.....	64
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	69

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Νιτροποίηση είναι η βιολογική οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) σε νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_3^-$ ). Το πρώτο βήμα της νιτροποίησης είναι η οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ). Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία γιατί η δραστηριότητά τους επηρεάζει τη γονιμότητα του εδάφους και την ποιότητα του υδάτινου και ατμοσφαιρικού περιβάλλοντος. Τα χημειολιθοαυτότροφα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria) και ανήκουν στα  $\beta$ -Proteobacteria και τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία (AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea) και ανήκουν στο φύλο Crenarchaeota είναι υπεύθυνα για την οξείδωση της αμμωνίας στα περισσότερα εδάφη.

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των πιθανών αλλαγών στη δομή και την αφθονία των κοινοτήτων των AOB και AOA, με τη χρήση των τεχνικών T-RFLP και PCR πραγματικού χρόνου αντίστοιχα, ύστερα από την εφαρμογή στο έδαφος συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά γεωργικά φάρμακα, τα Vydate® (oxamyl) και MCW-2 και δύο βιολογικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα, τα QL Agri® (εκχύλισμα από το δένδρο *Quillaja saponaria*) και το BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* 251).

Από τα τέσσερα γεωργικά φάρμακα που αξιολογήθηκαν, το BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* 251) ήταν το μόνο που προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη δομή της κοινότητας των AOB και λιγότερο εμφανείς αλλά επίσης σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των AOA. Επίσης, η εφαρμογή αυτού του σκευάσματος προκάλεσε σημαντικές μεταβολές και στον πληθυσμό των AOA και AOB κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος (90 ημέρες), που αποδόθηκαν σε άμεσο ανταγωνισμό με τον μύκητα ή έμμεσο ανταγωνισμό με ομάδες ετερότροφων μικροοργανισμών που ευνοούνται από την εφαρμογή του σκευάσματος στο έδαφος. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε υψηλότερος αριθμός αντιτύπων του γονιδίου *amoA* των AOA συγκριτικά με τα AOB με τον λόγο AOA/AOB να κυμαίνεται από 2 έως 28.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Τύχη γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Τα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία και έχουν ως στόχο την παρεμπόδιση, την καταστροφή ή την απώθηση φυτοπαράσιτων, καθώς και τη ρύθμιση της ανάπτυξης και εξέλιξης των φυτών. Η χρήση τους αποβλέπει στην αύξηση της παραγωγικότητας και των αποδόσεων στη γεωργία και στη βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων.

Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόζονται στο περιβάλλον με διάφορους τρόπους, όπως με ψεκασμούς των υπέργειων οργάνων των φυτών, με επένδυση και προστασία των σπόρων ή άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων και με επεμβάσεις στο έδαφος. Ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, και τις περιβαλλοντικές και εδαφικές συνθήκες, οι χημικές ενώσεις μεταφέρονται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών και διεργασιών. Η τύχη και η συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον είναι συνάρτηση ποικίλων αβιοτικών και βιοτικών αντιδράσεων. Ανεξάρτητα του τρόπου εφαρμογής τους, τα γεωργικά φάρμακα υπεισέρχονται σε διάφορες διαδικασίες συγκράτησης, μεταφοράς, απομάκρυνσης, μετασχηματισμού και αποδόμησης τους στο περιβάλλον (Ζιώγας, 2007).

Το έδαφος είναι ο τελικός αποδέκτης όλων των γεωργικών φαρμάκων και ο χρόνος που θα παραμείνουν στο εδαφικό περιβάλλον (υπολειμματική διάρκεια-εμμονή) εξαρτάται από τους παραπάνω μηχανισμούς. Τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να δεσμευτούν (**προσρόφηση**) στα ανόργανα και οργανικά κolloειδή του εδάφους, ή να αποδομηθούν με τη δράση αβιοτικών ή βιοτικών μηχανισμών ή να αποδομηθούν σε άλλα περιβάλλοντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αβιοτικής αποδόμησης είναι το φαινόμενο της **φωτόλυσης**, δηλαδή της φωτοχημικής διάσπασης του μορίου του γεωργικού φαρμάκου στην επιφάνεια του εδάφους, στην ατμόσφαιρα και τα επιφανειακά ύδατα με την επίδραση του φωτός και ιδιαίτερα της υπεριώδους ακτινοβολίας. Άλλες περιπτώσεις αβιοτικής αποδόμησης ενός ξενοβιοτικού μορίου στο εδαφικό περιβάλλον είναι διάφορες φυσικοχημικές αντιδράσεις, όπως οξειδώσεις, υδρολύσεις κ.α. που συμβαίνουν ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στην περίπτωση της βιολογικής διάσπασης του μορίου, παρατηρείται



αποδόμησή του με την επίδραση των μικροοργανισμών του εδάφους όπως βακτήρια, ακτινομύκητες, ζύμες και μύκητες. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως **βιοαποδόμηση**. Βέβαια, βιολογική αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να θεωρηθεί και ο μεταβολισμός του μορίου στους φυτικούς ιστούς ή τους ζωικούς οργανισμούς.

Όμως τα γεωργικά φάρμακα μπορεί, μέσω άλλων διεργασιών, να μεταφερθούν και να επηρεάσουν το περιβάλλον. Για παράδειγμα μπορεί να απομακρυνθούν με **εξάτμιση** προς την ατμόσφαιρα, ιδιαίτερα εάν πρόκειται για πτητικές ενώσεις, και να μεταφερθούν σε άλλες περιοχές με τη βοήθεια του αέρα και της βροχής. Μπορεί να **εκπλυθούν** προς τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα και να ρυπάνουν υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες, ή να μεταφερθούν με **απορροή** στα επιφανειακά ύδατα (ποτάμια, λίμνες, θάλασσες).

Η εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου είναι ιδανική όταν η απαιτούμενη ποσότητα δραστικής ουσίας καταλήγει, χωρίς να παρασυρθεί, ακριβώς στον προκαθορισμένο στόχο, εμμένει στο στόχο διατηρώντας την προκαθορισμένη της συγκέντρωση και για την προκαθορισμένη χρονική διάρκεια και κατόπιν αποδομείται πλήρως, παράγοντας προϊόντα αβλαβή για τους άλλους οργανισμούς.

## **1.2. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους**

Με την αυξανόμενη χρήση των γεωργικών φαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία, το θέμα της επίδρασης τους στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και στις διεργασίες που οι μικροοργανισμοί επιτελούν, έχει λάβει μεγάλη προσοχή (Andrea et al., 2000; Baxter and Cummings, 2008). Η ποσότητα από τα εφαρμοζόμενα γεωργικά φάρμακα που καταλήγει στους οργανισμούς-στόχους είναι περίπου 0,1%, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα ρυπαίνει το περιβάλλον (έδαφος, νερό, ατμόσφαιρα) (Carriger et al., 2006; Pimentel, 1995). Τα γεωργικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εδάφους και τις μεταβολικές τους δραστηριότητες (Singh and Walker, 2006) και μπορεί να επηρεάσουν τη φυσιολογική και βιοχημική τους συμπεριφορά.

Η μικροβιακή βιομάζα είναι ένα σημαντικός δείκτης της μικροβιακής δραστηριότητας και δίνει μια άμεση εκτίμηση της σχέσης μεταξύ μικροβιακών δραστηριοτήτων και μετατροπής των διαφόρων μορφών των θρεπτικών ουσιών

ή άλλων οικολογικών διεργασιών (Schultz and Urban, 2008). Πολλές πρόσφατες μελέτες δείχνουν τις δυσμενείς επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή βιομάζα και στην αναπνοή του εδάφους (Pamprulha and Oliveira, 2006; Zhou et al., 2006). Γενικά, συνήθως μείωση στην αναπνοή του εδάφους αντανακλά μείωση στη μικροβιακή βιομάζα (Chen et al., 2001; Klose and Ajwa, 2004) ενώ αντίθετα αύξηση της αναπνοής δείχνει συνήθως αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού (Haney et al., 2000; Wardle et al., 1994).

Μερικές ομάδες μικροοργανισμών είναι ικανές να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών, ενώ οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι τοξικές για άλλους μικροοργανισμούς (Johnsen et al., 2001). Κάποιες φορές, η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί να μειώσει την μικροβιακή ποικιλότητα αλλά να αυξήσει την λειτουργική ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων (Wang et al., 2006) ή μπορεί να προκαλέσει αντιστρέψιμες διεγερτικές ή ανασταλτικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Pamprulha and Oliveira, 2006). Επίσης, η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί να αναστείλει ή να σκοτώσει συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών και να ενισχύσει άλλες αριθμητικά με την απελευθέρωσή τους από τον ανταγωνισμό. Για παράδειγμα, ο Chen και συνεργάτες (2001) ανέφεραν ότι η εφαρμογή μυκητοκτόνων σκοτώνει ή αναστέλλει τη δραστηριότητα ορισμένων μυκήτων με αποτέλεσμα να παρατηρείται γρήγορη αύξηση της βακτηριακής δραστηριότητας.

Μερικές φορές, ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός επηρεάζεται από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων αλλά μετά από ένα χρονικό διάστημα εγκλιματισμού, ο πληθυσμός επιστρέφει στο αρχικό επίπεδο ή ακόμα μπορεί και να αυξηθεί (Fließbach and Mader, 2004; Niewiadomska, 2004). Αυτό είναι μία ένδειξη αλλαγών στις μικροβιακές καταβολικές ικανότητες που μπορεί να οφείλεται είτε στην επαγωγή της ικανότητας διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων είτε σε μια αλλαγή μέσα στη μικροβιακή κοινότητα.

### **1.3. Επιδράσεις βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους**

Πρόσφατα, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στα βιολογικά γεωργικά φάρμακα ως μία εναλλακτική λύση των συνθετικών για τον έλεγχο των φυτοπαρασίτων (Wang et al., 2007). Τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα μπορεί να έχουν ως

δραστικό συστατικό έναν μικροοργανισμό (βακτήρια, μήκητες, ιοί) ή ουσίες βοτανικής ή βιολογικής προέλευσης. Παρ' όλα αυτά ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση αυτών στη σύσταση, δομή και λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Η Σπύρου και συνεργάτες (2009) μελέτησαν την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων βοτανικής προέλευσης *azadirachtin*, *quillaja* καθώς και αλεσμένων καρπών του φυτού *Melia azedarach* στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με τη μέθοδο προσδιορισμού λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γεωργικά φάρμακα αυτά όταν χρησιμοποιηθούν στις προτεινόμενες δόσεις δεν φαίνεται να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Ο Sameh και συνεργάτες (2007) μελέτησαν την επίδραση ενός βιολογικού γεωργικού φαρμάκου, του *Paenimyxin* (παράγεται από το *Paenibacillus* sp. strain B2), στη γενετική δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Παρατήρησαν ότι είχε παροδική επίδραση στις βακτηριακές κοινότητες, καθώς καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε μετά από 7, 14 και 28 ημέρες σε σύγκριση με τη μεταχείριση χωρίς γεωργικό φάρμακο.

#### **1.4. Γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία**

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά γεωργικά φάρμακα, τα *Vydate®* (*Oxamyl*) και *MCW-2* και δύο βιολογικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα, τα *QL Agri®* (εκχύλισμα από το δένδρο *Quillajia saponaria*) και *BIOACT®* (στέλεχος 251 του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*) προκειμένου να διαπιστωθεί αν προκαλούν μεταβολές στη δομή και την αφθονία των κοινοτήτων των βακτηρίων και των αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία.

##### **Vydate® (Oxamyl)**

Το *oxamyl* είναι καρβαμιδικό νηματώδοκτόνο-εντομοκτόνο και εισήχθηκε στη γεωργική πράξη το 1974 με το εμπορικό όνομα *Vydate®*. Παρουσιάζει πλήρη διασυστηματική κίνηση (ανοδική και καθοδική) και διπλή δράση (επαφής και στομάχου). Καταπολεμά τους νηματώδεις και συγχρόνως έντομα φυλλώματος και ακάρεα ως εξής: όταν εφαρμόζεται στο έδαφος καταπολεμά τους νηματώδεις και μετακινούμενο στο φύλλωμα διαμέσου τη διαπνοής καταπολεμά έντομα και ακάρεα. Όταν ψεκάζεται στο φύλλωμα καταπολεμά

έντομα φυλλώματος και ακάρεα. Το oxamyl εφαρμόζεται στις εξής καλλιέργειες: εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα, μπανάνες, καρότο, τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα, αγγούρι, κολοκύθι, πατάτα, καπνός.

Το oxamyl έχει μικρό χρόνο παραμονής στο έδαφος με χρόνο ημιζωής από 4-20 ημέρες (Wauchore et al., 1992). Διασπάται από αερόβια και αναερόβια βακτήρια (Wagenet, 1985). Υδρολύεται γρήγορα σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη και πιο αργά σε όξινα (U.S. Environmental Protection Agency 1987). Δεν προσροφάται εύκολα στο έδαφος αλλά εκπλύνεται εύκολα (Wauchore et al., 1992, U.S. Environmental Protection Agency 1987). Η προσρόφησή του είναι μεγαλύτερη σε εδάφη με μεγάλο ποσοστό οργανικής ύλης ενώ σε αμμοπηλώδη εδάφη είναι ασθενής. Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της προσρόφησης (Wagenet, 1985.)

### **MCW-2**

Το MCW-2 είναι ένα νέο γεωργικό φάρμακο που έχει νηματωδοκτόνο δράση και πολύ χαμηλότερη τοξικότητα από ότι τα οργανοφωσφορικά ή καρβαμιδικά νηματωδοκτόνα (Oka et al., 2008). Το MCW-2 αυτή την στιγμή βρίσκεται προς αξιολόγηση για ένταξη στην λίστα των προϊόντων με έγκριση χρήσης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Annex I EK 91/414). Παρουσιάζει, επίσης, χαμηλό δυναμικό έκπλυσης στο έδαφος λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του στο νερό και του σχετικά μικρού χρόνου ημιζωής του στο έδαφος (Oka et al., 2008).

### **QL Agri® (Εκχύλισμα του φυτού *Quillaja saponaria*)**

Το δέντρο *Quillaja saponaria* είναι ένα αειθαλές δέντρο που ανήκει στην οικογένεια Quillajaceae και απαντάται στη Χιλή. Το υδατικό εκχύλισμα από το δέντρο αυτό περιέχει σαπωνίνες, πολυφαινόλες, άλατα και σάκχαρα και εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων και νηματωδών. Έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα του εκχυλίσματος του *Quillaja saponaria* στους νηματώδεις οφείλεται σε συνδυασμένη δράση των σαπωνινών και των πολυφαινολών (Martin and Magunacelaya, 2005). Το φυσικό αυτό εκχύλισμα που, επίσης προάγει την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών. Διατίθεται από την εταιρεία BASF με το εμπορικό όνομα QL Agri®.

### **BIOACT® *Paecilomyces lilacinus* strain 251**

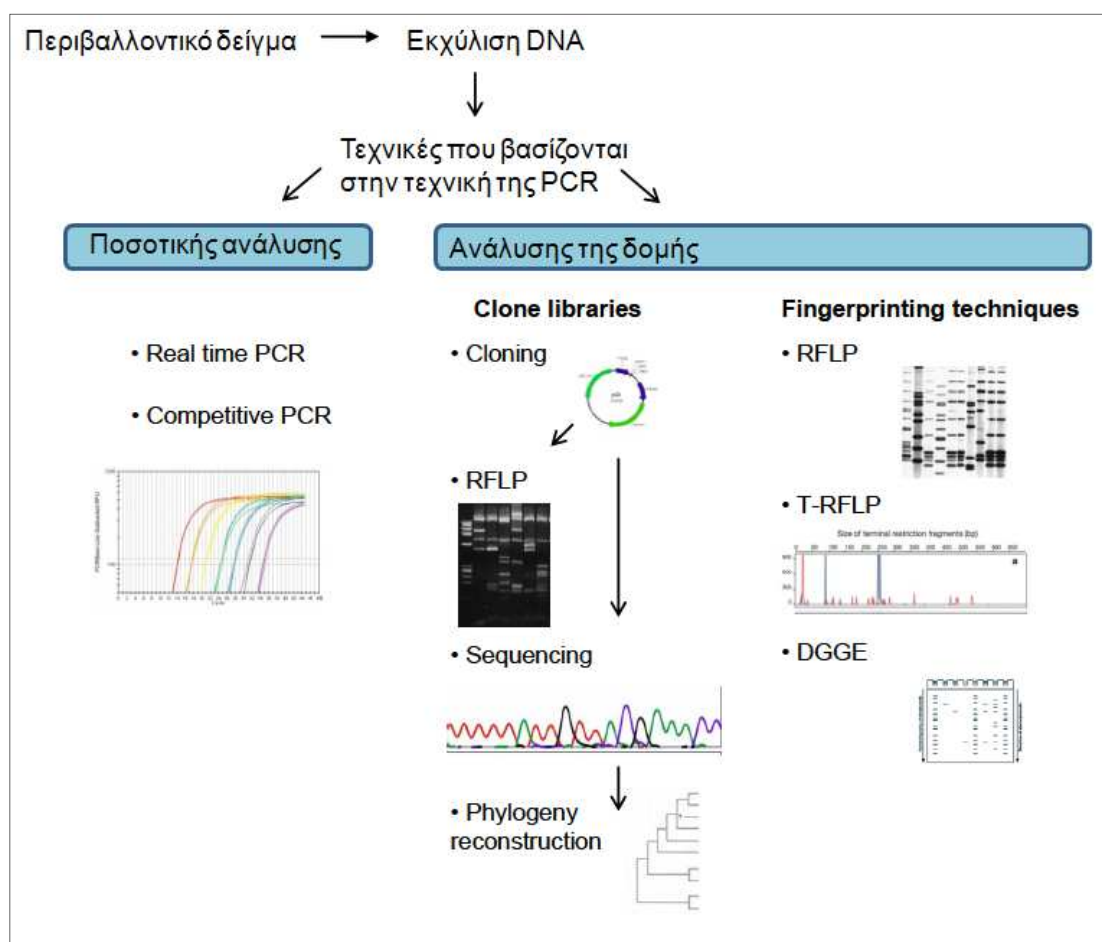
Το σκεύασμα BIOACT® περιέχει  $1 \times 10^{10}$  ζωντανά σπόρια του στελέχους 251 του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* σε φορέα κρυστάλλους γλυκόζης. Στελέχη του είδους *Paecilomyces lilacinus* αποτελούν παθογόνα ανώτερων ζωικών οργανισμών, παράσιτα εντόμων και νηματωδών που διαβιούν σαπροφυτικά στο έδαφος (Kiewnick 2006a). Ο μύκητας *Paecilomyces lilacinus* strain 251 χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των φυτοπαρσιτικών νηματωδών (Brand et al., 2004; Kiewnick and Sikora 2006b). Παρασιτεί και τελικά σκοτώνει τα αυγά, νεαρά και τα ενήλικα θηλυκά διαφόρων νηματωδών. Αντίθετα με πολλά άλλα στελέχη του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*, εργαστηριακές αναλύσεις έδειξαν ότι το στέλεχος 251 δεν παράγει τοξίνες (Mikami et al., 1989). Εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης για το BIOACT οδηγεί συνήθως σε επίπεδα πληθυσμού  $10^6$  σπορίων μύκητα/g εδάφους που είναι απαραίτητα για επαρκή έλεγχο των φυτοπαθογόνων νηματωδών. Μελέτες που έχουν γίνει με το συγκεκριμένο σκεύασμα έδειξαν ότι ο πληθυσμός του μύκητα μειώνεται σταδιακά και 6-8 εβδομάδες μετά την εφαρμογή φθάνει σε επίπεδα  $10^3$  κύτταρα/g εδάφους (Roumpros, 2005). Εξαιτίας της μη-εμμονής τους στο έδαφος προτείνεται στους χρήστες η εφαρμογή να επαναλαμβάνεται κάθε έξι εβδομάδες. Τα σκευάσματα του μύκητα διατίθενται στην αγορά με τις ονομασίες MeloConw WG, BioACT WT, Nemachek (U.S. Environmental Protection Agency, 2005).

#### **1.5. Τεχνικές για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους**

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες **(i) στις μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών και (ii) στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους**. Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση (van Elsas et al., 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Balestra & Misaghi, 1997; Sait et al., 2002). Το κυριότερο μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στην καλλιέργεια είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν

μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 95-99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Borneman et al., 1996). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al., 2000).

Η ανάπτυξη των μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορεί να δώσουν πληροφορίες για τη δομή (π.χ. βιβλιοθήκες κλώνων, T-RFLP, DGGE) ή για την αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων (real-time PCR, competitive PCR) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Συχνά χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές για τη μελέτη της δομής και της πικνότητας των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η δημιουργία **βιβλιοθηκών κλώνων** παρέχει λεπτομερείς φυλογενετικές πληροφορίες για την μικροβιακή κοινότητα ενός περιβαλλοντικού δείγματος,

αρκεί να ελεγχθεί επαρκής αριθμός κλώνων. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία και επομένως δεν είναι κατάλληλη για τις μελέτες που απαιτείται ανάλυση πολλών περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (**T-RFLP**, Terminal Restriction Fragment Polymorphisms) είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την ενίσχυση με την τεχνική της PCR του γονιδίου που μας ενδιαφέρει με τη χρήση ενός ή και των δύο εκκινητών σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική, την πέψη των προϊόντων της PCR με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και την ανίχνευση των ακραίων τμημάτων περιορισμού σε αυτόματο σύστημα αλληλούχισης DNA. Το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας και αναλύεται με ειδικά προγράμματα. Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο ηλεκτροφοριογράφημα) παρέχει πληροφορίες για την ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα. Η μέθοδος T-RFLP είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Clement et al., 1998; Liu et al., 1997). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη των νιτροκοποιητικών και απονιτροποιητικών βακτηρίων σε διάφορα περιβάλλοντα (Castro-Gonzalez et al., 2005; Horz et al., 2000).

Μια από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (**DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer et., 1993). Η μέθοδος DGGE έχει την ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός DNA τμήματος αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από (i) τους

δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπεται από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός PCR εκκινήτη που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανakλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών. Το DGGE χρησιμοποιείται στη μικροβιακή οικολογία για τη μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (Donner et al., 1996) και έχει χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία (Backman et al., 2003; Juretschko et al., 1998)

Η **PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)** χρησιμοποιείται στη μικροβιακή οικολογία για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μέσω της μέτρησης του αριθμού αντιγράφων ενός γονιδίου. Στην απλή PCR, ελέγχεται μόνο η τελική συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης μέσω φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο DNA. Στην PCR πραγματικού χρόνου η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται σε όλους τους κύκλους ενίσχυσης με την χρήση φθορίζουσων χρωστικών. Αυτές οι χρωστικές προσδένονται με τα προϊόντα ενίσχυσης χωρίς να τα καταστρέφουν έτσι ώστε η ενίσχυση τους να μπορεί να συνεχιστεί. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας αντανakλά τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η μη ειδική παρεμβαλλόμενη χρωστική SYBR green (Wittwer et al., 1997) και οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές TaqMan (Holland et al., 1991). Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος προσδιορίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ενώ στη

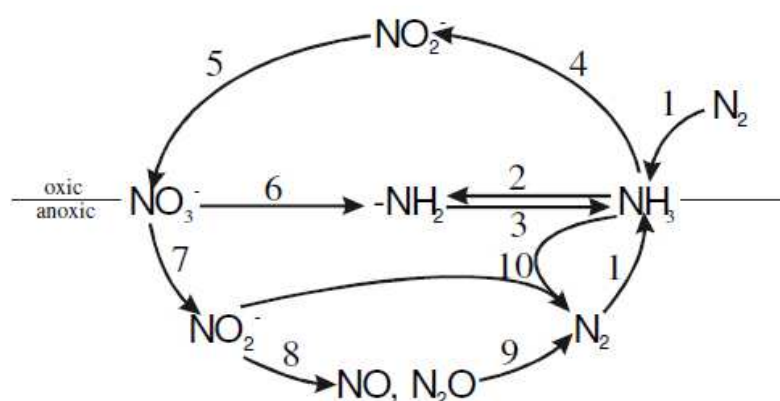


σχετική ποσοτικοποίηση οι αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου εκφράζονται σχετικά με τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου αναφοράς.

Οι πρώτες εφαρμογές της PCR πραγματικού χρόνου στη μικροβιακή οικολογία αναφέρονται σε τρία άρθρα που δημοσιεύτηκαν τον Νοέμβριο του 2000, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ανιχνευτές TaqMan στοχεύοντας το 16S rRNA γονίδιο (Becker et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Takai & Horikoshi, 2000). Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των γονιδίων 16S rRNA δεν μπορεί να μετατραπεί σε αριθμό κυττάρων καθώς ο ακριβής αριθμός αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου σε κάθε είδος ποικίλει (Klarrenbach et al., 2000). Επιπλέον η PCR πραγματικού χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση λειτουργικών γονιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα όπως είναι αυτά που συμμετέχουν στην οξείδωση της αμμωνίας (Okano et al., 2004; Treusch et al., 2005; Leininger et al., 2006) και στην απονιτροποίηση (Smith et al., 2007)

## 1.6. Κύκλος του αζώτου

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία στη ζωή καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών ενώσεων. Επίσης, είναι το πιο άφθονο άτομο της ατμόσφαιρας (78% του συνολικού όγκου) όπου και βρίσκεται με τη μορφή του μοριακού αζώτου ( $N_2$ ). Στη φύση, αρκετές από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του αζώτου πραγματοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά από μικροοργανισμούς (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Κύκλος του αζώτου. (1) Αζωτοδέσμευση (2) αφομοίωση αμμωνίας (3) αμμωνιοποίηση (4) αερόβια οξείδωση αμμωνίας (5) οξείδωση νιτρώδων ιόντων ( $NO_2^-$ ) (6) αφομοίωση νιτρικών ιόντων ( $NO_3^-$ ) (7,8,9) απονιτροποίηση διαμέσου νιτρώδων ιόντων ( $NO_2^-$ ), μονοξειδίου του αζώτου ( $NO$ ) και νιτρώδους οξειδίου ( $N_2O$ ) (10) αναερόβια οξείδωση αμμωνίας

Το μοριακό άζωτο μπορεί να δεσμευτεί από την ατμόσφαιρα από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και να μετατραπεί σε αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) (Εικόνα 2, μονοπάτι 1). Η διαδικασία αυτή (**αζωτοδέσμευση**) είναι σημαντική γιατί παρέχει αμμωνία για τα φυτά και τα ζώα. Το άζωτο με τη μορφή της αμμωνίας μπορεί να **αφομοιωθεί** στην οργανική ύλη (Εικόνα 2, μονοπάτι 2). Στη σύγχρονη γεωργία, πρόσθετη αμμωνία παρέχεται με λιπάσματα που προέρχονται από τη βιομηχανική δέσμευση του  $\text{N}_2$ . Επιπλέον, η αμμωνία μπορεί να προέλθει από τη μικροβιακή μετατροπή των οργανικών μορφών του αζώτου σε αμμωνία μια διεργασία γνωστή ως **αμμωνιοποίηση** (Εικόνα 2, μονοπάτι 3). Στο έδαφος, η αμμωνία είναι κυρίως δεσμευμένη στα σωματίδια αργίλου ιδίως με την μορφή  $\text{NH}_4^+$ , όπου και είναι διαθέσιμη για χρησιμοποίηση.

Σε αερόβιες συνθήκες, η αμμωνία δεν είναι σταθερή και μετατρέπεται σε νιτρικά ιόντα από τα νιτροποιητικά βακτήρια στο έδαφος και στα υδάτινα περιβάλλοντα (Εικόνα 2, μονοπάτια 4-5). Η μικροβιακή οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) και νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντα ονομάζεται **νιτροποίηση**. Η νιτροποίηση καταλύεται από δύο ομάδες βακτηρίων. Τα αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία ή νιτρωδοβακτήρια (AOB, ammonia-oxidizing bacteria) και παράγουν νιτρώδη (Εικόνα 2, μονοπάτι 4), και τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη σε νιτρικά ιόντα (Εικόνα 2, μονοπάτι 5) και ονομάζονται νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB, nitrite-oxidizing bacteria). Οι δύο αυτές ομάδες μικροοργανισμών ονομάζονται νιτροποιητές. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εκτός από τα βακτήρια σημαντικό ρόλο στην νιτροποίηση παίζουν και μικροοργανισμοί που ανήκουν στο φύλο Crenarchaeota (Konneke et al., 2005; Hansel et al., 2008; Tourna et al., 2008). Σε αντίθεση με την αμμωνία και το κατιόν αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ), τα νιτρώδη ιόντα βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στα αερόβια περιβάλλοντα και σπάνια συσσωρεύονται στο έδαφος. Εξαιτίας της τοξικότητας των  $\text{NO}_2^-$  για τους οργανισμούς, η διατήρησή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη. Το τελικό προϊόν της νιτροποίησης, τα νιτρικά ιόντα, δεν συγκρατούνται από το έδαφος και καταλήγουν σε υπόγεια ή επιφανειακά ύδατα.

Κάποιοι οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιούν εκτός από την αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα ως πηγή αζώτου για την αύξησή τους (Εικόνα 2, μονοπάτι 6). Τα νιτρικά ιόντα επίσης είναι υπόστρωμα για την **απονιτροποίηση** η οποία

γίνεται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Εικόνα 2, μονοπάτια 7-9). Τα απονιτροποιητικά βακτήρια παράγουν από τα νιτρικά ιόντα, μοριακό άζωτο ( $N_2$ ) και τα αέρια μονοξείδιο του αζώτου (NO) και νιτρώδες οξείδιο ( $N_2O$ ). Εκτός από την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας, έχει περιγραφεί και η αναερόβια οξείδωση της (Anammox, ANaerobic AMMonium OXidation) (Jetten, 2001). Τα βακτήρια που πραγματοποιούν αυτή τη διεργασία ανήκουν στο φύλο Planctomycetes και μετατρέπουν τα νιτρώδη ιόντα και την αμμωνία άμεσα σε  $N_2$  (Εικόνα 2, μονοπάτι 10).

Οι μικροβιακές μετατροπές των διαφόρων μορφών του αζώτου έχουν μεγάλη σημασία για την γονιμότητα του εδάφους και την ποιότητα του υδάτινου και ατμοσφαιρικού περιβάλλοντος.

### **1.7. Μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την οξείδωση της αμμωνίας**

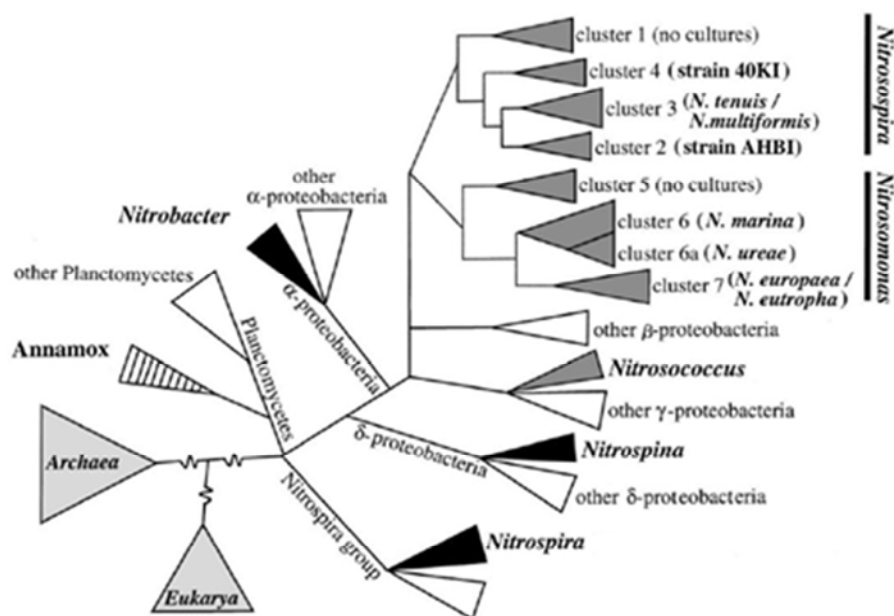
Μέχρι πρόσφατα τα χημειολιθοαυτότροφα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (AOB) και που ανήκουν στο φύλο Proteobacteria θεωρούνταν οι κύριοι μικροοργανισμοί για την αυτότροφη οξείδωση της αμμωνίας (Purkhold et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες βασισμένες σε μεταγενωμικές τεχνικές και σε τεχνικές καλλιέργειας έδειξαν ότι μικροοργανισμοί του φύλου Crenarchaeota παίζουν σημαντικό ρόλο στη νιτροποίηση σε εδάφη και υδάτινα οικοσυστήματα (Konneke et al., 2005; Hansel et al., 2008; Tourna et al., 2008). Επίσης, αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας επιβεβαιώθηκε σε πιλοτικό σταθμό επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Mulder et al. 1995). Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι η αναερόβια διαδικασία πραγματοποιείται από βακτήρια (van de Graaf et al., 1995) που ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του φύλου Planctomycetes (Strou et al., 1999).

#### **1.7.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria)**

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος φυλογενετικός δείκτης για τη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων είναι το 16S rRNA γονίδιο. Η ενίσχυση και ανάλυση του γονιδίου αυτού χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη της ποικιλομορφίας των AOB (Bothe et al., 2000; Kowalchuk and Stephen 2001; Juretschko et al., 1998; McCaig et al., 1994; Voytek and Ward 1995). Σύμφωνα με τις αλληλουχίες των 16S rRNA γονιδίων τα AOB χωρίζονται σε δύο μονοφυλετικές γενεαλογικές γραμμές (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2000, 2003; Teske et al., 1994). Η

πρώτη γενεαλογική γραμμή ανήκει στα β-Proteobacteria και αποτελείται από βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* (συμπεριλαμβανομένου του *Nitrosococcus mobilis*) και του γένους *Nitrospira* (συμπεριλαμβανομένου των *Nitrosolobus* και *Nitrosovibrio*). Η δεύτερη γενεαλογική γραμμή, ανήκει στα γ-Proteobacteria και περιλαμβάνει τα είδη *Nitrosococcus oceani* και *Nitrosococcus halophilus*. Τα δύο αυτά είδη έχουν βρεθεί μόνο σε θαλάσσια περιβάλλοντα (Ward and O'Mullan 2002).

Τα AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria έχουν καταταχθεί σε επτά ομάδες (clusters) με βάση φυλογενετικές αναλύσεις του 16S rRNA γονιδίου (Εικόνα 3) (Kowalchuk and Stephen, 2001). Τα πιο συχνά απαντούμενα AOB σε εδάφη και υδάτινα περιβάλλοντα ανήκουν στα: cluster 2 (είδη του γένους *Nitrospira* σε όξινο έδαφος), cluster 3 (είδη του γένους *Nitrospira* συγγενικά με καλλιεργήσιμα στελέχη συμπεριλαμβανομένου του πρώην γένους *Nitrosolobus*), cluster 4 (είδη του γένους *Nitrospira* συγγενικά με το στέλεχος 40KI), cluster 6 (είδη του γένους *Nitrosomonas* προσαρμοσμένα σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας όπως το είδος *Nitrosomonas oligotropha*) και cluster 7 (είδη του γένους *Nitrosomonas* συγγενικά με *N. europaea* και *N. eutropha*, προσαρμοσμένα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνίας).



**Εικόνα 3.** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16S rRNA αλληλουχίες των διαφόρων οργανισμών που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου. Τα αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία φαίνονται με σκούρο γκρι, τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές. Τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία δεν δείχνονται (Kowalchuk and Stephen, 2001).

Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης του 16S rRNA γονιδίου ως μοριακού δείκτη είναι ότι δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη φυσιολογία των οργανισμών-στόχων (Calvo and Garcia-Gil 2004; Kowalchuk and Stephen 2001) και μια μικρή έλλειψη εξειδίκευσης μπορεί να μετατοπίσει το φάσμα των αλληλουχιών που ενισχύονται με την PCR προς φυλογενετικά συγγενικούς αλλά φυσιολογικά και οικολογικά διαφορετικούς οργανισμούς (Bothe et al., 2000; Junier et al., 2008). Μια εναλλακτική προσέγγιση για τις οικολογικές μελέτες αποτελούν οι λειτουργικοί δείκτες όπως είναι τα γονίδια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια π.χ. οξειδωση αμμωνίας (Rotthauwe et al., 1997). Άλλος λόγος για την χρησιμοποίηση λειτουργικών γονιδίων ως δείκτες είναι ότι κάποιες μικροβιακές ομάδες δεν είναι αριθμητικά κυρίαρχες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία, και αρκετές είναι δύσκολο να ανιχνευθούν μέσω του 16S rRNA γονιδίου.

Η οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη είναι μια διαδικασία δύο βημάτων που καταλύεται από δύο διαφορετικά ενζυμικά σύμπλοκα. Στο πρώτο βήμα η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_3 + 2\text{e}^- + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ ) (Hollocher et al., 1981) από το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO, Ammonia Mono Oxygenase) (Hooper et al., 1997). Στο δεύτερο βήμα, η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγία της υδροξυλαμίνης (HAO) ( $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 4\text{e}^- + 5\text{H}^+$ ) (Sayavedra-Soto et al., 1994). Το δεύτερο βήμα της οξειδωσης της αμμωνίας μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα (Kumar and Nicholas 1982; Hollocher et al., 1982). Η χαμηλή παραγωγή ενέργειας από την οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη κάνει τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία να αναπτύσσονται εξαιρετικά αργά.

Το ένζυμο AMO κωδικοποιείται από τα γονίδια *amoA* (McTavish et al., 1993), *amoB* (Bergmann and Hooper 1994), *amoC* (Klotz et al., (1997) που βρίσκονται σε ένα οπερόνιο με τη δομή *amoCAB* (Chain et al., 2003; Klotz et al., 2006; Norton et al., 2002, 2008; Stein et al., 2007). Πολλαπλά αντίγραφα του οπερονίου *amoCAB* υπάρχουν στο γένωμα των AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria (Chain et al., 2003; Norton et al., 2008; Stein et al., 2007), ενώ ένα αντίγραφο στο γένωμα των AOB που ανήκουν στα γ-Proteobacteria (Klotz et al., 2006). Για την μελέτη της ποικιλότητας των AOB χρησιμοποιείται ένα

τμήμα του γονιδίου *amoA* (Rotthauwe et al., 1997), το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα που περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έχει βρεθεί ότι το μικρό αυτό τμήμα (περίπου 450bp) το οποίο είναι ιδιαίτερα συντηρημένο παρέχει χαμηλότερης διακριτικότητας ανάλυση σε σχέση με το 16S rRNA γονίδιο (Koops et al., 2003; Purkhold et al., 2003). Όμως, για τις περιβαλλοντικές μελέτες το πλεονέκτημα της υψηλότερης εξειδίκευσης με την χρήση του *amoA* υπερκαλύπτει αυτό το μειονέκτημα.

Το μεγαλύτερο μέρος της γνώσης που αποκτήθηκε για τους βιοχημικούς μηχανισμούς της οξειδωσης της αμμωνίας από τα AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria καθώς επίσης και για τη γενετική αυτής της ομάδας μικροοργανισμών προέρχεται από μελέτες του *Nitrosomonas europaea* (Arp et al., 2002), το γένωμα του οποίου έχει πλήρως αλληλουχηθεί (Chain et al., 2003). Μετά την δημοσίευση της πρώτης *amoA* αλληλουχίας του *N.europaea* (McTavish et al., 1993) ο αριθμός των αλληλουχιών που είναι πλέον διαθέσιμες στις βάσεις δεδομένων έχει αυξηθεί σημαντικά. Επίσης, έχουν σχεδιαστεί αρκετά ζευγάρια εκκινητών για την ενίσχυση των *amoA* αλληλουχιών (Hoshino et al., 2001; Nold et al., 2000; Norton et al., 2002; Okano et al., 2004; Purkhold et al., 2000;).

### 1.7.2 AOB στο περιβάλλον

Η δομή της κοινότητας των AOB έχει μελετηθεί σε διάφορα περιβάλλοντα. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει σε εδάφη, όπου το pH βρέθηκε να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των AOB και στις βιογεωχημικές διαδικασίες που πραγματοποιούν. Έχει αποδειχθεί ότι η οξειδωση της αμμωνίας σπάνια συμβαίνει σε τιμές pH κάτω από 7 (Burton and Prosser 2001; Gieseke et al., 2006). Ωστόσο, μια σειρά μελετών αποκάλυψε την ύπαρξη διαφορετικών ομάδων AOB σε εδάφη με pH μεταξύ 4,5 και 7,5 (Nicol et al., 2008). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μια τάση κυριαρχίας των βακτηρίων του γένους *Nitrosospira* του cluster 3 σε γεωργικά εδάφη με ουδέτερο pH και των βακτηρίων του γένους *Nitrosospira* του cluster 2 σε όξινα εδάφη χρησιμοποιώντας το 16S rRNA γονίδιο (Kowalchuk et al., 1997; Stephen et al., 1996) ή το γονίδιο *amoA* ως δείκτες (Nugroho et al., 2007).

Η μελέτη των AOB στα θαλάσσια οικοσυστήματα με τη χρήση των γονιδίων 16S rRNA και *amoA* έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι διαδεδομένοι σε παράκτιες περιοχές, ωκεανούς ακόμα και σε πολικά περιβάλλοντα (Hollibaugh et al., 2002; O'Mullan and Ward 2005; Phillips et al., 1999; Freitag and Prosser 2004). Επίσης, τα AOB έχουν μελετηθεί και σε άλλα ακραία περιβάλλοντα. Μοριακές μελέτες βασισμένες στα γονίδια 16S rRNA και *amoA* σε διαφορετικά περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας αποκάλυψαν την κυριαρχία των ειδών *N. europaea* και *N. eutropha* στην λίμνη Mono (Carini and Joye 2008) και των *Nitrosomonas halophila*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas communis* στον υγρότοπο Salar de Huasco (Dorador et al., 2008). Επίσης, εκτός από την ύπαρξη AOB σε περιβάλλοντα με χαμηλές θερμοκρασίες (Hollibaugh et al., 2002), μελέτες για τη νιτροποίηση σε υψηλές θερμοκρασίες περιέγραψαν μια κοινότητα με κυρίαρχες τις αλληλουχίες του γένους *Nitrosospira* μέσω της τεχνικής του ανοσοφθορισμού (Lebedeva et al., 2005). Η εύρεση *amoA* αλληλουχιών σε όξινες θερμές πηγές σε ορυχείο χρυσού αποκάλυψε τη μεγάλη προσαρμοστικότητα συγκεκριμένων AOB σε ακραίες συνθήκες (Hirayama et al., 2005).

### 1.7.3 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea)

Εκτός από τα AOB, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι μέλη του φύλου Crenarchaeota παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωση της αμμωνίας σε εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα. Οι πρώτες ενδείξεις της συμμετοχής των Crenarchaeota στη νιτροποίηση προέρχονται από δύο διαφορετικές μεταγενωμικές μελέτες σε έδαφος (Treusch et al., 2005) και θαλασσινό νερό (Venter et., 2004). Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν την ύπαρξη πιθανών γονιδίων που εμπλέκονται στην οξειδωση της αμμωνίας σε γενωμικά τμήματα προερχόμενα από Crenarchaeota που δεν έχουν καλλιεργηθεί. Η ύπαρξη αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία επιβεβαιώθηκε με την καλλιέργεια ενός αρχαίου του *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* που απομονώθηκε από ενυδρείο θαλασσινού νερού (Konneke et al., 2005). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η καλλιέργεια άλλων δύο θερμόφιλων αρχαίων, του *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* (de la Torre et al., 2008) και του *Candidatus Nitrososphaera gargansis* (Hatzenpichler et al., 2008) από θερμοπηγές.

Μέχρι τώρα, τα AOA φαίνεται να μην σχηματίζουν ένα μονοφυλετικό κλάδο αλλά να ανήκουν σε διαφορετικές γενεαλογικές γραμμές μέσα στο φύλο Crenarchaeota. Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι διαφορετικές γενεαλογικές γραμμές αντανακλούν συγκεκριμένο επίπεδο οικολογικής διαφοροποίησης βασισμένο στο περιβάλλον (Nicol and Schleper, 2006). Μία σύγκριση των μελετών της ποικιλότητας με βάση τα γονίδια 16S rRNA και *amoA* των αρχαίων δείχνει μια ουσιαστική αντιστοιχία στην φυλογένεση των Crenarchaeota (Prosser and Nicol 2008). Ωστόσο, η ποικιλότητα με βάση το 16S rRNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την ποικιλότητα με βάση το *amoA* (Nicol and Schleper 2006; Prosser and Nicol 2008). Όμως, αφού τα AOA φαίνεται να μην αποτελούν ένα μονοφυλετικό κλάδο, η χρήση του γονιδίου 16S rRNA για την μελέτη τους δεν αποτελεί μια καλή προσέγγιση. Αρκετά ζευγάρια εκκνητών έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση το γονιδίου *amoA* των αρχαίων (Francis et al., 2005; Köhneke et al., 2005; Tourna et al., 2008; Treusch et al., 2005), επιτρέποντας την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίησή τους (Beman et al., 2008; Mincer et al., 2007).

#### **1.7.4 AOA στο περιβάλλον**

Μετά την απομόνωση του *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* και την επιβεβαίωση της ύπαρξης αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία (Köhneke et al., 2005) ακολούθησαν μελέτες οι οποίες αποκάλυψαν την ύπαρξη αρχαίων σε εδάφη (Leininger et al., 2006; Tourna et al., 2008) σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Karner et al., 2001; Ingalls et al., 2006) σε εκβολές ποταμών (Caffrey et al., 2007; Santoro et al., 2008) και σε πιο ακραία περιβάλλοντα (Hatzepichler et al., 2008). Η ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των βακτηρίων και των αρχαίων δείχνει ότι τα δεύτερα υπερτερούν αριθμητικά των πρώτων στα περισσότερα εδάφη και υδάτινα περιβάλλοντα (Leininger et al. 2006; Wuchter et al. 2006 Beman et al. 2008) αλλά και σε κάποια ακραία περιβάλλοντα (Reigstad et al. 2008).

Ο Leininger και συνεργάτες (2006) μελέτησαν την αφθονία του γονιδίου *amoA* σε δώδεκα παρθένα και γεωργικά εδάφη από τρεις κλιματικές ζώνες και βρήκαν ότι τα AOA υπερτερούσαν αριθμητικά των AOB. Μεγαλύτερη αφθονία των AOA παρατηρήθηκε και σε δυο εδάφη από την Κίνα με διαφορετικές



μεταχειρίσεις λίπανσης και με τιμές pH που κυμαίνονται από 3,7 σε 6 (He *et al.*, 2007) και 8,3 σε 8,7 (Shen *et al.*, 2008). Οι ιδιότητες του εδάφους και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων του pH του εδάφους, του μεγέθους των εδαφικών σωματιδίων, της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, της διαθεσιμότητας θρεπτικών, της υγρασίας και της συγκέντρωσης οξυγόνου επηρεάζουν σημαντικά την αφθονία και την ποικιλομορφία των AOA (Nicol *et al.*, 2003; He *et al.*, 2007). Οι Tourna και συνεργάτες (2008) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στις κοινότητες των AOB και AOA του εδάφους και παρατήρησαν ότι η θερμοκρασία δεν παρουσίαζε σημαντική επίδραση στην κοινότητα των AOB, αντίθετα υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στη δομή της κοινότητας των AOA ιδιαίτερα στη θερμοκρασία των 30°C. Το μέγεθος του πληθυσμού των AOB και AOA μεταβάλλεται σημαντικά ύστερα από την εφαρμογή λιπασμάτων (He *et al.*, 2007). Στη μεταχείριση με λίπανση αζώτου, καλίου, φωσφόρου συν της οργανικής λίπανσης ανιχνεύτηκε σημαντικά υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA με την διαφορά ότι σε όλες τις περιπτώσεις ο αριθμός αντιγράφων ήταν υψηλότερος για τα AOA σε σύγκριση με τα AOB. Ωστόσο, ερωτήσεις όπως το πώς οι αλλαγές στη δομή και στην αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων συνδέονται με την μικροβιακές δραστηριότητες και τους ρυθμούς οξειδωσης της αμμωνίας στο έδαφος πρέπει να απαντηθούν.

Εκτός από το έδαφος έχει βρεθεί ότι ο αριθμός του *amoA* γονιδίου των AOA είναι μέχρι και τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερος από τον αντίστοιχο των AOB στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Ingalls *et al.*, 2006; Wuchter *et al.*, 2006). Επίσης, AOA έχουν ανιχνευθεί και σε εκβολές ποταμών (Caffrey *et al.*, 2007). Τέλος, AOA έχουν ανιχνευθεί και σε ακραία περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες όπως είναι θερμοπηγές (Reigstad *et al.*, 2008) αλλά και σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες χαμηλές θερμοκρασίες όπως είναι ορεινές λίμνες (Dorador 2007; Jiang *et al.*, 2009) και νερά ωκεανών σε μεγάλα βάθη (Tamegai *et al.*, 2007).

### **1.7.5 Βακτήρια του φύλου Planctomycetes**

Η μελέτη και ταξινόμηση των αναερόβιων βακτηρίων που οξειδώνουν την αμμωνία έχει βασιστεί στο φυλογενετικό δείκτη 16S rRNA. Όπως και στα AOB, η

ανάλυση των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου των αναερόβιων βακτηρίων δείχνει ότι δημιουργούν ένα μονοφυλετικό κλάδο μέσα στο φύλο Planctomycetes. Αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας έχει παρατηρηθεί σε υδάτινα οικοσυστήματα (Penton et al., 2006) και σε εδάφη (Wickramasinghe et al., 2009). Αν και πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την αναερόβια οξειδωση στα υδάτινα περιβάλλοντα, μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί αρκετά σε εδάφη και σε ακραία περιβάλλοντα.

### **1.8. Στόχοι της παρούσας εργασίας**

α) Η μελέτη των πιθανών αλλαγών στη δομή των κοινοτήτων των AOB και AOA ύστερα από την εφαρμογή συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων σε εδάφη με τη χρήση της τεχνικής T-RFLP

β) Η αξιολόγηση των επιδράσεων συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στον πληθυσμό των AOB και AOA με ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA με τη χρήση PCR πραγματικού χρόνου.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά γεωργικά φάρμακα, τα Vydate® (Oxamyl) και MCW-2 και δύο βιολογικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα, τα QL Agri® (εκχύλισμα από το δένδρο *Quillajia saponaria*) και BIOACT® (στέλεχος 251 του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*). Τα παραπάνω γεωργικά φάρμακα εφαρμόστηκαν στα εδάφη σύμφωνα με τη συνιστώμενη δόση για την καταπολέμηση των νηματωδών στο έδαφος. Συγκεκριμένα:

- Προστέθηκαν 0,003 g από το σκεύασμα Vydate® (10% oxamyl SL) σε 2,3 kg εδάφους.
- Προστέθηκαν 0,005 g από το σκεύασμα MCW-2 (48% MCW) σε 2,3 kg εδάφους.
- Προστέθηκαν 0,012 g από το σκεύασμα QL Agri® (35% *Quillajia saponaria* extract, SL) σε 2,3 kg εδάφους.
- Προστέθηκαν 0,09 g από το σκεύασμα BioACT® (6% *P. lilacinus* spores WG) σε 2,3 kg εδάφους.

Τα εδάφη αναμίχθηκαν προσεκτικά αφού πρώτα η υγρασία τους προσαρμόστηκε στο 45% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού. Τα εδάφη διαχωρίστηκαν στη συνέχεια σε δείγματα των 50 g που τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης όπου και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι στους  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Πριν την εφαρμογή (0 ημέρες) και 5, 20, 45 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εξαγωγή DNA.

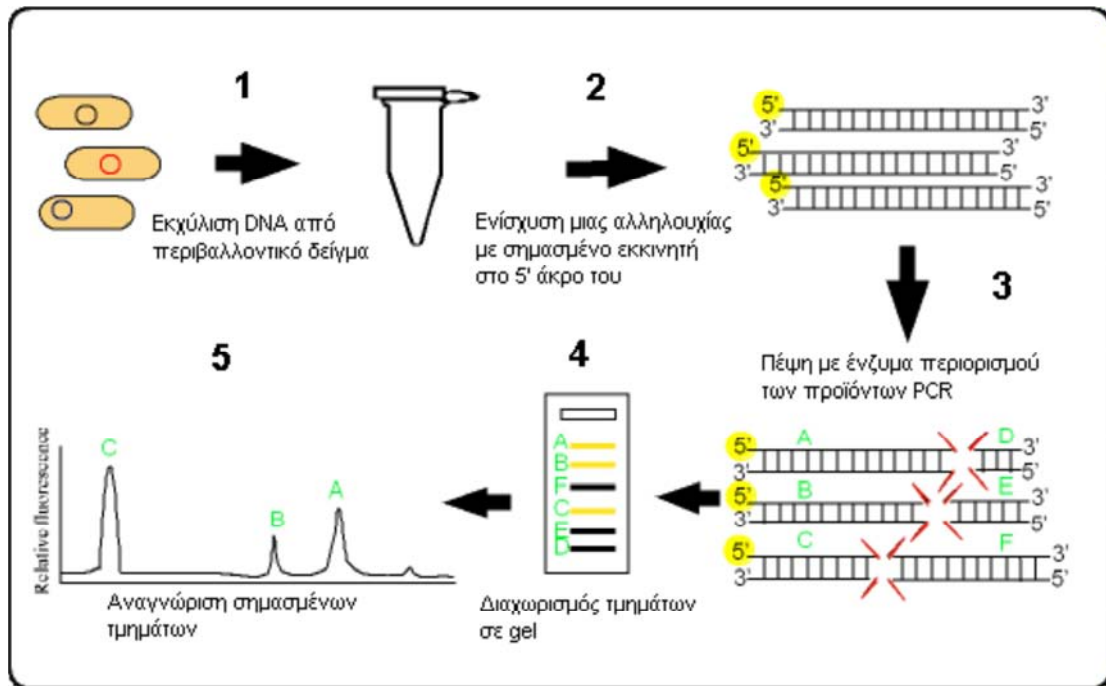
Τα χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα ανάλυσης του εδάφους πριν την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων

Ιδιότητες	Τιμές
pH	5.50
Οργανικός άνθρακας (%)	1.23
Άμμος (%)	71.0
Ιλύς (%)	19.0
Άργιλος (%)	10.0
Μηχανική σύσταση	Αμμοπηλώδες

## 2.2. Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου T-RFLP για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να παραληφθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Η Εικόνα 4 δείχνει τη διαδικασία της μεθόδου T-RFLP.



**Εικόνα 4.** Διαδικασία της μεθόδου T-RFLP

(1) Το DNA εκχυλίζεται από το περιβαλλοντικό δείγμα. (2) Το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με PCR και με εκκινητή σημασμένο στο 5' άκρο του με φθορίζουσα χρωστική. (3) Τα προϊόντα της ενίσχυσης είναι ίδιου ή παρόμοιου μεγέθους με το ένα άκρο τους σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική. Μετά τον καθαρισμό, ακολουθεί η πέψη των προϊόντων PCR με ένζυμο περιορισμού, η οποία παράγει τμήματα διαφορετικών μεγεθών (A-F). (4) Τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ή με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. (5) Με τη βοήθεια Laser ανιχνεύονται τα σημασμένα τμήματα και παράγεται ένα προφίλ με βάση το μέγεθος των τμημάτων.

## 2.3. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους

### 2.3.1 Θεωρητικό μέρος

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εξαγωγή του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA: **(i) η μέθοδος άμεσης λύσης** (Ogram et al., 1987) και **(ii) η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων** (Torsvik, 1980). Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων

στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό ή χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πολυφαινολικά, χουμικά οξέα ή πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες. Η παρουσία τέτοιων ουσιών στο εκχυλισμένο DNA του εδάφους μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR. Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Επίσης, διάφορα εμπορικά kit είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος.

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

### **2.3.2 Πειραματικό μέρος**

Εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε από τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση. Το DNA εκχυλίστηκε από 0,5 g εδάφους από κάθε δείγμα με τη χρήση του Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το kit χρησιμοποιεί τη μέθοδο της άμεσης λύσης και η λύση των κυττάρων γίνεται με συνδυασμό μηχανικών και χημικών μεθόδων. Για να διαπιστωθεί η ποιότητα και η ποσότητα των προϊόντων που πήραμε από την εκχύλιση έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.7%.

## **2.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης**

### **2.4.1 Θεωρητικό μέρος**

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό

τμημάτων DNA. Είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Η χρώση των τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με χρωστικές που προσδένονται στο DNA, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

#### **2.4.2 Υλικά**

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x (Tris-acetate-EDTA): 242 g Tris Base, 57.1 ml οξικό οξύ και 100 ml EDTA (0.5M, pH 8) προστίθενται σε 1 L dH<sub>2</sub>O
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 6x (Loading buffer): 5 ml γλυκερόλη, 1 ml Bromophenol blue, 0.5 ml 20x TAE και 3.5 ml ddH<sub>2</sub>O
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

#### **2.4.3 Πειραματικό μέρος**

Η ηλεκτροφόρηση του εκχυλισμένου DNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και των προϊόντων PCR σε πηκτές αγαρόζης 1 και 1,3%. Η πηκτή κάθε φορά παρασκευάστηκε διαλύοντας με βρασμό κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε 1x TAE. Στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Μετά τη στερεοποίηση του διαλύματος, η πηκτή εμβαιπίστηκε σε διάλυμα

1x TAE και φορτώθηκαν 5 μl δείγματος αναμειγμένα με 1 μl διάλυμα φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση των δειγμάτων και την παρακολούθηση της μετακίνησης τους στη πηκτή. Μετά την τοποθέτηση όλων των δειγμάτων και με τη βοήθεια τροφοδοτικού πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση στα 90V. Η παρατήρηση του DNA έγινε με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία.

## **2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

### **2.5.1 Θεωρητικό μέρος**

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

1. Ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοσταθερή και διατηρεί τη δρασικότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C.
2. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων), τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).
3. Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).
4. Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl<sub>2</sub>.
5. Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την πολυμεράση.
6. Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο της PCR, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές. Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Για την μέθοδο T-RFLP, η PCR πραγματοποιείται με έναν ή και τους δύο εκκινητές σημασμένους στο 5' άκρο τους με φθορίζουσα χρωστική. Στην περίπτωση που και οι δύο εκκινητές είναι σημασμένοι, χρησιμοποιούνται διαφορετικές χρωστικές. Διάφορες φθορίζουσες χρωστικές χρησιμοποιούνται για την σήμανση των εκκινητών όπως είναι οι: 6-FAM, ROX, TAMARA και HEX, με την 6-FAM να χρησιμοποιείται πιο πολύ. Στην παρούσα εργασία οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με έναν από τους δύο εκκινητές να φέρει τη φθορίζουσα χρωστική 6-FAM στο 5' άκρο του.

### 2.5.2 Υλικά

- DyNAzyme EXT DNA Polymerase, 1U/μl (Finnzymes)
- 10x Mg<sup>2+</sup>-free DyNAzyme EXT Buffer (Finnzymes)
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Finnzymes)
- Νουκλεοτίδια, dNTPs (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- Bovine Serum Albumin (BSA), 10mg/ml (New England Biolabs)
- Εκκινητές

**Πίνακας 2.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναφορά
<b>amoA-1F</b>	5'-FAM-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	Rotthauwe et al., 1997
<b>amoA-2R</b>	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3' K = G or T, S = G or C	

**Πίνακας 3.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναφορά
<b>Arch-amoAF</b>	5'-FAM-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'	Francis et al., 2005
<b>Arch-amoAR</b>	5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'	

### 2.5.3 Πειραματικό μέρος

#### Ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές amoA-1F και amoA-2R (Rotthauwe, 1997) με τον amoA-1F σημασμένο στο 5' άκρο του με τη χρωστική 6-FAM. Ο εκκινητής amoA-1F



στοχεύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στις θέσεις 332 με 349 και ο amoA-2R στοχεύει στις θέσεις 802 με 822 του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης που έχει δημοσιευτεί για την αλληλουχία του γονιδίου *amoA* του *Nitrosomonas europaea* (McTavish et al., 1993). Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είχε μέγεθος 491bp. Για κάθε μεταχείριση υπήρχαν 3 επαναλήψεις και για κάθε επανάληψη πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR έτσι ώστε να παραληφθεί αρκετό προϊόν για τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης. Τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φαίνονται στους Πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

**Πίνακας 4.** PCR αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x Mg <sup>2+</sup> -free)	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (10mM)	1 µl	200µM από το καθένα
Forward primer amoA-1F (20pmol/µl)	1 µl	0.2µM
Reverse primer amoA-2R (20pmol/µl)	1 µl	0.2µM
BSA (10µg/µl)	2 µl	400ng/µl
Polymerase (1U/µl)	1 µl	1U/50µl
DNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	36,5 µl	
Συνολικός όγκος	50 µl	

**Πίνακας 5.** Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	1min	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	56°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	1,5min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

## Ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ

Για την ενίσχυση τμήματος (περίπου 635bp) του γονιδίου *amoA* των αοα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoAF* και Arch-*amoAR* (Francis et al., 2005) με τον εκκινητή Arch-*amoAF* σηματοδοτούμενο στο 5' άκρο του με τη φθορίζουσα χρωστική 6-FAM. Για κάθε μεταχείριση υπήρχαν 3 επαναλήψεις και για κάθε επανάληψη πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις PCR έτσι ώστε να υπάρχει αρκετό προϊόν για τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης. Τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φαίνονται στους πίνακες 6 και 7.

**Πίνακας 6.** PCR αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x Mg <sup>2+</sup> -free)	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (10mM)	1 µl	200µM από το καθένα
Forward primer Arch- <i>amoAF</i> (20pmol/µl)	1 µl	0.2µM
Reverse primer Arch- <i>amoAR</i> (20pmol/µl)	1 µl	0.2µM
BSA (10µg/µl)	2 µl	400ng/µl
Polymerase (1U/µl)	1 µl	1U/50µl
DNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	36,5 µl	
Συνολικός όγκος	50 µl	

**Πίνακας 7.** Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	45sec	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	53°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	15min	

## 2.6. Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel. Με τη μέθοδο αυτή το DNA προσδένεται σε μια μεμβράνη πυριτίου παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Ακολουθεί ένα βήμα ξεπλύματος της μεμβράνης για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Τέλος, γίνεται έκλουση του καθαρού DNA με 30 μl αποστειρωμένο νερό.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του καθαρού DNA έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm. Τιμή απορρόφησης 1.000 στα 260 nm αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA /ml. Πραγματοποιήθηκε αραίωση στα προς ανάλυση δείγματα (2 μl DNA +48 μl ddH<sub>2</sub>O) και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σύμφωνα με τον τύπο:  $\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260}) * (\text{συντελεστής αραίωσης}) * (50 \mu\text{g DNA/ml})$ .

## 2.7. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού

### 2.7.1 Θεωρητικό μέρος

Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποδομώντας ξένο προς αυτά DNA (π.χ. DNA των φάγων). Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, όπου υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται κυρίως χάρη στη μεθυλίωση μιας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού και βρίσκονται σε ξένο ως προς το βακτήριο DNA, δεν είναι μεθυλιωμένες και συνεπώς, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πολλές τέτοιες ενδονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη βακτηρίων, αναγνωρίζουν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και είναι διαθέσιμες εμπορικά.

Τα ένζυμα περιορισμού ταξινομούνται βιοχημικά σε τρεις κατηγορίες: **Τύπου I**, **Τύπου II** και **Τύπου III**. Στις κατηγορίες τύπου I και III η δραστηριότητα περιορισμού και μεθυλίωσης διεκπεραιώνεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο. Παρ' όλο που αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα ακριβή σημεία που τέμνουν το DNA βρίσκονται σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία αναγνώρισης και μπορεί να είναι

ακόμα και εκατοντάδες νουκλεοτίδια μακριά. Τα τύπου II ένζυμα περιορισμού είναι ανεξάρτητα από δραστηριότητες μεθυλίωσης και διεκπεραιώνουν τις τομές τους σε πολύ συγκεκριμένα σημεία που βρίσκονται εντός, ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Επίσης, χρειάζεται ένα μόνο ένζυμο τύπου II για την τομή και των δύο κλώνων του DNA (όπως και τα τύπου III ένζυμα), σε αντίθεση με τα τύπου I ένζυμα, όπου χρειάζονται 2 μόρια για την τομή και των δύο κλώνων του DNA. Η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών ενζύμων περιορισμού είναι τύπου II.

Στην ανάλυση T-RFLP χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού για την πέψη των προϊόντων της PCR. Η αλληλουχία DNA που ενισχύθηκε από διαφορετικούς οργανισμούς και περιέχει διαφορετικά σημεία περιορισμού (restriction sites) θα δώσει ακραία τμήματα περιορισμού (terminal restriction fragments) διαφορετικών μεγεθών. Αυτά τα τμήματα θα διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους σε αυτόματο DNA αλληλουχητή και θα δώσουν ένα αποτύπωμα που είναι χαρακτηριστικό της κοινότητας του δείγματος που αναλύθηκε.

### 2.7.2 Πειραματικό μέρος

Για την ανάλυση της κοινότητας των AOB χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *TaqI*, *MspI* και *HhaI* (Πίνακες 8 και 10). Για την ανάλυση των AOA χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *RsaI*, *MspI* και *HhaI* (Πίνακες 9 και 10). Η επιλογή των συγκεκριμένων ενζύμων έγινε με βάση προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές αλλά και προκαταρκτικές *in silico* πέψεις επιλεγμένων αλληλουχιών του *amoA* γονιδίου που είναι κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων EMBL.

**Πίνακας 8.** Πέψεις για την ανάλυση των AOB

Ένζυμο (New England BioLabs)	1 μl <b>TaqI</b> (20 U/μL)	1 μl <b>MspI</b> (20 U/μL)	0,5 μl <b>HhaI</b> (20 U/μL)
BSA 10mg/ml (New England BioLabs)	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
10x Buffer (New England BioLabs)	2 μl	2 μl	2 μl
Δείγμα	~300 ng	~300 ng	~300 ng
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι 20 μl	μέχρι 20 μl	μέχρι 20 μl

**Πίνακας 9.** Πέψεις για την ανάλυση των ΑΟΑ

Ένζυμο (New England BioLabs)	0,8 $\mu$ l <b>Rsal</b> (10 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l <b>MspI</b> (20 U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ l <b>HhaI</b> (20 U/ $\mu$ L)
BSA 10mg/ml (New England BioLabs)	0,2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
10x Buffer (New England BioLabs)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Δείγμα	~300 ng	~300 ng	~300 ng
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι 20 $\mu$ l	μέχρι 20 $\mu$ l	μέχρι 20 $\mu$ l

**Πίνακας 10.** Ένζυμα περιορισμού

Ένζυμο περιορισμού	Θέση αναγνώρισης-κοπής	Συνθήκες πέψης	Απενεργοποίηση ενζύμου
HhaI	5'...GCG <sup>•</sup> C...3' 3'...C <sub>•</sub> GCG...5'	37°C για 3 ώρες	65°C για 20 λεπτά
MspI	5'...C <sup>•</sup> CGG...3' 3'...GGC <sub>•</sub> C...5'	37°C για 3 ώρες	80°C για 20 λεπτά
RsaI	5'...GT <sup>•</sup> AC...3' 3'...CA <sub>•</sub> TG...5'	37°C για 3 ώρες	65°C για 20 λεπτά
Taq <sup>o</sup> I	5'...T <sup>•</sup> CGA...3' 3'...AGC <sub>•</sub> T...5'	65°C για 3 ώρες	80°C για 20 λεπτά

## 2.8. Ανάλυση του μεγέθους των ακραίων τμημάτων περιορισμού σε DNA αλληλουχητή

Το μέγεθος των ακραίων τμημάτων (TRFs, Terminal Restriction Fragment) προσδιορίστηκε με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αλληλουχητή (Applied Biosystem) στο Ερευνητικό Ινστιτούτο The Macaulay Land Use Research Institute στο Aberdeen υπό την επίβλεψη του Dr. Brajesh Singh.

Μετά την πέψη, ακολούθησε ανάμειξη 1  $\mu$ L DNA με 0,3  $\mu$ l εσωτερικού μάρτυρα (Liz-labeled GeneScan-500 internal size standard) για να μπορέσει να γίνει ο υπολογισμός του μήκους των θραυσμάτων και με 12  $\mu$ l φορμαρίνης (Hi-Di, Highly deionized). Μετά την ανάμειξη αυτή, τα δείγματα αποδιατάχθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά. Η ανάλυση έγινε σε αυτόματο αλληλουχητή (Applied Biosystems Instruments) και τα T-RFLP προφίλ αποκτήθηκαν με το λογισμικό GeneMapper. Η ανάλυση T-RFLP παρέχει ημιποσοτικά (σχετική αφθονία) δεδομένα καθώς και δεδομένα δυαδικής μορφής (παρουσία/απουσία τμημάτων).

Ο πίνακας που αποκτάται από το GeneMapper περιλαμβάνει πληροφορίες για τον αριθμό των ακραίων τμημάτων περιορισμού, το μέγεθος των τμημάτων αυτών (bp) και το ύψος τους (σε μονάδες φθορισμού). Η σχετική αφθονία ενός συγκεκριμένου τμήματος σε ένα προφίλ υπολογίζεται ως ο λόγος του ύψους της κορυφής του τμήματος προς το συνολικό ύψος όλων των τμημάτων που βρίσκονται στο προφίλ. Κάθε TRF που αντιπροσωπεύει λιγότερο από 5% του συνολικού φθορισμού και βρίσκεται σε λιγότερο από 5 δείγματα αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση. Η προσέγγιση αυτή ελαχιστοποιεί την επίδραση των διαφορών στα TRFLP προφίλ που προέρχονται από την διαφορετική ποσότητα του DNA που αναλύεται.

## **2.9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης T-RFLP**

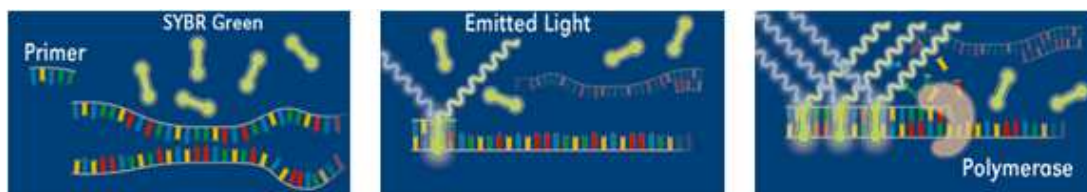
Στο πείραμα αξιολογήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων στη δομή της κοινότητας των AOB και των AOA, ο χρόνος δειγματοληψίας (4 επίπεδα) και το γεωργικό φάρμακο που εφαρμόστηκε (5 μεταχειρίσεις). Η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης με δύο παράγοντες (two-way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση σημαντικών επιδράσεων των δύο αυτών παραγόντων (χρόνος και γεωργικό φάρμακο) αλλά και των αλληλεπιδράσεων τους στη σχετική αφθονία των ακραίων τμημάτων περιορισμού που προέκυψαν. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05. Σε περιπτώσεις όπου υπήρξαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο παραπάνω παραγόντων χρησιμοποιήθηκε το τεστ των Ελαχίστων Σημαντικών Διαφορών (Least Significant Differences, LSD) για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο ή για την ίδια μεταχείριση γεωργικού φαρμάκου στον χρόνο. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GenStat Twelfth Edition (VSN International Ltd).

## **2.10. Ποσοτικοποίηση των *amoA* γονιδίων των AOB και των AOA με PCR πραγματικού χρόνου**

### **2.10.1 Θεωρητικό μέρος**

Η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει τον προσδιορισμό της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης

PCR. Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας χρωστικής. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με την βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα (Εικόνα 5). Ένα κύριο πλεονέκτημα της SYBR Green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από τη χρήση ειδικού ανιχνευτή. Αντίθετα, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η SYBR Green προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Για αυτό το λόγο πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο πείραμα μια καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve) η οποία διευκολύνει την διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η καμπύλη αποδιάταξης δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



**Εικόνα 5.** Λειτουργία χρωστικής SYBR Green. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος

Από τη μέτρηση της αύξησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να χωριστεί σε 4 φάσεις. Την φάση στην οποία τα επίπεδα του ενδογενή φθορισμού (background fluorescence) είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του φθορισμού που προέρχονται από τα προϊόντα των πρώτων κύκλων της PCR, την εκθετική φάση, την

γραμμική φάση και την φάση κορεσμού. Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης, η ποσότητα των συντιθέμενων προϊόντων είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας και κατά την διάρκεια αυτής της φάσης γίνεται η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct. Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο–κατώφλι (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του γονιδίου στόχου τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct.

Η ποσοτικοποίηση των αρχικών αλληλουχιών-στόχων ενός δείγματος με άγνωστη συγκέντρωση γίνεται, όπως αναφέρθηκε, με τον προσδιορισμό των Ct τιμών και μπορεί να περιγραφεί με σχετικούς ή απόλυτους όρους. Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε απόλυτη ποσοτικοποίηση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων έγινε από μια καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης και στη συνέχεια καθορίστηκαν οι Ct τιμές κάθε συγκέντρωσης. Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων με βάση τις Ct τιμές τους.

### **2.10.2 Πειραματικό μέρος**

Χρησιμοποιήθηκαν τα ζευγάρια εκκινητών amoA1F/amoA2R για τα AOB και Arch-amoAF/Arch-amoAR για τα AOA που χρησιμοποιήθηκαν και στην ανάλυση T-RFLP (Πίνακες 2 και 3) χωρίς όμως σήμανση με φθορίζουσα χρωστική. Τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων της PCR πραγματικού χρόνου φαίνονται στους πίνακες 11 και 12. Τρεις επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε μεταχείριση. Μετά το τέλος της φάσης ενίσχυσης ακολούθησε η φάση της αποδιάταξης για την κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης. Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Mx3000P QPCR (Stratagen).



**Πίνακας 11.** PCR πραγματικού χρόνου αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 µl	1X
Forward primer (20pmol/µl) AOB: AmoA1F AOA: Arch-amoAF	0,2 µl	0.2µM
Reverse primer (20pmol/µl) AOB: AmoA2R AOA: Arch-amoAR	0,2 µl	0.2µM
Rox Low (50X)	0,4 µl	1X
BSA (10µg/µl)	0,8 µl	400ng/µl
DNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	7,4 µl	
Συνολικός όγκος	20 µl	

**Πίνακας 12.** Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA

Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	20sec	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3sec	45 κύκλους
Υβριδοποίηση	AOB 57°C AOA 53°C	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	45sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 55°C 95°C	1min 30sec 30sec	1 κύκλος

## 2.11. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

### 2.11.1 Υλικά

- PCR clean up kit (Macherey-Nagel)
- ρGEM-T Easy vector systems (Promega)
- NucleoSpin Plasmid Kit (MACHEREY-NAGEL)
- Δεκτικά *E.coli* κύτταρα
- Θρεπτικό μέσο LB: 10g NaCl, 10g Casein, 5 g Yeast extract και 15g άγαρ (για την παρασκευή τριβλίων LB) διαλύονται σε 1L dH<sub>2</sub>O και αποστειρώνονται

- Αμπικιλίνη: συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος 100mg/ml σε νερό, αποστείρωση με φίλτρο. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml (φυλάσσεται στους -20°C)
- IPTG (0.1M): 0.238g IPTG διαλύονται σε 10mL ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο (φυλάσσεται στους 4°C)
- X-GAL (2%): 0.2g X-GAL διαλύονται σε 10ml διμεθυλοφορμαμίδιο και το διάλυμα αποστειρώνεται (φυλάσσεται στους -20°C)

### 2.11.2 Πειραματικό μέρος

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στα περιβαλλοντικά δείγματα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο *amoA*. Η κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και της καμπύλης αναφοράς έγινε ως εξής:

- Χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών *amoA1F/amoA2R* για τα AOB και *Arch-amoAF/Arch-amoAR* για τα AOA (Πίνακες 2 και 3), χωρίς την φθορίζουσα χρωστική, για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου από ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Πίνακες 4-7).
- Το προϊόν της PCR καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel.
- Έγινε εισαγωγή του καθαρού DNA στον φορέα pGEM-T Easy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
- Ο μετασχηματισμός έγινε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α. Σε 80μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 2μl από την αντίδραση της λιγάσης και το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 50sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μl LB. Έγινε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα κύτταρα 50μl X-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και όλος ο όγκος της καλλιέργειας απλώθηκε σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τριβλία επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

- Έγινε επιλογή λευκών αποικιών και εμβολιασμός σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη. Ακολούθησε επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το κιτ NucleoSpin Plasmid (MACHERY-NAGEL) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
- Στα πλασμίδια που απομονώθηκαν έγινε PCR με τα ζεύγη εκκινητών amoA1F/amoA2R για τα AOB και Arch-amoAF/Arch-amoAR για τα AOA για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του γονιδίου *amoA*.
- Ακολούθησε φωτομέτρηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Eppendorf Biophotometer) και μετατροπή της συγκέντρωσης σε αριθμό αντιγράφων σύμφωνα με τον τύπο (Whelan et al., 2003):

$$DNA (copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copies mol^{-1}) * DNA amount (g)}{DNA length (bp) * 660 (g mol^{-1}bp^{-1})}$$

$$AOB: DNA (copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copies mol^{-1}) * 229 * 10^{-9} (g)}{(3015 + 491) (bp) * 660 (g mol^{-1}bp^{-1})} \approx 6 * 10^{10} copies$$

$$AOA: DNA (copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copies mol^{-1}) * 286 * 10^{-9} (g)}{(3015 + 635) (bp) * 660 (g mol^{-1}bp^{-1})} \approx 7 * 10^{10} copies$$

- Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για τα AOB χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $6 \times 10^6$  έως  $6 \times 10^1$  αντίγραφα γονιδίου και για τα AOA χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $7 \times 10^6$  έως  $7 \times 10^2$  αντίγραφα γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε αραιώση.

## 2.12. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου

Οι αριθμοί των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA στα περιβαλλοντικά δείγματα που προέκυψαν από την PCR πραγματικού χρόνου μετατράπηκαν σε αριθμούς αντιγράφων γονιδίων ανά γραμμάριο εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση. Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων αλλά και του χρόνου και πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των παραγόντων στους αριθμούς των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA αξιολογήθηκε με two-way ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05. Στη συνέχεια, για τις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν

σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο παραγόντων (γεωργικό φάρμακο και χρόνος δειγματοληψίας) χρησιμοποιήθηκε το τεστ των Ελαχίστων Σημαντικών Διαφορών (Least Significant Differences, LSD) για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο ή για την ίδια μεταχείριση γεωργικού φαρμάκου στον χρόνο. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο GenStat Twelfth Edition (VSN International Ltd).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα εδάφους

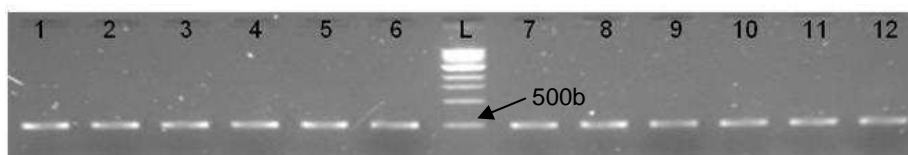
Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0.7% (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% εκχυλισμένου DNA από δείγματα εδάφους (90ημέρες). L: 1kb DNA Ladder, 1-15: DNA από δείγματα εδάφους (1-3): χωρίς γεωργικό φάρμακο (μάρτυρας), (4-6): με εφαρμογή του σκευάσματος BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*), (7-9): με εφαρμογή του σκευάσματος QL Agri® (εκχύλισμα του φυτού *Quillaja saponaria*), (10-12): με εφαρμογή του σκευάσματος MCW-2, (13-15): με εφαρμογή του σκευάσματος Vydate® (Oxamyl). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl DNA.

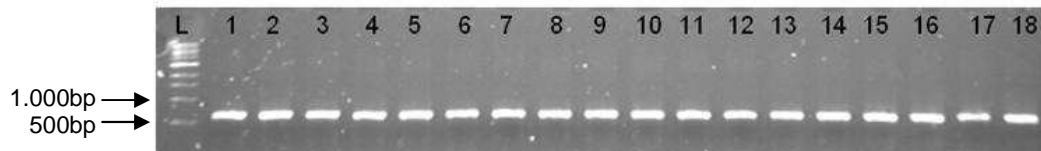
#### 3.2. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F (σημασμένος στο 5' άκρο του με τη χρωστική 6-FAM) και *amoA*-2R. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 491bp (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,3% PCR προϊόντων του γονιδίου *amoA* των AOB του εδάφους. L: 1kb DNA Ladder, 1-6: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους 45 ημερών χωρίς γεωργικό φάρμακο (μάρτυρας), 7-12: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους 45 ημερών με εφαρμογή του σκευάσματος BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl προϊόν PCR.

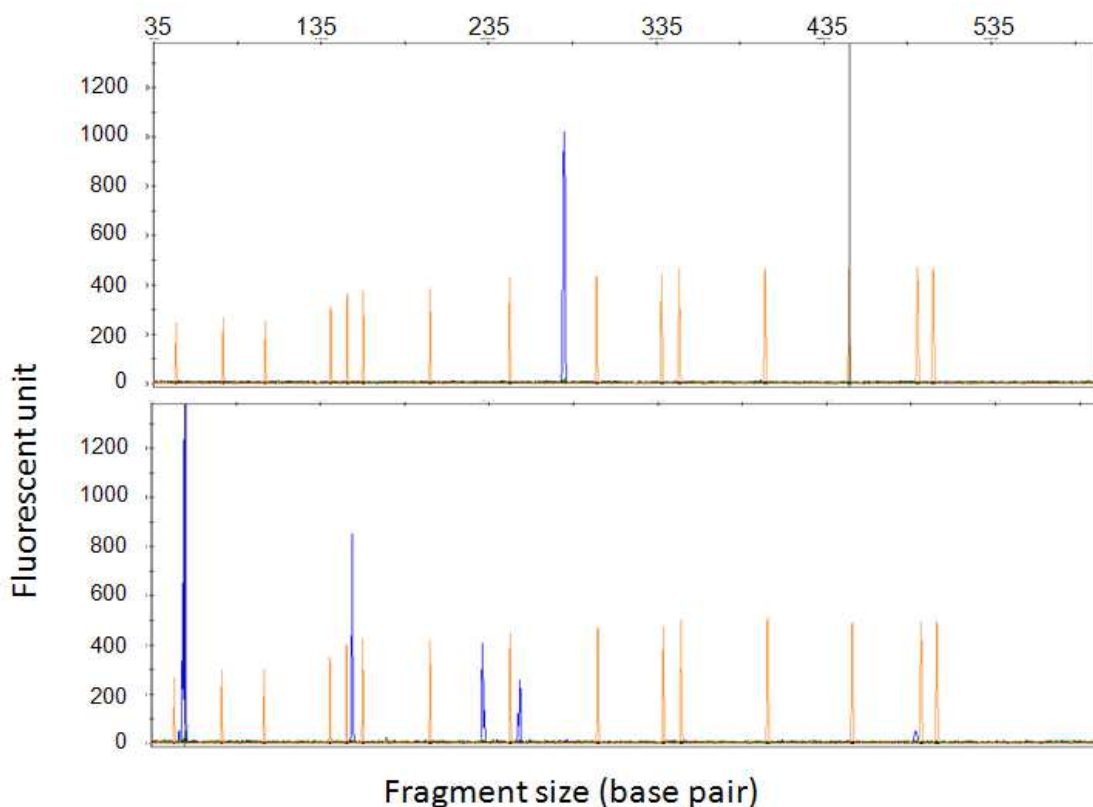
Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoA*F (σημασμένος στο 5' άκρο του με τη χρωστική 6-FAM) και Arch-*amoA*R και *amoA*-2R. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 635bp (Εικόνα 8).



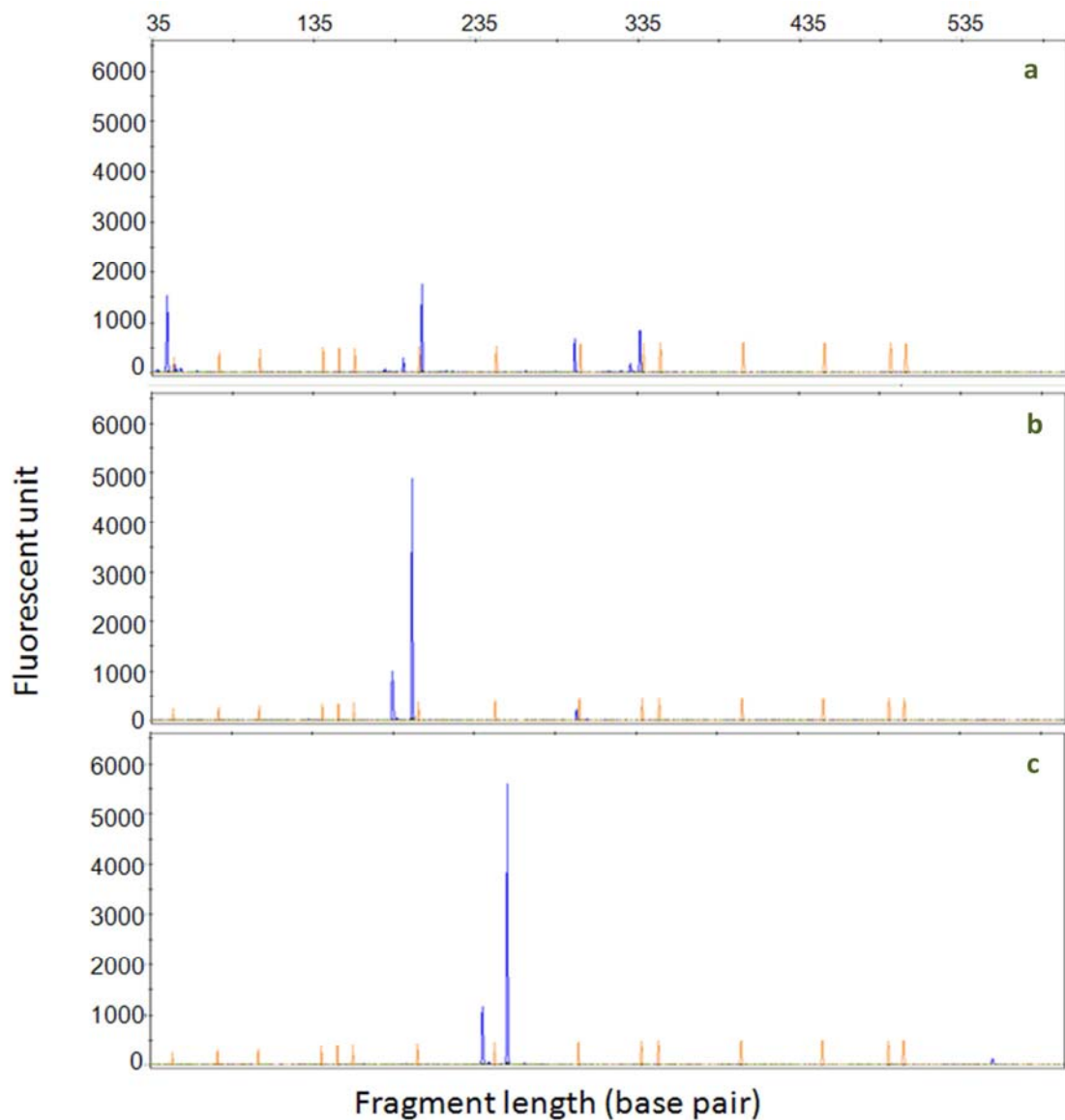
**Εικόνα 8.** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων του γονιδίου *amoA* των AOA του εδάφους. L: 1kb DNA Ladder, 1-6: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους 45 ημερών με εφαρμογή του σκευάσματος QL Agri® (εκχύλισμα του φυτού *Quillaja saponaria*), 7-12: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους 45 ημερών με εφαρμογή του σκευάσματος MCW-2, 13-18: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους 45 ημερών με εφαρμογή του σκευάσματος Vydate® (Oxamyl). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl προϊόν PCR.

### 3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης T-RFLP

Για την ανάλυση της κοινότητας των AOB χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *TaqI*, *MspI* και *HhaI* και για την ανάλυση της κοινότητας των AOA χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *RsaI*, *MspI* και *HhaI*. Στις Εικόνες 9 και 10 φαίνονται ενδεικτικά κάποια ηλεκτροφορογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση T-RFLP των κοινοτήτων των AOB και AOA αντίστοιχα.



**Εικόνα 9.** Ενδεικτικά ηλεκτροφορογραφήματα που προέκυψαν από τις πέψεις του γονιδίου *amoA* των AOB με τα ένζυμα a) *TaqI* b) *MspI*. Με μπλέ οι κορυφές που προέκυψαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα και με πορτοκαλί οι κορυφές που προέκυψαν από το size ladder.

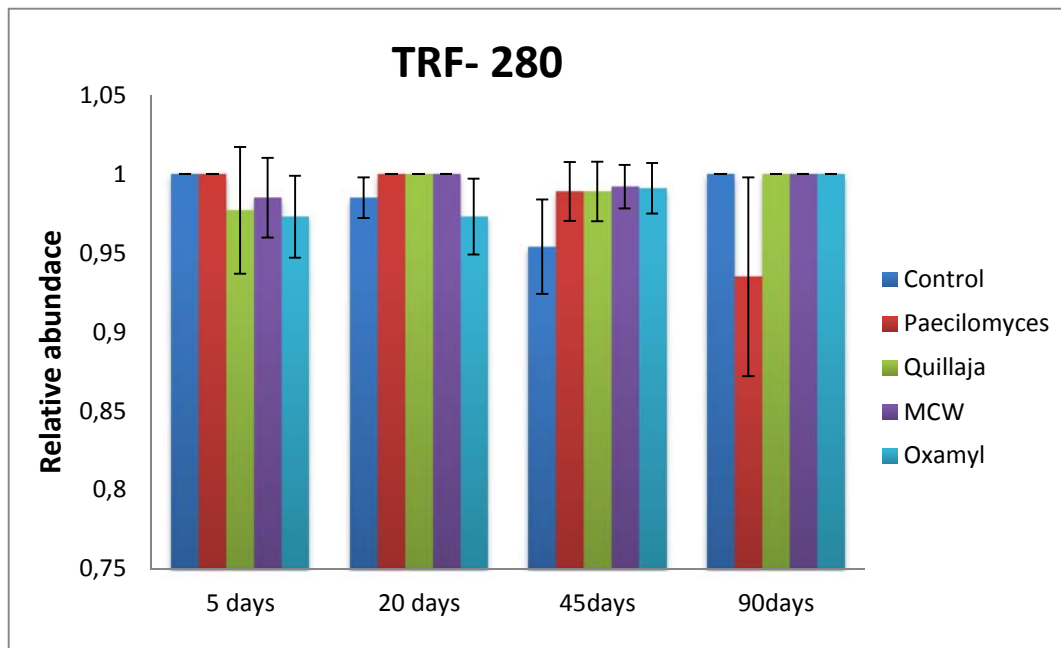


**Εικόνα 10.** Ενδεικτικά ηλεκτροφορογραφήματα που προέκυψαν από τις πέψεις του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ με τα ένζυμα a) *RsaI* b) *MspI* και c) *HhaI*. Με μπλέ οι κορυφές που προέκυψαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα και με πορτοκαλί οι κορυφές που προέκυψαν από το size ladder.

Οι σχετικές αφθονίες των ακραίων τμημάτων περιορισμού (TRFs) που προέκυψαν από την ανάλυση T-RFLP χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση.

## AOB-TaqI

Από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο TaqI προέκυψε ένα ακραίο τμήμα περιορισμού, το TRF-280. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε να υπάρχει καμία σημαντική επίδραση του χρόνου, του γεωργικού φαρμάκου ή της αλληλεπίδρασής τους στην αφθονία του τμήματος αυτού όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 280 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο TaqI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

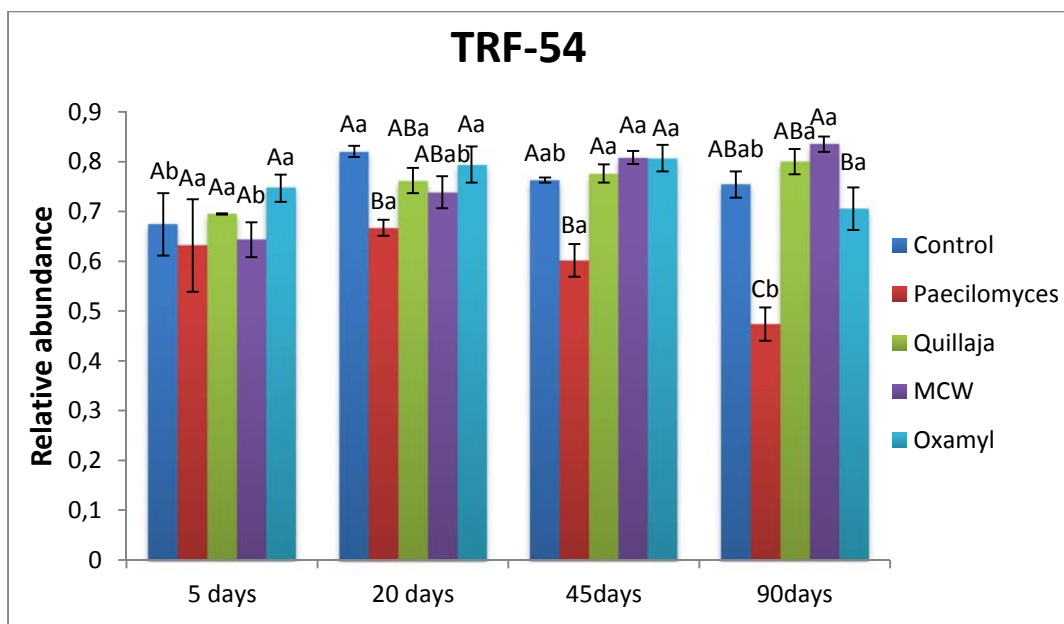
## AOB-MspI

Από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο MspI προέκυψαν τα TRFs 54, 154 και 231. Τα τμήματα με την μεγαλύτερη αφθονία είναι τα TRFs 54 και 154. Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων σχετικής αφθονίας για τα τρία αυτά τμήματα προέκυψαν τα εξής:



## TRF 54

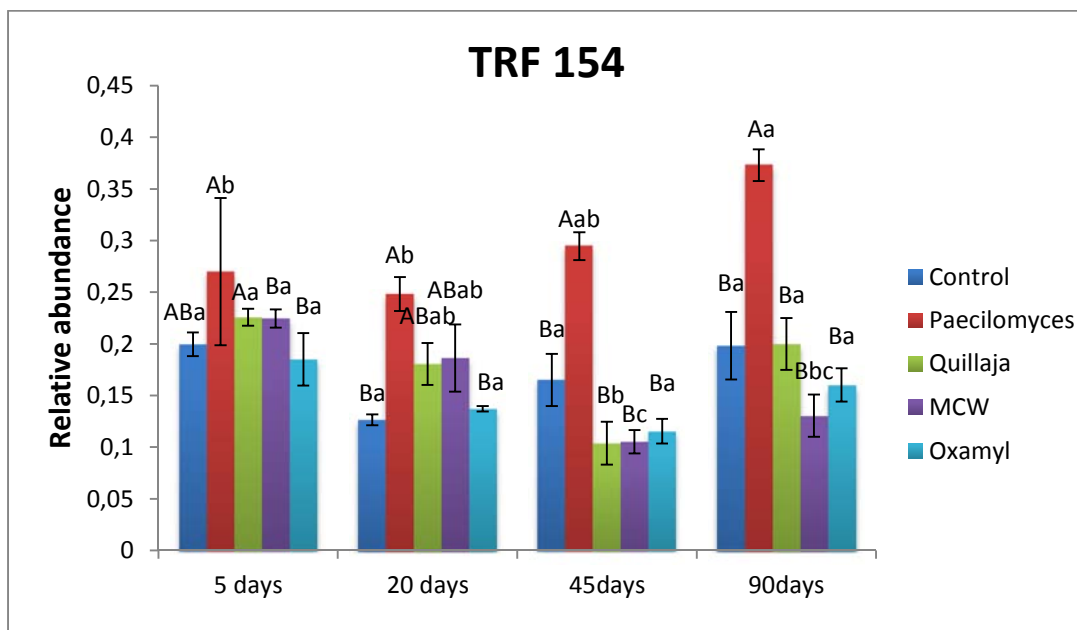
- ✓ Η κύρια επίδραση του παράγοντα γεωργικό φάρμακο ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, στα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή του σκευάσματος BIOACT® (μύκητας *Paecilomyces lilacinus*) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σχετικής αφθονίας του TRF 54 σε σχέση με τον μάρτυρα και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.
- ✓ Επίσης, ο χρόνος δειγματοληψίας μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων φαίνεται να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση, με τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις 20 και 45 ημέρες να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές σχετικής αφθονίας του TRF 54 σε σχέση με αυτά των 5 ημερών σε όλες τις μεταχειρίσεις γεωργικών φαρμάκων.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, γεωργικού φαρμάκου και χρόνου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σχετικής αφθονίας του TRF 54 στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* στις 20, 45 και 90 ημέρες σε σχέση με τους μάρτυρες στις αντίστοιχες ημέρες αλλά και σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στις 45 και 90 ημέρες (Διάγραμμα 2).



**Διάγραμμα 2.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 54 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο MspI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημαθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημαθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο.

### TRF 154

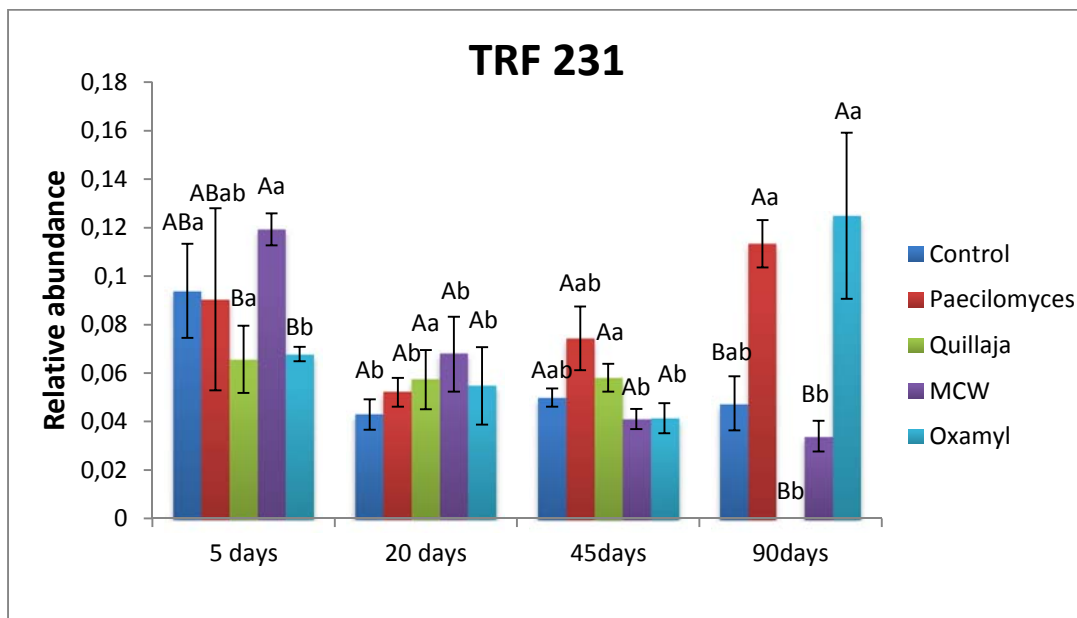
- ✓ Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην σχετική αφθονία του TRF 154. Συγκεκριμένα, στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του TRF 154 σε σχέση με τον μάρτυρα και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.
- ✓ Επίσης, ο χρόνος δειγματοληψίας φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την σχετική αφθονία του TRF 154 καθώς στις 20 και 45 ημέρες παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σχετικής αφθονίας του TRF 154 σε σχέση με τις 5 και τις 90 ημέρες.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων, γεωργικό φάρμακο και χρόνου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του TRF 154 στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* στις 20, 45 και 90 ημέρες σε σχέση με τους μάρτυρες και το Oxamyl στις αντίστοιχες ημέρες αλλά και σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στις 45 και 90 ημέρες (Διάγραμμα 3).



**Διάγραμμα 3.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 154 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο MspI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο.

## TRF 231

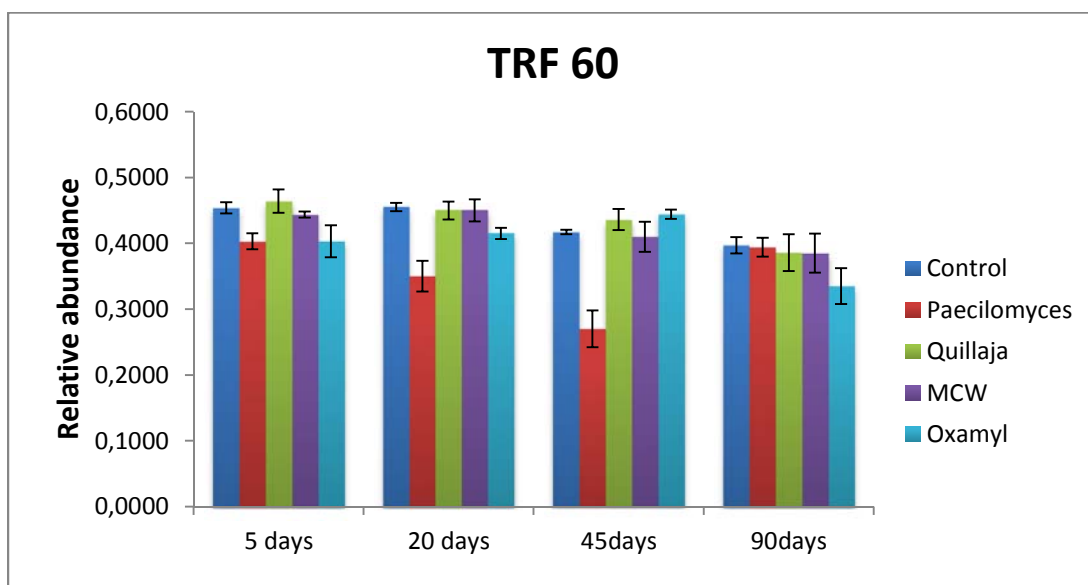
- ✓ Η κύρια επίδραση του παράγοντα γεωργικό φάρμακο δεν ήταν στατιστικά σημαντική.
- ✓ Ο χρόνος δειγματοληψίας είχε σημαντική επίδραση στην σχετική αφθονία του TRF-231. Ειδικότερα στις 5 ημέρες παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές σχετικής αφθονίας του TRF 231 σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις 20, 45 και 90 ημέρες.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων γεωργικά φάρμακα και χρόνος δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, υπάρχει σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του TRF 231 στις μεταχειρίσεις BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* και Oxamyl στις 90 ημέρες σε σχέση με το μάρτυρα στον ίδιο χρόνο. (Διάγραμμα 4).



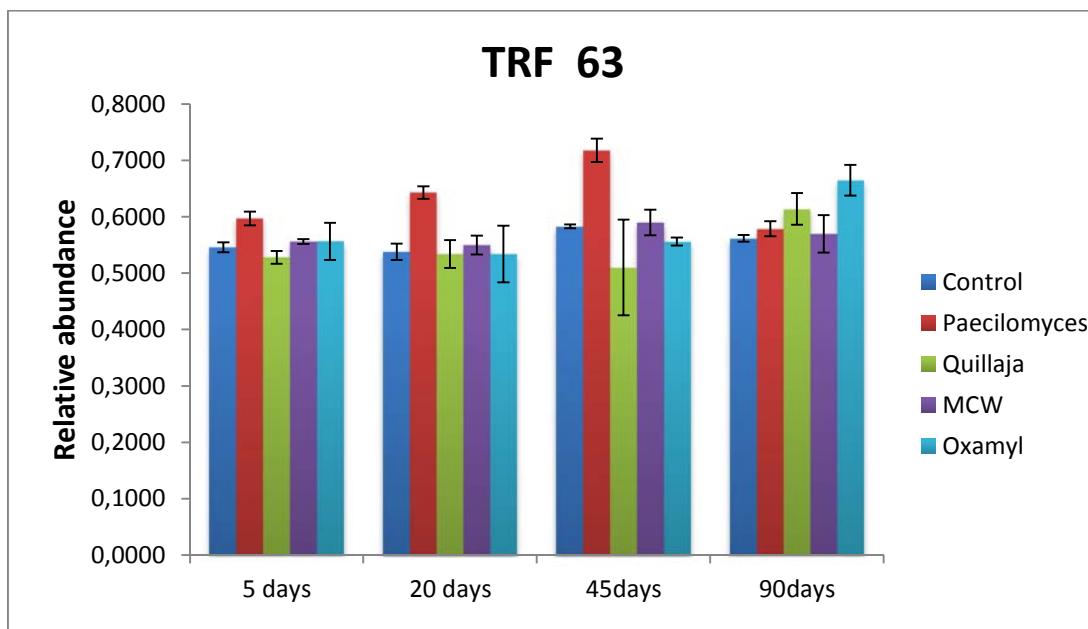
**Διάγραμμα 4.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 231 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο MspI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο

## AOB-HhaI

Από την πέψη του *amoA* γονιδίου των AOB με το ένζυμο HhaI προέκυψαν τα τμήματα 60 και 63. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπήρξε σημαντική επίδραση των παραγόντων χρόνος δειγματοληψίας και γεωργικό φάρμακο ή της αλληλεπίδρασής τους στην σχετική αφθονία των τμημάτων αυτών (Διαγράμματα 5 και 6).



**Διάγραμμα 5** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 60 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο HhaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 6.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 63 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο HhaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

## AOA-RsaI

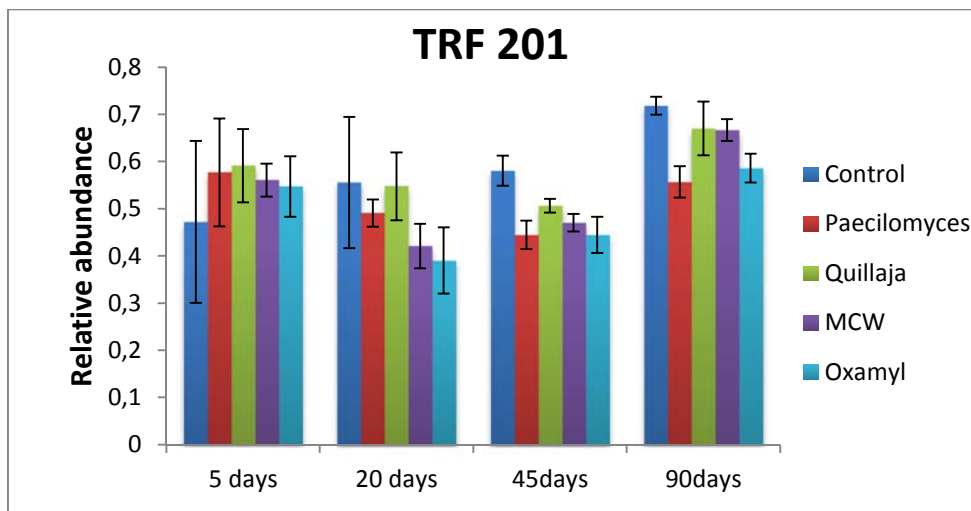
Από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο RsaI προέκυψαν τα TRFs 189, 201, και 336 με τα δύο τελευταία να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη αφθονία. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι:

### TRF 189

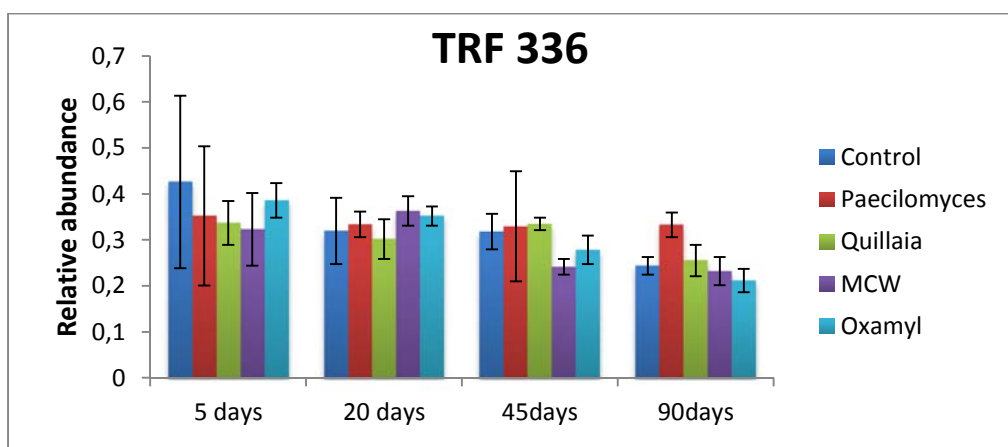
- ✓ Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του χρόνου ή του είδους του γεωργικού φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε ή της αλληλεπίδρασής των δύο αυτών παραγόντων στην αφθονία του TRF 189.

### TRFs 201 και 336

- ✓ Από τις κύριες επιδράσεις, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση μόνο του παράγοντα χρόνου στη σχετική αφθονία των TRF 201 και 336. Πιο συγκεκριμένα, στις 90 ημέρες η σχετική αφθονία του TRF 201 είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την αφθονία του στις 20 και 45 ημέρες. Ενώ, η σχετική αφθονία του TRF 336 στις 90 ημέρες είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τις 5 ημέρες.
- ✓ Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων χρόνος δειγματοληψίας και γεωργικού φαρμάκου στη σχετική αφθονία των TRF 201 και 336 (Διαγράμματα 7 και 8).



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 201 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο RsaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.



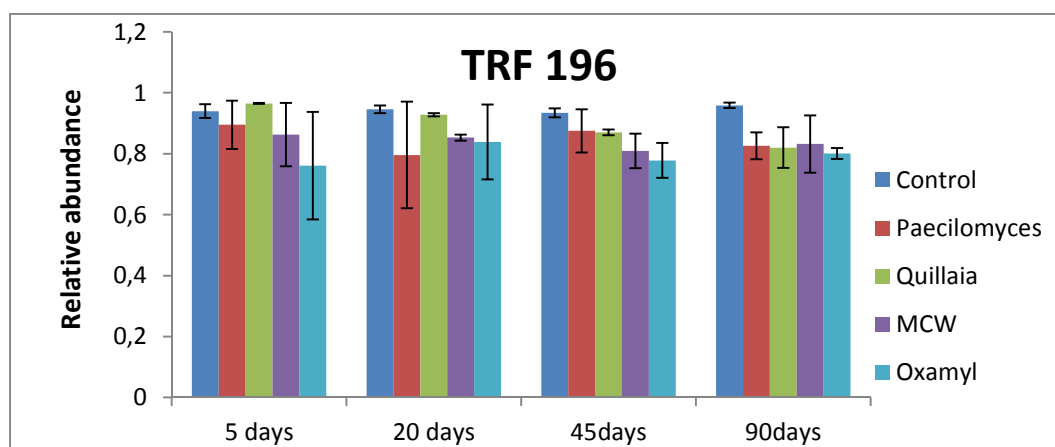
**Διάγραμμα 8.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 336 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο RsaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

### AOA-MspI

Η πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο MspI οδήγησε στην εμφάνιση των TRFs 196 και 298, με κύριο το TRF-196. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι:

#### TRF 196

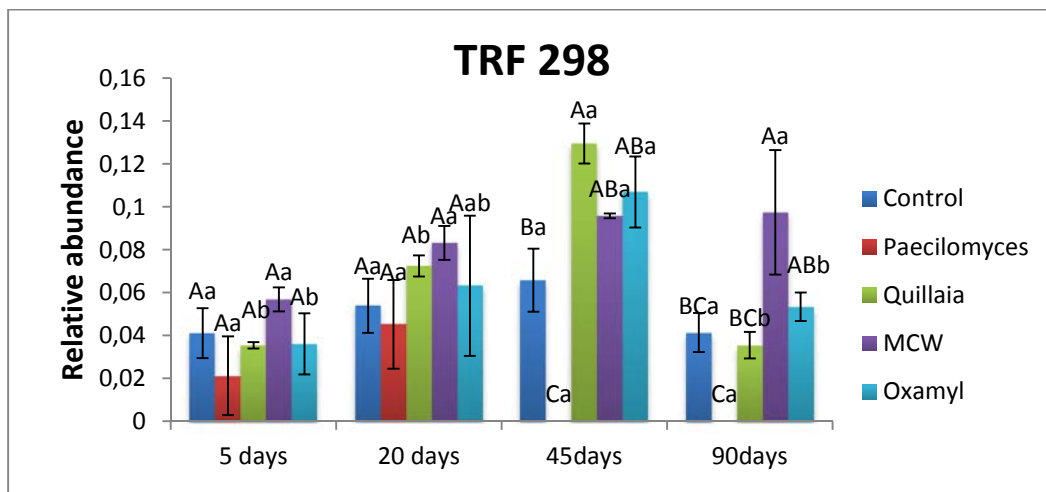
- ✓ Από τις κύριες επιδράσεις, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του παράγοντα γεωργικό φάρμακο στη σχετική αφθονία του TRF 196. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη σχετική αφθονία του TRF 196 στη μεταχείριση Oxamyl σε σχέση με τον μάρτυρα.
- ✓ Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, χρόνος και γεωργικό φάρμακο, για τη σχετική αφθονία του TRF 196 (Διάγραμμα 9).



**Διάγραμμα 9.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 196 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο MspI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

## TRF 298

- ✓ Παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του παράγοντα γεωργικό φάρμακο στην σχετική αφθονία του TRF 298. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της σχετικής αφθονία του TRF 298 στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* σε σχέση με τον μάρτυρα και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε αυξημένη σχετική αφθονία του ίδιου TRF στη μεταχείριση MCW σε σχέση με τον μάρτυρα.
- ✓ Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του παράγοντα χρόνου δειγματοληψίας στην σχετική αφθονία του TRF 298. Πιο συγκεκριμένα, στις 20 και 45 ημέρες η σχετική αφθονία του TRF 298 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις 5 και 90 ημέρες.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος (Διάγραμμα 10). Συγκεκριμένα, στις 45 και στις 90 ημέρες στην μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* δεν ανιχνεύεται καθόλου το TRF 298 ενώ η σχετική αφθονία του φαίνεται σημαντικά υψηλότερη στον μάρτυρα στις 45 ημέρες. Αντίθετα, η αφθονία του TRF 298 στις μεταχειρίσεις QL Agri® - *Quillaja saponaria* στις 45 ημέρες και MCW στις 90 ημέρες είναι σημαντικά υψηλότερη από τους αντίστοιχους μάρτυρες.



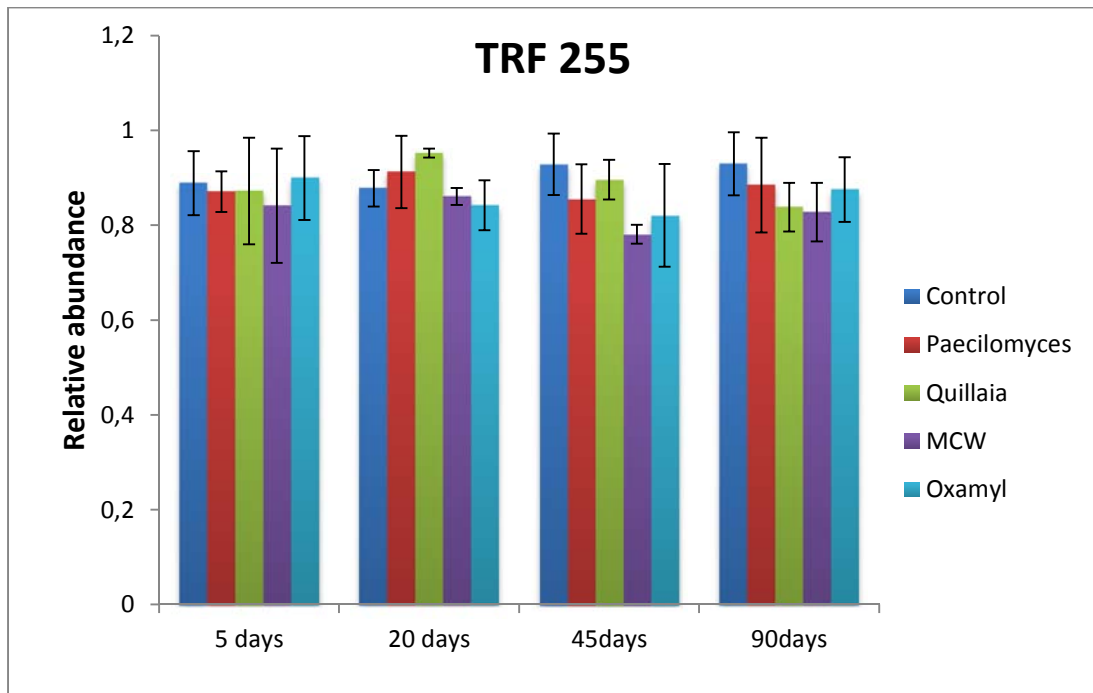
**Διάγραμμα 10.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 298 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOA με το ένζυμο MspI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο

## AOA-Hhal

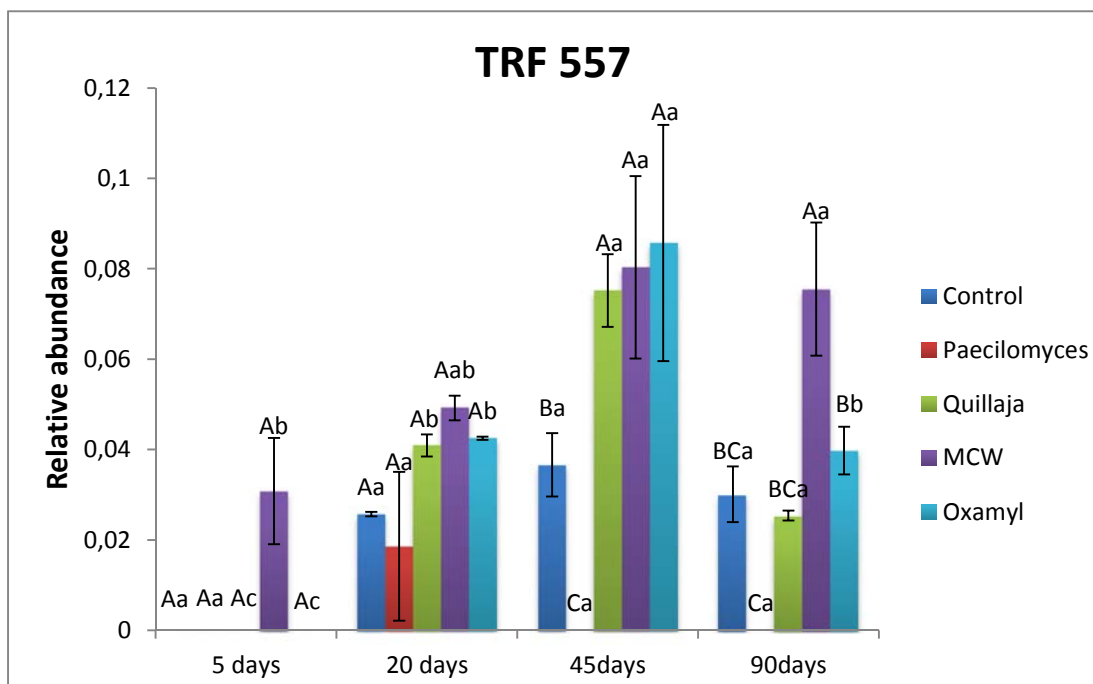
Από την πέψη του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ με το ένζυμο Hhal προέκυψαν τα 255 και 557 με κύριο το πρώτο. Μετά τη στατιστική ανάλυση δεν φάνηκε να υπάρχει καμία σημαντική επίδραση του χρόνου ή του γεωργικού φαρμάκου ή της αλληλεπίδρασής τους στην αφθονία του TRF-255 (Διάγραμμα 11). Αντίθετα, για τις επιδράσεις στην σχετική αφθονία του TRF-557 βρέθηκαν τα εξής:

- ✓ Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων είχε σημαντική επίδραση στην αφθονία του TRF-557. Συγκεκριμένα, στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σχετικής αφθονίας του TRF 557 σε σχέση με τον μάρτυρα και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις ενώ υπάρχει σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του τμήματος στην μεταχείριση MCW σε σχέση με τον μάρτυρα.
- ✓ Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας. Αναλυτικότερα παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερες τιμές σχετικής αφθονίας του TRF 557 στις 20, 45 και 90 ημέρες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις 5 ημέρες.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος (Διάγραμμα 12). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της σχετικής αφθονίας του TRF 557 στη μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* στις 45 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής αφθονίας του τμήματος στις μεταχειρίσεις QL Agri® - *Quillaja saponaria* στις 45 ημέρες, MCW 45 και 90 ημέρες και Oxamyl 45 ημέρες σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.





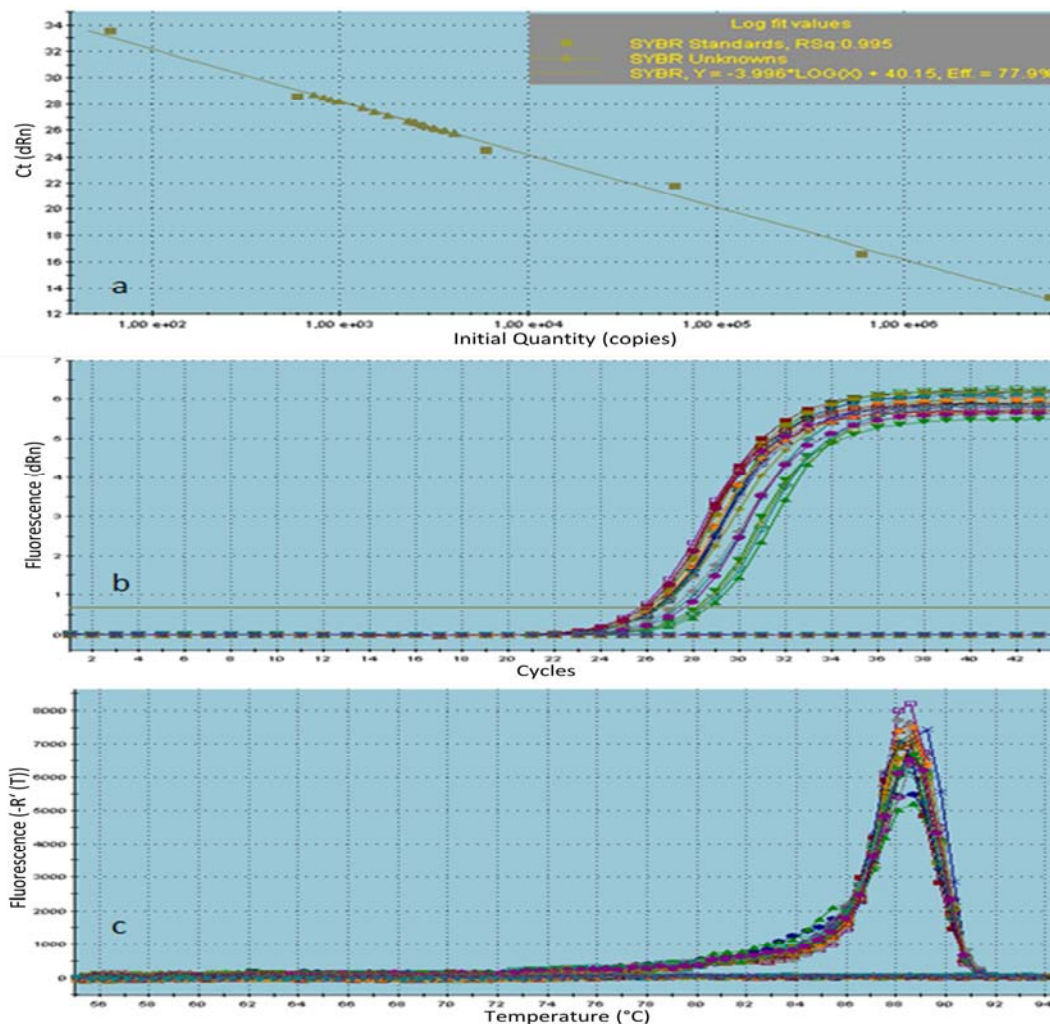
**Διάγραμμα 11.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 255 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ με το ένζυμο HhaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.



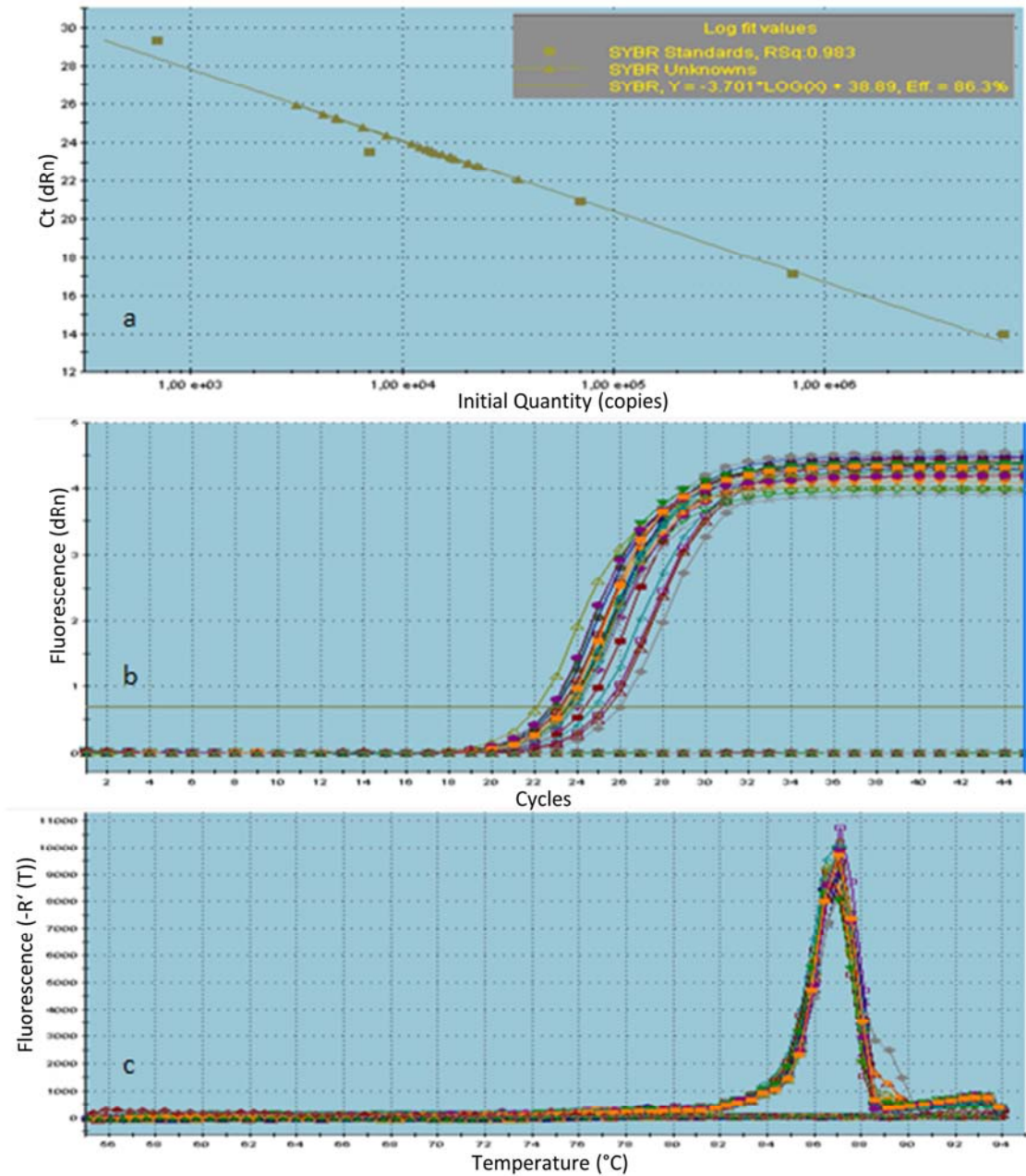
**Διάγραμμα 12.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στη σχετική αφθονία του TRF 557 που προέκυψε από την πέψη του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ με το ένζυμο HhaI. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο.

### 3.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην αφθονία των AOB και AOA με PCR πραγματικού χρόνου

Η ποσοτικοποίηση των κοινοτήτων των AOB και των AOA στα περιβαλλοντικά δείγματα έγινε με PCR πραγματικού χρόνου στοχεύοντας στο *amoA* γονίδιο. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στα δείγματα έγινε από με την χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιέχουν το γονίδιο *amoA*. Για την καμπύλη αναφοράς των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $6 \times 10^6$  έως  $6 \times 10^1$  αντίγραφα γονιδίου και για αυτή των AOA οι αραιώσεις  $7 \times 10^6$  έως  $7 \times 10^2$  αντίγραφα γονιδίου. Στις εικόνες 11 και 12 φαίνονται οι καμπύλες αναφοράς, οι καμπύλες ενίσχυσης και οι καμπύλες αποδιάταξης για τα AOB και AOA αντίστοιχα.

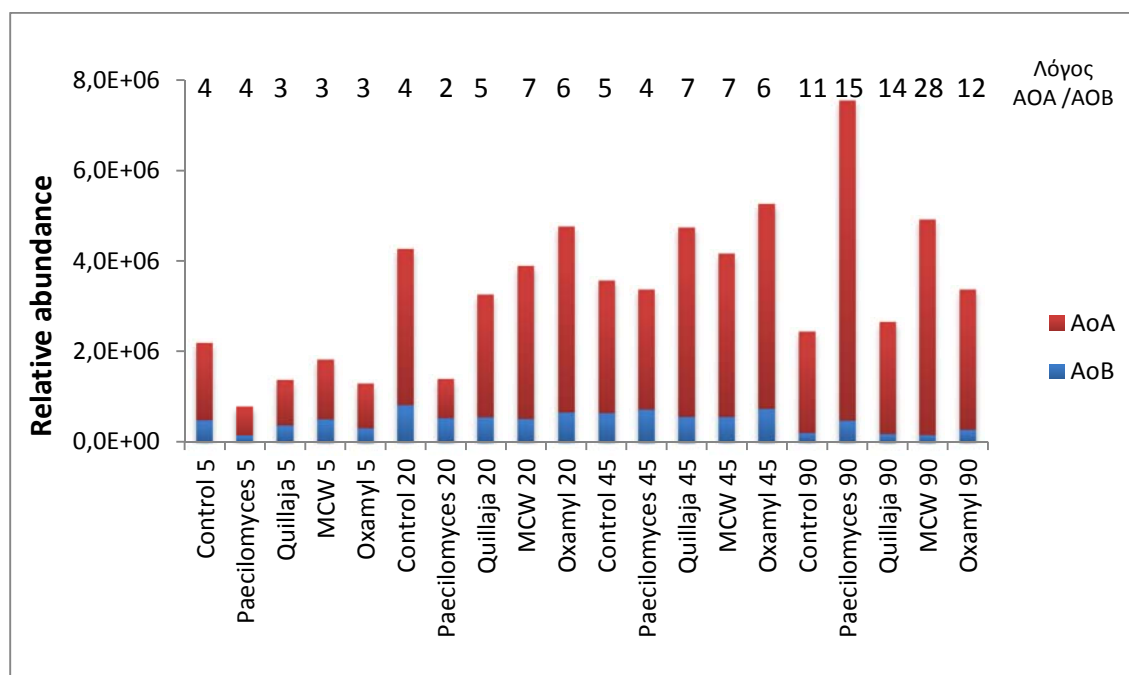


**Εικόνα 11.** Ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου. α) καμπύλη αναφοράς β) καμπύλη ενίσχυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων και γ) καμπύλη αποδιάταξης περιβαλλοντικών δειγμάτων.



**Εικόνα 12.** Ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου. α) καμπύλη αναφοράς β) καμπύλη ενίσχυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων και γ) καμπύλη αποδιάταξης περιβαλλοντικών δειγμάτων

Ο αριθμός των αντιγράφων γονιδίων που προέκυψε για κάθε περιβαλλοντικό δείγμα από την PCR πραγματικού χρόνου μετατράπηκε σε αριθμό αντιγράφων γονιδίων ανά γραμμάριο εδάφους. Οι τιμές για τα AOB κυμαίνονται από  $1 \times 10^5$  έως  $9 \times 10^5$  αντίγραφα/g εδάφους ενώ στα AOA κυμαίνονται από  $6 \times 10^5$  έως  $7 \times 10^6$  αντίγραφα/g εδάφους. Ο λόγος των AOA προς τα AOB κυμάνθηκε από 2 έως 28 με τις υψηλότερες τιμές του λόγου να καταγράφονται στην τελευταία δειγματοληψία 90 ημέρες μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων (Διάγραμμα 13).

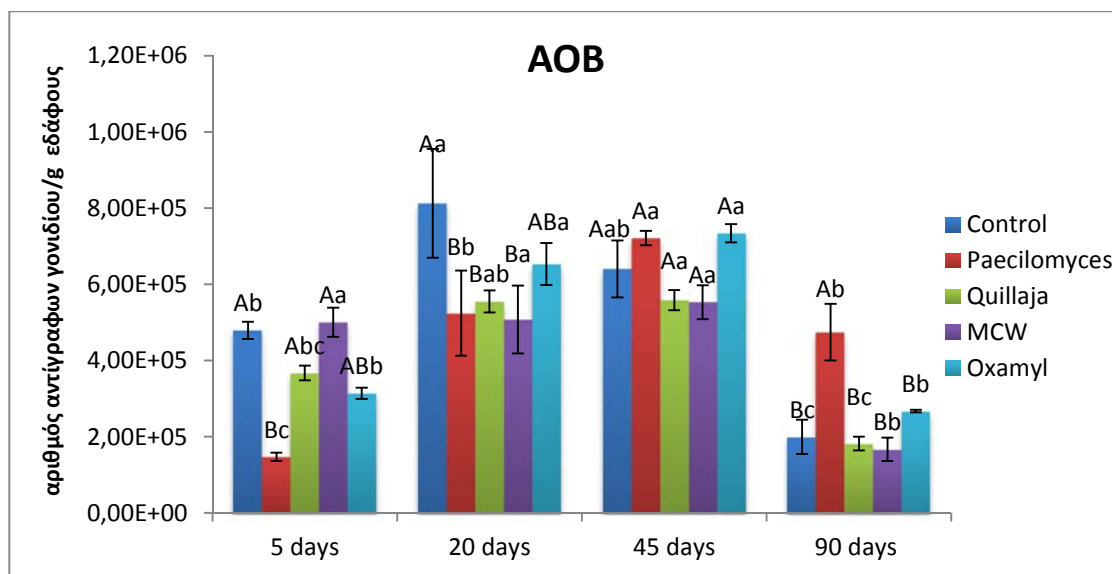


Διάγραμμα 13. Αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου *amoA*/gr εδάφους των AOB και AOA

#### α) Επιδράσεις του χρόνου δειγματοληψίας και των γεωργικών φαρμάκων στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB

- ✓ Γενικά η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* των AOB. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των αντιγράφων/g εδάφους στις μεταχειρίσεις QL Agri® - *Quillaja saponaria* και MCW σε σχέση με τον μάρτυρα ανεξάρτητα από τον χρόνο δειγματοληψίας.
- ✓ Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος δειγματοληψίας είχε σημαντική επίδραση στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA*. Πιο συγκεκριμένα, στις 20 και 45 ημέρες ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου ανά γραμμάριο

- εδάφους ήταν σημαντικά υψηλότερος από τις 5 ημέρες ενώ στις 90 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση σε σχέση με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες.
- ✓ Τέλος παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραπάνω παραγόντων, γεωργικών φαρμάκων και χρόνου δειγματοληψίας (Διάγραμμα 14). Συγκεκριμένα, η προσθήκη του σκευάσματος BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των αντιγράφων ανά γραμμάριο εδάφους σε χρόνο 5 και 20 ημέρες. Αντίθετα, στις 45 ημέρες ο αριθμός των αντιγράφων της ίδιας μεταχείρισης δεν διέφερε από τις τιμές στο μάρτυρα, ενώ στις 90 ημέρες παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τις τιμές στον μάρτυρα.

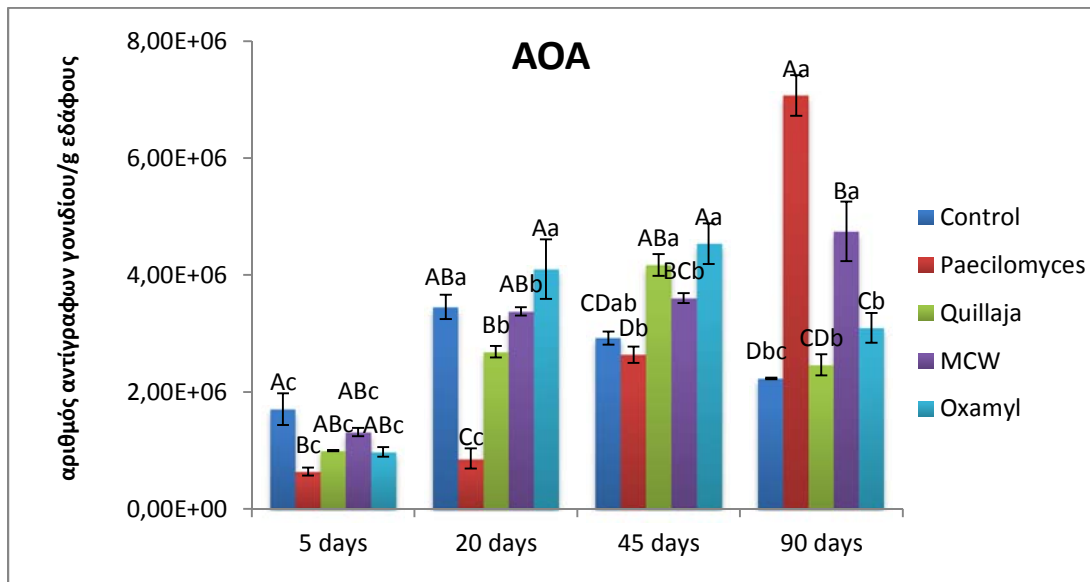


**Διάγραμμα 10** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB/g εδάφους. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο

### β) Επιδράσεις του χρόνου δειγματοληψίας και του γεωργικού φαρμάκου στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA

- ✓ Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στα AOA ανεξάρτητα από τον χρόνο δειγματοληψίας. Συνολικά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* ανά γραμμάριο εδάφους στις μεταχειρίσεις MCW και Oxamyl σε σχέση με τον μάρτυρα.

- ✓ Επίσης, ο χρόνος δειγματοληψίας φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στα ΑΟΑ. Συνολικά παρατηρήθηκε μια σταδιακή και σημαντική αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* ανά γραμμάριο εδάφους με τις μέγιστες τιμές να παρατηρούνται σε όλες τις μεταχειρίσεις γεωργικών φαρμάκων στις 90 ημέρες.
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων που μελετήθηκαν δηλαδή, μεταχείριση γεωργικών φαρμάκων και χρόνου δειγματοληψίας (Διάγραμμα 15). Συγκεκριμένα, η προσθήκη του σκευάσματος BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στις 5 και 20 ημέρες. Στις 45 ημέρες ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου της μεταχείρισης BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* αυξήθηκε σε επίπεδα ανάλογα με τον μάρτυρα. Τέλος, στις 90 ημέρες ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου στην μεταχείριση BIOACT® - *Paecilomyces lilacinus* ήταν σημαντικά υψηλότερος τόσο σε σύγκριση τόσο με το μάρτυρα στον ίδιο χρόνο όσο και με την ίδια μεταχείριση στις 45 ημέρες.



**Διάγραμμα 1511.** Επίδραση των παραγόντων γεωργικό φάρμακο και χρόνος στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ/gr εδάφους. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημανθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για το ίδιο γεωργικό φάρμακο.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Επίδραση στην δομή της κοινότητας των AOA και AOB

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες για την επίδραση της θερμοκρασίας (Avrahami et al., 2003) του pH (Nicol et al., 2008), της αλατότητας (Santoro et al., 2008) και των λιπασμάτων (Shen et al., 2008) στην δομή και την αφθονία των AOB και των AOA. Ωστόσο δεν υπάρχουν μελέτες για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στις κοινότητες των AOB και AOA που αποτελούν σημαντικές ομάδες βακτηρίων για την λειτουργία του κύκλου του N. Στη μοναδική ως σήμερα μελέτη ο Omirou και συνεργάτες (2010) έδειξαν ότι η εφαρμογή βιολογικών και χημικών υποκαπνιστικών δεν επηρέασε σε σημαντικό βαθμό τη δομή της κοινότητας των AOB.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική T-RFLP για τη μελέτη των πιθανών αλλαγών στη δομή των κοινοτήτων των AOB και AOA σε εδάφη ύστερα από την εφαρμογή συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά, τα Vydate® (Oxamyl) και MCW, και δύο βιολογικά γεωργικά φάρμακα τα BIOACT® (μύκητας *Paecilomyces lilacinus*) και QLAgrri® (εκχύλισμα από το φυτό *Quillaja saponaria*). Το γενετικό αποτύπωμα των μικροβιακών κοινοτήτων αποκτήθηκε αναλύοντας πολυμορφισμούς του γονιδίου *amoA*, το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα που περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας. Για τη μελέτη της δομής των AOB χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα TaqI, MspI και HhaI. Τα τμήματα με την μεγαλύτερη αφθονία που προέκυψαν από την πέψη του γονιδίου *amoA* με τα ένζυμα TaqI (TRF-280) και MspI (TRF-154) γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι αντιστοιχούν σε είδη που ανήκουν στο γένος *Nitrosospira* (Horz et al., 2000; Stephen et al., 1999; Wang et al., 2009). Τα κύρια αυτά τμήματα εμφανίζονται σε όλες τις μεταχειρίσεις αποδεικνύοντας την κυριαρχία των ειδών του γένους *Nitrosospira* στο έδαφος που μελετήθηκε. Άλλες μελέτες που έγιναν με τη χρήση τεχνικών που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών αλλά και με μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους επιβεβαιώνουν την κυριαρχία των ειδών του γένους *Nitrosospira* έναντι του γένους *Nitrosomonas* σε κοινότητες των AOB σε χερσαία περιβάλλοντα (Avrahami et al., 2002 Avrahami et al., 2003; Kowalchuk et al., 2000a; Kowalchuk et al., 2000b; Mintie et al., 2003). Αντίθετα, είδη του γένους *Nitrosomonas* συχνά ανιχνεύονται σε περιβάλλοντα με υψηλά

επίπεδα αζώτου, όπως είναι οι μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων (Geets et al., 2006). Μάλιστα, ο Stephen και συνεργάτες (1996) ανίχνευσαν μια τάση για την κυριαρχία του cluster 2 των *Nitrosospira* σε όξινα εδάφη, όπως είναι και το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (pH 5,5).

Οι σχετικές αφθονίες των ακραίων τμημάτων περιορισμού (TRFs) που προέκυψαν από την ανάλυση T-RFLP χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση με two-way ANOVA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σκεύασμα BIOACT® που περιέχει τον μύκητα *Paecilomyces lilacinus* προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σύσταση των κοινοτήτων των AOB και των AOA. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στη σχετική αφθονία των δύο κύριων TRFs (54 και 154) που προέκυψαν από την πέψη του γονιδίου *amoA* των AOB με το ένζυμο *MspI* στα δείγματα που είχαν δεχτεί την εφαρμογή του σκευάσματος BIOACT® σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη δομή της κοινότητας των AOB από την εφαρμογή του BIOACT® ήταν συνάρτηση του χρόνου καθώς εμφανίστηκαν 20 ημέρες μετά την εφαρμογή και παρέμειναν εμφανείς μέχρι της λήξης του πειράματος (90 ημέρες). Αντίθετα, η εφαρμογή των υπολοίπων συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην δομή της κοινότητας των AOB.

Για την ανάλυση της δομής των AOA χρησιμοποιήθηκαν τρία ένζυμα (*RsaI*, *MspI*, *HhaI*). Η εφαρμογή των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην σχετική αφθονία των κύριων TRFs που προέκυψαν από τις πέψεις και με τα τρία ένζυμα. Αντίθετα, το σκεύασμα BIOACT® (*Paecilomyces lilacinus*) προκάλεσε σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σχετική αφθονία TRFs των οποίων η σχετική αφθονία σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν <0.15 (TRF 298 (*MspI*), TRF 557 (*HhaI*)). Όπως και στα AOB, τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των AOA.

#### **4.2. Επίδραση στην αφθονία των AOA και AOB**

Πιθανές επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στην αφθονία των AOA και AOB προσδιορίστηκαν με PCR πραγματικού χρόνου μέσω της μέτρησης του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στο έδαφος. Οι τιμές για τα AOB στις



διάφορες μεταχειρίσεις και χρόνους κυμάνθηκαν από  $1 \times 10^5$  έως  $9 \times 10^5$  αντίγραφα γονιδίου *amoA*/g εδάφους ενώ για τα AOA οι αντίστοιχες τιμές ήταν  $6 \times 10^5$  έως  $7 \times 10^6$  αντίγραφα γονιδίου *amoA*/g εδάφους (Διάγραμμα 13). Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA ήταν υψηλότερος του αντίστοιχου των AOB σε όλες τις μεταχειρίσεις και χρόνους με τον λόγο AOA / AOB να κυμαίνεται από 2 έως 28 και να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές του στα δείγματα των 90 ημερών σε όλες τις μεταχειρίσεις. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι ο αριθμός των AOA (εκφρασμένος ως αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA*) κυμάνθηκε σε επίπεδα 2 ως 3,000 φορές υψηλότερα από τον αντίστοιχο αριθμό των AOB (Leininger et al., 2006; Adair and Schwartz, 2008; Boyle-Yarwood et al., 2008; He et al., 2007; Herrmann et al., 2008). Πρέπει να τονιστεί ότι για τη μετατροπή των αριθμών των αντιγράφων του γονιδίου *amoA*/g εδάφους των AOB και των AOA σε κύτταρα/gr εδάφους πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι τα μέχρι τώρα χαρακτηρισμένα AOB και AOA περιέχουν 2-3 και 1 αντίγραφο του γονιδίου *amoA* αντίστοιχα (Okano et al., 2004; Mincer et al., 2007). Συνεπώς ο αυξημένος αριθμός αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOA σε σχέση με τα AOB που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν μπορεί να αποδοθεί στον αριθμό αντιγράφων που κατέχουν τα AOA και AOB. Η υψηλότερη αφθονία των AOA θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένδειξη του σημαντικότερου ρόλου των AOA στην νιτροποίηση σε σχέση με τα AOB. Ωστόσο, η ερμηνεία των δεδομένων αφθονίας θα πρέπει να γίνεται με προσοχή καθώς η υψηλότερη αφθονία ενός λειτουργικού γονιδίου δεν σημαίνει και λειτουργία. Επίσης, τα βακτήρια και τα αρχαία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη φυσιολογία και τη δομή των κυττάρων τους, τα AOA φαίνεται να είναι μικρότερα από τα AOB και περιέχουν διαφορετικό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA*, όπως αναφέρθηκε. Επομένως, η δραστηριότητα ανά κύτταρο μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Οι Prosser και Nicol (2008) αναφέρουν ότι η μεγάλη αφθονία των AOA μπορεί να μην σχετίζεται με την οξειδωση της αμμωνίας αλλά με έναν διαφορετικό τρόπο αύξησης. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, οι Jian και Conrad (2009) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των AOA αυξάνεται στο έδαφος ακόμα και όταν η οξειδωση της αμμωνίας αναστέλλεται με ακετυλένιο. Αυτό δείχνει ότι η οξειδωση της αμμωνίας δεν στηρίζει από μόνη της την αύξηση του πληθυσμού

των AOA και υποστηρίζει την υπόθεση ότι μπορεί να έχουν την ικανότητα ετερότροφης ή συνδυασμό αυτότροφης και ετερότροφης αύξησης (Hallam et., 2006).

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν ότι το σκεύασμα BIOACT® που περιέχει το μύκητα *Paecilomyces lilacinus* προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA που ήταν συνάρτηση του χρόνου μετά την εφαρμογή. Η προσθήκη του σκευάσματος BIOACT® προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA κατά τις πρώτες 20 ημέρες. Την αρχική μείωση των αντιγράφων του *amoA* ακολούθησε μια σταδιακή αύξηση μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος (90 ημέρες) όπου και παρατηρήθηκε ο υψηλότερος αριθμός αντιγράφων του *amoA* για τα AOA και AOB.

Η αρχική μείωση του πληθυσμού των AOA και AOB που παρατηρήθηκε στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή του μύκητα *P. lilacinus* δεν μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος 251 δεν παράγει τοξίνες με αντιμικροβιακή δράση (Khan et al., 2003). Η αρχική μείωση του αριθμού των AOB και AOA κατά την διάρκεια των πρώτων 20 ημερών μετά την εφαρμογή μπορεί να αποδοθεί είτε 1) σε άμεσο ανταγωνισμό με τον μύκητα *Paecilomyces lilacinus* για χώρο και θρεπτικά στοιχεία είτε 2) σε έμμεσο ανταγωνισμό λόγω αύξησης ετερότροφων μικροοργανισμών (βακτηρίων ή μυκήτων) που ευνοούνται από την ελευθέρωση στο έδαφος γλυκόζης και σκόνης γάλακτος που περιέχονται σε ποσοστό 78 και 6% αντίστοιχα στο σκεύασμα BIOACT® που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Anastasiades et al., 2008). Η αύξηση των ετερότροφων μικροοργανισμών παρουσία του σκευάσματος είναι δυνατό να έχει οδηγήσει σε επικράτηση αυτών των ομάδων έναντι των AOA και AOB που χαρακτηρίζονται ως βραδέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί. Οι παραπάνω εκδοχές συνάδουν πλήρως και με την ανάκαμψη των AOA και AOB που παρατηρήθηκε 45 ως και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Η εξάντληση των οργανικών υποστρωμάτων που περιέχονται ως πρόσθετα στο σκεύασμα του BIOACT® είναι πιθανό να οδήγησε σε σταδιακή μείωση του πληθυσμού των ετερότροφων μικροοργανισμών και αντίστοιχη ανάκαμψη των λιγότερο ανταγωνιστικών στο

εδafικό οικοσύστημα AOA και AOB. Από την άλλη μεριά, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι 6-8 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του μύκητα *P. lilacinus* 251 στο έδαφος τα επίπεδά του μειώνονται και φτάνουν στα  $10^2$ - $10^3$  κύτταρα/g εδάφους που είναι και τα επίπεδα στα οποία μπορεί να βρεθεί ο συγκεκριμένος σαπροφυτικός μύκητας στο έδαφος σε φυσικούς πληθυσμούς (Roumpros, 2005). Έτσι, η μείωση του πληθυσμού του μύκητα με την πάροδο του χρόνου είναι πιθανόν να οδηγεί σε αντίστοιχη ανάκαμψη του πληθυσμού των AOB και των AOA λόγω περιορισμού του ανταγωνισμού.

Από τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν, τα QLAgr® και MCW-2 οδήγησαν σε συνολική μείωση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB. Αντίθετα εφαρμογή των MCW και Oxamyl προκάλεσαν μια συνολική αύξηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA.

### **Τελικά συμπεράσματα**

- ✓ Από τα τέσσερα γεωργικά φάρμακα που αξιολογήθηκαν στην παρούσα εργασία, το BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* 251) ήταν το μόνο που προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη δομή της κοινότητας των AOB και λιγότερο εμφανείς αλλά επίσης σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των AOA.
- ✓ Η εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος BIOACT® προκάλεσε σημαντικές μεταβολές και στον πληθυσμό των AOA και AOB κατά την χρονική διάρκεια του πειράματος (90 ημέρες), που αποδόθηκαν σε άμεσο ανταγωνισμό με τον μύκητα ή έμμεσο ανταγωνισμό με ομάδες ετερότροφων μικροοργανισμών που ευνοούνται από την εφαρμογή του σκευάσματος στο έδαφος.
- ✓ Σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε υψηλότερος αριθμός αντιτύπων του γονιδίου *amoA* των AOA συγκριτικά με τα AOB με τον λόγο AOA/AOB να κυμαίνεται από 2 έως 28.

## Συνέχιση μελέτης

Σε συνέχεια της παρούσα μελέτης θα πραγματοποιηθεί PCR πραγματικού χρόνου ώστε να διερευνηθούν πιθανές μεταβολές στον πληθυσμό του στελέχους 251 του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* στο έδαφος με την πάροδο του χρόνου και πως αυτές συσχετίζονται με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην σύσταση της κοινότητας των AOA και AOB αλλά και στην αφθονία τους στο έδαφος.

Επίσης, θα πραγματοποιηθεί προσθήκη γλυκόζης σε έδαφος και θα ακολουθήσει ποσοτικοποίηση των AOB και των AOA με PCR πραγματικού χρόνου ώστε να παρατηρηθεί η ανταπόκρισή τους στην προσθήκη γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου. Με αυτό τον τρόπο θα επιβεβαιωθεί ή όχι η υπόθεση ότι οι μεταβολές στην αφθονία των AOB και AOA οφείλονται στα έκδοχα που περιέχει το σκεύασμα BIOACT (78% γλυκόζη) και όχι σε άμεσο ανταγωνισμό των AOB και AOA με τον μύκητα *Paecilomyces lilacinus*.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adair, K.L. and Schwartz, E. (2008) Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA. *Microbiol Ecol* 56: 420-426.
- Anastasiadis, I.A., Giannakoub, I.O., Prophetou-Athanasiadou, D.A., Gowen, S.R. (2008) The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection* 27: 352-361.
- Andrea, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Pettinelli, A. Jr. (2000) Impact of longterm pesticide application on some soil biological parameters. *J. Environ. Sci. Health B* 35: 297–307.
- Arp, D.J., Sayabedra-Soto, L.A., Hommes, N.G. (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178: 250-255
- Avrahami, S., Conrad, R., Braker, G. (2002) Effects of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5685–5692.
- Avrhami, S. and Conrad, R., (2003) Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Appl Environ Microb* 69: 6152–6164.
- Backman, J.S.K., Hermansson, A., Tebbe, C.C., Lindgren P.-E. (2003) Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidizing bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1337-1347.
- Balestra, G.M. and Misaghi, I.J. (1997) Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 30: 111-117.
- Baxter, J. and Cummings, S.P. (2008) The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1605–1616.
- Bonats, P.J.M., Fitters, P.F.L., Thijs, H., den Belder, E., Waalwijk, C., Henfling, J.W.D.M. (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* 141: 775-784.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., Triplett, E.W. (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1935–1943.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K.-P. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev* 24: 673–690.
- Boyle-Yarwood, S.A., Bottomley, P.J., and Myrold, D.D. (2008) Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environ Microbiol* 10: 2956-2965.
- Becker, S., Boger, P., Oehlmann, R., Ernst, A. (2000) PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microb* 66: 4945–4953.

- Beman, J.M., Popp, B.N., Francis, C.A. (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* 2: 429–441.
- Bergmann, D.J. and Hooper, A.B. (1994) Sequence of the gene, *amoB*, for the 43kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 759-762.
- Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P.C., Pohl, J., Soccol, C.R. (2004) Development of a Bionematicide With *Paecilomyces lilacinus* to Control *Meloidogyne incognita* *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181: 81-88.
- Burton, S.A.Q. and Prosser, J.I. (2001) Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl Environ Microbiol* 67: 2952–2957.
- Byrne, N., Strous, M., Crépeau, V., et al (2009) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME J* 3:117–123
- Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., Hollibaugh, J.T. (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J.* 1: 660–662.
- Calvo, L., Garcia-Gil, L.J. (2004) Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. *J Microbiol Methods* 57: 69–78.
- Carini, S.A., Joye, S.B. (2008) Nitrification in Mono Lake, California: activity and community composition during contrasting hydrological regimes. *Limnol Oceanogr* 53: 2546–2557.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., Gardinali, P.R., Perry, W.B., Tompkins, M.S., Fernandez, A. M. (2006) Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida Canals: An ecological risk prioritization for aquatic arthropods. *Soil Sed. Contam.* 15: 21–45.
- Castro-González, M., Braker, G., Farías, L., Ulloa, O. (2005) Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environ. Microbiol* 7:1298-1306.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F. et al (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 185: 2759–2773.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S. (2001) Effect of fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1971–1980.
- Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L., Kitts, C.L. (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31: 135-142.
- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M., Stahl, D.A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* 10: 810–818.
- Donner, G., Schwarz, K., Hoppe, H.-G. Muyzer, G. (1996) Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Archives of Hydrobiology. Special Issues Advanced Limnology* 48: 7-14.

- Dorador, C. (2007) Microbial diversity in high altitude wetlands of the Chilean altiplano: phylogeny, diversity and function. Thesis, University of Kiel, Kiel.
- Dorador, C., Busekow, A., Vila, I., Imhoff, J.F., Witzel, K.-P. (2008) Molecular analysis of enrichment cultures of ammonia oxidizers from the Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile. *Extremophiles* 12: 405–414.
- Fliessbach, A. and Mader, P. (2004) Short- and long-term effects on soil microorganisms of two potato pesticide spraying sequences with either glufosinate as defoliant. *Biol. Fertil. Soils* 40: 268–276.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14683–14688.
- Freitag, T.E. and Prosser, J.I. (2004) Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Appl Environ Microbiol* 70: 3789–3793.
- Gabor, E.M., Vries, E.J., Janssen, D.B. (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology* 44: 153-163.
- Geets, J., Boon, N., Verstraete, W., (2006) Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58 1–13.
- Gieseke, A., Tarre, S., Green, M., de Beer, D. (2006) Nitrification in a biofilm at low pH values: role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 72: 4283–4292.
- Gupta, S.C., Leathers T.D., Wickolw D.T. (1993) Hydrolytic enzymes secreted by *Paecylomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavu*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 99-103.
- Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., DeLong, E.F. (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol.* 4: 520–536.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. (2000) Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 48: 89–93.
- Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A. (2008) Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1620–1633.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2134–2139.
- He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zheng, Y.-M., Xu, M.-G., Di, H.J. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol* 9: 2364–2374.

- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R. (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* 139: 1147–1153.
- Herrmann, M., Saunders, .M., and Schramm, A. (2008) Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl Environ Microbiol* 74: 3279-3283.
- Hirayama, H., Takai, K., Inagaki, F., Yamato, Y., Suzuki, M., Nealson, K.H., Horikoshi, K. (2005) Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles* 9: 169–184.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *P Natl Acad Sci USA* 88: 7276–7280.
- Hollocher, T., Tate, M., Nicholas, D. (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definite 18O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 256: 10834-10836.
- Hollocher, T.C., Kumar, S., Nicholas, D. J. (1982) Respiration-dependent proton translocation in *Nitrosomonas europaia* and its apparent absence in *Nitrobacter agilis* during inorganic oxidations. *J. Bacteriol.* 149: 1013-1020.
- Hollibaugh, J.T., Bano, N., Ducklow, H.W. (2002) Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 1478-1484.
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 59-67.
- Horz, H.-P., Rotthauwe, J.H., Lukow, T. Liesack. W. (2000) Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Methods* 39: 197-204.
- Hoshino, T., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. (2001) Direct detection by in situ PCR of the *amoA* gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process. *Appl Environ Microbiol* 67: 5261–5266.
- Ingalls, A.E., Shah, S.R., Hansman, R.L., Aluwihare, L.I., Santos, G.M., Druffel, E.R.M., Pearson, A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6442–6447.
- Jetten, M.S.M. (2001) New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant and Soil* 230: 9-19.
- Jia, Z.J. and Conrad, R. (2009) Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ. Microbiol.* 11: 1658–1671.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Lv, G., Deng, S., Berzins, N., Dai, M. (2009) Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China. *Geomicrobiology J* 26: 199–211.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. (2001) Pesticides effects on bacterial diversity in agricultural soils—A review. *Biol. Fertil. Soils* 33: 443–453.



- Junier, P., Kim, O.S., Hadas, O., Imhoff, J.F., Witzel, K.P. (2008) Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 74: 5231–5236.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M. (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* 64: 3042–3051.
- Karner, M.B., DeLong, E.F., Karl, D.M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507–510.
- Khan, A., Williams, K., Nebalain, H. (2003) Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS Microbiology Letters* 227: 107-111.
- Kiewnick, S. (2006a) Effect of temperature on growth, germination, germ-tube extension and survival of *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biocontrol Science and Technology* 16(5): 535-546.
- Kiewnick, S. and Sikora, R.A. (2006b) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251 2005. *Biological Control* 38:179-187.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microb* 66: 1328–1333.
- Klose, S. and Ajwa, H. A. (2004) Enzymes activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1625–1635.
- Klotz, M.G., Alzerreca, J., Norton, J.M. (1997) A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 150(1): 65-73.
- Klotz, M.G., Arp, D.J., Chain, P.S., et al (2006) Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceanus* ATCC 19707. *Appl Environ Microbiol* 72: 6299–6315.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.
- Koops, H.P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G., Wagner, M. (2003) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes*. Springer, New York.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., Woldendorp, J.W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63: 1489–1497.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heiling, G.H.J., Stephen, J.R., Woldendorp, J.W. (2000a) Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria

- during second-ary succession of calcareous grasslands, *Environ. Microbiol.* 2: 99–110.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heiling, G.H.J., Stephen, J.R., Woldendorp, J.W. (2000b) Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands), *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 207–215.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55: 485–529.
- Kumar, S. and Nicholas, D.J.D. (1982) A protonmotive force-dependent adenosine-5' triphosphate synthesis in spheroplasts of *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 14: 21-25.
- Lebedeva, E.V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E., Spieck, E. (2005) Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 297–306.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806–809.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Martín, R.-S., Magunacelaya, J.-C. (2005) Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology.* 7: 577-585(9).
- McCaig, A.E., Embley, T.M., Prosser, J.I. (1994) Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol Lett* 120: 363–367.
- McTavish, H., Fuchs, J.A., Hooper, A.B. (1993) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175: 2436-2444.
- Mikami, Y., Yazawa, K., Fukushima, K., Arai, T., Udagawa, S., Samson, R.A. (1989) Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains *Mycopathologia* 108: 195-199.
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., DeLong, E.F. (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* 9: 1162–1175.
- Mintie, A.T., Heichen, R.S., Cromack, K., (2003) Ammonia-oxidizing bacteria along meadow-forest transects in the Oregon cascade mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3126–3129.
- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* 16:177–184.
- Muyzer, G., de Waal, C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

- chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Nicol, G.W., Glover, L.A., Prosser, J.I., (2003) The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* 5: 152–162.
- Nicol, G.W. and Schleper, C. (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol* 14: 207–212.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* 10: 2966–2978.
- Niewiadomska, A. (2004) Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense* L). *Pol. J. Environ. Stud.* 13: 403–410.
- Nold, S.C., Zhou, J., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (2000) Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 4532–4535.
- Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y., Klotz, M.G. (2002) Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammoniaoxidizing bacteria. *Arch Microbiol* 177: 139–149.
- Norton, J.M., Klotz, M.G., Stein, L.Y., et al (2008) Complete genome sequence of *Nitrospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ Microbiol* 74: 3559–3572.
- Nugroho, R.A., Rolling, W.F.M., Laverman, A.M., Verhoef, H.A. (2007) Low nitrification rates in acid Scots pine forest soils are due to pH-related factors. *Microb Ecol* 53: 87–97.
- Ogram, A., Saylor, G.S, Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7: 57–66.
- Oka, Y., Berson M., Barazani A, (2008) MCW-2: a 'true' nematicide belonging to the fluoroalkenyl group. *Proc 5th International Congress of Nematology*, Brisbane, Australia, pp. 313–314.
- Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., and Scow, K.M. (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microb* 70: 1008–1016.
- Omirou, M., Rousidou, C., Bekris, F., Papadopoulou, K.K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Ehaliotis, C., Karpouzas, D.G. (2010) The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community *Microbial Ecology*
- O'Mullan, G.D., Ward, B.B. (2005) Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. *Appl Environ Microbiol* 71: 697–705.
- Pampulha, M. E. and Oliveira, A. (2006) Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Curr. Microbiol.* 53: 238–243.

- Penton, C.R., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (2006) Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 72: 6829–6832.
- Phillips, C.J., Smith, Z., Embley, T.M., Prosser, J.I. (1999) Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammoniaoxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class Proteobacteria in the northwestern Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol* 65: 779–786.
- Pimentel, D. (1995) Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8: 17–29.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2008) Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environ Microbiol* 10: 2931–2941.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P. Wagner, M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* 66: 5368–5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P. (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1485–1494.
- Reigstad, L.J., Richter, A., Daims, H., Urich, T., Schwark, L., Schleper, C. (2008) Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 167–174.
- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P. (2003) Extraction of DNA from soil *European Journal of Soil Biology* 39: 183–190.
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M. (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples *Applied Soil Ecology* 18: 47–60.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63: 4704–4712.
- Roumpos, C. (2005) Ecological studies on *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and their importance for biocontrol of plant-parasitic nematodes and risk assessment. Cuvillier Verlag Gottingen.
- Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, H.P. (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* 4: 654-666.
- Sameh, S., Fabrice, M. L., Nadine, R., Silvio, G., and Diederik, V. T. (2007) Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities. *Pest Manag. Sci.* 63: 269–275.
- Santoro, A.E., Francis, C.A., De Siewes, N.R., Boehm, A.B. (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ. Microbiol.* 10: 1068–1079.

- Sayavedra-Soto, L.A., Hommes, N.G., Arp, D.J. (1994) Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacterio.* 176: 504-510.
- Schultz, P. and Urban, N.R. (2008) Effects of bacterial dynamics on organic matter decomposition and nutrient release from sediments: A modeling study. *Ecol. Model.* 210: 1–14.
- Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zhang, J.-B., He, J.-Z. (2008) Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 10: 1601–1611.
- Singh, B.K. and Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 428–471.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., Osborn, A.M. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microb* 73: 3612–3622.
- Spyrou I.M., Karpouzas D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U. (2009) Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 58(4): 715-727.
- Stein, L.Y., Arp, D.J., Berube, P.M. et al (2007) Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environ Microbiol* 9: 2993–3007.
- Stephen, J., McCaig, A., Smith, Z., Prosser, J., Embley, T. (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 4147–4154.
- Stephen, J.R., Chang, Y.-J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Leung, K.T., Flemming, C.A., White, D.C. (1999) Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 95-101.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H. et al (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50-nuclease assays. *Appl Environ Microb* 66: 4605–4614.
- Takai, K. and Horikoshi, K., (2000) Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microb* 66: 5066–5072.
- Tamegai, H., Aoki, R., Arakawa, S., Kato, C. (2007) Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: genes for nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA. *Extremophiles* 11: 269–275.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite- oxidizing bacteria. *J Bacteriol* 176: 269-275.

- Torsvik, V.L. (1980) Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 15-21.
- Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ. Microbiol.* 10: 1357–1364.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7: 1985–1995.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1987) Health Advisory Summary: Oxamyl. Office of Drinking Water, Washington. D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency (2005) BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT, *Paecilomyces lilacinus* strain 251 (PC Code 028826)
- van de Graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol* 61: 1246–1251.
- van Elsas, J.D., Duarte, G.E., Rosado, A.S., Smalla, K. (1998) Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32: 133–54.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F. et al (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.
- Voytek, M.A. and Ward, B.B. (1995) Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 61: 1444–1450.
- Wagenet, L.P.A (1985) Review of Physical-Chemical Parameters Related to the Soil and Groundwater Fate of Selected Pesticides in New York State, Report No.30. Cornell University Agricultural Experiment Station, Ithaca, NY.
- Wang, M.C., Gong, M., Zang, H.B., Hua, X.M., Yao, J., Pang, Y.J., Yang, Y.H. (2006) Effect of methamidophos and urea application on microbial communities in soils as determined by microbial biomass and community level physiological profiles. *J. Environ. Sci. Health B* 41: 399–413.
- Wang, J., Lu, Y., Shen, G. (2007) Combined effects of cadmium and butachlor on soil enzyme activities and microbial community structure. *Environ. Geol.* 51: 1093–1284.
- Wang, Y., Xiubin, K., Liqin, W., Yahai, L. (2009) Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 27-36.
- Ward, B.B. and O'Mullan, G.D. (2002) Worldwide Distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a Marine Ammonia-Oxidizing gamma-Proteobacterium, Detected by PCR and Sequencing of 16S rRNA and amoA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4153-4157.
- Wardle, D.A., Nicholson, K.S., Rahman, A. (1994) Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. *NZ J. Agric. Res.* 37: 29–39.

- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M., Burt, J.P. (1992) SCS/ARS/CES pesticides properties database for environmental decisionmaking. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123: 1-157.
- Wessen, E., Nyberg, K., Jansoon, J.K., Hallin, S., (2010) Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology* 45: 193-200.
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O.V. (2009) Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol Eng* 35: 898–907.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. Rasmussen, R.P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22: 130–138.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J., Middelburg, J.J., Schouten, S., Damste, J.S.S., (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12317–12322.
- Zhou, Y., Liu, W., and Ye, H. (2006) Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aquisols. II. Soil respiration. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 17: 1305–1309.
- Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α (2007) Γεωργική φαρμακολογία. Αθήνα.