



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
3,5-ΔΙΧΛΩΡΟΑΝΙΛΙΝΗΣ ΣΤΑ
ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ
ΕΔΑΦΟΥΣ

ΚΑΣΙΩΤΑΚΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

25/6/2017



UNIVERSITY OF THESSALY, DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

STUDY OF THE IMPACT OF
3,5-DICHLOROANILINE IN
AMMONIA OXIDIZING BACTERIA
OF THE SOIL

KASIOTAKIS ALEXANDROS

25/6/2017

Τριμελής επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γονιμότητας – Βιολογίας Εδάφους, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, για τη καθοδήγηση, και τη βοήθεια σε όλα τα στάδια του πειράματος και στην συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Καρά για την μεγάλη του βοήθεια στην εκμάθηση και οργάνωση των πειραματικών διαδικασιών, όπως επίσης και για την υπομονή του για όλη την περίοδο του πειράματος. Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Νεκταρία Υψηλάντη που δουλεύαμε παράλληλα, για την βοήθεια της στο εργαστηριακό κομμάτι του πειράματος. Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία και τη φιλοτιμία τους. Ένα ευχαριστώ και στην κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και στον κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ανυπολόγιστη υποστήριξη τους όλο το διάστημα που διήρκησε η εργασία αλλά και καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ^[1]

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία είναι πολύ διαδεδομένη, οπότε είναι συχνές οι μελέτες για την επίδραση τους σε οργανισμούς-μη στόχους. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες επικεντρώνονται στις επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων και όχι στα προϊόντα του μεταβολισμού τους τα οποία μπορεί να εμφανίζουν υψηλότερη τοξικότητα από την μητρική ουσία. Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης (3,5-DCA), του κύριου μεταβολίτη του μυκητοκτόνου Iprodione, στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς τους εδάφους και συγκεκριμένα στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB). Οι νιτρωδοποιητές εμπλέκονται στην νιτροποίηση, την βασικότερη διεργασία του κύκλου του αζώτου και είναι υπεύθυνοι για το πρώτο βήμα αυτής, δηλαδή για την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) και των αμμωνιακών (NH_4^+) σε νιτρώδη (NO_2^-). Η επίδραση της 3,5-DCA αξιολογήθηκε σε επίπεδο εργαστηρίου σε έδαφος με ή χωρίς αμμωνιακή λίπανση όπου εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές δόσεις της 3,5-DCA (0.6, 6 και 60 mg/kg). Οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις της 3,5-DCA που αναμένεται να σχηματιστούν από την υδρόλυση του iprodione στο έδαφος ύστερα από εφαρμογή δόσεων x1, x10 και x100 της συνιστώμενης. Η επίδραση της 3,5-DCA στη νιτρωδοποίηση προσδιορίστηκε μέσω μέτρησης του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της αφθονίας του γονιδίου amoA των AOB με PCR πραγματικού χρόνου. Επιπλέον μελετήθηκε και η αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος. Η εφαρμογή των δύο υψηλότερων δόσεων 3,5-DCA οδήγησε σε παροδική (6 mg/kg) ή έμμονη (60 mg/kg) μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης η οποία ήταν πιο εμφανής στο έδαφος που είχε προηγηθεί εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης. Αντίθετα η εφαρμογή 3,5-DCA οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOB μόνο στα δείγματα που είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποιο ξεκάθαρο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο. Συνολικά η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η εφαρμογή 3,5-DCA σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της νιτρωδοποίησης ιδιαίτερα σε εδάφη με περίσσεια αμμωνιακών.

ABSTRACT

The use of agricultural pesticides is widespread in modern agriculture, so the studies of their impact on the non-target organisms of the ecosystems on which they are applied are pretty common. However most of these studies are focused only on the impact of the agricultural pesticides and not of their metabolites, which might show higher toxicity than the maternal substance. The current thesis studies the impact of 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), the main metabolite of the fungicide iprodione, on the community of ammonia oxidizing microorganisms of the soil and more specifically on ammonia oxidizing bacteria (AOB). Ammonia oxidizers are involved in nitrification, the most important step in the nitrogen cycle, and they are responsible for its first step, the oxidation of ammonia (NH_3) and of ammonium ions (NH_4^+) into nitrite ions (NO_2^-). The impact was evaluated in laboratory scale in soil with and without previous ammonia fertilization, with the application of three different concentrations of 3,5-DCA (0.6, 6 and 60 mg/kg). These concentrations correspond to the concentrations of 3,5-DCA that are expected to form from the hydrolysis of iprodione in the soil after the application of x1, x10, x100 of the recommended dose. The impact of 3,5-DCA on ammonia oxidation was determined through the potential nitrification rate and quantification of the abundance of AOB through real time PCR. Moreover, the degradation rate of 3,5-DCA was evaluated. From the results it was observed that a reduction in the potential nitrification rate occurred in the concentrations 6 and 60 mg/kg, that change was clearer in the soil with previous ammonia fertilization. On the contrary, the application of 3,5-DCA led to important variations in the abundance of AOB only in samples with previous ammonia fertilization but some clear dose dependant standard wasn't observed. The conclusion of this study is that 3,5-DCA in high concentrations may lead to the inhibition of nitrification, especially in soils with excess ammonium.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Γεωργικά φάρμακα	7
1.2. Μυκητοκτόνα	8
1.2.1. Iprodione	9
1.2.2. 3,5-Διχλωροανιλίνη (3,5-DCA)	11
1.3. Κύκλος του αζώτου.....	12
1.3.1. Νιτροποίηση.....	15
1.3.2. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων και νιτροποίηση	16
1.4. Σκοπός της εργασίας	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	19
2.2. Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης.....	20
Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	20
2.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOB.....	22
Μέθοδοι.....	22
2.4. Προσδιορισμός της αποδόμησης της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους.....	24
Διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:	24
Διαδικασία Εκχύλισης από το έδαφος	24
Διαδικασία Ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1. Αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος.....	26
3.2. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.....	28
3.3. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων του εδάφους	30

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	32
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γεωργικά φάρμακα

Ως γεωργικά φάρμακα ονομάζονται χημικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να θανατώσουν, να παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη οργανισμών, επιβλαβών για τις αγροτικές καλλιέργειες. Η χρήση τους είναι καθιερωμένη στην σύγχρονη γεωργία και έχει ως στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας και των αποδόσεων των καλλιεργούμενων φυτών, στη βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, στην οικονομικότερη καλλιέργεια και συνεπώς οικονομία στο καλάθι του καταναλωτή, στη μείωση των απωλειών στα γεωργικά προϊόντα και στην διασφάλιση της επάρκειας τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα (Aktar et al, 2009, Taube et al., 2002, Ζιώγας κ.α., 2010, Παπαδοπούλου , 2013).

Τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν την κατηγορία γεωργικών φαρμάκων με την μεγαλύτερη χρήση παγκοσμίως (48% επι της συνολικής εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων), ακολουθούμενα από τα μυκητοκτόνα (35%) και τα εντομοκτόνα (14%) (Braschil et al., 2011, Παπαδοπούλου, 2013).

Τα γεωργικά φάρμακα έχουν διάφορους τρόπους εφαρμογής. Μπορεί να γίνει υπέργειος ψεκασμός οργάνων των φυτών, επικάλυψη και προστασία των σπόρων και άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων και απευθείας επέμβαση στο έδαφος (Van der Werf 1996, Ζιώγας κ.α., 2010). Ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής το μεγαλύτερο ποσοστό της ποσότητας του γεωργικού φαρμάκου που εφαρμόζεται συνήθως έχει το έδαφος ως τον τελικό αποδέκτη (Braschil. et al., 2011, Galiulin et al., 2001, Παπαδοπούλου, 2013). Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία το ποσοστό των δραστικών ουσιών που καταλήγουν στο έδαφος ανέρχεται στο 85% της συνολικής χρησιμοποιούμενης ποσότητας (Margni et al., 2002).

1.2. Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ενώσεις ή οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν μύκητες ή σπόρια μυκήτων (Haverkate et al., 1969) ή να αναστείλουν την ανάπτυξη τους. Βρίσκουν εφαρμογή στην γεωργία και σε μυκητιακές μολύνσεις σε ζώα.

Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: μυκητοκτόνα επαφής, διασυστημικά ή διαφυλλικά. Τα μυκητοκτόνα επαφής παραμένουν στην επιφάνεια και δεν απορροφούνται από τον φυτικό ιστό, οπότε παρέχουν προστασία στο σημείο που εφαρμόζονται. Τα διασυστημικά μυκητοκτόνα απορροφούνται και ανακατανέμονται στο ξύλωμα. Τα διαφυλλικά εφαρμόζονται στα φύλλα και ανακατανέμονται από την πάνω στην κάτω πλευρά του φύλλου.

Υπολείμματα μυκητοκτόνων έχουν βρεθεί σε γεωργικά προϊόντα, κυρίως ύστερα από εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων λίγο πριν ή μετά την συγκομιδή (Gosselin et al., 1984). Κάποια είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, όπως το vinclozolin (Hrelia et al., 1996) και το ziram.

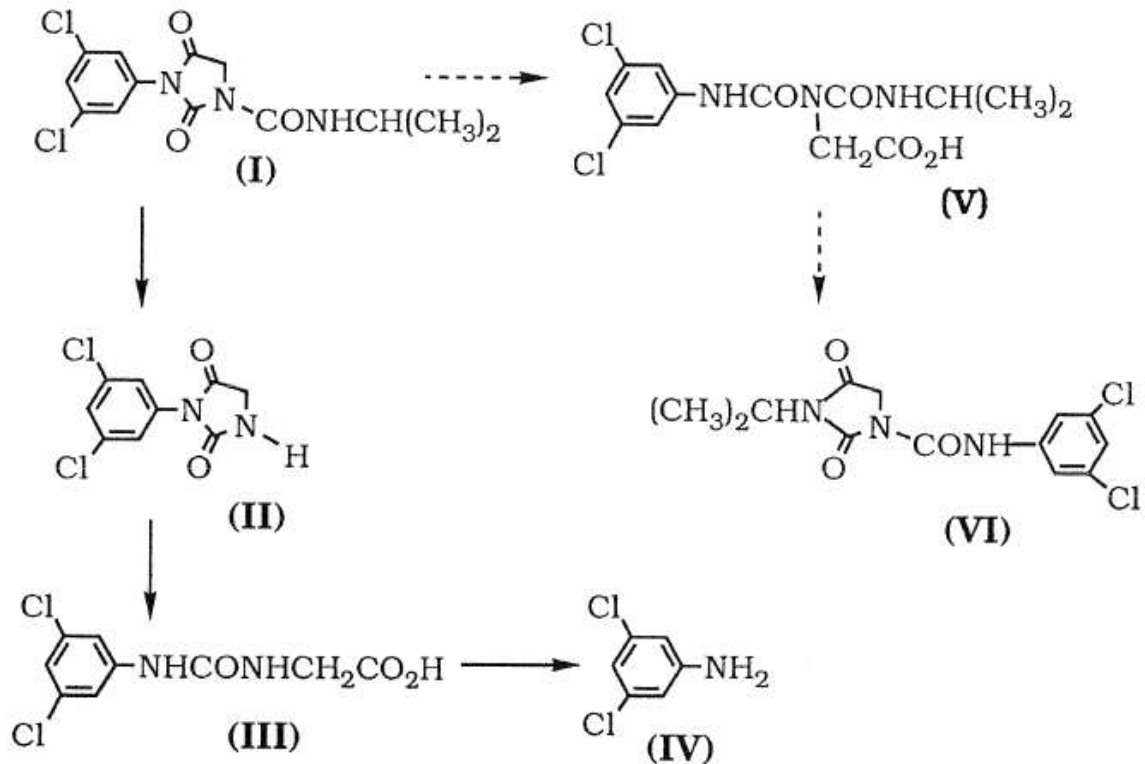
Υπάρχουν φυσικά μυκητοκτόνα από φυτά και μικροοργανισμούς τα οποία χρησιμοποιούνται ως φυσική άμυνα ενάντια στους μύκητες. Κάποια από αυτά στα φυτά είναι το λάδι σιτρονέλλας (Nahakara et al., 2003) και το λάδι ρίγανης. Ακόμη κάποιοι μυκητοκτόνοι ή μυκητοστατικοί μικροοργανισμοί είναι το βακτήριο *Bacillus subtilis* και ο ωφέλιμος μύκητας *Ulocladium oudemansii*.

1.2.1. Iprodione

Το iprodione [3-(3,5-δichλωροφαίνυλο)-N-ισοπρόπυλο-2,4-διοξοϊμιζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο] είναι προστατευτικό δικαρβοξαμιδικό μυκητοκτόνο επαφής με ευρύ φάσμα δράσης που αναστέλλει την βλάστηση των σπορίων, των μυκήτων και γενικότερα της μυκηλιακής ανάπτυξης. Χρησιμοποιείται ευρέως στην γεωργία (Puglisi et al., 2014). Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων όπως οι *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Rhizoctonia* sp. (Grabke et al., 2014, Miñambres et al. 2010). Ακόμη είναι γνωστό ότι επιδρά αρνητικά και σε οργανισμούς που δεν είναι στόχοι, μέσω του κύριου μεταβολίτη του, της 3,5-δichλωροανιλίνης (3,5-DCA) (Parrola et al., 2014). Το iprodione δρα σε όλες τις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης των μυκήτων. Το iprodione έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο, και έχει αναφερθεί η εμπλοκή του στην μείωση της παραγωγής τεστοστερόνης σε άρρενα άτομα καθώς πειράματα έχουν δείξει ότι υπάρχει καθυστέρηση στην εφηβική ανάπτυξη αρσενικού αρουραίου (Blystone et al., 2007). Επίσης εμφανίζει υψηλή οικοτοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς (NOEC 34 ημέρες ψάρια: 0.26 mg a.s./l) (EFSA 2016) Προσοφάται ασθενώς στα εδαφικά κολλοειδή ($K_{oc} = 400$ ml/g) με αποτέλεσμα να εμφανίζει υψηλή κινητικότητα στο περιβάλλον (Strömqvist & Jarvis 2005)^[k2] και να ανιχνεύεται συχνά σε επιφανειακά νερά (Sequinatto et al. 2013)^[k3] και ιζήματα λιμνών (Metcalf et al. 2017)^[k4]. Ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση του iprodione στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις iprodione προκάλεσαν μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (PLFAs, DGGE), χωρίς όμως να διευκρινίζεται εάν οι επιδράσεις ήταν θετικές ή αρνητικές (Wang et al., 2004)^[k5]; Minambres et al., 2010). Πρόσφατα οι Parrola et al., (2014)^[k6] έδειξαν ότι η εφαρμογή iprodione σε δόσεις x10 και x100 φορές της συνιστώμενης

οδηγεί σε πρόσκαιρη ή έμμονη αναστολή της νιτροποίησης που αποδόθηκε στην συσσώρευση της 3,5-DCA.

Το iprodione εμφανίζει χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα στο έδαφος ($DT_{50}=6.3-89.4$ d) (EFSA 2016) που συσχετίζεται με το pH του εδάφους (Walker 1987)^[k7]. Η ταχύτερη αποδόμηση του iprodione σε εδάφη που εμφανίζουν ουδέτερο προς αλκαλικό pH αποδόθηκε σε συνδυασμό βιοτικών και αβιοτικών μηχανισμών. Παράλληλες μελέτες έδειξαν ότι σε εδάφη με ιστορικό χρήσης iprodione το μυκητοκτόνο εμφάνιζε ταχύτερη αποδόμηση που οδηγούσε σε απώλεια της μυκητοκτόνου δράσης του (Entwistle et al. 1986)^[k8], φαινόμενο που ονομάστηκε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και αποδίδεται στην επικράτηση στο έδαφος βακτηρίων που χρησιμοποιούν το iprodione ή τα προϊόντα μεταβολισμού του ως πηγές ενέργειας (Mitchell & Cain 1996)^[k9]. Σε τέτοια εδάφη το μυκητοκτόνο υδρολύεται αρχικά σε 3,5-dichlorophenyl-carboxamide το οποίο στην συνέχεια μεταβολίζεται περαιτέρω σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate και στην συνέχεια σε 3,5-dichloroaniline (Mercadier et al. 1996)^[k10] (Εικόνα 1). Πρώτοι οι Athiel et al. (1995)^[k11] απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Arthrobacter* sp., που αποδομούσε ταχύτατα το iprodione ακολουθώντας το μεταβολικό μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Mercadier et al. 1996). Πιο πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση, από έδαφος χωρίς πρότερη χρήση iprodione, μίας βακτηριακής κοινοπραξίας, που αποτελούνταν από ένα *Arthrobacter* και ένα *Achromobacter* στέλεχος, που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το iprodione (Campos et al. 2015)^[k12]. Ακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι το *Arthrobacter* ήταν υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του iprodione ακολουθώντας το ίδιο μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Campos et al., 2017).^[k13]



Εικόνα 1. Το μονοπάτι μεταβολισμού του iprodione στο έδαφος όπως προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Mercadier et al. (1997). [k14] Διακεκομένα βέλη - Αβιοτικές Μετατροπές, συμπαγή βέλη - Βιοτικές Μετατροπές. (I) Iprodione, (II) *N*-(3,5-Dichlorophenyl)-2,4-dioxoimidazoline, (III) 3,5-dichlorophenylurea acetic acid, (IV) 3,5-dichloroaniline, (V) 3-Isopropyl-carbamoyl-(3,5-dichlorophenyl)-5-hydantoic acid, (VI) isopropyl-3-*N*-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide

1.2.2. 3,5-Διχλωροανιλίνη (3,5-DCA)

Η 3,5-DCA είναι το κύριο προϊόν του μεταβολισμού του Iprodione. Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά από τους Walker et. al. (1986) και ανήκει στις διχλωροανιλίνες οι οποίες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο ανιλίνης υποκατεστημένο με 2

άτομα χλωρίου και έχουν τον μοριακό τύπο $C_6H_5Cl_2N$. Υπάρχουν έξι ισομερή της διχλωροανιλίνης και ονομάζονται με βάση την αμινομάδα στην θέση 1.

Μελέτες για την τοξικότητα της 3,5-DCA σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι επάγει τον σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης, δηλαδή αιμοσφαιρίνης με ένα Fe^{3+} στην ομάδα αίμης αντί για Fe^{2+} , οπότε δεν μπορεί να προσδεθεί το οξυγόνο (Valentovic et al., 1997). Μελέτες για την τοξικότητα της σε άλλους οργανισμούς δείχνουν ότι προκαλεί νεφροτοξικότητα (Lo et al, 1990) και σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης σε αρουραίους (Gosselin et al, 1984). Ελάχιστα είναι γνωστά για την τύχη της 3,5-DCA στο περιβάλλον καθώς και τις αλληλεπιδράσεις της με τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω πρώτη φορά οι Pappola et al. (2014) παρατήρησαν συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της 3,5-DCA στο έδαφος (από την υδρόλυση του iprodione) και της δραστηριότητας διαφόρων μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος καθώς και στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.

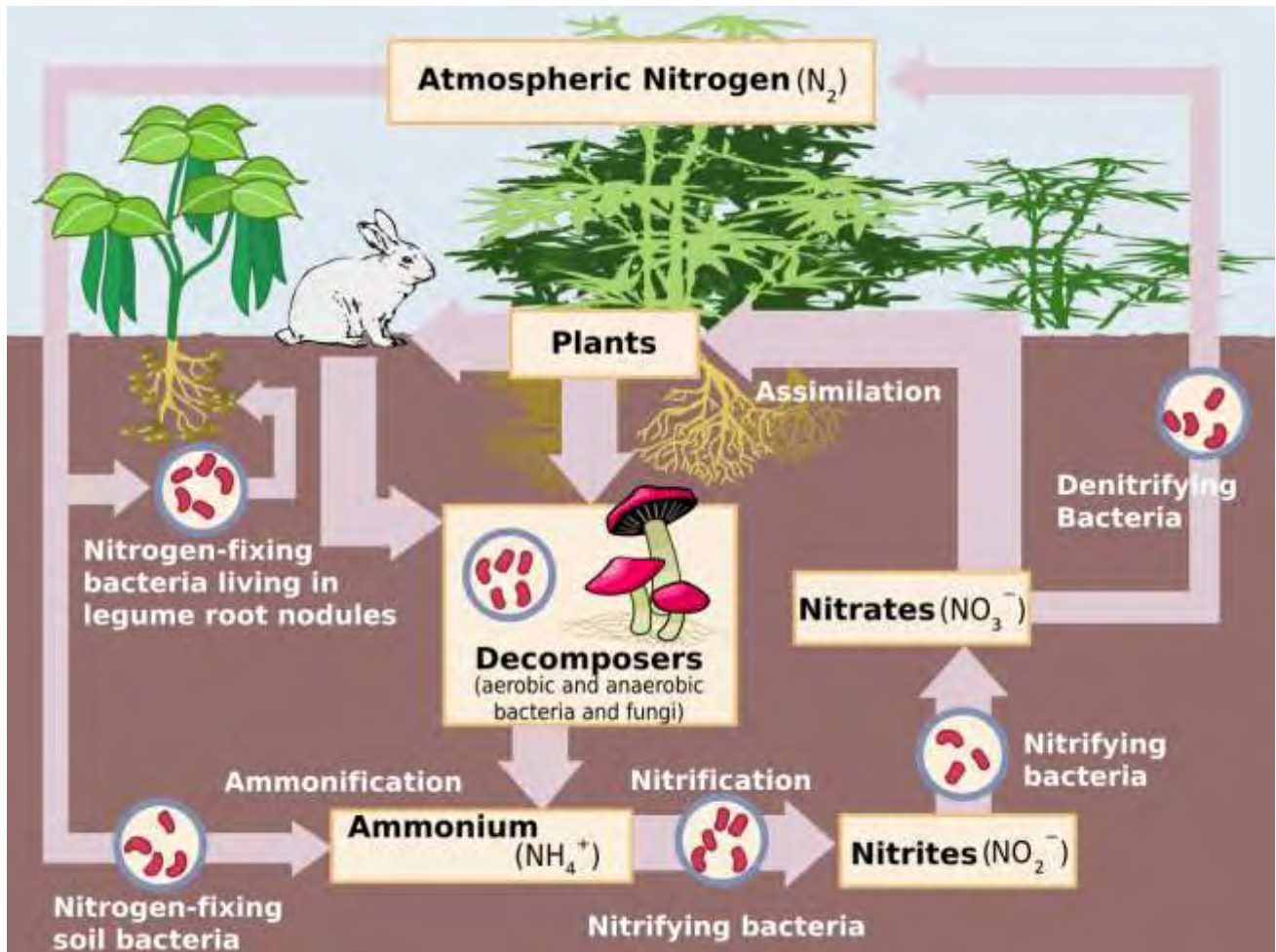
1.3. Κύκλος του αζώτου

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία της ζωής καθώς αποτελεί βασικό συστατικό νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών ενώσεων. Ακόμη είναι το πιο άφθονο στοιχείο στην ατμόσφαιρα (78%) υπό την μορφή του μοριακού αζώτου (N_2). Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου καθώς συμμετέχουν στις 4 βασικές διεργασίες μετατροπής του αζώτου στο έδαφος (Εικόνα 2):

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση αζώτου

- Νιτροποίηση

- Απονιτροποίηση



Εικόνα 2. Ο κύκλος του αζώτου και ο ρόλος των μικροοργανισμών στα επιμέρους βήματα.

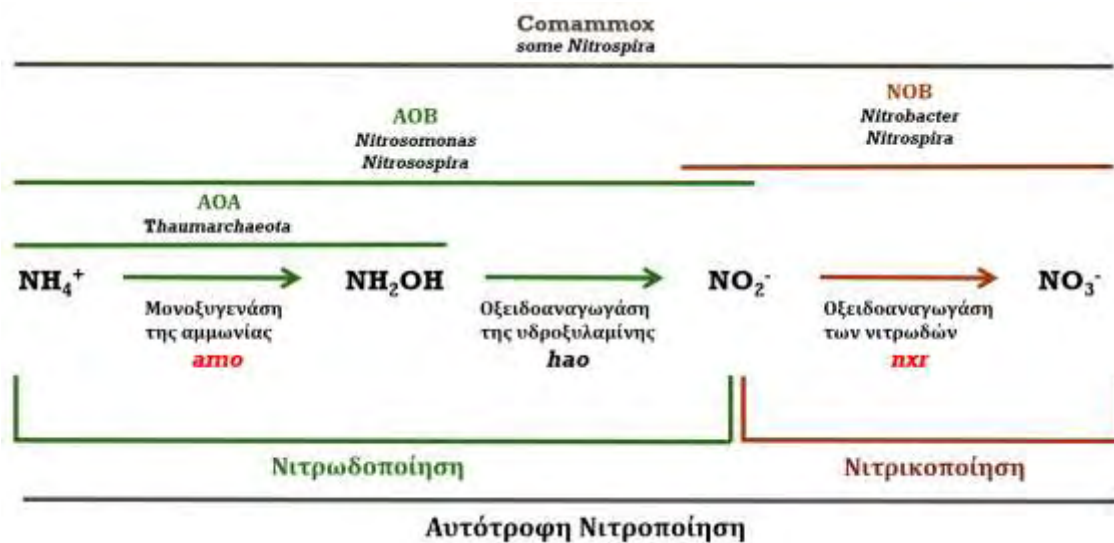
Το μοριακό άζωτο μπορεί να δεσμευτεί από την ατμόσφαιρα από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και να μετατραπεί σε αμμωνία (NH₃). Η διαδικασία αυτή λέγεται **αζωτοδέσμευση** και είναι σημαντική διότι εμπλουτίζει το έδαφος σε N με την μορφή αμμωνίας που μπορεί να αφομοιωθεί στην οργανική ύλη. Στη γεωργία χρησιμοποιούνται λιπάσματα για εμπλουτισμό του εδάφους με αμμωνία (Wagner,2009) .

Η αμμωνιακές οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο έδαφος υδρολύονται με την δράση υδρολυτικών ενζύμων (αμινοπεπτιδάσες, χιτινάσες) που παράγονται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η συγκεκριμένη διαδικασία οδηγεί στην ελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος και ονομάζεται **αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση N** (Bernhard, 2010).

Ακολούθως η αμμωνία ή τα αμμωνιακά ιόντα στο έδαφος (η μορφή τους εξαρτάται από το pH του εδάφους) μετατρέπονται μέσω μικροβιακής οξείδωσης σε νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-) ιόντα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **νιτροποίηση** και πραγματοποιείται από βακτήρια και αρχαία (Bernhard, 2010). Η νιτροποίηση αποτελεί την βασικότερη διεργασία του κύκλου του N στο περιβάλλον και είναι θεμελιώδους σημασίας για την ολοκλήρωση του. Τόσο οι μικροοργανισμοί όσο και τα ενζυμικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στη νιτροποίηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά εξαιτίας της ζωτικής οικονομικής σημασίας και της περιβαλλοντικής σπουδαιότητας της συγκεκριμένης διεργασίας (You et al., 2009; Francis et al., 2007^[k15]). Τα νιτρώδη είναι τοξικά για τους οργανισμούς οπότε η διατήρηση χαμηλών συγκεντρώσεων είναι απαραίτητη για την επιβίωση τους. Τα νιτρικά, το τελικό προϊόν της νιτροποίησης, δεν συγκρατούνται από το έδαφος λόγω του αρνητικού τους φορτίου και καταλήγουν με την διαδικασία της έκπλυσης στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα.

Τα νιτρικά ιόντα είναι υπόστρωμα για την **απονιτροποίηση**, η οποία είναι μια μικροβιακή αναερόβια διαδικασία. Τα απονιτροποιητικά βακτήρια μπορούν να μετατρέψουν υπό αναερόβιες συνθήκες τα νιτρικά ιόντα σε μοριακό άζωτο (N_2) μέσω της ενδιάμεσης παραγωγής νιτρωδών (NO_2^-), μονοξειδίου του αζώτου (NO) και υποξειδίου του αζώτου (N_2O) (Bernhard, 2010).

1.3.1. Νιτροποίηση



Εικόνα 3. Τα επιμέρους στάδια της νιτροποίησης και ποιές ομάδες μικροοργανισμών συμμετέχουν σε καθένα από τα βήματα.

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια: (i) την οξείδωση της NH_3 ή NH_4^+ προς NO_2^- (Νιτρωδοποίηση) και (ii) την οξείδωση των NO_2^- προς NO_3^- (Νιτρικοποίηση) (Εικόνα 3). Η νιτρωδοποίηση στο έδαφος πραγματοποιείται από βακτήρια που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια και ειδικότερα στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrosospira* (Kowalchuk and Stephen, 2001^[k16]) και Αρχαία που ανήκουν στο φύλο Thaumarchaeota (Schleper and Nicol 2010^[k17]). Η νιτρωδοποίηση βιοχημικά διαχωρίζεται σε δύο επιπλέον στάδια: (α) την οξείδωση της NH_3 ή NH_4^+ προς NH_2OH (υδροξυλαμίνη), στάδιο που ελέγχεται από το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και (β) την οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε NO_2^- που ελέγχεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγάση της υδροξυλαμίνης (HAO) και απαντάται μόνο στα AOB (ο μηχανισμός μετατροπής της υδροξυλαμίνης σε NO_2^- στα AOA δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη) (Stahl and de la Torres, 2012^[k18]). Τα νιτρώδη που παράγονται ως τελικό προϊόν της νιτρωδοποίησης μετατρέπονται ακολούθως από νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB, nitrite-oxidizing bacteria) σε νιτρικά ιόντα μέσω της νιτρικοποίησης.

Πρόσφατα οι Daims et al. (2015) [k19] κατέρριψαν την θεωρία του 'υποχρεωτικού' διαχωρισμού των διεργασιών στη νιτροποίηση (κάθε βήμα πραγματοποιείται από διακριτές ομάδες μικροοργανισμών) και έδειξαν ότι βακτήρια του γένους *Nitrospira* sp., πρότερα γνωστά ως αποκλειστικά NOB, έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιούν όλα τα στάδια της νιτροποίησης, και ονομάστηκαν Comammox (**Complete Ammonia Oxidation**). Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις που ακολούθησαν έδειξαν ότι τα Comammox είναι ευρέως διαδεδομένα σε τεχνητά συστήματα (π.χ. μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων) και σε φυσικά εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα (Pinto et al. 2016 [k20]).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο των AOA στην νιτροποίηση σε χερσαία οικοσυστήματα με το pH να αποτελεί το κύριο παράγοντα που καθορίζει ποιά από τα AOB ή AOA κυριαρχούν λειτουργικά στο έδαφος (Nicol et al., 2008 [k21]). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα AOB επικρατούν λειτουργικά συνήθως σε ουδέτερα προς αλκαλικά εδάφη σε αντίθεση με τα AOA που επικρατούν κυρίως σε όξινα εδάφη. Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργική κυριαρχία των δύο αυτών ομάδων στην νιτροποίηση είναι η συγκέντρωση αμμωνίας στο έδαφος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα AOA ευνοούνται σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας σε αντίθεση με τα AOB που ευνοούνται σε συστήματα ή περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακών (Hatzenpichler, 2012). [k22]

1.3.2. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων και νιτροποίηση

Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στα γεωργικά φάρμακα. Έτσι οι Feld et al., (2015) [k23] έδειξαν ότι η εφαρμογή του καπνιστικού dazomet αλλά και του μυκητοκτόνου mancozeb προκάλεσαν μείωση στον

πληθυσμό και στην λειτουργία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων με τις επιδράσεις του mancozeb να είναι αντιστρεπτές. Ανάλογες μελέτες από την Rousidou et al.,(2013) [k24] έδειξαν ότι η εφαρμογή του βιολογικού νηματωδοκτόνου BIOACT που περιέχει σπόρια του μύκητα *Raecilomyces lilacinus* οδήγησε σε προσωρινή μείωση του πληθυσμού των AOA και AOB η οποία αποδόθηκε στα συνέκδοχα της συσκευασίας του BIOACT και όχι στον ίδιο τον μύκητα. Οι Puglisi et al., (2012) [k25] έδειξαν ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων penconazole και cyprodynil οδήγησαν σε άμεση αλλά αντιστρεπτή και πάλι μείωση της δυνητικής νιτροποίησης ενώ παρατηρήθηκαν και σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOA και AOB. Πιο πρόσφατες μελέτες από τους Papadopoulou et al., (2016) [k26] έδειξαν ότι η εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών στο έδαφος όπως τα ortho-phenylphenol και ethoxyquin αντίστοιχα μπορούν να προκαλέσουν σημαντική αναστολή της νιτροποίησης και μείωση της έκφρασης του γονιδίου amoA. Άλλες ανάλογες μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, συνήθως σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες της συνιστώμενης έχει αρνητικές επιδράσεις στον πληθυσμό και στην λειτουργία των AOA και AOB (Crouzet et al., 2009; Hernandez et al., 2011) [k27]. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν τους Wessen and Hallin (2011) [k28] να προτείνουν τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς ως δείκτες καταπόνησης της μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους. Πρόσφατα οι Karpouzas et al, (2016) [k29] πρότειναν την χρήση των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων ως μικροβιακή - ομάδα βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι περισσότερες από τις μελέτες σήμερα έχουν εστιάσει στην μελέτη των επιδράσεων των μητρικών ουσιών στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για την τοξικότητα πιθανών μεταβολικών προϊόντων σε αυτούς. Πρώτοι οι Pappola et al., (2015) έδειξαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της συγκέντρωσης της 3,5-DCA που σχηματίστηκε από την εφαρμογή

του iprodione στο έδαφος. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ iprodione και τοξικότητας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διευκρινιστεί ο ρόλος των μεταβολικών προϊόντων και δη της 3,5-DCA και λοιπών δινιτροανιλινών που παράγονται ως παραπροϊόντα από την υδρόλυση διαφόρων γεωργικών φαρμάκων (παράγωγα ουρίας, propanil) στην τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.4. Σκοπός της εργασίας

Προηγούμενες μελέτες από τους Pappola et al., (2014) πρότειναν ότι η 3,5-DCA είναι υπεύθυνη για την μείωση της δραστηριότητας σημαντικού αριθμού μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος αλλά και της δυνητικής νιτροποίησης. Δεδομένου του σημαντικού ρόλου των AOB στην νιτροποίηση κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην λειτουργία και στην δυναμική των AOB. Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες (Pappola et al., 2015) τα δεδομένα για την εμπλοκή του 3,5-DCA στην τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους προέκυπταν με βάση τις συγκεντρώσεις της ανιλίνης που σχηματιζόταν στο έδαφος από την υδρόλυση του iprodione. Στην παρούσα μελέτη έγινε εφαρμογή της ίδιας της 3,5-DCA στο έδαφος (και όχι του iprodione), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, ανάλογες αυτών που αναμένεται να σχηματιστούν από την εφαρμογή του iprodione σε συγκεντρώσεις ίδιες με την συνιστώμενη και πολλαπλάσιες, και μελετήθηκε η αποδόμηση του καθώς και οι επιδράσεις του στην νιτροποίηση και στον πληθυσμό των νιτροδοποιητικών βακτηρίων. Παράλληλη μελέτη από την Νεκταρία Υψηλάντη στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος μελέτησε στο ίδιο πείραμα την επίδραση της 3,5-DCA στα AOA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από αγρό του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. στην περιοχή της Λάρισας. Μέρος του εδάφους κοσκινίστηκε. Από το κοσκινισμένο έδαφος ζυγίστηκαν 4.4 kg τα οποία χωρίστηκαν σε δύο δείγματα (A) και (B) των 2.2 kg. Στο ένα εφαρμόσθηκαν 22 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M, ως επιπλέον πηγή αμμωνίας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, ενώ στο άλλο δείγμα εφαρμόσθηκαν 22 ml αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Ακολούθως η υγρασία του εδάφους και στα δύο δείγματα προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Οι μεταχειρίσεις (A) και (B) χωρίστηκαν σε 4 δείγματα των 550 g το καθένα, Άρα σύνολο 8 μεταχειρίσεις, στα οποία έγινε εφαρμογή 3.3 ml διαλυμάτων 3,5-DCA (98% καθαρότητα) σε MeOH με συγκέντρωση 0, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g/ml}$ οδηγώντας τελικά σε συγκεντρώσεις 3,5-DCA στο έδαφος της τάξης των 0, 0.6, 6, 60 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα:

A1: 3,5-DCA 0 mg/kg	B1: 3,5-DCA 0 mg/kg
A2: 3,5-DCA 0.6 mg/kg	B2: 3,5-DCA 0.6 mg/kg
A3: 3,5-DCA 6 mg/kg	B3: 3,5-DCA 6 mg/kg
A4: 3,5-DCA 60 mg/kg	B4: 3,5-DCA 60 mg/kg

Τα δείγματα από κάθε μια από τις 8 μεταχειρίσεις διαχωρίστηκαν σε υπο-δείγματα των 25 g, τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια και στην συνέχεια επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 25°C. Έτσι για κάθε μεταχείριση υπήρχαν 21 υπο-δείγματα των 25 g. Αμέσως μετά την εφαρμογή της 3,5-DCA και

σε χρόνου T3, T7, T14, T28, T49, T70 ημέρες μετά την εφαρμογή τρία υπο-δείγματα από κάθε μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και χρησιμοποιούνταν για προσδιορισμό της δυνητικής νιτροποίησης και των συγκεντρώσεων αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στο έδαφος, για εξαγωγή DNA και περαιτέρω προσδιορισμό της δυναμικής των AOB με την χρήση q-PCR για το γονίδιο *amoA* και για προσδιορισμό της αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος.

2.2. Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM
- NaClO_3 1,5M
- KCl 2M
- NH_4Cl 0.19M pH = 8.5
- NaNO_2 1000 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{ml}$
- NaNO_2 10 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{ml}$
- Χρωματικός δείκτης (1 g σουλφανιλαμίδιο και 0.05 g υδροχλωρική N-(1-ναφθυλ)-αιθύλαινο-διαμίνη διαλύθηκαν σε διάλυμα 90 ml dH_2O / 10 ml πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ)

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της Kandeler (1995). Ειδικότερα, 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και

μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε NO_2^- από τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, και 0.1ml NaClO_3 1.5M, ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωσης των νιτρώδων προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτρώδων (NO_2^-) αντί νιτρικών (NO_3^-) ιόντων (Belser & Mays, 1980). Ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος. Παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάστηκαν δύο δείγματα-μάρτυρες για τις μεταχειρίσεις με προσθήκη $\text{NH}_4\text{-N}$ και δύο για τις μεταχειρίσεις χωρίς προσθήκη $\text{NH}_4\text{-N}$. Τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ οι μάρτυρες τοποθετήθηκαν στους -20°C με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτρωδοποίησης. Μετά το πέρας των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά προστέθηκαν 5 ml διαλύματος KCl 2M για τη δέσμευση των ιόντων NH_4^+ και NO_3^- , έπειτα αναδεύθηκαν και διηθήθηκαν. Η συγκέντρωση των ιόντων NO_2^- που σχηματίστηκαν προσδιορίστηκε φωτομετρικά με την χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{ml}$. Στην συνέχεια 5 ml από τα παραπάνω διαλύματα αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl 0.19M $\text{pH} = 8.5$, 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη, ο οποίος αντιδρά με τα NO_2^- και με τη φωτομέτρηση καταδεικνύει την συγκεντρωσή τους στα διαλύματα, και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520 nm. Η φωτομετρική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή σε 5 ml από το κάθε δείγμα προστέθηκαν 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl 0.19M $\text{pH} = 8.5$ και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη. Ακολούθησε ανάδευση και ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τον μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας 5 ml dH_2O με 3 ml

ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl 0.19M pH = 8.5 και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520 nm.

2.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOB

Για την απομόνωση και ποσοτικοποίηση DNA εδάφους χρησιμοποιήθηκαν:

- Powersoil® DNA Isolation Kit της MO BIO Laboratories Inc.
- Διάλυμα TAE 1x
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου (1%)
- Διάλυμα χρωστικής φόρτωσης σε πηκτή (Μπλέ της Βρωμοφαινόλης 6x)
- NEW ENGLAND BioLabs Inc. 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10.0 kb)
- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Ζεύγος εκκινητών amoA1-amoA2R
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Qubit® 2.0 Fluorometer της Invitrogen™
- BIORAD CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System

Μέθοδοι

Εξαγωγή DNA από δείγματα εδάφους: Η απομόνωση DNA από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε από 0.50 g εδάφους (ξ.β.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% για παρατήρηση της ποιότητας του DNA που

εκχυλίστηκε. Τέλος έγινε ακριβής ποσοτικοποίηση του συνολικού DNA με χρήση του Qubit® 2.0 Fluorometer της Invitrogen™.

Για τον υπολογισμό της αφθονίας των νιτροδωποιητικών βακτηρίων εφαρμόστηκε PCR πραγματικού χρόνου με ενίσχυση της A υπομονάδας του γονιδίου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας *amoA*. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε κατασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με το γονίδιο *amoA* γνωστής συγκέντρωσης. Από πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{10} αντιγράφων/μl παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα συγκεντρώσεων 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 αντιγράφων ανα μl που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή εξωτερικής πρότυπης καμπύλης. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR πραγματικού χρόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 ενώ οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες στο Πίνακα 2.

Πίνακας 1: Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για ενίσχυση του γονιδίου *amoA* στα AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl
AmoA1F	0.2 μl
AmoA2R	0.2 μl
BSA	0.2 μl
DNA	2 μl
ddH ₂ O	2.4 μl
Συνολικός όγκος	10 μl

Πίνακας 2: Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση των ΑΟΒ

Ενεργοποίηση ενζύμου	95 ^ο C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 ^ο C	15 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57 ^ο C	15 sec	
Επιμήκυνση	72 ^ο C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 ^ο C	1 min	1 κύκλος
	55 ^ο C	30 sec	
	95 ^ο C	30 sec	

2.4. Προσδιορισμός της αποδόμησης της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους

Διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), 99.9+% καθαρότητα

Διαδικασία Εκχύλισης από το έδαφος

Ποσότητα 5 g εδάφους από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml και αναμίχθηκε με 10 ml ακετονιτρίλιο για απομόνωση της 3,5-DCA. Ακολούθησε επώαση με ανάδευση στις 180 rpm για μία ώρα σε θερμοκρασία 25^οC. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 7500 rpm για πέντε λεπτά. Έπειτα, 5 ml από το υπερκείμενο

διηθήθηκαν μέσω PTFE φίλτρων σύριγγας και ακολούθησε ανάλυση σε σύστημα HPLC Shimadzu όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία Ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή φωτοδίοδων (HPLC-PDA) Shimadzu. Ο διαχωρισμός της 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε με τη στήλη Athena C18 4,6 x 150 mm, 5μm της εταιρείας CNW technologies, ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο : υπερκάθαρο νερό (70:30 κ.ο.) και ροή 1 ml/min. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 220 nm. Με βάση τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες η 3,5-DCA ανιχνεύθηκε με χρόνο κατακράτησης 4,04 min. Οι συγκεντρώσεις της 3,5-DCA προσδιορίστηκαν μέσω πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε με ανάλυση πρότυπων δειγμάτων της 3,5-DCA σε μεθανόλη συγκεντρώσεων από 0,01 έως 10 mg/L.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

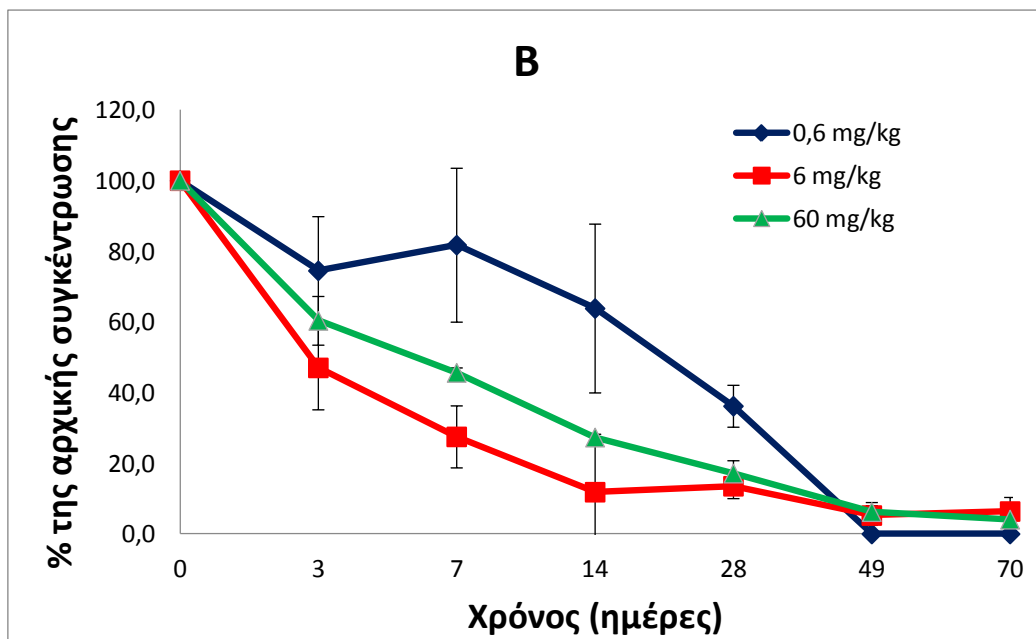
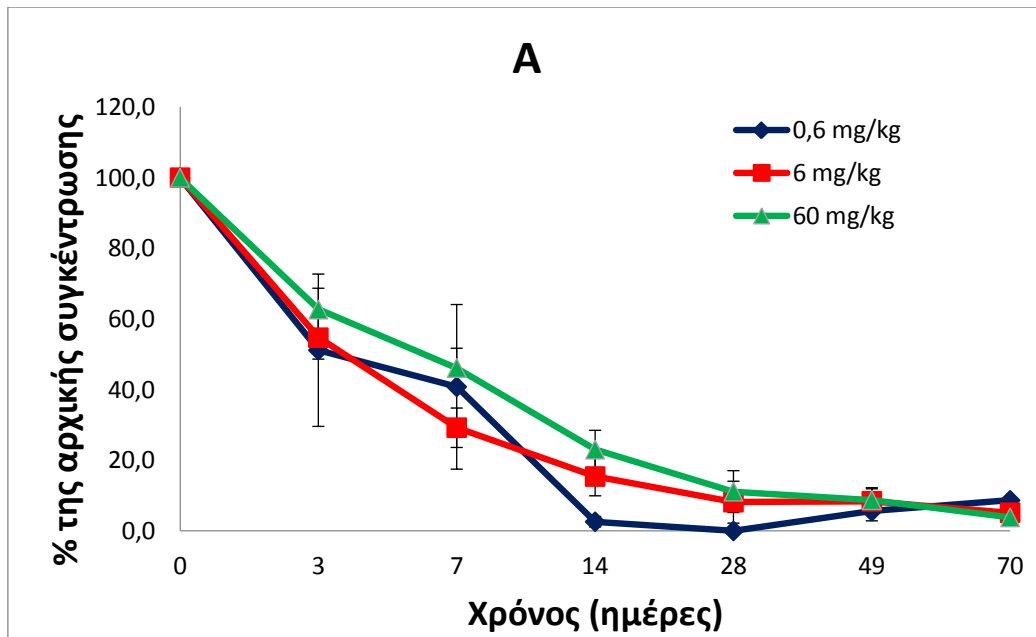
3.1. Αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος

Τα αποτελέσματα αποδόμησης της 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1. Τα πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) εκτός από την περίπτωση στη συγκέντρωση των 6 mg/Kg χωρίς αμμωνιακή λίπανση, όπου το μοντέλο κινητικής Hockey Stick (HS) απέδωσε με ακρίβεια την κινητική αποδόμησης της 3,5-DCA. Με βάση τα παραπάνω μοντέλα κινητικής υπολογίστηκαν οι τιμές DT₅₀ για την 3,5-DCA σε κάθε μεταχείριση (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Οι τιμές DT₅₀ της 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις

Μεταχειρίσεις	DT50 (ημέρες)		
	0.6 mg/kg	6 mg/kg	60 mg/kg
+ NH ₄ -N	4.11	4.14	6.62
- NH ₄ -N	17.0	3.27	7.48

Γενικότερα η 3,5-DCA δεν παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος με τιμές DT₅₀ που κυμάνθηκαν από 3.27 ως 17.0 ημέρες. Στα δείγματα που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή του 3,5-DCA (+NH₄-N) παρατηρήθηκε γενικότερα μια ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση (-NH₄-N). Αντίθετα δεν καταγράφηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο δοσοεξαρτώμενης υπολειμματικότητας της 3,5-DCA στις δύο μεταχειρίσεις με ή χωρίς αμμωνιακή λίπανση.



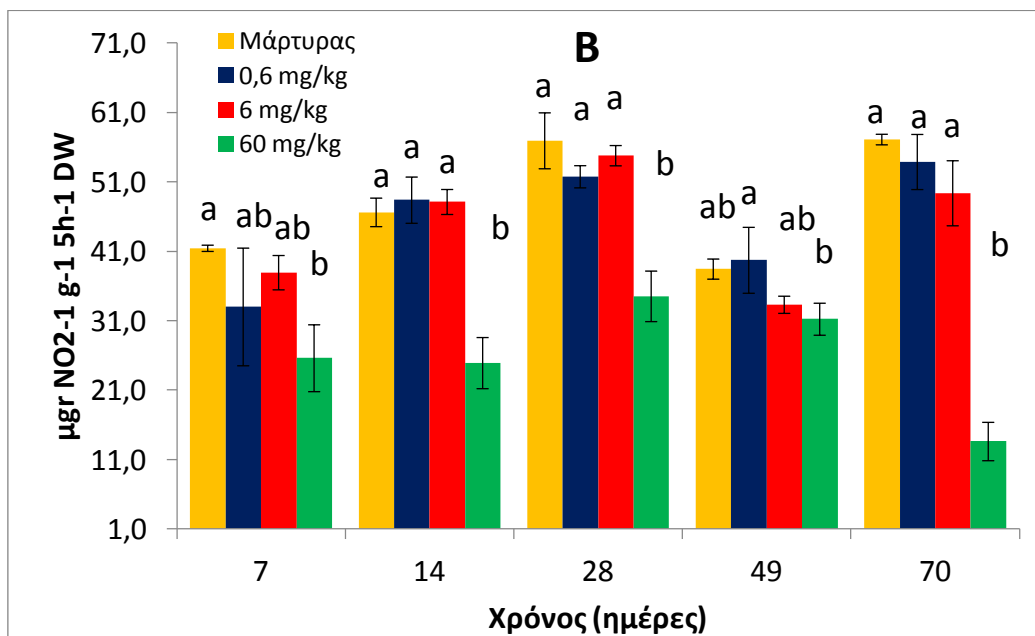
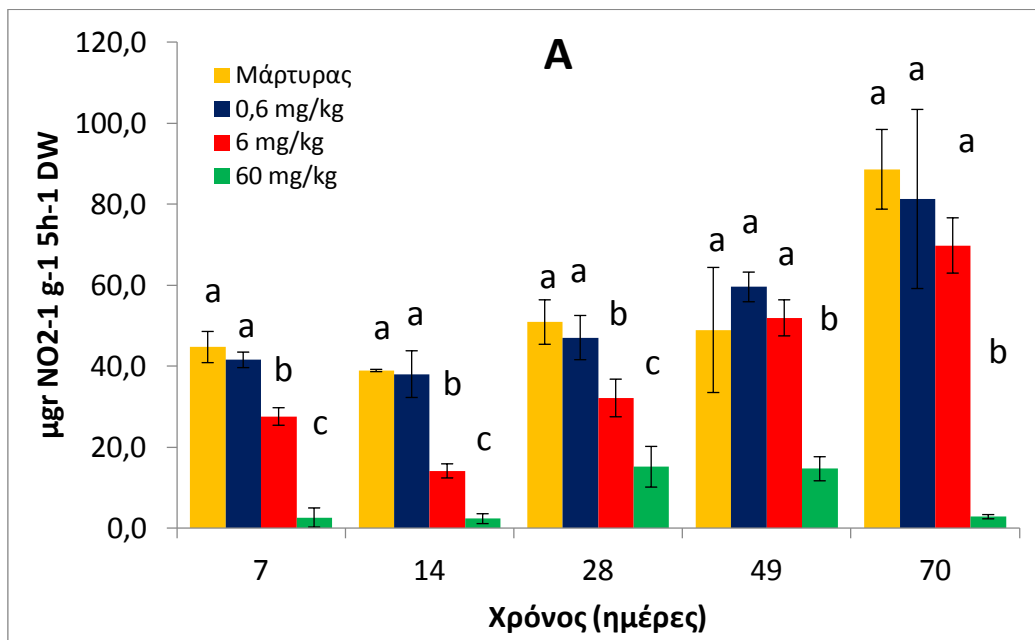
Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους (A) με ή (B) χωρίς αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογές διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA. [30]

3.2. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης

Η επίδραση της εφαρμογής της 3,5-DCA στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στα εδάφη που δέχτηκαν ή όχι εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2. Αναφορικά με τα δεδομένα από τα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή της 3,5-DCA ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (two way ANOVA) έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο της δόσης εφαρμογής της 3,5-DCA ($p < 0.001$), όσο και του χρόνου ($p < 0.001$) αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο αυτών μεταβλητών. Ειδικότερα η εφαρμογή των δόσεων 3,5-DCA 6 και 60 mg/kg οδήγησε σε σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ανεξαρτήτως του χρόνου δειγματοληψίας. Αντίστοιχα καταγράφηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων δυνητικής νιτροποίησης με τον χρόνο ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής 3,5-DCA. Η αρνητική επίδραση της δόσης των 6 mg/kg στη δυνητική νιτροποίηση ήταν εμφανής ως και τις 28 ημέρες μετά την εφαρμογή και επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα με τον μάρτυρα από τις 49 ημέρες και στην συνέχεια. Αντίθετα η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 60 mg/kg οδήγησε σε έμμονη μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης που παρέμεινε σημαντικά χαμηλότερος των υπολοίπων μεταχειρίσεων καθόλη την διάρκεια του πειράματος.

Αναφορικά με τα εδάφη που δεν δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση, η εφαρμογή της 3,5-DCA οδήγησε σε σημαντική μείωση ($p < 0.001$) στα δείγματα που δέχτηκαν την υψηλότερη δόση 3,5-DCA (60 mg/kg) ανεξάρτητα από τον χρόνο δειγματοληψίας. Παράλληλα παρατηρήθηκε και σημαντική επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας, ως κύριος παράγοντας στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης αν και η επίδραση αυτή δεν εμφάνισε κάποιο ξεκάθαρο χρονοεξαρτώμενο πρότυπο. Τέλος καταγράφηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις ($p < 0.001$) μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών

(χρόνος x δόση εφαρμογής 3,5-DCA). Έτσι η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης προκάλεσε και στα δείγματα χωρίς αμμωνιακή λίπανση μια έμμονη και σταθερή μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης που παρέμεινε σημαντικά χαμηλότερη των υπολοιπών μεταχειρίσεων συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα ως και τις 70 ημέρες.



Διάγραμμα 2: Η επίδραση των διαφορετικών δόσεων της 3,5-DCA στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης σε εδάφη με (A) ή χωρίς (B) αμμωνιακή λίπανση. Σε κάθε χρόνο

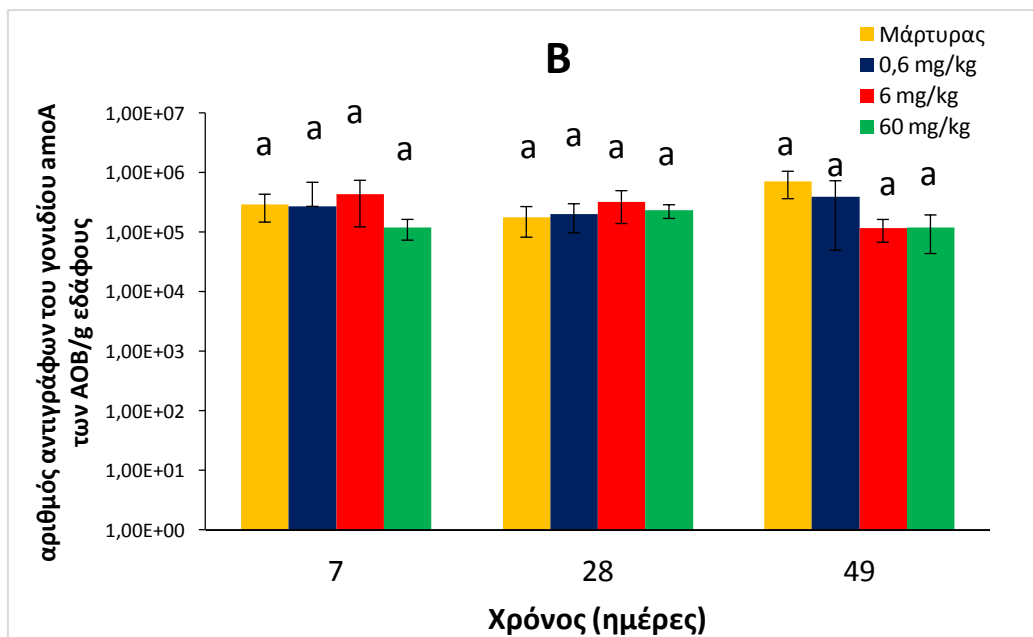
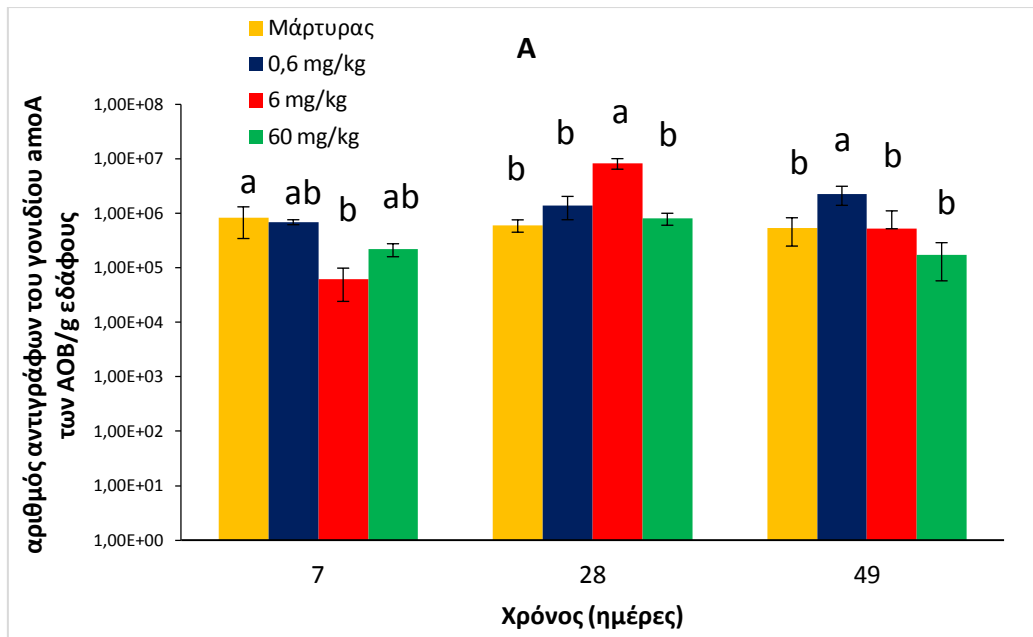
δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

3.3. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων του εδάφους

Η αφθονία των AOB στις διάφορες μεταχειρίσεις όπως καταγράφηκε μέσω του προσδιορισμού της αφθονίας των αντιγράφων του γονιδίου amoA παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3. Γενικότερα τόσο η δόση εφαρμογή όσο και ο χρόνος ως κύριες μεταβλητές προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές ($p < 0.001$) στην αφθονία των AOB στο έδαφος που είχε δεχθεί προηγουμένως αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 3A). Παράλληλα καταγράφηκαν και σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κύριων μεταβλητών ($p < 0.001$) χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποιο ξεκάθαρο και συστηματικό πρότυπο επίδρασης της δόσης στο χρόνο. Έτσι στις 7 ημέρες καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερη αφθονία των AOB στα εδάφη που δέχτηκαν την δόση των 6 mg/kg 3,5-DCA σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα στους επόμενους δύο χρόνους, 28 και 49 ημέρες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της αφθονίας των AOB στις μεταχειρίσεις των 0.6 και 6 mg/kg αντίστοιχα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στον ίδιο χρόνο.

Στα δείγματα χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση, η ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις των κυρίων μεταβλητών (χρόνος και δόση εφαρμογής 3,5-DCA) καθώς και των αλληλεπιδράσεων τους στην αφθονία των AOB (Διάγραμμα 3B).

[31]



Διάγραμμα 3: Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των ΑΟΒ στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν (Α) ή όχι (Β) αμμωνιακή λίπανση ύστερα από την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης, του κύριου μεταβολίτη του μηκυτοκτόνου Iprodione, στην δυνητική νιτροποίηση των νιτρωδοποιητών του εδάφους καθώς και στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα στα εδάφη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είχε προηγηθεί ή όχι αμμωνιακή λίπανση. Επίσης, σε συνδυασμό με τα παραπάνω παρατηρήθηκε και ο ρυθμός αποδόμησης της 3,5-DCA. Σύμφωνα με τους Pappola et al. 2014, ο μεταβολίτης του iprodione, η 3,5-DCA, προκαλεί σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε κάποιες μεταβολικές λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, όπως την διαδικασία της νιτροποίησης και σε κάποια ένζυμα, όπως η φωσφομονοεστεράση, η φωσφοδιεστεράση, η χιτινάση. Οπότε, η μελέτη έχει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς επικεντρώνεται στον μεταβολίτη ενός εμπορικού γεωργικού φαρμάκου και στην επίδραση του σε οργανισμούς που δεν είναι στόχοι του γεωργικού φαρμάκου αλλά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οικολογία των εδαφών, μέσω του κύκλου του αζώτου. Με βάση τα πειράματα αποδόμησης της 3,5-DCA (Διάγραμμα 1) παρατηρήθηκε ότι η αποδόμηση της ήταν σχετικά ταχεία και ανεξάρτητη της δόσης εφαρμογής. Παρόλη τη ταχεία αποδόμηση της 3,5-DCA, οι επιδράσεις των μεγάλων συγκεντρώσεων της στην δυνητική νιτροποίηση των μικροοργανισμών ήταν αισθητές για αρκετό καιρό μετά την αποδόμηση της. Στις μεταχειρίσεις με συγκέντρωση 3,5-DCA 0.6 mg/kg εδάφους, που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση που αναμένεται να σχηματιστεί από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του iprodione στο έδαφος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην δυνητική νιτροποίηση. Στις μεταχειρίσεις με εφαρμογή 3,5-DCA 6 mg/kg και 60 mg/kg εδάφους, που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις που αναμένεται να σχηματιστούν ύστερα από εφαρμογή x10 και x100 της συνιστώμενης δόσης του iprodione σε έδαφος, παρατηρήθηκε

παροδική αναστολή για την μεταχείριση 6 mg/kg και έμμονη αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης για την μεταχείριση 60 mg/kg στο έδαφος με αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 2). Οι Hernandez et al. 2011, έδειξαν ότι το ζιζανιοκτόνο simazine σε δόση 5x της συνιστώμενης είχε μεγάλη ανασταλτική δράση στην νιτροποίηση σε έδαφος με αμμωνιακή λίπανση η οποία παρέμεινε για όλη την διάρκεια του πειράματος. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του simazine επηρέαζε ελάχιστα την νιτροποίηση.

Απουσία αμμωνιακής λίπανσης οι επιδράσεις της 3,5-DCA στην νιτροποίηση ήταν περιορισμένες και εντοπίστηκαν σε πολύ μικρότερο βαθμό στη δυνητική νιτροποίηση συγκριτικά με το λιπασμένο έδαφος (Διάγραμμα 2). Μόνο η υψηλή συγκέντρωση της 3,5-DCA παρουσίασε μία σημαντικά ανασταλτική δράση στην δυνητική νιτροποίηση μόνο στην υψηλότερη δόση εφαρμογής (60 mg/kg). Σε μία παρόμοια μελέτη σε έδαφος χωρίς αμμωνιακή λίπανση οι Puglisi et al. (2012), έδειξαν ότι τα μυκητοκτόνα penconazole και cyprodinil όταν εφαρμόστηκαν στις συνιστώμενες δόσεις, προκάλεσαν παροδική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης και τα επίπεδα αναστολής συσχετίστηκαν με την συγκέντρωση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Αυτή η διαφορά μεταξύ των εδαφών με και χωρίς αμμωνιακή λίπανση οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι λόγω περίσσειας NH_4^+ στα εδάφη με αμμωνιακή λίπανση, οι διαφορές στην δυνητική νιτροποίηση και την νιτροποίηση είναι πιο εμφανείς.

Η εφαρμογή της 3,5-DCA προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOB χωρίς όμως την εμφάνιση κάποιου ξεκάθαρα δοσοεξαρτώμενου ή χρονοεξαρτώμενου προτύπου (Διάγραμμα 3). Σε μελέτη τους οι Tan et al. (2013), παρατήρησαν ότι η εφαρμογή του chlorlimuron ethyl σε έδαφος όπου είχε προηγηθεί λίπανση με ουρία οδήγησε σε σημαντική μείωση της αφθονίας των AOB στα δείγματα που είχαν δεχτεί προηγουμένως εφαρμογή ουρίας σε σχέση με αντίστοιχα δείγματα χωρίς ουρία. Ακόμη στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε

αντιστοιχία της επίδρασης της 3,5-DCA στην δυνητική νιτροποίηση με την επίδραση στην αφθονία των AOB. Αυτή η αναντιστοιχία μεταξύ δυνητικής νιτροποίησης και αφθονίας μπορεί να οφείλεται στον περιορισμένο ρόλο των AOB στην νιτροποίηση στο συγκεκριμένο έδαφος. Βέβαια σε παράλληλη μελέτη από την Νεκταρία Υψηλάντη στα AOA δεν παρατηρήθηκε κάποια αντιστοιχία μεταξύ της επίδρασης της 3,5-DCA στην αφθονία των AOA και στις μεταβολές στην δυνητική νιτροποίηση. Επίσης είναι πιθανό η καταμέτρηση των AOB με PCR πραγματικού χρόνου να μην αντικατοπτρίζει πλήρως την εικόνα των λειτουργικά δραστήριων AOB και σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να βασιστούμε σε αντίστοιχες μετρήσεις σε επίπεδο RNA. Οι Tourna et al. 2010, σε μελέτη τους έδειξαν ότι μοριακές τεχνικές σε επίπεδο RNA, όπως η RNA-DGGE (ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα διαβάθμισης) είναι πιο ευαίσθητες για την αξιολόγηση της δραστηριότητας των AOB. Έτσι θα δούμε εάν η μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης οφείλεται σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων των ενζύμων της νιτροποίησης ή σε αναστολή της δράσης των ίδιων των ενζύμων. Άρα από την παρούσα μελέτη συμπεραίνουμε ότι η 3,5-DCA σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, που δεν αναμένεται να εντοπιστούν σε αγροτικά εδάφη από την τυπική εφαρμογή του μηκυτοκτόνου iprodione, προκαλεί σημαντική αναστολή της νιτροποίησης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aktar, M. W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol***2**, 1–12 (2009).

Athiel, P. *et al.*, 1995. Degradation of iprodione by a soil Arthrobacter-like strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), pp.3216–3220

Belser, L. W. Population Ecology of Nitrifying Bacteria. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.001521> (2003).

Belser, L. W. & Mays, E. L. Specific Inhibition of Nitrite Oxidation by Chlorate and Its Use in Assessing Nitrification in Soils and Sediments. *Appl Environ Microbiol***39**, 505–510 (1980).

Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10):25

Blystone, C. R., Lambright, C. S., Furr, J., Wilson, V. S. & Gray, L. E. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. *Toxicol. Lett.***174**, 74–81 (2007).

Braschi, I., Gessa, C. E. & Blasioli, S. The Fate of Herbicides in Soil. (2011). doi:10.5772/13056

Campos, M. *et al.*, 2015. Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, pp.201–211

Campos M., Karas P., Perruchon C., Papadopoulou E.S., Christou V., Menkissoglou-Spiroudi U., Diez M.C., Karpouzas D.G., (2017) Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 24:152-163

Crouzet O, Besse-Hogan P, Batisson I, Bonnemoy F, Bohatier J, Mallet C. 2009. Responses of soil microorganisms to the herbicide mesotrione in microcosm experiments: from whole microbial communities to functional groups, p 12–13. In Proceedings of the Symposium on Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air, York, United Kingdom, 14 to 16 September 2009.

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**: 504-509

Entwistle, P.F. *et al.*, 1986. Epizootiology and strategies of microbial control. Natural Environment Research Council, Oxford (UK). Inst. of Virology

Francis, C.A., Beman, J.M., Kuypers, M.M.M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* **1**: 19-27

Feld L, Hjelmsø MH, Nielsen MS, Jacobsen AD, Ronn R, Ekelund F, Krogh PH, Strobel BW, Jacobsen CS. 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS One* 10:e0126080

Galiulin, R. V., Bashkin, V. N., Galiulina, R. A. & Birch, P. The theoretical basis of microbiological transformation and degradation of pesticides in soil. *Land Contamination & Reclamation* **9**, 367–376 (2001).

Gavrilescu, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng. Life Sci.***5**, 497–526 (2005).

Geets, J., Boon, N. & Verstraete, W. Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology***58**, 1–13 (2006).

Gerwick, B. C. Pesticide Chemistry and BioScience: The Food-Environment Challenge Edited by G. T. Brooks (University of Portsmouth, U.K.) and T. R. Roberts (JSC International Ltd, U.K.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, *J. Nat. Prod.***63**, 170–170 (2000).

Gosselin, R.E., R.P. Smith, H.C. Hodge. Clinical Toxicology of Commercial Products. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984., p. II-338]

Grabke, A. *et al.* Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology***104**, 396–402 (2014).

Hatzenpichler, R. (2012) Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7501-7510

Haverkate, F., Tempel, A. & Held, A. J. D. Interaction of 2,4,5-trichlorophenylsulphonylmethyl thiocyanate with fungal spores. *Netherlands Journal of Plant Pathology***75**, 308–315 (1969).

Hernández M, Jia Z, Conrad R, Seeger M. 2011. Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol* **78**:511–519.

Hrelia, P. *et al.* The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis***11**, 445–453 (1996).

Kandeler, E. (1995) Potential nitrification. In: Schinner, F., Óhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg,

Karpouzas D.G., Tsiamis G., Trevisan M., Ferrari F., Malandain C., Sibourg O. Martin-Laurent F., (2016) 'LOVE TO HATE'-Pesticides: Felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research* 23:18947-18951

Kastl, E.-M., Schloter-Hai, B., Buegger, F. & Schloter, M. Impact of fertilization on the abundance of nitrifiers and denitrifiers at the root–soil interface of plants with different uptake strategies for nitrogen. *Biol Fertil Soils* 51, 57–64 (2015).

Kim, B. H. & Gadd, G. M. *Bacterial Physiology and Metabolism*. (Cambridge University Press, 2008).

Kowalchuk, G.A, Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55: 485–529

Lo, H. H., Brown, P. I. & Rankin, G. O. Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology*63, 215–231 (1990).

Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P. & Jolliet, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*93, 379–392 (2002).

Metcalf, C.D. *et al.*, 2017. Current-use pesticides in urban watersheds and receiving waters of western Lake Ontario measured using polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Journal of Great Lakes Research*

Mercadier C et al; *FEMS Microbiology Ecology* 23 (3): 207-15 (1997)

Miñambres, G. G. *et al.* Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology***26**, 161–170 (2010).

Mitchell, J.A. & Cain, R.B., 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science*, 48, pp.1–11

Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T. T. & Trakoontivakorn, G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *JARQ. Japan agricultural research quarterly***37**, 249–252 (2003).

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

Ogram A, Saylor GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7: 57-66. doi:10.1016/0167-7012(87)90025-X.

Papadopoulou ES, Tsachidou P, Sulowic S, Menkissoglu-Spiroudi U, Karpouzas DG (2016) Land spreading of wastewaters from the fruit packaging industry and potential effects on soil microbes: effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 82:747–755

Pappolla, A.; Ferrarini, A.; Pertile, G.; Puglisi, E.; Suci, N.; Lamastra, L.; Vasileiadis, S.; Fornasier, F.; Karpouzas, D.; Trevisan, M. Assessing the soil microbial toxicity of iprodione using advanced biochemical and molecular tools: Put the blame on the metabolite 3,5 dichloroaniline. (2014)

- Pinto, A.J., Marcus, D.N., Ijaz, U.Z., Bautista-de Iose Santos, Q.M., Dick, G.J., Raskin, L. (2015) Metagenomic evidence for the presence of comammox Nitrospira-like bacteria in a drinking water system. *mSphere***1**(1):e00054-15
- Puglisi E, Vasileiadis S, Demiris C, Bassi D, Karpouzas DG, Capri E, et al. (2012) Fungicides impact on the diversity and function of nontarget ammonia oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *Microb Ecol* 64:692–701
- Schleper, C., Nicol, G.W. (2010) Ammonia oxidizing archaea: Genomes, physiology and ecology. *Adv Microb Physiol***57**: 1-41
- Sequinatto, L. *et al.*, 2013. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Quimica Nova*, 36(6), pp.768–772
- Stahl D.A., and de la Torres J.R. (2012) Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Ann Rev Microbiol***66**: 83-101
- Strömqvist, J. & Jarvis, N., 2005. Sorption, degradation and leaching of the fungicide iprodione in a golf green under Scandinavian conditions: Measurements, modelling and risk assessment. *Pest Management Science*, 61(12), pp.1168–1178
- Tan, H., Xu, M., Li, X., Zhang, H. & Zhang, C. Effects of chlorimuron-ethyl application with or without urea fertilization on soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *J. Hazard. Mater.* **260**, 368–374 (2013).
- Taube, J., Vorkamp, K., Förster, M. & Herrmann, R. Pesticide residues in biological waste. *Chemosphere***49**, 1357–1365 (2002).
- Torsvik, V.L., 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology & Biochemistry* 12, 15±21.

Tourna M, Freitag TE, Prosser JI (2010) Stable isotope probing analysis of interactions between ammonia oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 76:2468 – 2477

Valentovic, M. A. *et al.* Characterization of methemoglobin formation induced by 3,5-dichloroaniline, 4-amino-2,6-dichlorophenol and 3,5-dichlorophenylhydroxylamine. *Toxicology* **118**, 23–36 (1997).

Van der Werf, H. M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems&Environment* **60**, 81–96 (1996).

Wagner, S. C.. (2011) Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10):15

Walker, A., Brown, P. A. & Entwistle, A. R. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.* **17**, 183–193 (1986).

Wang Y-S, Wen C-Y, Chiu T-C, Yen J-H (2004) Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicol Environ Saf*59:127–132

Wessen E, Hallin S (2011) Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers—possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic* 11: 1696–1698

You, J., Das, A., Dolan, E.M., Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Res* **43**: 1801-1809

Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης & Χρήσεις των Φυτοπρ. Προϊόντων. Περιβαλλοντική Μικροβιολογία (Σπυρίδων Ντούγιας, Αλέξανδρος Αϊβαζίδης, Παράσχος Μελίδης)(2012), Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ

Δεμίρης Κωνσταντίνος, Μελέτη της επίδρασης των μηκυτοκτόνων Cyprodinil και Penconazole στην σύσταση και λειτουργία της κοινότητας των νιτροδωποιητικών βακτηρίων και αρχαίων σε στρώμα φυτικών υπολλειμάτων. (2010)

Καραβασίλης Δημήτριος, Μελέτης της αποδόμησης του μηκυτοκτόνου iprodione σε οργανικό βιομίγμα αποτελούμενο από έδαφος, άχυρο και τύρφη. (2015)

Παπαδοπούλου Ευαγγελία, Μελέτη της συμπεριφοράς βιολογικών και συνθετικών γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και των επιπτώσεων τους στη μικροβιακή κοινότητα. (2013)

Ρουσίδου Κωνσταντίνα, Επίδραση συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στη δομή και την αφθονία των νιτροδωποιητικών βακτηρίων και αρχαίων. (2010)