



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 3,5-ΔΙΧΛΩΡΟΑΝΙΛΙΝΗΣ
ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ
ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΕΔΑΦΟΥΣ ΑΠΟ ΒΟΣΚΟΤΟΠΟΥΣ

ΚΑΡΙΠΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017



UNIVERSITY OF THESSALY

**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY**

**EFFECT OF 3,5-DICHLOROANILINE ON
THE FUNCTION AND ABUNDANCE OF
AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA IN A
PASTURE SOIL**

KARIPIDOU MARIA

LARISA, SEPTEMBER 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της διπλωματικής αυτής εργασίας, καθώς και για τη βοήθεια στη συγγραφή της. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Καρα Παναγιώτη για τη συνεχή καθοδήγηση, αμέριστη βοήθεια και υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Επίσης ευχαριστώ πολύ τον Τζηκούλη Γιώργο, προπτυχιακό φοιτητή για την άψογη συνεργασία για να φέρουμε εις πέρας το εργαστηριακό κομμάτι. Ευχαριστώ πολύ και την κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, καθώς και τον κ. Οιχαλιώτη Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Γονιμότητας-Βιολογίας Εδάφους, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την φιλική τους διάθεση και συνεργασία. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την αμέτρητη στήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ – ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΔΑΦΟΥΣ, ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ – ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρόλο που τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντική πτυχή της σύγχρονης γεωργίας, η υπερβολική και επίμονη χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα τη σοβαρή ρύπανση του εδάφους και κατ'επέκταση του περιβάλλοντος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στα γεωργικά φάρμακα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Τα AOB παίρνουν μέρος στη νιτροποίηση, τη βασικότερη διεργασία στον κύκλο του αζώτου. Νιτροποίηση ονομάζεται η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων ή αμμωνίας αρχικά σε νιτρώδη και στην συνέχεια σε νιτρικά. Η διεργασία πραγματοποιείται σε δύο βήματα: Στο πρώτο στάδιο η αμμωνία (NH_3) μετατρέπεται σε νιτρώδη (NO_2^-) με ενδιάμεση παραγωγή υδροξυλαμίνης (NH_2OH) από Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια και Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA). Στο δεύτερο στάδιο τα νιτρώδη ιόντα μετατρέπονται σε νιτρικά (NO_3^-) από νιτρικοποιητικά βακτήρια. Οι περισσότερες μελέτες σήμερα έχουν εστιάσει στην εκτίμηση των επιπτώσεων των μητρικών ουσιών στους μικροοργανισμούς του εδάφους, ενώ λίγα πράγματα είναι γνωστά την πιθανή τοξικότητα των μεταβολικών προϊόντων τους. Έτσι στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης (3,5-DCA), του κύριου μεταβολίτη του μυκητοκτόνου iprodione στην νιτροποίηση και ειδικότερα στα AOB. Παράλληλη μελέτη από τον Γ. Τζηκούλη εξέτασε την επίδραση της 3,5-DCA στα AOA. Πραγματοποιήθηκε πείραμα εργαστηριακής κλίμακας όπου σε δείγματα εδάφους, που είχαν δεχτεί ή όχι αρχικά αμμωνιακή λίπανση, εφαρμόστηκαν αυξανόμενες δόσεις της 3,5-DCA (0.6, 6 και 60 $\mu\text{g/g}$). Αυτές οι συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις της 3,5-DCA που αναμένεται να σχηματιστούν από την υδρόλυση του iprodione στο έδαφος μετά από εφαρμογή δόσεων x1, x10 και x100 της συνιστώμενης. Η επίδραση της 3,5-DCA στη νιτροποίηση εκτιμήθηκε μέσω προσδιορισμού του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της αφθονίας των AOB με q-PCR. Παράλληλα προσδιορίστηκε και η αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος σε κάθε δόση εφαρμογής ώστε να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της διάρκειας έκθεσης και της ανάκαμψης της μικροβιακής κοινότητας από πιθανές επιπτώσεις. Συνολικά η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA (60 $\mu\text{g/g}$) και μόνο αυτή, οδήγησε σε σημαντική αλλά πρόσκαιρη ανάσχεση της δυνητικής νιτροποίησης η οποία επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα από τις 28 ημέρες και μετά. Η μείωση αυτή της δυνητικής νιτροποίησης δεν αντικατοπτρίστηκε στην αφθονία των AOB, που δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή 3,5-DCA. Η περιορισμένης διάρκειας επίδραση της 3,5-DCA στην δυνητική νιτροποίηση πιθανότατα οφείλεται στην ταχύτατη αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος σε όλες τις δόσεις εφαρμογής ($\text{DT}_{50} = 1.14\text{-}3.77$ ημέρες).

ABSTRACT

Although pesticides constitute an important aspect of modern agriculture, their excessive and persistent use results in severe soil and environmental pollution. Previous studies have shown that ammonia-oxidizing bacteria (AOB) are highly susceptible to pesticides and can be used as biomarkers to assess the toxicity of pesticides in soil microorganisms. AOBs take part in nitrification, the most fundamental process in the nitrogen cycle. Nitrification is the microbial conversion of ammonium ions or ammonia initially into nitrite and finally to nitrate. The nitrification process consists of two steps: In the first step ammonia (NH_3) is converted to nitrite (NO_2^-) through intermediate formation of hydroxylamine (NH_2OH) by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing Archaea (AOA). In the second step the nitrite ions are converted to nitrate (NO_3^-) by the nitrite-oxidizing bacteria. Most studies have focused on assessing the effects of parent substances on soil microorganisms, and little is known about the possible toxicity of their metabolic products. Thus, in the present research the effect of 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), the major metabolite of the fungicide iprodione, was studied on nitrification and especially on AOBs. A parallel study by G. Tzikoulis studied the effect of 3,5-DCA on the AOAs. A laboratory scale experiment was performed where in soil samples, with the initially presence or absence of ammonia fertilization, increased doses of 3,5-DCA (0.6, 6 and 60 $\mu\text{g/g}$) were applied. These concentrations correspond to the concentrations of 3,5-DCA expected to be formed by the hydrolysis of iprodione in the soil after the application of x1, x10 and x100 of the recommended dose. The effect of 3,5-DCA on nitrification was assessed by determining the rate of potential nitrification and abundance of AOBs by q-PCR. At the same time, the degradation of 3,5-DCA in the soil at each application dose was determined to find possible correlations between the duration of exposure and the recovery of the microbial community from potential impacts. Overall, the application of the highest dose of 3,5-DCA (60 $\mu\text{g/g}$) alone resulted in a significant but temporary inhibition of potential nitrification which returned to control levels from 28 days and afterwards. This reduction in potential nitrification was not reflected in the abundance of AOBs, who did not get affected by the application of 3,5-DCA. The limited duration effect of 3,5-DCA on potential nitrification is probably due to the rapid degradation of 3,5-DCA in the soil at all application rates ($\text{DT}_{50} = 1.14\text{-}3.77$ days).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Γεωργικά φάρμακα.....	8
1.2. Μυκητοκτόνα	9
1.2.1. Iprodione	10
1.2.2. 3,5-Διχλωροανιλίνη (3,5-DCA).....	13
1.3. Κύκλος Αζώτου	14
1.4. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα.....	17
1.5. Σκοπός εργασίας.....	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	19
2.2. Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης.....	20
2.2.1 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν	20
2.2.2. Πειραματική διαδικασία	20
2.3. Μέτρηση Αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος.....	21
2.3.1. Διαδικασία Εκχύλισης 3,5-DCA από το έδαφος	21
2.3.2. Διαδικασία ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA.....	22
2.4. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOB στο έδαφος	22
2.4.1. Διαλύματα/υλικά για απομόνωση, ηλεκτροφόρηση και ποσοτικοποίηση συνολικού DNA εδάφους	22
2.4.2. Πειραματική διαδικασία	23
2.4.3. Υλικά για Real-Time PCR.....	23
2.4.4. Πειραματική διαδικασία	23
2.5. Στατιστική Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης	26
3.2. Αξιολόγηση της αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος	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	34

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γεωργικά φάρμακα

Γεωργικό Φάρμακο (Pesticide ή Agrochemical) είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργική παραγωγή για την πρόληψη ή τον έλεγχο παρασίτων, ασθενειών, ζιζανίων και άλλων παθογόνων οργανισμών των φυτών σε μια προσπάθεια να διατηρηθεί υψηλή η ποιότητα των αγροτικών προϊόντων.

Παρόλο που τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντική πτυχή της σύγχρονης γεωργίας και έχουν αναπτυχθεί ώστε να δρουν με ελάχιστο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και την ποιότητα του περιβάλλοντος, η υπερβολική και επίμονη χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή γεωργικών εκτάσεων, προκαλώντας σοβαρή ρύπανση τόσο του εδάφους, όσο και του περιβάλλοντος.

Ένα μεγάλο ποσοστό γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη γεωργία δεν φθάνει ποτέ στους οργανισμούς-στόχους τους. Συγκεκριμένα, μια μελέτη του Pimentel (1995) έδειξε ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό (0,3%) των εφαρμοζόμενων γεωργικών φαρμάκων καταλήγει στο στόχο του ενώ το 99,7% καταλήγει στο περιβάλλον και πιθανόν να μετακινηθεί μέσω της τροφικής αλυσίδας σε τρόφιμα και τελικά στον καταναλωτή. Ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής, είτε η συνολική ποσότητα (εφαρμογή στο έδαφος) είτε ένα σημαντικό κλάσμα (εφαρμογή στο φύλλωμα) των γεωργικών φαρμάκων καταλήγουν στο επιφανειακό έδαφος όπου υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες αποδόμησης. Μεταξύ αυτών, οι αλληλεπιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων με τους μικροοργανισμούς του εδάφους έχουν θεμελιώδη σημασία για τη ρύπανση του περιβάλλοντος και τη λειτουργία των οικοσυστημάτων. Αφενός, οι μικροοργανισμοί εδάφους είναι σε θέση να αποδομούν τα παρασιτοκτόνα και να τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας διευκολύνοντας την ταχεία απομάκρυνσή τους από το έδαφος και εμποδίζοντας τη διασπορά τους σε άλλα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (Karpouzas et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες επιπτώσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Τέτοιες επιδράσεις θα μπορούσαν να εντοπιστούν ως παρεμπόδιση του ρυθμού μιας μικροβιακής διεργασίας (Puglisi et al., 2012), ως μείωση του πληθυσμού ή της ποικιλομορφίας λειτουργικών μικροβιακών στελεχών (Feld et al. 2015), με σοβαρές συνέπειες για τη λειτουργία του οικοσυστήματος (Karpouzas et al., 2016).

Τα γεωργικά φάρμακα, ανάλογα με το είδος του φυτοπαρασίτου που καταπολεμούν χωρίζονται σε 5 κύριες κατηγορίες: εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδοκτόνα, μυκητοκτόνα και ζιζανιοκτόνα. Από τη συνολική ποσότητα γεωργικών φαρμάκων

που εφαρμόζεται παγκοσμίως το 50 έως 60% είναι ζιζανιοκτόνα, 20 έως 30% είναι εντομοκτόνα και 10 έως 20% είναι μυκητοκτόνα (Pimentel 1995).

1.2. Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για την θανάτωση και έλεγχο ασθενειών των φυτών, που προκαλούνται από μύκητες. Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν τρεις κύριοι λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιούνται μυκητοκτόνα: (α) για τον έλεγχο μιας ασθένειας κατά τη δημιουργία και την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας, (β) για να αυξηθεί η παραγωγικότητα μιας καλλιέργειας και να μειωθούν οι απώλειες και, (γ) για βελτίωση της διάρκειας αποθήκευσης και της ποιότητας των συγκομιζόμενων φυτών. Τα περισσότερα μυκητοκτόνα πρέπει να εφαρμόζονται πριν από την εμφάνιση της ασθένειας ή κατά την πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων για να είναι αποτελεσματικά (McGrath, 2004).

Το έδαφος είναι αναμφισβήτητα ο σημαντικότερος πόρος για την παραγωγή τροφίμων. Πρόκειται για ένα πολύ περίπλοκο οικοσύστημα του οποίου οι λειτουργίες εξαρτώνται όχι μόνο από τις φυσικές του ιδιότητες αλλά και από τα βιολογικά συστατικά του. Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί του εδάφους είναι βασικοί παράγοντες στην πορεία πολλών στοιχείων ζωτικής σημασίας για τη ζωή, συμπεριλαμβανομένων των C, N, και P (Arponte et al., 2010). Η κατανόηση της επίδρασης των μυκητοκτόνων στις ωφέλιμες δραστηριότητες των μικροοργανισμών του εδάφους είναι σημαντική για την εκτίμηση των κινδύνων που σχετίζονται με το μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται στη γεωργία. Η παραγωγικότητα των καλλιεργειών και οι οικονομικές αποδόσεις θα μεγιστοποιηθούν με τη χρήση προϊόντων που εμφανίζουν ικανοποιητική δράση έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων - στόχων και παράλληλα εμφανίζουν περιορισμένη δράση έναντι οργανισμών μη-στόχων. Οι διάφοροι οργανισμοί μπορεί να έχουν ταυτόσημους ή παρόμοιους μηχανισμούς δράσης και τα μυκητοκτόνα που στοχεύουν μη ειδικές θέσεις δέσμευσης μπορούν να έχουν άμεσο αποτέλεσμα σε οργανισμούς μη στόχους. Επίσης οι μικροοργανισμοί είτε λειτουργικά είτε διατροφικά συνδέονται μεταξύ τους και οι αλλαγές σε ένα συστατικό μιας μικροβιακής κοινότητας μπορεί να επηρεάσουν τη δομή ολόκληρης της κοινότητας. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με φυτά, οι οποίοι επηρεάζουν και επηρεάζονται από τη μεταβολική κατάσταση του φυτού (Yang et al., 2011).

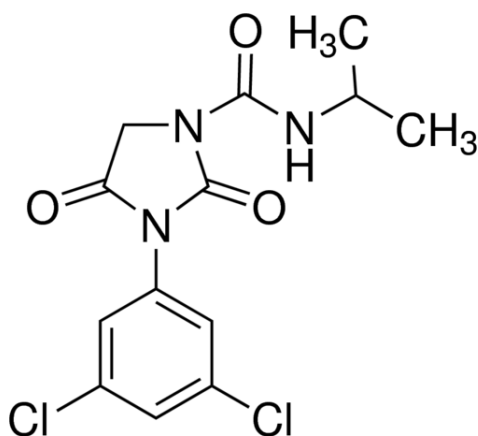
Πολλά μυκητοκτόνα έχουν στοχευμένη δράση που προσδίδει υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι ειδικών παθογόνων, πράγμα που σημαίνει χαμηλό ενδεχόμενο τοξικότητας σε ανθρώπους και άλλους οργανισμούς, αλλά έχει επίσης ως αποτέλεσμα υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας στο μυκητοκτόνο. Μυκητοκτόνα που έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν συγκεκριμένα ένζυμα ή

πρωτεΐνες που παράγονται από μύκητες δεν βλάπτουν τον φυτικό ιστό και επομένως μπορούν να διεισδύσουν και να κινηθούν μέσα στα φύλλα ενεργοποιώντας τις θεραπευτικές ιδιότητες και αυξάνοντας την ποσότητα φυτικού ιστού ώστε να προστατεύεται περισσότερο. Δεδομένου ότι ο τρόπος δράσης αυτών των μυκητοκτόνων είναι τόσο συγκεκριμένος, μικρές γενετικές μεταβολές στους μύκητες μπορούν να υπερνικήσουν την αποτελεσματικότητα αυτών των μυκητοκτόνων και οι πληθυσμοί των παθογόνων μπορεί να καταστούν ανθεκτικοί σε μελλοντικές εφαρμογές.

Προκειμένου να θεσπιστεί κατάλληλος κανονισμός για τη χρήση των πολλών μυκητοκτόνων ουσιών που προωθούνται από τη βιομηχανία στη βιώσιμη γεωργία, οι τρόποι δράσης των μυκητοκτόνων και οι πιθανές ανεπιθύμητες επιπτώσεις στους μη μυκητιακούς μικροοργανισμούς πρέπει να αποσαφηνιστούν. Οι τρόποι δράσης των μυκητοκτόνων δεν ήταν ποτέ καλά ταξινομημένοι και οι ανεπιθύμητες επιδράσεις αυτών των σημαντικών χημικών ουσιών δεν είναι πλήρως κατανοητές (Yang et al., 2011).

1.2.1.Iprodione

Το iprodione [3-(3,5-dichlorophenyl)N-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide] είναι ένα μυκητοκτόνο δικαρβοξαμιδίου που αποτελείται από έναν δακτύλιο ιμιδαζολίου ενωμένο με ένα 3,5 δίχλωρο- φαινυλαμίδιο (Εικόνα 1). Χρησιμοποιείται σε ευρύ φάσμα καλλιεργειών για τον έλεγχο προσβολών από μύκητες των ειδών και γενών *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. και *Sclerotinia* sp., (Minambres et al., 2010, Grabke et al., 2014).



Εικόνα 1: Χημική δομή του iprodione

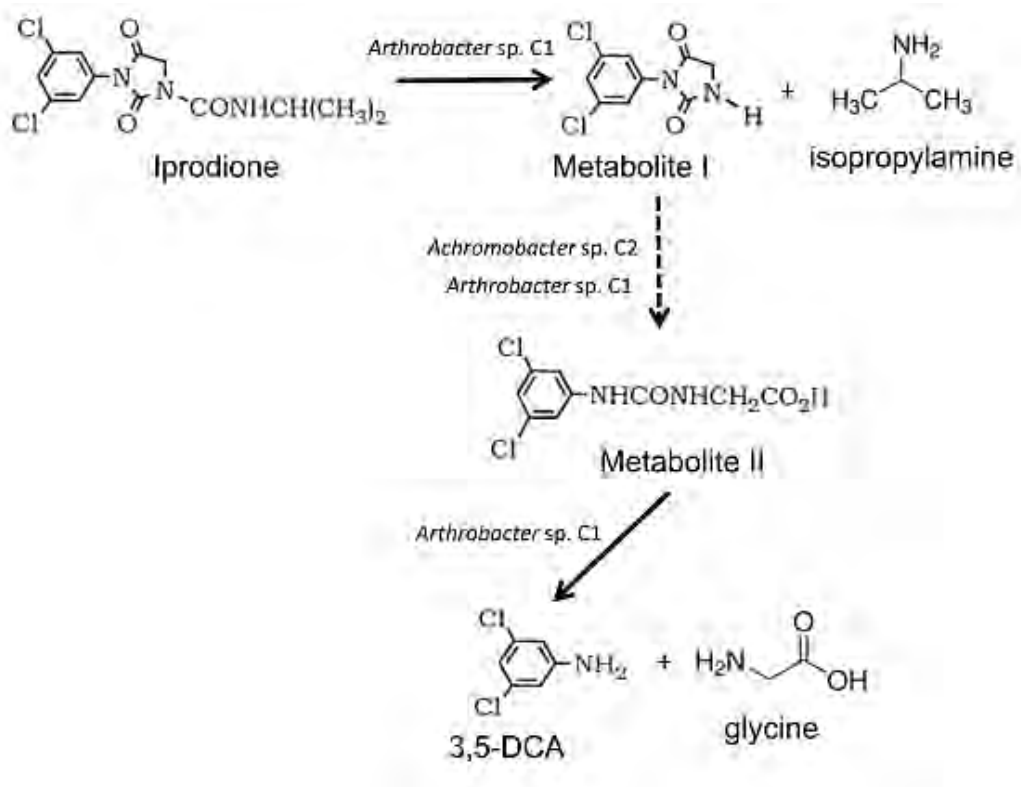
Το iprodione έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο (USEPA, 1998) και είναι γνωστό ότι μειώνει την παραγωγή τεστοστερόνης σε ποντίκια με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους (Blystone et al., 2007). Το iprodione είναι ελαφρώς τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, ενώ δεν είναι καθόλου τοξικό για τα φυτά (Charles 1991). Οι σχετικά χαμηλές τιμές συντελεστή προσρόφησης K_{oc} (400 mL g^{-1}) υποδηλώνουν την ασθενή προσρόφηση του στο έδαφος (Strömqvist and Jarvis 2005) και καταδεικνύουν την σχετικά υψηλή κινητικότητα του στο έδαφος. Το iprodione και οι μεταβολίτες του έχουν ανιχνευθεί στο νερό στράγγισης (Ludvigsen et al., 2004) και σε επιφανειακά ύδατα (Sequinatto et al., 2013). Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα ενέκρινε την επέκταση της χρήσης iprodione ως νηματοδοκτόνο για τον έλεγχο μυκήτων του γένους *Meloidogyne* sp. σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Σε αυτή την περίπτωση εφαρμόζεται μέσω του συστήματος άρδευσης. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω, η συσσώρευση υπολειμμάτων iprodione στους φυσικούς πόρους μπορεί να είναι επιβλαβής για την ανθρώπινη υγεία και την περιβαλλοντική ποιότητα και πρέπει να περιοριστεί.

Ο χρόνος ημιζωής του iprodione στο έδαφος κυμαίνεται μεταξύ 20 και 160 ημερών (The Agrochemicals Handbook. 1991). Το pH του εδάφους αποτελεί τον κύριο παράγοντα που ελέγχει την υπολειμματικότητα του iprodione στο έδαφος με υψηλότερους ρυθμούς αποδόμησης να παρατηρούνται σε ουδέτερα έως αλκαλικά εδάφη (Walker et al., 1986). Η συγκέντρωση του iprodione και η θερμοκρασία του εδάφους επηρεάζουν την εδαφική βακτηριακή κοινότητα στα εναιωρήματα του εδάφους. Οι υψηλές θερμοκρασίες και οι υψηλές συγκεντρώσεις του iprodione οδήγησαν σε αυξημένες επιδράσεις στην ποικιλότητα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους (Wang et al., 2014).

Μετά από επανειλημμένες εφαρμογές στο έδαφος, το iprodione αποδομείται ταχέως από μικροοργανισμούς του εδάφους που έχουν αναπτύξει ενζυμικά συστήματα για τον ταχύτατο μεταβολισμό του μυκητοκτόνου (φαινόμενο που ονομάζεται επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση) οδηγώντας σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας του (Martin et al., 1990). Μελέτες από τους Mercadier et al. (1997) σε εδάφη που επιδεικνύουν επιταχυνόμενη βιοαποικοδόμηση του iprodione έδειξαν ότι η μικροβιακή υδρόλυση του iprodione οδηγεί στην παραγωγή αρχικά του μεταβολικού προϊόντος 3,5-dichlorophenyl-carboxamide (Μεταβολίτη I), που ακολούθως μετασχηματίζεται σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate (Μεταβολίτης II) με τελικό προϊόν την 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) η οποία διασπάται περαιτέρω από την μικροβιακή κοινότητα των περισσότερων εδαφών.

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί εδαφικά βακτήρια που έχουν την ικανότητα να διασπούν το iprodione (Athiel et al., 1995; Campos et al., 2015). Πρόσφατες μελέτες των Campos et al. (2017), έδειξαν ότι ο μετασχηματισμός του iprodione από μια κοινότητα δύο βακτηρίων (*Arthrobacter* sp. C1 & *Achromobacter* sp. C2) προχωρά όπως και στα εδάφη με επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση. Έτσι αρχικά το iprodione υδρολύεται σε ισοπροπυλαμίνη και τον μεταβολίτη I, το τελευταίο μετασχηματίζεται σε μεταβολίτη II πριν υδρολυθεί τελικά σε 3,5-DCA και πιθανώς γλυκίνη. Μεταξύ

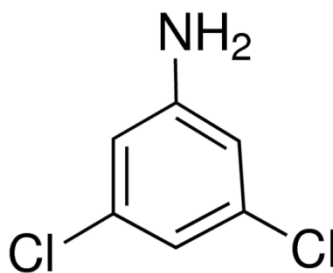
των δύο βακτηρίων της κοινότητας, το στέλεχος *Arthrobacter* C1 ήταν κυρίως υπεύθυνο για το πρώτο και το τρίτο υδρολυτικό στάδιο της οδού χρησιμοποιώντας ισοπροπυλαμίνη και γλυκίνη που απελευθερώνονται ως παραπροϊόντα των αντίστοιχων μεταβολικών σταδίων. Ο μετασχηματισμός του μεταβολίτη I επιτυγχάνεται μόνο με την παρουσία πρόσθετων πηγών C και N, με το στέλεχος *Achromobacter* C2 να είναι πιο αποτελεσματικό στην αποικοδόμηση αυτού του μεταβολίτη (Εικόνα 2). Περαιτέρω δοκιμές έδειξαν ότι το στέλεχος *Arthrobacter* C1 δεν είχε την ικανότητα να διασπά εξίσου αποτελεσματικά άλλα γεωργικά φάρμακα που παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα με το iprodione ως προς την χημική του δομή καταδεικνύοντας την εξειδίκευση των υποτιθέμενων αποδομητικών ενζύμων που σχετίζονται με την αποδόμηση του iprodione (Campos et al., 2015). Επίσης στην ίδια έρευνα δεν παρατηρήθηκε συνεργισμός ή συμπληρωματική δράση μεταξύ των δύο στελεχών στην αποδόμηση του iprodione υποδηλώνοντας ότι τα δύο στελέχη μπορούν να ενεργούν μεμονωμένα στο μεταβολισμό της iprodione ανάλογα με τις συνθήκες θρέψης (Campos et al., 2017).



Εικόνα 2: Μικροβιακό μονοπάτι μεταβολισμού το iprodione από τα βακτηριακά στελέχη C1 και C2 όπως έχει περιγραφεί από τους Campos et al. (2017)

1.2.2. 3,5-Διχλωροανιλίνη (3,5-DCA)

Η 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του iprodione. Ανήκει στις διχλωροανιλίνες οι οποίες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο ανιλίνης υποκατεστημένο με δύο άτομα χλωρίου και με μοριακό τύπο $C_6H_5Cl_2N$ (Εικόνα 3). Υπάρχουν έξι ισομερή διχλωροανιλίνης. Διάφορα παράγωγα χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βαφών και ζιζανιοκτόνων.



Εικόνα 3: Χημική δομή της 3,5-DCA

Η έκθεση του ανθρώπου σε καθαρές ενώσεις γενικά συμβαίνει στο βιομηχανικό περιβάλλον. Ωστόσο, ο άνθρωπος, τα ζώα και η υδρόβια ζωή μπορούν να εκτεθούν σε διχλωροανιλίνες από πολλές πηγές μετά από τη διάσπαση γεωργικών φαρμάκων.

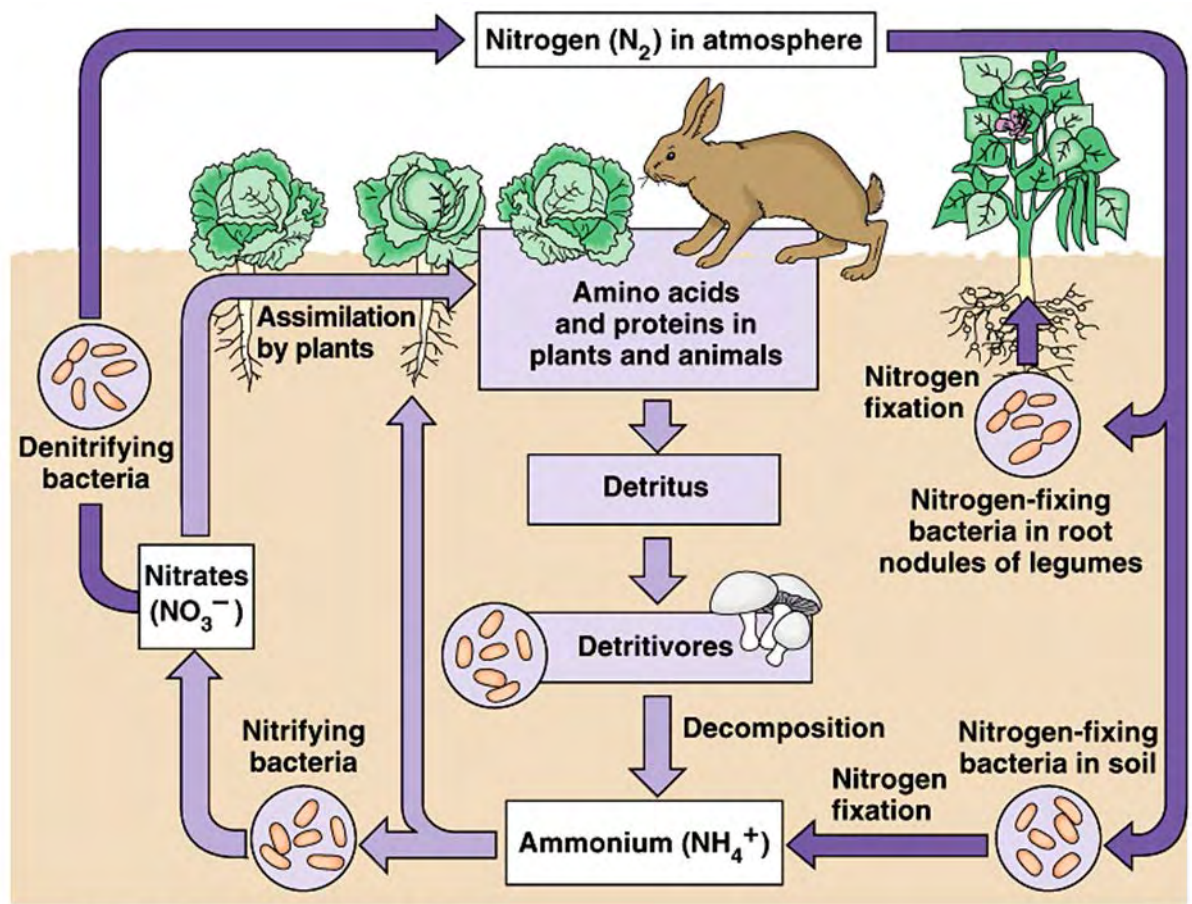
Με βάση τις συνολικές επιδράσεις στη νεφρική λειτουργία και τη μορφολογία, η φθίνουσα σειρά νεφροτοξικού δυναμικού βρέθηκε να είναι 3,5-DCA > 2,5-DCA > 2,4-, 2,6- και 3,4-DCA > 2,3-DCA. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι μεταξύ των διαφόρων διχλωροανιλινών το 3,5-DCA έχει το υψηλότερο νεφροτοξικό δυναμικό *in vivo* και *in vitro* στους αρουραίους (Lo et al., 1990). Επιπλέον, η αιμόλυση και η μεθαιμοσφαιριναιμία έχουν τεκμηριωθεί μετά την έκθεση των ερυθροκυττάρων στην 3,5-DCA (Valentovic et al., 1996).

Η 3,5-DCA χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή ανθεκτικότητα στο έδαφος (PBT Profiler 2013) και τοξικότητα σε μικροοργανισμούς του εδάφους (Rochkind et al., 1986). Πρόσφατες μελέτες από τους Papolla et al., (2014) έδειξαν ότι η εφαρμογή iprodione σε δόσεις x10 και x100 φορές τις συνιστώμενες οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας διάφορων μικροβιακών ενζύμων καθώς και σε δραματική μείωση της δυναμικής νιτροποίησης. Περαιτέρω στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε υψηλή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της 3,5-DCA στο έδαφος και της μικροβιακής δραστηριότητας. Παρόλα αυτά, έχουν απομονωθεί βακτήρια εδάφους ικανά να αποδομούν την 3,5-DCA (Lee et al., 2008 · Yao et al., 2011). Η ικανότητά τους να μετατρέπουν τις διχλωροανιλίνες που παράγονται με την αποικοδόμηση των ξενοβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των

δικαρβοξαμιδίων όπως το iprodione, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή δεδομένου ότι η δραστηρότητά τους παρεμποδίζει τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων στο έδαφος και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο περιβαλλοντικής υποβάθμισης (Campos et al., 2015).

1.3. Κύκλος Αζώτου

Το άζωτο είναι βασικό συστατικό πολλών βιολογικών μορίων όπως τα νουκλεοτίδια και τα αμινοξέα, και επομένως απαραίτητο για τη ζωή και την ανάπτυξη όλων των οργανισμών. Απαντάται στη βιόσφαιρα σε πολλές μορφές. Η ατμόσφαιρα εμπεριέχει τεράστιες ποσότητες (περίπου 79% κατ'όγκον) μοριακού αζώτου (N_2). Το μεγαλύτερο μέρος από το μεγάλο αυτό απόθεμα αζώτου δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στους ζώντες οργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν σημαντικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου. Ο κύκλος του N και η συμμετοχή των μικροοργανισμών στα διάφορα βήματα του παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.



Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

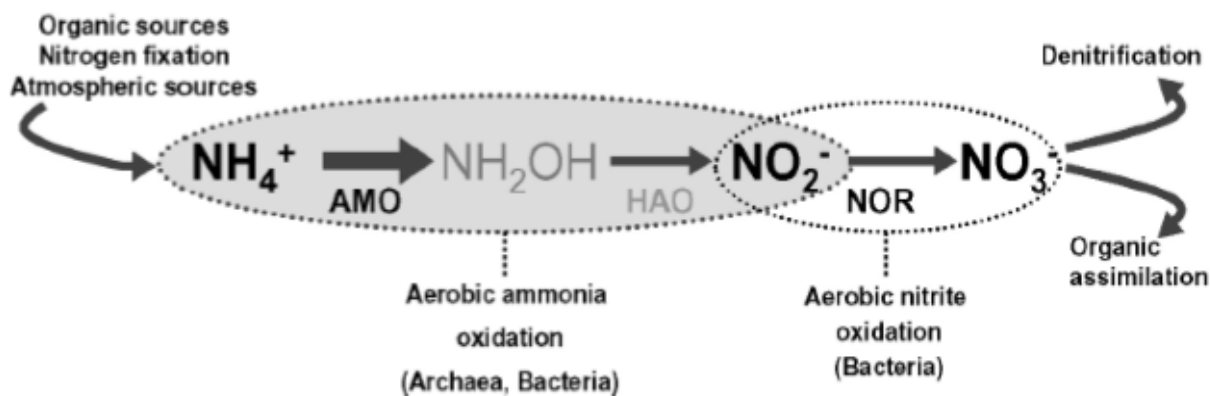
Εικόνα 4: Κύκλος του αζώτου και ο ρόλος των μικροοργανισμών στις επιμέρους διεργασίες

Οι κυριότερες βιοτικές διεργασίες στον κύκλο του αζώτου περιγράφονται παρακάτω:

Η **Αζωτοδέσμευση** είναι η διεργασία κατά την οποία ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό N_2 το οποίο μετατρέπουν σε NH_3 (Postgate, 1998). Με αυτήν την διεργασία προκύπτει περίπου το 90% του δεσμευόμενου αζώτου. Οι μικροοργανισμοί που αζωτοδεσμεύουν είναι ελεύθερα ζώντα βακτήρια που ανήκουν σε διάφορα γένη όπως *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas* κ.α, καθώς και συμβιωτικά βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* και ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia* (Newton, 2007). Από γεωργικής άποψης είναι ζωτικής σημασίας, καθώς η βιομηχανική παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων σπανίως καλύπτει τις απαιτήσεις των φυτών (FAOSTAT 2009).

Η **Αμμωνιοποίηση ή Ανοργανοποίηση N** είναι η διαδικασία μετατροπής οργανικών ενώσεων που περιέχουν N όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα (Schneider, 1995), ουρία και συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων βακτηρίων ή μυκήτων σε NH_4^+ . Πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς του εδάφους μέσω της παραγωγής κατάλληλων υδρολυτικών ενζύμων (πχ. ουρεάσες, αμινοπεπτιδάσες) και λαμβάνει χώρα ακόμη και υπό ιδιαίτερα αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Mengel, 1996). Η τύχη του παραγόμενου NH_4^+ εξαρτάται από τις ανάγκες των μικροοργανισμών του εδάφους.

Η **Νιτροποίηση** αποτελεί το ρυθμοκαθοριστικό βήμα στο κύκλο του αζώτου. Περιλαμβάνει την μετατροπή της NH_3 προς NO_2^- και NO_3^- και πραγματοποιείται σε δύο κύρια βήματα: τη μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε υδροξυλαμίνη και τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα (Εικόνα 5) (Hatzenpichler, 2012; Treusch et al., 2005). Κατά τη μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε υδροξυλαμίνη το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και βρίσκεται τόσο στα νιτροδοποιητικά βακτήρια όσο και στα νιτροδοποιητικά αρχαία. Η AMO διασπά το O_2 και χρησιμοποιεί το ένα άτομο οξυγόνου για την οξειδωση της αμμωνίας ενώ το άλλο αντιδρά με το H^+ και σχηματίζει ένα μόριο ύδατος (Ferguson et al., 2007). Τα δύο ηλεκτρόνια που απαιτούνται προέρχονται από την οξειδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη. Τα γονίδια *amoA* και *amoB* κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες του ενζύμου AMO (Moir et al., 1996). Αντιθέτως το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα, η οξειδοοξειδωτική της υδροξυλαμίνης (HAO), έχει εντοπιστεί μόνο στα νιτροδοποιητικά βακτήρια και όχι στα νιτροδοποιητικά αρχαία. Στα τελευταία δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα ο μηχανισμός μετατροπής της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη (Stahl and de la Torre, 2012). Τα νιτρώδη ιόντα που παράγονται ως τελικό προϊόν της νιτροδοποίησης, μετατρέπονται από νιτροδοποιητικά βακτήρια (NOB, nitrite-oxidizing bacteria) σε νιτρικά ιόντα μέσω νιτροποίησης.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της νιτροδοποίησης και νιτρίκοποίησης

Μέχρι πρόσφατα η διαδικασία της νιτροποίησης θεωρούνταν μια αποκλειστικά αρθρωτή διεργασία, με την (α) Νιτροδοποίηση να επιτελείται από β-Proteobacteria (του γένους *Nitrosomonas* sp, και *Nitrospira* sp), ή γ-Proteobacteria (*Nitrosococcus oceani*, *Nitrosococcus halophilus*) σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Purkhold et al., 2000) και Αρχαία που ανήκουν στο φύλο Thaumarcheota (Hatzenpichler, 2012) και (β) την Νιτρίκοποίηση να πραγματοποιείται από βακτήρια του γένους *Nitrobacter* sp., *Nitrospira* sp. Η μελέτη των Daims et al., (2015) απέδειξε ότι η νιτροποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένα μόνο βακτήριο (Comammox: Complete ammonia oxidation bacteria) του γένους *Nitrospira* sp. Σε μεταγονιδιωματικές αναλύσεις αποδείχθηκε ότι τα Comammox είναι ευρέως διαδεδομένα σε τεχνητά συστήματα και σε φυσικά εδαφικά ή υδάτινα οικοσυστήματα (Pinto et al., 2015). Παρ'όλα αυτά ο λειτουργικός και οικολογικός τους ρόλος στην νιτροδοποίηση στα διάφορα οικοσυστήματα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το pH αποτελεί κύριο παράγοντα που καθορίζει ποια από τα AOB (ammonia-oxidizing bacteria) ή AOA (ammonia-oxidizing archaea) κυριαρχούν λειτουργικά στο έδαφος (Stephen et al., 1996; Kowalchuk et al., 1998). Αποδείχθηκε ότι τα AOB επικρατούν λειτουργικά συνήθως σε ουδέτερα προς αλκαλικά εδάφη σε αντίθεση με τα AOA που επικρατούν κυρίως σε όξινα εδάφη (Nicol et al., 2008). Ένας δεύτερος παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργική κυριαρχία των δύο αυτών ομάδων στη νιτροδοποίηση είναι η συγκέντρωση αμμωνίας στο έδαφος. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα AOA ευνοούνται σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας σε αντίθεση με τα AOB που ευνοούνται σε συστήματα με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακών (Hatzenpichler, 2012).

Η νιτροποίηση είναι επιθυμητή για τη γεωργία καθώς μετατρέπει το NH_4^+ ή την NH_3 σε NO_3^- που είναι μια πιο εύκολα αφομοιώσιμη μορφή N για τα φυτά, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους σε υψηλά επίπεδα. Όσον αφορά το περιβάλλον όμως δεν είναι, λόγω του ότι οδηγεί στην παραγωγή NO_3^- που

εξαιτίας του αρνητικού φορτίου τους δεν προσροφούνται στα εδαφικά κolloειδή και εκκλίνονται στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα, που στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποιούνται κυρίως ως πόσιμο νερό (Νιτρορύπανση). Επιπλέον τα NO_3^- μπορούν μέσω της απονιτροποίησης να μετατραπούν σε N_2O ή NO που αποτελούν ατμοσφαιρικούς ρύπους (Singh and Verma, 2007).

Η **Απονιτροποίηση** είναι η διεργασία κατά την οποία τα NO_3^- ανάγονται υπό αναερόβιες συνθήκες προς NO_2 , NO , N_2O , N_2 (αέρια). Πραγματοποιείται απουσία O_2 διότι σε αερόβιες συνθήκες οι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί προτιμούν το O_2 αντί του NO_3^- και συνεπώς δεν πραγματοποιείται απονιτροποίηση (Bernhard, 2010).

1.4. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα

Το έδαφος είναι ένας μη ανανεώσιμος πόρος που πραγματοποιεί βασικές λειτουργίες και υπηρεσίες ζωτικής σημασίας για την ανθρωπότητα. Πολλές από αυτές τις λειτουργίες και υπηρεσίες βασίζονται σε μικροοργανισμούς που οδηγούν τους κύριους βιογεωχημικούς κύκλους και πραγματοποιούν πληθώρα άλλων διεργασιών (Falkowski et al., 2008). Το έδαφος χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλή ποικιλότητα, πιθανότατα την υψηλότερη από οποιοδήποτε άλλο οικοσύστημα στον πλανήτη, με ένα γραμμάριο εδάφους να περιέχει έως και 10^6 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών (Gans et al., 2005). Μεταβολές στην ποικιλότητα ή την αφθονία των μικροοργανισμών στο έδαφος θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες μεταβολές στην λειτουργία των βασικότερων βιογεωχημικών κύκλων και κατά συνέπεια παρεμπόδιση της ομαλής λειτουργίας του εδαφικού οικοσυστήματος.

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Saeki and Toyota., 2004, Karpouzas et al., 2014a). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Puglisi et al., 2012, Rousidou et al., 2013, Feld et al., 2015, Papadopoulou et al., 2016) και άλλων λειτουργικών μικροβιακών ομάδων όπως οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες (Ipsilantis et al., 2012, Karpouzas et al., 2014b) στην έκθεση στα γεωργικά φάρμακα. Ειδικότερα οι Hernandez et al., (2011) έδειξαν ότι η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου simazine σε υψηλές συγκεντρώσεις οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην ποικιλότητα των νιτροδοποιητικών βακτηρίων. Παρόμοιες μελέτες από τους Puglisi et al., (2012) έδειξαν ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων cyprodinil και penconazole προκάλεσαν σημαντικές αλλά αναστρέψιμες μεταβολές στην ποικιλότητα και στην λειτουργία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων. Βασιζόμενοι σε όλες αυτές τις παρατηρήσεις οι Wessen and Hallin (2011) και στην συνέχεια οι Pereira e Silva et al., (2013) πρότειναν ότι οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως δείκτες καταπόνησης και ποιότητας του εδάφους. Ειδικότερα οι Kargouzas et al., (2016) πρότειναν την χρήση των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών ως μικροβιακούς δείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.5. Σκοπός εργασίας

Μέχρι σήμερα οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους αγνοώντας πιθανές επιδράσεις των κύριων μεταβολικών προϊόντων τα οποία ενδεχομένως να είναι πιο τοξικά για τους οργανισμούς μη-στόχους. Αφορμή για την πραγματοποίηση της παρούσα μελέτης υπήρξαν προηγούμενες μελέτες των Papolla et al., (2014) που έδειξαν ότι η εφαρμογή του iprodione οδήγησε σε σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην δραστηριότητα αρκετών μικροβιακών ενζύμων καθώς και στην δυνητική νιτροποίηση και οι συγκεκριμένες επιδράσεις αποδόθηκαν, ύστερα από στατιστική ανάλυση, στην συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων 3,5-DCA στο έδαφος. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-DCA, ύστερα από εφαρμογή της ίδιας της ουσίας στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων στο ίδιο έδαφος με αυτό που πραγματοποιήθηκε η μελέτη των Papolla et al., (2014). Συγκεκριμένα, έγινε απευθείας εφαρμογή της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους, με ή χωρίς αμμωνιακή λίπανση, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που θα αναμένονταν να σχηματιστούν από την εφαρμογή του iprodione σε συγκεντρώσεις ίδιες με την συνιστώμενη ή πολλαπλάσιες αυτής. Με αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε η αποδόμηση της 3,5-DCA, η επίδρασή της στη νιτροποίηση και αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα, συλλέχθηκε από βοσκοτόπο στην Βόρεια Ιταλία (45°27'55.69"N, 9°38'20.05"E). Τα χαρακτηριστικά του εδάφους καταγράφονται στον Πίνακα 1 (Vasileiadis et al., 2013).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του εδάφους (Vasileiadis et al., 2013)

Χαρακτηριστικά Εδάφους	Τιμές
pH***	6.9
Ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) (mEq 100 g ⁻¹)	1.79
Υγρασία (%)	18.1
Ολικό άζωτο (N) (%)	0.32
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) (%)***	2.98
TOC/N	9.34

Αφού κοσκινίστηκε, ζυγίστηκαν 3,840 kg καθαρού εδάφους τα οποία χωρίστηκαν σε δύο σακούλες (A) και (B) των 1,920 kg. Το έδαφος της κάθε σακούλας (A) και (B) διαχωρίστηκε περαιτέρω σε 4 επιμέρους δείγματα των 480 g. Στα δείγματα τις σακούλας A (A₁,A₂,A₃,A₄) εφαρμόστηκαν 4,8 ml διαλύματος (NH₄)₂SO₄ συγκέντρωσης 0,6 M, ενώ στα αντίστοιχα δείγματα της σακούλας B (B₁,B₂,B₃,B₄) έγινε εφαρμογή 4,8 ml απιονισμένου νερού. Η υγρασία του εδάφους προσαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα στο 45% της υδατοχωρητικότητας (WHC) και ακολούθησε εφαρμογή 3,3 ml διαλύματος 3,5-DCA (98% καθαρότητα) σε MeOH με συγκέντρωση 0, 100, 1000 και 10000 µg/ml οδηγώντας σε τελικές συγκεντρώσεις 3,5-DCA της τάξης των 0 (Μάρτυρας), 0.6 , 6, 60 µg/g εδάφους όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Οι δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων, με (A) και χωρίς (B) αμμωνιακή λίπανση στις οποίες αξιολογήθηκε η επίδραση των διαφορετικών δόσεων εφαρμογής της 3,5-DCA

A1: 0 µg/g 3,5-DCA µε N	B1: 0 µg/g 3,5-DCA χωρίς N
A2: 0.6 µg/g 3,5-DCA µε N	B2: 0.6 µg/g 3,5-DCA χωρίς N
A3: 6 µg/g 3,5-DCA µε N	B3: 6 µg/g 3,5-DCA χωρίς N
A4: 60 µg/g 3,5-DCA µε N	B4: 60 µg/g 3,5-DCA χωρίς N

Υστερα, όλα τα δείγματα χωρίστηκαν περαιτέρω σε πλαστικά σακουλάκια που περιείχαν καθένα 23 g έδαφος και τοποθετήθηκαν για επώαση στο σκοτάδι στους 25°C. Αμέσως μετά την εφαρμογή και σε χρονικά διαστήματα 3, 7, 14, 28, 56 και 70 ημερών τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και χρησιμοποιούνταν όπως περιγράφεται παρακάτω. 5 g εδάφους από κάθε σακουλάκι χρησιμοποιούνταν για προσδιορισμό δυνητικής νιτροποίησης, 2 g αποθηκεύονταν στην κατάψυξη στους -80°C για προσδιορισμό της αφθονίας νιτροδοποιητικών βακτηρίων και το έδαφος που απέμενε αποθηκευόταν στους -20°C για προσδιορισμό αποδόμησης της 3,5-DCA.

2.2. Προσδιορισμός Δυνητικής Νιτροποίησης

2.2.1 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM.

Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM.

Διάλυμα NaClO_3 1.5 M.

Διάλυμα KCl 2 M.

Ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl 0.19 M, pH 8.5.

Χρωματικός δείκτης αποτελούμενος από σουλφανιλαμίδα και N-(1- ναφθυλ) αιθυλενο-διάμινο υδροχλωρίο.

Πυκνό διάλυμα NaNO_2 (1000 $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$).

Διάλυμα εργασίας NaNO_2 (10 $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$).

2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της Kandeler (1995), όπου 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 νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και 0.1 ml NaClO_3 1.5 M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωσίας των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτροδών (NO_2^-) αντί νιτρικών (NO_3^-) ιόντων και ακολούθησε ήπια

ανάδευση του μίγματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20°C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτροδοποίησης. Μετά το πέρας των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά προστέθηκαν 5 ml διαλύματος KCl 2 M για τη δέσμευση των ιόντων NH_4^+ και NO_3^- , και ακολούθησε σύντομη ανάδευση και διήθηση. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19 M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- που έχουν παραχθεί, ώστε με τη φωτομέτρηση να καταδειχθεί η συγκέντρωσή τους στα διαλύματα. Ακολούθησε ανάδευση, ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 5 ml απεσταγμένο νερό με 3 ml NH_4Cl 0.19 M και 2 ml χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520 nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα εδαφικά δείγματα νιτροδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 ml διαλύματος NaNO_2 ($10 \mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml, με απεσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και $1.0 \mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$. Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και $0.5 \mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19 M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520 nm.

2.3. Μέτρηση Αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος

2.3.1. Διαδικασία Εκχύλισης 3,5-DCA από το έδαφος

Αρχικά ζυγίστηκαν 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml, όπου προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Τα δείγματα στην συνέχεια αναδεύτηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στις 180 rpm. Με το πέρας της ανάδευσης τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες falcon των 50 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 7500 rpm στους 25°C. Ακολούθησε παραλαβή

5 ml του υπερκείμενου, και διήθηση μέσω PTFE φίλτρων σύριγγας και ακολούθως αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC-PDA όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.3.2. Διαδικασία ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-PDA) Shimadzu. Ο διαχωρισμός της 3,5-DCA επιτεύχθηκε με τη στήλη Athena RP 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. Σύμφωνα με τις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες, η 3,5-DCA ανιχνεύθηκε με χρόνο κατακράτησης 4,04 min. Οι συγκεντρώσεις της, προσδιορίστηκαν μέσω πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε με ανάλυση πρότυπων δειγμάτων της 3,5-DCA σε μεθανόλη, συγκεντρώσεων από 0.01 – 10 mg/L.

2.4. Προσδιορισμός της αφθονίας των ΑΟΒ στο έδαφος

2.4.1. Διαλύματα/υλικά για απομόνωση, ηλεκτροφόρηση και ποσοτικοποίηση συνολικού DNA εδάφους

DNeasy Power Soil Kit

Διάλυμα TAE 1x

Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου (1%)

Πηκτή Αγαρόζης (Άγαρ 0,8%)

Μπλε της Βρωμοφαινόλης (6x)

NEW ENGLAND BioLabs Inc. 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)

Qubit dsDNA BR Assay Kit της Invitrogen™

2.4.2. Πειραματική διαδικασία

Για την εξαγωγή DNA από το έδαφος χρησιμοποιήθηκαν 0,25 g εδάφους και η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε με το DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αφού έγινε η απομόνωση του DNA, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% για βεβαίωση της ύπαρξης γενωμικού DNA. Η ακριβής ποσοτικοποίηση του DNA έγινε με χρήση του Invitrogen™ Qubit™ 3.0 Fluorometer.

2.4.3. Υλικά για Real-Time PCR

KAPASYBR® DNA Polymerase

Ζεύγος εκκινητών amoAF-amoAR

BSA

ROX

ddH₂O

2.4.4. Πειραματική διαδικασία

Η αφθονία των AOB στα δείγματα εδάφους προσδιορίστηκε με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου ύστερα από ενίσχυση της υπομονάδας A του γονιδίου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας, *amoA*. Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα CFX Connect, BIORAD. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στο έδαφος πραγματοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο *amoA*. Από πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10¹⁰ αντιγράφων/μL παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα συγκεντρώσεων 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ αντιγράφων/μL. Για τα δείγματα DNA, αρχικά προετοιμάστηκε το master mix που περιλάμβανε το ζεύγος των δύο εκκινητών, την KAPA SYBR® DNA Polymerase, το BSA, το ROX και ddH₂O. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά πλαστικά 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 8 μl από το master mix και 2 μl δείγματος DNA (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR πραγματικού χρόνου

Συστατικά	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR® DNA Polymerase	5	1x
Forward primer (20pmol/μl) AOB: AmoA1F	0.2	0.4 μM
Reverse primer (20pmol/μl) AOB: AmoA2R	0.2	0.4 μM
BSA (10μg/μl)	0.2	400 ng/μl
ROX (50x)	0.2	1x
DNA	2	2.5 ng/μl
ddH ₂ O	2.2	
Συνολικός όγκος	10	

Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία αντί για DNA προστέθηκε ddH₂O. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR πραγματικού χρόνου του γονιδίου amoA των AOB παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Το θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα της PCR πραγματικού χρόνου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αφθονίας των AOB

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

2.5. Στατιστική Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα της δυναμικής νιτροποίησης και της αφθονίας των AOB αναλύθηκαν με ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (two-way-ANOVA) όπου ο χρόνος και τα επίπεδα εφαρμογής της 3,5-DCA αποτέλεσαν τις δύο κύριες μεταβλητές. Στις περιπτώσεις που εντοπίστηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών διαφορές μεταξύ των διαφόρων επιπέδων εφαρμογής 3,5-DCA στο κάθε χρόνο προσδιορίστηκαν με το Tukeys post-hoc test (5%).

Ο υπολογισμός των παραμέτρων κινητικής της αποδόμησης της 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων μοντέλων κινητικής όπως έχουν περιγραφεί από την ομάδα FOCUS (2006). Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα αποδόμησης προσαρμόστηκαν στα μοντέλα κινητικής πρώτης τάξης (SFO model) καθώς και σε τρία διφασικά μοντέλα κινητικής όπως το Hockey Stick (HS) καθώς και τα DFOP και FOMC. Η ακρίβεια προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής εκτιμήθηκε μέσω του στατιστικού χ^2 (<15%).

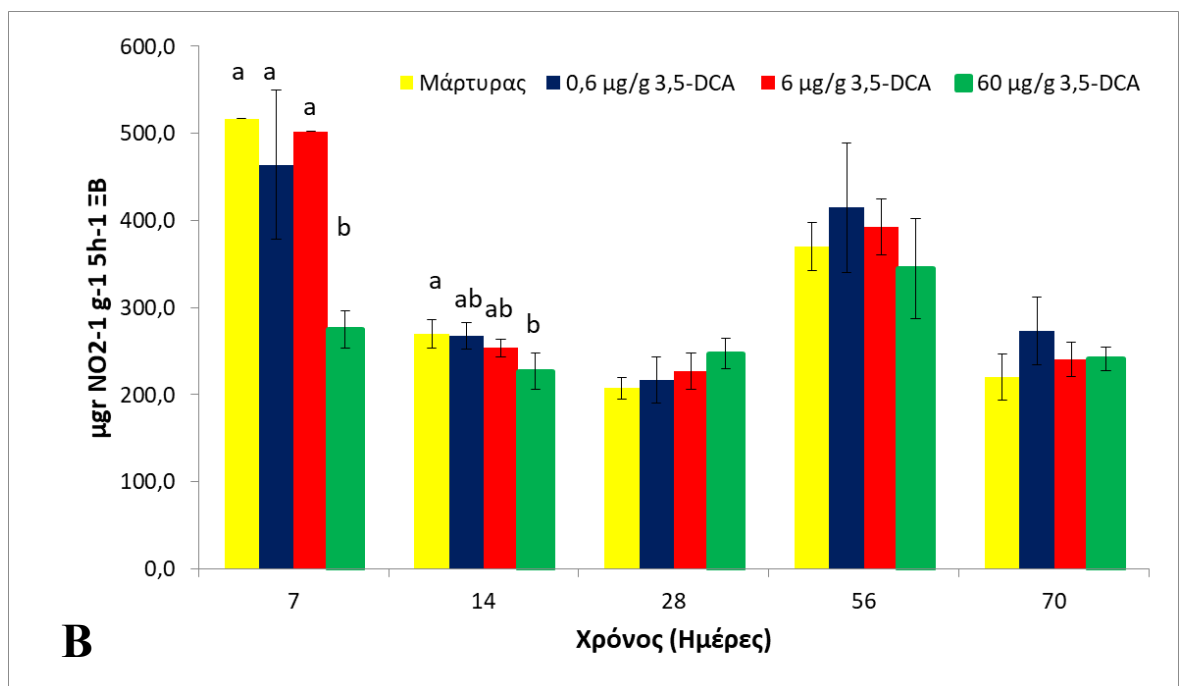
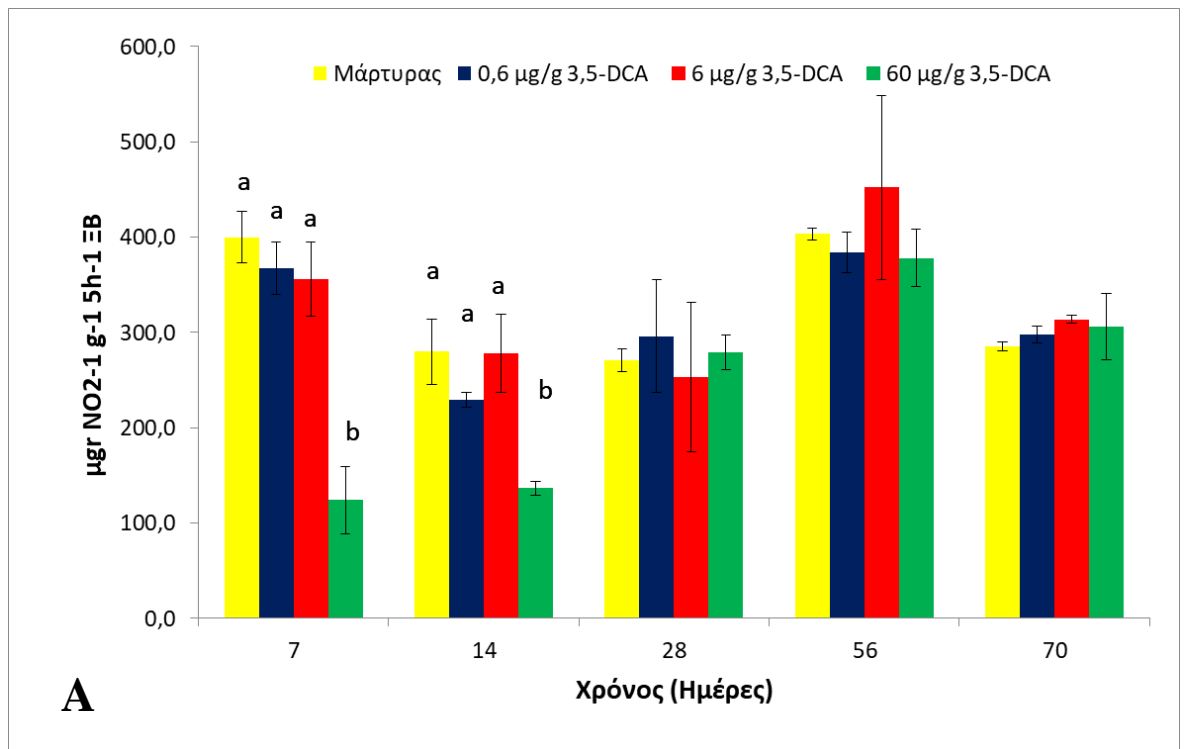
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης

Η επίδραση της 3,5-DCA στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης σε δείγματα που είχαν δεχτεί προηγουμένως ή όχι αζωτούχο λίπανση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε σημαντική επίδραση ($p < 0,001$) τόσο της δόσης εφαρμογής, όσο και του χρόνου, αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους.

Ειδικότερα στα εδάφη που δέχτηκαν αρχικά αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 1Α), παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης σε όλες τις μεταχειρίσεις με το πέρασμα του χρόνου. Αναφορικά με τις δόσεις εφαρμογής της 3,5-DCA, η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης εφαρμογής (60 μg/g) οδήγησε σε σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης ανεξαρτήτως του χρόνου δειγματοληψίας. Επιπρόσθετα η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης εφαρμογής προκάλεσε σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις κατά τις πρώτες 14 ημέρες. Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης στα συγκεκριμένα δείγματα επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα από τις 28 ημέρες και στην συνέχεια.

Στα εδάφη που δεν δέχτηκαν αρχικά αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 1Β) παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης σε όλες τις μεταχειρίσεις από τις 7 ημέρες και μέχρι το τέλος του πειράματος. Η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA προκάλεσε σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης που ήταν στατιστικά σημαντική κατά τις πρώτες 14 ημέρες μετά την εφαρμογή, ενώ ανέκαμψε σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα και των υπολοίπων μεταχειρίσεων στην συνέχεια.



Διάγραμμα 1: Η επίδραση διαφορετικών δόσεων (0, 0.6, 6 και 60 μg/g) της 3,5-DCA στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης σε δείγματα εφάρους με αμμωνιακή (A) και απουσία αμμωνιακής (B) λίπανσης

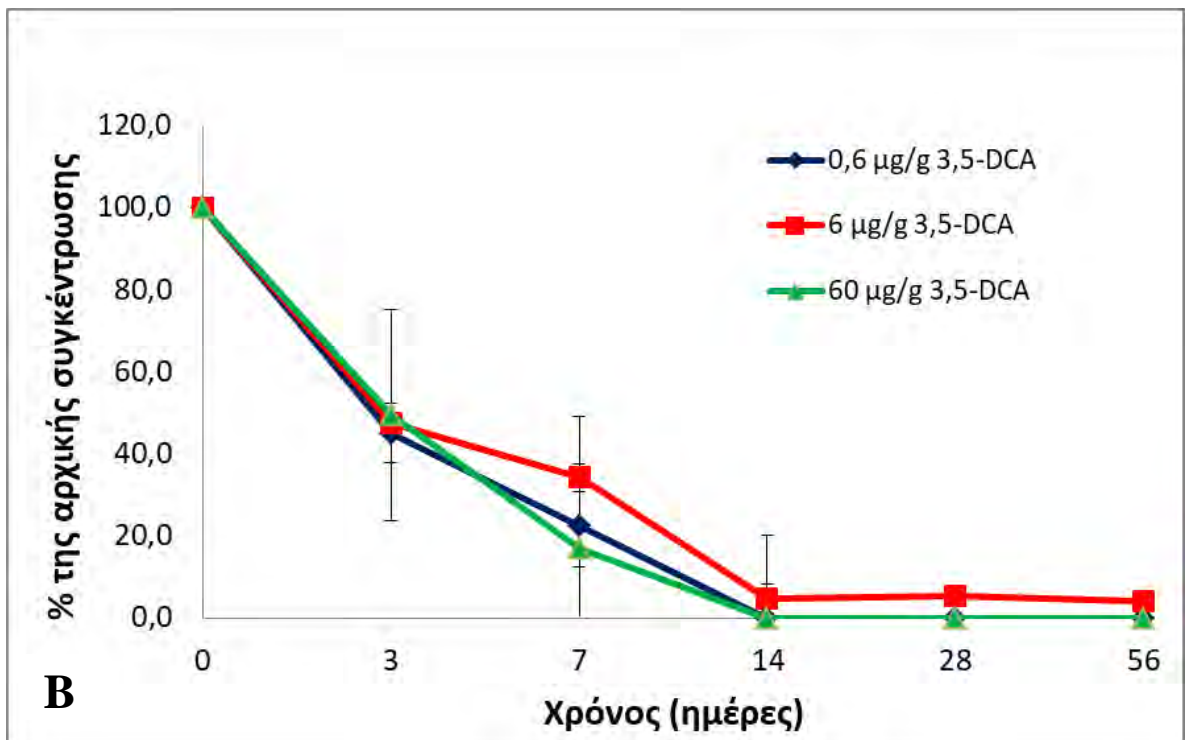
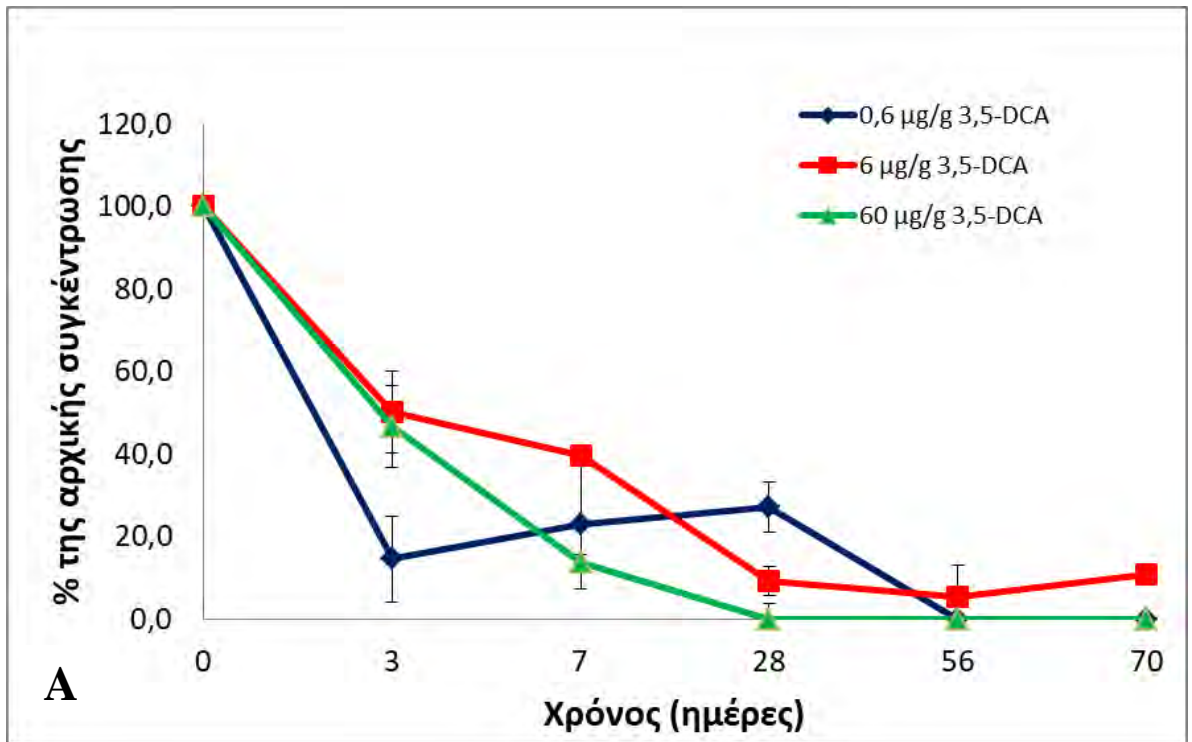
3.2. Αξιολόγηση της αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος

Το πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2. Το πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση με εφαρμογή της δόσης 0,6 μg/g περιγράφηκε καλύτερα από το μοντέλο κινητικής Hockey–Stick (HS), η δόση 6 μg/g από το μοντέλο κινητικής FOMC και η δόση των 60 μg/g από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO). Η αποδόμηση της 3,5-DCA στα εδάφη χωρίς αμμωνιακή λίπανση για όλες τις δόσεις εφαρμογής περιγράφηκε καλύτερα από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO). Με βάσει τα παραπάνω μοντέλα υπολογίστηκαν οι τιμές DT_{50} για την 3,5-DCA (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Οι τιμές DT_{50} για το 3,5-DCA στα εδάφη που είχαν δεχτεί ή όχι αζωτούχο λίπανση και στην συνέχεια δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων της 3,5-διχλωροανιλίνης.

Μεταχειρίσεις	DT_{50} (ημέρες)		
	0,6 μg/g	6 μg/g	60 μg/g
+NH ₄ -N	1,14	3,48	2,6
-NH ₄ -N	2,91	3,77	2,86

Γενικότερα η 3,5-DCA παρουσίασε χαμηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος, με τιμές DT_{50} που κυμαίνονταν από 1,14 ως 3,77 ημέρες. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στον χρόνο αποδόμησης ανάμεσα στις μεταχειρίσεις με αμμωνία (+NH₄-N) και χωρίς (-NH₄-N), ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αποδόμηση της 3,5-DCA ανάλογα με την δόση εφαρμογής της.

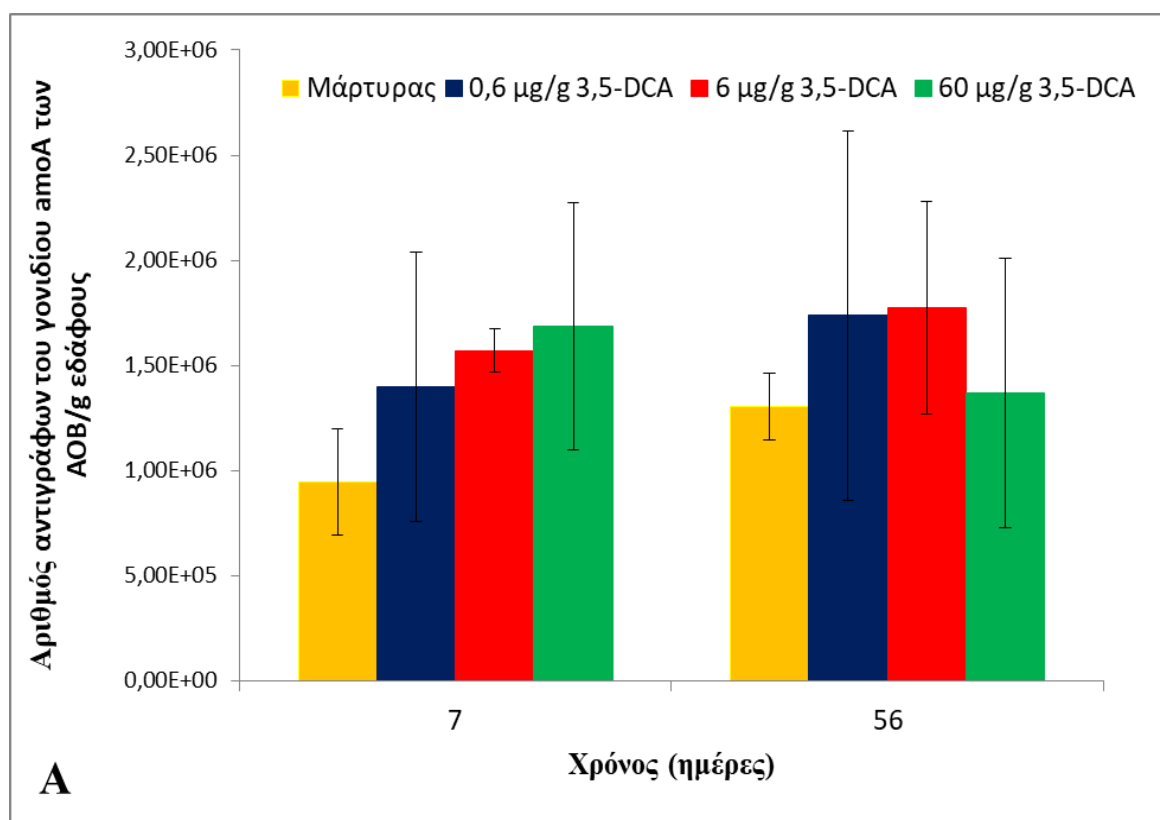


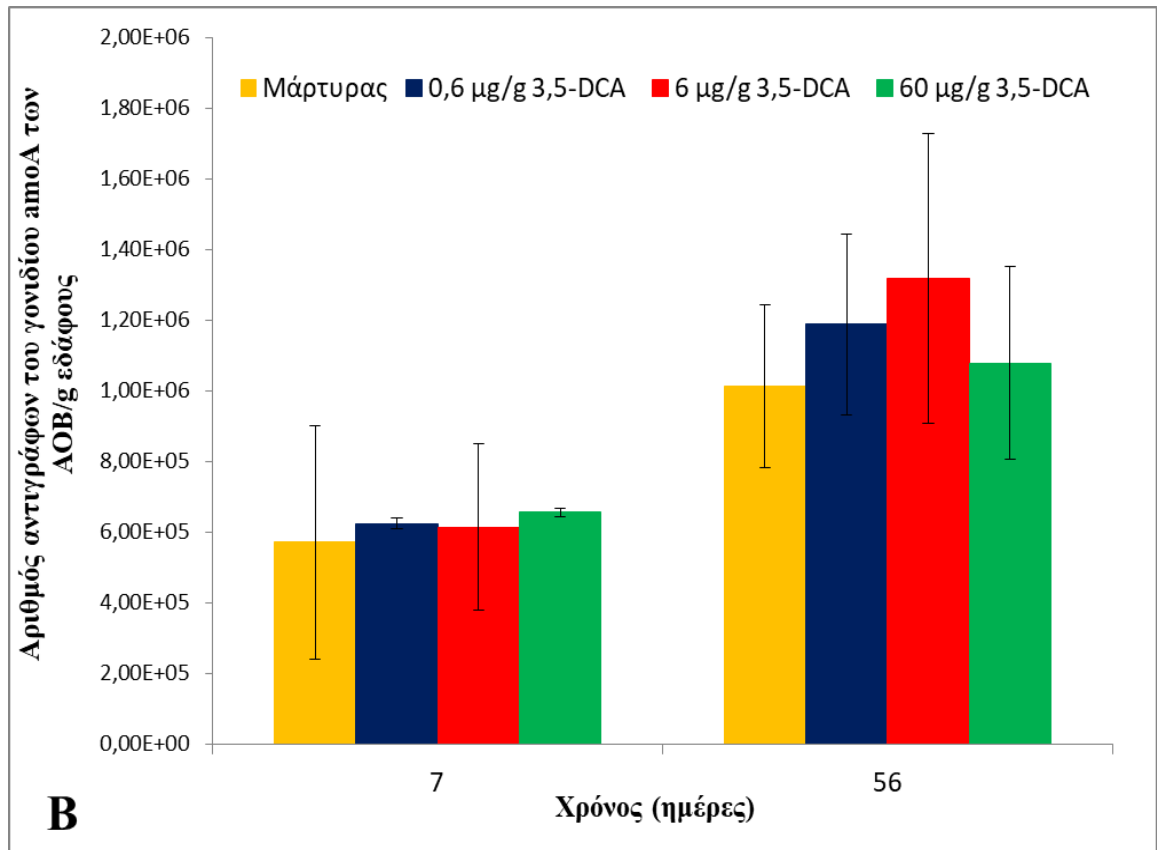
Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση των διαφορετικών δόσεων της 3,5-DCA σε δείγματα εδάφους που δέχτηκαν (A) ή δεν δέχτηκαν (B) αρχικά αμμωνιακή λίπανση

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

Η αφθονία των AOB προσδιορίστηκε μέσω μέτρησης του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB στα εδάφη που δέχτηκαν διαφορετικά επίπεδα δόσεων 3,5-DCA και στα οποία είχε ή δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.

Στα δείγματα που δέχτηκαν αρχικά εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης (Διάγραμμα 3A), η αφθονία των AOB δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διακύμανση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ως προς κανέναν παράγοντα ($p>0.05$). Αντιθέτως, στα δείγματα που δε δέχθηκαν αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 3B), παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία των AOB μόνο ως προς το χρόνο ($p<0.05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της δόσης του 3,5-DCA αλλά ούτε και σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυρίων παραγόντων. Ειδικότερα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αφθονίας των AOB στις 56 σε σχέση με τις 7 ημέρες, ανεξαρτήτου δόσης εφαρμογής 3,5-DCA (Διάγραμμα 3B). Από την άλλη μεριά δεν παρατηρήθηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μεταβολής της αφθονίας των AOB στο χρόνο.





Διάγραμμα 3: Η αφθονία των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των *AOB* στα δείγματα εδάφους με (A) ή χωρίς (B) αμμωνιακή λίπανση μετά από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-DCA, κύριου μεταβολικού προϊόντος του iprodione, στη λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων. Η λειτουργία τους εξετάστηκε μέσω του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης, ενώ η αφθονία μέσω προσδιορισμού του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου amoA των AOB με PCR πραγματικού χρόνου. Παράλληλα μελετήθηκε και η αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος ώστε να εκτιμηθεί η διάρκεια έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας στην εν λόγω ουσία. Η επίδραση της 3,5-DCA στην νιτροποίηση μελετήθηκε ύστερα από ή χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση. Η υπόθεση που κάναμε ήταν ότι προηγούμενη προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης θα οδηγήσει σε αύξηση στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και θα τους καταστήσει περισσότερο ευάλωτους στην έκθεση στην 3,5-DCA. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταβολικά προϊόντα των γεωργικών φαρμάκων είναι πιο τοξικά από τα τις μητρικές ουσίες, όπως ο μεταβολίτης 3,5-DCA από το μυκητοκτόνο vinclozolin (Lee et al., 2008). Έτσι η συγκεκριμένη μελέτη εστιάστηκε στην επίδραση της 3,5-DCA στους οργανισμούς μη στόχους, όπως τα AOB τα οποία αποτελούν ένα μικροβιακό δείκτη ποιότητας του εδάφους σύμφωνα με του Ritz et al., (2009). Επιπλέον μαζί με τα AOA, επιτελούν τη βασικότερη διεργασία στον κύκλο του αζώτου, τη νιτροποίηση, οπότε είναι σημαντικό να γνωρίζουμε αν η 3,5-DCA έχει επιπτώσεις σε αυτά.

Η διαδικασία της δυνητικής νιτροποίησης αποδείχθηκε λειτουργική, τόσο στις μεταχειρίσεις με αμμωνιακή λίπανση, όσο και απουσία της. Η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης DCA (60 µg/g) οδήγησε σε προσωρινή αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης που διήρκησε τουλάχιστον 14 ημέρες ανεξάρτητα από την πρότερη προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η δυνητική νιτροποίηση αποτελεί έναν από τους πιο ευαίσθητους δείκτες καταπόνησης. Έτσι οι Puglisi et al. (2012) έδειξαν πως τα μυκητοκτόνα penconazole και cyprodinil, όταν εφαρμόστηκαν στις συνιστώμενες δόσεις, προκάλεσαν προσωρινή αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης, η αποκατάσταση της οποίας συνέπεσε με την αποδόμηση των μυκητοκτόνων στο έδαφος. Παρομοίως οι Papadopoulou et al., (2016) έδειξαν ότι η εφαρμογή του αντιοξειδωτικού ethoxyquin στο έδαφος οδήγησε σε μη αντιστρεπτή αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε μερική συμφωνία με προηγούμενη μελέτη από τους Papolla et al., (2014) που έδειξε ότι ο σχηματισμός αναλόγων συγκεντρώσεων 3,5-DCA (60 µg/g), ύστερα από την εφαρμογή iprodione, προκάλεσαν σταθερή και μη αντιστρεπτή αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης. Η διαφοροποίηση μεταξύ των δικών μας ευρημάτων και αυτών των Papolla et al., (2014) οφείλεται στην υψηλή εμμόνη της 3,5-DCA στην μελέτη των Papolla et al., σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου η διγλωροανιλίνη αποδομήθηκε ταχύτατα σε όλες τις δόσεις εφαρμογής. Προηγούμενες μελέτες με άλλες δραστικές ουσίες όπως τα isoproturon και tebuconazole έδειξαν μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση της εμμόνης τους στο έδαφος η

οποία συνήθως αποδίδεται στην αδυναμία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους να αποδομήσει τις υψηλές συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στις οποίες εκτίθεται (Papadopoulou et al., 2016).

Η εφαρμογή της 3,5-DCA δεν οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOB ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τις μετρήσεις δυνητικής νιτροποίησης που έδειξαν αναστολή, έστω και προσωρινή, στην υψηλότερη δόση εφαρμογής. Η ασυμφωνία μεταξύ των μετρήσεων δυνητικής νιτροποίησης και αφθονίας των AOB μπορεί να αποδοθεί στον περιορισμένο ρόλο των AOB στην νιτροποίηση στο συγκεκριμένο έδαφος. Στην περίπτωση αυτή οι αντίστοιχες μετρήσεις για τα AOA (μέρος της διατριβής του Γ.Τζηκούλη) θα πρέπει να δείξουν αναστολή της αφθονίας τους. Από την άλλη μεριά θα πρέπει να τονιστεί ότι οι δύο αυτές μέθοδοι δεν παρέχουν την ίδια πληροφορία: η δυνητική νιτροποίηση παρέχει μια εκτίμηση της λειτουργίας της νιτροποίησης ενώ η μέτρηση της αφθονίας των amoA αποτελεί μέτρο της αφθονίας των AOB χωρίς απαραίτητα να συνεπάγεται και λειτουργία. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης παρατηρήσει αναντιστοιχία μεταξύ μετρήσεων δυνητικής νιτροποίησης και αφθονίας των AOB σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή ethoxyquin (Papadopoulou et al., 2016). Στην ίδια μελέτη η μέτρηση έκφραση του amoA (RT-q-PCR) αντί αφθονίας (q-PCR) εντόπισε σημαντικές επιδράσεις του ethoxyquin, αντίστοιχες αυτές που παρατηρήθηκαν με την δυνητική νιτροποίηση, οι οποίες δεν ήταν ορατές με τις μετρήσεις αφθονίας μέσω q-PCR.

Συνολικά η εφαρμογή 3,5-DCA στο έδαφος οδήγησε σε προσωρινή αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης η οποία αποκαταστάθηκε με την ολοκλήρωση της αποδόμησης της 3,5-DCA. Οι επιδράσεις αυτές δεν αντικατοπτρίστηκαν στην αφθονία των AOB.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Aponte, C., Marañón, T., & García, L. V. (2010). Microbial C, N and P in soils of Mediterranean oak forests: Influence of season, canopy cover and soil depth. *Biogeochemistry*, 101(1), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9418-5>
- Athiel, P., Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., Davet, P., Brunel, B., Cleyet-Marel, J., 1995. Degradation of iprodione by a soil Arthrobacter-like strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3216e3220.
- 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. (2007). Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. *Toxicology Letters*, 174(1–3), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.010>
- Bollag, J.M., Liu, S.-Y., 1990. Biological transformation processes of pesticides. In: Cheng, H.H. (Ed.), *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*. SSSA Book Series 2.
- Campos, M., Perruchon, C., Vasilieiadis, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzas, D. G., & Diez, M. C. (2015). Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.009>
- Campos, M., Karas, P. S., Perruchon, C., Papadopoulou, E. S., Christou, V., Menkissoglou-Spiroudi, U., ... Karpouzas, D. G. (2017). Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 152–163. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7682-1>
- Campos, M., Perruchon, C., Karas, P. A., Karavasilis, D., Diez, M. C., & Karpouzas, D. G. (2017). Bioaugmentation and rhizosphere-assisted biodegradation as strategies for optimization of the dissipation capacity of biobeds. *Journal of Environmental Management*, 187, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.031>
- Charles R. Worthing, R.J Hance, 1991. *The Pesticide manual: a world compendium*. British Crop Protection Council.

- Chen, Q., Yang, B., Wang, H., He, F., Gao, Y., & Scheel, R. A. (2014). Soil microbial community toxic response to atrazine and its residues under atrazine and lead contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 996–1007. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3369-7>
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, Kirkegaard RH, Volume 1 Issue 1 e00054-15 von Bergen M, Rattei T, Bendinger B, Nielsen PH, Wagner M.26 November 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* <http://dx.doi.org/10.1038/nature16461>
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., DeLong, E.F., 2008. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034e1039.
- FAOSTAT. (2009) Agricultural Data. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Feld, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F., ... Jacobsen, C. S. (2015). Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by *amoA* expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE*, 10(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080>
- Ferguson, S.J., Richardson, D.J. and Van Spanning, R.J.M. (2007) Biochemistry and molecular biology of nitrification. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 209–222, Elsevier, Amsterdam
- FOCUS (2006) Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, p. 434. EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006.
- Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil. *Science* 309, 1387–1390.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. A., Smith, P., & Schnabel, G. (2014). Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Phytopathology*, 104(4), 396–402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0156-R>
- Hatzenpichler R (2012) Diversity, physiology and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(21): 7501-7510
- 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 Microbiology Ecology*, 78(3), 511–519. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01180.x>

- Ipsilantis I., Samourelis C., Karpouzas D.G., (2012) The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 147-155
- Kandeler E (1995) Potential nitrification. In: Schinner F, Ohlinger R, Kandeler E, Margesin R (eds) *Methods in soil biology*. Springer-er, Heidelberg, pp 146–149
- Karpouzas, D.G., Kandeler, E., Bru, D., Friedel, I., Auer, Y., Kramer, S., Vasileiadis, S., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Martin-Laurent, F. (2014a) A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 75: 282-291
- Karpouzas D.G., Papadopoulou, E, Ipsilantis I., Petric I., Udikovic-Kolic N., Djuric S., Kandeler E., Menkissoglu-Spiroudi U., Martin-Laurent F., (2014) Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecological Indicators* 39: 44-53
- 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(18), 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Kidd Hamish; James David; Royal Society of Chemistry. Information Services. *The agrochemicals handbook*, 1991.
- Kowalchuk, G.A., Bodelier, P.L.E., Heilig, H.J.G., Stephen, J.R., and Laanbroek, H.J. (1998) Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol* 27: 339–350.
- Lee, J. B., Sohn, H. Y., Shin, K. S., Kim, J. S., Jo, M. S., Jeon, C. P., ... Kwon, G. S. (2008). Microbial biodegradation and toxicity of vinclozolin and its toxic metabolite 3,5-dichloroaniline. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 343–349.
- Leiniger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*. 2006; 442: 806–809. PMID: 16915287
- Lo, H. H., Brown, P. I., & Rankin, G. O. (1990). Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology*, 63(2), 215–231. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(90\)90044-H](https://doi.org/10.1016/0300-483X(90)90044-H)
- Ludvigsen, G.H., Vandsemb, S., Lode, O., 2004. Pesticider i avrenning fra norske golfbaner. *Vanni* 2, 2004 (in Norwegian)

- Martin, C., Vega, D., Bastide, J., & Davet, P. (1990). Enhanced degradation of iprodione in soil after repeated treatments for controlling *Sclerotinia minor*. *Plant and Soil*, *127*(1), 140–142. <https://doi.org/10.1007/BF00010847>
- McGrath, M.T. 2004. What are Fungicides. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01. Updated 2016. www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/Fungicides.aspx
- Mengel, K. (1996). Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. *Plant and Soil*, *181*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1007/BF00011295>
- Mercadier C, Vega D and Bastide J, Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 23:207–215 (1997).
- Miñambres, G. G., Conles, M. Y., Lucini, E. I., Verdenelli, R. A., Meriles, J. M., & Zygadlo, J. A. (2010). 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*(1), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0155-7>
- Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S., & Richardson, D. J. (1996). The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters*, *387*(1), 71–74. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00463-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00463-2)
- Newton, W.E. (2007) Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 109–129, Elsevier, Amsterdam
- 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. *Environmental Microbiology*, *10*(11), 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
- Papadopoulou E., Karas P., Nikolaki S., Storck V., Ferrari F., Trevisan M., Martin-Laurent F., Karpouzas D.G., (2016) The dissipation and adsorption of isoproturon, chlorpyrifos, tebuconazole and of their main metabolites: A lab-to-field assessment. *Science of the Total Environment* 569-570:86-96
- Papadopoulou E.S., Tsachidou P., Sulowic S., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzas D.G., (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. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 747-755
- Pappola A., Ferrari A, Pertile G., Puglisi E., Suci N., Lamastra L., Vasileiadis S., Fornasier F., D.G. Karpouzas, M. Trevisan (2014) Assessing the soil microbial toxicity of iprodione using advanced biochemical and molecular tools: Put the blame on the metabolite 3,5 dichloroaniline. 13th IUPAC International Symposium of Pesticide Chemistry, San Francisco, USA, poster No. 100 p. 25

- Pereira e Silva, M.C., Semenov, A.V., Schmitt, H., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biol. Biochem.* 57, 995-1002.
- Pimentel D, H. Acquay, M. Biltonen, P. Rice, M. Silva, J. Nelson, V. Lipner, S. Giordano, A. Horowitz, and M. D'Amore. 1992. Assessment of Environmental and economic costs of pesticide use. In *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*, edited by D. Pimentel and H. Lehman, pp. 47-84. New York: Chapman and Hall.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/BF02286399>
- Pinto, A. J., Marcus, D. N., Ijaz, Z., Bautista-de los 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. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00054-15>
- Postgate, J. (1998). *Nitrogen Fixation* (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press
- Profiler, P.B.T., 2013. Developed by Environmental Science Center for the Office of Pollution Prevention and Toxics. U.S. Environmental Protection Agency. Online at. <http://www.pbtprofiler.net>.
- Prosser J., Brendan J. M. Bohannan , Tom P. Curtis , Richard J. Ellis , Mary K. Firestone , Rob P. Freckleton , Jessica L. Green , Laura E. Green , Ken Killham , Jack J. Lennon , A. Mark Osborn , Martin Solan , Christopher J. van der Gast & J. Peter W. 2007. Young The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*
- Puglisi, E., Vasileiadis, S., Demiris, K., Bassi, D., Karpouzas, D. G., Capri, E., ... Trevisan, M. (2012). Impact of Fungicides on the Diversity and Function of Non-target Ammonia-Oxidizing Microorganisms Residing in a Litter Soil Cover. *Microbial Ecology*, 64(3), 692–701. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0064-4>
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.-P., and 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
- Rochkind, M.L., Blackburn, J.W., Sayler, G.S., 1986. *Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, pp. 115e128.
- Rotthauwe J-H, Witzel K-P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural

- ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 4704–4712. PMID: 9406389
- Rousidou C., Papadopoulou E., Kortsinidou M., Giannakou I.O., Singh B.K., Menkissoglu-Spiroudi, U., and Karpouzas D.G.,(2013) Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology & Biochemistry* 67:98-105
- Saeki, M., Toyota, K., 2004. Effect of bensulfuron-methyl (a sulfonyurea herbicide) on the soil bacterial community of a paddy soil microcosm. *Biology and Fertility of Soils* 40, 110-118.
- Schneider B 1995 Stoffliche Zusammensetzung extrahierbarer organischer Stickstoffverbindungen in Böden in ihrer Bedeutung für die Stickstoffmineralisation. Ph.D. Thesis, Agric. Fac., Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany.
- Sequinatto, L., Reichert, J. M., Dos Santos, D. R., Reinert, D. J., & Copetti, A. C. C. (2013). Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Quimica Nova*, 36(6), 768–772. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600004>
- Singh, S. N., & Verma, A. (2007). The Potential of Nitrification Inhibitors to Manage the Pollution Effect of Nitrogen Fertilizers in Agricultural and Other Soils: A Review. *Environmental Practice*, 9(4), 266–279. <https://doi.org/10.1017/S1466046607070482>
- Stahl DA, de la Torre JR. 2012. Physiology and diversity of ammonia- oxidizing archaea. *Annu Rev Microbiol* 66:83–101. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., and Embley, T.M. (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to b-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 4147–4154.
- 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), 1168–1178. <https://doi.org/10.1002/ps.1101>
- Treusch, A. H., S. Leininger, A. Kletzin, S. C. Schuster, H. P. Klenk, and C. Schleper, 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins in uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7:1985-1995.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 1998. Registration Eligibility Decision (RED) iprodione. Prevention, pesticides and toxic substances. Online at. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2335.pdf>.

- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., van Veen, J. A., Cocconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2013). Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. *FEMS Microbiology Ecology*, *86*(2), 172–184. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12150>
- Valentovic, M. A., Rogers, B. A., Meadows, M. K., Conner, J. T., Williams, E., Hong, S. K., & Rankin, G. O. (1997). Characterization of methemoglobin formation induced by 3,5-dichloroaniline, 4-amino-2,6-dichlorophenol and 3,5-dichlorophenylhydroxylamine. *Toxicology*, *118*(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(96\)03587-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(96)03587-1)
- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., & Huub, J. M. (2016). Europe PMC Funders Group Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, *528*(7583), 555–559.
- Walker A, Brown PA, Entwistle AR (1986) Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic Sci* 17:183–193
- Walker, A. (1987). Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pesticide Science*, *21*(3), 219–231. <https://doi.org/10.1002/ps.2780210308>
- Wang, Y. S., Wen, C. Y., Chiu, T. C., & Yen, J. H. (2004). Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *59*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.01.008>
- Wessen E, Hallin S. 2011. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizer possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic* 11:1696–1698.
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & Gan, Y. (2011). Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology*, *2011*, 1–8. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>
- Yao H, Gao Y, Nicol GW, Campbell CD, Prosser JI, Zhang L, Han W, Singh BK (2011) Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. *Appl Environ Microbiol* 77:4618–4625