



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης στη λειτουργία και αφθονία των νιτρωδοποιητικών αρχαίων του εδάφους από βοσκοτόπους.

ΤΖΗΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Λάρισα, 2017



**UNIVERSITY OF THESSALY, DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

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

TZIKOYLIS GEORGIOS

Larissa, 2017

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων: **Καρπούζας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

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

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του. Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Καρά για την τεράστια υπομονή και αμέριστη βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Καριπίδου Μαρία, με την οποία διεξήγαμε παράλληλα την πτυχιακή μας για την συνεργασία και βοήθειά της. Επίσης 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 επιτροπή. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την φιλική τους διάθεση και συνεργασία.

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

1. Εισαγωγή	
1.1 Γεωργικά φάρμακα.....	8
1.2 Μυκητοκτόνα.....	9
1.3 Iprodione.....	10
1.4 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA).....	12
1.5 Κύκλος αζώτου.....	13
1.6 Νιτροποίηση.....	14
1.7 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (ΑΟΑ).....	16
1.8 Επίδραση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και στη νιτροποίηση.....	16
1.9 Σκοπός εργασίας.....	19
2. Υλικά και Μέθοδοι	
2.1 Πειραματικό μέρος.....	20
2.2 Προσδιορισμός επιπέδων αμμωνιακών – νιτρικών ιόντων στο έδαφος.....	23
2.3 Προσδιορισμός της αφθονίας ΑΟΑ σε δείγματα εδάφους.....	25
2.4 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων της 3,5 DCA στο έδαφος.....	27
2.5 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	28
3. Αποτελέσματα	
3.1 Αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος.....	28
3.2 Επίδραση του 3,5-DCA στη συγκέντρωση νιτρικών στο έδαφος.....	30
3.3 Επίδραση του 3,5-DCA στην συγκέντρωση αμμωνιακών στο έδαφος.....	32
3.4 Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην αφθονία των ΑΟΑ.....	35
4. Συζήτηση και συμπεράσματα.....	37
Βιβλιογραφία.....	39

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα έχουν γίνει απαραίτητα στη σύγχρονη γεωργία αλλά η υπερβολική τους χρήση έχει ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του περιβάλλοντος και των οργανισμών μη στόχων τους. Γίνονται συνεχώς μελέτες για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων αλλά όχι για τα προϊόντα τους και την σχέση τους με το περιβάλλον, που συνήθως είναι πιο τοξικά από τη μητρική ουσία. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB) και νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA) εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στα γεωργικά φάρμακα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-DCA, η οποία αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του μυκητοκτόνου Iprodione, στα νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA). Τα AOA παίρνουν μέρος στη νιτροποίηση, τη βασικότερη διεργασία στον κύκλο του αζώτου κατά την οποία πραγματοποιείται μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) ή αμμωνίας (NH_3) αρχικά σε νιτρώδη (NO_2^-) και στην συνέχεια σε νιτρικά (NO_3^-). Πραγματοποιήθηκε πείραμα εργαστηριακής κλίμακας όπου σε δείγματα εδάφους, που είχαν δεχτεί ή όχι αρχικά αμμωνιακή λίπανση, εφαρμόστηκαν τρεις 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 της αφθονίας των AOA με q-PCR και την εκτίμηση των επιπέδων των αμμωνιακών – νιτρικών ιόντων. 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.

Abstract

Pesticides have become indispensable in modern agriculture, but over-use has as a result to pollute the environment and its non-target organisms. Studies on the impact of pesticides are being carried out continuously, but not on their products and their relation to the environment, which are usually more toxic than the parent substance. Previous studies have shown that ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) have high sensitivity to pesticides and can be used as biomarkers to assess the toxicity of pesticides to soil micro-organisms. In this current study it was researched the effect of 3,5-DCA, which is the major metabolite of the fungicide Iprodione, in the ammonia-oxidizing archaea (AOA). AOAs are involved in nitrification, the most basic process in the nitrogen cycle, where ammonium (NH_4^+) or ammonia (NH_3) is first converted to nitrite (NO_2^-) and then to nitrates (NO_3^-). An experiment was conducted where three incremental doses of 3,5-DCA (0.6, 6 and 60 $\mu\text{g} / \text{g}$) were applied to ground samples, whether or not initially soil was treated with ammonia. These concentrations correspond to the concentrations of 3,5-DCA expected to be formed from the hydrolysis of Iprodione to the soil after application of the recommended x1, x10 and x100 doses of the recommended. The effect of 3,5-DCA on nitrification was assessed by determining the abundance of AOA by q-PCR and estimating ammonium nitrate levels. At the same time, the disintegration of 3,5-DCA in the soil was determined in each application dose to find possible correlations between the duration of exposure and the recovery of the microbial community from potential impacts.

1.Εισαγωγή

1.1. Γεωργικά φάρμακα

Γεωργικά φάρμακα ονομάζονται οι χημικές ουσίες ή μίγματα ουσιών συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων που μπορούν να σκοτώσουν, να εμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων οργανισμών που είναι επιβλαβής για τις αγροτικές καλλιέργειες. Στόχος τους είναι η αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης των καλλιεργούμενων φυτών αλλά και της φθηνότερης παραγωγής, κάτι που θα έχει αντίκτυπο και στο καλάθι του καταναλωτή. Η χρήση τους είναι ευρέως διαδεδομένη στη σύγχρονη γεωργία και υπάρχουν 5 τύποι, και η τρίτη κατηγορία είναι η πιο διαδεδομένη:

- A. Τα ζιζανιοκτόνα B. Τα μυκητοκτόνα Γ. Τα εντομοκτόνα
Δ. Τα ακαρεοκτόνα E. Τα νημαδωτοκτόνα

Μετά από μελέτη του Pimentel et al ,1995 φάνηκε πως μόνο ένα μικρό ποσοστό (0,3%) των εφαρμοζόμενων γεωργικών φαρμάκων καταλήγει στο στόχο του ενώ το 99,7% καταλήγει στο περιβάλλον. Ανεξαρτήτως του τρόπου εφαρμογής τους είτε αυτός είναι στο υπέργειο τμήμα του φυτού, είτε γίνεται με επικάλυψη των οργάνων είτε με άμεση εφαρμογή στο έδαφος (Van der Werf et al ,1996) τα γεωργικά φάρμακα καταλήγουν στο έδαφος (Braschil. et al ,2011). Εκεί οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να αποδομήσουν τα γεωργικά φάρμακα και να χρησιμοποιήσουν τα προϊόντα ως πηγή ενέργειας διευκολύνοντας την ταχεία απομάκρυνσή τους από το έδαφος και εμποδίζοντας τη διασπορά τους σε άλλα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (Kargrouzas et al., 2016) ή έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις σε αυτούς όπως παρεμπόδιση των λειτουργιών τους (Puglisi et al. ,2012), μείωση ποικιλότητας (Feld et al 2015) και γενικά επιβλαβής επιπτώσεις για το οικοσύστημα.

1.2. Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη μυκήτων και σπορίων μυκήτων (Haverkate et al , 1979). Γενικά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο μιας ασθένειας, για την αύξηση της παραγωγικότητας μιας καλλιέργειας και για βελτίωση της διάρκειας αποθήκευσης και ποιότητας των 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). Χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

A) τα μυκητοκτόνα επαφής τα οποία εφαρμόζονται στην επιφάνεια των φυτών και προστατεύουν τα συγκεκριμένα μέρη του φυτού επί του οποίου αποτίθενται.

B) τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα τα οποία απορροφούνται από το φυτό και κατανέμονται κατάλληλα σε όλο το φυτό μέσω ξυλώματος

Γ) τα διαφυλλικά τα οποία μετά από την εφαρμογή τους στα φύλλα, απορροφούνται και κατανέμονται στο φυτό από πάνω προς τα κάτω

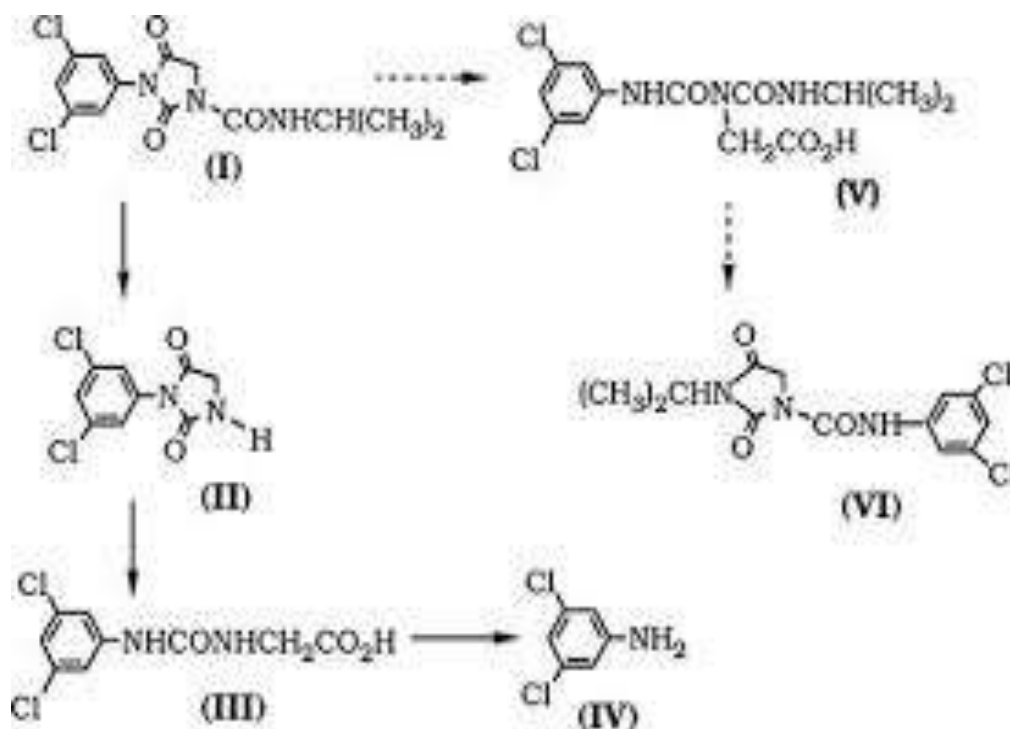
Πολλά μυκητοκτόνα έχουν στοχευμένη δράση που προσδίδει υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι ειδικών παθογόνων, πράγμα που σημαίνει χαμηλό ενδεχόμενο τοξικότητας σε ανθρώπους και άλλους οργανισμούς, αλλά έχει επίσης ως αποτέλεσμα υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας στο μυκητοκτόνο. Ανάλογα με το χρόνο εφαρμογής των μυκητοκτόνων μπορεί να εμφανιστούν υπολείμμάτα τους στα γεωργικά προϊόντα (Gosselin et al ,1994), αλλά συνήθως πρέπει αυτά να εφαρμόζονται πριν από την εμφάνιση της ασθένειας ή κατά την πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων για να είναι αποτελεσματικά. Υπάρχουν και φυσικά μυκητοκτόνα όπως το λάδι ρίγανης και σιτρονέλλα. (Yang et al ,2011)

1.3. Iprodione = [3-(3,5 διχλωροφαίνυλο)-N-ισοπροπύλο-2,4-διοξοϊμιζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο]

Το Iprodione ανήκει στη χημική οικογένεια των δικαρβοξαμιδίων και συντέθηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του '90. Χημικά αποτελείται από έναν δακτύλιο ιμιδαζολίου ενωμένο με ένα 3,5 δίχλωροφαινυλαμίδιο (Pospis et al, 1999). Είναι ένα προστατευτικό δικαρβοξαμιδικό μυκητοκτόνο επαφής με ευρύ φάσμα δράσης που αναστέλλει την μυκηλιακή ανάπτυξη και ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται μεταξύ 20 και 160 ημερών (The Agrochemicals Handbook. 1991). Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων που ανήκουν στα γένη και είδη: *Altenaria* sp. , *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp. , *Aspergillus* sp. , *Fusarium* sp. και *Rhizoctonia* sp. Μεταβολίζεται σε 3,5 διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) και επιδρά αρνητικά σε πολλούς οργανισμούς μη στόχους. Έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο και έχει αναφερθεί ότι μειώνει την παραγωγή τεστοστερόνης σε αρσενικούς αρουραίους (Blystone et al. 2007). Έχει υψηλή κινητικότητα στο περιβάλλον και δεν είναι γνωστή η επίδρασή του στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες (Athiel et al, 1995) έχουν καταγράψει την επίδραση του Iprodione στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρο αν οι επιδράσεις του ήταν θετικές ή αρνητικές καθώς το μυκητοκτόνο μεταβολίζεται βιοτικά ή αβιοτικά ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή διαφορετικών προϊόντων. Μελέτες από τους Pappola et al. έδειξαν για πρώτη φορά ότι η εφαρμογή iprodione σε δόσεις x10 και x100 της συνιστώμενης οδηγούν σε αντιστρεπτή ή καθολική αναστολή της νιτροποίησης αντίστοιχα. Το iprodione εμφανίζει μέτρια υπολειμματικότητα στο έδαφος που σχετίζεται με το pH του εδάφους δηλαδή σε ουδέτερο προς αλκαλικό έχουμε ταχύτερη αποδόμηση του. Οι υψηλές θερμοκρασίες και οι υψηλές συγκεντρώσεις του iprodione οδηγούν σε αυξημένες επιδράσεις στην ποικιλότητα της κοινότητας των αρχαίων του εδάφους (Wang et al., 2014). Σε εδάφη που είχε γίνει χρήση του φαρμάκου παλιότερα αποδομείτε ταχύτατα, φαινόμενο που ονομάστηκε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (Martin et al., 1986 , Slade et al., 1992) και αποδόθηκε στην κυριαρχία στο έδαφος των βακτηρίων που

χρησιμοποιούσαν αυτό ή τα προϊόντα του μεταβολισμού του ως πηγή C και N.

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, που ακολούθως μετασχηματίζεται σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate με τελικό προϊόν την 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) η οποία διασπάται περαιτέρω από την μικροβιακή κοινότητα των περισσότερων εδαφών. (βλ. **Εικόνα 1**) Ο μηχανισμός δράσης του iprodione περιλαμβάνει την αναστολή της σύνθεσης του DNA και του RNA κατά την εκβλάστηση των σπορίων του μύκητα. Επιπλέον, αναστέλλει το ένζυμο NADH αναγωγάση του κυτοχρώματος c εμποδίζοντας έτσι την σύνθεση λιπιδίων και μεμβρανών με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσεται το μυκήλιο του μύκητα (Edlich et al, 1992). Ο Julliard το 1994 ύστερα από πειράματα συμπέρανε ότι ο πρώτος στόχος του iprodione είναι το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση το οποίο καταλύει την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την σύνθεση του ασκορβικού οξέος μέσω της UDP- γλυκόζης.



Εικόνα 1: Το μονοπάτι μεταβολισμού του Iprodione όπως προτάθηκε από τους Mercadier et. al. ,1997. Τα συμπαγή βελάκια δείχνουν βιοτικές μετατροπές ενώ τα διακεκομένα αβιοτικές. Οι ουσίες στην εικόνα είναι:

I) Iprodione II) N-(3,5 Dichlorophenyl)-2,4 dioxoimidazoline

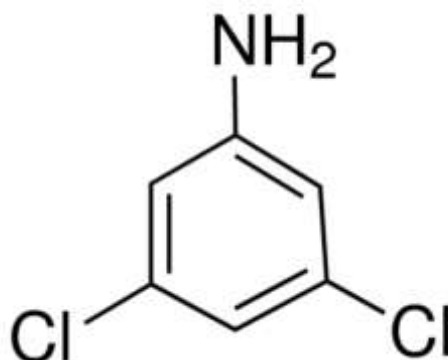
III) 3,5 Dichlorophenylurea acetic acid IV) 3,5 Dichloroaniline

V) 3-Isopropylcarbamoyl-(3,5 dichlorophenyl)-5 hydantoic acid

VI) Isopropyl-3-N(3,5 dichlorophenyl)-2,4 dioxoimidazolidine-1- carboxamide

1.4. 3,5-Διχλωροανιλίνη (DCA)

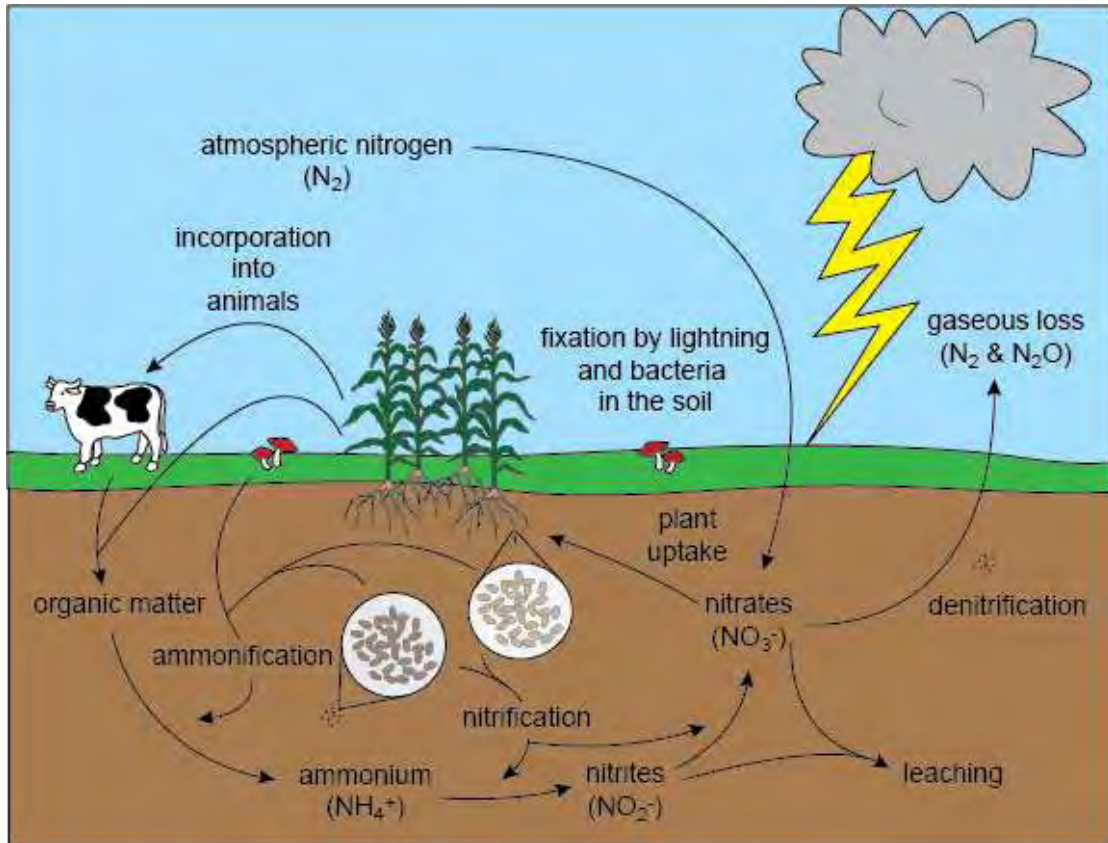
Η 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του Iprodione και ανήκει στην οικογένεια των διχλωροανιλινών οι οποίες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από δακτύλιο ανιλίνης υποκατεστημένο με 2 άτομα χλωρίου. Ο μοριακός της τύπος είναι ο $C_6H_5Cl_2N$ και υπάρχουν 6 ισομερή της διχλωροανιλίνης από τα οποία μόνο 2 χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζιζανιοκτόνων και ονομάζονται με βάση την αμινομάδα στην θέση 1. Ακόμα εμφανίζει νεφρική τοξικότητα με φθίνουσα σειρά νεφροτοξικού δυναμικού: 3,5-DCA > 2,5-DCA > 2,4-, 2,6- και 3,4-DCA > 2,3-DCA, αιμόλυση (Valentovic et al. ,1996) και επηρεάζει την μεθαιμοσφαιρίνη όπου δεν προσδέεται O_2 . Πρόσφατες μελέτες από τους Parolla et al., (2014) έδειξαν ότι η εφαρμογή iprodione σε δόσεις x10 και x100 φορές της συνιστώμενης οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας διάφορων μικροβιακών ενζύμων καθώς και σε δραματική μείωση της δυναμικής νιτροποίησης. Μετά από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (Lee et al., 2008, Yao et al., 2011) φάνηκε υψηλή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της 3,5-DCA στο έδαφος και της μικροβιακής δραστηριότητας.



Εικόνα 2: χημική δομή της 3,5-DCA

1.5. Κύκλος αζώτου

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία καθώς αποτελεί το 79% της ατμόσφαιρας υπό μορφή N_2 και είναι συστατικό πολλών βιολογικών ενώσεων. 4 είναι οι βασικές διεργασίες μετατροπής του αζώτου από μικροοργανισμούς στο έδαφος: η αζωτοδέσμευση, η αμμωνιοποίηση, η νιτροποίηση και τέλος η απονιτροποίηση



Εικόνα 3: ο κύκλος του αζώτου

Το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) δεσμεύεται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και μετατρέπεται σε αμμωνία (NH_3) (Postgate, 1998). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αζωτοδέσμευση και έτσι εμπλουτίζεται το έδαφος σε πηγές αζώτου που μπορούν να αφομοιωθούν για οργανική ύλη. Στη γεωργία χρησιμοποιούνται λιπάσματα για εμπλουτισμό του εδάφους σε αμμωνία.

Η αμμωνιοποίηση είναι η διαδικασία μετατροπής οργανικών ενώσεων που περιέχουν N σε NH_4^+ από υδρολυτικά ένζυμα. Λαμβάνει χώρα και

σε αντίξοες συνθήκες και η τύχη του παραγόμενου NH_4^+ εξαρτάται από τις ανάγκες των μικροοργανισμών του εδάφους.

Η απονιτροποίηση είναι η διεργασία κατά την οποία τα NO_3^- ανάγονται υπό αναερόβιες συνθήκες προς αέρια NO_2 , NO , N_2O , N_2 . 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).

1.6. Νιτροποίηση

Ονομάζεται η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρικά και νιτρώδη. Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο βήματα: Στο πρώτο στάδιο, που ονομάζεται και στάδιο *νιτρωδοποίησης*, η αμμωνία (NH_3) μετατρέπεται σε νιτρώδη (NO_2^-) με ενδιάμεση παραγωγή υδροξυλαμίνης (NH_2OH) από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA) (αντίδραση 1 και 2) (Hatzenpichler, 2012 Treusch et al., 2005). Στο δεύτερο στάδιο, που ονομάζεται και στάδιο της *νιτριοποίησης*, τα νιτρώδη ιόντα μετατρέπονται σε νιτρικά (NO_3^-) από νιτριοποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrobacter* και *Nitrospira* (αντίδραση 3). Η θεωρία των διακεκριμένων ρόλων μεταξύ των μικροβιακών ομάδων που συμμετέχουν στα διακριτά βήματα της νιτροποίησης καταρρίφθηκε από τους Daims et al. (2015) και Van Kessel et al. (2015) που ανέφεραν για πρώτη φορά την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Nitrospira* (δηλαδή φυλογενετικά χαρακτηρισμένα ως νιτριοποιητικά βακτήρια) που είχαν την ικανότητα να πραγματοποιούν όλα τα βήματα της νιτροποίησης, δηλαδή νιτρωδοποίηση και νιτριοποίηση. Τα συγκεκριμένα βακτήρια ονομάστηκαν *Comammox* (complete ammonia oxidation) και ο οικολογικός τους ρόλος στην νιτροποίηση στο έδαφος βρίσκεται υπό μελέτη.

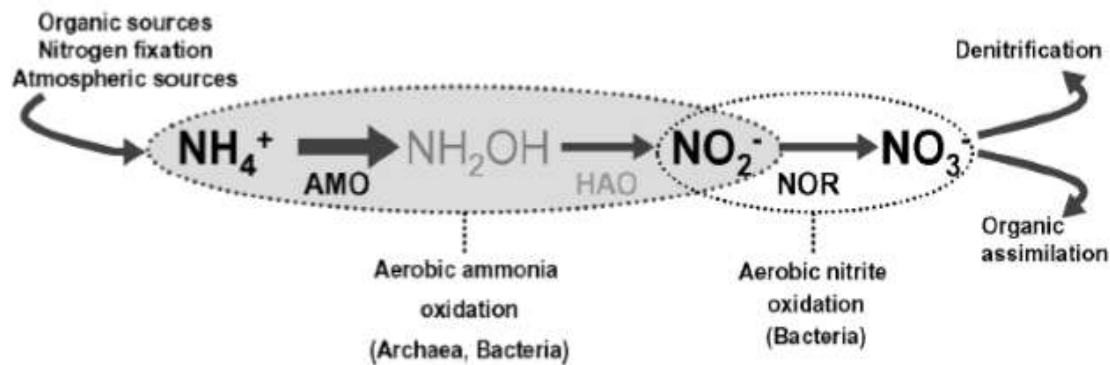
Αντιδράσεις Νιτρωδοποίησης

(1) $\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ Μονοξυγενάση της Αμμωνίας (AMO)

(2) $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ Οξειδοοξειδωτική της Υδροξυλαμίνης (HAO)

Αντιδράσεις Νιτρικοποίησης

(3) $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ Νιτρώδης οξειδοοξειδωτική



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της νιτρωδοποίησης και νιτρικοποίησης

Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί είναι χημειοαυτότροφοι και χρησιμοποιούν το CO_2 ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή τους (Prosser., 2007). Και τα δύο στάδια της νιτροποίησης παράγουν ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την σύνθεση του ATP. Το πρώτο στάδιο της νιτρωδοποίησης, δηλαδή η οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη, έχει μελετηθεί περισσότερο γιατί θεωρείται πως είναι το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης αλλά και συνολικά του κύκλου του αζώτου.

Το ένζυμο κλειδί στο βήμα αυτό είναι η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Η AMO διασπά το O_2 και χρησιμοποιεί το ένα άτομο οξυγόνου για την οξείδωση της αμμωνίας ενώ το άλλο αντιδρά με το H^+ και σχηματίζει ένα μόριο ύδατος. Τα δύο ηλεκτρόνια που απαιτούνται προέρχονται από την οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη. Τα γονίδια *amoA* και *amoB* κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες του ενζύμου AMO ενώ ένα τρίτο γονίδιο *amoC* κωδικοποιεί μια βοηθητική μεμβρανική πρωτεΐνη (Moir et al., 1996 Hermann et al., 2000 Arp et al., 2002). Η νιτροποίηση αποτελεί σημαντική διεργασία στα γεωργικά εδάφη και οικοσυστήματα όπου συνήθως χρησιμοποιούνται κυρίως αμμωνιακά λιπάσματα. Μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά, αυξάνει

την έκπλυση του αζώτου καθώς τα νιτρικά ιόντα λόγω του αρνητικού τους φορτίου εκπλύνονται εύκολα προς τα υπόγεια νερά με αποτέλεσμα την εκτεταμένη νιτρορύπανση αγροτικών περιοχών.

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 μέσω ενδιάμεσης παραγωγής νιτρωδών, μονοξειδίου του αζώτου και υποξειδίου του αζώτου.

1.7. Νιτροδοποιητικά Αρχαία (*Ammonia oxidizing archaia* (AOA))

Ο Leininger και οι συνεργάτες του (2005) ύστερα από μελέτη 15 εδαφών από διαφορετικές κλιματικές ζώνες, επιβεβαίωσε την παρουσία και την αφθονία των AOA στο έδαφος. Επιπλέον παρατήρησε πως η "κυριαρχία" των AOA έναντι των AOB μεγάλωνε όσο αυξανόταν το βάθος του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το pH αποτελεί το κύριο και καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή ποιιά από τις δύο ομάδες μικροοργανισμών, AOA ή AOB, θα κυριαρχήσει στο έδαφος. Έτσι φαίνεται ότι τα AOA αποτελούν τους κυρίαρχους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς σε όξινα εδάφη (Het et al., 2007; Nicol et al., 2008; Hansel et al., 2008). Ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στον πληθυσμό των AOA είναι η θερμοκρασία. Συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην δράση και στον πληθυσμό των AOA σε θερμοκρασία 30°C (Tourna et al., 2008) χωρίς να παρατηρούνται αντίστοιχες επιδράσεις στην ανάπτυξη των AOB οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα AOA ίσως είναι οι κυριότεροι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί στο έδαφος σε υψηλές θερμοκρασίες.

1.8. Επίδραση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και στη νιτροποίηση

Επειδή το έδαφος περιέχει μεγάλο πλήθος οργανισμών και μικροοργανισμών, τα γεωργικά φάρμακα που καταλήγουν στο έδαφος θανατώνουν παράλληλα με τους παθογόνους και ένα μεγάλο εύρος μη παθογόνων και ωφέλιμων στο περιβάλλον οργανισμών (Saeki and

Toyota. ,2004). Πολλά γεωργικά φάρμακα βρέθηκαν να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στη σύσταση και το μέγεθος της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, στη λειτουργία των μικροοργανισμών, την ταχύτητα διάσπασης της οργανικής ουσίας, τους κύκλους του αζώτου, του θείου και του φωσφόρου και τη μικροβιακή σύνθεση της περιοχής των ριζών (Falkowski et. al. ,2008). Όλες οι παραπάνω βιολογικές διεργασίες συμβάλλουν στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και οι δυσμενείς επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων σ' αυτές μπορούν να προκαλέσουν μείωση της παραγωγικότητας του. Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες καταπόνησης και ποιότητας του εδάφους. Ειδικότερα οι Karrouzas et al., (2016) πρότειναν την χρήση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών ως μικροβιακούς δείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Όπως και τα λιπάσματα, έτσι και τα γεωργικά φάρμακα ξεφεύγουν από τα όρια των αγροοικοσυστημάτων που εφαρμόζονται και ρυπαίνουν το φυσικό περιβάλλον. Υπάρχουν διάφοροι οδοί που μπορούν να ακολουθήσουν μετά την εφαρμογή τους. Είσοδος των γεωργικών φαρμάκων στα ύδατα μπορεί να γίνει μέσω έκπλυσης τους από το αγροοικοσύστημα λόγω βροχής ή άρδευσης, είτε μέσω εξάτμισης ή με απ' ευθείας εφαρμογή τους σ' αυτά. Γεωργικά φάρμακα και προϊόντα μεταβολισμού αυτών ανιχνεύονται με υψηλή συχνότητα σε ποτάμια, λίμνες, θάλασσες, υπόγεια νερά, στο νερό της βροχής και το χιόνι και μάλιστα σε μέρη πολύ μακρινά από αυτά στα οποία είχαν χρησιμοποιηθεί.

Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων φτάνουν στον άνθρωπο μέσω της τροφής, του ρυπασμένου νερού ή και του αέρα. Πολύ συχνά ιατρικά περιστατικά (δηλητηριάσεις, εγκαύματα, κ.ά.) οφείλονται στην επαφή με γεωργικά φάρμακα. Υπάρχουν όμως και χρόνιες επιδράσεις στην υγεία. Στις τελευταίες συμπεριλαμβάνονται αλλαγές στους εγκεφαλικούς κύκλους και νευρολογικές ανωμαλίες, επίδραση στη συμπεριφορά, ανωμαλίες στη γονιμότητα, στειρότητα, διαταραχές στον έμμηνο κύκλο, επίδραση στο μυελό των οστών, γεννήσεις παιδιών με

ανωμαλίες, καρκινογένεση, εκφυλισμός της άμυνας του οργανισμού και αλλεργικές ή φλεγμονώδεις αντιδράσεις στους ιστούς.

Σύμφωνα με την ετήσια έρευνα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων σχετικά με τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων σε προϊόντα φυτικής προέλευσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση, βρέθηκε ότι το 2005 περίπου το 4,7% του συνόλου (περίπου 62.500) των δειγμάτων που εξετάστηκαν περιείχαν υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων που υπερέβαιναν τα εθνικά και κοινοτικά επιτρεπόμενα όρια. Επιπλέον, στο 41% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν υπολείμματα των οποίων όμως οι συγκεντρώσεις ήταν μικρότερες των ορίων αυτών. Στην ίδια έρευνα βρέθηκε ότι στην Ελλάδα το 17% των δειγμάτων φρέσκων και κατεψυγμένων φρούτων και λαχανικών που αναλύθηκαν περιείχαν υπολείμματα εντός των επιτρεπόμενων ορίων ενώ το 1,1% περιείχε υπολείμματα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των ορίων αυτών. Αντίστοιχα στα δείγματα ελαιολάδου που εξετάστηκαν το 35,9% περιείχε υπολείμματα που δεν υπερέβαιναν τα όρια και το 1,7% περιείχε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των επιτρεπόμενων (Commission of the European Communities 2007).

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Saeki and Toyota., 2004, Karpouzas et al., 2014). 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) 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 cyprodynil και penconazole προκάλεσαν σημαντικές αλλά αναστρέψιμες μεταβολές στην ποικιλότητα και στην λειτουργία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων.

1.9. Σκοπός της εργασίας

Η ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στα γεωργικά φάρμακα και οι αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει η αναστολή της λειτουργίας των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στον κύκλο του Ν μας ώθησε να μελετήσουμε την επίδραση των προϊόντων του μεταβολισμού του μυκητοκτόνου Iprodione, στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Αφορμή για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης υπήρξαν προηγούμενες μελέτες των Papolla et al., (2014) που όπως αναφέρθηκε παραπάνω έδειξαν ότι η εφαρμογή δόσεων του iprodione x10 ή x100 φορές της συνιστώμενης οδήγησε σε προσωρινή ή μη αντιστρεπτή αναστολή της νιτροποίησης αντίστοιχα, η οποία με βάση στατιστικές προσεγγίσεις αποδόθηκε στον σχηματισμό του μεταβολικού προϊόντος 3,5-DCA στο έδαφος. Έτσι στο ίδιο έδαφος με τους Papolla et al., (2014) εξετάστηκαν οι παρακάτω υποθέσεις (α) ότι η απευθείας εφαρμογή της 3,5-DCA στο έδαφος σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που σχηματίστηκαν από την εφαρμογή των x1, x10, x100 της συνιστώμενης του iprodione (σύμφωνα με τους Papolla et al., 2014) θα οδηγήσει σε σημαντική αναστολή της νιτροποίησης και (β) ότι η προσθήκη στο έδαφος, πριν την εφαρμογή της 3,5-DCA, αμμωνιακής λίπανσης θα οδηγούσε σε αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των ΑΟΑ με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση πιθανών αρνητικών επιδράσεων από την έκθεση στην 3.5-DCA.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Πειραματικό μέρος

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγμα εδάφους που συλλέχθηκε από περιοχή της βόρειας Ιταλίας (45°27'55.69"N, 9°38'20.05"E) και απεστάλει στο εργαστήριο. Το έδαφος αφού παραλήφθηκε κοσκινίστηκε.

Τα χαρακτηριστικά του εδάφους περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Χαρακτηριστικά Εδάφους	Τιμές
pH	7.57
Ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) (mEq 100 g ⁻¹)	1.79
Ολικό άζωτο (N) (%)	0.32
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) (%)***	2.98
TOC/N	9.34

Το έδαφος διαχωρίστηκε σε 2 δείγματα (Α και Β) των 1,920kg και αυτά περεταίρω σε 4 υπό-δείγματα των 480gr. Στα δείγματα της ομάδας Α εφαρμόστηκαν 4,8 ml διαλύματος (NH₄)₂SO₄ συγκέντρωσης 0,6 M ως πηγή αμμωνίας, ενώ στα αντίστοιχα δείγματα της ομάδας Β έγινε εφαρμογή 4,8 ml απιονισμένου νερού δηλαδή χωρίς αμμωνιακή λίπανση. Η υγρασία του εδάφους και στις 2 μεταχειρίσεις προσαρμόστηκε στο 45% της υδατοχωρητικότητας. Με χρήση αναλυτικού προτύπου καθαρότητας 98% προετοιμάστηκε διάλυμα της 3,5-DCA σε μεθανόλη (1000 μg/ml), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή με διαδοχικές αραιώσεις σειράς πρότυπων διαλυμάτων της 3,5-DCA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων της στα δείγματα εδάφους. Στα 3 υπό-δείγματα εδάφους από κάθε ομάδα (Α και Β) έγινε εφαρμογή 3,3 ml μεθανολικών διαλυμάτων 3,5 DCA με συγκέντρωση 100, 1000 και 10000 μg/ml οδηγώντας εν τέλει σε συγκεντρώσεις 3,5-DCA στο έδαφος της τάξης των 0,6, 6 και 60 mg/kg. Τα τελευταία υπό-δείγματα από κάθε ομάδα δέχτηκαν την ίδια

ποσότητα μεθανόλης χωρίς 3,5-DCA και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Συνολικά το παραπάνω πειραματικό πλάνο οδήγησε στην διαμόρφωση 8 διαφορετικών μεταχειρίσεων που παρατίθενται παρακάτω:

A1: 0 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA με N	B1: 0 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA χωρίς N
A2: 0.6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA με N	B2: 0.6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA χωρίς N
A3: 6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA με N	B3: 6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA χωρίς N
A4: 60 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA με N	B4: 60 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA χωρίς N



Εικόνα 6: 4 Δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης πριν την εφαρμογή του 3,5-DCA

Τα οκτώ δείγματα εδάφους που είχαν δεχτεί διαφορετικές μεταχειρίσεις αζωτούχου λίπανσης και 3,5-DCA διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε δείγματα των 23 g, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια με αεροστεγές κλείσιμο και ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι στους 25°C. Αμέσως μετά την εφαρμογή της 3,5 DCA (0

ημέρες) και στις 3, 7, 14, 28, 56 και 70 ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε μια από τις οκτώ μεταχειρίσεις απομακρύνονταν από τον επωαστικό θάλαμο. Ποσότητες των 5gr χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος, 2gr για εκχύλιση DNA και προσδιορισμό της αφθονίας του *amoA* γονιδίου των AOA και AOB με q-PCR.

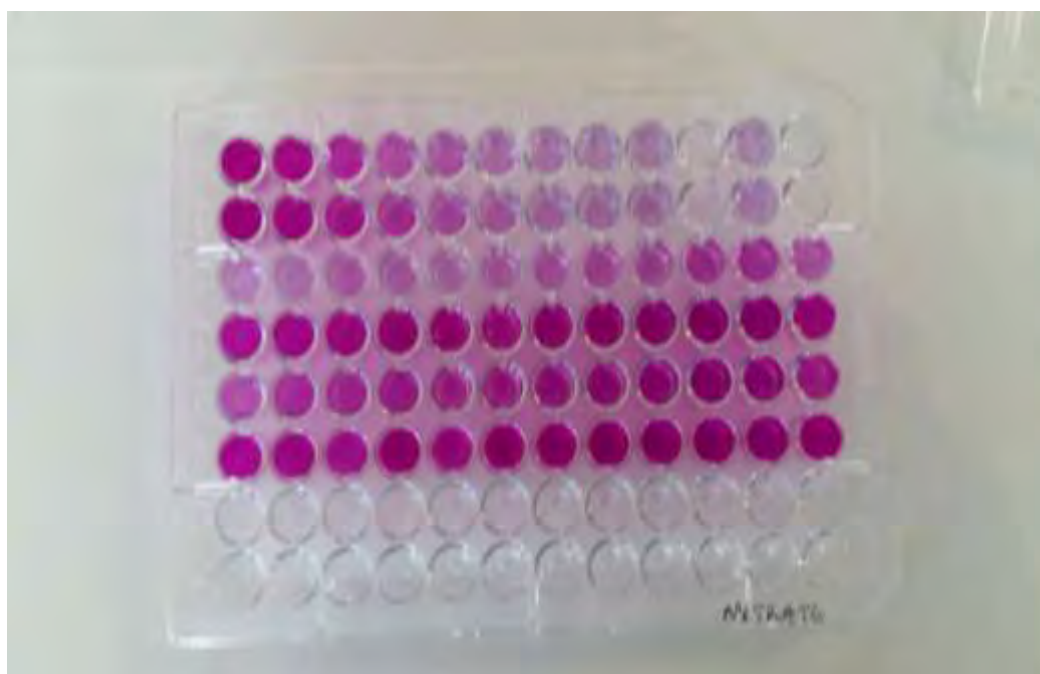


Εικόνα 7-8: Τα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση εμφανίζονται πάνω και τα δείγματα που δεν δέχθηκαν αμμωνιακή λίπανση εμφανίζονται κάτω όπως τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 25°C



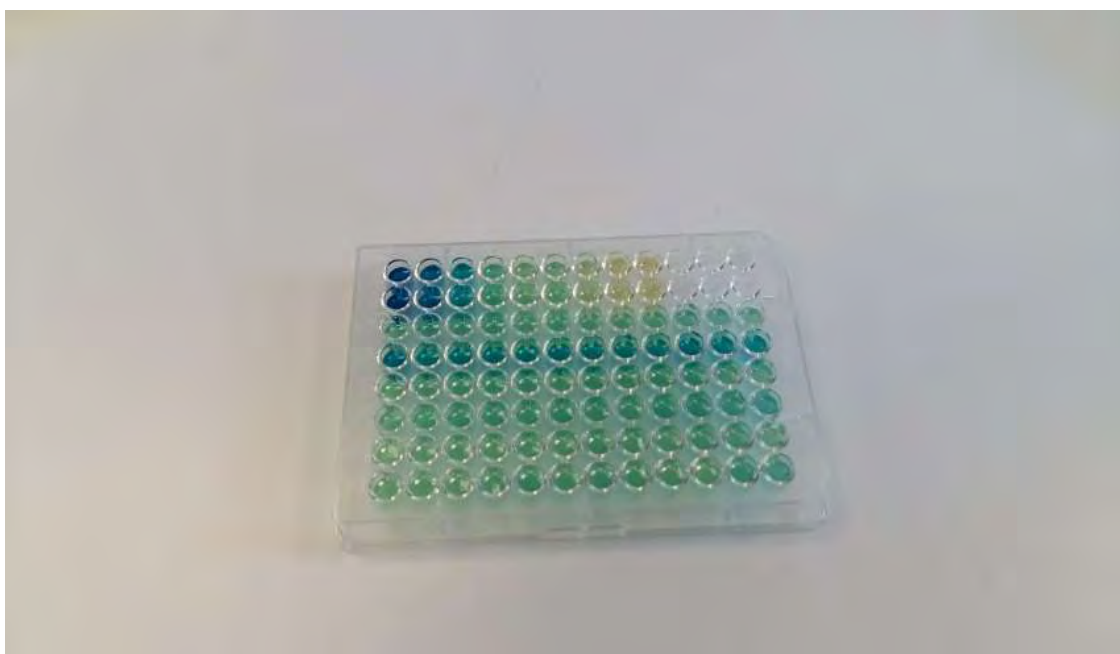
2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων αμμωνιακών (NH_3) – νιτρικών (NO_2^- , NO_3^-) ιόντων στο έδαφος

Για τον προσδιορισμό των νιτρικών και νιτρωδών ιόντων στο έδαφος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χλωριούχου βαναδίου (VCl_3) των Waner et al., (2009). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή τα νιτρώδη (NO_2) οξειδώνονται σε νιτρικά (NO_3) με την προσθήκη VCl_3 . Στην συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Griess και υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους φωτομετρικά στα 540 nm με την χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης. Για την κατασκευή της τελευταίας προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα NO_3^- συγκεντρώσεων από 0.02 ως 5 mg N- $\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$ με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος KNO_3 1000 mg N L^{-1} . Σε μικροπηγάδια τιτλοδότησης προστέθηκαν 100 μl από κάθε δείγμα - εκχύλισμα, 100 μl χλωριούχου βαναδίου (VCl_3) και 50 μl από τα αντιδραστήρια Griess 1 και 2. Έπειτα τοποθετήθηκαν τα μικροπηγάδια τιτλοδότησης στους 37°C. για μία ώρα και πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε φωτόμετρο στα 540 nm.



Εικόνα 9: Μικροπλάκα με 96 βοθρία που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό νιτρικών σε δείγματα εδάφους

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αμμωνιακών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Kandeler et al., (1988). Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στο πράσινο χρώμα που παράγεται μετά την οξείδωση της αμμωνίας από το sodium nitroprusside dihydrate, παρουσία φαινολικών ενώσεων (sodium salicylate) σε αλκαλικό περιβάλλον (0,3M NaOH). Έτσι αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,0195 ως 5 mg N L⁻¹ για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, από διάλυμα KCL 1M. Σε μικροπηγάδια τιτλοδότησης προστέθηκαν 600 μl από τα πρότυπα διαλύματα και από τα δείγματα – εκχυλίσματα. Επιπλέον, προστέθηκαν 300 μl διαλύματος χρώσης και 120 μl διαλύματος οξείδωσης (dichloroisocyanuric acid sodium salt dehydrate). Τέλος τα μικροπηγάδια τιτλοδότησης τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά στα 300 rpm και πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε φωτόμετρο στα 660 nm.



Εικόνα 10: Μικροπλάκα με 96 βοθρία που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αμμωνιακών σε δείγματα εδάφους

2.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των ΑΟΑ σε δείγματα εδάφους

Για τον προσδιορισμό της αφθονίας των ΑΟΑ στο έδαφος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια για την απομόνωση, ηλεκτροφόρηση και ποσοτικοποίηση του DNA εδάφους :

DNeasy Powersoil Isolation Kit

Διάλυμα TAE X1

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 1%

Μπλε της βρωμοφαινόλης 6x

NEW ENGLAND Biolabs Inc. 2-Log DNA Ladder (0,1 - 10.0 kb)

QUBIT 2.0 Fluorometer της Invitrogen

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Για την εξαγωγή του DNA από το έδαφος χρησιμοποιήθηκαν 0,25g και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή του εμπορικού kit DNeasy Powersoil Isolation Kit της Qiagen. Το DNA του εδάφους ελέγχθηκε ως προς την ποιότητα του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% και ακολούθησε ποσοτικοποίηση με την μέθοδο του φθορισμομέτρου Qubit.

Για την Real Time-PCR:

Για την αφθονία των ΑΟΑ πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου όπου ενισχύθηκε η υπομονάδα A του γονιδίου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας *amoA*. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου *amoA* από διαδοχικές αραιώσεις 1:10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης από 10^7 έως 10^0 . Στους Πίνακες 1 και 2 αναφέρονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες.

Πίνακας 1. Λίστα με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αφθονίας του γονιδίου *amoA* μέσω PCR πραγματικού χρόνου

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
ΚΑΡΑ SYBR DNA Polymerase	5	1x
Εμπόσθιος εκκινητής (20pmol/μl) AOA: AmoA1F	0.2	0.4 μM
Οπίσθιος εκκινητής (20pmol/μl) AOA: 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	

Πίνακας 2. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην q-PCR για τον προσδιορισμό της αφθονίας των AOA

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	

2.4. Προσδιορισμός των υπολειμμάτων της 3,5 DCA στο έδαφος

Για την εκχύλιση των υπολειμμάτων του 3,5-DCA στο έδαφος ζυγίστηκαν 5 g εδάφους 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.

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.

2.5. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα ανάλυσης νιτρικών και αμμωνιακών καθώς και τα δεδομένα αφθονίας των AOB από τις ομάδες δειγμάτων (A) και (B) αναλύθηκαν ξεχωριστά το καθένα με ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (two-way-ANOVA). Σε περιπτώσεις όπου καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών (χρόνος και μεταχείριση) ακολούθησε περαιτέρω στατιστική ανάλυση παραλλακτικότητας μίας μεταβλητής (one-way-ANOVA) ώστε να διαπιστωθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο.

Τα δεδομένα αποδόμησης του 3,5-DCA στο έδαφος χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παραμέτρων κινητικής της αποδόμησης της 3,5-DCA 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 τα Hockey Stick (HS), DFOP και FOMC. Η ακρίβεια προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής εκτιμήθηκε μέσω του στατιστικού χ^2 (<15%).

3. Αποτελέσματα

3.1. Αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος

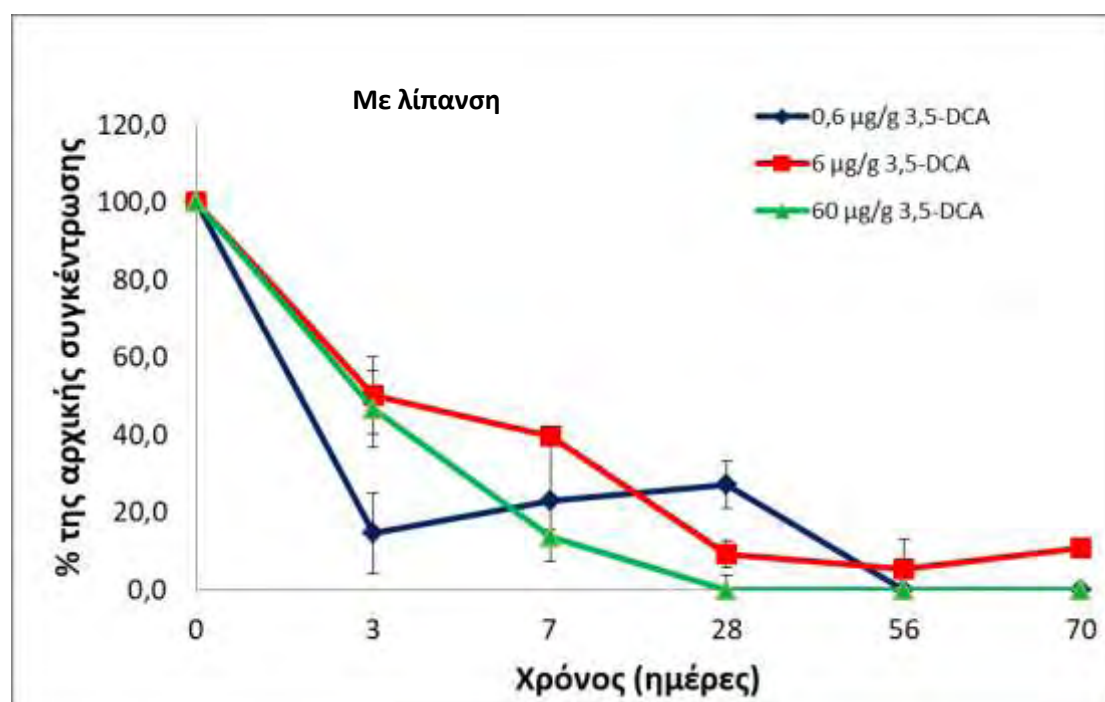
Το πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 1 και 2**. Το πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση και εφαρμογή της δόσης 0,6 μg/g περιγράφηκε καλύτερα από το μοντέλο κινητικής Hockey–Stick (HS), η δόση 6 μg/g από το μοντέλο 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 βάση τα παραπάνω υπολογίστηκαν οι τιμές

DT₅₀ για την 3,5-DCA σε όλες τις μεταχειρίσεις και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

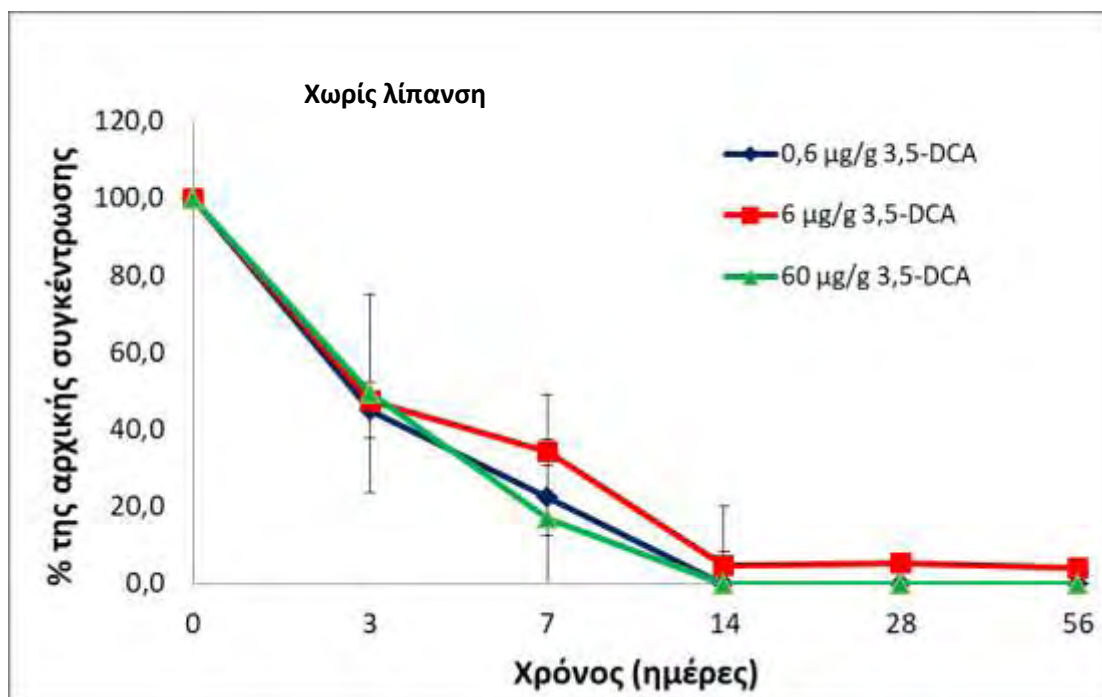
Πίνακας 3. Οι τιμές DT₅₀ (ημέρες) του 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις.

Μεταχειρίσεις	Επίπεδα δόσης 3,5 DCA		
	0,6 μg/g	6 μg/g	60 μg/g
Ομάδα Α	1,1	3,5	2,6
Ομάδα Β	2,9	3,8	2,7

Γενικότερα η 3,5-DCA παρουσίασε χαμηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος, με τιμές DT₅₀ που κυμαίνονταν από 1,1 ως 3,8 ημέρες. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στον χρόνο αποδόμησης ανάμεσα στις μεταχειρίσεις με αμμωνία και χωρίς, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αποδόμηση της 3,5-DCA ανάλογα με την δόση εφαρμογής της.



Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση των διαφορετικών δόσεων εφαρμογής 3,5-DCA στα εδάφη που δέχτηκαν αρχικά αμμωνιακή λίπανση . Κάθε μέτρηση αποτελεί το μέσο όρο 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση



Διάγραμμα 2. Η αποδόμηση των διαφορετικών δόσεων εφαρμογής 3,5-DCA στα εδάφη χωρίς αμμωνιακή λίπανση . Κάθε μέτρηση αποτελεί το μέσο όρο 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

3.2. Επίδραση του 3,5-DCA στη συγκέντρωση νιτρικών στο έδαφος

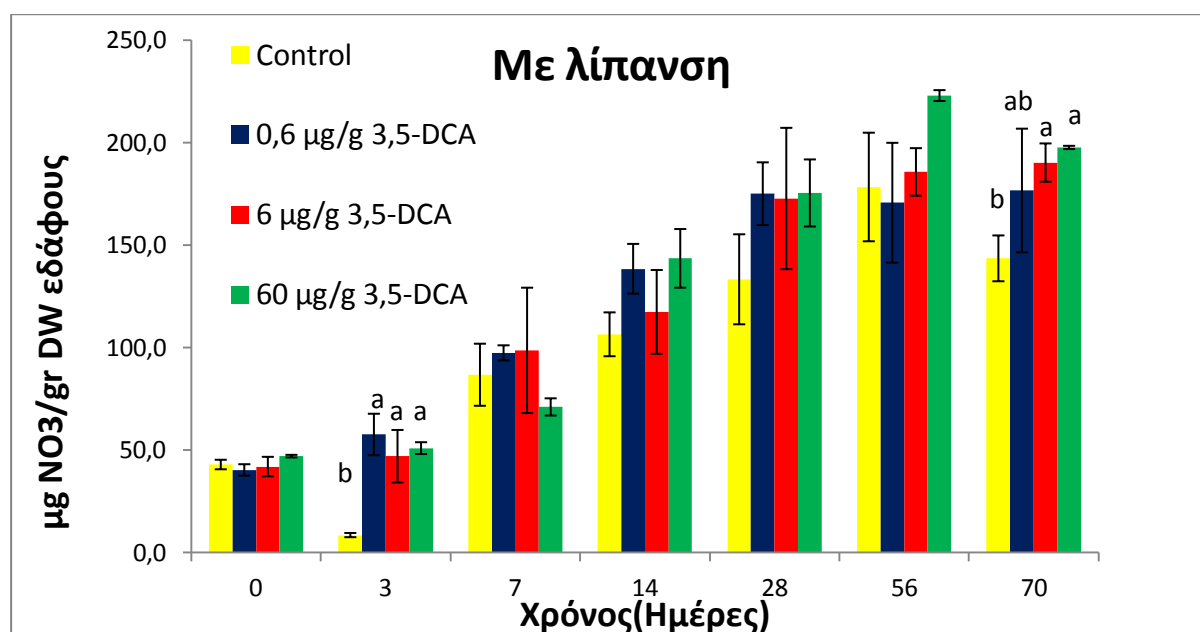
Στα **Διαγράμματα 3** και **4** παρουσιάζεται η χρονική διακύμανση της συγκέντρωσης νιτρικών υπό την επίδραση διαφορετικών δόσεων 3,5 DCA σε δείγματα στα οποία έγινε προηγουμένως προσθήκη (α) ή όχι αμμωνιακών (β). Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (βλ. **Πίνακα 4**) έδειξε ότι και στις δύο περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των νιτρικών ως προς τις δόσεις ($p < 0.05$) αλλά παρατηρήθηκαν ως προς τον χρόνο ($p < 0.05$) και ως προς την αλληλεπίδραση μεταξύ τους ($p > 0.05$). Ειδικότερα στα δείγματα που δέχθηκαν αμμωνιακή λίπανση παρατηρήθηκε μία σταθερή αύξηση της συγκεντρώσεως νιτρικών ενώ

σε αυτά που δεν είχε γίνει λίπανση πέφτει από το χρόνο T0 προς τον T3 και από εκεί και ως το τέλος παρουσιάζει την αύξηση.

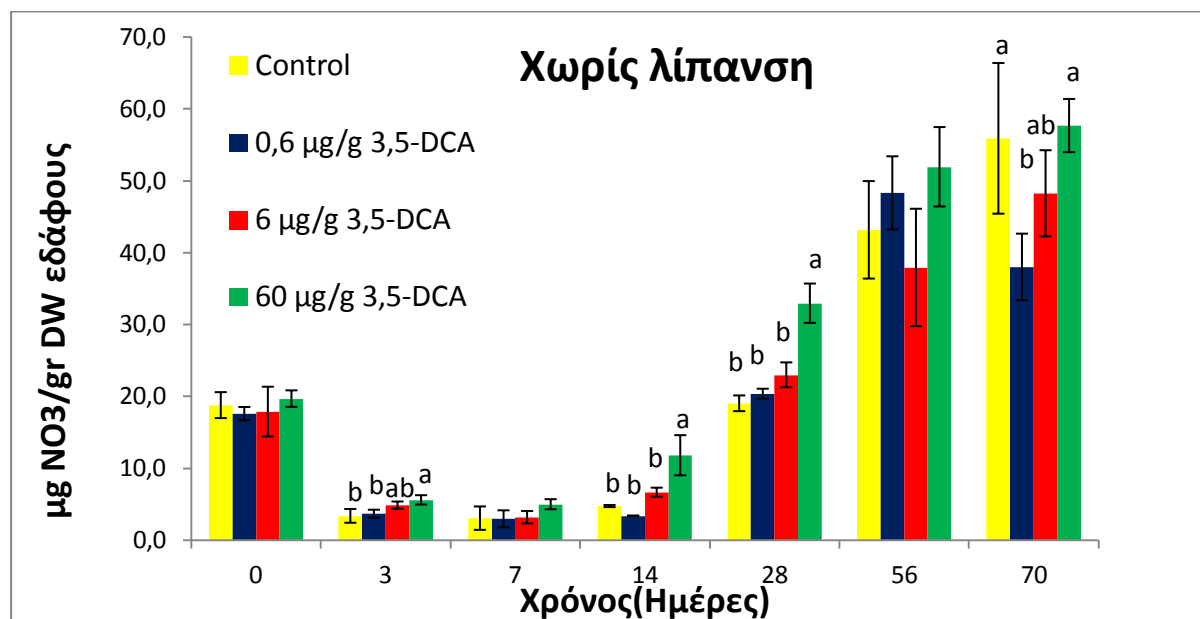
Γενικότερα και στις δύο ομάδες δειγμάτων (με ή χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση) παρατηρήθηκε μια σημαντική επίδραση του χρόνου, ως κύρια μεταβλητή, στις συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος. Έτσι ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης νιτρικών με τον χρόνο που καταδεικνύει ότι η νιτροποίηση είναι λειτουργική στο έδαφος. Από την άλλη μεριά δεν καταγράφηκε σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής του 3,5-DCA ως κύρια μεταβλητή, στις συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος. Τέλος παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο μεταβλητών χωρίς όμως αυτές να ακολουθούν κάποιο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα δοκιμασίας Two – Way Anova T0-T70

	Με αμμωνιακή λίπανση	Χωρίς αμμωνιακή λίπανση
Χρόνος	>0,001	>0,001
Δόση	>0,001	>0,001
Χρόνος * Δόση	0,004	>0,001



Διάγραμμα 3. Η διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα δείγματα εδάφους με πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτα ηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, ράβδοι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%)



Διάγραμμα 4. Η διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα δείγματα εδάφους χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, ράβδοι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%)

3.3. Επίδραση του 3,5-DCA στην συγκέντρωση αμμωνιακών στο έδαφος

Στα **Διαγράμματα 5** και **6** παρουσιάζεται η χρονική διακύμανση της συγκέντρωσης αμμωνίας υπό την επίδραση διαφορετικών δόσεων 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν ή όχι πρότερη αμμωνιακή λίπανση. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (βλ. **Πίνακα 5**)

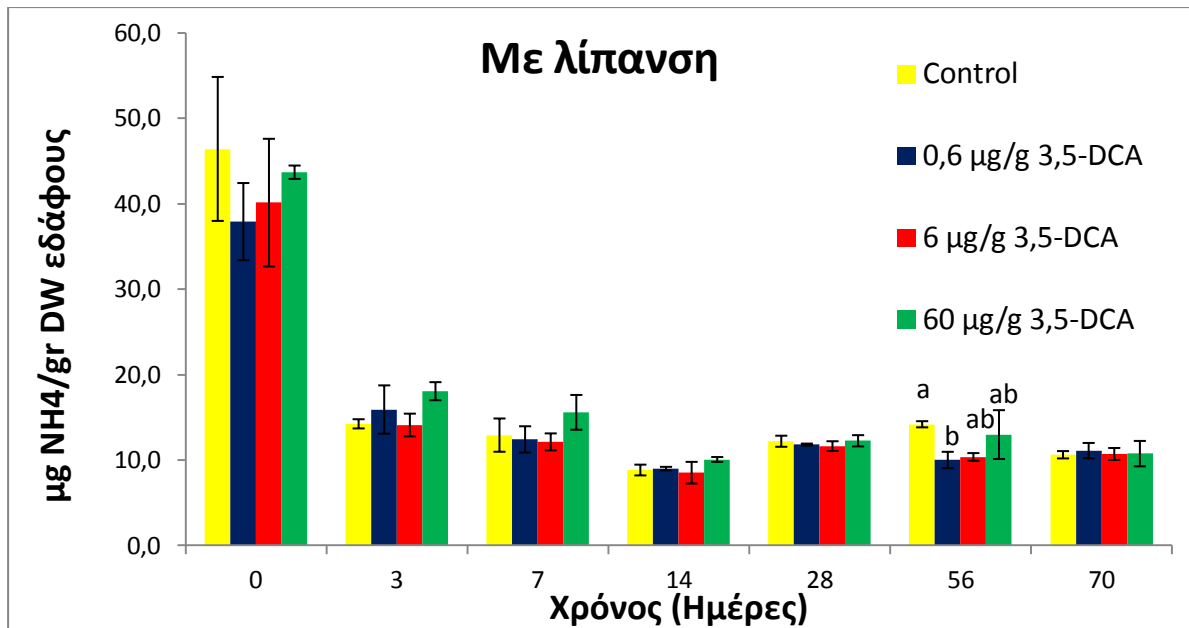
έδειξε ότι και στις δυο περιπτώσεις δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της αμμωνίας ως προς τη δόση εφαρμογής ($p < 0,05$) αλλά υπήρχαν ως προς το χρόνο ($p < 0,05$) και την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p < 0,05$).

Ειδικότερα στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών από τις 0 ημέρες και μετά κάτι που καταδεικνύει την λειτουργικότητα της νιτροποίησης στο συγκεκριμένο έδαφος ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής του 3,5-DCA (Διάγραμμα 5). Από την άλλη μεριά στα δείγματα εδάφους της ομάδας Β (χωρίς αμμωνιακή λίπανση) παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση των αμμωνιακών σε όλες τις μεταχειρίσεις ως τις 14 μέρες που ακολουθήθηκε από μια αύξηση των αμμωνιακών σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 28 ημέρες με τα επίπεδα τους να διατηρούνται στα συγκεκριμένα επίπεδα μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος (Διάγραμμα 6).

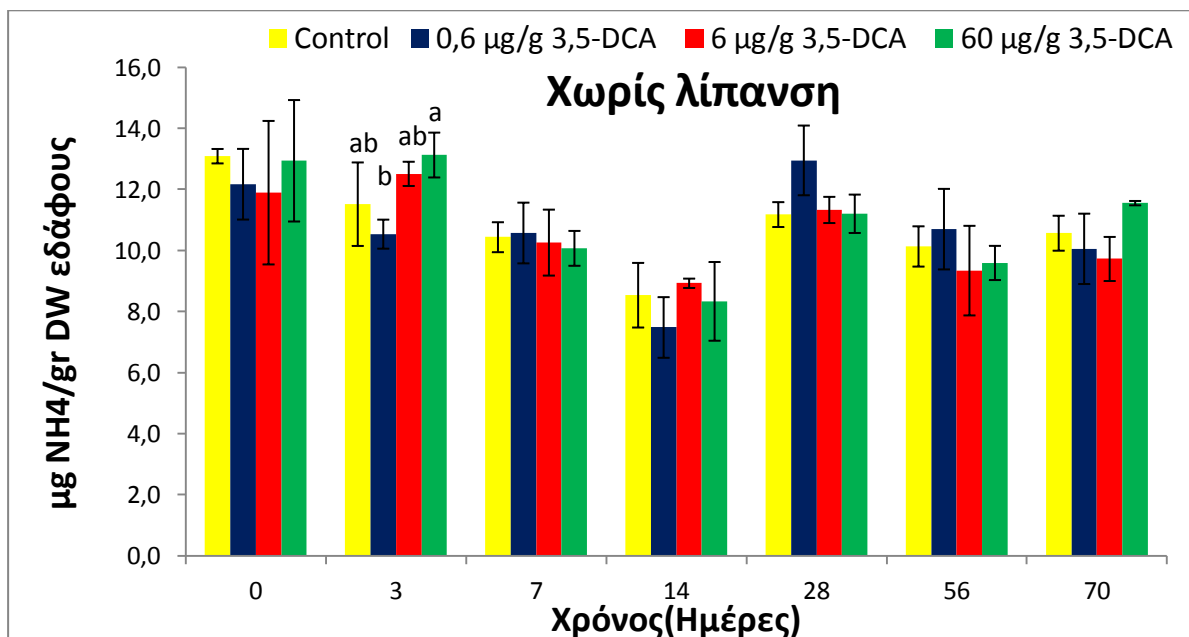
Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μεταβλητών και στις δύο ομάδες δειγμάτων (Α και Β), χωρίς όμως αυτές οι αλληλεπιδράσεις να ακολουθούν κάποιο ξεκάθαρο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο στο χρόνο.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα δοκιμασίας Two – Way Anova T0-T70

	Με αμμωνιακή λίπανση	Χωρίς αμμωνιακή λίπανση
Χρόνος	>0,001	>0,001
Δόση	0,011	0,588
Χρόνος * Δόση	0,309	0,063



Διάγραμμα 5. Η διακύμανση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών στα δείγματα εδάφους με πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 μg/g 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, ράβδοι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%)



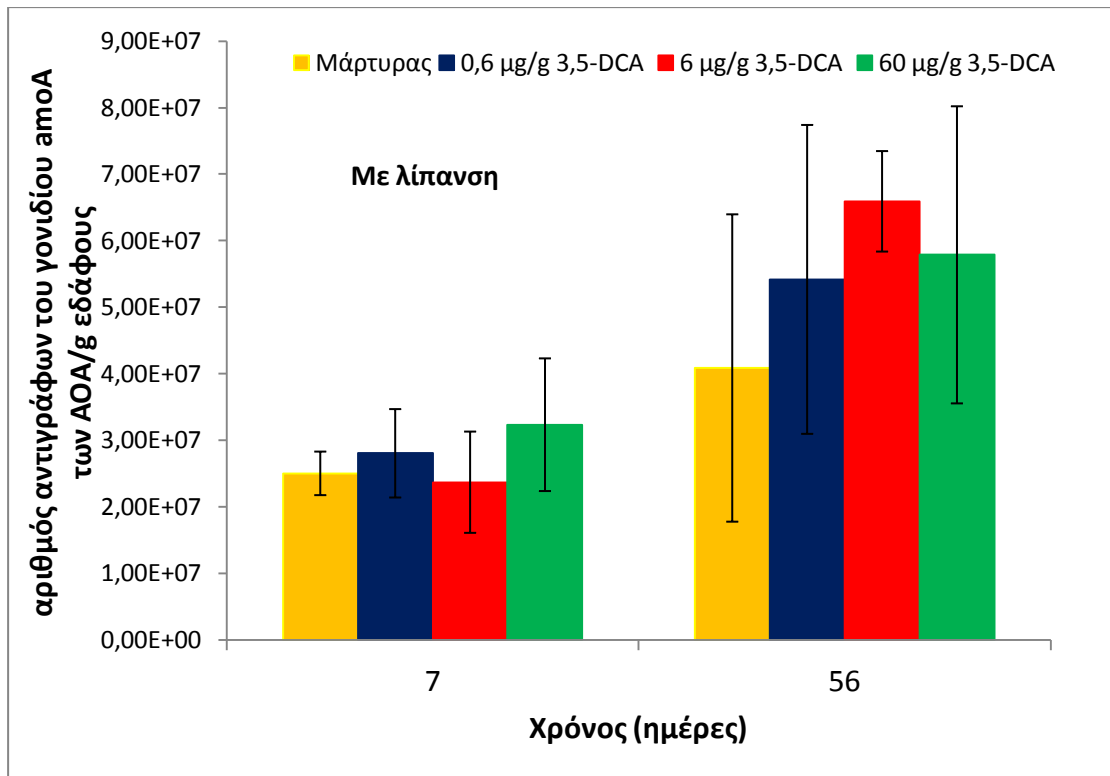
Διάγραμμα 6. Η διακύμανση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών στα δείγματα εδάφους χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 μg/g 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.

3.4. Αξιολόγηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην αφθονία των ΑΟΑ

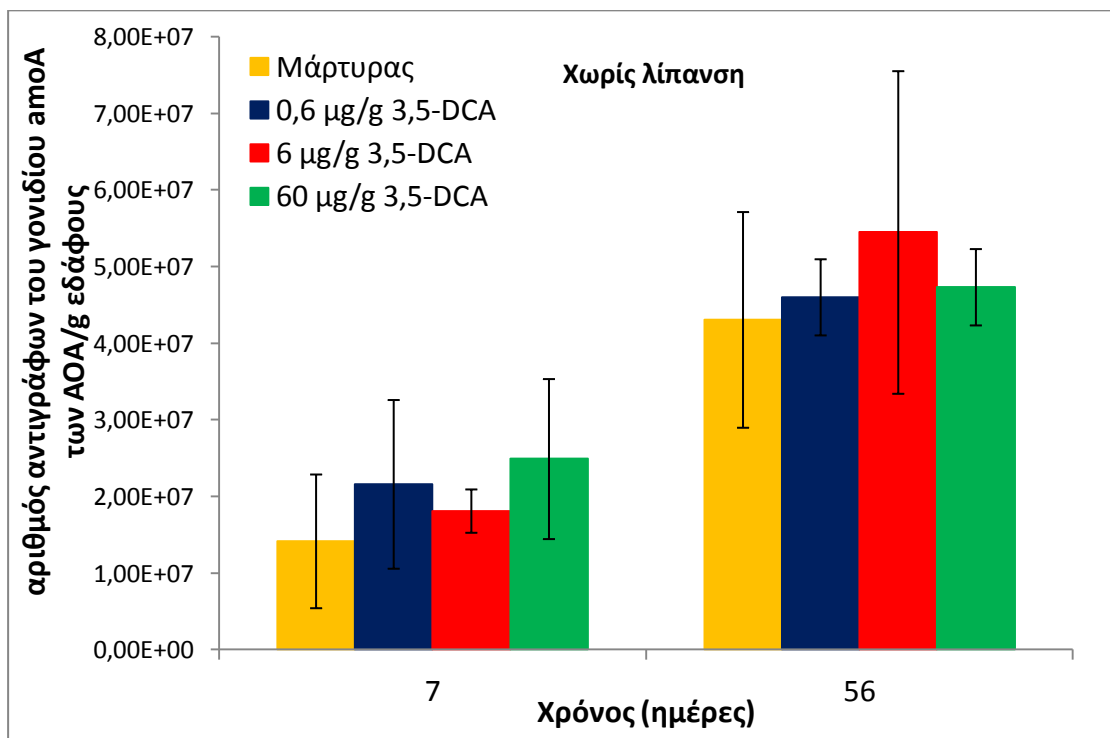
Στα **Διαγράμματα 7** και **8** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της αφθονίας των ΑΟΑ στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA και στα οποία είχε ή δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 6** και στις δύο ομάδες δειγμάτων, ο χρόνος ως κύρια μεταβλητή επηρέασε σημαντικά την αφθονία των ΑΟΑ ενώ δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής του 3,5-DCA αλλά ούτε και σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου και δόσης εφαρμογής στην αφθονία των ΑΟΑ. Έτσι και στις δύο ομάδες δειγμάτων και ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση, σχεδόν διπλασιασμός, της αφθονίας των ΑΟΑ με το χρόνο.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δοκιμασίας Two-Way Anova T7-T56

	Με αμμωνιακή λίπανση	Χωρίς αμμωνιακή λίπανση
Χρόνος	>0,001	>0,001
Δόση	0,492	0,617
Χρόνος * Δόση	0,593	0,717



Διάγραμμα 7. Η διακύμανση της αφθονίας των ΑΟΑ στα δείγματα εδάφους με πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 µg/g 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 8. Η διακύμανση της αφθονίας των ΑΟΑ στα δείγματα εδάφους χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,6, 6 και 60 μg/g 3,5-DCA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο, ράβδοι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%).

4. Συζήτηση και συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση του 3,5-DCA, που αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του μυκητοκτόνου Iprodione, στη λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών αρχαίων. Μελετήθηκε η απόκριση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στην έκθεση στο 3,5-DCA καθώς αποτελούν ιδανικούς βιοδείκτες τοξικότητας αβιοτικών καταπονήσεων και δη γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Wessen and Hallin 2011, Pereira Silva et al. 2013).

Η επιλογή του 3,5-DCA βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Wang et al. 2004; Minambres et al., 2010, Verdenelli et al. 2012). που έδειξαν ότι η εφαρμογή του στο έδαφος οδήγησε σε δραματική μείωση της νιτροποίησης αλλά και της δραστηριότητας άλλων μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος που παίζουν ρόλο στον κύκλο του αζώτου (όπως της χιτινάσης ή της φωσφοδιεστεράσης) αφού μεταβολίστηκε σε 3,5-DCA (Parrola et al. 2014). Στο πείραμά μας στα εδάφη που μελετήθηκαν είχε προηγηθεί η όχι 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.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ρυθμού της νιτροποίησης όπως φαίνεται από την σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα συγκεκριμένα εδάφη και την αντίστοιχη μείωση των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών. Το συγκεκριμένο πρότυπο διακύμανσης των συγκεντρώσεων αμμωνιακών

και νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση δείχνει ότι η διαδικασία της νιτροποίησης είναι απολύτως λειτουργική και οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν αποτελεσματικά να μετατρέψουν την προστιθέμενη περίσσεια αμμωνίας σε νιτρικά.

Η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης στο έδαφος ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι 3,5-DCA οδήγησε σε αύξηση της αφθονίας των νιτροδοποιητικών αρχαίων του εδάφους. Τα AOA έχουν ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια με την NH_3 και η υψηλή συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει αναστολή, κάτι που δεν παρατηρείται εδώ (Leiniger et al., 2006). Ο βασικότερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσει την επίδραση του 3,5-DCA στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Παράλληλα μελετήθηκε και η αποδόμηση του 3,5-DCA στα διάφορα επίπεδα εφαρμογής ώστε να έχουμε μια εκτίμηση της διάρκειας της έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας στην παραπάνω ουσία.

Γενικότερα σε όλα τα επίπεδα δόσης παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος με τιμές DT_{50} από 1,1 ως 3,8 ημέρες. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το 3,5-DCA εμφανίζει τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Rochkind et al. 1985). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του 3,5-DCA, στην λειτουργία (με βάση τις συγκεντρώσεις νιτρικών/αμμωνιακών στο έδαφος) και στην αφθονία των AOA. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν βρίσκονται σε συμφωνία με τους Pardo et al. (2014) όπου με ανάλογο πειραματικό σχεδιασμό κατέγραψαν μια ξεκάθαρη θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης 3,5-DCA στο έδαφος και αναστολής της δυναμικής νιτροποίησης αλλά και άλλων μικροβιακών ενζύμων. Η διαφορά στα ευρήματα της παρούσας εργασίας και αυτής των Pardo et al., (2014) θα μπορούσε να αποδοθεί στον περιορισμένο ρόλο των AOA στην νιτροποίηση στο συγκεκριμένο έδαφος, με τα AOB να έχουν πιο σημαντικό ρόλο. Η παραπάνω υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε από παράλληλες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της πτυχιακής διατριβής της κ. Καρυπίδου όπου δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιδράσεις του 3,5-DCA στην αφθονία των AOB. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια παροδική

μείωση της δυνητικής νιτροποίησης από την εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA που βρίσκεται σε μερική συμφωνία με τους Parola et al., (2014). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δικών μας ευρημάτων και αυτών των Parolla et al., (2014) είναι πιθανό να οφείλεται στην υψηλή εμμόνη της 3,5-DCA στην μελέτη αυτών σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου η διχλωροανιλίνη αποδομήθηκε ταχύτατα σε όλες τις δόσεις εφαρμογής. Προηγούμενες μελέτες με άλλες δραστικές ουσίες όπως τα isoproturon και tebuconazole έδειξαν μια δόσοεξαρτώμενη 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).

Συνολικά από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν προέκυψε κάποια σημαντική επίδραση της 3,5-DCA ακόμη και σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στην αφθονία των νιτροδοποιητικών αρχαίων. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην μελέτη των επιδράσεων σε επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ ώστε να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της 3,5-DCA χρησιμοποιώντας ένα πιο ευαίσθητο δείκτη της μικροβιακής λειτουργίας (Papadopoulou et al., 2016).

Βιβλιογραφία

Athiel P., Mercadier C., Vega D., Bastide J., Davet P., Brunel B., Marel JC. Sept, 1995. Degradation of Iprodione by a Soil Arthrobacter-Like Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3216–3220.

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

Pappola A., Ferrari A., Pertile G., Puglisi E., Suciú 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

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., Maranon, 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

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., Vasileiadis, 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-dichloroaniline. *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., & Karpouzias, 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
- 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, 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.

Leiniger S, Urich T, Schloter 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).

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. (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. Bohannon , 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>

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) Biopesticides: 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.

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>

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>