



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Ελένη Λαμπρονίκου

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

*In vitro μελέτη της επίδρασης των παρεμποδιστών
νιτροποίησης DCD, Nitrapyrin και DMPP σε
νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία*

*In vitro study of the activity of the nitrification
inhibitors DCD, Nitrapyrin and DMPP on ammonia
oxidizing bacteria and archaea*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Τσίκου Ντανιέλα (μέλος) Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, TBB, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους με τον τρόπο τους μου συμπαραστάθηκαν στην πραγματοποίηση και συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ξεκινώντας από τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, τον οποίο οφείλω πρώτα να ευχαριστήσω αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Τον ευχαριστώ επίσης, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την υλοποίηση του πειραματικού τμήματος της εργασίας μου, αλλά και κατά την συγγραφή αυτής.

Είναι σημαντικό επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την συμμετοχή της στην προσπάθεια μου αυτή και τον χρόνο που αφιέρωσε ως μέλος της επιτροπής αξιολόγησης της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω να απευθύνω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Παπαδοπούλου Ευαγγελία για την εξαιρετική συνεργασία μας, την συνεχή της στήριξη και ενθάρρυνση καθώς και την αμέριστη βοήθεια της σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας αλλά και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία μας, τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε εκτός αλλά και εντός του χώρου του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου, τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την κάθε μορφή στήριξης που απλόχερα μου προσέφεραν σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νιτροποίηση αποτελεί ρυθμο-καθοριστικό βήμα στο κύκλο του αζώτου και κατέχει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία των αγροτικών οικοσυστημάτων. Πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια, με το πρώτο να περιλαμβάνει τη μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα (νιτρωδοποίηση) και το δεύτερο τη μετατροπή των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα. Κύριοι συμμετέχοντες στο πρώτο στάδιο της νιτρωδοποίησης είναι τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia-Oxidizing Bacteria: AOB) και τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea: AOA). Το δεύτερο στάδιο της νιτρικοποίησης πραγματοποιείται από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι μια ομάδα μικροοργανισμών του γένους *Nitrospira* sp. έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί και τα δύο στάδια της νιτροποίησης και για το λόγο αυτό ονομάστηκαν Comammox (Complete ammonia-oxidizers).

Στις μέρες μας η παραγωγικότητα των καλλιεργειών βασίζεται κυρίως στις εισροές αζώτου υπό την μορφή χημικών λιπασμάτων. Ωστόσο, οι διαδικασίες της νιτροποίησης και της ακόλουθης απονιτροποίησης επιφέρουν τεράστιο περιβαλλοντικό και οικονομικό κόστος, καθώς είναι υπεύθυνες για σημαντικές απώλειες αζώτου από τα γεωργικά οικοσυστήματα. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι βελτιστοποιημένες τεχνικές διαχείρισης του αζώτου επικεντρώνονται στη μείωση της έκπλυσης των παραγόμενων NO_3^- αλλά και των εκπομπών αέριων οξειδίων του αζώτου (N_xO). Μία από αυτές τις τεχνικές είναι η ενσωμάτωση συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης στα αζωτούχα λιπάσματα με σκοπό την επιβράδυνση της μετατροπής του NH_4^+ σε NO_2^- . Η καθυστέρηση αυτή του πρώτου σταδίου της νιτρωδοποίησης, συμβάλει στη διατήρηση του NH_4^+ στο έδαφος για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα του στα φυτά και μειώνοντας έτσι την παραγωγή νιτρικών ιόντων (NO_3^-). Η πλειονότητα των παρεμποδιστών της νιτροποίησης στοχεύει στην αναστολή του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της αντίδρασης της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στο στάδιο οξείδωσης της αμμωνίας (AOB, AOA, Comammox) και χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης σε περιβαλλοντικά δείγματα για τη μελέτη της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η επιλογή του κατάλληλου παρεμποδιστή είναι αρκετά περίπλοκη και απαιτεί την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης αλλά και τη γνώση των κυτταρικών και μεταβολικών διαφορών των μικροοργανισμών στόχων. Οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των επιδράσεων των παρεμποδιστών νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς σε πειράματα εδάφους που δεν αποδίδουν ξεκάθαρη εικόνα του φάσματος δράσης των παρεμποδιστών νιτροποίησης. Αντίθετα είναι περιορισμένος ο αριθμός *in vitro* δοκιμών της δράσης των παρεμποδιστών νιτροποίησης έναντι αντιπροσωπευτικών μελών των AOA και AOB που κατέχουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο στη νιτροποίηση.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η *in vitro* αξιολόγηση της επίδρασης τριών

γνωστών και ευρέως διαδεδομένων παρεμποδιστών της νιτροποίησης, DCD, Nitrapyrin, DMPP, σε υγρές καλλιέργειες αντιπροσωπευτικών εδαφογενών νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB) (*Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*) και νιτρωδοποιητικών αρχαίων (AOA) (*Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της παραγωγής και της συσσώρευσης των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες των AOB και AOA, καθώς επίσης και της αφθονίας των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των εξεταζόμενων στελεχών ύστερα από την έκθεση τους σε εύρος συγκεντρώσεων των εν λόγω παρεμποδιστών νιτροποίησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών το Nitrapyrin παρουσίασε ισχυρότερη δράση έναντι των DCD και DMPP, αναστέλλοντας σημαντικά την αύξηση και τη λειτουργία των στελεχών AOB και AOA σε συγκεντρώσεις $\geq 5\mu\text{M}$. Αντίθετα το DCD ανέστειλε σημαντικά την αύξηση και τη λειτουργία των AOB μόνο στις υψηλότερες συγκεντρώσεις εφαρμογής ($\geq 250\mu\text{M}$), ενώ τα AOA επέδειξαν μεγαλύτερη αντοχή με την αναστολή να παρατηρείται σε συγκεντρώσεις εφαρμογής $\geq 2,5\text{mM}$ στην περίπτωση του *Ca. N. franklandus* και $\geq 1\text{mM}$ στην περίπτωση του *Ca. N. sinensis*). Τέλος, το DMPP προκάλεσε πλήρη αναστολή της νιτρωδοποίησης στα στελέχη AOB που αξιολογήθηκαν, *N. europaea* και *N. multiformis*, σε συγκεντρώσεις $\geq 10\mu\text{M}$ και $\geq 1\mu\text{M}$, αντίστοιχα, ενώ στα στελέχη των AOA ανάλογη αναστολή της νιτρωδοποίησης επιτεύχθηκε σε 5 mM για το *Ca. N. franklandus* και $\geq 1\text{mM}$ για το *Ca. N. sinensis*).

Συμπερασματικά, τα στελέχη των AOA που μελετήθηκαν παρουσίασαν χαμηλότερη ευαισθησία στους παρεμποδιστές DCD και DMPP, έναντι των στελεχών AOB. Επιπρόσθετα, μεταξύ των δύο στελεχών AOB που μελετήθηκαν στις *in vitro* δοκιμές, το *N. multiformis* εμφάνισε υψηλότερη ευαισθησία σε όλους τους παρεμποδιστές σε σχέση με το *N. europaea*. Παρόμοια διαφορά ευαισθησίας εντοπίστηκε και στα AOA με το στέλεχος *Ca. N. sinensis* να εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με το *Ca. N. franklandus*. Τέλος, ισχυρότερος παρεμποδιστής έναντι και των δύο ομάδων νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών που μελετήθηκαν αναδείχθηκε το Nitrapyrin, με το DMPP και το DCD να έπονται της σειράς.

Λέξεις-Κλειδιά: νιτροποίηση, νιτρωδοποιητικά βακτήρια, νιτρωδοποιητικά αρχαία, παρεμποδιστές νιτροποίησης, DCD, Nitrapyrin, DMPP.

ABSTRACT

Nitrification is a decisive step in the nitrogen cycle and holds a major role in agro-ecosystems. It is carried out in two distinct stages. The first phase includes the conversion of ammonia into nitrate ions and the second the conversion of nitrite ions to nitrate ions. The main participants in the first phase of nitrification are Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and Ammonia Oxidizing Archaea (AOA). The second stage of nitrification is carried out by Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB). Recent studies have pointed out that a group of microorganisms of the *Nitrospira* sp. genus has the ability to carry out both stages of nitrification and for that reason they were called Comammox (Complete-ammonia-oxidation).

Nowadays, crop productivity is mainly based on nitrogen inputs through the addition of chemical fertilizers. However, that nitrification process and the subsequent denitrification brings enormous environmental and economic costs as they are responsible for significant nitrogen losses. Over the last few decades, optimized nitrogen management techniques focus on reducing the leaching of NO_3^- produced, plus nitrogen gas emissions (N_2O). One of these techniques is the use of synthetic nitrification inhibitors to slow the conversion of NH_4^+ to NO_2^- . This delay of the first stage of nitrification, preserves NH_4^+ in the soil for an extended period of time, thus reducing the production of nitrite ions (NO_3^-). The majority of nitrification inhibitors aim to inhibit ammonium monooxygenase enzyme (AMO), which is the major catalyst for converting ammonia to hydroxylamine. This enzyme is found in microorganisms involved in the ammonia oxidation process (AOB, AOA, Comammox) and is used as a molecular marker in environmental samples concerning functional analysis of microbial communities.

Selection of the appropriate inhibitor is quite complex and requires a complete understanding of the inhibitory mechanism as well as knowledge of the cellular and metabolic differences of the target microorganisms. Most studies to date have focused on the effects of nitrification inhibitors on nitrifying strains in soil, but this does not give a clear picture of the spectrum of their action. In contrast, just a limited number of *in vitro* studies have focused on their effect on representative strains of AOA and AOB that have a major role in nitrification.

This project's focus has been the *in vitro* study and evaluation on the impact of different concentrations of known and well used nitrification inhibitors (DCD, Nitrapyrin, DMPP), through liquid cultures of representative soil strains of nitrifying bacteria (*Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira multiformis*) and nitrifying archaea (*Ca. Nitrosocosmicus franklandus* and *Ca. Nitrosotalea sinensis*). On those liquid cultures, measurements of NO_2^- production and accumulation, as well as *amoA* gene abundance levels, were conducted.

Based on results, Nitrapyrin was found to be the most potent inhibitor in regard to DCD and DMPP as it has majorly affected studied strains' (AOB and AOA) growth and activity, on concentrations $\geq 5\mu\text{M}$. DCD has drastically inhibited AOBs' growth and activity only on highest applied concentrations ($\geq 250\mu\text{M}$), while effects on AOA

where less significant on concentrations $\geq 2,5\text{mM}$ for *Ca. N. franklandus* and $\geq 1\text{mM}$ for *Ca. N. sinensis*. Lastly, DMPP has caused full nitrification inhibition on studied AOB strains on concentrations $\geq 10\mu\text{M}$ (*N. europaea*) and $\geq 1\mu\text{M}$ (*N. multiformis*), whereas AOA strains' nitrification inhibition has been observed on higher inhibitory concentration levels (5mM for *Ca. N. franklandus* and $\geq 1\text{mM}$ for *Ca. N. sinensis*).

In conclusion, studied AOA strains have showed less sensitivity to DCD and DMPP in regard to AOB strains. In addition, between the two AOB strains, studied in this in vitro research, *N. multiformis* has showed greater sensitivity to every inhibitor used. At the same time, *Ca. N. sinensis* has also showed greater sensitivity in regard to *Ca. N. franklandus*. Lastly, for both groups of microorganisms, Nitrapyrin was found to be the most potent inhibitor, followed by DMPP and lastly DCD.

Key-words: nitrification, ammonia oxidizing bacteria, ammonia oxidizing archaea, nitrification inhibitors, DCD, Nitrapyrin, DMPP

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	12
Θεωρητικό υπόβαθρο.....	12
1.1. Ο κύκλος του αζώτου	12
1.2. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση	15
1.2.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)	16
1.2.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA).....	16
1.2.3. <i>Comammox</i> - (Complete Ammonia Oxidizers)	18
1.2.4. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια – Nitrite oxidizing bacteria (NOB).....	19
1.2.5. <i>Anammox</i> - (Anaerobic Ammonia Oxidizers).....	20
1.3. Σημασία της νιτροποίησης	20
1.4. Παρεμποδιστές της νιτροποίησης	21
1.4.1. <i>DCD</i>	23
1.4.2. <i>Nitrapyrin</i>	24
1.4.3. <i>DMPP</i>	24
1.5. Στόχος της εργασίας	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	26
Πειραματικό μέρος.....	26
2.1. Καλλιέργεια στελεχών AOB <i>in vitro</i>	26
2.2. Καλλιέργεια στελεχών AOA <i>in vitro</i>	26
2.2.1. Καλλιέργεια του <i>Ca. Nitrosocosmicus franklandus</i>	27
2.2.2. Καλλιέργεια του <i>Ca. Nitrosotalea sinensis</i>	28
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός	29
2.4. Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία των AOB και των AOA	30
2.5. Απομόνωση DNA από τα κύτταρα των εξεταζόμενων AOB και AOA	31
2.6. Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB και των AOA.....	31
2.6.1. Ποσοτικοποίηση του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB.....	31
2.6.2. Ποσοτικοποίηση του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA.....	33
2.7. Στατιστική ανάλυση.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	35
Αποτελέσματα	35
3.1. Προσδιορισμός της επίδρασης του DCD στα AOB και AOA	35
3.1.1. Επίδραση του DCD στο στέλεχος <i>Nitrosomonas europaea</i>	35
3.1.2. Επίδραση του DCD στο στέλεχος <i>Nitrospira multififormis</i>	36
3.1.3. Επίδραση του DCD στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosocosmicus franklandus</i>	38

3.1.4. Επίδραση του DCD στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosotalea sinensis</i>	40
3.2. Προσδιορισμός της επίδρασης του Nitrapyrin στα AOB και AOA.....	41
3.2.1. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος <i>Nitrosomonas europaea</i>	41
3.2.2. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος <i>Nitrosospira multiformis</i>	43
3.2.3. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosocosmicus franklandus</i>	44
3.2.4. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosotalea sinensis</i>	46
3.3. Προσδιορισμός της επίδρασης του DMPP στα AOB και AOA.....	48
3.3.1. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος <i>Nitrosomonas europaea</i>	48
3.3.2. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος <i>Nitrosospira multiformis</i>	50
3.3.3. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosocosmicus franklandus</i>	51
3.3.4. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος <i>Ca. Nitrosotalea sinensis</i>	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	55
Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	55
4.1. Συζήτηση.....	55
4.2. Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα.....	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Κύκλος του αζώτου και ο ρόλος των μικροοργανισμών στις επιμέρους διεργασίες.	12
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων νιτρωδοποίησης (Subbarao et al., 2006).	14
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού οξείδωσης της αμμωνίας των AOB / <i>comammox Nitrospira</i> (Caranto and Lancaster, 2017) και του πιθανού μηχανισμού οξείδωσης της αμμωνίας των AOA (Kozłowski et al., 2016b).	18

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Χημικές δομές των πιο γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης	23
Πίνακας 2: Υλικά και συγκεντρώσεις στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Skinner & Walker.....	26
Πίνακας 3: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Selenite-tungstate	27
Πίνακας 4: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified vitamin.....	27
Πίνακας 5: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified trace elements	27
Πίνακας 6: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Basal Salt Solution 10X	28
Πίνακας 7: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου Modified Fresh Water.....	28
Πίνακας 8: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου Fresh Water.....	29
Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις του DCD που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	29
Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις του Nitrapyrin που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	30
Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις του DMPP που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	30
Πίνακας 12: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου amoA των AOB στην qPCR.....	32
Πίνακας 13: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την q-PCR του amoA	

γονιδίου των AOB.....	32
Πίνακας 14: Χαρακτηριστικά των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του <i>amoA</i> γονιδίου των AOB.....	32
Πίνακας 15: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στην q-PCR.....	33
Πίνακας 16: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την q-PCR του <i>amoA</i> γονιδίου των AOA.....	33
Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του <i>amoA</i> γονιδίου των AOA.....	34

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	36
Διάγραμμα 2: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	36
Διάγραμμα 3: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	37
Διάγραμμα 4: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	38
Διάγραμμα 5: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	39
Διάγραμμα 6: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	39
Διάγραμμα 7: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i>	40
Διάγραμμα 8: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i>	41
Διάγραμμα 9: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	42
Διάγραμμα 10: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	43
Διάγραμμα 11: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	43
Διάγραμμα 12: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	44
Διάγραμμα 13: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	45
Διάγραμμα 14: Επίδραση του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	46
Διάγραμμα 15: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i>	47
Διάγραμμα 16: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i>	47
Διάγραμμα 17: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	49
Διάγραμμα 18: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. europaea</i>	49
Διάγραμμα 19: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	50
Διάγραμμα 20: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB στις υγρές καλλιέργειες του <i>N. multiformis</i>	51
Διάγραμμα 21: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	52
Διάγραμμα 22: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. franklandus</i>	52

Διάγραμμα 23: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i> .	53
Διάγραμμα 24: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου <i>atp6A</i> των AOA στις υγρές καλλιέργειες του <i>Ca. N. sinensis</i> .	54

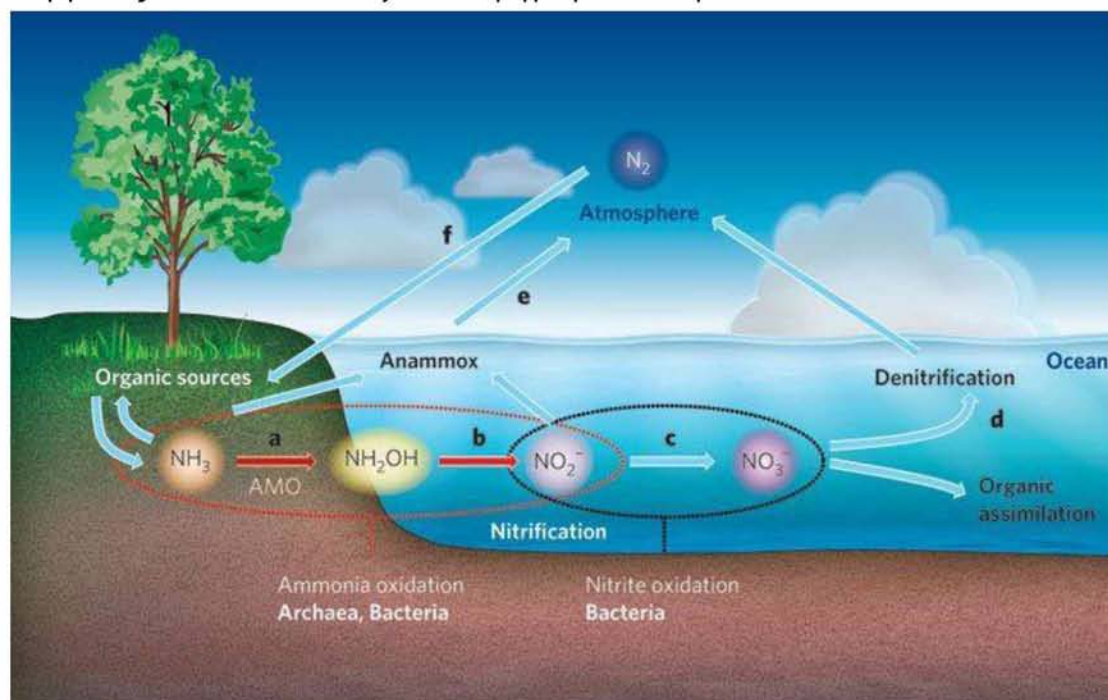
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

Θεωρητικό υπόβαθρο

1.1. Ο κύκλος του αζώτου

Το μοριακό άζωτο (N_2) είναι το κυρίαρχο αέριο στην ατμόσφαιρα της Γης, καταλαμβάνοντας περίπου το 78% του συνολικού όγκου της ατμόσφαιρας (Godfrey&Glass, 2011). Αποτελεί ένα από τα βασικότερα στοιχεία για την ανάπτυξη των οργανισμών, καθώς είναι το κύριο δομικό στοιχείο πολλών βιομορίων όπως των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων κ.α. (Zerkle & Mikhail, 2017). Ωστόσο, οι περισσότεροι οργανισμοί δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν/αξιοποιήσουν το N με τη μορφή που αυτό βρίσκεται στην ατμόσφαιρα και προκειμένου να το αφομοιώσουν απαιτείται η μετατροπή του σε άλλες αζωτούχες ενώσεις (Hoffman et al., 2014).

Οι αζωτούχες ενώσεις μετατρέπονται από τη μία μορφή στην άλλη υπό φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες. Το σύνολο των μετατροπών αυτών αποτελεί τον κύκλο του αζώτου, ο οποίος περιγράφει την κίνηση του στοιχείου από την ατμόσφαιρα στη βιόσφαιρα και πάλι πίσω στην ατμόσφαιρα. Οι κυριότερες διεργασίες του κύκλου του αζώτου περιγράφονται παρακάτω:



Εικόνα 1: Κύκλος του αζώτου και ο ρόλος των μικροοργανισμών στις επιμέρους διεργασίες.

I. Αζωτοδέσμευση

Η αζωτοδέσμευση είναι η διαδικασία μετατροπής του ατμοσφαιρικού μοριακού αζώτου (N_2) σε άλλες αζωτούχες ενώσεις και πραγματοποιείται είτε φυσικά είτε βιολογικά. Στη φυσική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμόσφαιρας αντιδρά με το οξυγόνο καθώς και το υδρογόνο των υδρατμών σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα και αμμωνία. Η ρήξη του ισχυρού τριπλού δεσμού του μοριακού αζώτου επιτυγχάνεται με γρήγορη απελευθέρωση ενέργειας κατά τη διάρκεια φυσικών φαινομένων (κεραυνοί, εκρήξεις ηφαιστείων κ.α.) (Navarro-Gonzalez et al., 2001). Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται μόνο από ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς που φέρουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης που τους επιτρέπει να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) σε αμμωνία (NH_3). Η νιτρογενάση εντοπίζεται τόσο σε ελεύθερα ζώντα βακτήρια που ανήκουν σε διάφορα γένη όπως τα *Azotobacter*, *Azomonas* κ.α., όσο και σε συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* και σε ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia* (Santi et al., 2013).

II. Αμμωνιοποίηση / Ανοργανοποίηση

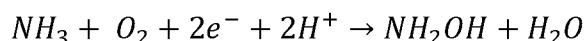
Κατά τον κυτταρικό θάνατο απελευθερώνονται στο έδαφος πολλές οργανικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και υπολείμματα κυτταρικών τοιχωμάτων (Rilling et al., 2007). Η διαδικασία της αμμωνιοποίησης ή ανοργανοποίησης περιλαμβάνει την μετατροπή αυτών των οργανικών ενώσεων σε αμμωνία και πραγματοποιείται από την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους με τη δράση υδρολυτικών ενζύμων (αμινοπεπτιδάσες, ουρεάσες). Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία αλλά και η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία διάσπασης (Sylvia et al., 2005).

III. Νιτροποίηση

Κύρια διεργασία στον κύκλο του αζώτου αποτελεί η νιτροποίηση, η οποία λαμβάνει χώρα υπό αερόβιες συνθήκες και επιτελείται από μία σειρά εξιδεικευμένων μικροοργανισμών. Περιγράφει τη διαδοχική οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) μέσω νιτρώδων (NO_2^-) και πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια.

Το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης καλείται νιτρώδοποίηση και περιλαμβάνει την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) με ενδιάμεση παραγωγή υδροξυλαμίνης (NH_2OH) (Εικόνα 2).

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η οξείδωση της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη σύμφωνα με την αντίδραση:

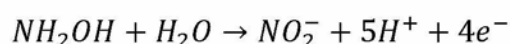


Απαραίτητη για την πραγματοποίηση αυτού του σταδίου είναι η δράση του

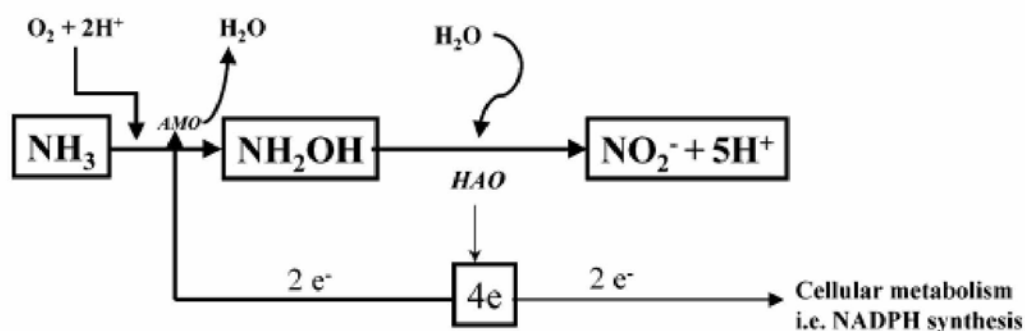
ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), η οποία είναι υπεύθυνη για την διάσπαση του O_2 και το σχηματισμό της υδροξυλαμίνης και ενός μορίου νερού (Subbarao et al., 2006).

Η μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) είναι ένα ένζυμο τριών πολυπεπτιδικών υπομονάδων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *amoC*, *amoA* και *amoB* που βρίσκονται σε ένα σπερόνιο *amoCAB*. Πολλαπλά, σχεδόν όμοια αντίγραφα του σπερόνιου *amoCAB* έχουν εντοπιστεί στο γονιδίωμα τόσο των χημειολιθότροφων βακτηρίων που συμμετέχουν στην οξείδωση της αμμωνίας (Ammonia-Oxidizing Bacteria: AOB) όσο και των νιτρωδοποιητικών αρχαίων (Ammonia-Oxidizing Archaea: AOA) (Khadka et al., 2018, Sayavedra-Soto et al., 1998, Pester et al., 2012, Norton et al., 2002). Το γονίδιο *amoA*, που κωδικοποιεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας και χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης σε περιβαλλοντικά δείγματα για τη μελέτη της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων που συμμετέχουν στην οξείδωση της αμμωνίας (Rotthauwe et al., 1997).

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα δύο από τα τέσσερα ηλεκτρόνια που παράγονται από την οξείδωση της υδροξυλαμίνης επιστρέφουν στην AMO για περαιτέρω οξείδωση της αμμωνίας, ενώ τα υπόλοιπα χρησιμοποιούνται για τις ανάγκες του κυττάρου και την σύνθεση ATP (Ensign et al., 1993). Το ένζυμο που συμμετέχει στη μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη ιόντα είναι η οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO), που όμως απαντάται μόνο στα AOB. Αντιθέτως, AOA δεν παρουσιάζουν κάποιο ένζυμο ομόλογο της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης και για τις ανάγκες τους χρησιμοποιούν εναλλακτικούς μηχανισμούς εύρεσης ηλεκτρονίων (Junier et al., 2010).

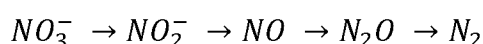


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων της νιτρωδοποίησης (Subbarao et al., 2006).

Το δεύτερο και τελικό στάδιο της νιτροποίησης καλείται νιτρίκοποίηση και περιλαμβάνει την οξείδωση των νιτρώδων (NO_2^-) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της οξειδοαναγωγής των νιτρώδων (NXR), το οποίο εντοπίζεται σε χημειολιθότροφα νιτρίκοποιητικά βακτήρια (NOB) (Pester et al, 2014).

IV. Απονιτροποίηση

Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου μία πληθώρα μικροοργανισμών που καλούνται απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε οξείδια του αζώτου. Η διαδικασία της απονιτροποίησης περιλαμβάνει τέσσερα αναγωγικά στάδια, με τελευταίο το στάδιο της παραγωγής μοριακού αζώτου (N_2) που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα. Οι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία φέρουν μία ομάδα τεσσάρων ενζύμων (νιτρική οξειδοαναγωγή, νιτρώδης οξειδοαναγωγή, οξειδοαναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, οξειδοαναγωγή του υποξειδίου του αζώτου) που καταλύουν τις διαδοχικές αναγωγικές αντιδράσεις (Knowles, 1982).



1.2. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στο στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση του γεωχημικού κύκλου του αζώτου. Οι μικροοργανισμοί αυτοί εντοπίζονται τόσο σε φυσικά (εδάφη, θάλασσες, γλυκό νερό), όσο και σε τεχνητά (μονάδες επεξεργασίας λυμάτων) οικοσυστήματα (Gubry-Rangin et al., 2010).

Από την πρώτη ανακάλυψη των νιτρώδοποιητικών βακτηρίων στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα (Winogradsky, 1981) θεωρήθηκε πως η νιτροποίηση αποτελούσε μία διαδικασία δύο σταδίων που πραγματοποιούνταν από δύο διαφορετικές ομάδες βακτηρίων, τα νιτρώδοποιητικά βακτήρια (AOB) και τα νιτρίκοποιητικά βακτήρια (NOB). Ωστόσο, η ανάπτυξη μοριακών και ομικών τεχνικών άλλαξαν σημαντικά την ανωτέρω υπόθεση, καθώς επιβεβαιώθηκε η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας από αναερόβια βακτήρια Anammox (Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria) (Vandegraaf et al., 1995), καθώς επίσης και η συμμετοχή νιτρώδοποιητικών αρχαίων (AOA) στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης (Kohnneke et al., 2005). Τέλος, σημείο αναφοράς αποτέλεσε η απομόνωση βακτηρίων του γένους *Nitrospira*, μέχρι πρόσφατα γνωστά ως NOB, που είχαν την ικανότητα να πραγματοποιούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης, δηλαδή την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά ιόντα και ονομάστηκαν comammox (Complete Ammonia Oxidizers) (Daims et al., 2015, Van Kessel et al., 2015).

Η ιδιαιτερότητα αυτών των μικροοργανισμών, που τους καθιστά ικανούς να

οξειδώσουν την αμμωνία ή τα αμμωνιακά ιόντα, αποδίδεται στο γενετικό τους υπόβαθρο και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO).

1.2.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) είναι χημειολιθότροφοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) ως πηγή άνθρακα και ανηγμένες μορφές N (π.χ αμμωνία) ως μοναδική πηγή ενέργειας (Chain et al., 2003). Κατατάσσονται σε τρία γένη με βάση τις φυλογενετικές αναλύσεις του 16S rRNA γονιδίου. Το πρώτο και το δεύτερο γένος, *Nitrosomonas* και *Nitrospira* αντίστοιχα, ανήκουν στη κλάση των β-πρωτεοβακτηρίων, ενώ το τρίτο γένος *Nitrococcus* ανήκει στη κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων (Head et al., 1993).

Προηγούμενες μελέτες των Kowalchuck και Stephen (2001) απέδειξαν πως η μικροβιακή κοινότητα των AOB επηρεάζεται από τις συνθήκες που επικρατούν στα εδάφη, όπως το pH και το άζωτο. Το επόμενο βήμα ήταν ο διαχωρισμός των β-πρωτεοβακτηρίων σε επτά συστάδες (*Nitrospira*:1-4, *Nitrosomonas*:5-7), με βάση τόσο του 16S rRNA γονιδίου όσο και των οικοφυσιολογικών τους χαρακτηριστικών (Stephen et al., 1996). Κυρίαρχη ομάδα AOB στο έδαφος διαπιστώθηκε εκείνη των συστάδων 2, 3 και 4 του γένους *Nitrospira* (Bruns et al., 1999, Phillips et al., 2000).

Σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας έχει παρατηρηθεί πως αυξάνεται η δραστηριότητα και η αφθονία των AOB (Hastings et al., 1997, Verhamme et al., 2011). Επιπλέον, το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 7 και 9 χωρίς αυτό να είναι απόλυτο καθώς έχει βρεθεί η ύπαρξη και η προσαρμογή AOB της δεύτερης συστάδας και σε εδάφη χαμηλότερου pH (όξινα) (Nugroho et al., 2005).

Στα γονίδια των β-πρωτεοβακτηρίων εντοπίζονται πολλαπλά αντίγραφα του οπερόνιου *amoCAB* σε αντίθεση με τα γονίδια των γ-πρωτεοβακτηρίων που έχει αναφερθεί η εύρεση μονάχα ενός αντιγράφου (Stein et al., 2007, Klotz et al., 2006). Το γονίδιο *amoA*, που κωδικοποιεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας, αποτελεί έναν ισχυρό μοριακό δείκτη για τη μελέτη της δράσης και της ποικιλομορφίας των AOB σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα (Rotthauwe et al., 1997). Η πρώτη αλληλούχιση του γονιδίου *amoA* του *Nitrosomonas europaea* πραγματοποιήθηκε από τους McTavish et al., (1993) και έκτοτε οι έρευνες συνεχίστηκαν και στα υπόλοιπα γονίδια του *amoCAB*.

1.2.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Τα πρώτα ευρήματα που σηματοδότησαν την εμπλοκή των αρχαίων στην νιτροποίηση προήλθαν από την εύρεση υπεύθυνων γονιδίων, που εμπλέκονται στο

μονοπάτι οξειδωσης της αμμωνίας, σε τμήματα των γονιδιωμάτων τους. Αυτά τα γονίδια εντοπίστηκαν σε μεταγονιδιωματικές μελέτες θαλασσινού νερού από τους Venter et al., (2004) και εδάφους από τους Treusch et al., (2005). Ωστόσο, η επιβεβαίωση έγινε λίγο αργότερα από τους Köhneke et al., (2005) που απομόνωσαν το πρώτο νιτρωδοποιητικό αρχαίο *Nitrosopumilus maritimus*, στέλεχος SCM1, από ένα ενυδρείο θαλασσινού νερού στο Σιάτλ. Η πρώτη απομόνωση αποτέλεσε ισχυρό κίνητρο για τις μετέπειτα έρευνες των AOA σε ένα ευρύ φάσμα χερσαίων και υδάτινων περιβαλλόντων (Sauder et al., 2017).

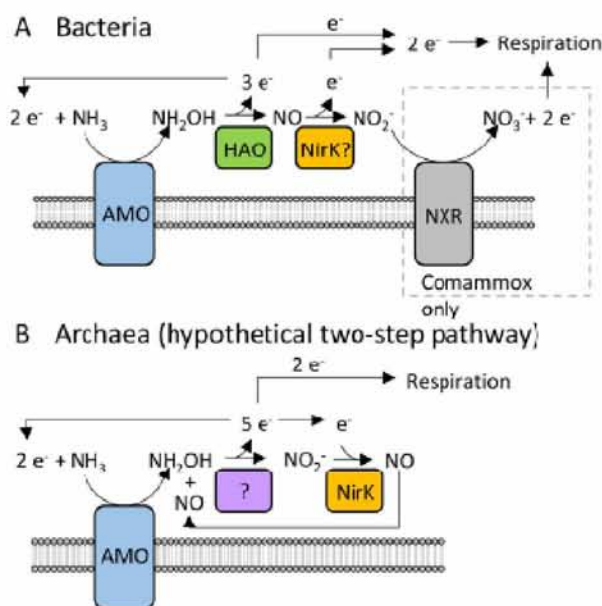
Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία ανήκουν στο φύλο Thaumarcheota, ωστόσο δεν αποτελούν όλα τα αρχαία αυτού του φύλου νιτρωδοποιητές (Brochier-Armanet et al., 2008, Weber et al., 2015). Πολλαπλές έρευνες επικεντρώθηκαν στην αριθμητική υπεροχή των AOA έναντι των AOB που εντοπίζονται στο έδαφος (Leininger et al., 2006) και στους ωκεανούς (Karner et al., 2001) επισημαίνοντας την ευκολία αυτών των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται εύκολα σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών ανάπτυξης.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, η συγκέντρωση της αμμωνίας και η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζουν την επικράτηση και την αφθονία των AOA. Η πλειοψηφία των μελετών αναφέρει την κυριαρχία των AOA σε εδάφη και σε θαλάσσια οικοσυστήματα όπου η συγκέντρωση της αμμωνίας είναι γενικά χαμηλή (Martens-Habbena et al., 2009, Beman and Francis, 2008). Το εύρος των τιμών pH που απαντώνται τα AOA είναι αρκετά μεγάλο, από 3,7 (He et al., 2007) έως 8,7 (Urakawa et al., 2008) αλλά η κυριαρχία των AOA έναντι των AOB εντοπίζεται σε όξινα εδάφη (Nicol et al., 2008). Σε αντίστοιχα μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος έχουν εντοπιστεί *amoA* γονίδια αρχαίων, με τη χαμηλότερη τιμή να αγγίζει τους 0,2°C (εντοπίστηκαν σε μεγάλο βάθος ωκεανού από τους Nakagawa et al., (2007), και την υψηλότερη τιμή των 97°C (εντοπίστηκαν σε θερμές πηγές από τους Reigstad et al., (2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της ιδιαιτερότητας αυτών των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες αποτελεί η έρευνα των de la Torre et al., (2008) που επικεντρώθηκε στο νιτρωδοποιητικό αρχαίο *Nitrosocaldus yellowstonii* και υπέδειξε την πρωτοφανή παραγωγή νιτρωδών σε θερμοκρασίες μεταξύ 60°C και 74°C.

Το ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο της νιτρωδοποίησης, η AMO, παρουσιάζει αρκετές διαφορές ανάμεσα στα AOA και στα AOB. Από αναλύσεις γονιδιωμάτων των AOA έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων ομόλογων γονιδίων *amoA*, *amoB* και *amoC* χωρίς όμως αυτά να εντοπίζονται σε οπερόνιο (Spang et al., 2012, Nicol and Schleper., 2006). Επιπρόσθετα, τα AOA δεν παρουσιάζουν κάποιο ένζυμο ομόλογο της HAO. Απεναντίας, σε όλα τα γονιδιώματα των AOA έχει εντοπισθεί στη θέση δίπλα από το γονίδιο *amoA* ένα μικρό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης «*amoX*» το οποίο εικάζεται ότι ευθύνεται για την κωδικοποίηση μιας επιπλέον υπομονάδας της AMO ως υποκατάστατο άλλων ελλειπόντων υπομονάδων (Treusch et al., 2005). Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με τις διαφορετικές δομές των κυτταρικών μεμβρανών των AOA και των AOB,

υποδηλώνουν τη σημαντική απόκλιση αυτών των δύο στο οξειδωτικό μονοπάτι της αμμωνίας (Walker et al., 2010). Τέλος, πολλοί υποθετικοί μηχανισμοί οξείδωσης της αμμωνίας από τα AOA έχουν προταθεί χωρίς όμως να έχουν ακόμα εξακριβωθεί (Beekman et al., 2018).

Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού οξείδωσης της αμμωνίας των AOB/comammox *Nitrospira* (Caranto and Lancaster, 2017) και του πιθανού μηχανισμού οξείδωσης της αμμωνίας των AOA (Kozłowski et al., 2016b).



1.2.3. Comammox - (Complete Ammonia Oxidizers)

Πολλές θεωρητικές έρευνες είχαν τοποθετηθεί στην ύπαρξη πιθανών μικροοργανισμών ικανών να εκτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης (Costa et al., 2006) μέχρι που το 2015 αποδείχθηκε η ύπαρξη τους και τους αποδόθηκε το όνομα Comammox (Complete Ammonia Oxidizers) (Daims et al., 2015, Van Kessel et al., 2015). Αυτή η ανακάλυψη άλλαξε δραματικά τη μέχρι πρότινος εικόνα της νιτροποίησης και έδωσε το κίνητρο για περαιτέρω διερεύνηση.

Όλα τα γνωστά Comammox ανήκουν στο γένος *Nitrospira* και έχουν αναγνωριστεί ως βασικά νιτροποιητικά βακτήρια (NOB) σε διάφορα φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα. Οι πρώτες απομονώσεις comammox βακτηρίων του γένους *Nitrospira* πραγματοποιήθηκαν από τους Daims et al. (2015) και τους Van Kessel et al. (2015), οι οποίοι και εντόπισαν την ιδιαιτερότητα αυτών των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα χαμηλών συγκεντρώσεων αμμωνίας και να επιβιώνουν έναντι των AOA και των AOB. Σε αντίθεση με προηγούμενες υποθέσεις που έθεταν τα AOA ως τους πιο ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς σε περιβάλλοντα χαμηλής συγκέντρωσης αμμωνίας, πλέον το *N. inopinata* θεωρείται πως έχει τη

μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμα της αμμωνίας με εξαίρεση το θαλάσσιο AOA *Nitrosopumilus maritimus* SCM13 (Kits et al., 2017).

Από τις πρώτες γονιδιωματικές αναλύσεις των comammox, βρέθηκε πως διαθέτουν όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν την μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) και την οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR), απαραίτητα ένζυμα για την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά (Daims et al., 2015, VanKessel et al., 2015, Wang et al., 2017, Palomo et al., 2016). Στις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε επίσης η φυλογενετική διαφορά της AMO των comammox έναντι των AOB και των AOA, καταλήγοντας στον περαιτέρω διαχωρισμό των comammox *Nitrospira* σε δύο μονοφυλετικές ομάδες A και B, βασιζόμενες στη φυλογένεση του γονιδίου *amoA*. Όλες οι απομονώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν μέλη της ομάδας A, ενώ δεν υπάρχει ακόμα απομονωμένος εκπρόσωπος της ομάδας B (Palomo et al., 2018). Η αλληλουχία του comammox *amoA* γονιδίου ταξινομήθηκε εσφαλμένα στις βάσεις δεδομένων ως αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο της μονοξυγενάσης του μεθανίου (*Crenothrix promA*). Ως εκ τούτου, τα comammox *Nitrospira* είναι πιθανό να διατηρούν μεγαλύτερη περιβαλλοντική κατανομή από αυτήν που μπορεί εσφαλμένα να είχε θεωρηθεί από προηγούμενες μελέτες βασιζόμενες σε αποτελέσματα PCR αναλύσεων (Hu and He, 2017).

Πολλά ερωτηματικά παραμένουν ακόμα, σχετικά με τον ακριβή οικολογικό ρόλο των comammox και τη σημασία της πλήρους νιτροποίησης στα φυσικά και στα τεχνητά οικοσυστήματα, οδηγώντας πολλούς ερευνητές σε στοχευμένες προσεγγίσεις.

1.2.4. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια – Nitrite oxidizing bacteria (NOB)

Το δεύτερο και τελικό στάδιο της παραδοσιακής εκδοχής της νιτροποίησης, δηλαδή η μετατροπή των νιτρωδών (NO_2^-) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-), πραγματοποιείται από τα χημειολιθότροφα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) που ανήκουν στο φύλο των πρωτεοβακτηρίων (Pester et al., 2014). Η πρώτη απομόνωση NOB του γένους *Nitrobacter* πραγματοποιήθηκε από τον Winogradsky το 1892. Ωστόσο, η δύσκολη ανάπτυξη τους υπό εργαστηριακές συνθήκες καθώς και η έλλειψη ερευνητικού ενδιαφέροντος σε σχέση με τους νιτρικοποιητικούς μικροοργανισμούς οδήγησαν στην περιορισμένη γνώση της οικολογίας των NOB (Sorokin et al., 2012, Pester et al., 2014).

Το βασικό ένζυμο οξείδωσης των νιτρωδών είναι η οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (NXR), η οποία αποτελεί λειτουργικό δείκτη για όλα τα νιτρικοποιητικά βακτήρια. Αυτό το ενζυμικό μεμβρανικό σύμπλεγμα εντοπίζεται σε δύο φυλογενετικά διακριτές μορφές. Ο κυτταροπλασματικός τύπος βρέθηκε στα NOB *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrolanceus* (Sorokin et al., 2012), ενώ ο περιπλασματικός τύπος εντοπίστηκε στα NOB *Nitrospira* και *Nitrospina* (Lücker et al., 2010, 2013). Και οι δύο μορφές NXR περιέχουν τρεις υπομονάδες, τις *NxrA*, *NxrB* και *NxC* (Lücker et al.,

2010).

Τα νιτρικά ιόντα αποτελούν κύρια πηγή αζώτου για πολλούς οργανισμούς και σημαντικούς δέκτες ηλεκτρονίων για την αναερόβια αναπνοή. Ακόμη, η απομάκρυνση του αζώτου στις βιολογικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την παρουσία των νιτρικοποιητικών βακτηρίων. Η σημασία τους λοιπόν αναγνωρίζεται εύστοχα τόσο για τα φυσικά όσο και για τα τεχνητά οικοσυστήματα (Sorokin et al., 2012).

1.2.5. Anammox - (Anaerobic Ammonia Oxidizers)

Η διαδικασία οξειδωσης της αμμωνίας μπορεί να λάβει χώρα και υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου με πρωταγωνιστές τα αναερόβια βακτήρια του φύλου Planctomycetales, γνωστά και ως anammox. Η αντίδραση υπό ανοξικές συνθήκες περιλαμβάνει την οξειδωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), με τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) να αξιοποιούνται ως δέκτες ηλεκτρονίων για την τελική παραγωγή ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2). Ως ενδιάμεσα προϊόντα εντοπίζονται η υδραζίνη και η υδροξυλαμίνη (Schmid et al., 2005).

Τα anammox βακτήρια απαντώνται ευρέως σε υποξικά περιβάλλοντα σε ολόκληρο τον πλανήτη αλλά και σε θάλασσες, λίμνες, παράκτια / υπεράκτια ιζήματα και ακραίες τοποθεσίες (Gao et al., 2018). Αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (AOA και AOB) που τους παρέχουν τα απαραίτητα νιτρώδη ιόντα και εκτιμάται πως είναι υπεύθυνα για περίπου 30% της απώλειας αζώτου στους ωκεανούς (Kuypers et al., 2018, Babbitt et al., 2014). Κατατάσσονται σε πέντε γένη: *Kuenenia*, *Brocadia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* και *Scalindua* (Oshikiet al., 2015).

1.3. Σημασία της νιτροποίησης

Το άζωτο αποτελεί δομικό στοιχείο για την ανάπτυξη των οργανισμών και η προσθήκη του για τον εμπλουτισμό των εδαφών των γεωργικών οικοσυστημάτων είναι τεράστιας ζωτικής και οικονομικής σημασίας. Ωστόσο, η προσθήκη αζωτούχων λιπασμάτων στις καλλιεργητικές εκτάσεις επιφέρει και τεράστιο περιβαλλοντικό κόστος. Οι διαδικασίες της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης είναι υπεύθυνες για σημαντικές απώλειες αζώτου διαμέσου της έκπλυσης των παραγόμενων NO_3^- και της παραγωγής αέριων οξειδίων του αζώτου (N_xO) όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) και το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) που θεωρούνται σημαντικοί ατμοσφαιρικοί ρύποι, αντίστοιχα (Wrage et al., 2001). Έτσι, οι γεωργικές δραστηριότητες θεωρούνται υπεύθυνες για περίπου 70% των εκπομπών υποξειδίου του αζώτου (N_2O), το οποίο αποτελεί ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου (Signor and Cerri, 2013). Επιπρόσθετα, η συσσώρευση των παραγόμενων νιτρικών ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε συνθήκες ευτροφισμού μέσω της έκπλυσης στα επιφανειακά ύδατα και τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα.

Μολονότι τεράστιες ποσότητες αζωτούχων λιπασμάτων προστίθενται για την ανάπτυξη των καλλιεργειών, το ποσοστό αφομοίωσης τους από τα φυτά δεν ξεπερνάει το 30% με 50% (Abalos et al., 2014). Η βελτίωση της βιολογικής σταθεροποίησης του αζώτου με ταυτόχρονη μείωση των αέριων εκπομπών και των αποτιθέμενων νιτρικών παραμένει ένα από τα βασικά ενδιαφέροντα της ερευνητικής κοινότητας (Reay et al., 2012). Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν συμβάλει σημαντικά η βαθύτερη κατανόηση των σταδίων του βιοχημικού κύκλου του αζώτου και η ανάπτυξη σύγχρονων τεχνολογιών.

Προηγούμενες μελέτες των Huijsmans et al., (2001) έδειξαν πως η κατάλληλη μέθοδος εφαρμογής των λιπασμάτων αλλά και ο κατάλληλος χρόνος εφαρμογής τους, είναι σε θέση να μειώσουν αισθητά τις απώλειες αζώτου με τη μορφή νιτρικών από το έδαφος. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν ειδικά σχεδιασμένοι αισθητήρες που είναι σε θέση να διαγνώσουν τις ανάγκες των φυτών σε άζωτο με σκοπό τον στοχευμένο εμπλουτισμό, έναντι της απεριόριστης συσσώρευσης (Scharf et al., 2011). Διάφοροι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και η αναλογία άνθρακα/αζώτου επηρεάζουν άμεσα τη μικροβιακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη διάρκεια διαθεσιμότητας των λιπασμάτων στο έδαφος και το μέγεθος των εκπομπών N₂O (Benckiser et al., 2015).

Η κύρια τεχνική που εφαρμόζεται στις μέρες μας είναι η συνδυασμένη προσθήκη αζωτούχων λιπασμάτων και χημικών ουσιών που αναστέλλουν τη διεργασία της νιτροποίησης, ούτως ώστε να καθυστερήσει η μικροβιακή οξείδωση για ορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτές οι χημικές ουσίες καλούνται παρεμποδιστές της νιτροποίησης και με τη δράση τους αυξάνουν τη διάρκεια της διαθεσιμότητας του αζώτου των λιπασμάτων στο έδαφος προκειμένου να αφομοιωθεί από τα φυτά και ταυτόχρονα ελαττώνουν την πιθανότητα μεγάλων απωλειών νιτρικών ενώσεων (Bell et al., 2016).

1.4. Παρεμποδιστές της νιτροποίησης

Η πλειονότητα των παρεμποδιστών της νιτροποίησης στοχεύει στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης και συγκεκριμένα στην αναστολή του ενζύμου AMO. Με τον τρόπο αυτό επιβραδύνεται άμεσα η νιτροποίηση αλλά και η παραγωγή νιτρικών ιόντων (NO₃⁻), τα οποία χρησιμεύουν ως υπόστρωμα για την απονιτροποίηση (Ruser and Schulz, 2015). Από την άλλη μεριά η HAO δεν θα μπορούσε να αποτελεί πιθανό στόχο των παρεμποδιστών νιτροποίησης διότι οι υψηλές συγκεντρώσεις υδροξυλαμίνης έχουν αποδειχθεί τοξικές και επιβλαβείς για τα *Nitrosomonas* spp. (Arg and Stein, 2003). Γενικά, οι μεταβολικές και κυτταρικές διαφορές των AOA και των AOB είναι πιθανό να οδηγούν σε διαφορετικές ανταποκρίσεις έναντι των προστιθέμενων παρεμποδιστών.

Οι παρεμποδιστές της νιτροποίησης χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους.

i. *Άμεση δέσμευση και αλληλεπίδραση με το ένζυμο AMO*

Σε αυτήν την ομάδα εντοπίζονται οι παρεμποδιστές που είτε προσδένονται απευθείας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της AMO (ανταγωνιστική αναστολή), είτε προσδένονται σε μια δεύτερη θέση που δεν χρησιμοποιείται για την οξείδωση της αμμωνίας (μη ανταγωνιστική αναστολή). Στα *Nitrosomonas* spp. θεωρήθηκε ότι η δεύτερη θέση πρόσδεσης έχει υδρόφοβες ιδιότητες καθώς όλοι οι παρεμποδιστές που χρησιμοποιούνται είναι μη πολικοί (Keener και Arp, 1993).

ii. *Απομάκρυνση των συμπαραγόντων με χρήση χηλικών ενώσεων*

Προηγούμενες μελέτες των Singh και Verma (2007) έδειξαν πως η οξείδωση της αμμωνίας επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα του χαλκού ως συμπαραγόντα της AMO. Η προσθήκη χηλικών ενώσεις χαλκού (π.χ. θειουρία), αναστέλλει την ενεργότητα της μονοξυγενάσης της αμμωνίας σε αντίθεση με την προσθήκη αλάτων χαλκού που συμβάλουν στην ενεργοποίηση της οξείδωσης της αμμωνίας.

iii. *Οξείδωση των υποστρωμάτων που αδρανοποιούν την AMO και άλλα ένζυμα*

Όπως επισημάνθηκε από τον McCarty (1999), αυτός ο τρόπος αναστολής συνήθως περιλαμβάνει μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση του ενζύμου μέσω της ομοιοπολικής τροποποίησής του από το προϊόν της κατάλυσης (αναστολή με βάση τον μηχανισμό). Οι παρεμποδιστές αυτής της κατηγορίας προκαλούν ομοιοπολική τροποποίηση στις πρωτεΐνες των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα να απαιτείται η νέα σύνθεση τους. Ορισμένοι αναστολείς όπως το ακετυλένιο ή το αλλυλοσουλφίδιο αδρανοποιούν μόνο μία απλή πρωτεΐνη (Hyman and Arp, 1992), ενώ σε άλλους παρατηρείται η ομοιοπολική σύνδεση του προϊόντος αναστολής με αρκετά κυτταρικά συστατικά. Συνεπώς, η διαδικασία της σύνθεσης πολλών νέων πρωτεϊνών είναι βραδύτερη από την ανάκτηση μιας απλής πρωτεΐνης (Hyman et al., 1995).

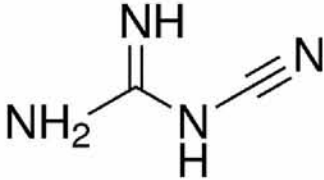
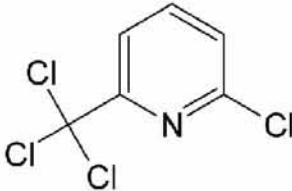
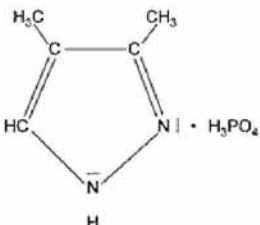
Η άμεση ταξινόμηση των παρεμποδιστών της νιτροποίησης σε μία κατηγορία συχνά δεν είναι τόσο ευδιάκριτη, καθώς έχουν αναφερθεί παρεμποδιστές που στοχεύουν σε περισσότερες από μία κατευθύνσεις. Για παράδειγμα ο εμπορικός παρεμποδιστής Nitrapyrin χρησιμοποιείται ως μη ανταγωνιστικός αναστολέας και παράλληλα παρουσιάζει και μία πιο ασθενή αναστολή με βάση τον δεύτερο μηχανισμό δράσης (Vannelli and Hooper, 1992).

Καθοριστικός παράγοντας για τη σταθερότητα των παρεμποδιστών νιτροποίησης αναδείχθηκε η θερμοκρασία του εδάφους (Irigoyen et al., 2003). Έρευνες των Kelliher et al., (2008) εντόπισαν πως ο χρόνος ημιζωής του παρεμποδιστή DCD μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας όμως δεν υπήρξε καμία συσχέτιση με τη συνολική μείωση των εκπομπών N_2O . Δεδομένου ότι στα πειράματα εργαστηρίου δεν λαμβάνονται υπόψιν περιβαλλοντικές μεταβλητές όπως η θερμοκρασία του εδάφους, η υγρασία και οι βροχοπτώσεις, η συμβολή του παρατεταμένου χρόνου παραμονής των παρεμποδιστών στην μείωση των

εκπομπών N₂O παραμένει ασαφής (Ruser and Schulz., 2015).

Οι πιο κοινοί και ευρέως χρησιμοποιούμενοι παρεμποδιστές της νιτροποίησης είναι το DCD (Dicyandiamide), το Nitrapyrin (2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine) και το DMPP (3,4-Dimethylpyrazole phosphate) που δρουν ως χηλικοί παράγοντες, δημιουργώντας σύμπλοκα με το χαλκό που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της AMO.

Πίνακας 1: Χημικές δομές των πιο γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης

Παρεμποδιστές νιτροποίησης	Χημική δομή
Dicyandiamide (DCD)	
2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (Nitrapyrin)	
3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP)	

1.4.1. DCD

Ο παρεμποδιστής νιτροποίησης DCD έχει πολλά πλεονεκτήματα τα οποία τον καθιστούν από τους πιο ανταγωνιστικούς στην αγορά. Αρχικά το κόστος παραγωγής του είναι χαμηλότερο συγκριτικά με άλλους παρεμποδιστές. Η υψηλή υδατοδιαλυτότητα του επιτρέπει την εφαρμογή σε υγρή μορφή καθιστώντας δυνατή τη χρήση του σε συνδυασμό με στερεά λιπάσματα. Ωστόσο, αυτή του η ιδιότητα του

αποδίδει και μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος (Teske and Matzel, 1988). Οι Singh et al., (2008) σε μία μελέτη τους σχετικά με την επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του παρεμποδιστή DCD και της πιθανής μείωσης των εκπομπών N_2O ανέφεραν αύξηση του χρόνου ημιζωής της ουσίας σε ποσοστό 45% με διπλασιασμό της συγκέντρωσης χωρίς ωστόσο να παρατηρείται σημαντική μείωση των εκπομπών του N_2O . Τέλος, η διερεύνηση της επίδρασης της μακροχρόνιας εφαρμογής του DCD (7 έτη) στη μικροβιακή κοινότητα από τους Guo et al., (2013) απέδειξε πως η εφαρμογή του οδηγεί στο μετριασμό της έκπλυσης των παραγόμενων NO_3^- και στη μείωση των αέριων εκπομπών N_2O , χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στην αφθονία των AOB και των AOA.

1.4.2. Nitrapyrin

Ο εμπορικός αναστολέας Nitrapyrin ανακαλύφθηκε το 1962 από τον Goring και έκτοτε άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως για τις ανάγκες των καλλιεργειών. Παρουσιάζει υψηλή πτητικότητα και για το λόγο αυτό η χρήση του περιορίζεται αποκλειστικά με άνυδρα λιπάσματα και η εφαρμογή του γίνεται πριν τους χειμερινούς μήνες (Goos and Johnson, 1999). Επιπλέον, ως οργανική ένωση χλωρίου μπορεί να επιφέρει αρκετές περιβαλλοντικές επιβαρύνσεις όπως η διάβρωση και φαινόμενα τοξικότητας (Trenkel, 1997). Σε αντίθεση με το DCD, το οποίο δρα κυρίως στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Subbarao et al., 2007), ο παρεμποδιστής Nitrapyrin είναι αποτελεσματικός για την μείωση της νιτρωδοποίησης τόσο των AOB όσο και των AOA (Shen et al., 2013).

1.4.3. DMPP

Το DMPP είναι ένας μη πτητικός παρεμποδιστής που διατίθεται υπό μορφή κοκκίων που διαλύονται εύκολα με τη βροχή. Είναι πολύ αποτελεσματικός και επιτυγχάνει μεγαλύτερη αναστολή από το DCD, ακόμη και σε συγκεντρώσεις που αγγίζουν το ένα δέκατο αυτού (Zerulla et al., 2001, Chen et al., 2015). Η διάρκεια της δράσης του, όπως και όλων των παρεμποδιστών, εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες (Pasda et al., 2001), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (Barth et al., 2001) και πιθανώς από την εγκατεστημένη καλλιέργεια. Μία παρόμοια μακροχρόνια έρευνα (7 έτη) της επίδρασης του DMPP στη μικροβιακή κοινότητα πραγματοποιήθηκε από τους Dong et al., (2013), τα αποτελέσματα της οποίας αποκάλυψαν τη μείωση της αφθονίας των AOB, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην αφθονία των AOA και λοιπών μικροβιακών ομάδων που δεν αποτελούν στόχους των παρεμποδιστών νιτροποίησης.

1.5. Στόχος της εργασίας

Μέχρι σήμερα οι περισσότεροι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των επιδράσεων των παρεμποδιστών της νιτροποίησης στους νιτρωδοποιητικούς

μικροοργανισμούς σε πειράματα εδάφους (Dong et al., 2013, Chen et al., 2015, Zhang et al., 2018), ενώ περιορισμένος αριθμός μελετών αναφέρεται στη δράση τους σε *in vitro* επίπεδο με χρήση αντιπροσωπευτικών εδαφογενών νιτρωδοποιητικών στελεχών. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν αξιολόγηση του φάσματος δράσης των εμπορικά γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης, DCD, Nitrapyrin και DMPP μέσω δοκιμών *in vitro* σε υγρές καλλιέργειες αντιπροσωπευτικών εδαφογενών στελεχών νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (*Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*) και νιτρωδοποιητικών αρχαίων (*Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*). Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η ανασταλτική δράση ενός εύρους συγκεντρώσεων των παραπάνω παρεμποδιστών νιτροποίησης στην αύξηση (αφθονία *amoA* γονιδίου) και τη λειτουργία (παραγωγή NO_2^- στις υγρές καλλιέργειες) των εξεταζόμενων στελεχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

Πειραματικό μέρος

2.1. Καλλιέργεια στελεχών AOB *in vitro*

Τα δύο στελέχη των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων, *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*, που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση αυτής της διατριβής, διατέθηκαν από τη συλλογή του Prof. G. Nicol (Ecole Centrale de Lyon, France). Τα παραπάνω στελέχη αναπτύχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, αερόβια και χωρίς ανάδευση σε θρεπτικό μέσο Skinner και Walker (1961). Η επώαση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι και θερμοκρασία 28°C. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι τελικές τους συγκεντρώσεις στο μέσο παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Υλικά και συγκεντρώσεις στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Skinner & Walker

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
(NH ₄) ₂ SO ₄	1mM NH ₄ ⁺ (0.066g/L)
KH ₂ PO ₄	1.47mM (0.2g/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.27mM (0.04g/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.16 mM (0.04g/L)
Phenol red (0.05%) / δείκτης pH	1.41 μM (1ml/L)
FeNa EDTA (7.5 mM, in parcel)	7.5 μM (1ml/L)
Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (1M)	1 mM (1ml/L)

Το pH του θρεπτικού διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7.5 – 8.0 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (1M). Σε αυτές τις συνθήκες οι υγρές καλλιέργειες εμφανίζουν ένα ελαφρύ ροζ χρώμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως ένδειξη της διατήρησης του pH σε αυτά τα επίπεδα. Ωστόσο, όταν λόγω της παραγωγής νιτρωδών ιόντων μειωνόταν η τιμή του pH η επαναρύθμιση του πραγματοποιούνταν με την προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃).

2.2. Καλλιέργεια στελεχών AOA *in vitro*

Τα δύο στελέχη των νιτρωδοποιητικών αρχαίων, *Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*, που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση αυτής της διατριβής επίσης διατέθηκαν από τη συλλογή του Prof. G. Nicol (Ecole Centrale de Lyon, France). Τα παραπάνω στελέχη αναπτύχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, αερόβια και χωρίς ανάδευση σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα

που περιγράφονται παρακάτω. Η επώαση των στελεχών των ΑΟΑ πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι και θερμοκρασία 35°C.

2.2.1. Καλλιέργεια του *Ca. Nitrosocosmicus franklandus*

Το στέλεχος *Ca. N. franklandus* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο Modified Fresh Water. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν τα επιμέρους διαλύματα Modified vitamin solution, Selenite-tungstate solution, Modified trace elements και Basal Salt Solution 10X. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 3-6.

Πίνακας 3: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Selenite-tungstate

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
NaOH	0.1 M (4g/L)
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0.23mM (0.06g/L)
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.24mM (0.08g/L)

Πίνακας 4: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified vitamin

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
Biotin	0.082 mM (0.02g/L)
Pyridoxine HCl	0.24 mM (0.05g/L)
Thiamine HCl	0.15 mM (0.05g/L)
Nicotinic acid	0.4 mM (0.05g/L)
Calcium pantothenate	0.19 mM (0.05g/L)
P Aminobenzoic acid)	0.36 mM (0.05g/L)
Vitamin B12	0.0073mM (0.01g/L)

Πίνακας 5: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified trace elements

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
H ₃ BO ₃	0.5 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5 mM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.8 mM
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 mM
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 mM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 mM
Na ₂ MoO ₄ ·6H ₂ O	0.15 mM
HCl (12,5 M)	100 mM

Πίνακας 6: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του *Basal Salt Solution 10X*

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
NaCl	170 mM (10g/L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	40 mM (4g/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	9 mM (1g/L)
KH ₂ PO ₄	15 mM (2g/L)
KCl	70 mM (5g/L)

Στη συνέχεια για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου *Modified FreshWater* αναμείχθηκαν τα υλικά που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ανά λίτρο 1X *Basal Salt Solution*.

Πίνακας 7: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου *Modified Fresh Water*

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
HEPES Buffer (1M)	10 ml
NaHCO ₃ (1M)	2 mM (2 ml/L)
FeNaEDTA (7.5 mM)	7.5 μM (1 ml/L)
Modified trace elements	1.0 ml/L
NH ₄ Cl	0.5 mL/L
Modified vitamin solution	1 mL/L
Selenite-tungstate solution	0.1 mL/L

Το pH του θρεπτικού διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7.5 – 7.6 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (1M).

2.2.2. Καλλιέργεια του *Ca. Nitrosotalea sinensis*

Το στέλεχος *Ca. N. sinensis* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο *FreshWater*. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν τα επιμέρους διαλύματα *Modified trace elements* και *Basal Salt Solution 10X*. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων παρουσιάστηκαν παραπάνω στους Πίνακες 5 και 6.

Στη συνέχεια για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου *Fresh Water* αναμείχθηκαν τα υλικά που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ανά λίτρο 1X *Basal Salt Solution*.

Πίνακας 8: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου *Fresh Water*

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
NaHCO ₃ (1M)	2 mM (2 ml/L)
FeNaEDTA (7.5 mM)	7.5 μM (1 ml/L)
Modified trace elements	1.0 ml/L
NaNO ₂ (0.5M)	0.5 mM (1ml/L)

Το pH του θρεπτικού διαλύματος ανάπτυξης *Fresh Water* ρυθμίστηκε στο 5.0 – 5.3 με τη χρήση πυκνού HCl (12.5N).

2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Το εύρος των συγκεντρώσεων των παρεμποδιστών νιτροποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος παρουσιάζεται αναλυτικά για κάθε παρεμποδιστή στους Πίνακες 9-11. Τα αναλυτικά πρότυπα των ουσιών DCD (99%) και Nitrapyrin (98%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich, ενώ το αναλυτικό πρότυπο του DMPP (99%) αποτέλεσε ευγενική χορηγία της εταιρείας BASF. Το nitrapyrin χαρακτηρίζεται από χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πυκνά διαλύματα εργασίας των διαφορετικών συγκεντρώσεων και η προσθήκη τους στις υγρές καλλιέργειες των AOB και των AOA έγινε σε 0.1% (o/o) dimethylsulfoxide (DMSO), το οποίο προηγουμένως αποστειρώθηκε μέσω διήθησης με ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο PTFE 0.22 μm. Αντίθετα, για την παρασκευή των αντίστοιχων διαλυμάτων εργασίας του DCD και του DMPP χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό καθώς αυτές οι ουσίες εμφανίζουν υψηλή υδατοδιαλυτότητα.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις του DCD που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Μεταχείριση	Συγκέντρωση δ/τος εργασίας
Control	AOB & AOA
DCD 25 μM	Χωρίς προσθήκη ΠΝ
DCD 50 μM	2.1 mg/L
DCD 100 μM	4.2 mg/L
DCD 250 μM	8.4 mg/L
DCD 500 μM	21.02 mg/L
DCD 0.25 mM	42.04 mg/L
DCD 0.5 mM	21.02 mg/L
DCD 1 mM	42.04 mg/L
DCD 2.5 mM	84.08 mg/L
DCD 5 mM	210.2 mg/L
	420.4 mg/L

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις του Nitrapyrin που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Μεταχείριση	Συγκέντρωση δ/τος εργασίας
DMSO	ΑΟΒ & ΑΟΑ
NP 0.05μM	ΑΟΑ
NP 0.5 μM	ΑΟΒ
NP 1 μM	ΑΟΑ
NP 5μM	ΑΟΒ & ΑΟΑ
NP 25 μM	ΑΟΒ & ΑΟΑ
NP 50 μM	ΑΟΒ
NP 100μM	ΑΟΒ & ΑΟΑ
	Προσθήκη DMSO
	0.01155 mg/L
	0.1155 mg/L
	0.23 mg/L
	1.155mg/L
	5.775 mg/L
	11.55 mg/L
	21.1 mg/L

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις του DMPP που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Μεταχείριση	Συγκέντρωση δ/τος εργασίας
Control	ΑΟΒ & ΑΟΑ
DMPP 0.1μM	ΑΟΒ
DMPP 1 μM	ΑΟΒ
DMPP 10μM	ΑΟΒ
DMPP 25μM	ΑΟΒ
DMPP 50 μM	ΑΟΒ
DMPP 100 μM	ΑΟΒ & ΑΟΑ
DMPP 0.5 mM	ΑΟΑ
DMPP 1 mM	ΑΟΑ
DMPP 2.5 mM	ΑΟΑ
DMPP 5 mM	ΑΟΑ
	Χωρίς προσθήκη ΠΝ
	0.01 mg/L
	0.1 mg/L
	1 mg/L
	2.5mg/L
	5 mg/L
	10 mg/L
	50 mg/L
	100 mg/L
	250 mg/L
	500 mg/L

Για κάθε μεταχείριση μεταφέρθηκαν 50 mL από τα θρεπτικά μέσα των ΑΟΒ και των ΑΟΑ, τα οποία διατηρούνταν στους 4°C, σε γυάλινα μπουκάλια Duran των 100 mL και τοποθετήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους σε θερμοκρασίες 28 και 35°C στην περίπτωση των ΑΟΒ και των ΑΟΑ αντίστοιχα, για λίγες ώρες πριν τον εμβολιασμό. Όταν τα εξεταζόμενα στελέχη διένυσαν την εκθετική φάση ανάπτυξης και το μέσο έφτανε στην επιθυμητή θερμοκρασία πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός του με 1% (ΑΟΒ) ή 2% (ΑΟΑ) (ο/ο) φρέσκιας καλλιέργειας. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

2.4. Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία των ΑΟΒ και των ΑΟΑ

Η επίδραση των μελετούμενων ουσιών στη λειτουργία των επιλεγμένων στελεχών ΑΟΒ και ΑΟΑ ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για περίπου 2 έως και 7 εβδομάδες, με χρωματομετρική μέτρηση των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων των καλλιεργειών σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 20 μL αντιδραστηρίων Diazotizing (0.5 g sulfanilamide σε 100mL 2.4M HCl) και Coupling (0.3g N-(1-naphthyl)-ethylenediamine HCl σε 100mL 0.12M HCl) σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας που περιείχε συνολικά 100

μL δείγματος και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer). Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων πραγματοποιούνταν με βάση πρότυπες καμπύλες γνωστών συγκεντρώσεων NaNO₂ (0-100 μM).

2.5. Απομόνωση DNA από τα κύτταρα των εξεταζόμενων AOB και AOA

Σε τακτά χρονικά διαστήματα και με βάση τις μετρήσεις των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες, συλλέγονταν δείγματα από κάθε μεταχείριση (2 ml). Στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 17,000xg για 10 λεπτά προκειμένου να αφαιρεθεί το υπερκείμενο υγρό και να χρησιμοποιηθεί το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων για την απομόνωση του DNA. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin Tissue Genomic DNA (Macherey-Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.6. Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA.

2.6.1. Ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των DCD, Nitrapyrin και DMPP στην αύξηση των AOB *N. europaea* και *N. multiformis* μελετήθηκε η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB για κάθε μεταχείριση. Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του εξεταζόμενου γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R (Rotthauwe et al., 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- ❖ *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'
- ❖ *amoA*-2R: 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'

Στον Πίνακα 12 και Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την διεξαγωγή της q-PCR.

Πίνακας 12: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB στην qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκοι αντιδραστηρίων	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μL	1x
<i>amoA</i> -1F (20pmol/μL)	0.1μL	0.2μM
<i>amoA</i> -2R (20pmol/L)	0.1μL	0.2μM
BSA (10μg/μL)	0.2μL	200ng/μL
DNA	2μL	-
ddH ₂ O	2.6μL	-
Συνολικός όγκος	10μL	-

Πίνακας 13: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την q-PCR του *amoA* γονιδίου των AOB

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	95°C	5 sec	
Υβριδοποίηση	57°C	10 sec	40
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C	1 min	
	65-95°C	0.5°C για 5 sec	

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με τη χρήση αραιώσεων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης (2.04×10^8 – 2.04×10^0 copies/μL), τα οποία περιείχαν το εξεταζόμενο γονίδιο (Rousidou et al., 2013). Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά (efficiency, R^2) των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 14: Χαρακτηριστικά των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB

AOB + ΠN	Efficiency (%)	R^2
<i>N. europaea</i> & DCD	84.5	0.994
<i>N. europaea</i> & Nitrapyrin	84.5	0.994
<i>N. europaea</i> & DMPP	87.7	0.988
<i>N. multiformis</i> & DCD	78.8	0.996
<i>N. multiformis</i> & Nitrapyrin	78.4	0.998
<i>N. multiformis</i> & DMPP	89.9	0.995

2.6.2. Ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOA

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των DCD, Nitrapyrin και DMPP στην αύξηση των AOA *Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis* μελετήθηκε η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA για κάθε μεταχείριση. Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε με q-PCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του εξεταζόμενου γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoA*F και Arch-*amoA*R (Francis et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

- ❖ Arch-*amoA*F: 5'- STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'
- ❖ Arch-*amoA*R: 5' - GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'

Στους Πίνακες 15 και 16 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την διεξαγωγή της qPCR.

Πίνακας 15: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA στην q-PCR

Αντιδραστήρια	Όγκοι αντιδραστηρίων	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μL	1x
Arch- <i>amoA</i> F(20pmol/μL)	0.1μL	0.2μM
Arch- <i>amoA</i> R(20pmol/L)	0.1μL	0.2μM
BSA (10μg/μL)	0.2μL	200ng/μL
DNA	2μL	-
ddH ₂ O	2.6μL	-
Συνολικός όγκος	10μL	-

Πίνακας 16: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την q-PCR του *amoA* γονιδίου των AOA

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	95°C	15 sec	
Υβριδοποίηση	53°C	30 sec	45
Επιμήκυνση	72°C	45 sec	
	95°C	1 min	
Καμπύλη αποδιάταξης	65-95°C	0.5°C για 5 sec	

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων αναφορικά με τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με τη χρήση αραιώσεων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης (1.59×10^9 – 1.59×10^1 copies/μL), τα οποία περιείχαν το εξεταζόμενο γονίδιο (Rousidou et al., 2013). Στον

Πίνακα 17 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά (efficiency, R^2) των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά των πρότυπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOA

AOA + ΠΝ	Efficiency (%)	R^2
Ca. Nitrosocosmicus franklandus & DCD	95.7	0.998
Ca. Nitrosocosmicus franklandus & Nitrapyrin	100.4	0.993
Ca. Nitrosocosmicus franklandus & DMPP	94.8%	0.999
Ca. Nitrosotalea sinensis & DCD	96.9%	0.998
Ca. Nitrosotalea sinensis & Nitrapyrin	95.8%	0.997
Ca. Nitrosotalea sinensis & DMPP	89.2%	0.996

2.7. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 20.0. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της παραγωγής νιτρωδών ιόντων και της ποσοτικοποίησης του γονιδίου *amoA* των υγρών καλλιεργειών των AOB και των AOA υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης, του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών παραγόντων. Στις περιπτώσεις όπου διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ($p \leq 0.05$), ακολούθησε η ανίχνευση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο με το Tuckey's post-hoc test.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

Αποτελέσματα

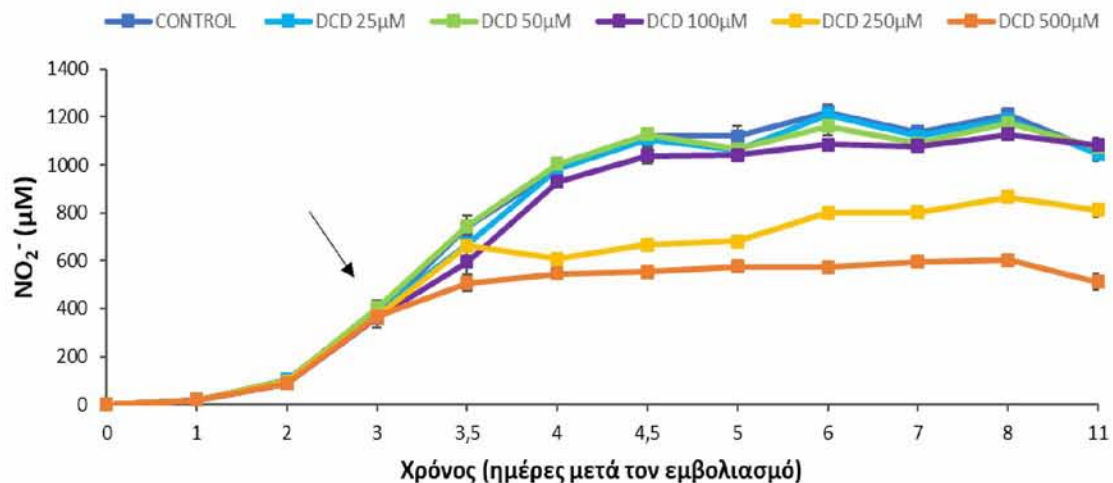
3.1. Προσδιορισμός της επίδρασης του DCD στα AOB και AOA

Η επίδραση του παρεμποδιστή της νιτροποίησης DCD στα στελέχη των AOB *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospirilla multififormis* καθώς και στα στελέχη των AOA *Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis* διερευνήθηκε σε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων μεταξύ 25 μM – 500 μM (2.1 – 42.04 mg/L) για τα AOB και 0,25 mM- 5 mM (21.02 – 420.4 mg/L) για τα AOA. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε στέλεχος οι επιπτώσεις στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) καθώς και στην αφθονία του γονιδίου *amoA*.

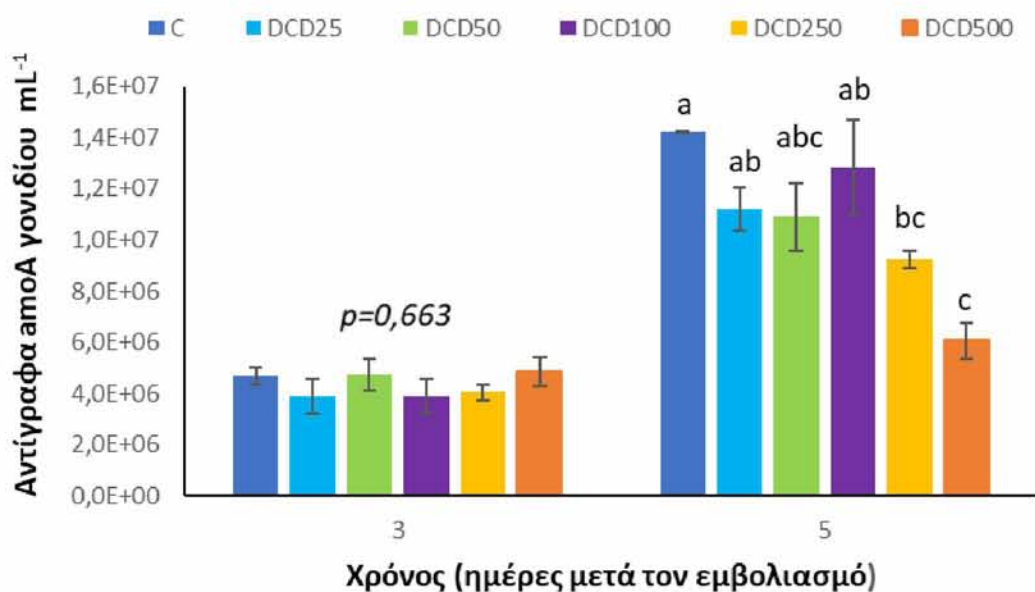
3.1.1. Επίδραση του DCD στο στέλεχος *Nitrosomonas europaea*

Το DCD προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις τρεις ημέρες. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις (25-100 μM) δε φάνηκε να επηρεάζουν καθόλου τη λειτουργία του στελέχους σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control). Οι μόνες σημαντικές μειώσεις στη συσσώρευση των νιτρωδών της τάξης του 39.1% (± 2.1) και του 48,5% (± 2.2) προήλθαν από τις υψηλές συγκεντρώσεις των 250 μM (21 mg L⁻¹) και των 500 μM (42 mg L⁻¹) αντίστοιχα, δύο ημέρες μετά την προσθήκη του στις υγρές καλλιέργειες. Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 1** υπήρξε μια μικρή άνοδος της παραγωγής νιτρωδών από το *N. europaea* στη μεταχείριση των 250 μM , που όμως δεν κατάφερε να ανακάμψει πλήρως και παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος.

Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης του DCD στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB ήταν η τρίτη ημέρα (αμέσως πριν την προσθήκη του παρεμποδιστή) και η πέμπτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό (**Διάγραμμα 2**). Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στα αντίγραφα του *amoA* γονιδίου συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των νιτρωδών ιόντων και στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης του DCD (500 μM) κατά την 5^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας του γονιδίου σε ποσοστό της τάξης του 57.3%.



Διάγραμμα 1: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DCD στις υγρές καλλιέργειες.



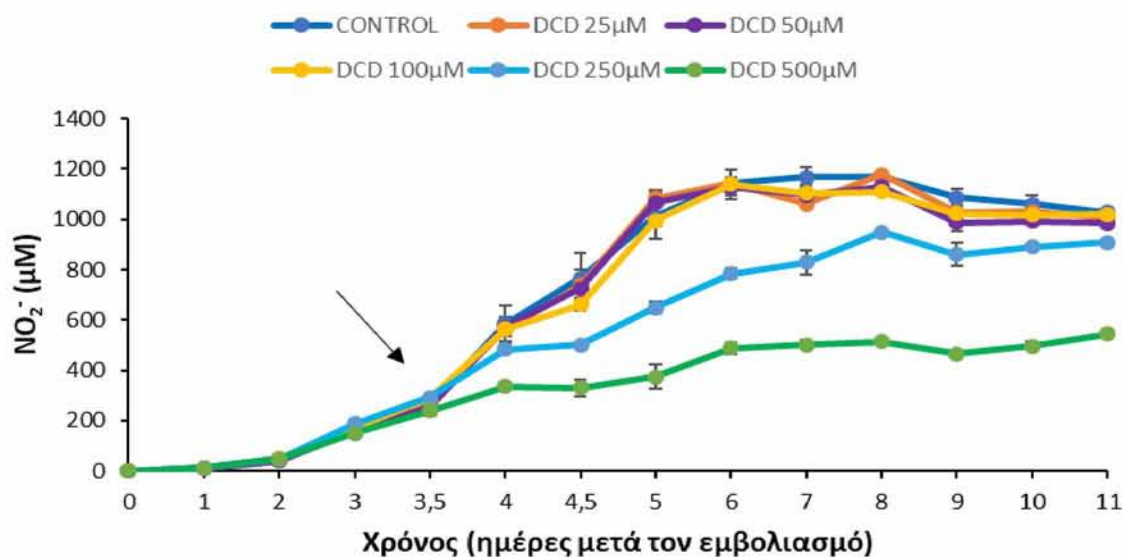
Διάγραμμα 2: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.2. Επίδραση του DCD στο στέλεχος *Nitrosospira multiformis*

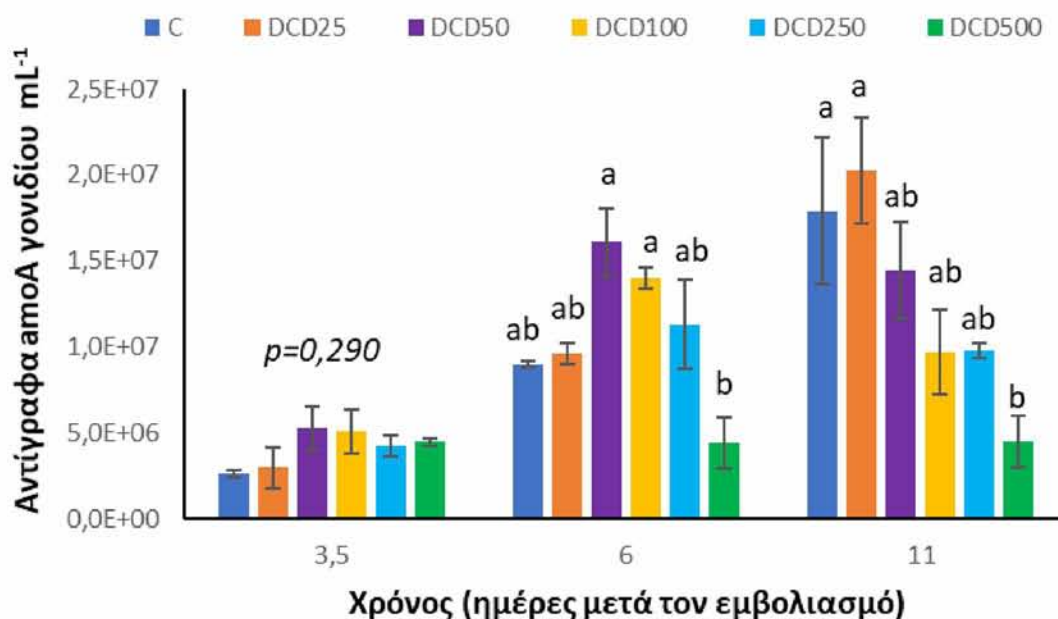
Το *N. multiformis* παρουσίασε υψηλή αντοχή στο DCD αναφορικά με την παραγωγή νιτρωδών ιόντων με μικρή αναστολή της λειτουργίας του στελέχους να εντοπίζεται στη μεταχείριση των 250 μM που όμως ανακτήθηκε στο τέλος του πειράματος σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Control). Σημαντική μείωση στη

συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση εφαρμογής της υψηλότερης συγκέντρωσης των 500 μM με το ποσοστό μείωσης να ανέρχεται στο 57.35% (± 2.4) κατά την 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό (**Διάγραμμα 3**).

Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του DCD στην αύξηση του *N. multiformis*. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν αυτοί των τρεισήμισι (ακριβώς πριν την προσθήκη του DCD), των έξι και των έντεκα ημερών μετά τον εμβολιασμό (**Διάγραμμα 4**). Σημαντική μείωση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης των 500 μM κατά την 11η ημέρα..



Διάγραμμα 3: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DCD στις υγρές καλλιέργειες.



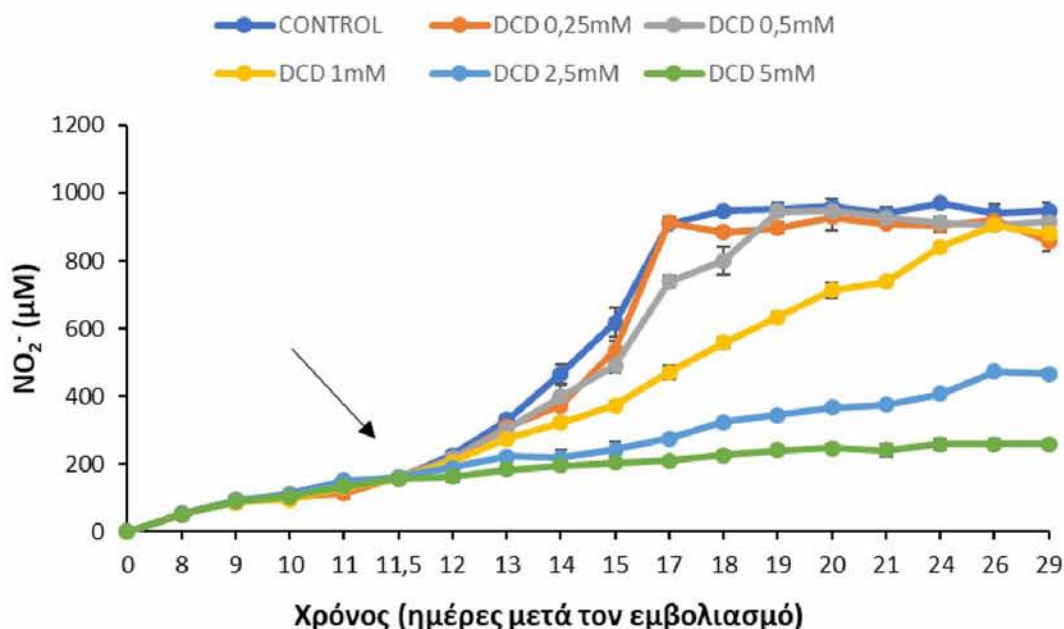
Διάγραμμα 4: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. multififormis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.3. Επίδραση του DCD στο στέλεχος *Ca. Nitrosocosmicus franklandus*

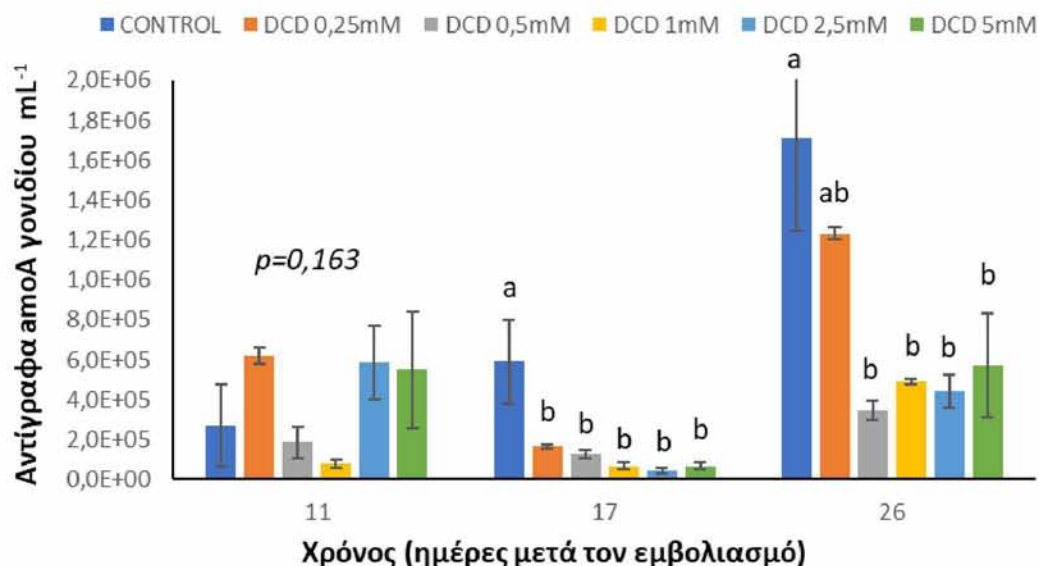
Το DCD προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Ca. N. franklandus* στην εκθετική φάση ανάπτυξης μετά το πέρας των έντεκα ημερών. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 5 παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων σε όλες τις μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του DCD (2,5 και 5 mM) ανέστειλαν σημαντικά τη λειτουργία του στελέχους *Ca. N. franklandus* και το ποσοστό μείωσης των παραγόμενων νιτρωδών έναντι του μάρτυρα (Control) ανήλθε στο 77% (± 0.9) στην περίπτωση της μεταχείρισης των 5 mM την έκτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό, όπου και παρέμεινε σε ανάλογα επίπεδα για τις υπόλοιπες μέρες. Αντίθετα, μόνο προσωρινή ήταν αναστολή της παραγωγής νιτρωδών ιόντων στη μεταχείριση του 1 mM, η οποία και επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα στις δεκαπέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Η διερεύνηση της επίδρασης του DCD στην αύξηση του στελέχους *Ca. N. franklandus* απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 6**. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή της qPCR ήταν η 11^η ημέρα (αμέσως πριν την προσθήκη του DCD), η 17^η (όπου παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης στη παραγωγή των νιτρωδών) και η 26^η. Αρχικά, πριν την προσθήκη του παρεμποδιστή στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus* δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOA (one-way-ANOVA, $p = 0.163$). Ωστόσο, εμφανή μείωση στην αφθονία του *amoA* γονιδίου παρουσιάστηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις τη δέκατη έβδομη ημέρα μετά τον

εμβολιασμό. Στο τέλος του πειράματος, μόνο στη περίπτωση της μεταχείρισης των 0,25 mM παρατηρήθηκε αύξηση των παραγόμενων νιτρωδών σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά της μεταχείρισης του μάρτυρα.



Διάγραμμα 5: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DCD στις υγρές καλλιέργειες.

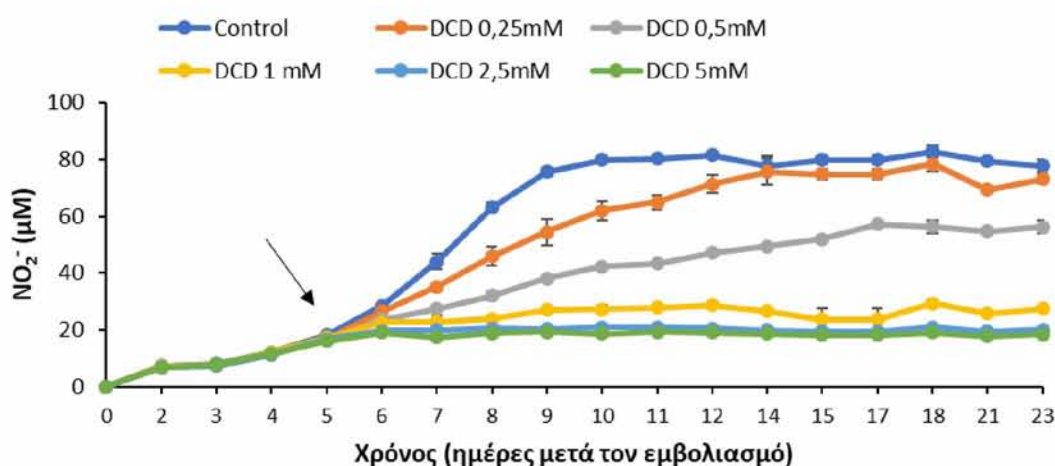


Διάγραμμα 6: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

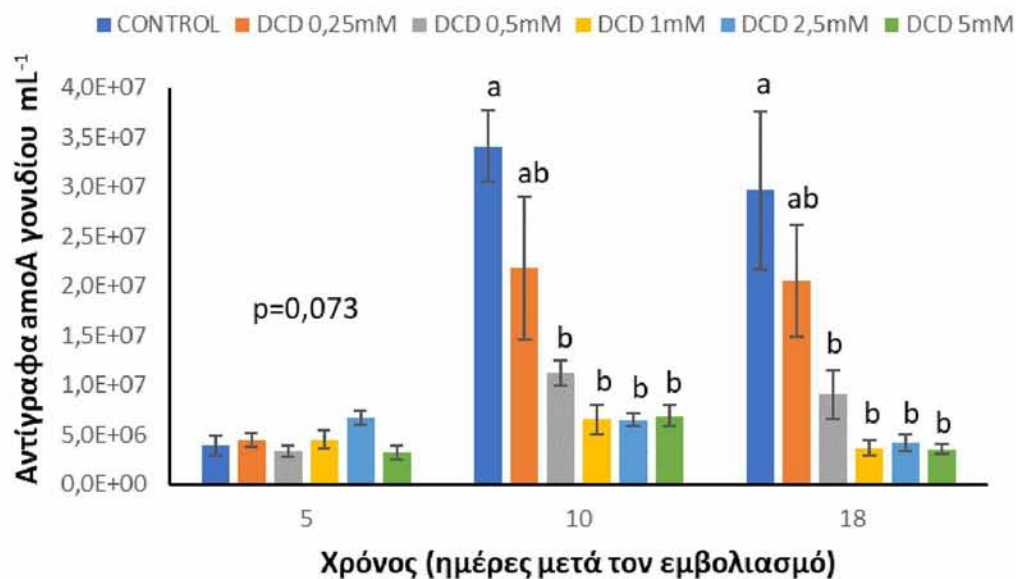
3.1.4. Επίδραση του DCD στο στέλεχος *Ca. Nitrosotalea sinensis*

Το DCD στις διάφορες συγκεντρώσεις προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis* κατά την 5^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό και ενώ διένυαν την εκθετική φάση ανάπτυξης. Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του DCD συγκριτικά με το στέλεχος *Ca. N. franklandus*. Συγκεκριμένα, μόνο η μεταχείριση των 0,25 mM προκάλεσε προσωρινή μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις επέφεραν σταθερή μείωση έναντι του μάρτυρα (Control). Το ποσοστό αναστολής της νιτρωδοποίησης των τριών υψηλότερων συγκεντρώσεων DCD που εφαρμόστηκαν έφτασε το 71.2% (± 5.3), την πέμπτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό (Διάγραμμα 7).

Η επίδραση του DCD στην αύξηση του στελέχους *Ca. N. sinensis* μελετήθηκε με την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA και τα αποτελέσματα της qPCR παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από τους χρόνους των πέντε, δέκα και δεκαοχτώ ημερών μετά τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών. Μολονότι πριν την προσθήκη του DCD δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA ($p=0.073$), μείωση στην αφθονία του γονιδίου παρατηρήθηκε τις επόμενες ημέρες σε όλες τις μεταχειρίσεις σε σχέση με το μάρτυρα (Control). Ωστόσο, στη περίπτωση της μεταχείρισης των 0,25 mM, (όπου παρουσιάστηκε μόνο προσωρινή αναστολή της λειτουργίας, σύμφωνα με το Διάγραμμα 7) η μείωση αυτή δεν ήταν σημαντική.



Διάγραμμα 7: Επίδραση του DCD στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DCD στις υγρές καλλιέργειες.



Διάγραμμα 8: Επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2. Προσδιορισμός της επίδρασης του Nitrapyrin στα AOB και AOA

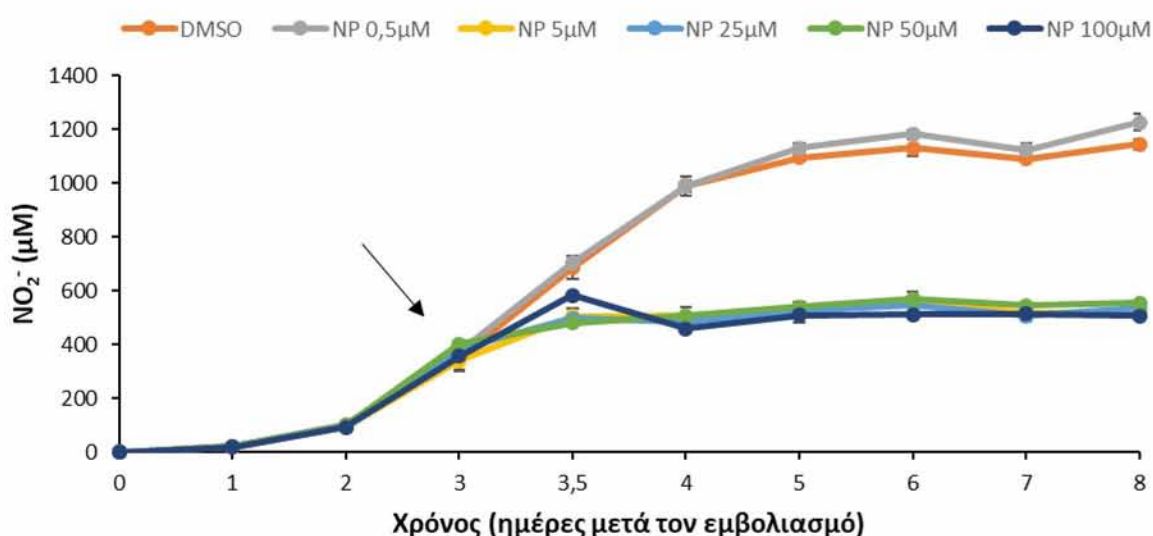
Η επίδραση του παρεμποδιστή της νιτροποίησης Nitrapyrin στα στελέχη των AOB *Nitrosomonas europaea* και *Nitrospira multififormis* καθώς και στα στελέχη των AOA *Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis* διερευνήθηκε σε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων μεταξύ 0,5 μM – 100 μM (0,1155 – 23,1 mg/L) για τα AOB και 0,05 μM -100 μM (0,0115 – 23,1 mg/L) για τα AOA. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε στέλεχος οι επιπτώσεις στην παραγωγή και τη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων (NO_2^-) καθώς και στην αφθονία του γονιδίου *amoA*.

3.2.1. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος *Nitrosomonas europaea*

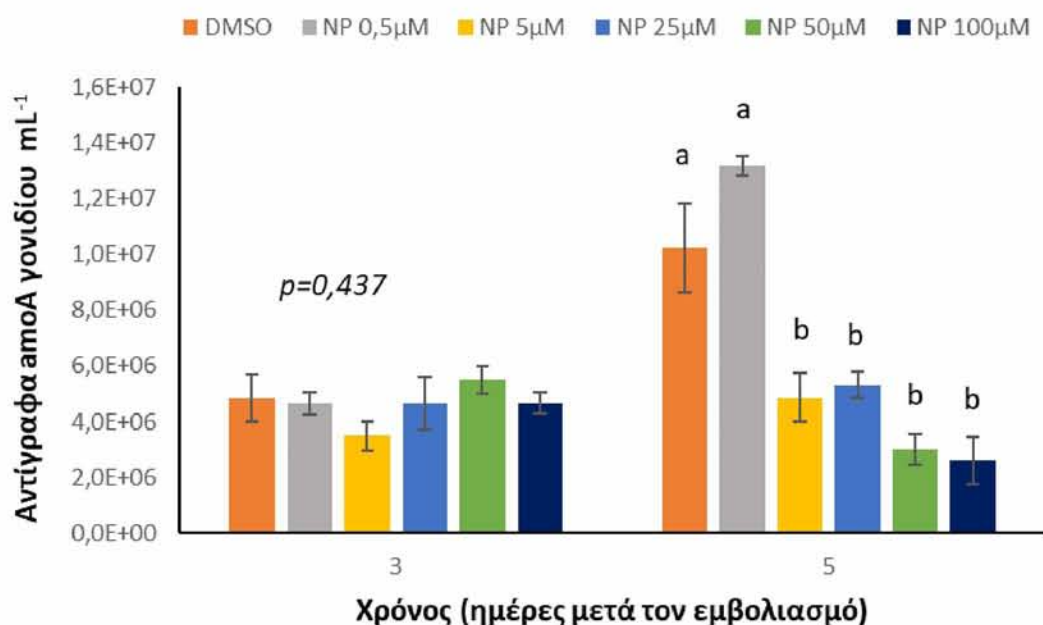
Ο παρεμποδιστής Nitrapyrin προκάλεσε σημαντική μείωση στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις καλλιέργειες του στελέχους *N. europaea* σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκε (Διάγραμμα 9). Η μόνη εξαίρεση εντοπίστηκε στην περίπτωση της μικρότερης συγκέντρωσης της ουσίας που εφαρμόστηκε στις υγρές καλλιέργειες (0,5 μM) όπου παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις νιτρικών ανάλογες με αυτές του μάρτυρα (DMSO). Στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε ποσοστό μείωσης της παραγωγής των νιτρικών $\leq 52.3\%$ (± 2.8).

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ποσοτικοποίηση του γονιδίου

amoA των AOB, που πραγματοποιήθηκε με q-PCR για τους χρόνους των τριών (ακριβώς πριν την προσθήκη του Nitrapyrin) και των πέντε ημερών. Στην περίπτωση της μικρότερης συγκέντρωσης των 0,5 μM δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της λειτουργίας του στελέχους καθώς η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB δε διέφερε σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 10). Αντίθετα, η μείωση της αφθονίας των αντιγράφων του *amoA* ήταν σημαντική σε όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.



Διάγραμμα 9: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το Nitrapyrin στις υγρές καλλιέργειες.

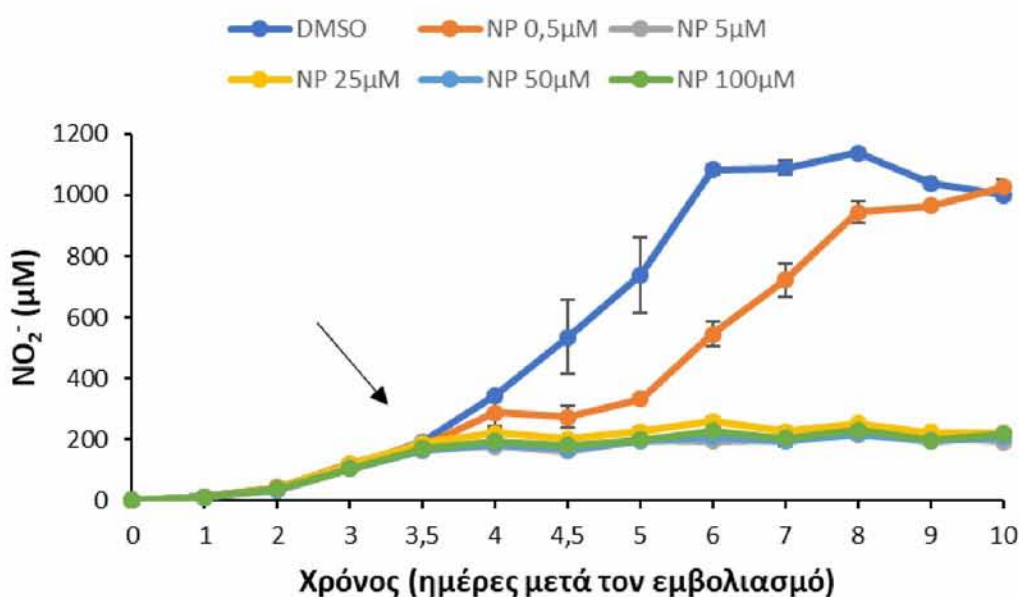


Διάγραμμα 10: Επίδραση του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.2. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος *Nitrosospira multiformis*

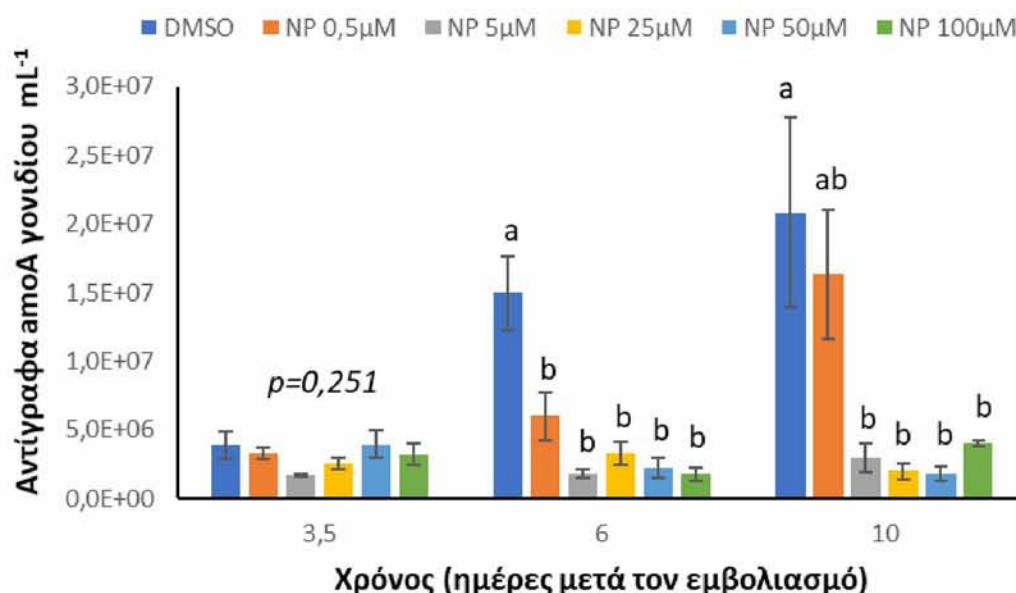
Η εφαρμογή του Nitrapyrin προκάλεσε σημαντική μείωση στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) και μόνο στην περίπτωση εφαρμογής της μικρότερης συγκέντρωσης (0,5 μM) η αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν προσωρινή. Οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις προκάλεσαν μόνιμη αναστολή της νιτρωδοποίησης $\leq 77.4\%$ (± 1.8) σύμφωνα με το **Διάγραμμα 11**.

Αναφορικά με την αξιολόγηση της επίδρασης του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου *amoA*, εξετάστηκαν οι χρόνοι των τριών (ακριβώς πριν την προσθήκη του NP), των έξι και των δέκα ημερών. Η αρχική ανάλυση των δειγμάτων πριν τη προσθήκη του παρεμποδιστή, δεν υπέδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* ($p = 0.251$). Ωστόσο, σύμφωνα με το **Διάγραμμα 12** η εικόνα αυτή άλλαξε και παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα αντιγράφων του γονιδίου, συγκριτικά με τον μάρτυρα (DMSO), σε όλες τις μεταχειρίσεις τις επόμενες ημέρες. Ωστόσο, στη περίπτωση της μεταχείρισης των 0,5 μM (όπου παρατηρήθηκε προσωρινή αναστολή στη παραγωγή των νιτρωδών ιόντων), η μείωση της αφθονίας των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB ήταν μόνο προσωρινή και επανήλθε σε επίπεδα αντίστοιχα του μάρτυρα (DMSO) κατά τη δέκατη ημέρα μετά τον εμβολιασμό.



Διάγραμμα 11: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*.

καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το Nitrapyrin στις υγρές καλλιέργειες.

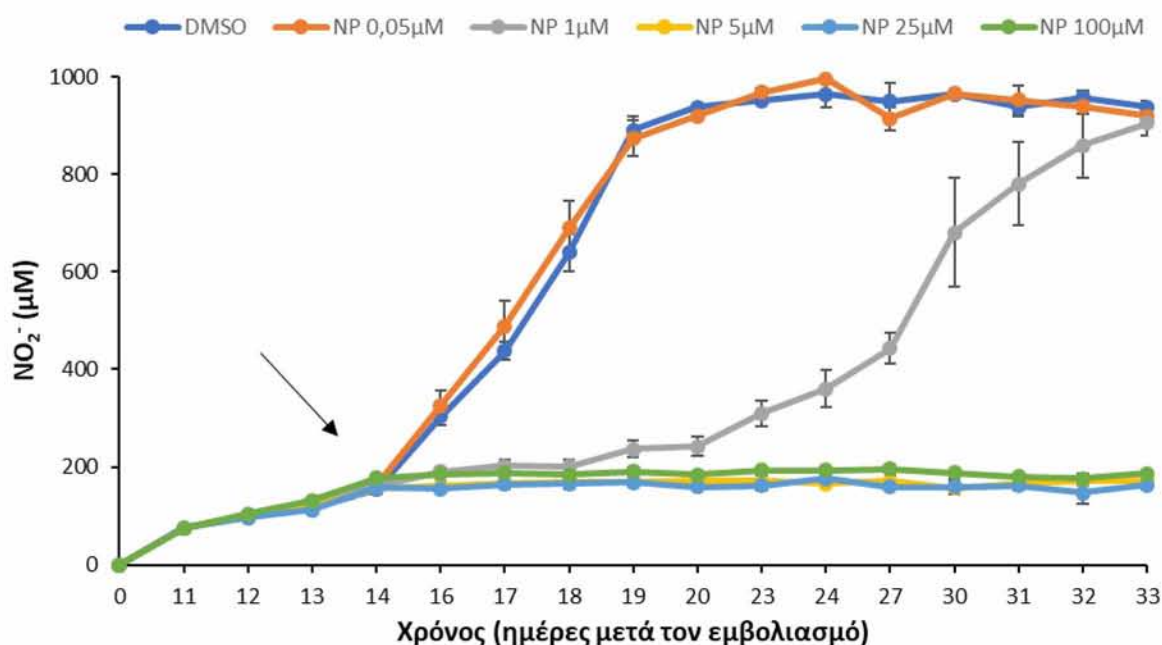


Διάγραμμα 12: Επίδραση του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

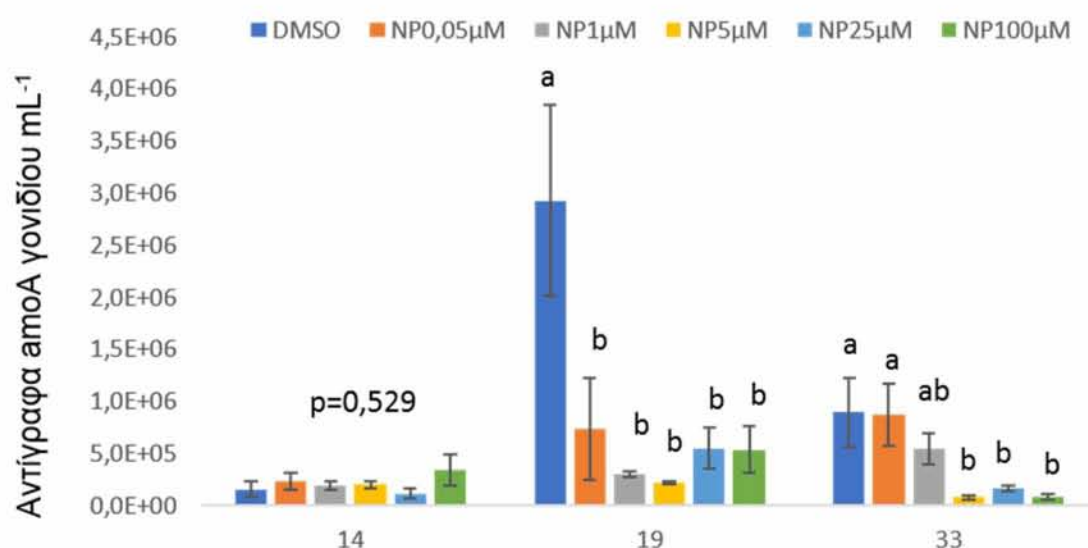
3.2.3. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος *Ca. Nitrosocosmicus franklandus*

Οι υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Ca. N. franklandus* παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία στο Nitrapyrin. Συγκεκριμένα, η προσθήκη του Nitrapyrin έγινε στις δεκατέσσερις ημέρες και έκτοτε παρατηρήθηκε σταθερή αναστολή της νιτρωδοποίησης στη περίπτωση όλων των μεταχειρίσεων εκτός από αυτή της μικρότερης συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε (0,05 μM), η οποία δε φάνηκε να επηρεάζει το στέλεχος αναφορικά με την παραγωγή των νιτρωδών ιόντων. Αξιοσημείωτη σύμφωνα με το **Διάγραμμα 13** είναι η ανθεκτικότητα που υπέδειξε το συγκεκριμένο στέλεχος στη περίπτωση της μεταχείρισης του 1 μM , όπου ενώ τις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή φάνηκε να προκαλεί υψηλό ποσοστό μείωσης της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων, στη συνέχεια παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής των νιτρωδών με αποτέλεσμα στο τέλος του πειράματος (33 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) να φτάσει στα ίδια επίπεδα παραγωγής με το μάρτυρα (DMSO).

Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR και την αξιολόγηση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOA παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 14**. Ακριβώς πριν την προσθήκη του Nitrapyrin δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA μεταξύ των μεταχειρίσεων (one-way-ANOVA, $p=0.529$). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των αντιγράφων του εξεταζόμενου γονιδίου τις επόμενες ημέρες υπέδειξαν μια πλήρη και έμμενη αναστολή του στελέχους *Ca. N. franklandus* στη περίπτωση των υψηλότερων συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν (5 μM , 25 μM και 100 μM). Στη περίπτωση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων (0,05 και 1 μM) επίσης παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOA που ήταν ωστόσο μόνο προσωρινή (19^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό) και επανήλθε σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (33^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό).



Διάγραμμα 13: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το Nitrapyrin στις υγρές καλλιέργειες.



Χρόνος (ημέρες μετά τον εμβολιασμό)

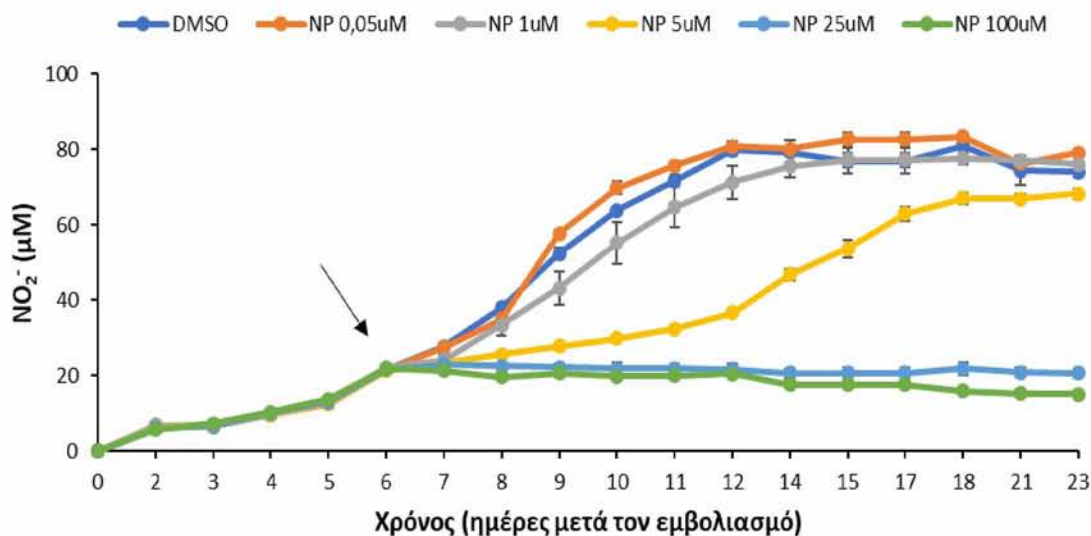
Διάγραμμα 14: Επίδραση του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.4. Επίδραση του Nitrapyrin στο στέλεχος *Ca. Nitrosotalea sinensis*

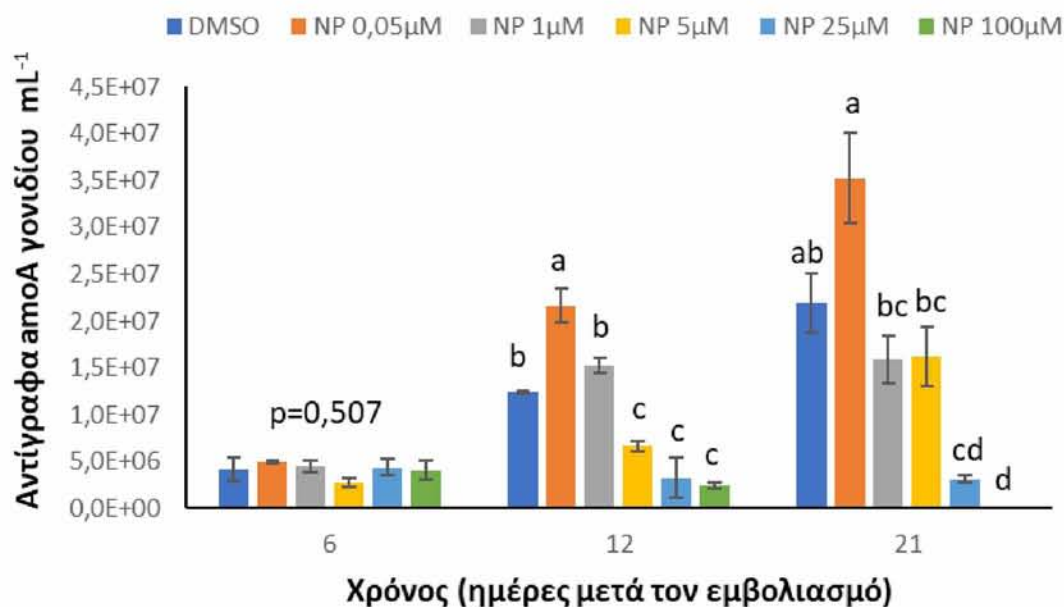
Το Nitrapyrin προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Ca. N. sinensis*, όταν εκείνο βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, στις έξι ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Τα αποτελέσματα της ανταπόκρισης του στελέχους στις διαφορετικές μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 15**. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του nitrapyrin (25 και 100 μM) οδήγησαν σε σημαντική και σταθερή μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων και το ποσοστό αναστολής της νιτρωδοποίησης ξεπέρασε το 75% συγκριτικά με το μάρτυρα (DMSO). Ακόμη, προσωρινή παρεμπόδιση παρατηρήθηκε στη μεταχείριση των 5 μM , με το στέλεχος να ανακτά τη λειτουργία του στο τέλος του πειράματος. Οι υπόλοιπες χαμηλές συγκεντρώσεις δεν φάνηκαν να αναστέλλουν σημαντικά την παραγωγή των νιτρωδών ιόντων.

Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και στην ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* (**Διάγραμμα 16**). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του Nitrapyrin (5 μM , 25 μM και 100 μM) δεν ανέστειλαν μόνο τη λειτουργία του στελέχους αλλά επηρέασαν εμφανώς και τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA. Στη περίπτωση της μεταχείρισης των 5 μM η επίδραση αυτή ήταν μόνο προσωρινή (12^η ημέρα μετά τον

εμβολιασμό). Αντίθετα, στη περίπτωση των συγκεντρώσεων 25 μM και 100 μM η μείωση της αφθονίας του μελετώμενου γονιδίου ήταν μόνιμη και εμφανής μέχρι το τέλος του πειράματος (21^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό).



Διάγραμμα 15: Επίδραση του Nitrapyrin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το Nitrapyrin στις υγρές καλλιέργειες.



Διάγραμμα 16: Επίδραση του Nitrapyrin στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

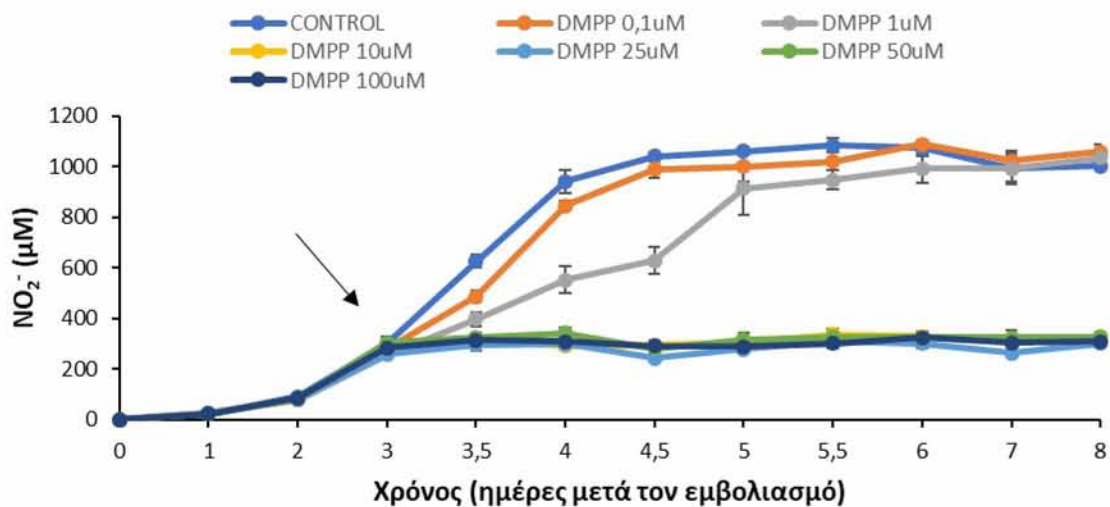
3.3. Προσδιορισμός της επίδρασης του DMPP στα AOB και AOA

Η επίδραση του παρεμποδιστή της νιτροποίησης DMPP στα στελέχη των AOB *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis* καθώς και στα στελέχη των AOA *Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis* διερευνήθηκε σε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων μεταξύ 0,1 μM – 100 μM (0.01 – 10 mg/L) για τα AOB και 0,1 mM–5 mM (10 – 500 mg/L) για τα AOA. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε στέλεχος οι επιπτώσεις των διαφορετικών συγκεντρώσεων στη λειτουργία και την αύξηση των μελετούμενων στελεχών.

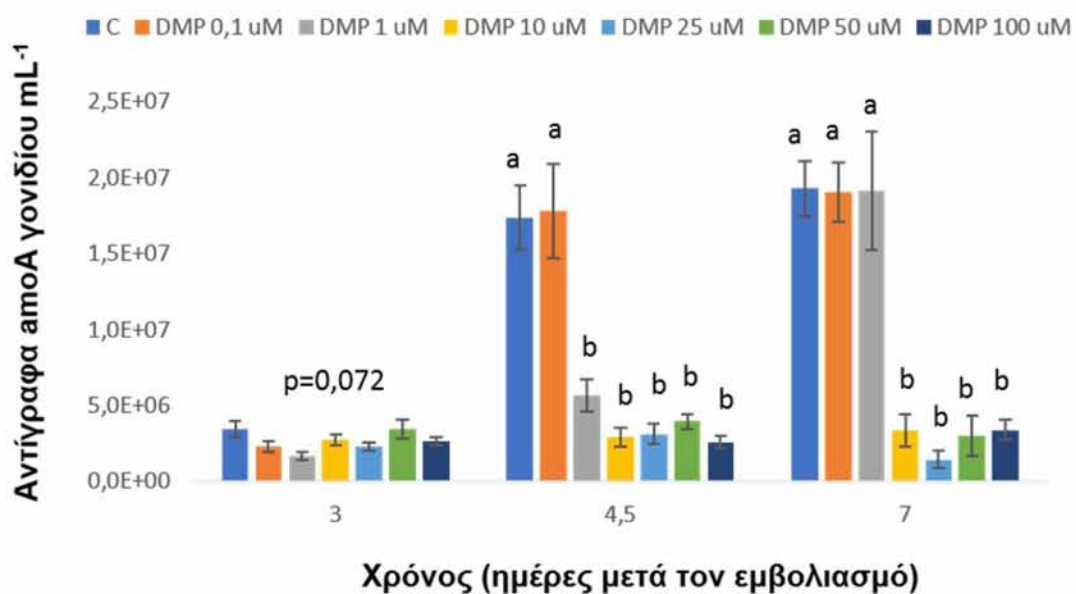
3.3.1. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος *Nitrosomonas europaea*

Η συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* σημείωσε σημαντική μείωση της τάξης του 72.9% (± 1.5), την πέμπτη ημέρα μετά την εφαρμογή του DMPP, στις μεταχειρίσεις 10, 25, 50 και 100 μM σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Control). Στο **Διάγραμμα 17** παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συγκέντρωσης των παραγόμενων νιτρωδών για όλες τις μεταχειρίσεις. Στη περίπτωση της μεταχείρισης του 1 μM παρατηρήθηκε προσωρινή αναστολή της νιτρωδοποιητικής λειτουργίας, που ωστόσο ανέκαμψε προς το τέλος του πειράματος όπου και η παραγωγή των νιτρωδών ιόντων συμβάδιζε με εκείνη του μάρτυρα (Control) και της χαμηλότερης συγκέντρωσης DMPP (0,1 μM).

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την αφθονία του γονιδίου *amoA* που προσδιορίστηκε για τους χρόνους των τριών (ακριβώς πριν την προσθήκη του DMPP), των τεσσεράμισι και των επτά ημερών. Αμέσως πριν την προσθήκη του DMPP δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα αντίγραφα του γονιδίου *amoA* των AOB μεταξύ των μεταχειρίσεων (one-way-ANOVA, $p=0,072$). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των αντιγράφων του εξεταζόμενου γονιδίου τις επόμενες ημέρες υπέδειξαν την πλήρη και μόνιμη αναστολή του στελέχους *N. europaea* από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του DMPP (10, 25, 50, 100 μM). Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 1 μM επίσης παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* που ήταν ωστόσο μόνο προσωρινή (στις 4,5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) και επανήλθε σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (7^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό). Στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης 0,1 μM αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB συγκριτικά με τη μεταχείριση του μάρτυρα, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (**Διάγραμμα 18**).



Διάγραμμα 17: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. eugoraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DMPP στις υγρές καλλιέργειες.

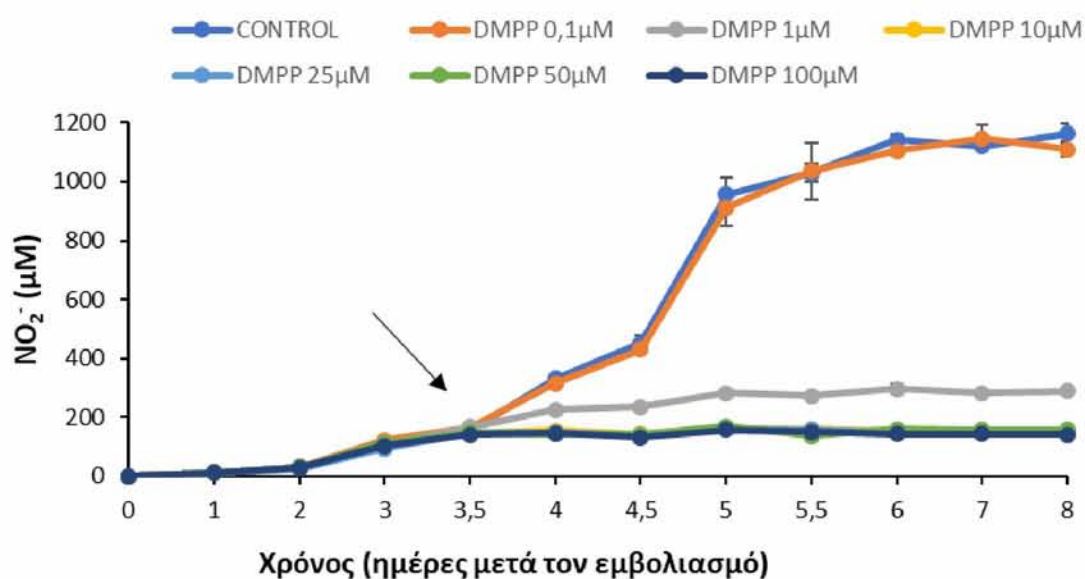


Διάγραμμα 18: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. eugoraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

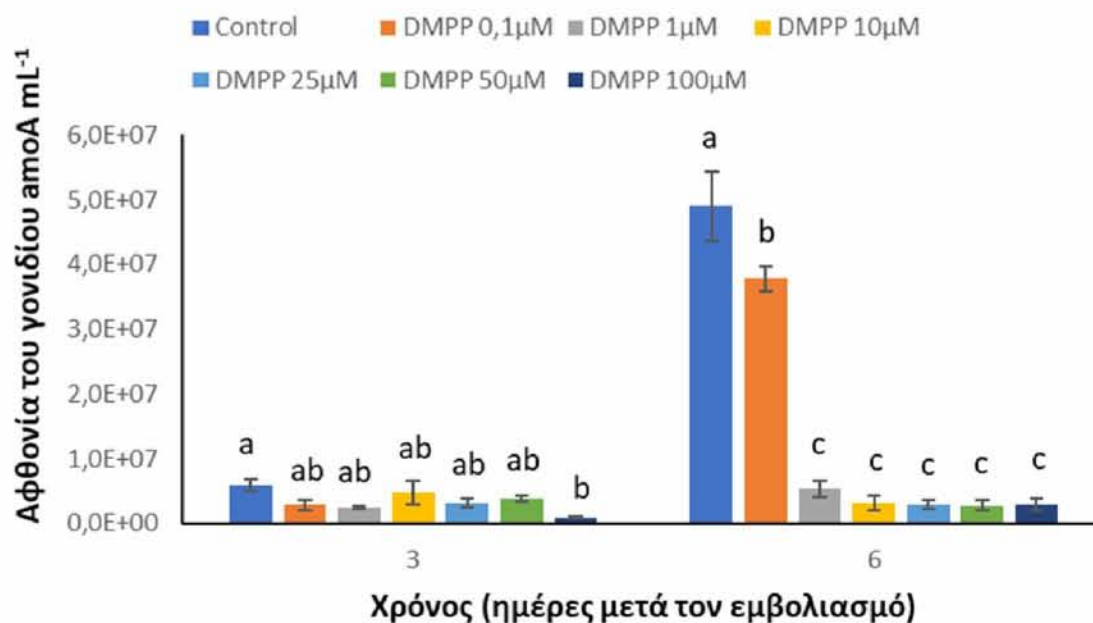
3.3.2. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος *Nitrosospira multiformis*

Το DMPP προκάλεσε σημαντική μείωση στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του στελέχους *N. multiformis* σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκε (**Διάγραμμα 19**). Η μόνη εξαίρεση εντοπίστηκε στην περίπτωση της μεταχείρισης με τη μικρότερη συγκέντρωση του DMPP (0,1 μM), όπου η παραγωγή νιτρωδών ιόντων δεν διέφερε σημαντικά συγκριτικά με αυτή στη μεταχείριση του μάρτυρα (Control). Οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις (1 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM και 100 μM) επέδειξαν ποσοστό αναστολής της νιτρωδοποίησης $\geq 80.2\%$ (± 7.2) σε σύγκριση με τον μάρτυρα την 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό.

Ανάλογη εικόνα παρατηρήθηκε και κατά την μελέτη της επίδρασης του DMPP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Συγκριτικά με το μάρτυρα (Control) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αφθονίας του εξεταζόμενου γονιδίου σε όλες τις μεταχειρίσεις (**Διάγραμμα 20**).



Διάγραμμα 19: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DMPP στις υγρές καλλιέργειες.

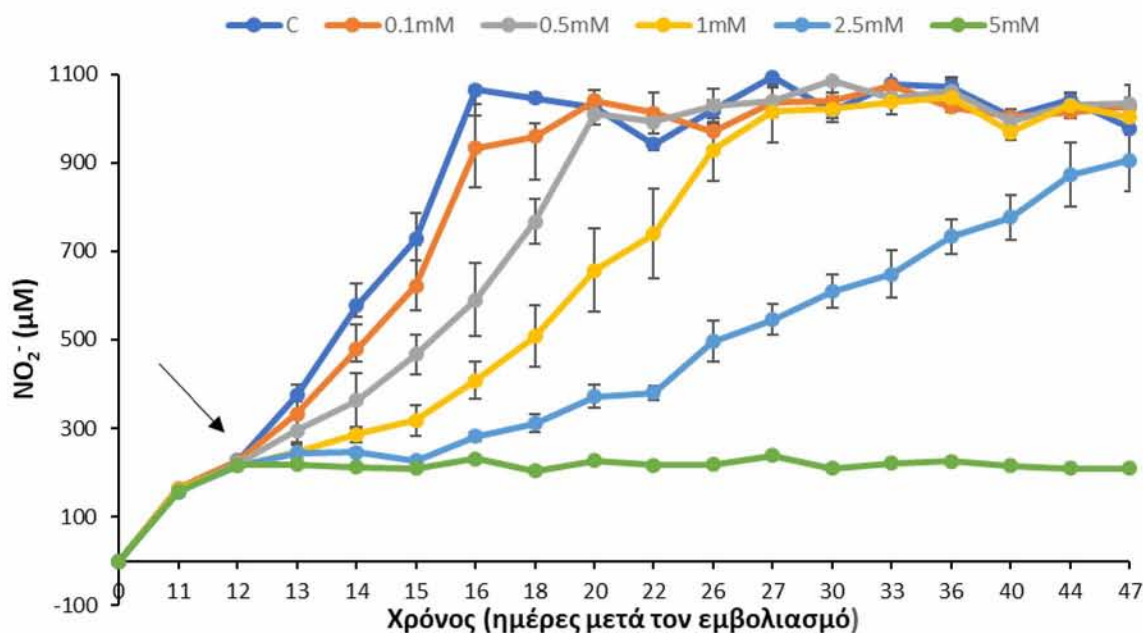


Διάγραμμα 20: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

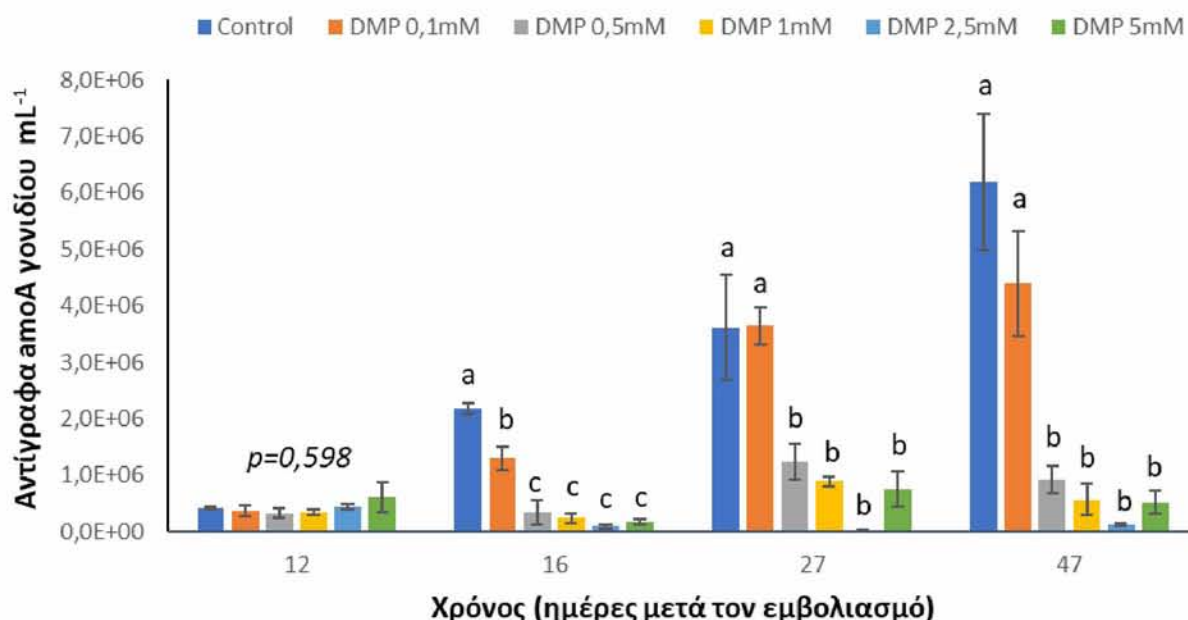
3.3.3. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος *Ca. Nitrosocosmicus franklandus*

Οι υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Ca. N. franklandus* παρουσίασαν υψηλή ανθεκτικότητα στην προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων του DMPP (Διάγραμμα 21). Μόνο στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης του DMPP (5 mM) σημειώθηκε σταθερή αναστολή της νιτρωδοποίησης, ενώ όλες οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις υπέδειξαν προσωρινή μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Control).

Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για την εξαγωγή της q-PCR παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 22. Αρχικά δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία του *amoA* γονιδίου μεταξύ των μεταχειρίσεων τη χρονική στιγμή αμέσως πριν την εφαρμογή του DMPP ($p = 0.598$). Ωστόσο, αυτή η εικόνα άλλαξε στις διάφορες μεταχειρίσεις με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των μεταχειρίσεων 0.5, 1, 2.5 και 5 mM παρατηρήθηκε σημαντική και μόνιμη μείωση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* σε σύγκριση με το μάρτυρα, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (47 ημέρες μετά τον εμβολιασμό). Εξαίρεση αποτελεί η μεταχείριση της χαμηλότερης συγκέντρωσης του DMPP (0,1 mM), όπου παρατηρήθηκε μόνο προσωρινή μείωση της αφθονίας του *amoA* γονιδίου (16η ημέρα μετά τον εμβολιασμό).



Διάγραμμα 21: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DMPP στις υγρές καλλιέργειες.

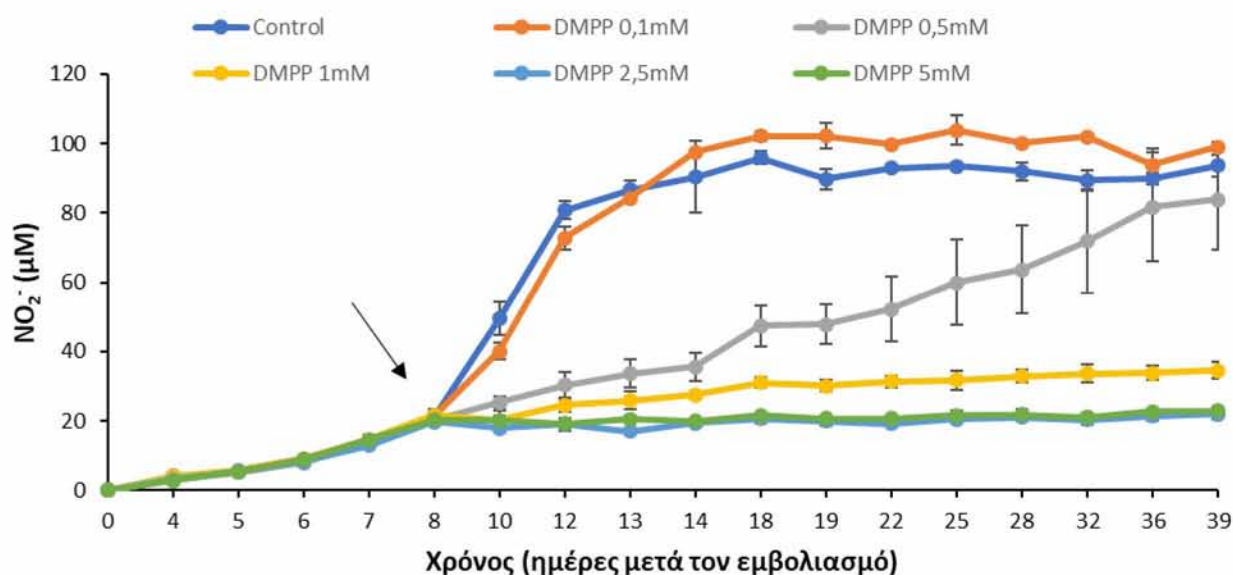


Διάγραμμα 22: Επίδραση του DMPP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

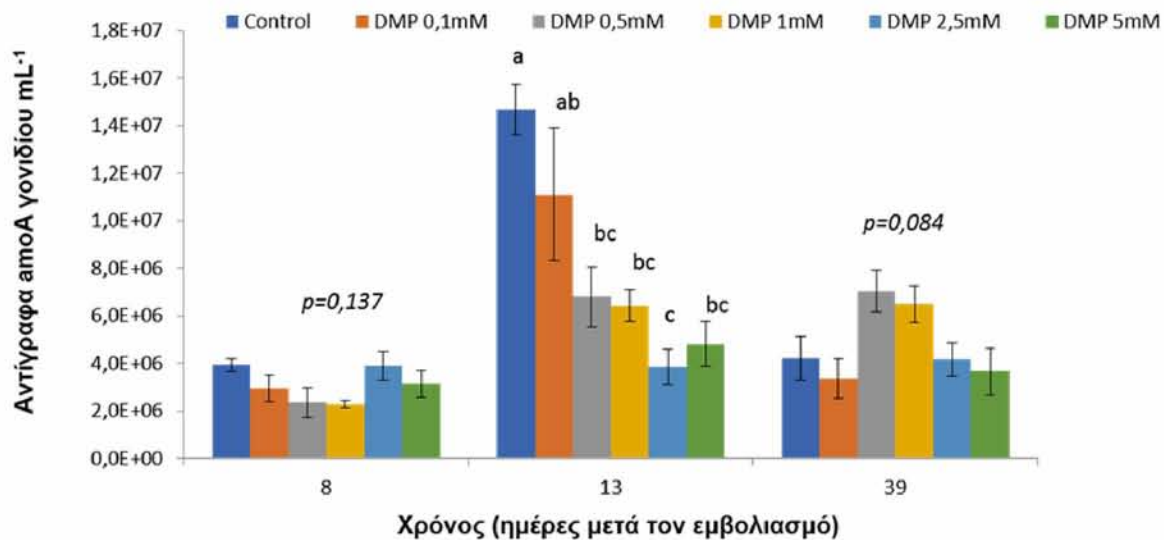
3.3.4. Επίδραση του DMPP στο στέλεχος *Ca. Nitrosotalea sinensis*

Ο παρεμποδιστής DMPP προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες του στελέχους *Ca. N. sinensis* κατά την όγδοη ημέρα όταν το στέλεχος βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα της ανταπόκρισης του στελέχους στις διαφορετικές μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 23**. Σημαντική και μόνιμη αναστολή της παραγωγής νιτρωδών ιόντων παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις των 1, 2.5 και 5 mM. Παράλληλα, στην περίπτωση της μεταχείρισης των 0.5 mM παρατηρήθηκε μόνο προσωρινή μείωση της παραγωγής των νιτρωδών, με υψηλότερο ποσοστό αναστολής της νιτρωδοποίησης (60.73%) έναντι του μάρτυρα (Control) κατά τη 14^η ημέρα και ανάκαμψη της νιτρωδοποιητικής λειτουργίας στο τέλος του πειράματος (39^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό).

Αναφορικά με τη μελέτη της επίδρασης του DMPP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* στο στέλεχος *Ca. N. sinensis*, εξετάστηκαν οι χρόνοι που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 24**. Η αρχική ανάλυση των δειγμάτων πριν την προσθήκη του DMPP, δεν υπέδειξε σημαντικές στατιστικές διαφορές στην αφθονία του γονιδίου *amoA* στις διάφορες μεταχειρίσεις ($p=0,137$). Στην περίπτωση των μεταχειρίσεων 0.5, 1, 2.5 και 5 mM παρατηρήθηκε σημαντική αλλά μόνο προσωρινή μείωση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* σε σύγκριση με το μάρτυρα, κατά την 13^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Αντίθετα, η χαμηλότερη συγκέντρωση του DMPP (0,1mM) δεν επηρέασε την αφθονία του *amoA* γονιδίου καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος (39 ημέρες).



Διάγραμμα 23: Επίδραση του DMPP στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το DMPP στις υγρές καλλιέργειες.



Διάγραμμα 24: Επίδραση του DMP στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. sinensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Συζήτηση- Συμπεράσματα

4.1. Συζήτηση

Η χρήση συνθετικών παρεμποδιστών της νιτροποίησης αποσκοπεί στην επιβράδυνση της μετατροπής του NH_4^+ σε NO_2^- . Η καθυστέρηση αυτή του πρώτου σταδίου της νιτρωδοποίησης, καθιστά το NH_4^+ στο έδαφος διαθέσιμο στα φυτά για μεγαλύτερη χρονική περίοδο μειώνοντας έτσι την παραγωγή νιτρικών ιόντων (NO_3^-) (Ruser and Schulz, 2015).

Η επιλογή του κατάλληλου παρεμποδιστή απαιτεί την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης αλλά και τη γνώση των κυτταρικών και μεταβολικών διαφορών των μικροοργανισμών-στόχων, που καθορίζουν την ευαισθησία τους ως προς την παρεμπόδιση της νιτροποίησης (Shen et al., 2013). Οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των παρεμποδιστών νιτροποίησης στη μικροβιακή κοινότητα σε επίπεδο μικροκόσμων εδάφους, ενώ περιορισμένος αριθμός μελετών εντοπίζεται σχετικά με τη δράση τους σε *in vitro* μελέτες αντιπροσωπευτικών στελεχών AOB και AOA. Επίσης, αρκετοί από τους γνωστούς παρεμποδιστές νιτροποίησης, όπως το DCD και το DMPP εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των AOB, χωρίς να είναι ταυτόχρονα εξίσου αποτελεσματικοί έναντι των AOA (Dong et al., 2013, Guo et al., 2013), καθιστώντας αμφίβολη την αποτελεσματικότητά τους. Αυτή η επιλεκτική τους δράση πιθανόν να οφείλεται στις βιοχημικές και δομικές διαφορές που εμφανίζουν μεταξύ τους αυτές οι δύο ομάδες μικροοργανισμών (Kleineidam et al. 2011, Shen et al., 2013). Με βάση τα παραπάνω κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση της επίδρασης των παρεμποδιστών νιτροποίησης με *in vitro* δοκιμές σε αντιπροσωπευτικά στελέχη που συμμετέχουν στη διεργασία οξείδωσης της αμμωνίας ώστε να καθοριστεί με ακρίβεια η ικανότητα των γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης να παρεμποδίζουν την δράση των AOA και AOB. Στο πλαίσιο αυτό στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η *in vitro* αξιολόγηση της επίδρασης των τριών και ευρέως διαδεδομένων, εμπορικών παρεμποδιστών της νιτροποίησης DCD, Nitrapyrin και DMPP, σε αντιπροσωπευτικά εδαφογενή στελέχη νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (*N. europaea* και *N. multiformis*) και νιτρωδοποιητικών αρχαίων (*Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*).

Προηγούμενες μελέτες μικροκόσμων εδάφους που επικεντρώθηκαν στην επίδραση του DCD στην αφθονία του γονιδίου *amoA* καθώς και στη συσσώρευση και την παραγωγή των νιτρωδών ιόντων, έδειξαν υψηλή ανασταλτική δράση επί των AOB και περιορισμένη επί των AOA (Gong et al., 2013, O'Callaghan et al., 2009, Di et al., 2009, 2010). Ακόλουθες μελέτες των Yang et al., (2017), σχετικά με την ανασταλτική δράση του DCD σε δείγματα όξινου εδάφους (pH 5,4), έδειξαν μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOB σε σύγκριση με το μάρτυρα ενώ δεν

παρατηρήθηκε διαφορά στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA. Ακόμη μία έρευνα των Wang et al., (2016) έδειξε ότι η προσθήκη ουρίας στο έδαφος αύξησε σημαντικά την αφθονία των AOB ενώ δεν επηρέασε τα AOA καθώς και ο συνδυασμός DCD και ουρίας μείωσε την αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB και δεν επηρέασε την αφθονία του αντίστοιχου γονιδίου των AOA.

Στη παρούσα εργασία οι υγρές καλλιέργειες των μελετούμενων AOB και AOA ανταποκρίθηκαν διαφορετικά στις μεταχειρίσεις του DCD με τα αποτελέσματα μας να βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των παραπάνω μελετών μικροκόσμων εδάφους, υποδεικνύοντας τα AOB ως πιο ευαίσθητα στην επίδραση του συγκεκριμένου παρεμποδιστή. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που επηρέασαν τη λειτουργία αλλά και την ανάπτυξη των AOB ήταν κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες των AOA που εφαρμόστηκαν (500 μM έναντι 2500 μM). Επιπλέον, επιμέρους διαφορές ως προς την ανταπόκριση στις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν, εντοπίστηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων AOB όσο των AOA.. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η λειτουργία και η αύξηση του *N. europaea* στην μεταχείριση των 250 μM παρουσίασε υψηλότερο ποσοστό αναστολής σε σχέση με την προσωρινή αναστολή που παρατηρήθηκε για το *N. multiformis* στην ίδια συγκέντρωση. Ωστόσο, σε παρόμοια *in vitro* μελέτη οι Shen et al., (2013) παρατήρησαν σημαντική αναστολή της νιτρωδοποίησης, με μετρήσεις παραγωγής και συσσώρευσης νιτρωδών ιόντων, στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του DCD (40-100 μM).

Παράλληλα, διαφορετική ήταν η επίδραση των μεταχειρίσεων του DCD στα στελέχη των AOA που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, με το *Ca. N. franklandus* να αποδεικνύεται πιο ανθεκτικό από το *Ca. N. sinensis*. Συγκεκριμένα, πλήρης αναστολή της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων αλλά και σημαντική μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* παρατηρήθηκε στο στέλεχος *Ca. N. sinensis* σε συγκεντρώσεις $\text{DCD} \geq 1\text{mM}$ σε αντίθεση με το στέλεχος *Ca. N. franklandus* το οποίο παρουσίασε υψηλή αναστολή της νιτρωδοποιητικής του λειτουργίας και μείωση των αντιγράφων του εξεταζόμενου γονιδίου σε συγκεντρώσεις $\text{DCD} \geq 2,5 \text{ mM}$. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές *in vitro* αξιολόγησης της δράσης του DCD επί των εξεταζόμενων στελεχών. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες των Shen et al., (2013) που επικεντρώθηκαν στην επίδραση του DCD σε ένα άλλο εδαφογενές στέλεχος AOA, το *Ca. Nitrososphaera viennensis*, έδειξαν μείωση της συσσώρευσης των παραγόμενων νιτρωδών σε συγκεντρώσεις $\geq 1,2 \mu\text{M}$. Παρόμοια *in vitro* μελέτη από τους Lethorvita-Morley et al. (2013) ανέδειξε την ανασταλτική δράση του DCD στη λειτουργία και στην ανάπτυξη των υγρών καλλιεργειών του *Nitrosotalea devanatera* σε συγκεντρώσεις $\geq 1\text{mM}$.

Οι συγκεντρώσεις του Nitrapyrin που επιλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν ήταν χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές του DCD. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία το nitrapyrin έχει αποδειχθεί να αναστέλλει αποτελεσματικά τη νιτρωδοποίηση τόσο των AOB και των AOA (Shen et al., 2013). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της παραπάνω μελέτης αναφορικά με την ικανότητα του

Nitrapyrin να παρεμποδίζει αυτές τις δύο ομάδες μικροοργανισμών, ενώ εντοπίστηκαν περεταίρω διαφορές ως προς την ευαισθησία των εξεταζόμενων στελεχών AOB και AOA. Η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε μόνιμη αναστολή στην παραγωγή και τη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* ήταν εκείνη των 5 μM , η οποία και επηρέασε σημαντικά και την αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στο συγκεκριμένο στέλεχος. Σε μία αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Vannelli and Hooper (1992) σχετικά με την επίδραση του Nitrapyrin σε υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* παρατηρήθηκε αναστολή της νιτρωδοποίησης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ($\text{NP} \geq 10 \mu\text{M}$). Συγκρίνοντας τα δύο εξεταζόμενα στελέχη των AOB, το *N. multiformis* αποδείχθηκε πιο ευαίσθητο σε όλες τις μεταχειρίσεις του Nitrapyrin που εφαρμόστηκαν.

Παρόμοιες διαφορές εντοπίστηκαν και στα στελέχη των AOA, με το *Ca. N. franklandus* να εμφανίζεται πιο ευαίσθητο έναντι του *Ca. N. sinensis*. Συγκεκριμένα, προσωρινή αναστολή της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων αλλά και πολύ χαμηλός αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA* παρατηρήθηκαν στη μεταχείριση του 1 μM στο στέλεχος *Ca. N. sinensis* σε αντίθεση με το *Ca. N. franklandus*, στις καλλιέργειες του οποίου στην ίδια συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή. Δεδομένης της απαιτητικότητας και της δυσκολίας αυτών των μικροοργανισμών να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες το εύρος ανάλογων μελετών είναι περιορισμένο, με τις περισσότερες έρευνες να κατευθύνονται σε μεταγονιδιωματικές αναλύσεις για τον εντοπισμό τους στις μικροβιακές κοινότητες των εδαφών. Μία έρευνα των Lehtorvita et al., (2013) επικεντρώθηκε στις επιδράσεις τριών ΠΝ (allythiourea, DCD, nitrapyrin) στη λειτουργία και την αύξηση ενός άλλου εδαφογενούς στελέχους των AOA, το *Nitrosotalea devanattera*, τόσο σε υγρές καλλιέργειες όσο και στο έδαφος. Οι συγκεντρώσεις του NP που εφαρμόστηκαν στις υγρές καλλιέργειες του *N. devanattera* στην ανωτέρω έρευνα κάλυπταν ένα εύρος από 0 έως 50 μM προκαλώντας πλήρη αναστολή της νιτρωδοποίησης στη μεταχείριση των 10 μM . Ακόμη, μία in vitro μελέτη των Shen et al., (2013) εντόπισε σημαντική αναστολή της νιτρωδοποίησης από το nitrapyrin σε ένα άλλο στέλεχος των AOA, το *Nitrososphaera viennensis*, σε συγκέντρωση 173 μM .

Οι συγκεντρώσεις του DMPP που επιλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν στα εξεταζόμενα στελέχη των AOB και των AOA διέφεραν μεταξύ τους. Οι μεταχειρίσεις που ανέστειλαν τη λειτουργία και την ανάπτυξη των AOB ήταν πολύ χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που εφαρμόστηκαν στα AOA (10 μM έναντι 2,5 mM), αποδεικνύοντας έτσι την υψηλότερη ανθεκτικότητα των AOA στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή. Σύμφωνα με μελέτη των Zhang et al., (2018), παρατηρήθηκε αναστολή της νιτρωδοποίησης με τη χρήση DMPP στο έδαφος με παράλληλη μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA. Ακόμη, οι Florio et al., (2014) εξέτασαν την επίδραση του DMPP σε μικροκόσμους εδάφους και παρατήρησαν μείωση του αριθμού μεταγράφων του γονιδίου *amoA* τόσο των AOB όσο και των AOA. Η επίδραση του DMPP στη μείωση της νιτρωδοποιητικής

λειτουργίας των AOB και των AOA σε συνθήκες εδάφους σύμφωνα με μία μελέτη των Shi et al., (2016), φαίνεται να επηρεάζεται από το pH και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα του παρεμποδιστή σε όξινες συνθήκες.

Αναφορικά με την επίδραση του DMPP στις υγρές καλλιέργειες των AOB, το στέλεχος *N. europaea* αναδείχθηκε περισσότερο ανθεκτικό από το *N. multiformis*. Συγκεκριμένα, μόνιμη αναστολή της λειτουργίας αλλά και σημαντική μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* (σε σύγκριση με το μάρτυρα) παρατηρήθηκε στην περίπτωση του στελέχους *N. multiformis* σε επίπεδα συγκέντρωσης 1μM, σε αντίθεση με το στέλεχος *N. europaea* το οποίο στην ίδια συγκέντρωση παρουσίασε προσωρινή αναστολή.

Παρόμοιες διαφορές στην δράση του DMPP εντοπίστηκαν και στα στελέχη των AOA, με το *Ca. N. sinensis* να εμφανίζεται πιο ευαίσθητο έναντι του *Ca. N. franklandus*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός πως ενώ το στέλεχος *Ca. N. franklandus* επέδειξε χαμηλή ευαισθησία στη μεταχείριση των 2,5 mM DMPP αναφορικά με την παραγωγή και τη συσσώρευση των νιτρωδών, η αφθονία του γονιδίου *amoA* περιορίστηκε σημαντικά σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control). Αντίθετα, στη περίπτωση του στελέχους *Ca. N. sinensis* και ενώ η λειτουργία του φάνηκε να επηρεάζεται προσωρινά από τη συγκέντρωση 0,5 mM που χρησιμοποιήθηκε, παρατηρήθηκε μείωση των αντιγράφων του εξεταζόμενου γονιδίου σε σύγκριση με το μάρτυρα (Control).

4.2. Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων γνωστών παρεμποδιστών της νιτροποίησης (DCD, Nitrapyrin, DMPP) στην ανάπτυξη και στη λειτουργία δύο AOB (*N. europaea* και *N. multiformis*) και δύο AOA (*Ca. Nitrosocosmicus franklandus* και *Ca. Nitrosotalea sinensis*). Τα αποτελέσματα μας συνολικά έδειξαν ότι η ομάδα των AOA παρουσιάζει υψηλότερη ανθεκτικότητα έναντι των AOB στα DCD και DMPP.

Μεταξύ των δύο στελεχών των AOB που αξιολογήθηκαν, το *N. multiformis* εμφάνισε υψηλότερη ευαισθησία σε όλους τους παρεμποδιστές που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με το *N. europaea*. Παρόμοιες διαφορές στην ευαισθησία παρατηρήθηκαν και μεταξύ των AOA που μελετήθηκαν με το στέλεχος *Ca. N. sinensis* να εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία στους παρεμποδιστές νιτροποίησης σε σχέση με το *Ca. N. franklandus*. Τέλος, ισχυρότερος παρεμποδιστής αναδείχθηκε το Nitrapyrin και για τις δύο ομάδες μικροοργανισμών, με το DMPP και το DCD να έπονται.

Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιάσουν στη διερεύνηση της δράσης των παρεμποδιστών νιτροποίησης σε εδαφογενή βακτήρια *commenox* που δεν έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί ως τώρα. Επιπρόσθετες μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στην αποκάλυψη πιθανών τοξικών επιδράσεων των παραπάνω

παρεμποδιστών νιτροποίησης σε μικροοργανισμούς μη στόχους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abalos, D., Jeffery, S., Sanz-Cobena, A., Guardia, G., Vallejo, A. (2014). Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agric Ecosyst Environ*, 189: 136-144
- Arp, D. J., Stein, L. Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio*, 38: 471-495
- Babbin, A.R., Keil, R.G., Devol, A.H., Ward, B.B. (2014). Oxygen control nitrogen loss in the ocean. *Science*, 344:406-8
- Barth, G., Tucher, S., von Schmidhalter, U. (2001). Influence of soil parameters on the effect of 3,4-dimethylpyrazole phosphate as nitrification inhibitor. *Biol Fertil Soils*, 34: 98-102
- Beeckman, F., Motte, H., Beeckman, T. (2018). Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology*, 166-173
- Bell, M.J., Cloy, J.M., Topp, C.F.E., Ball, A., Bagnall, R.M., Rees, D.R. (2016). Quantifying N₂O emissions from intensive grassland production: the role of synthetic fertilizer type, application rate, timing and nitrification inhibitors. *J. Agric. Sci.*, 154: 812-827
- Beman, J.M., & Francis, C.A. (2006). Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypereutrophic subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Appl Environ Microb*, 72: 7767-7777
- Benckiser, G., Scharrel, T., & Weiske, A. (2015). Control of NO₃ - and N₂O emissions in agroecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 35: 1059-1074
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol.*, 6:245-52
- Bruns, MA., Stephen, JR., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I., Paul, E.A. (1999). Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2994-3000
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, N., Whittaker, M., Arp, D. (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol.*, 185:2759-73
- Chen, Q., Qi, L., Bi, Q., Dai, P., Sun, D., Sun, C., Liu, W., Lu, L., Ni, W., Lin, X. (2015). Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99:477-87
- Costa, E., Pérez, J., Kreft, J-U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol.*, 14:213-219.
- Daims, H., Lebedeva, EV., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, RH., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, PH., Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature.*, 528:504-509

- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Konneke, M., & Stahl, D.A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol.*, 10: 810–818.
- Dong, X. X., Zhang, L. L., Wu, Z. J., Li, D. P., Shang, Z. C., Gong, P. (2013). Effects of the nitrification inhibitor DMPP on soil bacterial community in a Cambisol in northeast China. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 13:580–591
- Florio, A., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Jhurreea, D., Benedetti, A., (2014). Effects of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 50: 795–807.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., and Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 14683–14688.
- Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y., Li, L. (2018). Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Front Environ Sci Eng.*12:1–15.
- Godfrey, L.V., Glass, J.B., (2011). The geochemical record of the ancient nitrogen cycle, nitrogen isotopes, and metal cofactors. *Methods Enzymol.*, 486: 483–506.
- Goos, R.J., and Johnson B.E. (1999). Performance of two nitrification inhibitors over a winter with exceptionally heavy snowfall. *Agron. J.*, 91:1046–1049
- Goring, C.A.I. (1962a) Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine. *Soil Sci.*, 93:431–439
- Guo, Y. J., Di, H. J., Cameron, K. C., Li, B., Podolyan, A., Moir, J. L., Monaghan, R. M., Smith, L. C., O'Callaghan, M., Bowatte, S., Waugh, D., He, J.-Z. (2013). Effect of 7-year application of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on soil microbial biomass, protease and deaminase activities, and the abundance of bacteria and archaea in pasture soils. *J. Soil. Sediment.*, 13: 753–759
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2010). Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiol Ecol.*, 74:566-74.
- Hastings, R.C., Ceccherini, M.T., Miclaus, N., Saunders, J.R., Bazzicalupo, M., McCarthy, A.J. (1997). Direct molecular biological analysis of ammonia-oxidizing bacteria population in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 45–54
- He, J.Z., Shen, J.P., Zhang, L.M., Zhu, Y.G., Zheng, Y.M., Xu, M.G, Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammoniaoxidizing archaea of a Chinese upland red soil under longterm fertilization practices. *Environ Microbiol.*, 9: 2364–2374.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol.*, 139: 1147–1153
- Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R., Seefeldt, L.C. (2014). Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Chem. Rev.*, 114: 4041–4062

- Hu, H.W., He, J.Z. (2017). Comammox-a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *J Soils Sediments*, 17:2709– 2717
- Huijsmans, J.F.M., Hol, J.M.G., Hendriks, M.M.W.B. (2001). Effect of application technique, manure characteristics, weather and field conditions on ammonia volatilization from manure applied to grassland. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.*, 49: 323-342
- Hyman, M. R., Arp, D. J. (1992). $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 267: 1534–1545
- Hyman, M. R., Russell, S. A., Ely, R. L., Williamson, K. J., Arp, D. J. (1995). Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1480–1487.
- Irigoyen, I., Muro, J., Azpilikueta, M., Aparicio-Tejo, P., Lamsfus, C. (2003). Ammonium oxidation kinetics in the presence of nitrification inhibitors DCD and DMPP at various temperatures. *Aust. J. Soil Res.*, 41: 1177–1183.
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O. S., Junier, T., Witzel, K.P., Imhoff, J.F. (2010). Phylogenetic and functional marker gene to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 425–440
- Kamer, M.B., DeLong, E.F., Karl, D.M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 409:507
- Keener, W. K., Arp, D. J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2501–2510
- Kelliher, F. M., Clough, T. J., Clark, H., Rys, G., Sedcole, J. R. (2008). The temperature dependence of dicyandiamide (DCD) degradation in soils: a data synthesis. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1878–1882
- Khadka, R., Clothier, L.N., Wang, L., Lim, C.K., Klotz, M.G., Dunfield, P. (2018). Evolutionary History of Copper Membrane Monooxygenases. *Publ. in Front. Microbiol.*
- Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daebeler, A., Romano, S., Albertsen, M., Stein, L.Y., Daims, H., Wagner, M. (2017). Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549:269–272
- Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schlöter M. (2011). Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere*, 84:182-6
- Klotz, M.G., Arp, D.J., Chain, P.S. et al (2006). Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. *Appl Environ Microbiol.*, 72:6299–6315
- Knowles, R., (1982). Denitrification, *Microbiol. Revs.*, 46: 43
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437:543–6
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular

microbiology ecology. Annu. Rev. Microbiol., 55: 485–529

- Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. Nat Rev Microbiol., 16:263–76
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M., (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47: 569–593
- Lehtovirta-Morley, L. E., Verhamme, D. T., Nicol, G. W., Prosser, J. I. (2013). Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil ' Soil Biology and Biochemistry, vol. 62:129-133
- Leininger, S., Ulrich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 442: 806– 809.
- Lücker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., and Daims, H. (2013). The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. Front Microbiol. 4:27
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B. et al. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. Proc Natl Acad Sci USA., 107:13479–13484.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R., Stahl, D.A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. Nature, 461:976–9
- McCarty, G. W. (1999). Mode of action of nitrification inhibitors. Biol. Fert. Soils, 29: 1–9
- McTavish, H., Fuchs, J.A., Hooper, A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. J Bacteriol., 175:2436–2444
- Nakagawa, T., Mori, K., Kato, C., Takahashi, R., & Tokuyama, T. (2007). Distribution of cold-adapted ammonia-oxidizing microorganisms in the deep-ocean of the northeastern Japan Sea. Microbes Environ, 22: 365–372
- Navarro-Gonzalez, R., McKay, C. P., Mvondo, D. N. (2001). A possible nitrogen crisis for Archaeal life due to reduced nitrogen fixation by lightning. Nature, 412: 61–64
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J.I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environ Microbiol., 10: 2966–2978.
- Nicol, G.W., Schleper, C. (2006). Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? Trends Microbiol., 14:207–212
- Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y., & Klotz, M.G. (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Arch. Microbiol., 177: 139-149
- Nugroho, R.A., Roling, W.F., Laverman, A.M., Zoomer, H.R., Verhoef, H.A. (2005). Presence of *Nitrospira* cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scots pine forest soils. FEMS Microbiol. Ecol., 53: 473–481
- Oshiki, M., Satoh, H., Okabe, S. (2016). Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing

- bacteria. *Environ Microbiol.*, 18:2784–96.
- Palomo, A., Pedersen, A.G., Fowler, S.J., Dechesne, A., Sicheritz-Pontén, T., Smets, B.F. (2018). Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira*. *ISME J.*, 12:1779–1793
- Pasda, G., Hähndel, R., Zerulla, W. (2001). Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (=3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol Fertil Soils*, 34: 85-97
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E., Loy, A., Wagner, M., Daims, H. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. *Environ Microbiol.*, 16:3055–3071
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Grongroft, A., Richter, A., Overmann, J., et al. (2012). *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol.*, 14: 525–539
- Phillips, C.J., Harris, D., Dollhopf, S.L., Gross, K.L., Prosser, J.I., Paul, E.A. (2000). Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 5410–5418
- Reay, D. S., Davidson, E. A., Smith, K. A., Smith, P., Melillo, J. M., Dentener, F., & Crutzen, P. J. (2012). Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature Climate Change*, 2: 410-416
- Reigstad, L.J., Richter, A., Daims, H., Urich, T., Schwark, L., & Schleper, C. (2008). Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol Ecol.*, 64: 167–174
- Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wösten, H.A.B., Sollins, P. (2007). Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry*, 85: 25–44.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 4704–4712.
- Rousidou C, Papadopoulou SE, Kortsinidou M, Giannakou O, Singh D, U. Menkissoglu-Spiroudi BK, Karpouzas DG. (2013). Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology & Biochemistry*, 67:98-105
- Ruser, R., Schulz, R. (2015). The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils-a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 178:171–188
- Santi, C., D. Bogusz, C. Franche (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.*, 111:743-67
- Sauder, L.A., Ross, A.A., Neufeld, J.D. (2016). Nitric oxide scavengers differentially inhibit ammonia oxidation in ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 363
- Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, J. J. Alzerreca, D. J. Arp, J. M. Norton, and M. G. Klotz. (1998). Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.*, 167:81-88.
- Scharf, P.C., Shannon, D.K., Palm, H.L. et al. (2011). Sensor-based nitrogen application out-

- performed producer-chosen rates for corn in on-farm demonstrations. *Agron J.*, 103: 1683–91.
- Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B., van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J.G., Wagner, M., Sinninghe, Damste J.S., Kuypers, M., Revsbech, N.P., Mendez, R., Jetten, M.S., Strous, M. (2005). Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, 71:1677–1684
- Shen, T., Stieglmeier, M., Dai, J., Urich, T., Schleper, C. (2013). Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospirillum multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 344: 121–129
- Signor, D., and Cerri, C.E.P. (2013). Nitrous oxide emissions in agricultural soils: a review. *Pesq Agropecu Trop.*, 43:322–338
- Singh, J., Saggar, S., Giltrap, D. L., Bolan, N. S. (2008). Decomposition of dicyandiamide (DCD) in three contrasting soils and its effect on nitrous oxide emission, soil respiratory activity, and microbial biomass—an incubation study. *Aust. J. Soil Res.*, 46: 517–525
- 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. *Environ. Practice*, 9: 266–279
- Skinner FA, Walker N. (1961). Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Archives in Microbiology*, 38: 339–349.
- Sorokin, D.Y., Lucker, S., Vejmekova, D., Kostrikina, N.A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W.I., Damste, J.S., Le Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M.C., Daims, H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME J.*, 6: 2245–2256
- Spang, A., Poehlein, A., Offre, P., Zumbragel, S., Haider, S., Rychlik, N., Nowka, B., Schmeisser, C., Lebedeva, E.V., Rattei, T., Böhm, C., Schmid, M., Galushko, A., Hatzenpichler, R., Weinmaier, T., Daniel, R., Schleper, C., Spieck, E., Streit, W., Wagner, M. (2012). The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. *Environ Microbiol.*, 14: 3122–3145
- Stein, LY., Arp, D.J., Berube, P.M. et al (2007). Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environ Microbiol.*, 9:2993–3007
- Stephen, JR., McCaig, A.E., Smith, Z. et al. (1996). Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4147–4154
- Subbarao, G.V, Rondon, M., Ito, O., Ishikawa, T., Rao, I.M., Nakahara, K., Lascano, C., Berry, W.L. (2007). Biological nitrification inhibition (BNI)—is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil*, 294:5–18.
- Subbarao, GV., Ito, O., Sahrawat, KL., Berry, WL., Nakahara, K., Ishikawa, T., Watanabe, T., Suenaga, K., Rondon, M., Rao, IM. (2006a). Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems –Challenges and opportunities. *Crit Rev Plant Sci.*, 25:303–

- Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (2005). Principles and Applications of Soil Microbiology. second ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Teske, W., Matzel, W. (1988). Die Beeinflussung der nitrifikationshemmenden Wirkung von Dicyandiamid durch Abbau und Verlagerung im Boden. Arch Acker Pflanzenbau Bodenkd., 32:241–246
- Trenkel, M. (1997). Improving fertilizer use efficiency controlled release and stabilized fertilizers in agriculture. International Fertilizer Industry Association, Paris
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schlepper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amorelated proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. Environ. Microbiol., 7:1985–1995.
- Urakawa, H., Tajima, Y., Numata, Y., & Tsuneda, S. (2008). Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. Appl Environ Microb., 74: 894–900
- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1246–1251
- van Kessel, M.A., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., den Camp, H.J.O., Kartal, B., Jetten, M.S., Lucker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. Nature, 528:555–559.
- Vannelli, T., Hooper, A. B. (1992). Oxidation of nitrapyrin to 6-chloropicolinic acid by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol., 58: 2321–2325
- Venter, J.C., Remington, K., JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen DI, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science, 304:66 –74
- Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. The ISME Journal 5, 1067–1071
- Walker, CB., de La Torre, J.R., Klotz, M.G., Urakawa, H., Pinel, N., Arpd, D.J., Brochier-Armanet, C., Chainf, P.S.G., Chani, P.P., Gollabgirj, A., Hemph, J., Hüglerl, M., Karm, E.A., Könnekeo M, Shinf M, Lawtonp TJ, Loweit, MartensHabbenaa W, Sayavedra-Sotod LA, Langf, D., Sievertq, S.M., Rosenzweigp, A.C., Manningj, G., Stahl, D.A. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. Proc Natl Acad Sci USA., 107:8818–8823
- Wang, Y., Ma, L., Mao, Y., Jiang, X., Xia, Y., Yu, K., Li, B., Zhang, T. (2017). Comammox in drinking water systems. Water Res., 116:332–341
- Weber, E.B., Lehtovirta-Morley, L.E., Prosser, J.I., Gubry-Rangin, C. (2015). Ammonia oxidation is not required for growth of Group 1.1c soil Thaumarchaeota. FEMS Microbiol Ecol 91
- Winogradsky S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann Inst Pasteur 4:213–331.
- Winogradsky, S. (1892). Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. Arch Sci

Biol (St Petersburg), 1: 88–137

Wrage, N., Velthof, G. L., Van Beusichem, M. L. & Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1723–1732

Zerkle, A., and S. Mikhail (2017). The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle, *Geobiology*, 15: 343–352

Zerulla W, Barth T, Dressel J, Erhardt K, Horchler von Locquenghien K, Pasda G, Rädle M, Wissemeier, A.H (2001). 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol Fertil Soils*, 34:79–84.

Zhang, M., Wang, W., Bai, S. H., Zhou, X., Teng, Y., & Xu, Z. (2018). Antagonistic effects of nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate and fungicide iprodione on net nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 116: 167–170