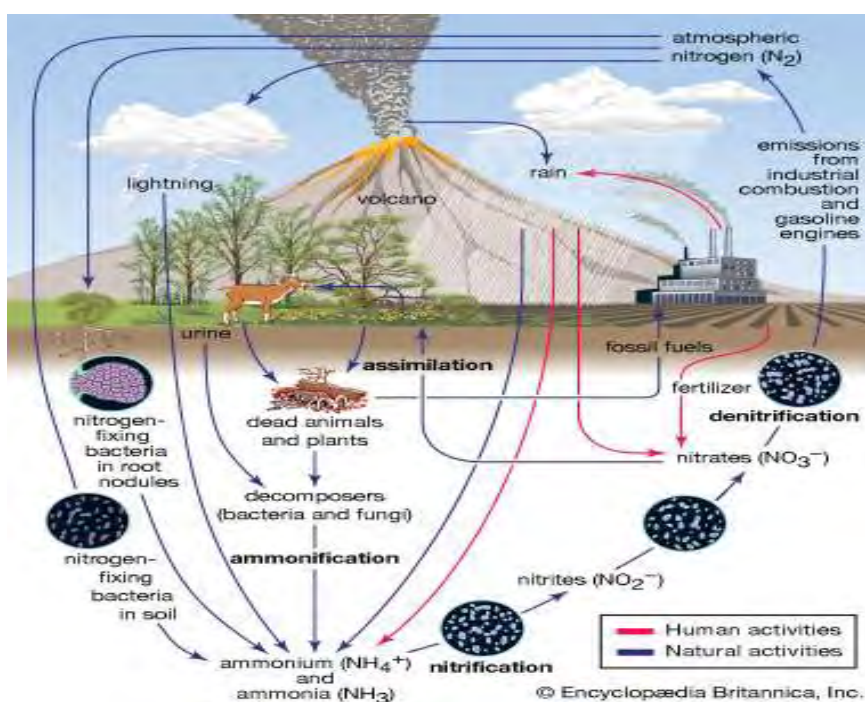


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ‘ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ’

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ  
ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΟΥ ΕΤΗΟΧΥΚΙΝ, ΚΙΝΟΝΕ ΙΜΙΝΕ, ΣΤΗ  
ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ**



ΜΠΡΟΥΖΙΩΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ – ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Υπεύθυνος καθηγητής:

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Τριμελής Επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Επιβλέπων, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Μέλος, Αν. Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τσίκου Ντανιέλα, Μέλος, Επίκ. Καθηγήτρια, Μοριακή και Αναπτυξιακή Βιολογία Φυτών

## Ευχαριστίες

Θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δίχως τον αδιάκοπο προσωπικό κόπο, την εσωτερική ανάγκη για περαιτέρω εξέλιξη και την διαρκή αφιέρωση αμέριστης προσπάθειας και χρόνου. Πράγματι, η εργασία αυτή σηματοδοτεί την περάτωση ενός μεταπτυχιακού το οποίο αποτέλεσε για εμένα έναν στόχο που υπήρξα αποφασισμένος να επιτύχω.

Σίγουρα αρωγός σε αυτή μου την προσπάθεια υπήρξε ο επιβλέπων μου, καθηγητής κος. Καρπούζας Δημήτριος ο οποίος και εφάρμοσε την εμπειρία του, ώστε να με ωθεί όπου αυτό ήταν απαραίτητο, πάντα με γνώμονα την καλή μου εικόνα και το βέλτιστο αποτέλεσμα της έρευνας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος Δρ. Παπαδοπούλου Ευαγγελία για την καθοριστική της παρουσία και την καθοδήγηση που μου παρείχε στο εργαστήριο.

Τέλος, μεγάλο μερίδιο στην επιτυχία μου αναλογεί και στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και την κοπέλα μου Ειρήνη, για τα πολλά μερόνυχτα που στάθηκαν δίπλα μου. Χωρίς τη συνεχή και ασταμάτητη στήριξη τους δε θα τα είχα καταφέρει να φτάσω ως εδώ. Αυτή η εργασία αφιερώνεται σε όλους σας .

Ευχαριστώ!

## Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

### **Μέρος Α: Εισαγωγή**

A.1 Ο κύκλος του αζώτου

A.2 Ο μηχανισμός της νιτροποίησης

A.3 Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

A.4 Περιβαλλοντική και οικονομική σημασία της νιτροποίησης

A.5 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

A.6 Στόχος

### **Μέρος Β: Πειραματικό μέρος**

B.1 Πειραματικός σχεδιασμός

B.2 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$  στο έδαφος

B.3 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

B.4 Επίδραση των ουσιών στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

B.5 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στο έδαφος

B.6 Στατιστική ανάλυση

### **Μέρος Γ: Αποτελέσματα**

Γ.1 Επίδραση των QI, NP και DCD στη συγκέντρωση των  $\text{NH}_4^+$  στο έδαφος

Γ.2 Επίδραση των QI, NP και DCD στη συγκέντρωση των  $\text{NO}_3^-$  στο έδαφος

Γ.3 Επίδραση των QI, NP και DCD στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος

Γ.4 Επίδραση των QI, NP και DCD στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος

Γ.5 Μελέτη της αποδόμησης των DCD, NP και QI στο έδαφος

**Μέρος Δ: Συζήτηση**

**Μέρος Ε: Συμπεράσματα**

**Βιβλιογραφία**

## Περίληψη

Ένας από τους βιογεωχημικούς κύκλους είναι ο κύκλος του αζώτου, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη ζωή στον πλανήτη. Ένα σημαντικό στάδιο αυτού του κύκλου αποτελεί η νιτροποίηση, μέσω της οποίας το μοριακό άζωτο της ατμόσφαιρας μετατρέπεται από εξειδικευμένους μικροοργανισμούς σε αζωτούχες ενώσεις, τις οποίες μπορούν να προσλάβουν και να χρησιμοποιήσουν οι ανώτεροι οργανισμοί. Δίχως λοιπόν τη νιτροποίηση, η ανώτερη ζωή στον πλανήτη δεν υφίσταται. Ο κύκλος του αζώτου και η διαδικασία της νιτροποίησης πραγματοποιείται από συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών που έχουν χαρακτηριστεί ως νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB) και νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA) και επηρεάζονται από πολλές ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα η χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα. Όμως, ένα μεγάλο μέρος αυτών των λιπασμάτων χάνεται στο περιβάλλον είτε μέσω της έκπλυσης των νιτρικών ιόντων, είτε μέσω της αποβολής αερίων αζώτου λόγω απονιτροποίησης, κυρίως υποξειδίου του αζώτου, το οποίο είναι και το κύριο αέριο του φαινομένου του θερμοκηπίου.

Προκειμένου να μετριαστούν αυτές οι απώλειες, εδώ και πολλά χρόνια, ταυτόχρονα με τα λιπάσματα γίνεται χρήση μιας κατηγορίας χημικών ουσιών, οι οποίοι ονομάζονται παρεμποδιστές νιτροποίησης. Οι ουσίες αυτές εμπλέκονται στον κύκλο του αζώτου, παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της νιτροποίησης από τους εδαφικούς μικροοργανισμούς. Εκτενείς έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τη δράση αυτών των ουσιών στη διαδικασία της νιτροποίησης και στην αφθονία και λειτουργία των μικροοργανισμών που την επιτελούν.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της επίδρασης του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του EQ, QI, στην αφθονία και λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών σε πειράματα μικρόκοσμων εδάφους, σε σύγκριση με τους γνωστούς παρεμποδιστές νιτροποίησης, NP και DCD. Το QI είναι οξειδωτικό παράγωγο του Ethoxyquin (EQ), το οποίο χρησιμοποιείται ως συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων και σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας βρέθηκε να δρα ανασταλτικά, έναντι των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Παράλληλα, μελετήθηκε η αποδόμηση των ουσιών αυτών, προκειμένου να πραγματοποιηθούν συσχετίσεις της ελλειμματικότητάς τους, με τις μεταβολές στη λειτουργία και αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Όλα τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν σε δύο εδάφη με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αλλά διαφορετικό pH (όξινο και αλκαλικό) καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει το pH ως βασικό παράγοντα που επηρεάζει τη λειτουργία των διαφόρων ομάδων νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος.

Το pH του εδάφους επηρέασε την επίδραση των μελετώμενων ουσιών στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους.

Στο όξινο έδαφος, το QI προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων που ήταν ισοδύναμη ή ισχυρότερη σε σχέση με αυτή των DCD και NP. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB μειώθηκε μόνο προσωρινά σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOA δεν επηρεάστηκε από καμία από τις μελετώμενες ουσίες. Στο αλκαλικό έδαφος, το QI δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων, ενώ προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης, χαμηλότερη ή ισοδύναμη, των NP και DCD. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA μειώθηκε σημαντικά από όλες τις μελετώμενες ουσίες, όμως στην περίπτωση των AOA η επίδραση των QI και DCD ήταν υψηλότερη σε σχέση με αυτή του NP. Η υπολειμματική διάρκεια των ΠΝ στο έδαφος δε φάνηκε να έχει ξεκάθαρη συσχέτιση με τις παρατηρούμενες στους νιτροδοποιητικούς οργανισμούς επιδράσεις.

Το QI αποδείχθηκε ένας ισχυρός παρεμποδιστής νιτροποίησης και μελλοντικές έρευνες σχετικά με το μηχανισμό δράσης αυτής της ουσίας μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ενός νέου και πιο αποτελεσματικού παρεμποδιστή νιτροποίησης, ώστε να γίνεται πιο αποδοτική η χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα.

## Abstract

Nitrogen Cycle is one of the Biogeochemical Cycles and is of great importance for the presence of life on earth. Nitrification is a crucial part of the Nitrogen Cycle and through this process dinitrogen of the atmosphere, turns into other N compounds by specified microorganisms. These compounds are being used by higher organisms. Nitrification is highly significant thus, without it complicate life forms would not exist. Human activities though, like extensive use of nitrogen fertilizers in agriculture, affect both the Nitrogen Cycle and the nitrification process which is executed by groups of specialized microorganisms named ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing Archaea (AOA). A large amount of those fertilizers ends up in the environment due to either nitrate leaching or gas emissions, especially nitrous oxide ( $N_2O$ ) which is the main responsible gas for the greenhouse effect.

In order to lessen those leaks to the environment, for many years now, a category of chemical compounds, which are called nitrification inhibitors, are used together with the fertilizers. Those substances involve in the Nitrogen Cycle and inhibit the nitrification process, in agricultural soils. Many studies have been conducted concerning the activity of these compounds on the abundance and the function of the microorganisms that are involved in that process.

This study focused on the assessment of the effectiveness of quinone imine (QI), a major oxidative derivative of the antioxidant ethoxyquine (EQ), on the abundance and function of nitrifiers. This was done in comparison with the commonly used nitrification inhibitors Nitrapyrin (NP) and Dicyandiamide (DCD). EQ is being used as a food conservative and in previous studies of the Laboratory of Plant and Environmental Biotechnology, it was found to strongly inhibit nitrifiers. At the same time, the soil dissipation of those substances was determined in order to explore potential correlations between the persistence of those chemicals and effects on the abundance and the function of nitrifying microorganisms. All these measurements were performed in two soils with similar physicochemical properties which differed only in the pH, acidic vs alkaline, considering previous studies which have identified pH as the dominant factor affecting the function and abundance of the different groups of nitrifying microorganisms in soil.

Soil pH affected the efficiency and impact of the tested substances on the function and abundance of nitrifiers. In the acidic soil, QI increased the concentration of  $NH_4^+$ , while it caused a decrease in the concentration of the  $NO_3^-$  and the rate of potential nitrification during the whole study, with the levels of inhibition being equivalent or higher than those of DCD and NP. The abundance of AOB was reduced only temporarily, while AOA was not affected by any of the tested substances. In the alkaline soil, QI did not affect the concentration of  $NH_4^+$ , while it caused a decline to the concentration of the  $NO_3^-$  and the rate of potential nitrification, with the effects



being lower or equivalent to those of NP and DCD. The abundance of AOB and AOA was significantly reduced by all the tested substances. In the case of AOA though, the effect of QI and DCD was higher than that of NP.

QI was proven to be a strong nitrification inhibitor and future studies will investigate the mode of action of this substance and of the parent compound EQ act. This is expected to lead to the development of a new and more effective inhibitor, which will allow the use of fertilizers in agriculture to become more effective .

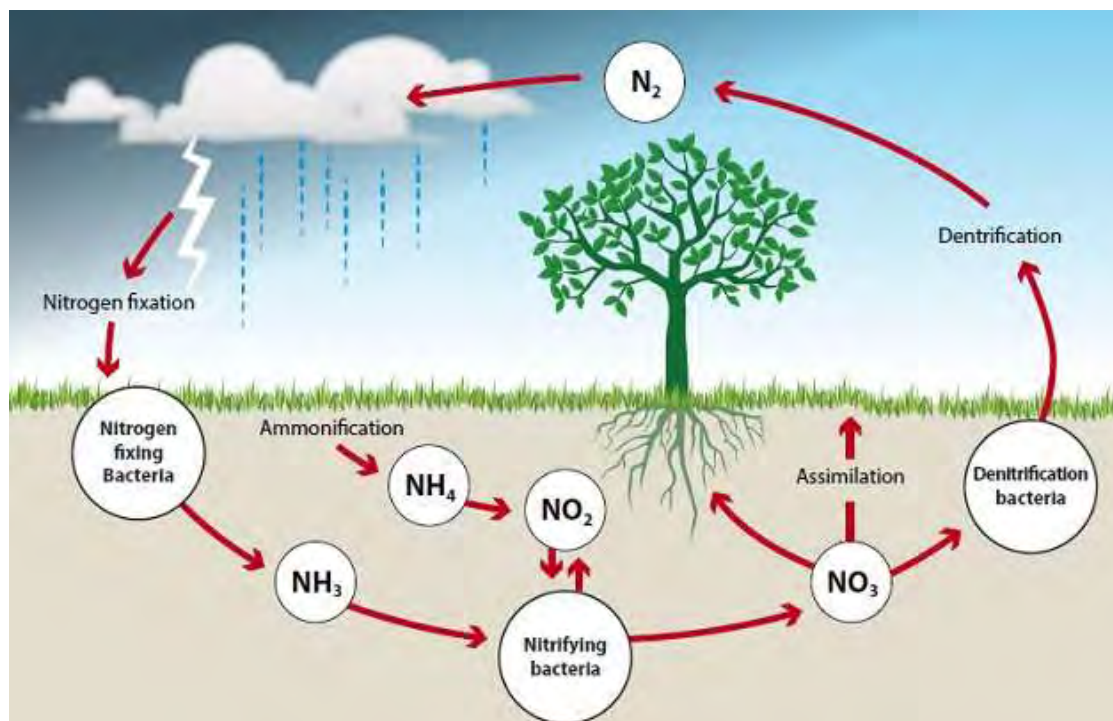
## **ΜΕΡΟΣ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## A.1 Ο κύκλος του αζώτου

### Γενικά

Το άζωτο αποτελεί σημαντικό συστατικό δομικών λίθων της ζωής, όπως του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Όλοι οι οργανισμοί χρειάζονται άζωτο για να ζήσουν και να αναπτυχθούν. Το μεγαλύτερο ποσοστό του αέρα που αναπνέουμε αποτελείται από  $N_2$ . Ωστόσο, το άζωτο βρίσκεται στην ατμόσφαιρα σε μορφή που δεν είναι διαθέσιμη για άμεση χρήση από τους οργανισμούς, επειδή ο ισχυρός τριπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων αζώτου στο μόριο του  $N_2$  το κάνει ιδιαίτερα αδρανές. Στην πραγματικότητα, για να είναι τα ζώα και τα φυτά σε θέση να χρησιμοποιήσουν το αέριο άζωτο, αυτό θα πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε μια χημικά πιο διαθέσιμη μορφή όπως το αμμώνιο ( $NH_4^+$ ), τα νιτρικά ( $NO_3^-$ ) ή το οργανικό άζωτο (π.χ. ουρία) (Stein et al., 2016).

Το άζωτο είναι απαντάται σε ανόργανες και σε οργανικές μορφές. Η κινητικότητα του αζώτου μεταξύ της ατμόσφαιρας, της βιόσφαιρας και της γεώσφαιρας σε διαφορετικές μορφές περιγράφεται από τον κύκλο του αζώτου (Εικόνα 1), έναν από τους πολυπλοκότερους βιογεωχημικούς κύκλους. (Vitousek et al., 1997).



Εικόνα 1: Ο κύκλος του αζώτου (<https://www.studyacs.com/blog-nitrogen-cycle-37.aspx>).

Οι κυριότερες διαδικασίες που συμβάλλουν στην ανακύκλωση του αζώτου στη βιόσφαιρα, την ατμόσφαιρα και τη γεώσφαιρα είναι:

1. Η αζωτοδέσμευση
2. Η αμμωνιοποίηση/ανοργανοποίηση του αζώτου
3. Η νιτροποίηση
4. Η απονιτροποίηση

Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλες τις μετατροπές του αζώτου. Ως εξαρτώμενες από μικροοργανισμούς διαδικασίες, αυτές οι μετατροπές του αζώτου τείνουν να συμβούν πιο γρήγορα από άλλες γεωλογικές διαδικασίες και εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα, όπως είναι η θερμοκρασία και η υγρασία (Delwiche, 1970).

## Αζωτοδέσμευση

Η αζωτοδέσμευση είναι η μετατροπή του ατμοσφαιρικού μοριακού αζώτου ( $N_2$ ) σε άλλες αζωτούχες ενώσεις (αμμωνία, νιτρώδη ιόντα, νιτρικά ιόντα). Διακρίνονται δύο τύποι αζωτοδέσμευσης: η βιολογική και η φυσική.

Στη βιολογική αζωτοδέσμευση, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, δεσμεύουν άζωτο μέσω μεταβολικών διαδικασιών. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια συνήθως σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά ξενιστές. Αυτή η συμβίωση είναι γνωστό ότι συμβαίνει σε ψυχανθή φυτά όπως τα φασόλια και το τριφύλλι. Σε αυτή τη σχέση, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια δημιουργούν ειδικά οργανίδια στις ρίζες των φυτών που ονομάζονται φυμάτια (Εικόνα 2), εντός των οποίων πραγματοποιείται η δέσμευση του αερίου αζώτου. Σε αντάλλαγμα προσλαμβάνουν υδατάνθρακες από το φυτό. Πέραν της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, έχουν αναγνωριστεί στο έδαφος και ειδικά στη ριζόσφαιρα των φυτών βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν χωρίς να συμβιώνουν στις ρίζες των φυτών και ονομάζονται ελεύθερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Στα υδάτινα οικοσυστήματα, τα κυανοβακτήρια είναι ελεύθερα βακτήρια που δεσμεύουν άζωτο. Η βιολογική αζωτοδέσμευση κατέχει το 90% της συνολικής αζωτοδέσμευσης (Adamantiadou et al, 2009).



**Εικόνα 2:** Φυμάτια αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων στις ρίζες των ψυχανθών (<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C106/151/1087,3997/>).

Στη φυσική αζωτοδέσμευση, γεγονότα υψηλής ενέργειας προερχόμενα από το φυσικό περιβάλλον, όπως ο κεραυνός (Εικόνα 3) και η λάβα των ηφαιστειών, μπορούν να προκαλέσουν αζωτοδέσμευση. Η υψηλή ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αυτών των φυσικών φαινομένων μπορεί να σπάσει τον τριπλό δεσμό των μορίων  $N_2$ , δημιουργώντας άτομα αζώτου διαθέσιμα για χημική μετατροπή. Η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος. Η φυσική αζωτοδέσμευση κατέχει το 10% της συνολικής αζωτοδέσμευσης (Adamantiadou et al, 2009).



**Εικόνα 3:** Ο κεραυνός είναι ένα φυσικό φαινόμενο υψηλής ενέργειας, μέσω του οποίου διασπάται ο τριπλός δεσμός στο μόριο  $N_2$  (<https://www.athensmagazine.gr/article/news/eparxia/397059-apisteyto-sthn-kerkyra-keraynos-xytyphse-skafos>).

### **Αμμωνιοποίηση/ανοργανοποίηση του αζώτου**

Στην αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση οι οργανικές ενώσεις αζώτου μετατρέπονται σε ανόργανες, κυρίως αμμωνία, από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Όταν πεθαίνουν οι οργανισμοί, οι αποικοδομητές (όπως βακτήρια και μύκητες) καταναλώνουν την οργανική ύλη και την αποδομούν. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, σημαντική ποσότητα αζώτου που περιέχεται στο νεκρό οργανισμό μετατρέπεται σε αμμώνιο. Στη μορφή του αμμωνίου, το άζωτο είναι διαθέσιμο για χρήση από τα φυτά ή για περαιτέρω μετατροπή σε νιτρικά μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται νιτροποίηση (Bernhard 2011).

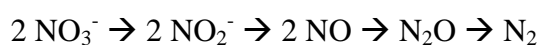
### **Νιτροποίηση**

Η νιτροποίηση είναι η διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα. Η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος, οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε νιτρικά ιόντα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της νιτροποίησης απαιτείται η δράση εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα. Η πλειοψηφία των φυτών παραλαμβάνει το απαιτούμενο άζωτο υπό τη μορφή των νιτρικών ιόντων, τα οποία στη συνέχεια

ανάγονται στο εσωτερικό των κυττάρων σε αμμωνία, αμινοξέα και πρωτεΐνες (Bernhard 2011).

## **Απονιτροποίηση**

Μέσω της απονιτροποίησης, οι οξειδωμένες μορφές του αζώτου όπως τα νιτρώδη και τα νιτρικά μετατρέπονται σε μοριακό άζωτο (N<sub>2</sub>), αλλά και σε άλλες αέριες μορφές αζώτου, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N<sub>2</sub>O). Η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία που επιτελείται από απονιτροποιητικά βακτήρια που μετατρέπουν τα νιτρικά σε μοριακό άζωτο με την εξής ακολουθία (Bernhard 2011):



Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υποξείδιο του αζώτου (N<sub>2</sub>O) είναι σημαντικά αέρια του θερμοκηπίου, επομένως συμβάλλουν στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή.

Η απονιτροποίηση είναι η μόνη διαδικασία μετατροπής αζώτου που αφαιρεί άζωτο από τα οικοσυστήματα και εξισορροπεί την ποσότητα αζώτου που δεσμεύεται από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Bernhard 2011).

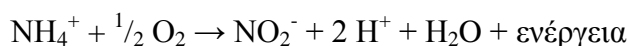
## A.2 Ο μηχανισμός της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί μια από τις βασικότερες βιοτικές μετατροπές του αζώτου και είναι τεράστιας σημασίας για την ολοκλήρωση του κύκλου του. Η νιτροποίηση οδηγεί στη μετατροπή της αμμωνίας στην οξειδωμένη και πιο αφομοιώσιμη μορφή αζώτου, η οποία είναι τα νιτρικά ιόντα. Συνέπεια αυτής της μετατροπής είναι η αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά και η διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους (Zifa et al, 2011).

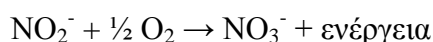
Οι μικροοργανισμοί και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην νιτροποίηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά, εξαιτίας της ζωτικής οικονομικής σημασίας και της περιβαλλοντικής σπουδαιότητας της διαδικασίας αυτής.

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια (Εικόνα 4):

- τη νιτρωδοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) προς νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ), και αποτελεί το ρυθμό-καθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης,



- τη νιτρικοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση των νιτρωδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ) προς νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_3^-$ )



Η νιτρωδοποίηση ως διαδικασία διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους βιοχημικά στάδια:

- την οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) ή των αμμωνιακών ιόντων ( $\text{NH}_4^+$ ) προς υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) με τη δράση του ενζύμου μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO)
- την οξείδωση της υδροξυλαμίνης ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) προς νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ) με τη δράση του ενζύμου οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO).

Η νιτρικοποίηση περιλαμβάνει τη μετατροπή των νιτρωδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ), που παράγονται κατά την νιτρωδοποίηση, σε νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_3^-$ ) με τη δράση του ενζύμου νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NOR) (Zifa et al, 2011).



**Εικόνα 4:** Τα στάδια της νιτροποίησης (<https://slideplayer.com/slide/4214537/>).

## **A.3 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση**

Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία της νιτροποίησης διακρίνονται σε 5 κατηγορίες: τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB), τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA), τα βακτήρια Comammox, τα βακτήρια Anammox και τα νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB).

### **Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB)**

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) είναι χημειολιθότροφοι οργανισμοί που περιλαμβάνουν είδη των γενών *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter* και *Nitrosococcus*. Ανήκουν στα β- και γ- πρωτεοβακτήρια. Αυτά τα βακτήρια παίρνουν την ενέργειά τους με την οξείδωση ανόργανων αζωτούχων ενώσεων (Mancinelli, 1996) και έχουν κάποια σύνθετα συστήματα εσωτερικής μεμβράνης, τα οποία αποτελούν τη θέση για ένζυμα-κλειδιά στη νιτροποίηση: την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (η οποία οξειδώνει την αμμωνία σε υδροξυλαμίνη) και την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (η οποία οξειδώνει την υδροξυλαμίνη σε νιτρώδη) (Kuypers et al, 2011).

### **Νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA)**

Το νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA) είναι χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί. Ανήκουν στο φύλο των Thaumarchaeota και περιλαμβάνουν τα εξής γένη: *Ca. Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales*, *Ca. Nitrosotaleales* και *Nitrosopumilales*. (Stahl et al, 2012). Το *Nitrosopumilus maritimus* αποτελεί το πρώτο αναγνωρισμένο AOA που έχει απομονωθεί (Konneke et al, 2005). Τα AOA βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα εδάφη με όξινο pH σε σχέση με τα AOB και συνεισφέρουν περισσότερο στη διαδικασία της νιτροποίησης (Lehtovirta-Morley et al, 2014). Κατά την οξείδωση της αμμωνίας από τα AOA το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει είναι η υδροξυλαμίνη, ωστόσο, ο μηχανισμός του δεύτερου βήματος της οξείδωσης της αμμωνίας στα AOA παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος (Vajralaa et al, 2013).

### **Βακτήρια Comammox (Complete ammonia oxidation)**

Μέχρι πρόσφατα η νιτροποίηση θεωρούνταν μια διαδικασία η οποία επιτελείται σε δύο βήματα από διακεκριμένες κατηγορίες μικροοργανισμών. Αυτή η θεωρία καταρρίφθηκε το 2015 με την ανακάλυψη ενός νέου στελέχους, του *Candidatus*



*Nitrospira inopinata*, που ανήκει στο γένος *Nitrospira* και έχει την ικανότητα να εκτελεί και τα δύο βήματα της νιτροποίησης. Οι μικροοργανισμοί αυτής της κατηγορίας ονομάστηκαν Comammox (Complete ammonia oxidation bacteria) (Daims et al, 2015).

## **Anammox**

Ο όρος Anammox αναφέρεται στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας και είναι μια σημαντική μικροβιακή διαδικασία του κύκλου του αζώτου που λαμβάνει χώρα σε πολλά φυσικά περιβάλλοντα. Τα βακτήρια που διαμεσολαβούν αυτή τη διαδικασία εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1999 και αποτέλεσαν μεγάλη έκπληξη για την επιστημονική κοινότητα. Σε αυτή τη βιολογική διαδικασία, τα νιτρώδη και αμμωνιακά ιόντα μετατρέπονται απευθείας σε μοριακό άζωτο και νερό. Τα βακτήρια anammox ανήκουν στο φύλο *Planctomycetes*. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί πέντε γένη Anammox: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* και *Scalindua*. Σε όλα τα Anammox, ένα τμήμα της μεμβράνης, γνωστό ως anammoxosome, αποτελεί το σημείο καταβολισμού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η μετατροπή της αμμωνίας σε υδραζίνη ως ενδιάμεσο προϊόν, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε μοριακό άζωτο με τη δράση της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (Jetten et al, 2009).

## **Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)**

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) είναι μια ομάδα χημειοαυτότροφων μικροοργανισμών, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου μεταξύ των νιτρώδοποιητικών βακτηρίων, τα οποία παράγουν νιτρώδη ιόντα, και των απονιτρώδοποιητικών μικροοργανισμών, που απομακρύνουν τα νιτρικά ιόντα με την αναγωγή τους σε μοριακό άζωτο, ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο του αζώτου. Η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού σχετικά με θέματα ρύπανσης του περιβάλλοντος κατά τις τελευταίες δεκαετίες, έφερε ξανά το ενδιαφέρον σε αυτή την ομάδα βακτηρίων, καθώς ο ρόλος τους στο μετασχηματισμό των νιτρικών ιόντων κατέστη εμφανής. (Abeliovich, 2006).

## A.4 Περιβαλλοντική και οικονομική σημασία της νιτροποίησης

Η διαδικασία της νιτροποίησης που πραγματοποιείται στη φύση έχει πολλές θετικές επιπτώσεις σε οικονομικό και περιβαλλοντικό επίπεδο. Το κυριότερο θετικό αντίκτυπο είναι πως χάρη σε αυτήν τη διαδικασία μπορούν και διαβιούν οι ανώτεροι οργανισμοί πάνω στον πλανήτη. Το άζωτο είναι το πιο άφθονο αέριο στην ατμόσφαιρα της γης (78%), όμως βρίσκεται στη μορφή του μοριακού αζώτου ( $N_2$ ), η οποία δε μπορεί να προσληφθεί και να χρησιμοποιηθεί από τους ανώτερος οργανισμούς, καθώς δε μπορούν να διασπάσουν τον ισχυρό τριπλό δεσμό στο  $N_2$  και να χρησιμοποιήσουν το απαραίτητο για την επιβίωση τους άζωτο. Αυτή η διάσπαση πραγματοποιείται από εξειδικευμένους μικροοργανισμούς τους εδάφους, οι οποίοι διασπούν το μοριακό άζωτο και το μετατρέπουν σε αζωτούχες ενώσεις, τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιήσουν οι ανώτεροι οργανισμοί. Δίχως λοιπόν την ύπαρξη αυτών των μικροοργανισμών και τη φυσική επιτέλεση της διαδικασίας της νιτροποίησης, η ζωή των ανώτερων οργανισμών πάνω στον πλανήτη δεν υφίσταται (Tchobanoglous et al, 2003).

Η νιτροποίηση συμβάλλει επίσης θετικά σε οικονομικό και περιβαλλοντικό επίπεδο στον τομέα της γεωργίας. Μέσω της νιτροποίησης, το ατμοσφαιρικό μοριακό άζωτο μετατρέπεται σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, τα οποία νιτρικά ιόντα προσλαμβάνουν και χρησιμοποιούν οι φυτικοί οργανισμοί για την ανάπτυξη τους. Έτσι, η χρήση λιπασμάτων αζώτου για την ανάπτυξη τους γίνεται σε μικρότερο βαθμό από ότι θα γινόταν αν δεν πραγματοποιούταν αυτή η διαδικασία. Ουσιαστικά δηλαδή, η νιτροποίηση επιφέρει και οικονομικό όφελος στον αγροτικό τομέα (Qiao et al, 2015).

Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν στη διαδικασία της νιτροποίησης, και πιο συγκεκριμένα τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια, χρησιμοποιούνται στη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων, κυρίως αγροτικών και βιομηχανικών. Μέσω αυτών λοιπόν, το περιβάλλον είναι λιγότερο επιφορτισμένο με άζωτο, καθώς αυτό αποβάλλεται από τα απόβλητα (Tchobanoglous et al, 2003).

Δυστυχώς όμως, η νιτροποίηση επιφέρει και κάποιες αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Ένα μεγάλο μέρος των  $NO_3^-$  που παράγονται μέσω της νιτροποίησης, κυρίως στα αγροτικά οικοσυστήματα λόγω της χρήσης λιπασμάτων αζώτου, εκπλέεται μέσω της βροχής ή της άρδευσης με αποτέλεσμα τη ρύπανση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων και την εμφάνιση του ευτροφισμού σε υδάτινα συστήματα, ενώ ένα άλλο μέρος αυτών οδηγείται σε απονιτροποίηση και την παραγωγή αερίων του θερμοκηπίου, κυρίως μονοξειδίου του αζώτου (NO) και υποξειδίου του αζώτου ( $N_2O$ ) με αποτέλεσμα να επιδεινώνεται αυτό το φαινόμενο. Η ύπαρξη νιτρικών στο πόσιμο νερό αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς τα νιτρικά αντιδρούν με άλλες ενώσεις και σχηματίζουν καρκινογόνες ουσίες ή ενώσεις που προκαλούν μεταλλάξεις στα ανθρώπινα κύτταρα (Rouse et al, 1999).



## A.5 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες και ειδικότερα η χρήση συνθετικών λιπασμάτων αζώτου, έχουν διπλασιάσει την παγκόσμια ετήσια εισαγωγή ενεργού αζώτου τα τελευταία 50-100 χρόνια, προκαλώντας επιβλαβείς επιδράσεις στο περιβάλλον μέσω της αυξημένης έκλυσης νιτρικών, αλλά και των εκπομπών αερίων αζώτου, κυρίως υποξειδίου του αζώτου, που είναι το πιο σημαντικό αέριο του φαινομένου του θερμοκηπίου. Εκτενή πειράματα έχουν διεξαχθεί για να αναπτυχθούν τρόποι αναστολής αυτής της διαδικασίας, με κυριότερη τη χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης (ΠΝ), δηλαδή ουσιών που αναστέλλουν την οξειδωση της αμμωνίας από τους νιτρώδοις μικροοργανισμούς σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα (Qiao et al, 2015). Καθώς λοιπόν, μέσω της νιτροποίησης προκαλούνται απώλειες μεγάλης ποσότητας λιπάσματος από το έδαφος, η χρήση ΠΝ είναι διαδεδομένη στη γεωργία. (Shen et al., 2013).

Οι ΠΝ κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: στους βιολογικούς (ΒΠΝ) και στους συνθετικούς (ΣΠΝ).

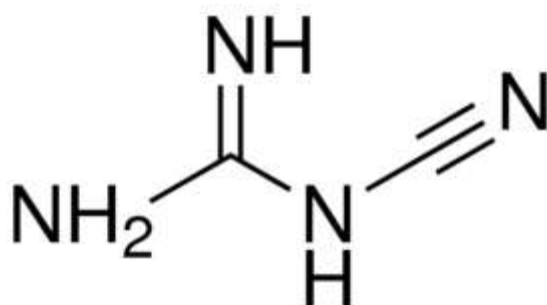
Οι ΒΠΝ παράγονται από τα φυτά, αλλά ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει ακόμα άγνωστος. Η δράση και το είδος των ΒΠΝ που απελευθερώνονται από τα φυτά σε ένα οικοσύστημα επηρεάζεται από το pH του οικοσυστήματος. Οι ΒΠΝ που έχουν απομονωθεί προς το παρόν από τις ρίζες φυτών είναι το Sorgoleone, το Sakuranetin, το MHPP, το Brachialactone, το 1,9-Decanediol, το λινολενικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και τα τερπενοειδή (Coskun et al, 2017).

Οι ΣΠΝ συντίθενται χημικά στο εργαστήριο και η ανάπτυξη τους υποκινήθηκε από την ανάγκη περιορισμού των απωλειών αζώτου από τα αγροτικά οικοσυστήματα, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα χρήσης του αζώτου (Nitrogen Use Efficiency). Ωστόσο, η εφαρμογή τους παρουσιάζει μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων του κόστους εφαρμογής, της ρύπανσης του εδάφους και της πιθανής εισχώρησης τους στην τροφική αλυσίδα. Οι κυριότεροι ΣΠΝ είναι το Dicyandiamide (DCD), το DMPP, το Nitrapyrin, το ακετυλένιο, η allylthiourea και το DMPSA (Coskun et al, 2017), αν και μόνο τα DCD, DMPP και Nitrapyrin χρησιμοποιούνται σε πρακτικό επίπεδο.

### DCD

Το Dicyandiamide (DCD) (Εικόνα 5) είναι ένα διμερές του κυαναμιδίου, από το οποίο προέρχεται. Χρησιμοποιείται ευρέως ως ΠΝ και παλαιότερα χρησιμοποιούταν ως καύσιμο στα εκρηκτικά (Guuthner et al., 2006). Δρα δημιουργώντας σύμπλοκα με το χαλκό που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της AMO κι επίσης μπλοκάρει το κυτόχρωμα που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στην AMO (Subbarao et al, 2007). Το

Dicyandiamide παράγεται σε μεγάλη κλίμακα από νιτρική κιμωλία μέσω της ενδιάμεσης ένωσης Cyandiamide με μια διαδικασία δύο βημάτων (Schwarzer & Hazelwandter, 1995). Είναι μια μη πτητική ένωση, διαλυτή στο νερό και με μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος. Η εφαρμογή του DCD μπορεί να μειώσει τις εκπομπές N<sub>2</sub>O. Η χρήση του απαγορεύτηκε στη Νέα Ζηλανδία το 2013 εξαιτίας της ανίχνευσης υπολειμμάτων DCD σε εξαγόμενο γάλα. Στην Ευρώπη, ωστόσο, παραμένει σε χρήση (Pal et al., 2015).

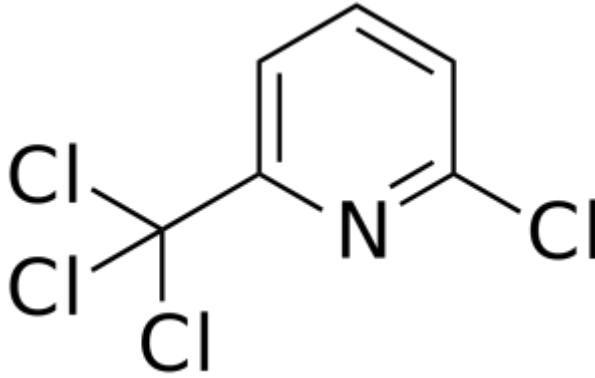


**Εικόνα 5:** Η χημική δομή του Dicyandiamide (DCD)

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d76609?lang=en&region=GR>).

## Nitrapyrin

Το Nitrapyrin (NP) είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο ClC<sub>5</sub>H<sub>3</sub>NCCl<sub>3</sub> (Εικόνα 6). Ανακαλύφθηκε το 1962 και χρησιμοποιείται ευρέως ως ΠΝ στη γεωργία από το 1974 (Dittmar et al, 2009). Δρα δημιουργώντας σύμπλοκα με το χαλκό, ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της AMO. Ως οργανική ένωση χλωρίου, η χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα στο περιβάλλον (Zerulla et al, 2001). Το Nitrapyrin είναι ένας αποτελεσματικός ΠΝ για τα βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* και έχει αναφερθεί ότι μειώνει δραστικά τις εκπομπές N<sub>2</sub>O από το έδαφος (Dittmar et al., 2009).

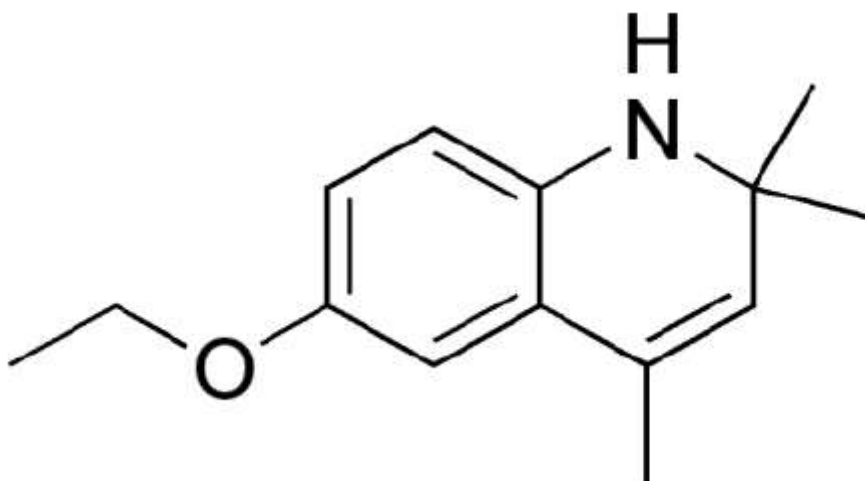


**Εικόνα 6:** Η χημική δομή του Nitrapyrin (NP)  
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrapyrin>).

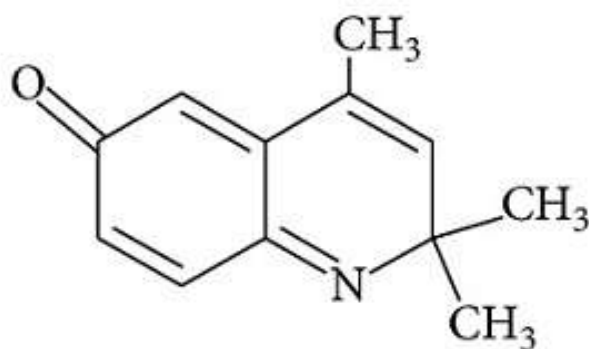
## Το αντιοξειδωτικό EQ και η επίδραση του στη νιτροποίηση

Το Ethoxyquin (EQ) (Εικόνα 7) είναι ένα αντιοξειδωτικό το οποίο χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων σε ορισμένες χώρες, αλλά και για τον έλεγχο της φυσιολογικής ασθένειας καφέτιασμα σε πράσινα μήλα και αχλάδια. Αναπτύχθηκε από τη Monsanto στη δεκαετία του 1950, ενώ καταγράφηκε αρχικά ως παρασιτοκτόνο το 1965. Χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε ορισμένες τροφές για κατοικίδια ζώα για να επιβραδύνει την ανάπτυξη της τάγγισης των λιπών. Χρησιμοποιείται επίσης σε μερικά μαχαρικά για την πρόληψη της απώλειας χρωμάτων λόγω της οξείδωσης των καροτενοειδών. Είναι εγκεκριμένο στις ΗΠΑ, ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση ανακλήθηκε η χρήση του στα συσκευαστήρια φρούτων. Επιπλέον, δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο τροφίμων ούτε στην Αυστραλία ούτε εντός της ΕΕ. Το 2017, η ΕΕ ανέστειλε τη χορήγηση άδειας για τη χρήση του ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών, με διαφορετικές ημερομηνίες μεταξύ του 2017 και του 2019 για τελική αποζημίωση πώλησης αγαθών, ώστε να είναι δυνατή η εμφάνιση εναλλακτικών λύσεων (R.E.D. FACTS Ethoxyquin, 2004).

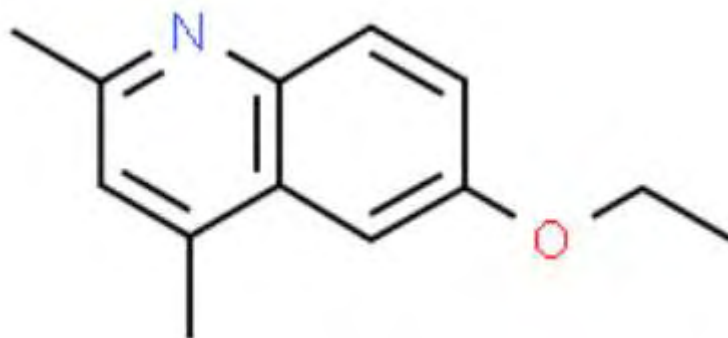
Προηγούμενες μελέτες μικρόκοσμων εδάφους έδειξαν πως το EQ στο έδαφος μεταβολίζεται ταχύτατα προς το μη υπολειμματικό 2,6-dihydro-2,2, 4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine QI) (κύριος μεταβολίτης) (Εικόνα 8) και το έμμοιο 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) (δευτερεύων μεταβολίτης) (Εικόνα 9), με το πρώτο (QI) να προκαλεί προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης (Papadopoulou et al., 2016). Ακόλουθη *in vitro* αξιολόγηση (σε επιλεγμένα εδαφογενή στελέχη AOB, AOA και NOB) του αντιοξειδωτικού EQ και των μεταβολικών προϊόντων του ως ΠΝ, σε σύγκριση με λοιπούς παρεμποδιστές ευρείας εφαρμογής (DCD, nitrapyrin, DMPP), έδειξε ότι το EQ και κυρίως ο κύριος μεταβολίτης του QI παρουσιάζει ικανότητα αναστολής και των δύο ομάδων μικροοργανισμών (AOA και AOB) που αποδεδειγμένα συμμετέχουν στη νιτροποίηση, με τα AOA να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τα AOB (Papadopoulou et al., 2019).



**Εικόνα 7:** Η χημική δομή του Ethoxyquin (EQ)  
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Ethoxyquin>).



**Εικόνα 8:** Η χημική δομή του Quinone Imine (QI)  
(<https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2013/585931/tab3/>).



**Εικόνα 9:** Η χημική δομή του EQNL (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.192197.html>).





## A.6 Στόχος της Διατριβής

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του EQ, QI, στην αφθονία και τη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών σε πειράματα μικρόκοσμων εδάφους σε σύγκριση με τους γνωστούς και εμπορικά διαδεδομένους ΠΝ, ΝΡ και DCD. Η αποδόμηση των μελετώμενων ουσιών στα εδαφικά δείγματα μελετήθηκε παράλληλα, προκειμένου να πραγματοποιηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των ουσιών και των παρατηρούμενων μεταβολών στην αφθονία και τη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών.

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε δείγμα από δυο εδάφη με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, αλλά με διαφορά ως προς το pH, καθώς είναι ένας παράγοντας ο οποίος επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή δραστηριότητα γενικότερα και των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων ειδικότερα. Οι τρεις προαναφερθέντες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση η κάθε μία ( $200 \text{ mg kg dw}^{-1}$  DCD,  $5 \text{ mg kg dw}^{-1}$  NP και  $30 \text{ mg kg dw}^{-1}$  QI), με βάση προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στις οποίες εξετάστηκε η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών έναντι των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Papadopoulou et al, 2019).

## **ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## B.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δύο εδάφη με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αλλά με διαφοροποίηση ως προς την τιμή του pH, ένα αλκαλικό πηλώδες έδαφος και ένα όξινο πηλώδες, τα οποία συλλέχθηκαν από επιλεγμένα αγροτεμάχια του νομού Θεσσαλίας. Συνολικά, συλλέχθηκαν 1,6 kg ανά έδαφος, τα οποία αεροξηράθηκαν μερικώς για διάστημα 48 ωρών. Ακολούθησε κοσκίνισμα του εδάφους με κόσκινο διαμετρήματος πόρων 2 mm και προσθήκη υδατικού διαλύματος ουρίας, με τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση της ουρίας σε κάθε έδαφος να είναι  $1\text{g kg}^{-1}$  ξηρού βάρους εδάφους και επιμελής ανάδευση των εδαφών, τα οποία διατηρήθηκαν στη συνέχεια για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι πριν την εφαρμογή των υπό μελέτη ουσιών. Κατόπιν, η συνολική ποσότητα κάθε εδάφους διαχωρίστηκε σε 4 επιμέρους δείγματα των 400 g. Σε κάθε ένα από τα επιμέρους δείγματα εδάφους προστέθηκαν 4 ml κατάλληλου διαλύματος ενός εκ των QI, NP σε ακετονιτρίλιο λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των συγκεκριμένων ουσιών και κατάλληλος όγκος υδατικού διαλύματος DCD, που παρασκευάστηκαν από τα αντίστοιχα εμπορικά πρότυπα των ουσιών, με εξαίρεση το QI του οποίου η σύνθεση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με τους Thorisson et al, 1992, ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις στο έδαφος 30 (QI), 5 (Nitrapyrin) και 200 (DCD) mg δ.ο.  $\text{kg}^{-1}$  ξηρού βάρους εδάφους. Ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού ώστε να προσαρμοστεί η υγρασία του εδάφους στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Στο τελευταίο δείγμα εδάφους προστέθηκε ανάλογη ποσότητα ακετονιτριλίου (4 ml) και στη συνέχεια νερού χωρίς την προσθήκη ΠΝ προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Τέλος, 4 ml ακετονιτριλίου προστέθηκαν και στο δείγμα εδάφους που δέχθηκε τη μεταχείριση με το DCD για λόγους ομογένειας μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων. Τα δείγματα στη συνέχεια, αφού αναμείχθηκαν επιμελώς, αφήθηκαν για 2-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) ώστε να επέλθει ισορροπία και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των ΠΝ. Έπειτα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε υπο-δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές αεροστεγείς σακούλες και επώαστηκαν στο σκοτάδι στους  $20^\circ\text{C}$ .

Για τη μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους (συγκέντρωση  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ , ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης και αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA), καθώς και για τη μελέτη της πορείας αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών, τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν στους χρόνους 3, 7, 14, 21 και 35 ημέρες μετά την προσθήκη των ουσιών στο έδαφος και είτε αναλύθηκαν άμεσα (προσδιορισμός συγκέντρωσης  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ , προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης) είτε αποθηκεύτηκαν στους  $-20^\circ\text{C}$  (δείγματα που προορίζονταν για qPCR και HPLC ανάλυση) μέχρι να αναλυθούν περαιτέρω.

## Προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των δύο εδαφών, προσδιορίστηκαν με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο εδαφών που συλλέχθηκαν.

Ιδιότητες	Έδαφος 1 (Ροδιά Τυρνάβου)	Έδαφος 2 (Λιβάδι Ελασσόνας)
pH (σε H <sub>2</sub> O)	7.42	5.12
Οργανική ουσία (5)	3.6	4.37
N	0.08	0.13
C	1.8	2.18
Άμμος (%)	45.82	40.82
Αργίλος (%)	18.18	11.36
Ιλύς (%)	36.0	47.82
Μηχανική σύσταση	Πηλώδες	Πηλώδες

## **B.2 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των $\text{NH}_4^+$ και $\text{NO}_3^-$ στο έδαφος**

Για το σκοπό αυτό 2 g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε falcon των 50 ml, στα οποία προστέθηκαν 20 ml KCl 1M και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντια αναδευτήρα για 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που προέκυψε διηθήθηκε στη συνέχεια από φίλτρο Whatman 42 σε falcon των 15 ml και αποθηκεύτηκε στους  $-20^\circ\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω ανάλυση του.

### **Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των $\text{NH}_4^+$ στο έδαφος**

Για το σκοπό αυτό 600 μl δείγματος μεταφέρθηκαν σε erpendorf των 1,5 ml και κατόπιν προστέθηκαν 120 μl διαλύματος οξειδωσης που παρασκευάστηκε με διάλυση 0,1 g dichloroisocyanuric acid sodium salt dihydrate σε 100 ml dd  $\text{H}_2\text{O}$  και 300 μl χρωματικού δείκτη που παρασκευάστηκε με ανάμιξη διαλυμάτων 0,3 M NaOH, sodium salicylat (8,5 g sodium salicylat και 63,9 mg sodium nitroprussite dihydrate σε 50 ml dd  $\text{H}_2\text{O}$ ) και dd  $\text{H}_2\text{O}$  σε αναλογία 1:1:1 (o/o/o). Κατόπιν ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 300 rpm και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της έντασης του παραγόμενου χρώματος στα 660 nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,0195 - 5 mg  $\text{NH}_4\text{Cl-N L}^{-1}$ . Η αρχή της παραπάνω μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση του περιεχομένου στο δείγμα  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε χλωραμίνη από το άλας νατρίου του δίχλωρο-ισοκυανουρικού οξέος και τον ακόλουθο σχηματισμό πράσινης ινδοφαινόλης, παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό μέσο, η ένταση του χρώματος της οποίας προσδιορίζεται στη συνέχεια φωτομετρικά.

### **Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των $\text{NO}_3^-$ στο έδαφος**

Για το σκοπό αυτό 100 μl δείγματος και 100 μl διαλύματος βαναδίου 50,9 mM σε 1M HCl μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate). Αμέσως μετά ακολούθησε προσθήκη 50 μl διαλύματος σουλφανιλαμίδης 58mM σε 3M HCl και 50 μl υδατικού διαλύματος N-naphthylethylenediamide dihydrochloride 0,77 mg και κατόπιν η πλάκα τοποθετήθηκε στους  $37^\circ\text{C}$  για 60 λεπτά. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 540 nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,02 - 5 mg  $\text{KNO}_3\text{-N L}^{-1}$ . Η αρχή της παραπάνω μεθόδου βασίζεται στη μετατροπή του περιεχομένου στο δείγμα  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  σε  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  διαμέσου ενός όξινου διαλύματος χλωριούχου βαναδίου ( $\text{VCl}_3$ ) και ακόλουθο φωτομετρικό προσδιορισμό του  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  μέσω σύζευξης με το αντιδραστήριο Griess.



### B.3 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της Kandeler, 1995. Συγκεκριμένα, 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε  $\text{NO}_2^-$  από τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και 0,1 NaClO<sub>3</sub> 1,5M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξείδωσης των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτροδών αντί νιτρικών ιόντων (Belser and Mays, 1980) και ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάζονταν ένα δείγμα για κάθε μεταχείριση που θα χρησίμευε στον υπολογισμό του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ως μάρτυρας αναφοράς. Τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20°C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτροδοποίησης.

Μετά το πέρας των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολούθησε προσθήκη 5 ml διαλύματος KCl 2M για τη δέσμευση των ιόντων  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$ , σύντομη ανάδευση και διήθηση. Για τη φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα  $\text{NO}_2^-$  που έχουν παραχθεί και με τη φωτομέτρηση καταδεικνύει τη συγκέντρωσή τους στα διαλύματα. Ακολούθησε ανάδευση και ομογενοποίηση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 5 ml αποσταγμένο νερό με 3 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,19M και 2 ml χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα δείγματα νιτροδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα  $\text{NaNO}_2$  διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8, 10 ml διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  ( $10\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ ), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml, με αποσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0,2, 0,4, 0,8 και 1,0  $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ . Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0,1, 0,2, 0,4 και 0,5  $\mu\text{mol NO}_2\text{-N ml}^{-1}$ ) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520 nm (Kandeler, 1995).

## B.4 Επίδραση των ουσιών στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των υπό μελέτη ουσιών στην επίδραση των AOB και AOA στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA ( $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) που εκχλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 14 και 35 ημέρες μετά την εφαρμογή των μελετούμενων ουσιών.

### Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η εξαγωγή του DNA από το έδαφος έγινε με τη χρήση του εμπορικού κιτ PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc. USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R (Rotthauwe et al, 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

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

Ο συνολικό όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10  $\mu\text{l}$ , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOB.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
<b>KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal</b>	5 $\mu\text{L}$	1x
<b>Εκκινητής <i>amoA</i>-1F (20 pmol/ <math>\mu\text{l}</math>)</b>	0.1 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$
<b>Εκκινητής <i>amoA</i>-2R (20 pmol/ <math>\mu\text{l}</math>)</b>	0.1 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$



<b>BSA (10 µg/µl)</b>	0.2 µL	200ng µL <sup>-1</sup>
<b>DNA</b>	2 µL	-
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2.6 µL	-
<b>Συνολικός όγκος</b>	10 µL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίστοιχης αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOB.

	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95°C	3 min	1 κύκλος
<b>Αποδιάταξη</b>	95°C	5 sec	40 κύκλοι
<b>Υβριδοποίηση</b>	57°C	10 sec	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C	30 sec	
<b>Καμπύλη αποδιάταξης</b>	95°C 65-95°C	1 min 0.5°C για 5 sec	

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoAF* και Arch-*amoAR* (Francis et al, 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Arch-*amoAF*: 5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'
- Arch-*amoAR*: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 µl, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOA.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
<b>KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal</b>	5 µL	1x
<b>Εκκινητής Arch-<i>amoAF</i> (20 pmol/ µl)</b>	0.1 µL	0.2 µM
<b>Εκκινητής Arch-<i>amoAR</i> (20 pmol/µl)</b>	0.1 µL	0.2 µM
<b>BSA (10 µg/µl)</b>	0.2 µL	200ng µL <sup>-1</sup>
<b>DNA</b>	2 µL	-
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2.6 µL	-
<b>Συνολικός όγκος</b>	10 µL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ.

	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95°C	3 min	1 κύκλος
<b>Αποδιάταξη</b>	95°C	5 sec	45 κύκλοι
<b>Υβριδοποίηση</b>	53°C	10 sec	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C	30 sec	
<b>Καμπύλη αποδιάταξης</b>	95°C 65-95°C	1 min 0.5°C για 5 sec	

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων των λειτουργικών γονιδίων των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, με τη χρήση αραιώσεων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το εκάστοτε λειτουργικό γονίδιο των, σύμφωνα με τους Rousidou et al (2013). Σε κάθε περίπτωση οι τιμές του  $R^2$  και του efficiency των προτύπων καμπυλών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση ήταν  $\geq 0,99$  και  $\geq 80\%$  αντίστοιχα.

## B.5 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στο έδαφος

Προκειμένου να μελετηθεί η πορεία αποδόμησης των ουσιών στο έδαφος πραγματοποιήθηκε αρχικά εκχύλιση και παραλαβή τους από δείγματα εδάφους που συλλέγονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος και στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση και προσδιορισμός τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

Η παραλαβή του QI από το έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS (Anastasiades et al, 2003), με ελάχιστες τροποποιήσεις σύμφωνα με τους Karas et al (2015). Η μέθοδος QuEChERS περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια: το στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο του καθαρισμού. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, 5 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon χωρητικότητας 50 ml, με καπάκι, και αναμείχθηκαν με 5 ml κρύου (4°C) αποσταγμένου H<sub>2</sub>O. Ακολούθησε σύντομη ανακίνηση, προσθήκη 10 ml διαλύτη ακετονιτριλίου και έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα αλάτων αποτελούμενο από 4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl και 1,5 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 7500 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε καθαρισμό. Συγκεκριμένα, κλάσμα όγκου 1 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml) που περιείχε 150 mg MgSO<sub>4</sub> και 25 mg PSA και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 3000 rpm.

Για την εκχύλιση του NP, 5 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 mL και αναμείχθηκαν με 10 mL ακετονιτριλίου. Ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 250 rpm για 90 λεπτά και έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μπανάκι υπερήχων για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 7500 rpm.

Η εκχύλιση του DCD από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Kim et al, 2014. Συγκεκριμένα, 5 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 mL και αναμείχθηκαν με 10 mL dd H<sub>2</sub>O. Ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα, στα 250 rpm για 1 ώρα και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 7500 rpm. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 2 mL εκχυλίσματος όπου και προστέθηκαν 80 μL 0,66M sulfuric acid και τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 13000 rpm.

### HPLC χρωματογραφική ανάλυση

Η πορεία της αποδόμησης των μελετώμενων ουσιών στο έδαφος παρακολούθηθηκε στη συνέχεια με ανάλυση των εκχυλισμάτων τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC-PDA: SHIMADZU LC-20AD, με στήλη SHIMADZU VP-ODS διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODS διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm . Ο όγκος έγχυσης ήταν 20  $\mu$ L και η θερμοκρασία στήλης ήταν 25°C. Τέλος, σε όλες τις περιπτώσεις τα επιμέρους δείγματα διηθήθηκαν διαμέσω φίλτρου σύριγγας 0,45  $\mu$ m και αναλύθηκαν χρωματογραφικά σύμφωνα με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Ο έλεγχος της γραμμικότητας της ανταπόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση κάθε δραστικής ουσίας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων των μελετώμενων ουσιών (0,05-10 mg L<sup>-1</sup>). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μελετώμενων ουσιών στα δείγματα εδάφους έγινε με βάση το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχούσε σε κάθε ουσία και τη χρήση των προτύπων καμπυλών.

**Πίνακας 6:** Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των μελετώμενων ουσιών.

Χημική ουσία	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Ροή κινητής φάσης (mL/min)	Μήκος κύματος (nm)
<b>QI</b>	ACN: H <sub>2</sub> O+0.25% NH <sub>3</sub>	70:30	1	254
<b>Nitrapyrin</b>	ACN: H <sub>2</sub> O+0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	70:30	1	269
<b>DCD</b>	H <sub>2</sub> O	100	0.8	218

## B.6 Στατιστική ανάλυση

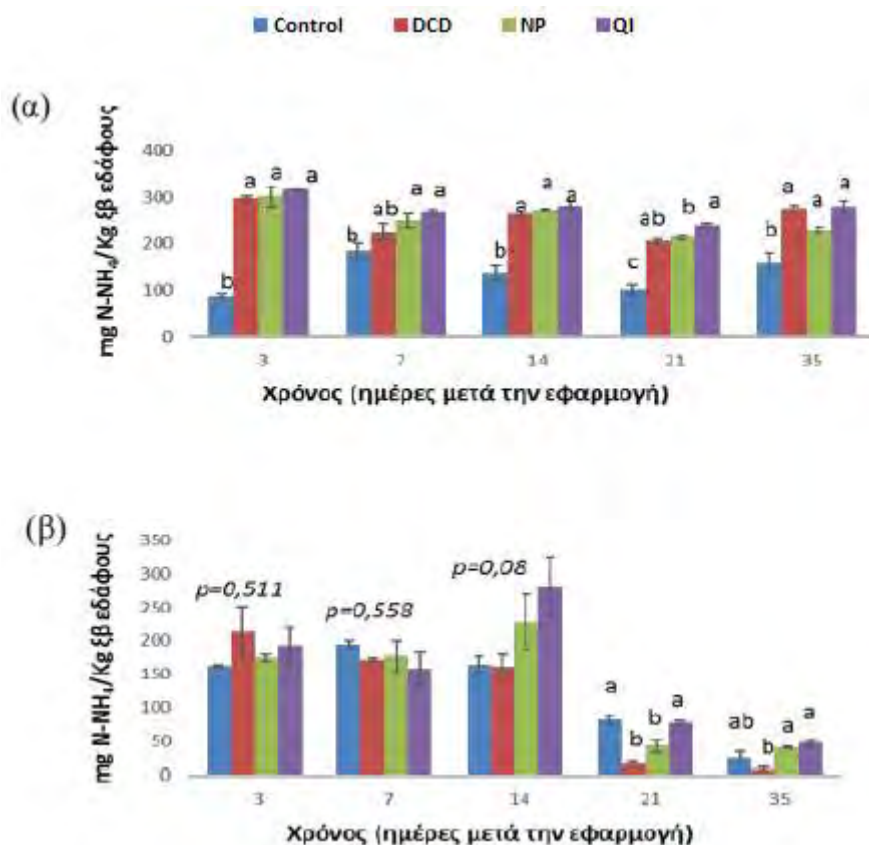
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 20.0. Τα δεδομένα των επιμέρους μετρήσεων υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way-ANOVA) για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασης τους. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κύριων παραγόντων ( $p \leq 0.05$ ) χρησιμοποιήθηκε το Tukey's post-hoc test προκειμένου να ανιχνευθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο χωριστά. Η περιγραφή της πορείας αποδόμησης των ουσιών στο έδαφος στο χρόνο πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μαθηματικού μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης (FOCUS, 2006).

## **ΜΕΡΟΣ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## Γ.1 Επίδραση των QI, NP και DCD στη συγκέντρωση των $\text{NH}_4^+$ στο έδαφος

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των μελετούμενων ουσιών στη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος απεικονίζονται στα Διαγράμματα 1α και 1β. Στην περίπτωση του όξινου εδάφους, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των αμμωνιακών ιόντων στα εδαφικά δείγματα σε σχέση με το μάρτυρα. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε η μεταχείριση του DCD κατά την 7<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, όπου ο ΠΝ δε φαίνεται να επηρέασε τη συγκέντρωση των  $\text{NH}_4^+$  (Διάγραμμα 1α).

Αντίθετα, στο αλκαλικό έδαφος η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων δε φαίνεται να επηρεάστηκε σημαντικά από καμία από τις μεταχειρίσεις, με εξαίρεση τις μεταχειρίσεις των DCD και NP κατά την 21<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, όπου καταγράφηκε μείωση της συγκέντρωσης των  $\text{NH}_4^+$  στα εδαφικά δείγματα (Διάγραμμα 1β).



**Διάγραμμα 1:** Η επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των  $\text{NH}_4^+$  στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα

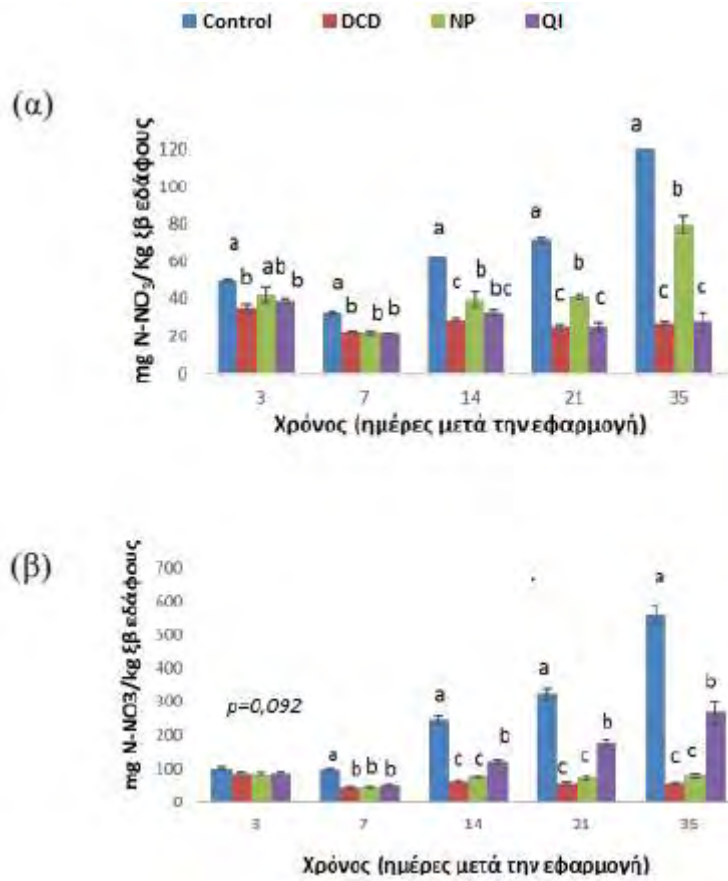
μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.



## Γ.2 Επίδραση των QI, NP και DCD στη συγκέντρωση των $\text{NO}_3^-$ στο έδαφος

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των ΠΝ στη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος απεικονίζονται στα Διαγράμματα 2α και 2β αντίστοιχα. Στην περίπτωση του όξινου εδάφους, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των παραγόμενων νιτρικών ιόντων στα εδαφικά δείγματα σε σύγκριση με το μάρτυρα. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε η μεταχείριση του NP κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, όπου ο ΠΝ δε φαίνεται να επηρέασε τη συγκέντρωση των  $\text{NO}_3^-$  σε σχέση με το μάρτυρα. Μεταξύ των μελετώμενων ουσιών από την 21<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος, η μείωση που προκάλεσαν τα DCD και QI ήταν ανάλογη και υψηλότερη αυτής που προκάλεσε το NP (Διάγραμμα 2α).

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στο αλκαλικό έδαφος, όπου σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των παραγόμενων νιτρικών ιόντων στα εδαφικά δείγματα σε σύγκριση με το μάρτυρα, με εξαίρεση την 3<sup>η</sup> ημέρα από την εφαρμογή, όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ( $p=0.092$ ). Μεταξύ των μελετώμενων ουσιών, από την 14<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος η μείωση που προκάλεσαν τα DCD και NP ήταν ανάλογη και υψηλότερη αυτής που προκάλεσε το QI (Διάγραμμα 2β).

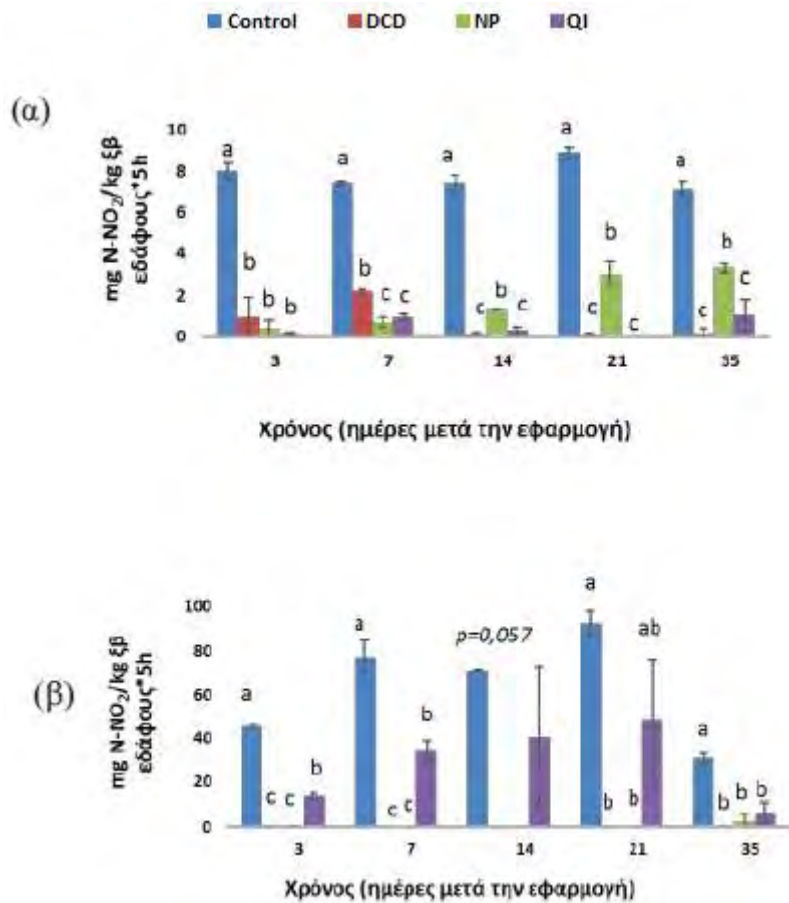


**Διάγραμμα 2:** Η επίδραση των ΠΙΝ στη συγκέντρωση των  $\text{NO}_3^-$  στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

### **Γ.3 Επίδραση των QI, NP και DCD στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος**

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των μελετώμενων ουσιών στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3α και 3β, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του όξινου εδάφους, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ρυθμού της δυνητικής νιτροποίησης στα εδαφικά δείγματα σε σύγκριση με αυτόν του μάρτυρα. Μεταξύ των μελετώμενων ουσιών, από την 14<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος η μείωση που προκάλεσαν τα DCD και QI ήταν ανάλογη και υψηλότερη αυτής που προκάλεσε το NP (Διάγραμμα 3α).

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στο αλκαλικό έδαφος, όπου σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ρυθμού της δυνητικής νιτροποίησης στα εδαφικά δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή ΠΝ σε σχέση με το μάρτυρα, με εξαίρεση την 14<sup>η</sup> ημέρα από την εφαρμογή, όπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ( $p=0.057$ ). Μεταξύ των μελετώμενων ουσιών, μόνο κατά την 3<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος η μείωση που προκάλεσαν τα DCD και NP ήταν ανάλογη και υψηλότερη αυτής που προκάλεσε το QI (Διάγραμμα 3β).



**Διάγραμμα 3:** Η επίδραση των ΠΙΝ στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης ( $\text{mg NO}_2^- \text{ Kg}^{-1}$  εδάφους  $5 \text{ h}^{-1}$ ) στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

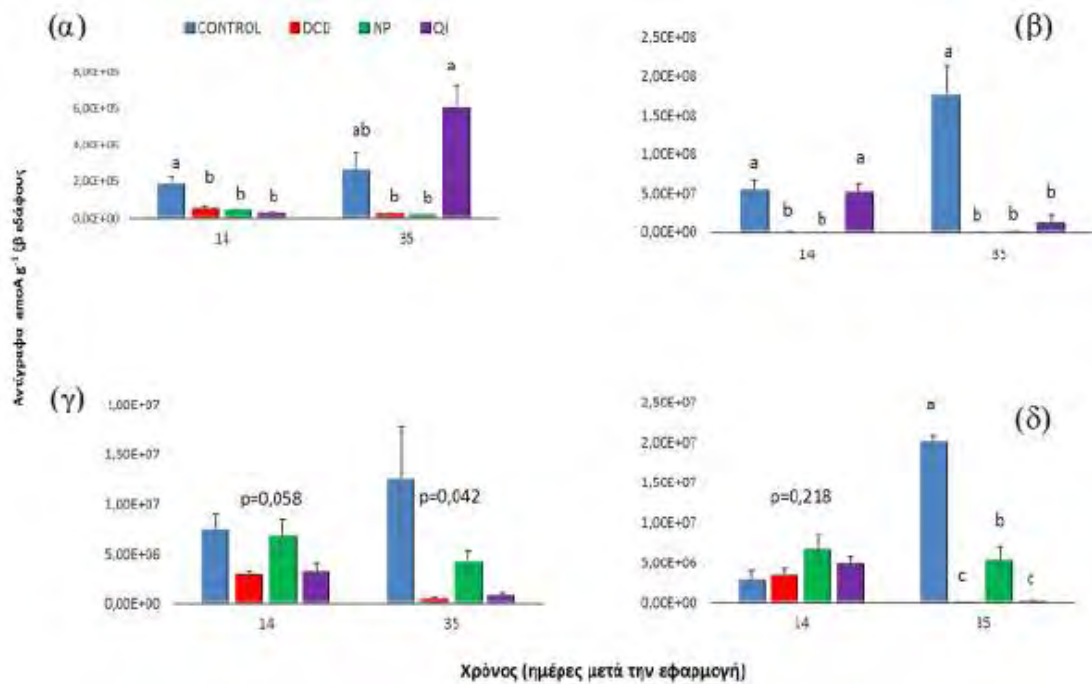
## Γ.4 Επίδραση των QI, NP και DCD στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των μελετώμενων ουσιών στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους απεικονίζονται στο Διάγραμμα 4.

Γενικά, παρατηρήθηκε ξεκάθαρη κυριαρχία των AOA ( $4,76 \times 10^5$  έως  $1,26 \times 10^7$  αντίγραφα *amoA* γονιδίου  $g^{-1}$  ξβ εδάφους) σε σχέση με τα AOB ( $1,73 \times 10^4$  έως  $6,01 \times 10^5$  αντίγραφα *amoA* γονιδίου  $g^{-1}$  ξβ εδάφους) στο όξινο έδαφος και σχετική κυριαρχία των AOB ( $1,45 \times 10^5$  έως  $1,77 \times 10^8$  αντίγραφα *amoA* γονιδίου  $g^{-1}$  ξβ εδάφους) σε σχέση με τα AOA ( $7,75 \times 10^4$  έως  $2,01 \times 10^7$  αντίγραφα *amoA* γονιδίου  $g^{-1}$  ξβ εδάφους) στο αλκαλικό έδαφος.

Στην περίπτωση των AOB, στο όξινο έδαφος η αφθονία μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα σε όλες τις μεταχειρίσεις αλλά μόνο προσωρινά (14<sup>η</sup> ημέρα από την εφαρμογή) και επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα με αυτά του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 4α). Αντίθετα, στο αλκαλικό έδαφος όλες οι μεταχειρίσεις στο τέλος του πειράματος οδήγησαν σε μείωση της αφθονίας των AOB (Διάγραμμα 4β).

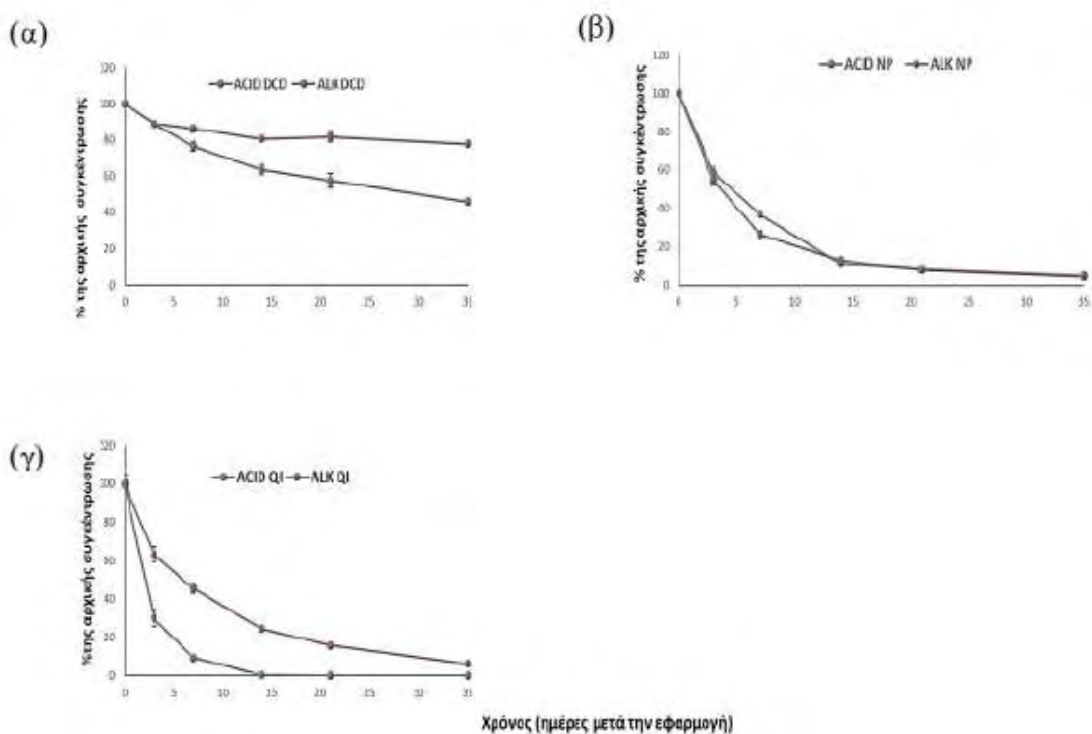
Στην περίπτωση των AOA στο όξινο έδαφος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την αφθονία τους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 4γ). Αντίθετα στο αλκαλικό έδαφος όλες οι μεταχειρίσεις στο τέλος του πειράματος (35<sup>η</sup> ημέρα από την εφαρμογή) οδήγησαν σε μείωση της αφθονίας των AOA. Μεταξύ των μεταχειρίσεων ωστόσο, η μείωση που προκάλεσαν τα DCD και QI ήταν ανάλογη και υψηλότερη αυτής που προκάλεσε το NP (Διάγραμμα 4δ).



**Διάγραμμα 4:** Η επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των ΑΟΒ (α,β) και ΑΟΑ (γ,δ) στο όξινο (α,γ) και στο αλκαλικό (β,δ) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

## Γ.5 Μελέτη της αποδόμησης των DCD, NP και QI στο έδαφος

Η πορεία αποδόμησης των DCD, NP και QI στα δύο εδάφη απεικονίζονται στο Διαγράμματα 5α, β και γ, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι τιμές του χρόνου ημιζωής ( $DT_{50}$ ), του ρυθμού αποδόμησης  $k$  και του σφάλματος  $\chi^2$  όπως υπολογίστηκαν για τις ουσίες που μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης. Η πιο έμμονη ουσία ήταν το DCD το οποίο εφαρμόστηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση και παρουσίασε ταχύτερο ρυθμό αποδόμησης στο όξινο συγκριτικά με το αλκαλικό έδαφος (χρόνος ημιζωής στο όξινο και αλκαλικό έδαφος 28,9 και 110,2 ημέρες αντίστοιχα). Το NP αποδομήθηκε ταχύτατα με ρυθμό που δε διέφερε μεταξύ των εδαφών (χρόνος ημιζωής στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος 4,7 και 3,9 ημέρες αντίστοιχα). Το QI επίσης αποδομήθηκε ταχύτατα και παρουσίασε ταχύτερο ρυθμό αποδόμησης στο όξινο συγκριτικά με το αλκαλικό έδαφος (χρόνος ημιζωής στο όξινο και αλκαλικό έδαφος 1,8 και 6,8 ημέρες αντίστοιχα).



**Διάγραμμα 5:** Η πορεία αποδόμησης των DCD (α), Nitrapyrin (β) και QI (γ) στο όξινο (μπλε γραμμή) και στο αλκαλικό (κόκκινη γραμμή) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

**Πίνακας 7:** Ο χρόνος ημιζωής ( $DT_{50}$ ), ο ρυθμός αποδόμησης  $k$  και το σφάλμα  $\chi^2$  όπως υπολογίστηκαν για τις ουσίες που μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	$k$ ( $d^{-1}$ )	$DT_{50}$ (d)	$\chi^2$ (%)
<b>DCD (200 mg Kg<sup>-1</sup>) ΟΞΙΝΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.024	28.93	4.047
<b>DCD (200 mg Kg<sup>-1</sup>) ΑΛΚΑΛΙΚΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.0063	110.2	3.636
<b>NP (5 mg Kg<sup>-1</sup>) ΟΞΙΝΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.147	4.729	7.082
<b>NP (5 mg Kg<sup>-1</sup>) ΑΛΚΑΛΙΚΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.178	3.901	8.814
<b>QI (30 mg Kg<sup>-1</sup>) ΟΞΙΝΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.385	1.799	4.125
<b>QI (30 mg Kg<sup>-1</sup>) ΑΛΚΑΛΙΚΟ ΕΛΛΑΦΟΣ</b>	0.102	6.828	7.952



## **ΜΕΡΟΣ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της επίδρασης του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του EQ, QI, στην αφθονία και τη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών σε πειράματα μικρόκοσμων εδάφους σε σύγκριση με τους γνωστούς και εμπορικά διαδεδομένους ΠΝ, ΝΡ και DCD.

Το pH του εδάφους αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα της επίδρασης των μελετώμενων ουσιών στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους. Στο όξινο έδαφος, το QI προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (35 ημέρες) που ήταν ισοδύναμη ή ισχυρότερη σε σχέση με αυτή των DCD και ΝΡ. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB μειώθηκε μόνο προσωρινά σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOA δεν επηρεάστηκε από καμία από τις μελετώμενες ουσίες. Στο αλκαλικό έδαφος, το QI δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων, ενώ προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης, χαμηλότερη ή ισοδύναμη, των ΝΡ και DCD. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA μειώθηκε σημαντικά από όλες τις μελετώμενες ουσίες, όμως στην περίπτωση των AOA η επίδραση των QI και DCD ήταν υψηλότερη σε σχέση με αυτή του ΝΡ.

Τα QI και DCD αποδομήθηκαν ταχύτερα στο όξινο έδαφος συγκριτικά με το αλκαλικό έδαφος, ενώ το ΝΡ αποδομήθηκε με παρόμοιο ρυθμό στα δύο εδάφη. Η υπολειμματική διάρκεια των ΠΝ στο έδαφος δε φάνηκε να έχει ξεκάθαρη συσχέτιση με τις παρατηρούμενες στους νιτροδοποιητικούς οργανισμούς επιδράσεις. Συνήθως η μεγαλύτερη υπολειμματικότητα μιας ουσίας συνδυάζεται με μεγαλύτερης διάρκειας δράση, κάτι το οποίο όμως δε φαίνεται να ισχύει στην εργασία μας για την περίπτωση του QI. Τα αποτελέσματα της έρευνας μας συνάδουν με προηγούμενη μελέτη των Papadopoulou et al σε μικρόκοσμο εδάφους, όπου το QI αποδομήθηκε ταχύτατα και προκάλεσε σημαντική μείωση του ρυθμού παραγωγής νιτροδών ιόντων, αλλά και της αφθονίας των μεταγράφων του *amoA* γονιδίου (Papadopoulou et al, 2016).

Στο όξινο έδαφος κυριάρχησαν τα AOA ενώ στο αλκαλικό τα AOB. Η κυριαρχία των AOA έναντι των AOB στα όξινα εδάφη έχει αναφερθεί σε πολλές άλλες εργασίες. Ενδεικτικά, οι Yao et al (2001), διαπίστωσαν ότι η μείωση του pH του εδάφους προκαλεί μεγαλύτερη αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOA έναντι των AOB. Επίσης, οι Hu et al (2013), εξέτασαν δείγματα από 65 διαφορετικά εδάφη και διαπίστωσαν σημαντικά υψηλότερη αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOA έναντι αυτό των AOB με όλο και μειούμενο εδαφικό pH, προτείνοντας πως τα AOA υπερτερούν έναντι των AOB σε εδάφη με όξινο pH.

Οι γνωστοί παρεμποδιστές ΝΡ και DCD αποδείχθηκαν και στην έρευνα μας ότι αναστέλλουν ισχυρά τη διαδικασία της νιτροποίησης στο έδαφος, κάτι το οποίο έχει αναφερθεί και σε πολλές προηγούμενες εργασίες σε μικρόκοσμους εδάφους. Οι Di & Cameron (2002) παρατήρησαν ότι το DCD σε δόσεις εφαρμογής 7,5 και 15 kg ha<sup>-1</sup>

μπορούν να μειώσουν την έκπλυση των νιτρικών ιόντων κατά 76% το φθινόπωρο και κατά 46% την άνοιξη, 59% ετησίως κατά μέσο όρο, χρησιμοποιώντας έδαφος από βοσκότοπο στην έρευνα τους. Οι Di et al (2009), εξέτασαν την επίδραση του DCD σε τρία διαφορετικά εδάφη σε διαφορετικές περιόδους βροχοπτώσεων στη Νέα Ζηλανδία και διαπίστωσαν ότι το DCD σε δόση  $10 \text{ kg ha}^{-1}$  περιόρισε την έκπλυση των νιτρικών ιόντων συνολικά κατά 59% και πως αυτό συσχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη των AOB στο έδαφος. Στην εργασία των Merino et al (2001),  $25 \text{ kg ha}^{-1}$  DCD μείωσαν το ρυθμό νιτροποίησης κατά 53% σε δύο εδάφη, όπου στο ένα είχε προστεθεί ανόργανο λίπασμα και στο άλλο οργανικό, αλλά μείωσε την παραγωγή  $\text{N}_2\text{O}$  από τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση μόνο στο έδαφος με το οργανικό λίπασμα. Οι Powell & Prosser (1985) έδειξαν ότι το NP μπορεί να μειώσει το ρυθμό οξείδωσης της αμμωνίας από το *N. europaea sp1* στο έδαφος όλο και περισσότερο σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ( $1,25$ ,  $3,75$  και  $7,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ο Martikainen (1984) διαπίστωσε ότι  $50 \text{ } \mu\text{g g dw}^{-1}$  NP, είναι ικανά να αναστείλουν την οξείδωση της αμμωνίας σε δύο εδάφη από κωνοφόρα δάση. Στην έρευνα των Sahrawat et al (1987),  $8 \text{ } \mu\text{g g dw}^{-1}$  NP και  $20 \text{ } \mu\text{g g dw}^{-1}$  DCD, αποδείχθηκαν αρκετά ώστε να μειωθεί σημαντικά ο ρυθμός οξείδωσης της αμμωνίας και της νιτροποίησης σε ένα λασπώδες έδαφος από αγροτική περιοχή, όχι όμως και σε ένα οργανικό. Στην εργασία των Bauhus et al (1996),  $20 \text{ mg kg dw}^{-1}$  NP μείωσαν το ρυθμό νιτροποίησης σε ένα όξινο δασικό έδαφος κατά 25%. Στη δική μας εργασία το NP χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση μικρότερη ( $5 \text{ mg kg dw}^{-1}$ ) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στις τρεις τελευταίες αναφερθέντες εργασίες και προκάλεσε πάλι σημαντική αναστολή της νιτροποίησης.

## **ΜΕΡΟΣ Ε: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αποτελέσματα της εργασίας μας υποδεικνύουν πως το QI αποτελεί έναν ισχυρό παρεμποδιστή νιτροποίησης. Επιπρόσθετα, το QI φαίνεται να έχει ισχυρότερη δράση στη διαδικασία της νιτροποίησης σε σύγκριση με τους γνωστούς PN NP και DCD στο όξινο έδαφος. Μελλοντικές έρευνες σε αυτό το κομμάτι, θα πρέπει να επικεντρωθούν στη δραστικότητα έναντι των νιτροποιητικών μικροοργανισμών τόσο του QI, όσο και του μητρικού του μορίου EQ, οι μηχανισμοί δράσης των οποίων παραμένουν ακόμη άγνωστοι. Η αποκάλυψη του μηχανισμού δράσης αυτών, καθώς και η επιβεβαίωση της ανασταλτικής τους δράσης σε ομάδες μικροοργανισμών με λειτουργικό ρόλο στη νιτροποίηση είναι πιθανό να συμβάλει στην ανάπτυξη ενός νέου και πιο αποτελεσματικού παρεμποδιστή νιτροποίησης, με συνέπεια την πιο αποδοτική χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα.

## Βιβλιογραφία

Abeliovich A., 2006. The Nitrite Oxidizing Bacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY

Adamantiadou S.M., Georgatou M., Giapitzakis H., Lakka L., et al., 2009. Biology of Third Grade of High School, POFT.

Anastasiades M., Lehotay S. J., Stainbahr D., Schenck F. J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int 86:412-431

Belser L.W., Mays E. L., 1980. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. Appl Environ Microb 39:505-510.

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

Coskun D., Britto D. T., Shi W., Kronzucker H. J., 2017. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. Nat Plants 3:17074

Delwiche C. C., 1970. The nitrogen cycle. Scientific American 223:136-147.

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

Di H. J., Cameron K. C., 2002. The use of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), to decrease nitrate leaching and nitrous oxide emissions in a simulated grazed and irrigated grassland. *Soil use and management* 18:395-403

Di H. J., Cameron K. C., Shen J. P., He J. Z., Winefield C. S., 2009. A lysimeter study of nitrate leaching from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor, dicyandiamide, and relationships with ammonia oxidizing bacteria and Archaea. *Soil use and management* 25:454-461

Dittmar Heinrich, Drach Manfred, Vosskamp Ralf, Trenkel Martin E., Gutser Reinhold, Steffens Günter "Fertilizers, 2. Types" In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, 2009

FOCUS. Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC document reference Sanco/10058/2005 version 2.0, 2006, 434 pp.

Francis C. A., Roberts K. J., Beman J. M., Santoro A. E., Oakley B. B., 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing Archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS* 102:14683-14688

Güthner T., Mertschenk B., 2006. "Cyanamides". Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry

Hu H. W., Zhang L. M., Dai Y., Di H. J., He J. Z., 2013. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. *Journal of Soils and Sediments* 8(13):1439-1449

Jetten, M.S.M. et al., 2009. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria" *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44(2-3):65-84

Kandeler E., 1995. Potential nitrification. In: Schinner F., Ohlinger R., Kandeler E., Margasin R. (Eds), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 426.

Karas P. A., Metsoviti A., Vasileios Z., Abatzi M., Ehaliotis C., Omirou M., Papadopoulou E. S., Menkissoglou-Spiroudi U., Karpouzas D. G., 2015. Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Sci Total Environ* 530-531:129-139.

Kim D. G., Giltrap D. L., Sagggar S., Hanly J. A., 2014. Field studies assessing the effect of dicyandiamide (DCD) on N transformation, pasture yields, N<sub>2</sub>O emissions and N leaching in the Manawatu region, New Zealand. *Journal of Agricultural Research*, 57:4, 271-293

Konneke M., Bernhard A. E., R. de la Torre J., Walker C. B., Waterbury J. B., Stahl D. A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546

Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal B., 2011. "The Microbial Nitrogen-Cycling Network". *Nature Reviews Microbiology*. 1(1): 1–14.

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 devanatterra* in culture and soil. *Soil Biology & Biochemistry* 62:129-133

Lehtovirta-Morley L. E., Ge C., Ross J., Yao H., Nicol G. W., Prosser J. I., 2014. Characterization of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidizers and their inhibition and stimulation by organic compounds. *FEMS Microbiology Ecology* 89:542-552

Mancinelli R.L., 1996. "The nature of nitrogen: an overview". *Life Support & Biosphere Science : International Journal of Earth Space*. 3 (1–2): 17–24

Pal P., Mc Millan A. M. S., Sagggar S., 2015. Routes of Dicyandiamide uptake in pasture plants: A preliminary glasshouse study.



Papadopoulou S. E., Tsachidou B., Sulowicz S., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzas D. G., 2016, Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry and potential effects on soil microbes: effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 82:747-755

Powell S. J., Prosser J. I., 1985. The effect of nitrapyrin and chloropicolinic acid on ammonium oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 28:51-54

Qiao C., Liu L., Hu S., Compton J. Greaver T. L., Li Q., 2015. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global Change Biology* 21:1249-1257

R.E.D. FACTS Ethoxyquin. United States Environmental Protection Agency. November 2004. EPA-738-F-04-006

Rotthauwe J. H., Witzel K. P., Liesaek 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 E., Kortsinidou M., Giannakou I. O., Singh B. K., Menkissoglou-Spiroudi U., Karpouzas D. G., 2013. Bio-pesticides: harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a Paecilomycelilacinus-based nematicide. *Soil Biol Biochem* 67:98-105

Rouse J., Bishop C., Struger J., 1999. Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival. *Environ Health Perspect* 107(10):799-803

Schwarzer C., Hazelwandter K., 1995. Rapid quantification of the nitrification inhibitor dicyandiamide in soil samples, nutrient media and bacterial cell-free extracts. *Journal of Chromatography A* 732:390-393

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 *Nitrosospira multififormis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiology Letters* 344:121-129

Stahl D.A., R. de la Torre J., 2012. Physiology and diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annu Rev Microbiol* 66:83-101

Stein L. Y., Klotz M. G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26:R94-R98

Subbarao G. V., Rondon M., Ito O., Ishikawa T., Rao I. M., Nakahara K., Lascano C., Berry W. L., 2007. Biological nitrification inhibitor (BNI) – is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294(1-2):5-18

Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. Mc Graw-Hill Education. Metacalf & Eddy Inc.

Thorisson S., Gunstone F. D., Hardy R., 1992. Some oxidation products of Ethoxyquin including those found in autoxidising systems. *Chem Phys Lipids* 60:263-71

Vajralaa N., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L. A., Schauer A., Bottomley P. J., Stahl D. A., Arp D. J., 2013. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *P Natl Acad Sci USA* 110:1006-1011

Vitousek P. M., Aber J. D., Howarth R. W., Likens G. E., Matson P. A., Schindler D. W., Schlesinger W. H., Tilman D. G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* 7:737-750

Yao H., Gao Y., Nicol G. W., Campbell C. D., Prosser J. I., Zhang L., Han W., Singh B. K., 2011. Links between Ammonia Oxidizer Community Structure, Abundance, and Nitrification Potential in Acidic Soils. *Appl and Env Microb* 77(13):4618-4625

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

Zifa A., Mamouris Z, Moutou K., 2011. *Biology* 2nd edition. Volos: Thessaly University Editions