



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της επίδρασης της 3,5-
διχλωροανιλίνης, προϊόντος
μεταβολισμού του μυκητοκτόνου
iprodione, στην αφθονία και
λειτουργία των νιτροδοποιητικών
αρχαίων σε εδάφη από την Ελλάδα

Διπλωματική εργασία

Υψηλάντη Νεκταρία

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY, DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Study of the impact of 3,5-dichloroaniline, a transformation product of the fungicide iprodione, on the abundance and function of ammonia-oxidizing archaea in soil from Greece

Τριμελής επιτροπή

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

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

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

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
Abstract.....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1. Γεωργικά φάρμακα.....	8
1.1.1. Μυκητοκτόνα.....	9
1.1.1.1. Iprodione.....	9
1.1.1.2. 3,5-DCA.....	11
1.2. Μικροοργανισμοί του εδαφους.....	12
1.3. Βιογεωχημικοί κύκλοι- Κύκλος Αζώτου.....	12
1.3.1. νιτροποίηση.....	14
1.3.2. Επίδρασεις γεωργικών φαρμάκων και νιτροποίηση.....	15
1.4. Σκοπός πειράματος.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. Πειραματική προετοιμασία.....	17
2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ NH_4^+ ΚΑΙ ΤΩΝ NO_3^- ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	19
2.3.1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:.....	19
Για απομόνωση NH_4^+ και NO_3^-	19
2.3.2. Πειραματική διαδικασία.....	19
2.4. Προσδιορισμός της αφθονίας των ΑΟΑ.....	21
2.4.1. Μέθοδοι.....	21
2.5. Προσδιορισμός της αποδόμησης της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους.....	23
2.5.1. Διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:.....	23
2.5.2. Διαδικασία Εκχύλισης από το έδαφος.....	23
2.5.3. Διαδικασία Ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA.....	23
2.6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	23
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1. Αξιολογηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην συγκεντρωση των NH_4^+ και των NO_3^- στο εδαφος.....	24
3.1.1. Επίδραση 3,5-dca στη συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων στο εδαφος.....	24
3.1.2. Αποτελέσματα για την επίδραση στη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων.....	26
3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗΝ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ αρχαιων ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	28

3.3. Αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος	30
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	31
5.Βιβλιογραφία	33

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Καρά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου, την βοήθεια του στην εκμάθηση και οργάνωση των πειραματικών διαδικασιών, τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές και φυσικά για την υπομονή του για όλη την περίοδο του πειράματος καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την καθοδήγηση του πειράματος μου στο εργαστήριο. Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω τον Αλέξανδρο Κασιωτάκη, με τον οποίο δουλεύαμε παράλληλα, για την βοήθεια του στο εργαστηριακό κομμάτι του πειράματος, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα. Επίσης, ένα ευχαριστώ και στην κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος και στον κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη αναπληρωτή στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη τους με κάθε δυνατό τρόπο όλο το διάστημα που διήρκεσε η εργασία, αλλά και τους φίλους μου για όλες τις στιγμές που μου χάρισαν κατά τη διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων είναι αρκετά διαδεδομένη μέθοδος στη σύγχρονη γεωργία, για αυτό η μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο του εφαρμοζόμενου γεωργικού φαρμάκου στο εξεταζόμενο οικοσύστημα είναι πολύ συχνή. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν μόνο στην επίδραση των γεωργικών φαρμάκων και όχι στους μεταβολίτες τους, οι οποίοι ίσως και να παρουσιάζουν υψηλότερη τοξικότητα από τη μητρική ουσία. Η παρούσα μελέτη εξετάζει την επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης (3,5-DCA), του κύριου μεταβολικού προϊόντος του μυκητοκτόνου iprodione, στα νιτροδοποιητικά αρχαία (AOA). Τα AOA συμμετέχουν στη νιτροποίηση, το σημαντικότερο στάδιο στον κύκλο του αζώτου, και είναι υπεύθυνα, μαζί με τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB), για το πρώτο βήμα της νιτροποίησης, την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) και αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρικά ιόντα (NO_2^-). Η επίδραση του 3,5-DCA αξιολογήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα σε δείγματα εδάφους στα οποία είχε προηγηθεί ή όχι αμμωνιακή λίπανση, με την εφαρμογή 3,5-DCA σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.6, 6 και 60 mg/g). Οι συγκεντρώσεις αυτές αντικατοπτρίζουν τις συγκεντρώσεις που αναμένεται να σχηματιστούν από την υδρόλυση του iprodione στο έδαφος μετά την εφαρμογή x1, x10, x100 της συνιστώμενης δόσης. Η επίδραση 3,5-DCA στην αμμωνιακή οξείδωση καθορίστηκε μέσω του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της ποσοτικοποίησης της αφθονίας των AOA μέσω PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR). Επιπλέον, αξιολογήθηκε και ο ρυθμός αποδόμησης 3,5-DCA. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως υπήρξε μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στις συγκεντρώσεις 6 και 60 mg/g, η οποία ήταν περισσότερο ξεκάθαρη στα δείγματα εδάφους με αμμωνιακή λίπανση. Αντίθετα, η εφαρμογή 3,5-DCA οδήγησε σε σημαντικές παραλλαγές στην αφθονία των AOA χωρίς όμως την εμφάνιση κάποιου ξεκάθਾਰου δόσο-εξαρτώμενου ή χρονο-εξαρτώμενου προτύπου. Το συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι υψηλές συγκεντρώσεις 3,5-DCA οδηγούν σε αναστολή της νιτροποίησης, ιδιαίτερα σε εδάφη με περίσσεια αμμωνίου.

Abstract

The use of pesticides is widespread in modern agriculture, so the studies of their impact on non-target organisms of the ecosystems where they are applied are common. However most of these studies are focused only on the impact of the pesticide itself and not of their metabolites, which might show higher toxicity than the parent compound. The current thesis studied the impact of 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), the main metabolite of the fungicide iprodione, on the community of ammonia oxidizing microorganisms of the soil and more specifically on ammonia oxidizing archaea (AOA). Ammonia oxidizers are involved in nitrification, the most important step in the nitrogen cycle, and they are responsible for its first step, the oxidation of ammonia (NH_3) and ammonium ions (NH_4^+) to nitrite (NO_2^-). Its impact was evaluated in a soil lab study, where the soil was subjected or not to ammonia fertilization prior to the treatment with different concentrations of 3,5-DCA (0.6, 6 and 60 mg/g). These concentrations correspond to the concentrations of 3,5-DCA that are expected to be formed from the hydrolysis of iprodione in the soil after the application of x1, x10, x100 of the recommended dose. The impact of 3,5-DCA on ammonia oxidation was determined through measurement of the potential nitrification rate and quantification of the abundance of AOA through real time PCR. Moreover, the degradation rate of 3,5-DCA was evaluated. We observed a reduction in the potential nitrification rate in the soils treated with the high dose rates of 6 and 60 mg/g, and that change was clearer in the ammonia-amended soil. The application of 3,5-DCA induced significant changes in the abundance of AOA only in the ammonia-amended samples, although a clear dose- or time-dependent pattern was not evident. The conclusion of this study is that 3,5-DCA at high concentrations may lead to the inhibition of nitrification, especially in soils with excess ammonium.

1.Εισαγωγή

1.1. ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η εθνική νομοθεσία με το άρθρο 9 της οδηγίας 2009/128/ΕΚ, ορίζει το γεωργικό φάρμακο ως φυτοπροστατευτικό προϊόν που πληρεί τα κριτήρια του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.1107/2009 και βιοκτόνο όπως ορίζεται στο ΠΔ 205/2001 (ΦΕΚ 160/Α'/16-7-2001), για τη διάθεση στην αγορά βιοκτόνων. Επομένως με τον όρο γεωργικό φάρμακο καλύπτεται ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών ικανών να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη εχθρών των καλλιεργειών, ή ακόμα και να τους θανατώσουν. Η χρήση τους έχει ως στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας και των αποδόσεων των καλλιεργούμενων φυτών, τη βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, τη μείωση των απωλειών στα γεωργικά προϊόντα κατά την αποθήκευση αλλά και κατά τη διακίνηση τους και την διασφάλιση της επάρκειας τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα (Aktar et al, 2009, Taube et al., 2002, Ζιώγας κ.α., 2010, Παπαδοπούλου , 2013).

Η σύγχρονη γεωργία εξαρτάται από μια ευρεία ποικιλία συνθετικών χημικών προϊόντων, όπως εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και άλλα γεωργικά φάρμακα (Martinez-Toledo et al. 1998). Εκτιμάται ότι ετησίως χρησιμοποιούνται 4 εκατομμύρια τόνοι γεωργικών φαρμάκων στις διάφορες καλλιέργειες σε παγκόσμια κλίμακα, με τα ζιζανιοκτόνα να είναι η πιο χρησιμοποιούμενη κατηγορία γεωργικών φαρμάκων (48% επί της συνολικής εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων παγκοσμίως), ακολουθούμενα από τα μυκητοκτόνα (35%) και τα εντομοκτόνα (14%) (Gavrilescu,2005, Braschil et al., 2011, Παπαδοπούλου Ε., 2013). Οι τρόποι χρήσης τους ποικίλουν , όμως ανεξάρτητα από τον τρόπο χρήσης, τελικά το ποσοστό της συνολικής χορηγούμενης ποσότητας που φτάνει στο στόχο είναι μικρό, ενώ ο τελικός αποδέκτης όλων των γεωργικών φαρμάκων είναι το έδαφος (Gavrilescu,2005, Galiulin et al.,2001).

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, από τη συνολικά χορηγούμενη ποσότητα, το 80% της δραστικής ουσίας καταλήγει στο έδαφος, 5% κατακρατείται από το φύλλωμα των φυτών και 15% ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα (Margni et al., 2002). Η συμπεριφορά και τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος ελέγχεται από χημικές, φυσικές, βιολογικές διεργασίες που διακρίνονται σε διεργασίες που επηρεάζουν την υπολειμματικότητα και σε διεργασίες που καθορίζουν την κινητικότητα (Andreu and Pico, 2004).

Η υπολειμματική δράση των γεωργικών φαρμάκων ορίζεται συνήθως βάσει του χρόνου ημιζωής ($t_{1/2}$) δηλαδή του χρόνου που απαιτείται για τη διάσπαση του 50% της ποσότητας του γεωργικού φαρμάκου που αρχικά χρησιμοποιήθηκε. Οι τιμές του χρόνου ημιζωής επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από διεργασίες όπως η μικροβιακή διάσπαση (Tiryaki and Temur, 2010). Επομένως η συνεχώς αυξανόμενη χρήση γεωργικών φαρμάκων μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική ισορροπία του

εδάφους, προκαλώντας αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους (Martinez-Toledo et al. 1998).

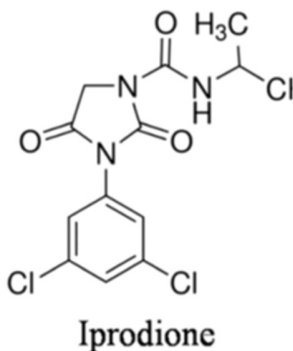
1.1.1. Μυκητοκτόνα

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

Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, μυκητοκτόνα επαφής, διασυστηματικά ή διαφυλλικά μυκητοκτόνα. Τα μυκητοκτόνα επαφής παραμένουν στην επιφάνεια και δεν απορροφούνται από τον φυτικό ιστό, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο προστασία στο σημείο εφαρμογής. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα απορροφούνται και ανακατανέμονται στο εσωτερικό του φυτού διαμέσου του ξυλώματος. Τα διαφυλλικά εφαρμόζονται στα φύλλα και ανακατανέμονται από την πάνω στην κάτω πλευρά του φύλλου.

Υπολείμματα μυκητοκτόνων έχουν βρεθεί σε φαγητά, κυρίως από μεταχειρίσεις μετά την συγκομιδή (Gosselin et al., 1984). Κάποια είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, όπως το vinclozolin (Hrelia et al., 1996).

1.1.1.1. Iprodione



Εικόνα 1: Η δομή του μορίου της ιπροδιόνης (Campos et al., 2016)

Το iprodione [3-(3,5-διχλωροφαίνυλο)-N-ισοπρόπυλο-2,4-διοξοϊμιζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο] (Εικόνα 1) είναι προστατευτικό δικαρβοξαμίδιο μυκητοκτόνο επαφής με ευρύ φάσμα δράσης που αναστέλλει την βλάστηση των σπορίων, των μυκήτων και γενικότερα την μυκηλιακή ανάπτυξη. Χρησιμοποιείται ευρέως στην γεωργία και την κηπουρική (Puglisi et al., 2014), και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων όπως οι *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Rhizoctonia* sp. (Grabke et al., 2014, Miñambres et al. 2010).

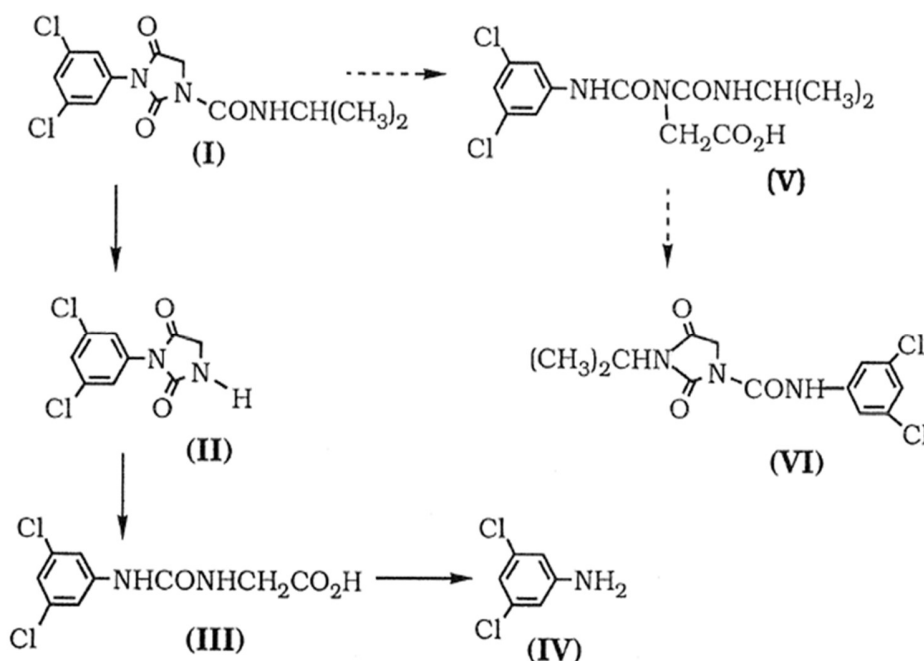
Το iprodione δρα σε όλες τις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης των μυκήτων. Ενώ είναι επίσης γνωστό ότι μέσω του κύριου μεταβολίτη του, της 3,5-διχλωροανιλίνης (3,5-DCA), επιδρά αρνητικά και σε οργανισμούς που δεν είναι στόχοι (Parrola et al., 2014). Έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο, και έχει αναφερθεί η εμπλοκή του στην μείωση της παραγωγής τεστοστερόνης σε άρρενα άτομα καθώς πειράματα έχουν δείξει ότι υπάρχει καθυστέρηση στην εφηβική ανάπτυξη αρσενικού αρουραίου (Blystone et al., 2007). Επίσης εμφανίζει υψηλή οικοτοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς (NOEC 34 ημέρες ψάρια: 0.26 mg a.s./l)

(EFSA 2016). Προσροφάται ασθενώς στα εδαφικά κολλοειδή ($K_{oc} = 400 \text{ ml/g}$) με αποτέλεσμα να εμφανίζει υψηλή κινητικότητα στο περιβάλλον (Strömqvist & Jarvis 2005) και να ανιχνεύεται συχνά σε επιφανειακά νερά (Sequinatto et al. 2013) καθώς και σε ιζήματα λιμνών (Metcalf et al. 2017).

Όσον αφορά την επίδραση του iprodione στους μικροοργανισμούς του εδάφους, ελάχιστα είναι γνωστά. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλές συγκεντρώσεις iprodione προκάλεσαν μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (PLFAs, DGGE), χωρίς όμως να διευκρινίζεται εάν οι επιδράσεις ήταν θετικές ή αρνητικές (Wang et al., 2004, Minambres et al., 2010), ενώ μια πρόσφατη μελέτη των Pardo et al., (2014) έδειξε ότι η εφαρμογή iprodione σε δόσεις $\times 10$ και $\times 100$ φορές της συνιστώμενης οδηγεί σε πρόσκαιρη ή έμμονη αναστολή της νιτροποίησης που αποδόθηκε στην συσσώρευση της 3,5-DCA.

Το iprodione εμφανίζει χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα στο έδαφος ($t_{1/2} = 6.3-89.4 \text{ d}$) (EFSA 2016) που εμφάνισε σημαντική αρνητική συσχέτιση με το pH του εδάφους (Walker 1987). Η ταχύτερη αποδόμηση του σε εδάφη που εμφανίζουν ουδέτερο προς αλκαλικό pH αποδόθηκε σε συνδυασμό βιοτικών και αβιοτικών μηχανισμών.

Παράλληλες μελέτες έδειξαν ότι σε εδάφη με ιστορικό χρήσης iprodione το μυκητοκτόνο εμφάνιζε ταχύτερη αποδόμηση που οδηγούσε σε απώλεια της μυκητοκτόνου δράσης του (Entwistle et al. 1986), φαινόμενο που ονομάστηκε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και αποδίδεται στην επικράτηση στο έδαφος βακτηρίων που χρησιμοποιούν το iprodione ή τα προϊόντα μεταβολισμού του ως πηγές ενέργειας (Mitchell & Cain 1996). Σε τέτοια εδάφη το μυκητοκτόνο υδρολύεται αρχικά σε 3,5-dichlorophenyl-carboxamide το οποίο στην συνέχεια μεταβολίζεται περαιτέρω σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate και στην συνέχεια σε 3,5-dichloroaniline (Mercadier et al. 1996) (Εικόνα 2).



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

Πρώτοι οι Athiel et al. (1995) απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Arthrobacter* sp., που αποδομούσε ταχύτατα το iprodione ακολουθώντας το μεταβολικό μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Mercadier et al. 1996). Πιο πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση, από έδαφος χωρίς πρότερη χρήση iprodione, μίας βακτηριακής κοινοπραξίας, που αποτελούνταν από ένα *Arthrobacter* και ένα *Achromobacter* στέλεχος, που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το iprodione (Campos et al. 2015). Ακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι το στέλεχος *Arthrobacter* ήταν υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του iprodione ακολουθώντας το ίδιο μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Campos et al., 2017).

1.1.1.2. 3,5-DCA

Η 3,5-DCA είναι το κύριο προϊόν του μεταβολισμού του Iprodione. Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά από τους Walker et al. (1986) και ανήκει στις διχλωροανιλίνες οι οποίες είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο ανιλίνης υποκατεστημένο με 2 άτομα χλωρίου και έχουν τον μοριακό τύπο $C_6H_5Cl_2N$. Υπάρχουν έξι ισομερή της διχλωροανιλίνης και ονομάζονται με βάση την αμινομάδα στην θέση 1.

Μελέτες για την τοξικότητα της 3,5-DCA σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι επάγει τον σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης, δηλαδή αιμοσφαιρίνης με ένα Fe^{3+} στην ομάδα αίμης αντί για Fe^{2+} , οπότε δεν μπορεί να προσδεθεί το οξυγόνο (Valentovic et al., 1997). Μελέτες για την τοξικότητα της σε άλλους οργανισμούς δείχνουν ότι προκαλεί νεφροτοξικότητα (Lo et al, 1990) και σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης σε αρουραίους (Gosselin et al, 1984).

Ελάχιστα είναι γνωστά για την τύχη της 3,5-DCA στο περιβάλλον καθώς και τις αλληλεπιδράσεις της με τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω πρώτη φορά οι Parrola et al. (2014) παρατήρησαν συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της 3,5-DCA στο έδαφος (από την υδρόλυση του iprodione) και της δραστηκότητας διαφόρων μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος καθώς και στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.

1.2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

Τα γεωργικά φάρμακα στο έδαφος αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εδάφους και μπορούν να μεταβάλλουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα, καθώς και τη φυσιολογική και βιοχημική τους συμπεριφορά. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επηρεαστεί η ομαλή λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος εξαιτίας του ιδιαίτερου ρόλου των μικροοργανισμών στο έδαφος. Οι μικροοργανισμοί επηρεάζουν, συμμετέχουν και καταλύουν μεγάλο αριθμό σημαντικών διεργασιών στο έδαφος. Ο κυριότερος ρόλος τους είναι η συμμετοχή τους στην ανακύκλωση βασικών θρεπτικών στοιχείων για τα φυτά και ιδιαίτερα ενώσεων άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου και θείου (Falkowski et al., 2008, Miransari, 2001). Η μικροβιακή δράση στο έδαφος μετατρέπει τα στοιχεία αυτά σε μορφές που επιτρέπουν την εύκολη πρόσληψη τους από τα φυτά, ενισχύει τη γονιμότητα των εδαφών και συμβάλει στην αύξηση της παραγωγικότητας των φυτών (van der Heijden et al., 2008, Miransari, 2001). Στους μικροοργανισμούς του εδάφους διακρίνονται οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στους βιογεωχημικούς κύκλους του άνθρακα, του αζώτου και του φωσφόρου. Ως τέτοιοι μικροοργανισμοί έχουν αναγνωριστεί οι βασιδιομύκητες που συμμετέχουν στη διάσπαση της οργανικής ουσίας του εδάφους (κύκλος άνθρακα) (Casieri et al., 2010, Hassett et al., 2009) και οι μικροοργανισμοί που καταλύουν την οξείδωση της αμμωνίας (νιτρωδοποιητικά αρχαία και βακτήρια και νιτροποιητικά βακτήρια) (κύκλος αζώτου) (You et al., 2009, Francis et al., 2007). Τέλος σημαντικοί για τον κύκλο του φωσφόρου είναι οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες (Wang and Qui, 2006).

1.3. ΒΙΟΓΕΩΧΗΜΙΚΟΙ ΚΥΚΛΟΙ- ΚΥΚΛΟΣ ΑΖΩΤΟΥ

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία της ζωής καθώς αποτελεί βασικό συστατικό νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών ενώσεων. Ακόμη είναι το πιο άφθονο στοιχείο στην ατμόσφαιρα (78%) υπό την μορφή του μοριακού αζώτου (N₂). Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου καθώς συμμετέχουν στις 4 βασικές διεργασίες μετατροπής του αζώτου στο έδαφος:

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση αζώτου
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση

Το μοριακό άζωτο μπορεί να δεσμευτεί από την ατμόσφαιρα από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και να μετατραπεί σε αμμωνία (NH_3). Η διαδικασία αυτή λέγεται **αζωτοδέσμευση** και είναι σημαντική διότι εμπλουτίζει το έδαφος σε N με την μορφή αμμωνίας που μπορεί να αφομοιωθεί στην οργανική ύλη. Στη γεωργία χρησιμοποιούνται λιπάσματα για εμπλουτισμό του εδάφους με αμμωνία (Wagner, 2009) .

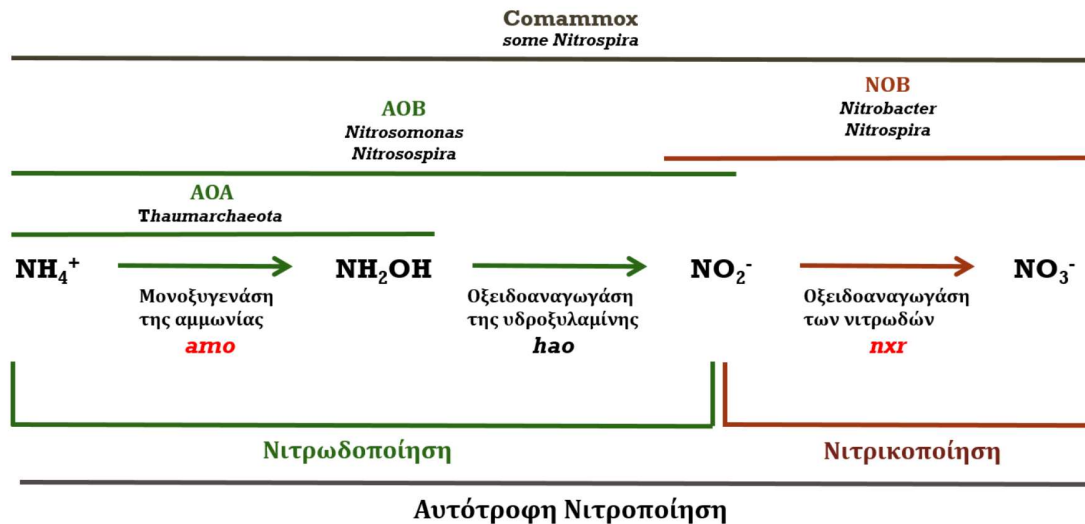
Οι αμμωνιακές οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στο έδαφος υδρολύονται με την δράση υδρολυτικών ενζύμων (αμινοπεπτιδάσες, χιτινάσες) που παράγονται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η συγκεκριμένη διαδικασία οδηγεί στην ελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος και ονομάζεται **αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση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

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

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

1.3.1. ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια: (i) την οξείδωση της NH_3 ή NH_4^+ προς NO_2^- (Νιτρωδοποίηση) και (ii) την οξείδωση των NO_2^- προς NO_3^- (Νιτρικοποίηση) (Εικόνα 3).



Η νιτρωδοποίηση στο έδαφος πραγματοποιείται από βακτήρια που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια και ειδικότερα στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrosospira* (Kowalchuk and Stephen, 2001) και Αρχαία που ανήκουν στο φύλο Thaumarchaeota (Schleper and Nicol 2010). Η νιτρωδοποίηση βιοχημικά διαχωρίζεται σε δύο επιπλέον στάδια: (α) την οξείδωση της NH_3 ή NH_4^+ προς NH_2OH (υδροξυλαμίνη), στάδιο που ελέγχεται από το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και (β) την οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε NO_2^- που ελέγχεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) και απαντάται μόνο στα AOB (ο μηχανισμός μετατροπής της υδροξυλαμίνης σε NO_2^- στα AOA δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη) (StahlanddelaTorres, 2012). Τα νιτρώδη που παράγονται ως τελικό προϊόν της νιτρωδοποίησης μετατρέπονται ακολούθως από νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB, nitrite-oxidizingbacteria) σε νιτρικά ιόντα μέσω της νιτρικοποίησης.

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

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

1.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων, κάποιες εκ των οποίων έχουν καταδείξει την ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στα γεωργικά φάρμακα. Στις μελέτες αυτές συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων, η μελέτη των Feld et al., (2015) που υπέδειξαν ότι η εφαρμογή του καπνιστικού dazomet αλλά και του μυκητοκτόνου mancozeb προκάλεσαν μείωση στον πληθυσμό και στην λειτουργία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων με τις επιδράσεις του mancozeb να είναι αντιστρεπτές, καθώς και η μελέτη των Puglisi et al., (2012) που έδειξαν ότι η εφαρμογή των μυκητοκτόνων penconazole και cyprodynil οδήγησαν σε άμεση αλλά αντιστρεπτή και πάλι μείωση της δυναμικής νιτροποίησης ενώ παρατηρήθηκαν και σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των AOA και AOB.

Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, συνήθως σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες της συνιστώμενης έχει αρνητικές επιδράσεις στον πληθυσμό και στην λειτουργία των AOA και AOB (Crouzet et al., 2009; Hernandez et al., 2011), ενώ μελέτη από τους Paradourouliou et al., (2016) έδειξε ότι η εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών στο έδαφος όπως τα *ortho*-phenylphenol και ethoxyquin αντίστοιχα μπορούν να προκαλέσουν σημαντική αναστολή της νιτροποίησης και μείωση της έκφρασης του γονιδίου *amoA*.

Οι Wessen and Hallin (2011) προτείνουν τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς ως δείκτες καταπόνησης της μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους, ενώ οι Kargouzas et al, (2016) πρότειναν την χρήση των νιτροδοποιητικών βακτηρίων ως μικροβιακή - ομάδα βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Οι περισσότερες από τις μελέτες σήμερα έχουν εστιάσει στην μελέτη της επίδρασης των μητρικών ουσιών στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στους νιτροδοποιητικούς

μικροοργανισμούς ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για την τοξικότητα πιθανών μεταβολικών προϊόντων σε αυτούς.

Πρώτοι οι Pappola et al., (2015) έδειξαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της συγκέντρωσης της 3,5-DCA που σχηματίστηκε από την εφαρμογή του iprodione στο έδαφος. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ iprodione και τοξικότητας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διευκρινιστεί ο ρόλος των μεταβολικών προϊόντων, της 3,5-DCA και λοιπών δινιτροανιλινών που παράγονται ως παραπροϊόντα από την υδρόλυση διαφόρων γεωργικών φαρμάκων (παράγωγα ουρίας, propanil) στην τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.4. Σκοπός πειράματος

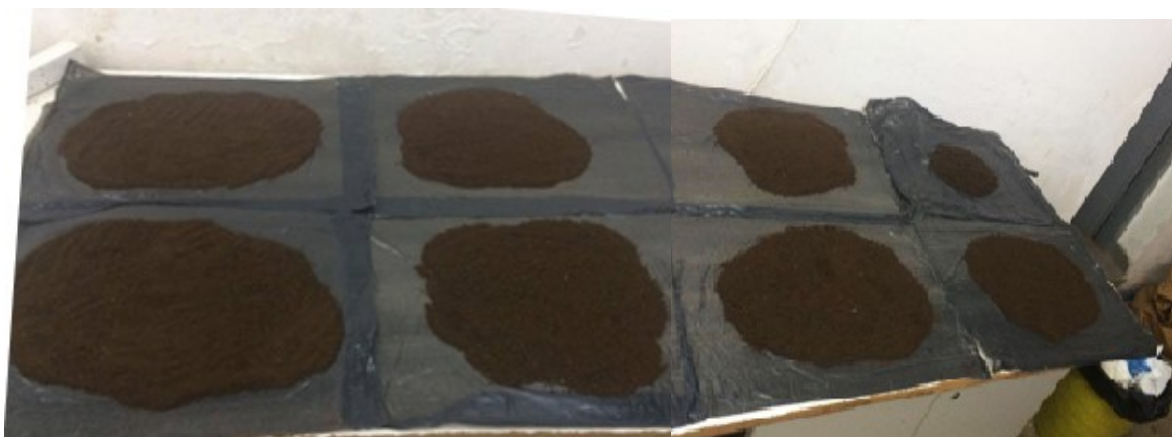
Προηγούμενες μελέτες από τους Pappola et al., (2015) πρότειναν ότι η 3,5-DCA είναι υπεύθυνη για την μείωση της δραστηριότητας σημαντικού αριθμού μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος αλλά και της δυνητικής νιτροποίησης. Δεδομένου του ρόλου των AOA στην νιτροποίηση κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της 3,5-DCA στην λειτουργία και στην αφθονία των AOA.

Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες (Pappola et al., 2015) τα δεδομένα για την εμπλοκή του μεταβολίτη 3,5-DCA στην τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους προέκυπταν με βάση τις συγκεντρώσεις της ανιλίνης που σχηματιζόταν στο έδαφος από την υδρόλυση του iprodione. Στην παρούσα μελέτη έγινε εφαρμογή της ίδιας της 3,5-DCA στο έδαφος (και όχι του iprodione), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, ανάλογες αυτών που αναμένεται να σχηματιστούν από την εφαρμογή του iprodione σε συγκεντρώσεις ίδιες με την συνιστώμενη αλλά και πολλαπλάσιες αυτής, και μελετήθηκε η αποδόμηση και η επιδράση της 3,5-DCA στην αφθονία των νιτροδοποιητικών αρχαίων. Παράλληλα, στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος, μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-DCA στα νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB), στα ίδια δείγματα εδάφους, από τον Κασιωτάκη Αλέξανδρο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

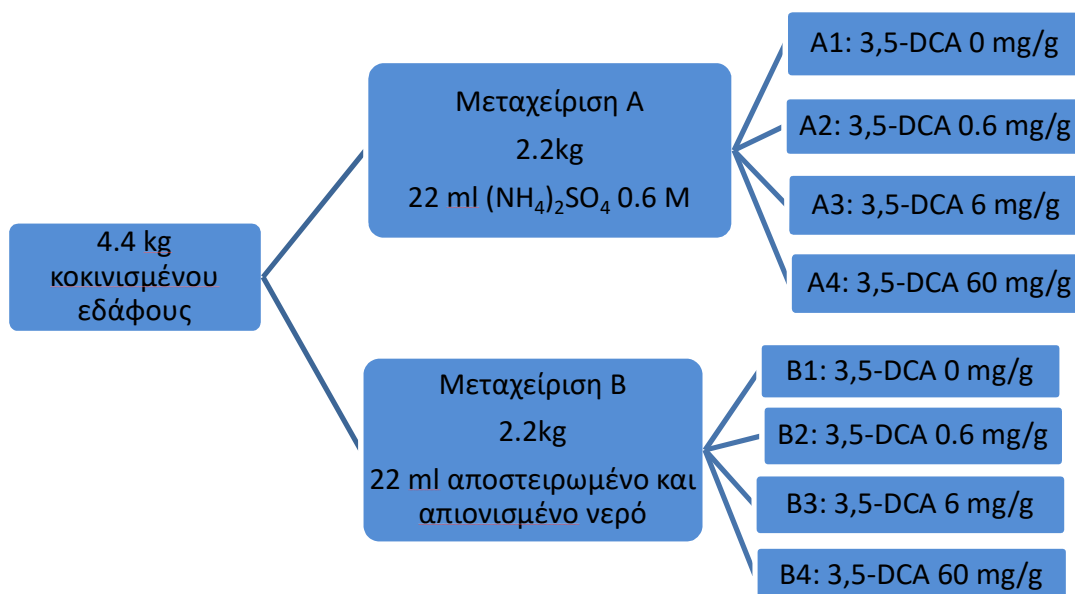
Συλλέχθηκε δείγμα εδάφους από αγρό του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ στην Λάρισα από το οποίο αφού κοσκινίστηκε, ζυγίστηκαν 4.4 kg εδάφους τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ίσα δείγματα των 2.2 kg το καθένα (μεταχείριση Α και μεταχείριση Β). Στην μια μεταχείριση (Α) εφαρμόστηκαν 22 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M, ως επιπλέον πηγή αμμωνίας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, ενώ στην άλλη (Β) εφαρμόστηκαν 22 ml αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Αφού προσαρμόστηκε η υγρασία των δυο εδαφικών αυτών δειγμάτων στο 40% της υδατοχωρητικότητας, καθεμιά από τις δυο μεταχειρίσεις χωρίστηκε σε 4 δείγματα των 550 g το καθένα. Έτσι συνολικά σχηματίστηκαν 8 μεταχειρίσεις (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Τα δείγματα εδάφους όπως διαχωρίστηκαν και δέχτηκαν είτε εφαρμογή διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M (αριστερά) είτε απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού (δεξιά).

Σε όλες τις μεταχειρίσεις ακολούθησε εφαρμογή 3.3 ml διαλύματος 3,5-DCA (98% καθαρότητα) σε μεθανόλη, όμως όχι ίδιας συγκέντρωσης, αλλά αυξανόμενης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά διαλύματα 3,5-DCA σε μεθανόλη με συγκέντρωση 0, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ώστε να επιτευχθούν στις μεταχειρίσεις συγκεντρώσεις 3,5-DCA της τάξης των 0, 0.6, 6, 60 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους, αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, η εφαρμογή καθενός εκ των τεσσάρων αυτών διαλυμάτων έγινε σε δυο δείγματα, σε ένα δείγμα προερχόμενο από τη μεταχείριση Α (με πρότερη αμμωνιακή λίπανση) και σε ένα από τη μεταχείριση Β (χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση).

Έτσι, προέκυψαν 8 διαφορετικές μεταχειρίσεις που διέφεραν ως προς την προσθήκη ή όχι επιπλέον πηγής αμμωνίας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους καθώς και ως προς τη συγκέντρωση του διαλύματος 3,5-DCA (98% καθαρότητα) σε MeOH. Η παραπάνω διαδικασία συνοψίζεται παρακάτω:



Οι 8 αυτές μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δυνητικής νιτροποίησης, των συγκεντρώσεων αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στο έδαφος, για εξαγωγή DNA και περαιτέρω προσδιορισμό της δυναμικής των AOA με την χρήση q-PCR για το γονίδιο *amoA* και για τον προσδιορισμό της αποδόμησης της 3,5-DCA στο έδαφος, σε βάθος χρόνου 70 ημερών, και πιο συγκεκριμένα με μετρήσεις τη μέρα εφαρμογής της 3,5-DCA (T0) και μετά από επώαση τριών (T3), επτά (T7), δεκατεσσάρων (T14), εικοσι οκτώ (T28), σαράντα εννέα (T49) και εβδομήντα (T70) ημερών.

Για το λόγο αυτό κάθε μια από τις 8 μεταχειρίσεις (A1,A2,A3,A4,B1,B2,B3,B4) διαχωρίστηκε σε υπο-δείγματα των 25 g, από τις οποίες προέκυψαν 21 υπο-δείγματα των 25 g, τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια και επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 25°C.

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

2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ NH_4^+ ΚΑΙ ΤΩΝ NO_3^- ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.

2.3.1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Για την εξαγωγή NH_4^+ και NO_3^- από το έδαφος

- KCl 1M

Για φωτομέτρηση NO_3^-

- KNO_3 stock 1000 mg N/L
- HCl 3M
- Αντιδραστήριο βανάδιου 50.9 mM (χλωρίδιο του βανάδιου (III) διαλυμένο σε HCl 1M και διήθηση)
- Αντιδραστήριο Griess 1 0.77 M (0.81 g διυδροχλωρίδιοN-ναφθυλενοδιαμίνη διαλυμένα σε 50 ml ddH₂O)
- Αντιδραστήριο Griess 2 58 mM (0.5 g σουλφανιλαμίδιο διαλυμένα σε 50 ml 3M HCl)

*Τα αντιδραστήρια Griess αναμίχθηκαν πριν χρησιμοποιηθούν

Για φωτομέτρηση NH_4^+

- Διάλυμα αμμώνιου ρύθμισης καμπύλης (0.382 g NH_4Cl διαλυμένα σε 100 ml KCl 1M) 1000 mg N/L
- NaOH 0.3M
- Σαλικυλικού νατρίου (2.55 g σαλικυλικό νάτριο και 19.17 mg διενυδρονιτροπρουσίδιο του νατρίου διαλυμένα σε 15 ml ddH₂O)
- Χρωματικός δείκτης (NaOH 0.3 M, σαλικυλικό νάτριο, ddH₂O σε αναλογία 1:1:1)
- Διάλυμα οξείδωσης (0.015 g δι-ένυδρο άλας νατρίου του διχλωροισοκυανουρικού οξέως διαλυμένο σε 15 ml ddH₂O)

*Η φωτομέτρηση έγινε σε φασματοφωτομετρο για πιατάκι 96 μικροπηγαδιών.

2.3.2. Πειραματική διαδικασία

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των NH_4^+ και των NO_3^- στα δείγματα μας, αρχικά ζυγίσαμε 2 g από το κάθε δείγμα και τα προσθέσαμε σε σωληνάρια falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προσθέσαμε 20 ml KCl 1M σε κάθε falcon ώστε να δεσμεύσει τα NH_4^+ και τα NO_3^- . Ακολούθησε έντονη ανάδευση των falcon για 30 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα με το έδαφος και έπειτα τα διηθήσαμε σε σωληνάρια falcon των 15 ml. Τα falcon 15 ml διατηρήθηκαν στους -20 °C έως την ημέρα της φωτομέτρησης.

Για την φωτομέτρηση των προετοιμασμένων δειγμάτων πρώτα σχηματίστηκε πρότυπη καμπύλη για τα NH_4^+ και τα NO_3^- . Για τα NH_4^+ διαλύθηκαν 0.5 ml διάλυμα αμμωνίου ρύθμισης καμπύλης σε 100 ml KCl 1M οπότε δημιουργήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg N/L. Έπειτα σε 7 φιαλίδια των 2 ml πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:2, δηλαδή από συγκέντρωση 5 mgN/L έως 0.0195 mgN/L. Για τα NO_3^- διαλύθηκαν 0.5 ml KNO_3 stock 1000 mgN/L σε 100 ml ddH₂O οπότε δημιουργήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg N/L. Στη συνέχεια έγιναν διαδοχικές αραιώσεις όπως και για την πρότυπη καμπύλη για τα NH_4^+ . Η προετοιμασία για το κάθε πιατάκι 96 μικροπηγαδιών ήταν η εξής (Εικόνα 7):

Για NO_3^- : Προστέθηκαν 100 μl από κάθε διάλυμα της καμπύλης και κάθε δείγμα, και για δύο μάρτυρες 100 μl από ddH₂O, συμπληρώθηκαν στη συνέχεια 100 μl από το αντιδραστήριο βαναδίου 50.9 mM και τέλος άλλα 100 μl από το μίγμα αντιδραστηρίων Griess 1 και 2, άρα ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 300 μl. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 1 ώρα και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 490 nm.

Για NH_4^+ : Προστέθηκαν 600 μl από κάθε διάλυμα της καμπύλης, κάθε δείγμα και για δύο μάρτυρες 600 μl από διάλυμα KCl 1M σε σωληνάρια erpendorf των 1.5 ml. Ακολούθησε προσθήκη 300 μl χρωματικού δείκτη και 120 μl διαλύματος οξειδωσης. Στην συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν στα 300 grm για διάστημα 30 min. Έπειτα εισήχθησαν 300 μl από κάθε φιαλίδιο (200 μl για τους μάρτυρες) στα αντίστοιχα μικροπηγαδάκια στο πιατάκι 96 θέσεων και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 630 nm.



Εικόνα 7: Τα 96-well plate για τη μέτρηση NH_4^+ (αριστερά) και τα NO_3^- (δεξιά).

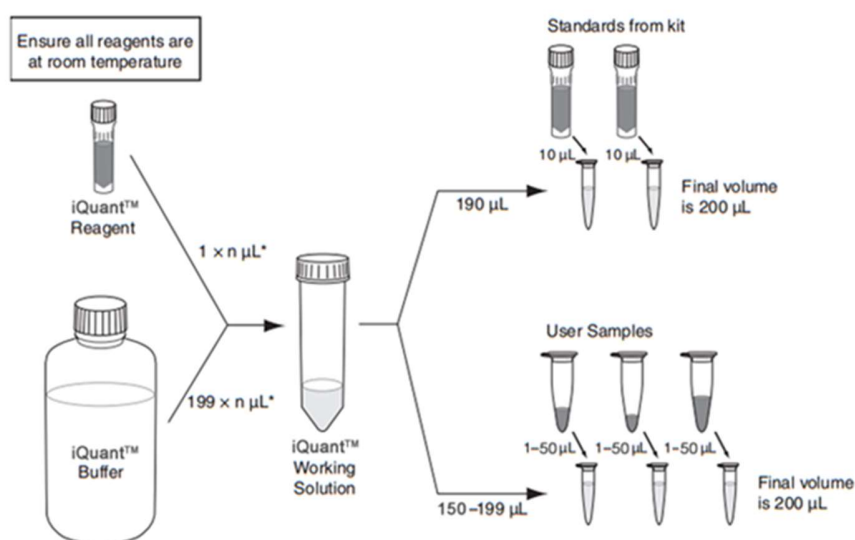
2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΤΩΝ ΑΟΑ

2.4.1. Για την απομόνωση και ποσοτικοποίηση DNA εδάφους χρησιμοποιήθηκαν:

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

2.4.1. Μέθοδοι

Απομόνωση DNA από δείγματα εδάφους: Η απομόνωση DNA από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε από 0,500 g εδάφους (ξ.β.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% για παρατήρηση της ποιότητας του DNA που εκχυλίστηκε. Τέλος έγινε ακριβής ποσοτικοποίηση του συνολικού DNA με χρήση του Qubit® 2.0 Fluorometer της Invitrogen™ (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Η διαδικασία ποσοτικοποίησης του συνολικού DNA με χρήση του Qubit® 2.0 Fluorometer της Invitrogen™

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

Πίνακας 1.....

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1X
Arch-amoAF(20pmol/μl)	0.2 μl	0,4μM
Arch-amoAR(20pmol/μl)	0.2 μl	0,4μM
BSA(10μg/μl)	0.2 μl	400 ng/μl
DNA	2 μl	2,5 ng/μl
ddH2O	2.4 μl	
Συνολικός όγκος	10 μl	

Πίνακας 1: Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση των AOA

Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	15 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	25 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C	1 min	1 κύκλος
	55°C	30 sec	
	95°C	30 sec	

2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ

2.5.1. Διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), 99.9+% καθαρότητα

2.5.2. Διαδικασία Εκχύλισης από το έδαφος

Ποσότητα 5 g εδάφους από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml και αναμίχθηκε με 10 ml ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε επώαση με ανάδευση στις 180 rpm για μία ώρα σε θερμοκρασία 25°C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 7500 rpm για πέντε λεπτά. Έπειτα, 5 ml από το υπερκείμενο διηθήθηκαν μέσω PTFE φίλτρων σύριγγας και ακολούθησε ανάλυση σε σύστημα HPLC Shimadzu όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.5.3. Διαδικασία Ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA

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

2.6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συγκέντρωσης των αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων καθώς και τα δεδομένα αφθονίας των ΑΟΑ στις διάφορες μεταχειρίσεις αναλύθηκαν με ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (two way ANOVA). Σε περιπτώσεις που εντοπίστηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών (συγκεντρώσεις 3,5-DCA και χρόνος), σημαντικές επιδράσεις μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων σε κάθε χρονικό σημείο εντοπίστηκαν με την χρήση post-hoc Tuckey's test.

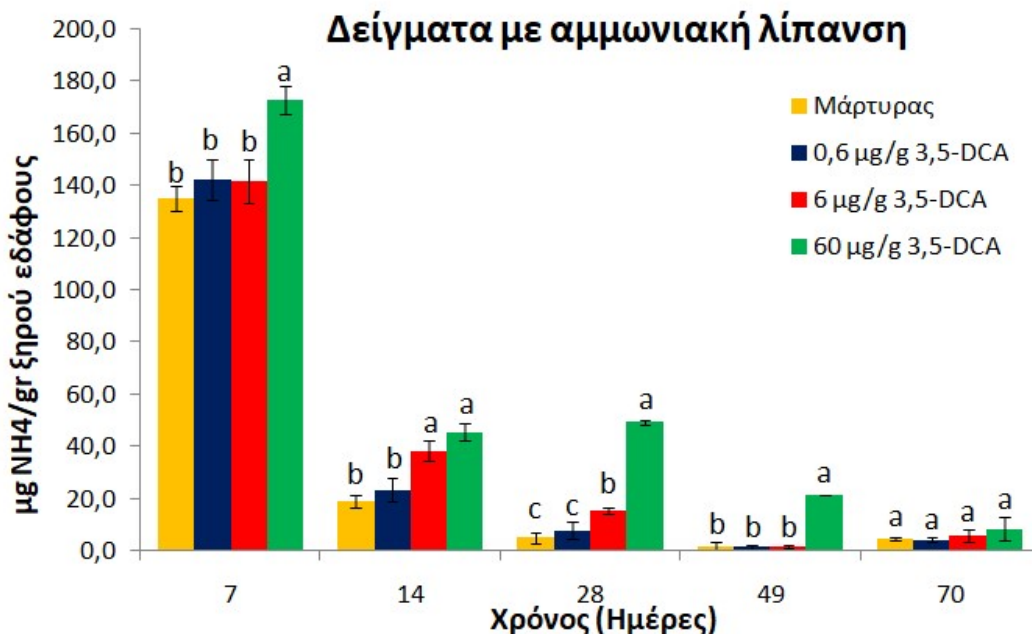
Ο υπολογισμός των παραμέτρων κινητικής της αποδόμησης της 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων μοντέλων κινητικής όπως έχουν περιγραφεί από την ομάδα FOCUS (2006). Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα αποδόμησης προσαρμόστηκαν στο μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO model) καθώς και σε τρία διφασικά μοντέλα κινητικής όπως το Hockey Stick (HS) καθώς και τα DFOP και FOMC. Η ακρίβεια προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής εκτιμήθηκε μέσω του στατιστικού χ² (<15%).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ NH₄⁺ ΚΑΙ NO₃⁻ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

3.1.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ 3,5-DCA ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Όσον αφορά τη συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) δείγματα στα οποία είχε εφαρμοστεί αμμωνιακή λίπανση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής 3,5-DCA (Διάγραμμα 1). Ανεξάρτητα του χρόνου δειγματοληψίας παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αμμωνιακών στα εδάφη που δέχτηκαν την εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Ακολούθως η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή 6 μg/g 3,5-DCA ήταν σημαντικά υψηλότερη αυτών του μάρτυρα και των δειγμάτων που δέχτηκαν εφαρμογή 0.6 μg/g 3,5-DCA αλλά σημαντικά χαμηλότερη των επιπέδων νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν την υψηλότερη δόση εφαρμογής. Επίσης και ο χρόνος, ως κύρια μεταβλητή είχε σημαντική επίδραση στην συγκέντρωση αμμωνιακών στο έδαφος. Έτσι παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των επιπέδων αμμωνιακών σε όλα τα εδάφη, ανεξάρτητα από την δόση εφαρμογής 3,5-DCA από τις 7 στις 14 ημέρες.

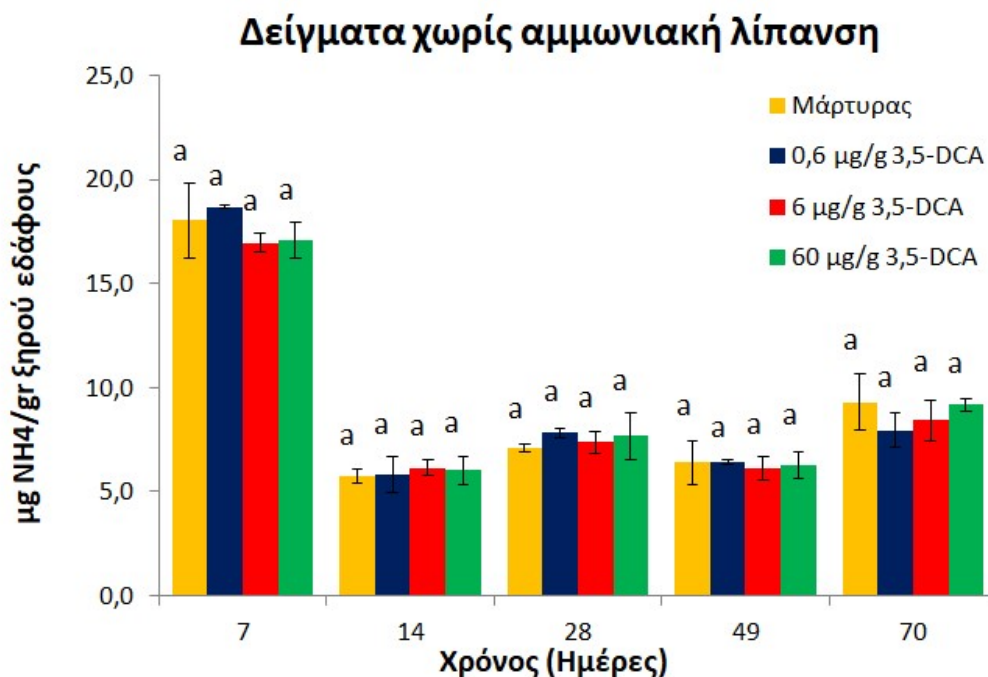


Διάγραμμα 1. Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA (0, 0.6, 6 και 60 μg/g) και συλλέχθηκαν σε

χρόνους 7, 14, 28, 49 και 70 ημέρες μετά την εφαρμογή. Σε κάθε χρόνο, μπάρες που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τέλος παρατηρήθηκαν και σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυρίων μεταβλητών. Ειδικότερα παρατηρήθηκε μια σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνιακών στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA (60 μg/g) σε σχέση με τον μάρτυρα από τις 7 ως και τις 49 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 1). Ανάλογα οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή 6 μg/g 3,5-DCA ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τον μάρτυρα στις 14 και 28 ημέρες με τα επίπεδα αμμωνιακών στα συγκεκριμένα εδάφη στις 14 ημέρες να μην διαφέρουν με αυτά που μετρήθηκαν στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA. Αντίθετα η εφαρμογή της δόσης των 0.6 μg/g δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των αμμωνιακών στο έδαφος σε σχέση με αυτά στον μάρτυρα καθόλη την διάρκεια του πειράματος.

Σε αντίθεση με τα δείγματα στα οποία είχε εφαρμοστεί αμμωνιακή λίπανση, στα δείγματα χωρίς αμμωνιακή λίπανση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής αλλά ούτε και σημαντική αλληλεπίδραση της δόσης εφαρμογής με τον χρόνο. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια σημαντική επίδραση του χρόνου με τις συγκεντρώσεις των αμμωνιακών ιόντων στις 7 ημέρες σε όλες τις μεταχειρίσεις να είναι σημαντικά υψηλότερες των αντιστοίχων τιμών στους υπόλοιπους χρόνους δειγματοληψίας (Διάγραμμα 2).

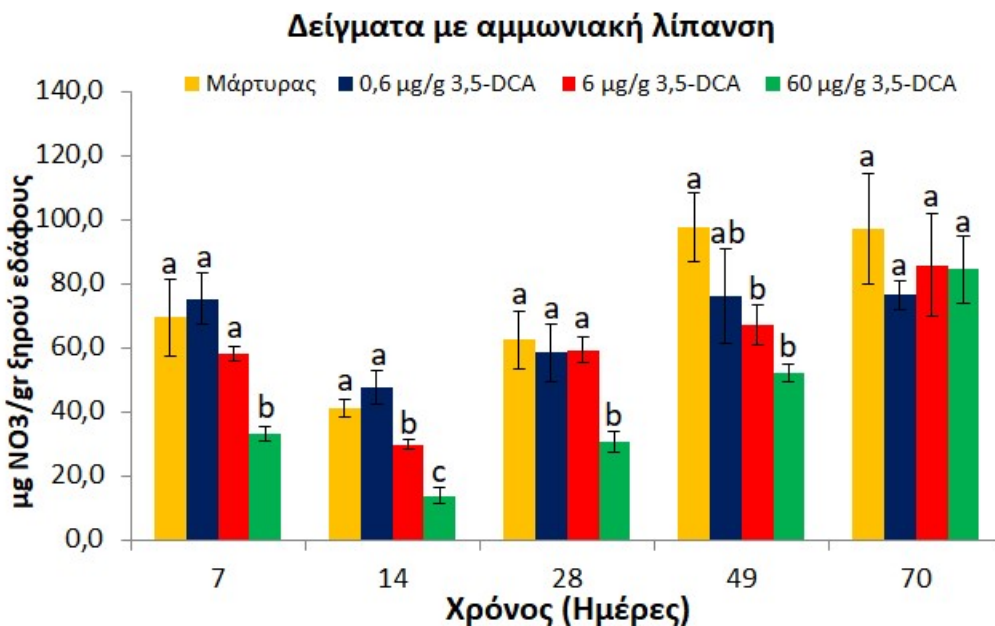


Διάγραμμα 2. Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στα εδάφη που δεν δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA (0, 0.6, 6 και 60 μg/g) και συλλέχθηκαν

σε χρόνους 7, 14, 28, 49 και 70 ημέρες μετά την εφαρμογή. Σε κάθε χρόνο, μπάρες που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

3.1.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Όσον αφορά στη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων (NO_3^-), η στατιστική ανάλυση δύο μεταβλητών έδειξε καταρχήν σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής 3,5-DCA (Διάγραμμα 3). Ειδικότερα ανεξάρτητα του χρόνου δειγματοληψίας παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα νιτρικών ιόντων στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA σε σχέση με τα επίπεδα νιτρικών στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Παράλληλα παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή 6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA σε σχέση με τις μεταχειρίσεις 0.6 $\mu\text{g/g}$ και τον μάρτυρα. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα νιτρικών στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή της χαμηλότερης δόσης 3,5-DCA και του μάρτυρα. Η στατιστική ανάλυση έδειξε και σημαντική επίδραση του χρόνου, ως κύρια μεταβλητή, με τα επίπεδα νιτρικών σε όλες τις μεταχειρίσεις να εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα στις 49 και 70 ημέρες σε σχέση με την περίοδο 7-28 ημέρες.

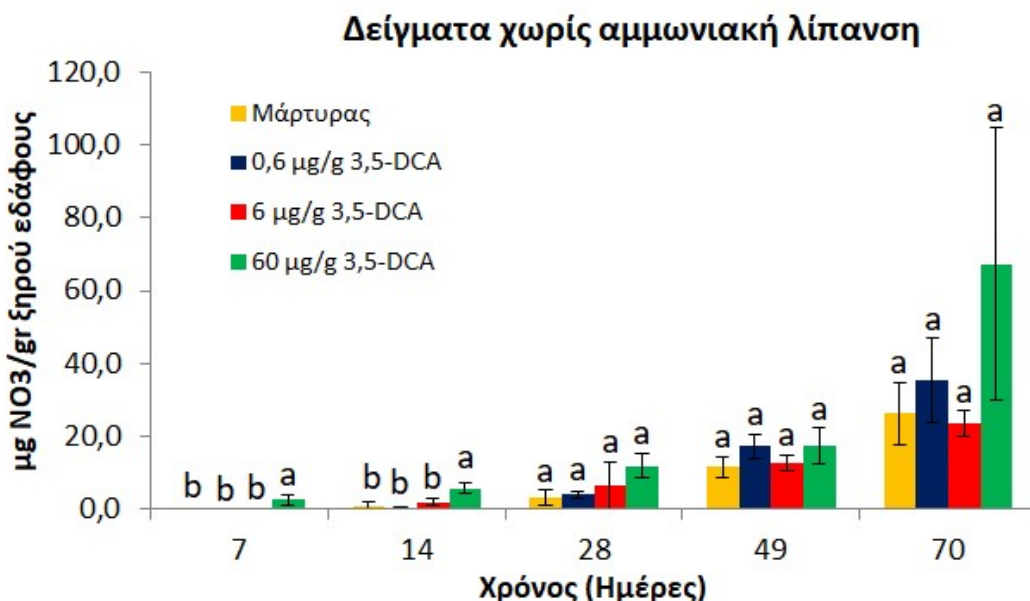


Διάγραμμα 3. Οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA (0, 0.6, 6 και 60 $\mu\text{g/g}$) και συλλέχθηκαν σε χρόνους 7, 14, 28, 49 και 70 ημέρες μετά την εφαρμογή. Σε κάθε χρόνο, μπάρες που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τέλος η στατιστική ανάλυση εντόπισε και σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κύριων μεταβλητών. Ειδικότερα η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA προκάλεσε μια σημαντική μείωση των επιπέδων νιτρικών σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις η οποία διήρκησε από τις 7

ως και τις 49 ημέρες (Διάγραμμα 3). Τα επίπεδα νιτρικών στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA ανέκαμψαν σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα στις 70 ημέρες. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα νιτρικών στις 14 και 49 ημέρες στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή της δόσης των 6 $\mu\text{g/g}$ 3,5-DCA σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη που είτε δεν δέχτηκαν εφαρμογή 3,5-DCA είτε δέχτηκαν εφαρμογή της χαμηλότερης δόσης (0.6 $\mu\text{g/g}$) Αντίθετα η εφαρμογή της δόσης των 0.6 $\mu\text{g/g}$ δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των νιτρικών στο έδαφος σε σχέση με αυτά στον μάρτυρα καθόλη την διάρκεια του πειράματος.

Στα δείγματα που δεν είχε γίνει εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της δόσης εφαρμογής του 3,5-DCA στα επίπεδα νιτρικών στο έδαφος. Αντίθετα καταγράφηκε σημαντική επίδραση του χρόνου ως κύρια μεταβλητή στις συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος. Ειδικότερα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων νιτρικών σε όλες τις μεταχειρίσεις με την πάροδο του χρόνου με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στις 49 και 70 ημέρες (Διάγραμμα 4).

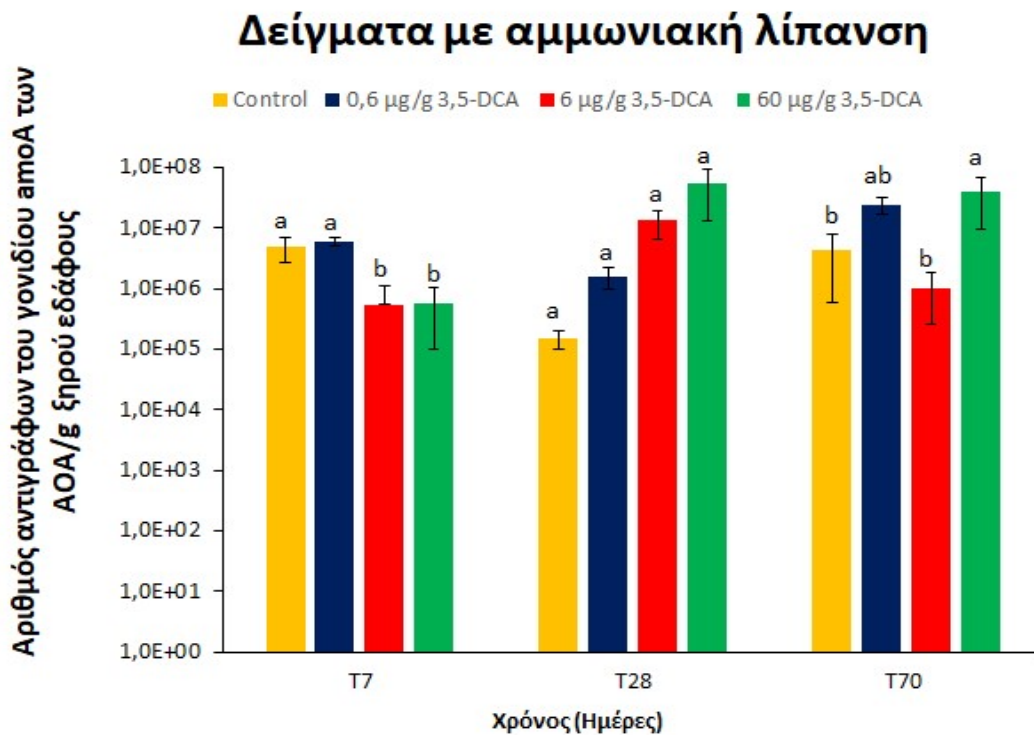


Διάγραμμα 4. Οι συγκεντρώσεις νιτρικών στα εδάφη που δεν δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA (0, 0.6, 6 και 60 $\mu\text{g/g}$) και συλλέχθηκαν σε χρόνους 7, 14, 28, 49 και 70 ημέρες μετά την εφαρμογή. Σε κάθε χρόνο, μπάρες που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τέλος παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κύριων μεταβλητών. Έτσι καταγράφηκαν οριακά υψηλότερες τιμές νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν την εφαρμογή της υψηλότερης δόσης 3,5-DCA σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στις 7 και 14 ημέρες (Διάγραμμα 4).

3.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΗΝ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ΑΟΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

Η αφθονία των ΑΟΑ στις διάφορες μεταχειρίσεις υπολογίστηκε μέσω του προσδιορισμού της αφθονίας των αντιγράφων του γονιδίου *amoA*, μετά από PCR πραγματικού χρόνου, και ακολούθησε στατική ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (two-way-ANOVA). Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι στα δείγματα εδάφους που είχαν δεχθεί αμμωνιακή λίπανση τόσο η δόση όσο και ο χρόνος ως κύριες μεταβλητές προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές ($p < 0.001$) στην αφθονία των ΑΟΑ στο έδαφος που είχε δεχθεί προηγουμένως αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 5), ενώ εξίσου σημαντική ήταν και η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κύριων μεταβλητών ($p < 0.001$) χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποιο ξεκάθαρο και συστηματικό πρότυπο επίδρασης της δόσης στο χρόνο.

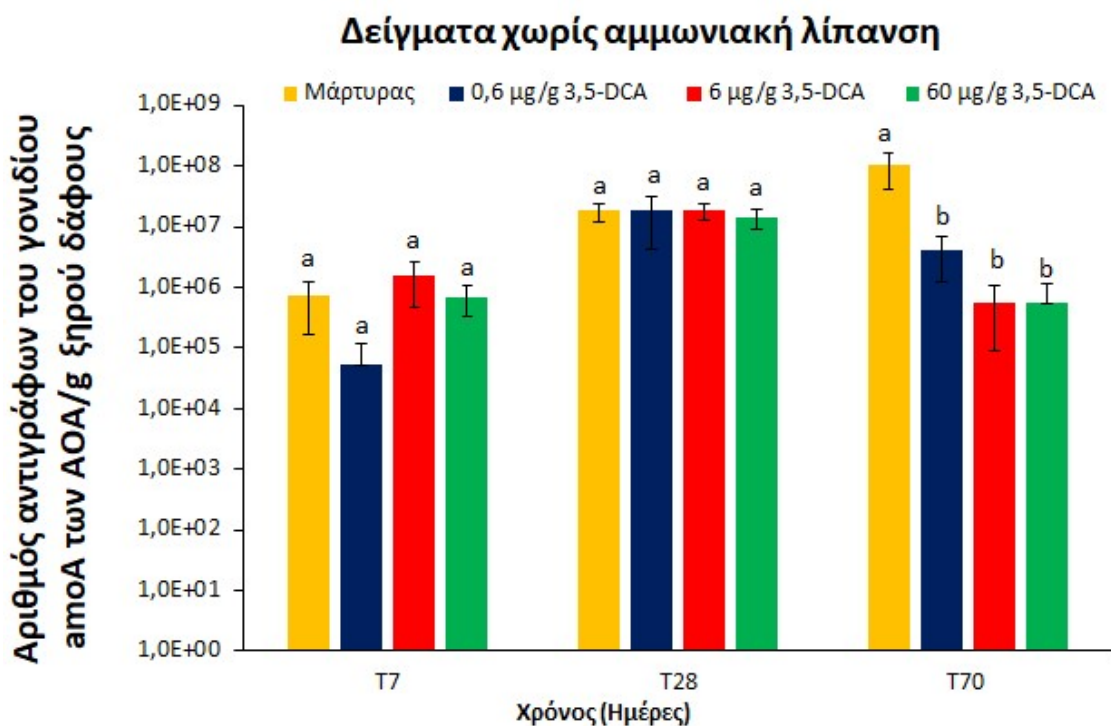


Διάγραμμα 5. Η αφθονία του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση και στην συνέχεια εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5- DCA. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στις 7 ημέρες η αφθονία των ΑΟΑ στα εδάφη που δέχτηκαν την δόση των 6 mg/g και 60 mg/g 3,5-DCA ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με του μάρτυρα και την δόση των 0,6 mg/g. Στις 28 ημέρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων, ενώ στις 70 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη αφθονία των ΑΟΑ στις μεταχειρίσεις του μάρτυρα και της

δόσης των 6 mg/g σε σχέση με τα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή της υψηλότερης δόσης.

Στα δείγματα χωρίς πρότερη αμμωνιακή λίπανση, η ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση των δυο κυρίων μεταβλητών (χρόνος και δόση εφαρμογής 3,5-DCA), καθώς και στην περίπτωση αλληλεπίδρασης τους (Διάγραμμα 6). Ειδικότερα στις 7 και 28 ημέρες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των επιπέδων αφθονίας των AOA στις διάφορες μεταχειρίσεις. Αντίθετα καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αφθονίας των AOA στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή 3,5-DCA, σε όλες τις δόσεις εφαρμογής, σε σχέση με τα δείγματα της μεταχείρισης μάρτυρα (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA στα δείγματα εδάφους που δεν δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση και στην συνέχεια εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5- DCA. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

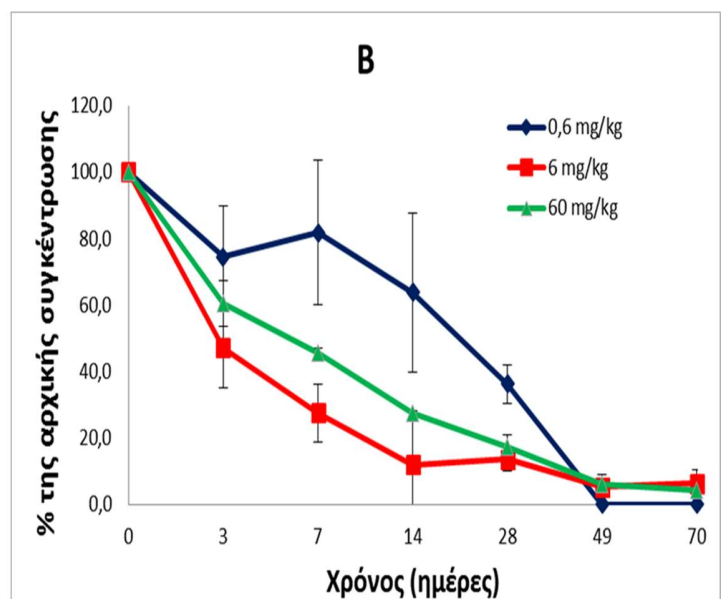
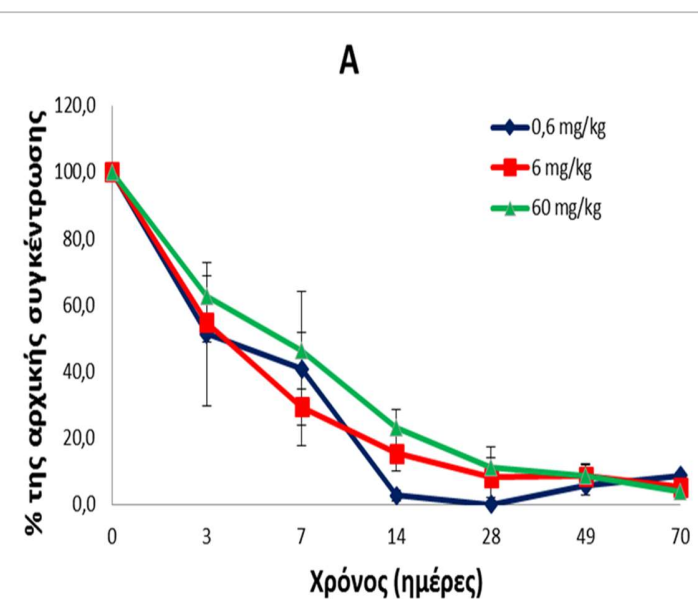
3.3. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ 3,5-DCA ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Οι τιμές DT_{50} για την 3,5-DCA στις διάφορες μεταχειρίσεις υπολογίστηκαν με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) και το μοντέλο κινητικής Hockey Stick (HS), τα οποία απέδωσαν με ακρίβεια την αποδόμηση της 3,5-DCA στο έδαφος. Συγκεκριμένα, το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) απέδωσε με ακρίβεια την αποδόμηση της 3,5-DCA σε όλες τις μεταχειρίσεις εκτός των εδαφών χωρίς αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογή δόσης 6 mg/g 3,5-DCA, όπου το μοντέλο κινητικής Hockey Stick (HS) περιέγραψε με μεγαλύτερη ακρίβεια την αποδόμηση της 3,5-DCA (Πίνακας 3).

Μεταχειρίσεις	Δόση	Μοντέλο Κινητικής	DT_{50s}	DT_{90s}	K_{deg}	K_1	K_2	t_b	χ^2
+ NH_4-N	0,6 μg/g	SFO	4,1	13,7	0,169				18,36
	6 μg/g	SFO	4,1	13,8	0,168				13,87
	60 μg/g	SFO	6,6	22,0	0,105				11,33
- NH_4-N	0,6 μg/g	SFO	17,0	56,6	0,041				13,49
	6 μg/g	HS	3,3	32,8		0,212	0,015	9,19	10,05
	60 μg/g	SFO	7,5	24,9	0,093				14,19

Πίνακας 3: Οι τιμές DT_{50} της 3,5-DCA στα εδάφη που δέχτηκαν ή όχι αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή διαφορετικών δόσεων της 3,5-DCA.

Γενικότερα η 3,5-DCA δεν παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος με τιμές DT_{50} που κυμάνθηκαν από 3.3 ως 17.0 ημέρες. Στα δείγματα που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή του 3,5-DCA (+ NH_4-N) παρατηρήθηκε γενικότερα μια ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση (- NH_4-N). Αντίθετα δεν καταγράφηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο δόσο-εξαρτώμενης υπολειμματικότητας της 3,5-DCA στις δύο μεταχειρίσεις με ή χωρίς αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Η αποδόμηση της 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους (A) με και (B) χωρίς αμμωνιακή λίπανση που δέχτηκαν εφαρμογές διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 3,5-διχλωροανιλίνης, προϊόντος μεταβολισμού του μυκητοκτόνου iprodione, στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών αρχαίων. Παρόλο που οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί θεωρούνται ιδανικοί δείκτες τοξικότητας αβιοτικών καταπονήσεων και γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Wessen and Hallin 2011; Pereira e Silva et al. 2013), οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων σε αυτούς είναι ελάχιστες, με τις περισσότερες να εξετάζουν την επίδραση των μητρικών ουσιών στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για την τοξικότητα πιθανών μεταβολικών προϊόντων σε αυτούς.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή του iprodione μπορεί να αλλάξει τη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όταν εφαρμοστεί σε συγκεντρώσεις ως και $\times 10$ της συνιστώμενης (Wang et al. 2004; Minambres et al., 2010, Verdenelli et al. 2012). Αντίθετα ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση της 3,5-DCA στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και ειδικότερα στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Ο μεταβολίτης του iprodione, η 3,5-DCA, προκαλεί σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε κάποιες μεταβολικές λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, όπως την διαδικασία της νιτροποίησης καθώς και σε κάποια ένζυμα, όπως η φωσφομονοεστεράση, η φωσφοδιεστεράση, η χιτινάση (Pappola et al. 2014). Με βάση τα παραπάνω επιλέξαμε να μελετήσουμε την επίδραση της εφαρμογής στο έδαφος (και όχι του iprodione), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, ανάλογες αυτών που αναμένεται να σχηματιστούν από την εφαρμογή του iprodione σε συγκεντρώσεις ίδιες με την συνιστώμενη αλλά και πολλαπλάσιες αυτής, εστιάζοντας στην επίδραση της 3,5-DCA στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, για την οποία δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες. Η δυνητική νιτροποίηση έχει εξεταστεί σε μεγάλο αριθμό πειραμάτων, καθότι αποτελεί βασική μικροβιακή λειτουργία στον κύκλο του αζώτου, αποτελώντας τον πιο ευαίσθητο δείκτη που επηρεάστηκε σημαντικά κατά την εφαρμογή διαφόρων γεωργικών φαρμάκων, όπως κατά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου tebuconazole (Munoz - Leoz et al., 2011) καθώς και κατά τη χρήση του μυκητοκτόνου mancozeb (Cernohlavkova et al., 2009).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, συνήθως σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες της συνιστώμενης έχει αρνητικές επιδράσεις στον πληθυσμό και στην λειτουργία των AOA και AOB (Crouzet et al., 2009; Hernandez et al., 2011), ενώ μελέτη από τους Papadopoulou et al., (2016) έδειξε ότι η εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών στο έδαφος όπως τα ortho-phenylphenol και ethoxyquin αντίστοιχα μπορούν να προκαλέσουν σημαντική αναστολή της νιτροποίησης και μείωση της έκφρασης του γονιδίου *amoA*. Η μελέτη της εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων cyprodynil και penconazole έδειξε πως τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα προκαλούν σημαντικές αλλά παροδικές αλλαγές στην αφθονία, στην ποικιλομορφία και στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Puglisi et al., 2012). Μια πιο πρόσφατη έρευνα με χρήση των γεωργικών φαρμάκων oxamyl, fluensulfone και QLAGri έδειξε ότι γεωργικά αυτά φάρμακα δεν επιδρούν στα νιτροδοποιητικά αρχαία και βακτήρια ενώ το BIOACT, ένα βιολογικό σκεύασμα, επέφερε σημαντικές αλλά παροδικές μεταβολές στην αφθονία, λειτουργία και ποικιλότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Rousidou et al., 2013). Τόσο στη μελέτη των Puglisi et al.,(2012), όσο και στα πειράματα των Spyrou et al., (2009), ο παράγοντας χρόνος επηρέασε σημαντικά τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων, κάτι το οποίο αποδόθηκε στη βαθμιαία μείωση των διαθέσιμων πόρων για τη μικροβιακή βιομάζα σε πειράματα εργαστηρίου που περιλαμβάνουν μακρόχρονες επώσεις. Στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή της 3,5-DCA προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOA χωρίς όμως την εμφάνιση κάποιου ξεκάθαραυ δόσοεξαρτώμενου ή χρονοεξαρτώμενου προτύπου.

Επιπλέον, όσον αφορά στην επίδραση της στη συγκέντρωση νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων, παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή της υψηλότερης δόσης οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών και αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων στα δείγματα με αμμωνιακή λίπανση, το οποίο μπορεί να συνεπάγεται ότι η διαδικασία της νιτροποίησης δεν είναι απολύτως λειτουργική (έμμονη ή παροδική αναστολή της) και ότι οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μετατρέψουν αποτελεσματικά την περίσσεια αμμωνίας σε νιτρικά ιόντα. Μελέτες των Malhi και McGill (1981), έδειξαν ότι η προσθήκη περίσσειας αμμωνιακών ιόντων (συγκέντρωση έως και 200 μg/g εδάφους) οδήγησε σε αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος. Εντούτοις, οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η προσθήκη περίσσειας αμμωνιακών ιόντων (συγκεντρώσεως > 200 μg/g εδάφους), οδήγησε σε παρεμπόδιση της νιτροποίησης. Οι Hernandez et al. 2011, έδειξαν ότι το ζιζανιοκτόνο simazine σε δόση 5x της συνιστώμενης είχε μεγάλη ανασταλτική δράση στην νιτροποίηση σε έδαφος με αμμωνιακή λίπανση η οποία παρέμεινε για όλη την διάρκεια του πειράματος.

Παράλληλα μελετήθηκε και η αποδόμηση της 3,5-DCA στα διάφορα επίπεδα εφαρμογής ώστε να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας στην ουσία αυτή και της εμφάνισης επιπτώσεων στην λειτουργία και αφθονία των AOA. Οι Campos et al., το 2015, απομόνωσαν μια βακτηριακή καλλιέργεια, αποτελούμενη από δύο βακτηριακά στελέχη, ένα *Arthrobacter* sp. που ονομάστηκε στέλεχος C1 και ένα *Achromobacter* που ονομάστηκε στέλεχος C2, η

οποία αποδομούσε ταχύτατα το iprodione. Συγκεκριμένα, το στέλεχος C1 αποδομούσε ταχέως την ιπροδιόνη(DT50= 2.3 h) όταν το μυκητοκτόνο αποτελούσε τη μοναδική πηγή C και N, σε αντίθεση με το στέλεχος C2 το οποίο υδρόλυε την ιπροδιόνη μόνο παρουσία πρόσθετων πηγών C και N (DT50= 19,5 h). Σε μια ακόμη μελέτη, το στέλεχος *Zygosaccharomyces rouxii* αποδομούσε την ιπροδιόνη(2.8 μmol L⁻¹) σε χρόνο DT50 = 6 ημέρες (Zadra et al. 2006). Ενώ η αποδόμηση της ιπροδιόνης έχει μελετηθεί αρκετά, δεν ισχύει το ίδιο και για την 3,5-DCA. Το συγκεκριμένο ισομερές της δίχλωροανιλίνης αποτελεί το κύριο προϊόν μεταβολισμού του iprodione στο έδαφος (Athiel et al. 1995; Campos et al. 2015), με προηγούμενες μελέτες να έχουν δείξει ότι εμφανίζει τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Rochkind et al. 1985).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν η 3,5-DCA δεν παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος, με ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση της στα δείγματα που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση πριν την εφαρμογή της 3,5-DCA (+NH₄-N) σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση (-NH₄-N), χωρίς όμως να καταγράφηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο δόσοεξαρτώμενης υπολειμματικότητας της 3,5-DCA στις δύο μεταχειρίσεις. Επομένως, η αποδόμηση της ήταν σχετικά ταχεία, με τιμές DT₅₀ που κυμάνθηκαν από 3.27 ως 17.0 ημέρες, και ανεξάρτητη της δόσης εφαρμογής.

Συνολικά, η απευθείας εφαρμογή της 3,5-DCA στο έδαφος, σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, που δεν αναμένεται να εντοπιστούν σε αγροτικά εδάφη υπό την τυπική εφαρμογή του μηκυτοκτόνου iprodione, οδηγεί σε αναστολή της διαδικασίας της νιτροποίησης και προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOA χωρίς όμως την εμφάνιση κάποιου ξεκάθαρα δόσοεξαρτώμενου ή χρονοεξαρτώμενου προτύπου. Επομένως, η μελέτη της επίδρασης της 3,5-DCA στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους χρειάζεται να συνεχιστεί, με έμφαση στα νιτρωδοποιητικά αρχαία καθώς και να επαναληφθεί σε εδάφη από διαφορετικές περιοχές ώστε να εξεταστούν και άλλοι παράγοντες όπως διαφορετική μικροβιακή κοινότητα και διαφορετική σύσταση θρεπτικών εδάφους.

5.Βιβλιογραφία

1. Aktar, M. W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*2, 1–12 (2009).
2. Athiel, P. et al., 1995. Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), pp.3216–3220
3. Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10):25

4. Blystone, C. R., Lambright, C. S., Furr, J., Wilson, V. S. & Gray, L. E. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. *Toxicol. Lett.* 174, 74–81 (2007).
5. Braschi, I., Gessa, C. E. & Blasioli, S. The Fate of Herbicides in Soil. (2011). doi:10.5772/13056
6. Campos M., Karas P., Perruchon C., Papadopoulou E.S., Christou V., Menkissoglou-Spiroudi U., Diez M.C., Karpouzas D.G., (2017) Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 24:152-163
7. Campos, M. et al., 2015. Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, pp.201–211
8. Casieri I., Anastasi A., Prigione V., Varese G.C., (2010) survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 483-504
9. Cernohlavkova, J., Jarkovsky, J., Hofman, J. (2009) Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 80-85
10. Crouzet O, Besse-Hogan P, Batisson I, Bonnemoy F, Bohatier J, Mallet C. 2009. Responses of soil microorganisms to the herbicide mesotrione in microcosm experiments: from whole microbial communities to functional groups, p 12–13. In *Proceedings of the Symposium on Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air, York, United Kingdom, 14 to 16 September 2009*.
11. Crouzet, O., Besse-Hogan, P., Batisson, I., Bonnemoy, F., Bohatier, J., Mattel, C. (2009) Responses of soil microorganisms to the herbicide mesotrione in microcosm experiments: from whole microbial communities to functional groups. *Proceedings of the Symposium in Pesticide behaviour in soils, water and air. York, UK, September 14-16, pp 12-13*.
12. Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528: 504-509
13. Entwistle, P.F. et al., 1986. *Epizootiology and strategies of microbial control*. Natural Environment Research Council, Oxford (UK). Inst. of Virology
14. Falkowski, P.G., Fenchel, T., DeLong E.F. (2008) The microbial engines that drives earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034-1039.

15. Feld L, Hjelmsø MH, Nielsen MS, Jacobsen AD, Ronn R, Ekelund F, Krogh PH, Strobel BW, Jacobsen CS. 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS One* 10:e0126080
16. Francis, C. A., K. J. Roberts, J. M. Beman, A. E. Santoro, and B. B. Oakley. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:14683-14688.
17. Francis, C.A., Beman, J.M., Kuypers, M.M.M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* 1:19-27
18. Galiulin, R. V., Bashkin, V. N., Galiulina, R. A. & Birch, P. The theoretical basis of microbiological transformation and degradation of pesticides in soil. *Land Contamination & Reclamation* 9, 367–376 (2001).
19. Gavrilescu, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng. Life Sci.* 5, 497–526 (2005).
20. Gosselin, R.E., R.P. Smith, H.C. Hodge. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984., p. II-338]
21. Grabke, A. et al. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* 104, 396–402 (2014).
22. Hassett, J., Zak, D.R., Blackwood, C.B., Pragitzer, K.S. (2009) Are basidiomycete laccase gene abundance and composition related to reduced lignolytic activity under elevated atmospheric NO₃- deposition in northern hardwood forest? *Microbial Ecology* 57:728-739
23. Hatzenpichler, R. (2012) Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* 78: 7501-7510
24. Haverkate, F., Tempel, A. & Held, A. J. D. Interaction of 2,4,5-trichlorophenylsulphonylmethyl thiocyanate with fungal spores. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 75, 308–315 (1969).
25. Hernández M, Jia Z, Conrad R, Seeger M. 2011. Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol* 78:511–519.
26. Hernández, M., Jia, Z., Conrad, R., Seeger, M., 2011. Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 511e519.
27. Hrelia, P. et al. The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* 11, 445–453 (1996).

28. Karpouzas D.G., Tsiamis G., Trevisan M., Ferrari F., Malandain C., Sibourg O. Martin-Laurent F., (2016) 'LOVE TO HATE'-Pesticides: Felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research* 23:18947-18951
29. Kowalchuk, G.A, Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol*55: 485–529
30. Lo, H. H., Brown, P. I. & Rankin, G. O. Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology*63, 215–231 (1990).
31. M.V. Martinez-Toledo, V. Salmeron, B. Rodelas, C. Pozo, J. Gonzalez-Lopez, Effects of the fungicide Captan, on some functional groups of soil microflora, *Applied Soil Ecology* 7, 245-255, (1998).
32. Malhi SS, McGill W, 1981. Nitrification in three Alberta soils: effects of temperature, moisture and substrate concentration. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 14, pp. 393-399.
33. Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P. & Jolliet, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*93, 379–392 (2002).
34. Mercadier C et al; *FEMS Microbiology Ecology* 23 (3): 207-15 (1997)
35. Metcalfe, C.D. et al., 2017. Current-use pesticides in urban watersheds and receiving waters of western Lake Ontario measured using polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Journal of Great Lakes Research*
36. Miñambres, G. G. et al. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*26, 161–170 (2010).
37. Miransari, M. (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Appl Microbiol Biotechnol*92:875-885.
38. Mitchell, J.A. & Cain, R.B., 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science*, 48, pp.1–11
39. Munoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C. (2011) Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biol Biochem* 43:2176-2183
40. 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
41. Papadopoulou ES, Tsachidou P, Sulowic S, Menkissoglu-Spiroudi U, Karpouzas DG (2016) Land spreading of wastewaters from the fruit packaging industry and potential effects on soil

microbes: effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 82:747–755

42. Pappolla, A.; Ferrarini, A.; Pertile, G.; Puglisi, E.; Suci, N.; Lamastra, L.; Vasileiadis, S.; Fornasier, F.; Karpouzas, D.; Trevisan, M. Assessing the soil microbial toxicity of iprodione using advanced biochemical and molecular tools: Put the blame on the metabolite 3,5 dichloroaniline. (2014)
43. Pereira e Silva MC, Semenov AV, Schmitt H, van Elsas JD, Salles JF. 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biol Biochem* 57:995–1002.
44. Pinto, A.J., Marcus, D.N., Ijaz, U.Z., Bautista-de Iose Santos, Q.M., Dick, G.J., Raskin, L. (2015) Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system. *mSphere*1(1):e00054-15
45. Puglisi E, Vasileiadis S, Demiris C, Bassi D, Karpouzas DG, Capri E, et al. (2012) Fungicides impact on the diversity and function of nontarget ammonia oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *MicrobEcol* 64:692–701
46. Puglisi E, Vasileiadis S, Demiris C, Bassi D, Karpouzas DG, Capri E, et al. (2012) Fungicides impact on the diversity and function of nontarget ammonia oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *MicrobEcol* 64:692–701
47. Rochkind, M.L., Blackburn, J.W., Sayler, G.S., 1986. Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, pp. 115e128.
48. Rousidou C, Papadopoulou E.S., Kortsinidou M., Giannakou I.O., Singh B.K., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzas D.G., 2013. Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology & Biochemistry* 67, 98-105
49. Schleper, C., Nicol, G.W. (2010) Ammonia oxidizing archaea: Genomes, physiology and ecology. *AdvMicrob Physiol*57: 1-41
50. Sequinatto, L. et al., 2013. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Quimica Nova*, 36(6), pp.768–772
51. Spyrou, I.M., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U. (2009) Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microb Ecol* 58:715-727
52. Stahl D.A., and de la Torres J.R. (2012) Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Ann Rev Microbiol*66: 83-101

53. Strömqvist, J. & Jarvis, N., 2005. Sorption, degradation and leaching of the fungicide iprodione in a golf green under Scandinavian conditions: Measurements, modelling and risk assessment. *Pest Management Science*, 61(12), pp.1168–1178
54. Taube, J., Vorkamp, K., Förster, M. & Herrmann, R. Pesticide residues in biological waste. *Chemosphere*49, 1357–1365 (2002).
55. Tiryaki O, Temur C, (2010), The fate of pesticide in the environment, *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4(10), pp 29-38.
56. Valentovic, M. A. et al. Characterization of methemoglobin formation induced by 3,5-dichloroaniline, 4-amino-2,6-dichlorophenol and 3,5-dichlorophenylhydroxylamine. *Toxicology*118, 23–36 (1997).
57. van der Heijden, M.G.A., Bardgett R.D., van Straalen, N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*11:296-310
58. Verdenelli RA, Lamarque AL, Meriles JM (2012) Short-term effects of combined iprodione and vermicompost applications on soil microbial community structure. *Science of the Total Environment* 414: 210-219
59. Wagner, S. C.. (2011) Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10):15
60. Walker, A., Brown, P. A. & Entwistle, A. R. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.*17, 183–193 (1986).
61. Wang Y-S, Wen C-Y, Chiu T-C, Yen J-H (2004) Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicol Environ Saf*59:127–132
62. Wang, B., Qui, Y-L.(2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizae in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363
63. Wessen E, Hallin S (2011) Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers—possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic* 11: 1696–1698
64. You, J., Das, A., Dolan, E.M., Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Res*43: 1801-1809
65. Zadra C, Cardinali G, Corte L, Fatichenti F, Marucchini C (2006) Biodegradation of the fungicide iprodione by *Zygosaccharomyces rouxii* strain DBVPG 6399. *J Agric Food Chem* 54:4734–4739.
66. Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Α., (2007) Γεωργική φαρμακολογία, Αθήνα
67. Παπαδοπούλου Ευαγγελία, Μελέτη της συμπεριφοράς βιολογικών και συνθετικών γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και των επιπτώσεων τους στη μικροβιακή κοινότητα. (2013)

