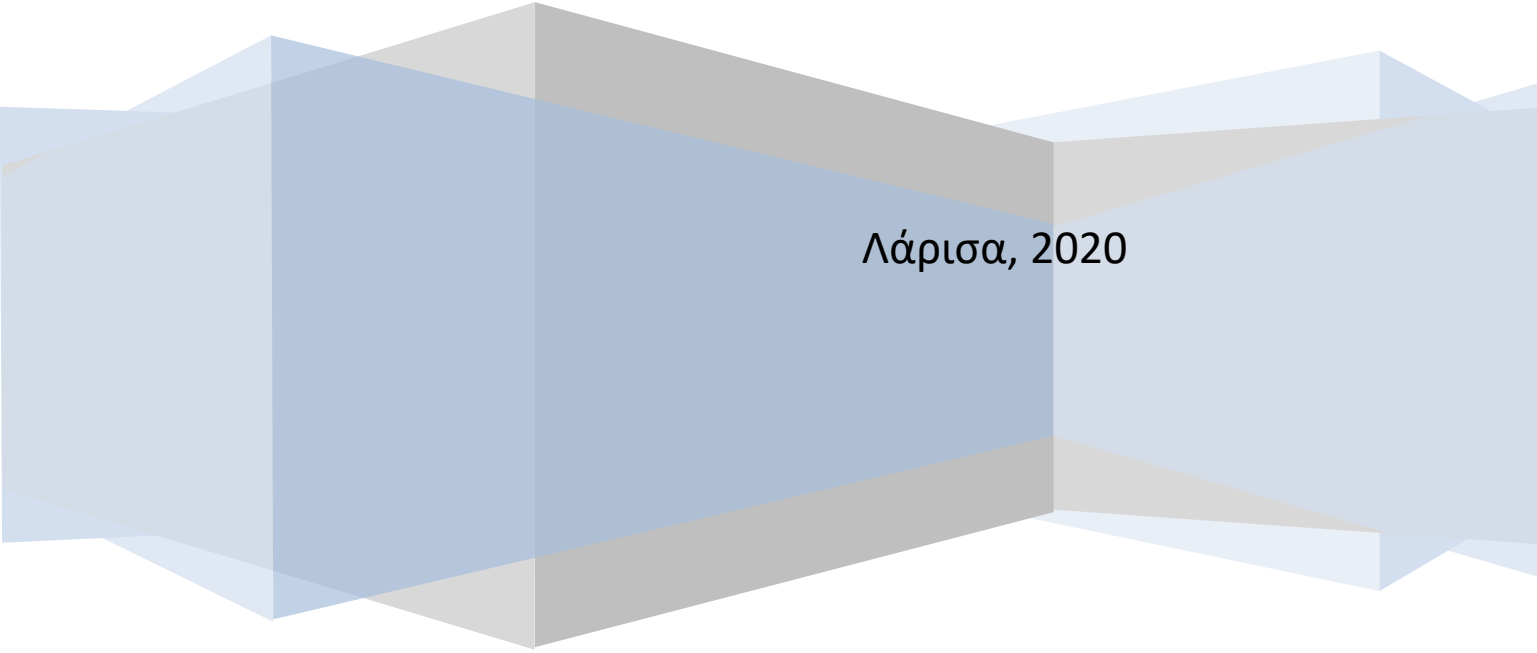


ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Επίδραση της άρδευσης με νερό εμπλουτισμένο σε  
μικροκυστίνες στην λειτουργία της ριζόσφαιρας φυτών  
ραπανιού *Raphanus sativus* L**

ΠΕΤΡΟΥ ΜΑΛΑΜΩ



Λάρισα, 2020

## Τριμελής Επιτροπή

### Επιβλέπων:

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

### Μέλη:

**Λεβίζου Ευθυμία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Κορμάς Κωνσταντίνος** Καθηγητής Οικολογίας Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο κ. Καρπούζας Δημήτριος, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω που με δέχτηκε στην ομάδα του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου, τα οποία μου προσέφεραν βοήθεια κατά τη διάρκεια εκπονήσεως της εργασίας και κυρίως τον Καρά Παναγιώτη για την αμέριστη βοήθεια και υπομονή του. Την κ. Λεβίζου και τον κ. Κορμά καθώς και τον Ζαφειριάδη Ιωάννη, φοιτητή του Γεωπονικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου διεξήγαμε μαζί το πρώτο στάδιο του πειράματος.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια.

Πέτρου Μέλια

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT .....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Μικροκυστίνες.....	10
1.1.1. Εισαγωγή στις Κυανοτοξίνες.....	10
1.1.2. Εισαγωγή στις Μικροκυστίνες .....	12
1.1.3. Μικροοργανισμοί που παράγουν Μικροκυστίνες.....	13
1.1.4. Μικροοργανισμοί που παράγουν Μικροκυστίνες-Η κατάσταση στην Ελλάδα 14	
1.1.5. Προβλήματα για την υγεία και το περιβάλλον από τις μικροκυστίνες.....	15
1.1.5.1. Εισαγωγή .....	15
1.1.5.2. Προβλήματα στο περιβάλλον και στην γεωργική παραγωγή (υπολείμματα μικροκυστινών στα καλλιεργούμενα φυτά). .....	16
1.1.5.3. Προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή .....	17
1.2. Μικροβιακή Κοινότητα Εδάφους.....	18
1.2.1 Εισαγωγή .....	18
1.2.2. Ο ρόλος των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας στην ανάπτυξη των φυτών .	20
1.2.3. Νιτροποίηση και νιτροδωποποιητικοί μικροοργανισμοί.....	23
Νιτροδωποποιητικά βακτήρια (AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria) .....	25
Νιτροδωποποιητικά Αρχαία (AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea).....	26
1.2.4. Θειο-οξειδωτικά βακτήρια .....	27
Κατηγορίες Θειο-οξειδωτικών Μικροοργανισμών .....	28
1.3. Οικοσύστημα Κάρλας .....	29
1.4. Στόχοι της Διατριβής.....	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 Έδαφος, φυτά , νερό Κάρλας και μικροκυστίνες .....	35
2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	35
2.3 Μετρήσεις νιτρικών και αμμωνιακών στο έδαφος.....	37
2.4. Προσδιορισμός αφθονίας μικροοργανισμών στο έδαφος.....	38
2.4.1. Εξαγωγή DNA από το έδαφος .....	38

2.4.2. PCR πραγματικού χρόνου για προσδιορισμό της αφθονίας ολικών βακτηρίων και μυκήτων, νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB), αρχαίων (AOA) και θειο-οξειδωτικών βακτηρίων (SOXB) .....	38
2.5 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1. Επιδράσεις στην αφθονία ολικών βακτηρίων και μυκήτων στο έδαφος.....	41
3.2. Επιδράσεις στην νιτρωδοποίηση .....	43
3.3. Επιδράσεις στην αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων .....	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
Συμπεράσματα-Μελλοντικές προοπτικές .....	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροκυστίνες (MCs) αποτελούν μια ομάδα κυανοβακτηριακών επταπεπτιδίων με ηπατοτοξικές ιδιότητες που παράγονται από υδρόβια κυανοβακτήρια συνήθως σε ευτροφικά επιφανειακά υδροφόρα συστήματα. Τα τελευταία έτη έχει αναδειχθεί ο πιθανός κίνδυνος έκθεσης του αστικού πληθυσμού στις μικροκυστίνες μέσω της άρδευσης καλλιεργειών με νερό που προέρχεται από αποταμιευτήρες ή λίμνες που εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Η συγκεκριμένη πρακτική πέραν των προβλημάτων για την δημόσια υγεία είναι πιθανό να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα τοξικότητα στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που κατέχει δομικό λειτουργικό ρόλο στην λειτουργία των εδαφικών οικοσυστημάτων υποστηρίζοντας της γονιμότητα των γεωργικών εδαφών. Στο πλαίσιο αυτό στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε την επίδραση των μικροκυστινών στην αφθονία και λειτουργία σημαντικών μικροβιακών ομάδων στην ριζόσφαιρα φυτών *Raphanus sativus*. Ειδικότερα μελετήσαμε την υπόθεση ότι η εφαρμογή μικροκυστινών σε συγκεντρώσεις 2 και 12  $\mu\text{g/L}$  (ρεαλιστικές συγκεντρώσεις που έχουν αναφερθεί σε αρκετές Ελληνικές λίμνες και στην λίμνη Κάρλα) προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην αφθονία βακτηρίων και μυκήτων καθώς και στην λειτουργία και αφθονία νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (βακτηρίων και αρχαίων) καθώς και στα θειο-οξειδωτικά βακτήρια. Σε δεύτερο επίπεδο αξιολογήσαμε και την υπόθεση ότι πιθανές επιδράσεις των μικροκυστινών στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους θα μεγιστοποιούνται παρουσία λοιπών αβιοτικών παραγόντων (τοξίνες, μέταλλα κτλ) που περιέχονται στο νερό επιβαρυσμένων λιμνών όπως η Κάρλα. Για την απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων προετοιμάστηκε πείραμα φυτοδοχείων με φυτά *R. sativus* στα οποία γινόταν άρδευση με νερό χωρίς μικροκυστίνες (μάρτυρας), νερό εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες σε δύο επίπεδα 2 και 12  $\mu\text{g/L}$  και νερό Κάρλας αυτούσιο (περιέχει περίπου 2  $\mu\text{g/L}$  μικροκυστίνες) καθώς και νερό Κάρλας που εμπλουτίστηκε με μικροκυστίνες σε επίπεδα 12  $\mu\text{g/L}$ . Σε χρόνο 31 και 64 ημερών συλλέχθηκαν δείγματα ριζόσφαιρας και προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις στην αφθονία βακτηρίων και μυκήτων, νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων, θειο-οξειδωτικών βακτηρίων με q-PCR ενώ παράλληλα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα νιτρικών και αμμωνιακών ώστε να διαπιστωθούν πιθανές αρνητικές επιδράσεις στην λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Συνολικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές επιδράσεις των παραπάνω μεταχειρίσεων στην μικροβιακή αφθονία και λειτουργία με μοναδικές

εξαιρέσεις την σημαντική μείωση της αφθονίας των νιτρωδοποιητικών αρχαίων ύστερα από 63 ημέρες άρδευσης με νερό που περιείχε 12 μg/L μικροκυστίνη. Η απουσία επιδράσεων στην παρούσα μελέτη μπορεί να αποδοθεί στις χαμηλές αλλά ρεαλιστικές συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που μελετήθηκαν καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει δόσοεξαρτώμενη απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στις μικροκυστίνες. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην επίδραση των παραπάνω μεταχειρίσεων στην ποικιλότητα των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας με την χρήση προσεγγίσεων μαζικής αλληλούχισης ενώ παράλληλες μελέτες έχουν προσδιορίσει τις επιδράσεις στην φυσιολογία και ανάπτυξη των φυτών.

## ABSTRACT

Microcystins (MCs) are a group of heptapeptide cyanobacterial with hepatotoxic properties which produced by aquatic cyanobacteria usually in eutrophic surface aquatic systems. In recent years, the potential risk of exposure of the urban population to microcystins has been increased through irrigation of crops with water from lakes with high concentrations of microcystins. This practice in addition to public health problems is likely to create serious toxicity problems in the soil microbial community that has a structural functional role in the functioning of soil ecosystems by supporting the fertility of agricultural soils. In the present study, we evaluated the effect of microcystins on the abundance and function of important microbial groups in the rhizosphere of *Raphanus sativus* plants. In particular, we studied the hypothesis that the application of microcystins at concentrations of 2 and 12  $\mu\text{g} / \text{L}$  (realistic concentrations reported in several Greek lakes and Lake Karla) cause significant changes in the abundance of bacteria and fungi as well as in the function and abundance of Ammonia Oxidizing Bacteria and Archaea as well as in thio-oxidizing bacteria. At the second level we also evaluated the hypothesis that the potential effects of microcystins on the soil microbial community would be maximized in the presence of other abiotic agents (toxins, minerals, etc.) that present in the water of overburdened lakes such as Karla. To answer the above questions, an experiment was prepared with *R. sativus* plants irrigating with water without microcystins (control), water enriched with microcystins at two levels of 2 and 12  $\mu\text{g} / \text{L}$ , and Carla water as is (containing approximately 2  $\mu\text{g} / \text{L}$  microcystins) as well as Carla water enriched with microcystins at levels of 12  $\mu\text{g} / \text{L}$ .

Rhizosphere samples were collected at 31 and 64 days and the effects on abundance of bacteria and fungi, ammonia oxidizing bacteria and archaea, thio-oxidizing bacteria were determined by q-PCR, while nitrate and ammonium nitrate levels were determined to evaluate negative effects to the function of microorganisms. Overall, no significant effects of the above treatments were observed on microbial abundance and function with unique exceptions to the significant reduction in the abundance of ammonia oxidizing archaea after 63 days of irrigation with water containing 12  $\mu\text{g} / \text{L}$  microcystin. The absence of effects in the present study can be attributed to the low but realistic concentrations of the microcystins that were studied as previous studies have shown a dose-dependent response of the microbial community to the microcystins. Further studies will focus on the effects of the above treatments on the diversity of rhizosphere microorganisms using mass sequencing



approaches while other studies have identified the effects on plant physiology and development.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Μικροκυστίνες

#### 1.1.1. Εισαγωγή στις Κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μια μεγάλη ποικιλία από δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί παρουσιάζουν διάφορους τύπους βιολογικών ή βιοχημικών δράσεων. Μια υποκατηγορία από τους μεταβολίτες αυτούς έχουν αναγνωρισθεί ως ισχυρές τοξίνες. Οι τοξίνες που παράγονται από κυανοβακτήρια χαρακτηρίζονται ως κυανοτοξίνες. Σύμφωνα με τις χημικές τους δομές, οι κυανοτοξίνες εμπίπτουν σε διάφορες κύριες ομάδες: πεπτίδια, ετεροκυκλικές ενώσεις (αλκαλοειδή) ή λιπιδικές ενώσεις (Merel et al, 2013; Pearson et al, 2010)

Τα κυανοβακτήρια παράγουν ένα ευρύ φάσμα τοξινών, δηλαδή, ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες, λιποπολυσακχαρίτες και άλλες βιοδραστικές ενώσεις (Martins & Vasconcelos, 2009). Οι κυανοτοξίνες ταξινομούνται γενικά σε τρεις μεγάλες ομάδες με βάση κυρίως τις πρωτογενείς τοξικολογικές επιπτώσεις τους α) ηπατοτοξικά πεπτίδια, β) νευροτοξίνες και γ) ερεθιστικά επαφής (Merel et al, 2013; Pearson et al, 2010). Η μοριακή τους δομή και ιδιότητες ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο και την χημική σύσταση της εκάστοτε τοξίνης (Merel et al, 2013; Pearson et al, 2010).

Οι ηπατοτοξίνες (microcystins, nodularin), οι νευροτοξίνες (saxitoxins, anatoxins, β-methylamino-L-alanine), οι δερματοτοξίνες (lipopolysaccharide, aplysiatoxin, lyngbyatoxins) και οι κυτοτοξίνες (cylindrospermopsin) που παράγονται από διάφορα γένη κυανοβακτηρίων (π.χ. Microcystis, Plaktothrix, Anabaena, Cylindrospermopsis, και Nodularia) μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία είτε μέσω άμεσης έκθεσης (π.χ. κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα) ή μέσω κατανάλωσης νερού ή τροφής εμπλουτισμένου με κυανοτοξίνες (Cheung et al, 2013; Lee et al, 2017a; Lee et al, 2017b).

Οι πιο ευρέως μελετημένες είναι οι ηπατοτοξικές μικροκυστίνες (Microcystins MC). Οι μικροκυστίνες είναι μια πολύ γνωστή ομάδα πάνω από 60 παραλλαγών της βασικής δομής του κυανοβακτηριακού κυκλικού επταπεπτιδίου (Martins & Vasconcelos, 2009).

Οι ηπατοτοξίνες παράγονται από ορισμένα γένη κυανοβακτηρίων, όπως τα *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* και *Anabaenopsis* (Martins & Vasconcelos, 2009).

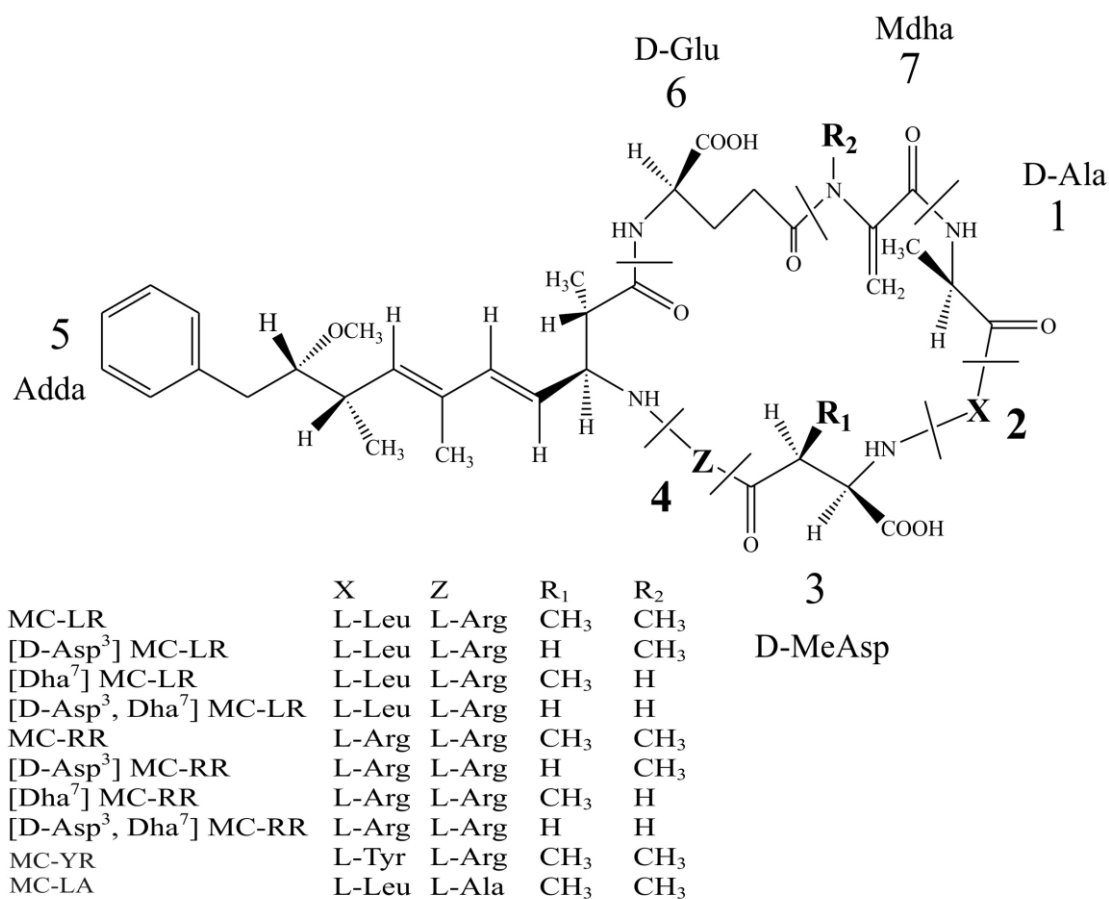
Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 65 νευροτοξίνες κυανοβακτηρίων, εκ των οποίων οι πιο μελετημένες είναι τα νευροτοξικά αλκαλοειδή, δηλαδή οι ανατοξίνες και σαξιτοξίνες (STXs) [επίσης γνωστές ως τοξίνες παραλυτικής δηλητηρίασης οστρακοειδών (PSP)] (Kellmann et al, 2013 253; Testai et al, 2016). Τα κυανοβακτηριακά αλκαλοειδή που συμπεριφέρονται ως νευροτοξίνες δρουν επί χολινεργικών συνάψεων ή καναλιών ιόντων που εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των σκελετικών και / ή αναπνευστικών μυών (Testai et al, 2016).

Υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες που διερευνούν τις επιδράσεις της ανατοξίνης ή των σαξιτοξινών σε υδρόβιους οργανισμούς, αλλά μόνο περιορισμένος αριθμός επιστημονικών εργασιών που αφορούν άλλες κυανοτοξίνες όπως η ανατοξίνη-α (S), η κυλινδροσπερμψίνη ή οι κυανοβακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες. Δεδομένου ότι αυτές οι "μη παραδοσιακές" κυανοτοξίνες δεν παρακολουθούνται συστηματικά, η σημασία τους στα υδροβιακά οικοσυστήματα μπορεί εύκολα να υποτιμηθεί (Blahova et al, 2009). Εκτός από τις κυανοτοξίνες που αναφέρονται παραπάνω, έχουν εντοπιστεί πολλές άλλες ουσίες κυανοβακτηριακής προέλευσης που κατέχουν κάποιο είδος βιολογικής δραστηριότητας ή τοξικότητας (Welker & von Dohren, 2006). Επίσης, έχει αποδειχθεί η τοξικότητα πτητικών ενώσεων (π.χ., γεωσμίνης) που παράγονται από κυανοβακτήρια. Είναι ενδιαφέρον, ότι και τα κυανοβακτηριακά λιπαρά οξέα μπορεί επίσης να είναι τοξικά ή να ρυθμίζουν την επίδραση άλλων κυανοτοξινών (Bláha et al, 2009).

Αν και μέχρι πρόσφατα έχει δοθεί σημαντική προσοχή στην έρευνα για επιλεγμένες κυανοτοξίνες (κυρίως μικροκυστίνες), είναι πλέον επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι τα κυανοβακτήρια μπορεί να παράγουν ευρύ φάσμα μέχρι σήμερα άγνωστων τοξινών. Αρκετές μελέτες ανέφεραν τοξικές επιδράσεις από εκχυλίσματα κυανοβακτηρίων, τα οποία δεν θα μπορούσαν να αποδοθούν σε κυανοβακτηριακούς μεταβολίτες που παραδοσιακά κατατάσσονται στις "κυανοτοξίνες". Ιδιαίτερα από οικοτοξικολογική άποψη, έχει δοθεί ουσιαστικά λιγότερη προσοχή στις υπόλοιπες τοξικές κυανοβακτηριακές ενώσεις.

### 1.1.2. Εισαγωγή στις Μικροκυστίνες

Τα ανάλογα μικροκυστινών είναι κυκλικά επταπεπτίδια που μοιράζονται την ακόλουθη δομή: κύκλο-(D-Ala1-X2-D-isoMeAsp3-Y4-Adda5-D-isoGlu6-Mdha7). Οι θέσεις X2 και Y4 αντιπροσωπεύουν μεταβλητές θέσεις L-αμινοξέων (Puddick et al, 2014). Οι μικροκυστίνες γενικά περιέχουν D-ερυθροβρωμο-μεθυλασπαρτικό οξύ (D-erythro-methylaspartic acid) στη θέση τρία, η θέση επτά είναι συχνά N-μεθυλδεϋδροαλανίνη (N-methyldehydroalanine) ενώ περιέχουν και δύο συμβατικά D-αμινοξέα στις θέσεις 1 και 6. Τέλος, οι μικροκυστίνες περιέχουν Adda (ένα μοναδικό β-αμινοξύ, 3-αμινο-9-μεθοξυ-2,6,8-τριμεθυλο-10-φαινυλδεκα-4,6-διενοϊκό οξύ).



**Σχήμα 1.1.** Γενική χημική δομή των μικροκυστινών και χημικές δομές ορισμένων MC. Τα X και Z είναι μεταβλητά L-αμινοξέα. Τα R<sub>1</sub> και R<sub>2</sub> είναι H ή CH<sub>3</sub>. Το D-MeAsp είναι το D-ερυθρο-β-μεθυλ-ασ\_αρτικό οξύ. Το Adda είναι το 3-αμινο-9-μεθοξυ-2,6,8-τριμεθυλο-10-φαινυλδεκα-4,6-διενοϊκό οξύ. Το Mdha είναι το N-μεθυλ-αφυδρο-αλανίνη.

Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 100 διαφορετικές μικροκυστίνες (Puddick et al, 2014) που διαφέρουν κυρίως στις μεταβλητές περιοχές ( L-αμινοξέα στις θέσεις 2 και 4), αν και τροποποιήσεις έχουν αναφερθεί για όλα τα αμινοξέα (Puddick et al, 2014). Οι μικροκυστίνες ονομάζονται σύμφωνα με τον κωδικό ενός γράμματος των αμινοξέων που ενσωματώνονται στο θέσεις δύο και τέσσερα. Έτσι, π.χ., η μικροκυστίνη (microcystin)-LR (L: Λευκίνη, R:Αργινίνη) περιέχει L (Λευκίνη) στην θέση δύο και R (Αργινίνη) στη θέση τέσσερα. Η microcystin-LR είναι το πλέον τοξικό και διαδεδομένο ανάλογο μικροκυστινών που έχει απομονωθεί μέχρι τώρα και η μικροκυστίνη που έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα από τις υπόλοιπες.

Μια δημοφιλής υπόθεση για τον ρόλο των μικροκυστινών είναι ότι οι μικροκυστίνες δρουν αποτρεπτικά για τους ευκαριωτικούς θηρευτές των κυανοβακτηρίων, όπως το ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια. Ωστόσο, φυλογενετική ανάλυση υποδηλώνει ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των μικροκυστινών εξελίχτηκαν προγενέστερα από την εξελικτική γραμμή των ευκαρυωτικών θηρευτών. Πιο πρόσφατα, παράγοντες όπως η δημιουργία οργανομεταλλικών συμπλόκων μέσω χηλικών ενώσεων (Schatz et al, 2007; Sevilla et al, 2008), ο σχηματισμός αποικιών (Gan et al, 2012) και η συνεισφορά στην στερεοδιαμόρφωση πρωτεϊνών (Zilliges et al, 2011) έχουν υποδειχτεί ως πιθανές λειτουργίες για τις μικροκυστίνες. Σύντομη ανασκόπηση των μελετών σε αυτούς τους τομείς παρουσιάζεται παρακάτω στο κείμενο.

Οι Μικροκυστίνες είναι ανθεκτικές σε πολλές αντίξοες συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες, οξείδωση και υδρολυτικές συνθήκες και μπορεί να παραμείνουν σταθερές για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υδάτινα οικοσυστήματα (Paradimitriou et al, 2016).

### **1.1.3. Μικροοργανισμοί που παράγουν Μικροκυστίνες**

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περίπου 40 είδη που ανήκουν σε 20 γένη κυανοβακτηρίων τα οποία έχουν συσχετιστεί με την παραγωγή κυανοτοξινών που περιλαμβάνουν και κυκλικά πεπτίδια και αλκαλοειδή (Gkelis & Zaoutsos, 2014). Έχει αναφερθεί ότι μικροκυστίνες παράγουν κυανοβακτήρια που ανήκουν σε διάφορα γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Planktothrix* και *Anabaena*.

Το γένος *Microcystis* χαρακτηρίζεται μορφολογικά από κυμαινόμενα σε μέγεθος (με διάμετρο που κυμαίνεται από 1 έως 9 μm) μονοκύτταρα, κοκκοειδή κύτταρα. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό που αποτελεί και την πρωταρχική βάση για την οριοθέτηση των ειδών, είναι η ποικιλία αποικιακών μορφολογιών που αποτελούνται από πυκνές συγκεντρώσεις κυττάρων υπό φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπάρχουν πάνω από δώδεκα αναγνωρισμένα μορφολογικά διαχωρισμένα είδη του *Microcystis*. Τα πιο συχνά απαντούμενα μορφολογικά διαχωρισμένα είδη φαίνεται να είναι τα *M. firm*, *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. botrys*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. ichthyoblabe*, *M. smithii*, *M. wesenbergii*, *M. viridis* και *M. panniformis*. Υπάρχει ωστόσο η επιστημονική ανησυχία, ότι η ταξινομική υπόσταση κάποιων ειδών είναι αμφισβητήσιμη και ότι κάποια στελέχη μπορούν να εμφανίζουν πολλαπλά μορφολογικά χαρακτηριστικά ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ή φυσιολογικά ερεθίσματα. Με την έλευση των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) είναι τώρα δυνατή η σύγκριση μικροβιακών γονιδιωμάτων *in silico*.

#### **1.1.4. Μικροοργανισμοί που παράγουν Μικροκυστίνες-Η κατάσταση στην Ελλάδα**

Πρόσφατες δημοσιευμένες έρευνες που αναλύουν πειραματικά δεδομένα σε διάφορες ελληνικές λίμνες έχουν αποκαλύψει την εκτεταμένη εμφάνιση επιβλαβών κυανοβακτηρίων και μικροκυστινών που παράγονται από αυτά (Kagalou et al, 2008; Papadimitriou et al, 2010; Papadimitriou et al, 2012a; Papadimitriou et al, 2012b). Στην Ελλάδα, το θερμό μεσογειακό κλίμα ευνοεί την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε ευτροφικά νερά. Η ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων μπορεί να ξεκινήσει με την έλευση της άνοιξης και να συνεχιστεί μέχρι το τέλος του χρόνου (το Δεκέμβριο). Σε υπερτροφικές λίμνες έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο ότι η ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων μπορεί να συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τα κύρια συστατικά της βιοκοινότητας του φυτοπλαγκτού πολλών ελληνικών λιμνών (Kagalou et al, 2008; Papadimitriou et al, 2010; Papadimitriou et al, 2012a; Papadimitriou et al, 2012b). Στα ελληνικά νερά, είναι γνωστό ότι κυριαρχούν διάφορα είδη *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* και *Cylindrospermopsis* (Gkelis &

Zaoutsos, 2014). Το κυρίαρχο είδος στην λίμνη Δοϊράνη (L. Doirani, Kastoria) ήταν το *Microcystis wesenbergii* ενώ τα *Microcystis viridis* και *Microcystis novacekii* ήταν τα κυρίαρχα είδη στην Λίμνη Παμβώτιδα (L. Pamvotis). Αντίθετα, το είδος *Anabaena perturbata* ήταν κυρίαρχο στην Λίμνη Βόλβη (L. Volvi), ενώ τα *Planktothrix agardhii*, *Limnothrix redekei* και *Anabaenopsis elenkinii* ήταν κυρίαρχα στην Λίμνη Κάρλα (L. Karla) (Gkelis & Zaoutsos, 2014). Έχουν καταγραφεί τρεις μονοειδικές πληθυσμιακές εκρήξεις του *C. raciborskii* (δεξαμενή Κερκίνης, Λίμνη Βόλβη) καθώς και μια από *Microcystis* spp. στην Λίμνη Παμβώτιδα (Gkelis & Zaoutsos, 2014).

Οι ηπατοτοξίνες και ιδιαίτερα οι μικροκυστίνες παράγονται κυρίως από τα γένη *Microcystis*, *Anabaena* και *Planktothrix* και είναι προς το παρόν οι πιο καλά μελετημένες κυανοτοξίνες με μια κοσμοπολίτικη κατανομή (Berillis et al, 2014). Στην Ελλάδα, μικροκυστίνες έχουν ανιχνευθεί σε τουλάχιστον δεκατρείς λίμνες (Paradimitriou et al, 2010). Μικροκυστίνες βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα μιας άλλης μελέτης σε δείγματα νερού συλλεγμένα από έξι λίμνες (Gkelis & Zaoutsos, 2014). Τα αποτελέσματα παρείχαν με αυτόν τον τρόπο περαιτέρω στοιχεία ότι τα είδη *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* που ήταν κοινά στα υπό μελέτη ύδατα (και είναι γνωστό ότι κυριαρχούν στην Ελλάδα) είναι πιθανό να περιέχουν μικροκυστίνες.

### **1.1.5. Προβλήματα για την υγεία και το περιβάλλον από τις μικροκυστίνες**

#### **1.1.5.1. Εισαγωγή**

Οι πληθυσμιακές εκρήξεις κυανοβακτηριακών ειδών αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο εμφανείς υδατογενείς μικροβιακούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και τον εφοδιασμό με νερό των αγροτικών καλλιεργειών, την παραγωγή της αλιείας και την βιολογική/οικολογική ισορροπία των λιμναίων και θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Paerl, 2014; Paerl et al, 2011; Paerl & Otten, 2013; Paerl & Paul, 2012).

Αυτός ο κίνδυνος είναι αποτέλεσμα από την παραγωγή κυανοτοξινών και άλλων επιβλαβών δευτερογενών μεταβολιτών των κυανοβακτηρίων, όπως οι μικροκυστίνες (MCs), οι

κυλινδροσπερμψίνες (CYNs), η ανατοξίνη-α (ATX-α) και η σαξιτοξίνη (STX), που μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιδράσεις μέσα σε δεξαμενές και σε συστήματα διοχετεύσεως νερού κατά την απελευθέρωση (Paerl & Otten, 2013) και αποτελούν απειλή για τους ζώντες οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων (Testai et al, 2016).

#### **1.1.5.2. Προβλήματα στο περιβάλλον και στην γεωργική παραγωγή (υπολείμματα μικροκυστινών στα καλλιεργούμενα φυτά).**

Οι μικροκυστίνες μπορούν να επεκτείνουν την τοξική τους δράση στα χερσαία φυτά, όταν χρησιμοποιείται επιβαρυμμένο με μικροκυστίνες νερό για άρδευση. Το επιβαρυμμένο με μικροκυστίνες νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση των καλλιεργειών έχει τεράστιο αντίκτυπο στην ανάπτυξη των φυτών και προκαλεί σημαντική μείωση της απόδοσης (Freitas et al, 2015a; Lee et al, 2017b; Machado et al, 2017a).

Συνολικά, οι μικροκυστίνες φαίνεται να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην:

1. **Βλάστηση των σπερμάτων** (Corbel et al, 2015b; El Khalloufi et al, 2012; El Khalloufi et al, 2011; Saqrane et al, 2008).
2. **Ανάπτυξη των δενδρυλλίων** (El Khalloufi et al, 2012; Levizou et al, 2017; Zhu et al, 2018) (Cao et al, 2018a; Chen et al, 2012a; Chen et al, 2012b; El Khalloufi et al, 2013; Freitas et al, 2015a; Lahrouni et al, 2013; Lahrouni et al, 2016; Liang & Wang, 2014; Zhu et al, 2018).
3. **Φωτοσυνθετική αφομοίωση** (El Khalloufi et al, 2012; Saqrane et al, 2009) (El Khalloufi et al, 2011; Lahrouni et al, 2013; Lahrouni et al, 2016; Lahrouni et al, 2011; Liang & Wang, 2014; Machado et al, 2017a; Machado et al, 2017b).
4. **Πρόκληση οξειδωτικού στρες** (Chen et al, 2012a; Chen et al, 2012b) (El Khalloufi et al, 2012) (Cao et al, 2018a; El Khalloufi et al, 2011; Wang et al, 2011).
5. **Πρόσληψη αζώτου** (El Khalloufi et al, 2011; Lahrouni et al, 2013).

Ωστόσο, η απόκριση των φυτών στις μικροκυστίνες εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι: α) το είδος του φυτού, β) το είδος της τοξίνης, γ) η φύση της τοξίνης (καθαρισμένη ή ακατέργαστο εκχύλισμα), δ) η συγκέντρωση τοξινών, ε) ο χρόνος έκθεσης στ) η μέθοδος άρδευσης (άρδευση επιφάνειας ή ψεκασμού) και (ζ) η



σύσταση του γεωργικού εδάφους στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό (Chen et al, 2013; Máthé et al, 2013; Saqrane et al, 2008).

### *1.1.5.3. Προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή*

Οι μικροκυστίνες συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο συχνά εντοπισμένων τοξικών προϊόντων στα γλυκά νερά και παράγουν ισχυρά τοξικά αποτελέσματα. Τα προβλήματα ανθρώπινης υγείας σχετίζονται πιθανότατα με τη χρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών μέσω της κατανάλωσης επιβαρυσμένων υδάτων και τροφίμων (γεωργικά προϊόντα, ψάρια, γαρίδες, μαλάκια), της δερματικής έκθεσης και της εισπνοής (Campos & Vasconcelos, 2010). Οι μικροκυστίνες μπορούν να βιοσυσσωρευτούν και στα βρώσιμα τμήματα των ζωικών και φυτικών ιστών, οι οποίες ενδέχεται να αυξήσουν τον κίνδυνο έκθεσης του μικροκυστινών σε ανθρώπους (Lee et al, 2017a).

Η άρδευση φυτών με πλούσιο σε μικροκυστίνες νερό μπορεί να αποτελέσει σοβαρό κίνδυνο για την δημόσια υγεία, ιδίως όταν το νερό εφαρμόζεται στα πολύ πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (σπόροι και κοτυληδόνες) του φυτού. Βιοσυσσώρευση μικροκυστινών σε βρώσιμους φυτικούς ιστούς μπορεί να προκαλέσει μόλυνση στην τροφική αλυσίδα με σημαντικούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία (Carmichael & Boyer, 2016).

Η κατάποση επιβαρυσμένου νερού, η εισπνοή και η δερματική επαφή αποτελούν τις κυριότερες οδούς για την έκθεση σε μικροκυστίνες (Lee et al, 2017a). Η κατάποση των μικροκυστινών μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένες βιολογικές δυσλειτουργίες και σοβαρά προβλήματα υγείας των ζώων και ανθρώπων, συμπεριλαμβανομένου του πυρετού, εμέτου, αδυναμίας, βλάβης του ήπατος, των νεφρών, της καρδιάς, του εγκεφάλου (και γενικότερα νευρολογική βλάβη) και του δέρματος που ενδέχεται να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο (Rastogi et al, 2014).

Η δηλητηρίαση από τις μικροκυστίνες αποτελεί τον πιο τεκμηριωμένο κίνδυνο για τους ανθρώπους και τα ζώα και συνεπάγεται οξεία ηπατοτοξικότητα (Carmichael & Boyer, 2016; Dias et al, 2009). Το ήπαρ είναι το όργανο που επηρεάζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στον άνθρωπο, αλλά η έκθεση στην τοξίνη είναι πιθανό να επηρεάσει και άλλα όργανα όπως το

νεφρό όπως αποδεικνύεται από *in vivo* και *in vitro* μελέτες (Dias et al, 2009; Žegura et al, 2008). Ως εκ τούτου, οι ασθένειες που οφείλονται σε δηλητηρίαση με μικροκυστίνας μπορεί να είναι γαστρεντερίτιδα και συναφείς ασθένειες, αλλεργικές και ερεθιστικές αντιδράσεις και ασθένειες του ήπατος (Campos & Vasconcelos, 2010).

Οι μικροκυστίνας δρουν κυρίως μέσω της αναστολής των φωσφατασών πρωτεϊνών 1 και 2A. Μετά την είσοδο τους, οι μικροκυστίνας διασπείρονται σε όλο το σώμα και στην συνέχεια εισέρχονται στα κύτταρα μέσω πολυπεπτιδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων οργανικών ανιόντων (OATP). Κύρια κύτταρα-στόχοι για μικροκυστίνας είναι τα κύτταρα του ήπατος. Οι μεταφορείς OATP μεσολαβούν στην πρόσληψη των μικροκυστινών από ηπατοκύτταρα. Ωστόσο αυτές οι τοξίνες μπορούν να επηρεάσουν και ποικίλους άλλους ιστούς (νεφρούς, αναπαραγωγικό ιστό, κόλον, εγκέφαλο) που περιέχουν τους κατάλληλους μεταφορείς OATP (1A2, 1B1, 1B2, 1B3)(Chen et al, 2016; Zilliges et al, 2011). Η αναστολή από μικροκυστίνας των προκαρυωτικών πρωτεϊνών φωσφατασών σερίνης / θρεονίνης οδηγεί σε υπερφωσφορλίωση των βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών στη διαδικασία μεταγωγής σήματος που ελέγχει τον κυτταροσκελετό (Meng et al, 2011). Αυτή η ζημιά συνοδεύεται από οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, στους νεφρούς, στον εγκέφαλο και στα αναπαραγωγικά όργανα (Chen et al, 2016).

Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων (και ιδιαίτερα οι μικροκυστίνας) μπορούν να προκαλέσουν και οικονομικές επιπτώσεις μέσω των απωλειών στον τουρισμό (~ 1 δισεκατομμύριο δολάρια ετησίως στις ΗΠΑ), αύξηση τιμών του πόσιμου νερού (~ \$ 13 εκατομμύρια στο Οχάιο το 2011-2012), και μειωμένα αλιευτικά έσοδα (Lee et al, 2017b).

## 1.2. Μικροβιακή Κοινότητα Εδάφους

### 1.2.1 Εισαγωγή

Στην αλληλεπίδραση ριζών-εδάφους εντοπίζονται διαφορετικές διακριτές οικολογικές θέσεις:

1. Η επιφάνεια της ρίζας (κυρίως φυτικό υλικό) είναι γνωστή ως "rhizoplane" (Antoun, 2012; Minz et al, 2013).

2. Η ριζόσφαιρα είναι το έδαφος υπό την επίδραση των ριζών. Τα ριζικά εκκρίματα είναι πλούσια σε ενέργεια (φωτοσυνθετικά προϊόντα) που υποστηρίζουν σημαντικές μικροβιακές δραστηριότητες. Ως εκ τούτου, ο αριθμός των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα είναι αρκετές φορές υψηλότερος από τον αριθμό τους στο ελεύθερο ριζών έδαφος (Antoun, 2012; Minz et al, 2013).
3. Μερικοί μικροοργανισμοί μπορούν να αποικίσουν το εσωτερικό των ριζών (ενδόσφαιρα) και θεωρούνται ενδοφυτικοί (Antoun, 2012).

Ως ριζόσφαιρα χαρακτηρίζεται μια οργανωμένη βιολογική μονάδα, που αποτελείται από το ριζικό σύστημα του φυτού και την μικροβιακή βιοκοινότητα που την περιβάλλει. Είναι δυνατόν να εξεταστεί το σύμπλεγμα φυτών-ριζοβακτηρίων ως ένα «ολοβίωμα» που αποτελείται από το φυτό και την συνοδευτική βακτηριακή βιομάζα τα οποία ενεργούν ως κοινοπραξία και αποτελούν μια εξελικτική ομάδα (μονάδα επιλογής στην εξέλιξη) (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2011; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Η μικροβιακή γενετική ποικιλότητα στο έδαφος είναι τεράστια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα ότι 1 g εδάφους μπορεί να περιέχει εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα που ανήκουν σε περισσότερα από 10.000 μοναδικά είδη (Fierer et al, 2007).

Η ριζόσφαιρα περιέχει άφθονα θρεπτικά συστατικά και διάφοροι μικροοργανισμοί αποκτούν πρόσβαση σε ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά περιβάλλον από το φυτό. Οι ακτινικές διαστάσεις της ριζόσφαιρας μπορούν να εκτείνονται σε διάμετρο πολλών χιλιοστών για τα διαλυτά θρεπτικά συστατικά (π.χ. νιτρικό) ή πτητικά, αλλά είναι πολύ πιο περιορισμένη (<1 mm) για ελαφρώς διαλυτά ορυκτά (όπως P και Fe). Αυτές περιλαμβάνουν μη εκκρινόμενες και εκκρινόμενες ενώσεις (διοξείδιο του άνθρακα, όξινα ανθρακικά, πρωτόνια, ηλεκτρόνια κ.λπ.) που επηρεάζουν το pH του εδάφους και τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Οι ρυθμοί απελευθέρωσης των ενώσεων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από περιορισμούς των θρεπτικών ουσιών. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών αποθέσεων της ρίζας είναι αντιστρόφως ανάλογες με την απόσταση από την επιφάνεια της ρίζας (Gao et al, 2011). Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ποσότητα και τη σύνθεση του οργανικού άνθρακα που απελευθερώνεται στην ριζόσφαιρα: το είδος του φυτού (Jones et al, 2009), περιβαλλοντικοί παράγοντες (φως, θερμοκρασία), διατροφική ισορροπία, αβιοτική και βιοτική καταπόνηση και βιολογικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των μυκορριζών και των προκαρυωτικών μικροοργανισμών.

Διάφορες μελέτες έχουν σκιαγραφήσει αρκετές βασικές πτυχές της τοπολογίας του αποικισμού της ρίζας. Το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της ρίζας είναι απαλλαγμένο από βακτήρια (Watt et al, 2006). Τα βακτήρια που συνδέονται με τις ρίζες σιταριού που καλλιεργούνται σε φυσική κάλυψη εδάφους αποικίζουν μεταξύ 12% και 15% της επιφάνειας της ρίζας (Watt et al, 2006). Οι μικροοργανισμοί δεν κατανέμονται τυχαία στις ρίζες αλλά τείνουν να συγκεντρωθούν σε συγκεκριμένα σημεία (Watt et al, 2006). Οι πληθυσμοί που συσχετίζονται με τις ρίζες αντιπροσωπεύουν ένα υποσύνολο του όγκου (Weinert et al, 2011). Η αύξηση της επιλεκτικής πίεσης με την εγγύτητα στη ρίζα, λόγω της παρουσίας και της δραστηριότητας της ρίζας, αναμένεται επομένως να οδηγήσει σε σταδιακή μείωση του πλούτου των ειδών και μετατόπιση της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας και των σχετικών κατανομών της αφθονίας των διαφόρων μικροβιακών ειδών.

Οι ενδομυκορριζικοί και οι εκτομυκορριζικοί μύκητες (AMF και EMF, αντίστοιχα) δημιουργούν μια νέα δομή και λειτουργία για τη ριζόσφαιρα, που ονομάζεται «μυκορριζόσφαιρα». Δεδομένου ότι οι περισσότερες γεωργικές καλλιέργειες σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με μυκορριζικούς μύκητες, η έννοια της μυκορριζόσφαιρας αντικατέστησε εκείνη της ριζόσφαιρας για να συμπεριλάβει τη ζώνη υπό την επίδραση των ριζών των φυτών και των συμβιωτικών μυκήτων και περιλαμβάνει την μυκόσφαιρα που είναι η περιοχή που περιβάλλει τα μυκήλια (Antoun, 2012).

### ***1.2.2. Ο ρόλος των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας στην ανάπτυξη των φυτών***

Η απελευθέρωση ενώσεων άνθρακα από τα φυτά στην ριζόσφαιρα αυξάνει τη μικροβιακή βιομάζα και τη μικροβιακή δραστηριότητα (Herrera Paredes & Lebeis, 2016). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria, ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών) μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες ομάδες σύμφωνα με την σχέση τους με τα φυτά ξενιστές: (1) εξωκυτταρικά PGPR, που ανιχνεύονται στη ριζόσφαιρα, στο "rhizosphere" ή στους χώρους μεταξύ των κυττάρων του φλοιού της ρίζας και (2) ενδοφυτικά-ενδοκυττάρια PGPR, τα οποία υπάρχουν μέσα στα ριζικά κύτταρα, γενικά σε εξειδικευμένες οξειδιακές δομές (Ngoma et al, 2012). Τα πιο μελετημένα PGPR ανήκουν στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ο μεγαλύτερος αριθμός στελεχών είναι

μέλη φθοριζουσών *Pseudomonas*. Πολλές αναφορές επίσης υποδηλώνουν ότι και θετικά κατά Gram βακτήρια (όπως βακτήρια του γένους *Bacillus*) είναι PGPR (Berger et al, 2015).

Τα PGPR έχουν άμεσες ευεργετικές επιδράσεις στα φυτά και έμμεσες με την ενίσχυση της γονιμότητας του εδάφους (για παράδειγμα, αύξηση της ποσότητας του διαθέσιμου αζώτου, και φωσφόρου και άλλων φυτικών θρεπτικών συστατικών) (Zaidi et al, 2015). Τα PGPR μπορεί να διευκολύνουν άμεσα την ανάπτυξη του φυτών αφομοιώνοντας το ατμοσφαιρικό άζωτο, διαλυτοποιώντας ορυκτά, όπως ο φωσφόρος και παράγοντας ένζυμα που μπορούν να ρυθμίσουν την ανάπτυξη των φυτών. Επιπρόσθετα, τα PGPR συνθέτουν αρκετές φυτορμόνες όπως το IAA (ινδολο-3-οξικό οξύ) που μπορεί να ενεργοποιήσει την ανάπτυξη των φυτών. Εκτός από το IAA, τα βακτήρια συντελούν στην παραγωγή φυτορμονών όπως η κυτοκίνη και η γιββερελίνη (Mohamed & Goma, 2012).

Τα PGPR είναι βακτήρια που παράγουν σιδηροφόρα (χηλικοί παράγοντες Fe-III) που μπορεί να διαλυτοποιήσουν και να συμπλοκοποιήσουν το σίδηρο και με αυτή την μορφή να διευκολύνουν την πρόσληψη τους από τα φυτά (Mohamed & Goma, 2012). Τα PGPR είναι βακτήρια που επίσης παράγουν βιταμίνες και παράγοντες ανάπτυξης (Προαγωγείς ανάπτυξης) που βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών και αύξηση της απόδοσης των γεωργικών εγκαταστάσεων. Οι βιοδραστικοί παράγοντες που παράγονται από PGPR είναι ουσίες που επηρεάζουν την ανάπτυξη όπως βιταμίνες, και αμινοξέα (Babalola, 2010).

Η έμμεση διέγερση της ανάπτυξης των φυτών από μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας περιλαμβάνει μια ποικιλία μηχανισμών όπου τα βακτήρια κυρίως εμποδίζουν τα φυτοπαθογόνα να αναστείλλουν την ανάπτυξη των φυτών με ένα ή περισσότερους διαφορετικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αντιβιοτικών, λυτικών ενζυμικών και υδροκυανίου. Η δυναμική των PGPR για τον βιολογικό έλεγχο παθογόνων μπορεί να προκύψει από έναν ή περισσότερους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων της παραγωγής σιδηροφόρων ή προκαλώντας ανοχή στην ασθένεια με τη βελτίωση της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών από τα φυτά ή καταστέλλοντας την ασθένεια των φυτών μέσω ανταγωνιστικού αποκλεισμού ή με την τροποποίηση των επιπέδων των φυτικών ορμονών (Babalola, 2010) ή διεγείροντας την παραγωγή φυτορμονών. Τα PGPR συμβάλουν στην καταστολή των παθογόνων μικροοργανισμών από το έδαφος και / ή τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά (Ngoma et al, 2012).

Οι προστατευτικοί μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας μπορούν επίσης, να αποτρέπουν τη μόλυνση μέσω ανοσο-κατασταλτικών μηχανισμών (Zamioudis & Pieterse, 2012). Τα προστατευτικά βακτήρια της ριζόσφαιρας προκαλούν συστημική αντοχή (ISR), ενώ οι μυκορριζικοί μύκητες μπορούν επίσης να προάγουν την αντοχή (MIR, αντίσταση που προκαλείται από μυκόρριζες) (Zamioudis & Pieterse, 2012). Η συστημική αντοχή (ISR) επιτυγχάνεται μέσω της σηματοδότησης από το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο και διακρίνεται από μια άλλη μορφή συστημικής αντοχής, δηλαδή τη συστημική απόκτηση αντοχής (SAR), η οποία προκαλείται από παθογόνα φύλλων με μόριο - διαμεσολαβητή το σαλικυλικό οξύ (Zamioudis & Pieterse, 2012). Τα PGPR συμβάλουν στην παραγωγή HCN (υδροκυανίου) και DAPG (2,4-διακετυλοφθορογλυκινόλη) τα οποία είναι αντιμυκητιακές ενώσεις. Η παραγωγή τους βοηθά στον έλεγχο των ασθενειών του εδάφους (Babalola, 2010). Τέλος, υπάρχουν νηματωδοφάγα βακτήρια, τα οποία ανταγωνίζονται νηματώδεις συμβάλλοντας και με αυτόν τον τρόπο στην άμυνα των φυτών (Babalola, 2010).

Οι μικροοργανισμοί προωθούν έμμεσα την αύξηση της παραγωγικότητας των φυτών προστατεύοντας τόσο από το βιοτικό στρες (ασθένειες) όσο και από τις αβιοτικές καταπονήσεις (Bulgarelli et al, 2013). Τα PGPR συμβάλουν στην βελτίωση της αντοχής του φυτικού σε αβιοτικές καταπονήσεις (στην ξηρασία, την αλατότητα και την τοξικότητα μετάλλων (Mohamed & Goma, 2012). Μερικά PGPR έχουν το ένζυμο απαμινάση ACC (απαμινάση του 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικού) η οποία υδρολύει το ACC, τον άμεσο πρόδρομο του αιθυλενίου στα φυτά (Ngoma et al, 2012). Επιπρόσθετα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν οι μικροβιακές βιοκοινότητες σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, τα βακτήρια που παράγουν ACC (διευκολύνουν την επιβίωση των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας (Marasco et al, 2012). Η απαμινάση του 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικού μειώνει τις συγκεντρώσεις αιθυλενίου υπό συνθήκες καταπόνησης, βοηθώντας τα φυτά κατά τη διάρκεια της ξηρασίας (Cao et al, 2007). Όμως ένας από τους κυριότερους ρόλους της μικροβιακής κοινότητας της ριζόσφαιρας (αν όχι ο σημαντικότερος) είναι η συμμετοχή στους περισσότερους βιογεωχημικούς κύκλους όπως του N και του S. Για τον λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που σχετίζονται με αυτούς τους κύκλους (πέραν της ανάλυσης το ολικών βακτηρίων η οποία επίσης πραγματοποιήθηκε). Συμπερασματικά, οι μικροοργανισμοί της βιοκοινότητας της ριζόσφαιρας είναι οι μηχανές λειτουργίας του

εδαφικού οικοσυστήματος έχοντας σημαντικούς ρόλους και για τους λόγους αυτούς η μέτρηση των επιδράσεων στους μικροοργανισμούς του εδάφους αποκτά ιδιαίτερη αξία.

### *1.2.3. Νιτροποίηση και νιτροδωποιητικοί μικροοργανισμοί*

Η νιτροποίηση αποτελεί την σημαντικότερη διεργασία για την ολοκλήρωση του γεωχημικού κύκλου του N, επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών και έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία για τη γεωργία και τη μεταχείριση των αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων.

Με τη νιτροποίηση, διασφαλίζεται η μετατροπή της αμμωνίας, στην οξειδωμένη και περισσότερο εύκολα αφομοιώσιμη μορφή των νιτρικών ιόντων και ταυτόχρονα παρέχεται το υπόστρωμα για την απονιτροποίηση διαμέσου της οποίας το άζωτο θα επιστρέψει πίσω στην ατμόσφαιρα. Τα νιτρικά ιόντα είναι η ανόργανη μορφή αζώτου που προτιμούν τα φυτά και οι αερόβιοι μικροοργανισμοί. Έτσι, στα καλλιεργούμενα εδάφη η οξείδωση της αμμωνίας προς νιτρικά ιόντα αυξάνει τη διαθεσιμότητα του αζώτου για τα φυτά (Schleper and Nicol, 2010, Tourna et al., 2008).

Αν και φυσική διαδικασία, η νιτροποίηση μπορεί να έχει και αρνητικές συνέπειες για το περιβάλλον. Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που αναφέρονται είναι η επιβάρυνση των υδατοσυλλογών γλυκού νερού (λίμνες, ποτάμια) και των υπόγειων υδάτων με νιτρικά ιόντα διαμέσου της έκπλυσης τους από αγροτικές περιοχές. Η κατανάλωση νιτρικών από τον άνθρωπο και τα ζώα μπορεί να αποβεί επικίνδυνη για την υγεία τους. Η συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών σε υδατοσυλλογές γλυκού νερού, με την προϋπόθεση ότι στην υδατοσυλλογή εμπεριέχονται και επαρκείς ποσότητες διαθέσιμων φωσφορικών ιόντων, συμβάλλει επίσης στο φαινόμενο του ευτροφισμού. Η μικροβιακή δράση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και εκπομπή αερίων όπως τα NO και N<sub>2</sub>O που ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την τρύπα του όζοντος και το φαινόμενο του θερμοκηπίου, αντίστοιχα. Ακόμα, η διαδικασία της οξείδωσης της αμμωνίας οδηγεί σε γενικότερη οξύνιση του περιβάλλοντος. Όπου οι συγκεντρώσεις αμμωνίας και το επίπεδο νιτροποίησης είναι υψηλά για μεγάλα χρονικά διαστήματα, παρατηρείται μείωση του περιβαλλοντικού pH

(Hatzenpichler, 2012, Junier et al., 2010, Nicol and Schleper, 2006, Kowalchuk and Stephen, 2001).

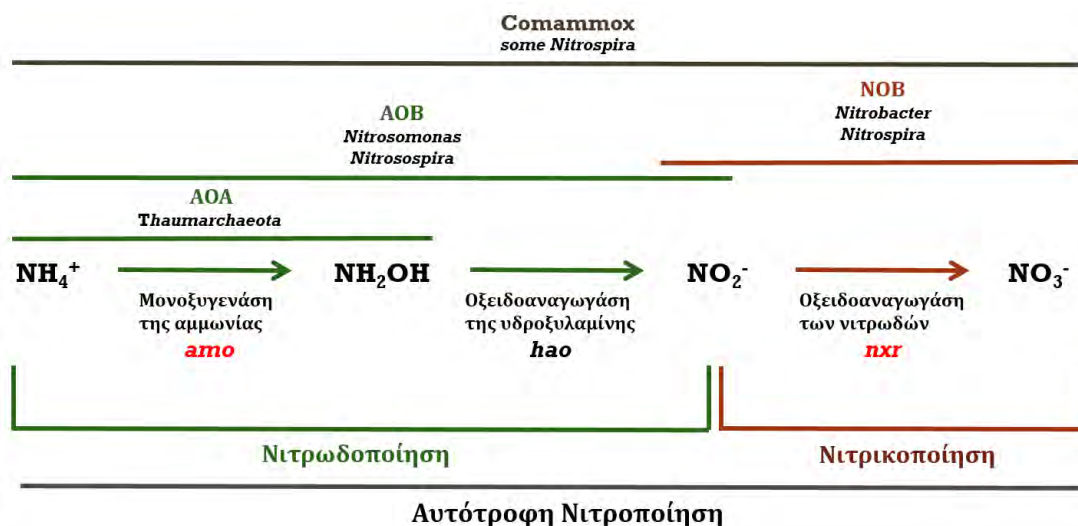
Μέχρι πρόσφατα ως κύριοι μικροοργανισμοί για την οξείδωση της αμμωνίας θεωρούνταν τα χημειολιθότροφα βακτήρια που ανήκουν στο φύλο Proteobacteria (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB), που σχηματίζουν δύο διακριτές μονοφυλετικές ομάδες στα β- και γ-πρωτεοβακτήρια. Τα στελέχη των AOB που έχουν καλλιεργηθεί μέχρι σήμερα ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια που πιστεύεται ότι είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί για την οξείδωση της αμμωνίας στα περισσότερα περιβάλλοντα (Purkhold et al., 2000, Nicol and Schleper, 2006). Πρόσφατες μελέτες που βασίζονται σε μεταγονιδιωματικές τεχνικές και σε τεχνικές καλλιέργειας έδειξαν ότι τα αρχαία που ανήκουν στο φύλο Thaumarcheota συμβάλλουν σημαντικά στη νιτροποίηση (νιτροδοποιητικά αρχαία : AOA, ammonia-oxidizing archaea) τόσο στο έδαφος όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα (Tourna et al., 2008, Konneke et al., 2005).

Η νιτροποίηση, που αποτελεί το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, είναι μια διαδικασία δύο διαδοχικών σταδίων που καταλύονται από διαφορετικά ενζυμικά σύμπλοκα. Στο πρώτο στάδιο η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_3 + 2\text{e}^- + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ ) με τη δράση του ενζύμου μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (AMO, AmmoniaMonoOxygenase) (Hooper et al., 1997, Hollocher et al., 1981). Η αντίδραση αυτή θεωρείται ρυθμoκαθοριστική (rate-limiting) για τη συνολική διαδικασία της νιτροποίησης (Kowalchuk and Stephen, 2001). Στο δεύτερο στάδιο, η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται σε νιτρικά ιόντα και η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) ( $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 4\text{e}^- + 5\text{H}^+$ ) (Sayavedra-Soto et al., 1994). Κατά το δεύτερο στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας προκύπτουν τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα (Kumar and Nicholas, 1982, Hollocher et al., 1982). Συγκεντρωτικά στην εικόνα 1 φαίνονται τα στάδια της νιτροποίησης και οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν.

Η μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (AMO) αποτελεί ένζυμο-κλειδί για τη βιοχημεία των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην οξείδωση της αμμωνίας. Αποτελείται από 3 υπομονάδες **amoA**, **amoB** και **amoC** που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια (Hatzenpichler, 2012).



Δεδομένης της λειτουργικής του σημαντικότητας και της συντηρημένης φυλογένεσης, το γονίδιο **amoA** χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης για τη μελέτη της ποικιλότητας και της αφθονίας των AOB και AOA σε εδαφικά και υδάτινα περιβάλλοντα (Santoro et al., 2008).



Εικόνα 1. Τα επιμέρους στάδια της νιτροποίησης και ποιες ομάδες μικροοργανισμών συμμετέχουν σε καθένα από τα βήματα

### Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB, Ammonia-Oxidizing Bacteria)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) απαντούν στα περισσότερα αερόβια περιβάλλοντα όπου υπάρχει διαθέσιμη αμμωνία εξαιτίας της ανοργανοποίησης της οργανικής ύλης ή από ανθρωπογενείς πηγές αζώτου, όπως αμμωνιακά λιπάσματα και απόβλητα. Βρίσκονται σε αφθονία στο έδαφος, σε υδατοσυλλογές γλυκού νερού και αλμυρού νερού. Αν και θεωρούνται υποχρεωτικά αερόβια έχουν απομονωθεί από περιβάλλοντα με έλλειψη οξυγόνου όπως ανοξικά εδάφη και υφάλμυρο νερό (Kowalchuk and Stephen, 2001).

Τα AOB είναι χημειολιθότροφοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν ανηγμένες μορφές N (π.χ αμμωνία) ως πηγή ενέργειας, το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα και το μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων (You et al., 2009).

Η διαχείριση των αποβλήτων είναι μέχρι στιγμής η πιο σημαντική βιοτεχνολογική εφαρμογή των AOB. Η απομάκρυνση του αζώτου από τα απόβλητα είναι εξαιρετικής περιβαλλοντικής σημασίας εξαιτίας της συμβολής του σε φαινόμενα ευτροφισμού. Ωστόσο,

το σύμπλοκο ενζύμων της μονο-οξυγενάσης της αμμωνίας, εξαιτίας της ευρείας και μη εξειδικευμένης δράσης του, επιτρέπει ταυτόχρονα με την οξείδωση της αμμωνίας, την οξείδωση και αλειφατικών, αρωματικών και αλογονομένων οργανικών ουσιών, δίνοντας τη δυνατότητα στα AOB να χρησιμοποιηθούν και ως παράγοντες βιοαποκατάστασης. Η συμμετοχή των AOB αναφέρεται τέλος σε συστήματα βιολογικών ηθμών όπου χρησιμοποιούν τα εισερχόμενα υποστρώματα ώστε να συντηρείται η βιομάζα σε σταθερά επίπεδα και να απομακρύνονται τυχόν ρύποι (Junier et al., 2010, Kowalchuk and Stephen, 2001).

### *Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA, Ammonia-Oxidizing Archaea)*

Τα Αρχαία φυλογενετικά χωρίζονται σε τέσσερα κύρια φύλα: (1) τα Euryarchaeota όπου περιλαμβάνονται ετερόκλητες από άποψη φυσιολογίας ομάδες όπως αλόφιλα, θερμόφιλα και μεθανιογόνα αρχαία, (2) τα Crenarchaeota που αποτελούνται από τα υπερθερμόφιλα και τα θείο-εξαρτώμενα αρχαία, (3) τα Korarchaeota που απαντούν σε υδροθερμικά περιβάλλοντα και χαρακτηρίζονται από χαμηλή σχετική αφθονία στο περιβάλλον και (4) το φύλο Thaumarchaeota που προστέθηκε πρόσφατα στο φυλογενετικό δέντρο των αρχαίων και περιλαμβάνει είδη ευρέως διαδεδομένα και άφθονα στο περιβάλλον που εμπλέκονται στην αντίδραση της οξείδωσης της αμμωνίας (Auchtung et al., 2011, Schleper and Nicol, 2010, You et al., 2009, Madigan et al., 2005).

Οι πρώτες ενδείξεις της συμμετοχής των αρχαίων στη νιτροποίηση προέρχονται από δύο διαφορετικές μεταγονιδιωματικές μελέτες σε έδαφος (Treusch et al., 2005) και θαλασσινό νερό (Venter et al., 2004). Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν την ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται πιθανώς στην οξείδωση της αμμωνίας, σε τμήματα γονιδιωμάτων που προέρχονταν από αρχαία που δεν έχουν ωστόσο καλλιεργηθεί. (de la Torre et al., 2008, Hatzenpichler et al., 2008).

Στα εδαφικά οικοσυστήματα τα AOA φαίνεται να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των AOB στις περισσότερες περιπτώσεις (Erguder et al., 2009, Chen et al., 2008, Adair and Schwartz, 2008, Leininger et al., 2006, Nicol and Schleper, 2006).

Η γενικότερη αφθονία των AOA στο εδαφικό οικοσύστημα, όπως και η αφθονία τους σε μεγαλύτερα βάθη στο έδαφος, φανερώνουν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν και προσαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών ανάπτυξης και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι έχουν περισσότερο ευπροσάρμοστο μεταβολισμό από τα AOB (Leininger et al., 2006). Επίσης, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα AOA υπερτερούν αριθμητικά σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αμμωνιακά ιόντα έναντι των AOB που κυριαρχούν συνήθως σε εδάφη με υψηλή συγκέντρωση αμμωνιακών. Έτσι έχει προταθεί πως τα AOA συνεισφέρουν σημαντικά στη νιτροποίηση της αμμωνίας που προέρχεται από την ανοργανοποίηση, ενώ τα AOB που ευνοούνται από υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας δρουν κυρίως σε καλλιεργούμενα εδάφη που δέχονται εισροές ανόργανου αζώτου με τη μορφή λιπασμάτων (Verhamme et al., 2011, Diatal., 2010, Erguder et al., 2009). Έχει επίσης βρεθεί πως η μακρόχρονη χημική λίπανση, επηρεάζει σημαντικά την αφθονία και τη σύνθεση της κοινότητας των AOB και όχι των AOA (Shen et al., 2008).

Ωστόσο, ο κυριότερος παράγοντας που φαίνεται να καθορίζει το είδος των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν αριθμητικά καθώς και τη συνολική δραστηριότητα τους στο εδαφικό περιβάλλον, είναι το pH του εδάφους. Συγκεκριμένοι φυλότυποι των AOA και AOB έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το pH του εδάφους σε ένα εύρος τιμών από 4.9 έως 7.5, με τα AOA να επικρατούν αριθμητικά σε όξινα και τα AOB σε αλκαλικά εδάφη. Αν και τα AOA φαίνεται να είναι οι μόνοι λειτουργικοί νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί σε εδάφη με  $\text{pH} < 5.5$ , η ανάπτυξη και η δραστηριότητα κάποιων AOB σε όξινες συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί με τη δράση του ενζύμου ουρεάση. Συγκεκριμένα, τα ουρεολυτικά βακτήρια, υδρολύουν την ουρία και τη χρησιμοποιούν σαν πηγή αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα, ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιούν τα προϊόντα της ουρεόλυσης για την τροποποίηση του pH στην περιοχή του κυττάρου (Prosser and Nicol, 2012, Yao et al., 2011, Nicol et al., 2008, Koper et al., 2004, DeBoer et al., 1991).

#### **1.2.4. Θειο-οξειδωτικά βακτήρια**

Το θείο είναι ένα βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ενζύμων (και γενικότερα πρωτεϊνών) και βιταμινών. Το μεγαλύτερο μέρος του θείου στο έδαφος (> 95% του ολικού θείου) δεσμεύεται από

οργανικά μόρια και επομένως δεν είναι άμεσα διαθέσιμα στα φυτά. Η οξείδωση του θείου είναι το πιο σημαντικό βήμα του κύκλου του θείου, που βελτιώνει τη γονιμότητα του εδάφους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό θειικού άλατος, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά, ενώ η οξύτητα που παράγεται από την οξείδωση βοηθά για τη διαλυτοποίηση των φυτικών θρεπτικών ουσιών και τη βελτίωση των αλκαλικών εδαφών (Anandham et al, 2011; Chaudhary et al, 2018; Vidyalakshmi et al, 2009).

Οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν στον βιογεωχημικό κύκλο θείου (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009). Η μικροβιακή βιομάζα του εδάφους είναι η βασική κινητήρια δύναμη πίσω από όλους τους μετασχηματισμούς θείου (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009) και ενεργεί ως πηγή και αποδέκτης για το ανόργανο θειικό άλας (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009) (Chaudhary et al, 2018). Συγκεκριμένα, δημιουργεί διαθέσιμο θειικό άλας από το στοιχειώδες θείο ή οποιεσδήποτε άλλες μορφές θείου, μέσω της διαδικασίας της οξείδωσης του στο έδαφος από θειο-οξειδωτικά βακτήρια, για να το μετατρέψουν σε βιοδιαθέσιμα για τα φυτά θειικά άλατα. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μικροοργανισμοί (προκαρυωτικά πράσινο θείο βακτηρίδια) οι οποίοι χρησιμοποιούν (υποχρεωτικά ή προαιρετικά) ενώσεις θείου ως δότες ηλεκτρονίων και είναι σε θέση να τις οξειδώσουν σε θειικά άλατα. Τα θειο-οξειδωτικά βακτήρια ενισχύουν το ρυθμό φυσικής οξείδωσης του θείου και επιταχύνουν την παραγωγή θειικών αλάτων. Αυτή η διαδικασία καθιστά το θείο περισσότερο διαθέσιμο για τα φυτά και κατά συνέπεια έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη απόδοση φυτών (Anandham et al, 2011; Chaudhary et al, 2018; Vidyalakshmi et al, 2009).

Για παράδειγμα, εμβολιασμοί θειο-οξειδωτικών βακτηριδίων σε σπόρους μουστάρδας (*Brassica juncea* L.) οξείδωσαν τις ανηγμένες ενώσεις θείου και τις έκαναν διαθέσιμες σε φυτά σε θειική μορφή. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση των παραμέτρων ανάπτυξης των φυτών, όπως το μήκος, το βάρος, το βάρος σπόρου, η περιεκτικότητα σε έλαιο και η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (Chaudhary et al, 2018).

### **Κατηγορίες Θειο-οξειδωτικών Μικροοργανισμών**

Τα θειο οξειδωτικά βακτήρια ανήκουν στα *Alpha-, Beta- και Gamma-proteobacteria* (Anandham et al, 2011). Οι θειο-οξειδωτικοί μικροοργανισμοί είναι κυρίως *gram* αρνητικά

βακτήρια που ταξινομούνται επί του παρόντος στα είδη *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* και *Thiosphaera* (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009). Έχουν χαρακτηριστεί και αλλά ετερότροφα, θειο-οξειδωτικά βακτήρια, όπως μερικά είδη των γενών *Paracoccus*. Κάποια στελέχη *Pseudomonas*, *Xanthobacter* και *Alcaligenes* μπορούν επίσης να παρουσιάζουν χημειολιθοτροφική ανάπτυξη σε ενώσεις με ανόργανο θείο (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009). Δύο σαφείς μεταβολικοί τύποι βακτηρίων υπάρχουν σε αυτήν την ομάδα: Τα υποχρεωτικά χημειολιθότροφα, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν μόνο όταν τροφοδοτούνται με οξειδωσιμες ενώσεις θείου (και CO<sub>2</sub> ως πηγή άνθρακα) και τα ετερότροφα που μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσουν τον χημειοαυτοτροφικό τρόπο της ανάπτυξης (Anandham et al, 2011; Vidyalakshmi et al, 2009) (Chaudhary et al, 2018).

Από την άλλη πλευρά, τα βακτήρια που ανάγουν τα θειικά άλατα (SRB) είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν θειικά άλατα ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων, για παράδειγμα, στην αποικοδόμηση οργανικών ενώσεων. Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν επίσης να είναι ευεργετικοί για την απομάκρυνση θειικών και βαρέων μετάλλων από τις ροές αποβλήτων (Muyzer & Stams, 2008).

Πρόσφατα, ο εμβολιασμός με βακτήρια οξείδωσης του θείου ως βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη φυτών κερδίζει δυναμική ως μια αποτελεσματική μέθοδος ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών (Anandham et al, 2011).

### 1.3. Οικοσύστημα Κάρλας

Η λίμνη Κάρλα χαρακτηρίζεται από σοβαρά προβλήματα ευτροφισμού με συχνές πληθυσμιακές εκρήξεις κυανοβακτηριακών ειδών (Papadimitriou et al, 2013; Skordas et al, 2015). Στη λίμνη Κάρλα έχουν καταγραφεί πληθυσμιακές εκρήξεις ιχθυοτοξικού φυτοπλαγκτού των ειδών *Pfesteria piscicida* και *Prymnesium parvum* και αρκετών κυανοβακτηριακών ειδών (Οικονομου et al, 2012; Papadimitriou et al, 2013). Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με αποτελέσματα από άλλες λίμνες όπως η λίμνη Κορωνία στην οποία κατά τη διάρκεια του έτους 2004 παρατηρήθηκε πληθυσμιακή έκρηξη του ιχθυοτοξικού *Prymnesium cf. parvum* που συνυπάρχει με γνωστά τοξικά κυανοβακτήρια (Genitsaris et al, 2009). Η λίμνη Κάρλα θεωρείται οικοσύστημα πλούσιο σε κυανοβακτήρια και η περιεκτικότητα μικροκυστινών στο νερό της λίμνης ήταν υψηλή. Μια έρευνα (Nikouli

et al, 2013) η οποία αν και κυρίως επικεντρώθηκε στους ευκαρυώτες και όχι στα κυανοβακτήρια αποκάλυψε ότι στη ζεστή περίοδο του 2010 (δηλ. στο διάστημα από τον Απρίλιο έως τον Οκτώβριο του έτους αυτού) τα κυανοβακτήρια κυριαρχούσαν στο φυτοπλαγκτόν με αντιπροσώπευση κατά μέσο όρο στο 75% στην συνολική βιοκοινότητα του φυτοπλαγκτού, ενώ κατά τον μήνα Αύγουστο το ποσοστό των κυανοβακτηρίων άγγιζε το 90% (Paradimitriou et al, 2013), όπως συμβαίνει σε αρκετές άλλες ρηχές ευτροφικές λίμνες.

Τα προϊόντα μικροκυστινών παράγονται κυρίως από είδη *Microcystis*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Dolichospermum*, *Nostoc* και *Halosiphon* (Paradimitriou et al, 2018). Η εμφάνιση τοξικών κυανοβακτηριακών των ειδών *Anabaenopsis*, *Microcystis* και *Planktothrix* έχει επανειλημμένα καταγραφεί στη λίμνη Κάρλα (Οικονομου et al, 2012; Paradimitriou et al, 2013). Κατά το πρώτο έτος της επαναπλήρωσης της λίμνης Κάρλας, τα κυρίαρχα κυανοβακτήρια ανήκαν στα είδη *Anabaenopsis elenkinii*, *Planktothrix agardhii* και *Sphaerospermopsis arhanizomenoides* τα οποία έχουν συνδεθεί με την παραγωγή κυανοτοξινών (μικροκυστίνες) που ανιχνεύονται τόσο στα ύδατα όσο και στους ιστούς των ψαριών και παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο με επιπτώσεις από κατανάλωση ψαριών ή στην υγεία από ψυχαγωγικές δραστηριότητες στην λίμνη (Chamoglou et al, 2014; Mitsoura et al, 2013; Paradimitriou et al, 2013).

Όλα τα κυανοβακτηριακά είδη που βρέθηκαν στη λίμνη Κάρλα έχει αποδειχτεί ότι παράγουν μια ποικιλία τοξινών και αλκαλοειδών με τοξική δράση και σε πολλές άλλες λίμνες παγκοσμίως (Paradimitriou et al, 2013). Η παρουσία των περισσότερων από αυτά τα κυανοβακτήρια είδη, έχουν συσχετιστεί με την ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων μικροκυστινών .

Μια άλλη έρευνα (Berillis et al, 2014) επιβεβαίωσε την ύπαρξη δυνητικά τοξικών κυανοβακτηρίων στην λίμνη Κάρλα, με την μοριακή ανάλυση αλληλουχιών από το 16S rRNA και με την μέτρηση των συγκεντρώσεων μικροκυστινών. Συνολικά, ανιχνευτήκαν επτά φυλότυποι κυανοβακτηρίων. Δύο από αυτούς είχαν σχέση με δυνητικά τοξικά είδη του γένους *Anabaenopsis* sp. και της ομάδας των ειδών *Limnothrix / Planktothrix*.

Η ίδια έρευνα αποκάλυψε και την ύπαρξη μικροκυστινών στο νερό της λίμνης (Berillis et al, 2014) και επιβεβαίωσε παλιότερα πειραματικά δεδομένα (Paradimitriou et al, 2013). Στην μελέτη αυτή βρέθηκε ότι οι συνολικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στη λίμνη Κάρλα συναγωνίζεται εκείνες που αναφέρθηκαν στις ευτροφικές λίμνες Κορώνεια, Καστοριά και Παμβώτιδα και μάλιστα είναι υψηλότερες από αυτές που αναφέρθηκαν στις υπόλοιπες λίμνες που είχαν μέχρι παλιότερα μελετηθεί (Paradimitriou et al, 2010). Η υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών και της βιομάζας του *P. agardhii* δείχνει ότι ο πληθυσμός του *P. agardhii* ήταν ο πιο πιθανός παραγωγός μικροκυστινών στην λίμνη Κάρλα (Paradimitriou et al, 2013).

Στη Λίμνη Κάρλα, εκτός από την ύπαρξη μικροκυστινών (MCs), έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη σαξιτοξίνης (STX), neoSTX και ATX-a (Gkelis et al, 2017). Μάλιστα, η ταυτόχρονη ύπαρξη τους έχει παρατηρηθεί πολύ λίγες φορές όπως για παράδειγμα μία φορά στα γλυκά ύδατα από τις Μεσοδυτικές Ηνωμένες Πολιτείες (Graham et al, 2010). Τα πειραματικά αποτελέσματά αποδεικνύουν ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση μικροκυστινών και κυλινδροσπερμψίνων συνδέεται με την θερμοκρασία του νερού και τις συγκεντρώσεις SRP (συγκεντρώσεις ολικού και μερικού φωσφόρου) (Gkelis et al, 2017). Η θετική συσχέτιση των μικροκυστινών με τη θερμοκρασία και SRP αποκαλύφθηκε επίσης πρόσφατα και στη λίμνη Παμβώτιδα. Οι συγκεντρώσεις φωσφόρου ή αζώτου ή ταυτόχρονα αζώτου-φωσφόρου επηρεάζουν την εκδήλωση του φαινομένου (Dolman et al, 2012) και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι όταν οι αναλογίες μάζας N / P κυμαίνονται μεταξύ 5 και 10, τα κυανοβακτήρια τείνουν να κυριαρχούν (Laspidou et al, 2017). Σύμφωνα με μια άλλη έρευνα (Mellios et al, 2016), κατά το καλοκαίρι του 2012, η πρωτογενής παραγωγή έφτασε στην μέγιστη τιμή, ενώ ο λόγος N / P έφθασε τη χαμηλότερη τιμή (N / P = 5). Αυτό υποδηλώνει ότι η αναλογία μαζών N / P στη λίμνη Κάρλα συνδέεται στενά με τη δυναμική του φυτοπλαγκτού (Mellios et al, 2016).

Εκτός από τον προσδιορισμό της παρουσίας μικροκυστινών στο νερό της λίμνης Κάρλα (σαν μέρος της μελέτης της κοινότητας του φυτοπλαγκτού και των γενικών λιμνολογικών χαρακτηριστικών της Λίμνης Κάρλας) έχει μελετηθεί εκτεταμένα και η συσσώρευσή τους στους ιστούς των εμπορικών ειδών ψαριών του είδους *Cyprinus carpio* κατά το πρώτο έτος επαναπλήρωσης της τότε πρόσφατα ανακατασκευασμένης λίμνης (Mitsoura et al, 2013;

Mitsoura et al, 2012; Papadimitriou et al, 2013). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών σε ιστούς *C. carpio* (Papadimitriou et al, 2013). Ιστοί (ήπαρ, νεφρά, εγκέφαλος, μύες, καρδιά) από ψάρια του είδους *Cyprinus carpio* που συλλέχτηκαν από τη λίμνη Κάρλα, κατά τη διάρκεια της περιόδου έντονης κυανοβακτηριακής ανάπτυξης, αναλύθηκαν με μικροσκοπικές παρατηρήσεις (Mitsoura et al, 2012). Σοβαρές αλλοιώσεις ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ και στα νεφρά που μπορούν να αποδοθούν σε τοξικές επιδράσεις που προκαλούνται από διάφορους ρύπους (και ιδιαίτερα από μικροκυστίνες). Μια επιπλέον μελέτη (Mitsoura et al, 2013) επίσης αποκάλυψε ότι ανιχνεύθηκαν μικροκυστίνες σε ιστούς σε όλα τα δείγματα ψαριών που αλιεύτηκαν κατά τη δειγματοληψία. Συμπερασματικά, οι κοινοί κυπρίνοι από τη λίμνη Κάρλα που εκτέθηκαν σε κυανοβακτήρια περιείχαν υψηλές ποσότητες μικροκυστινών στους εξεταζόμενους ιστούς. Το πειραματικό αυτό δεδομένο μπορεί να εξηγηθεί από την επίδραση της χρόνιας έκθεσης των ψαριών σε κυανοβακτηριακά στελέχη που περιέχουν μικροκυστίνες. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συνάφεια με μια άλλη πρόσφατη μελέτη που ανέφερε συγκεντρώσεις μικροκυστινών στον εγκεφαλικό ιστό ατόμων του *C. gibelio* από τη λίμνη Παμβώτιδα στην Ελλάδα (Kagalou et al, 2008).

Πιο πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι κυανοτοξίνες είναι μια εύλογη αιτία και για ένα επεισόδιο μαζικής θνησιμότητας πτηνών στη Λίμνη Κάρλα (Papadimitriou et al, 2018). Οι ιστοί και το περιεχόμενο στομάχου των νεκρών πτηνών και τα ύδατα της λίμνης εξετάστηκαν για τη παρουσία μικροκυστινών, σαξιτοξινών και κυλινδροσπερμψίνης. Όλοι οι εξεταζόμενοι ιστοί και το περιεχόμενο στομάχου των πτηνών περιείχαν σημαντικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών και σαξετοξινών. Οι συγκεντρώσεις κυλινδροσπερμψίνης ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ιστούς εκτός από τον εγκέφαλο (Papadimitriou et al, 2018). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ και οι χαμηλότερες στον εγκέφαλο. Επίσης καταγράφηκαν συγκεντρώσεις μικροκυστινών και σε άλλους ιστούς με την ακόλουθη σειρά: σπλήνας> στομαχικό περιεχόμενο> νεφρός> πνεύμονας> μυϊκός ιστός. Οι συγκεντρώσεις κυλινδροσπερμψίνης ήταν υψηλότερες στο ήπαρ, χαμηλότερες στους μύες ενώ οι τιμές στα άλλα όργανα ήταν ενδιάμεσες με την ακόλουθη σειρά: νεφρός> στομαχικό περιεχόμενο> σπλήνας> πνεύμονας. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σαξιτοξινών εμφανίστηκαν σε περιεχόμενο στομάχου (μέση τιμή: 204,3 ng / g). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των σαξιτοξινών στους ιστούς των πτηνών ήταν πολύ χαμηλότερες, με τις



χαμηλότερες συγκεντρώσεις να εμφανίζονται στο πνευμονικό ιστό (μέση τιμή: 8,37 ng / g). Οι συγκεντρώσεις σαξιτοξινών εντοπίστηκαν με την ακόλουθη σειρά: στομαχικό περιεχόμενο> εγκεφαλικός ιστός> νεφρός> ήπαρ> μύες> σπλήνας> πνεύμονας. Οι μικροκυστίνες, σαξιτοξίνες και κυλινδροσπερμψίνη έχουν ήδη καταγραφεί στην Λίμνη Κάρλα από τα πρώτα χρόνια της ανοικοδόμησης της (Gkelis et al, 2017; Papadimitriou et al, 2013). Παρ'όλα αυτά, συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις κυανοτοξινών που βρέθηκαν κατά την εξεταζόμενη περίοδο με αυτές που βρέθηκαν νωρίτερα (Gkelis et al, 2017; Papadimitriou et al, 2013), είναι προφανές ότι οι συγκεντρώσεις κυανοτοξινών στη Λίμνη Κάρλα είναι πραγματικά υψηλότερες κατά την εξεταζόμενη περίοδο. Η εμφάνιση δυνητικών τοξικών κυανοβακτηριακών ειδών στη Λίμνη Κάρλα, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών, σαξιτοξινών και κυλινδροσπερμψίνης στο νερό και στους ιστούς των νεκρών πτηνών, υποστηρίζουν έντονα τη συμβολή των κυανοτοξινών στη θνησιμότητα των πτηνών.

#### 1.4. Στόχοι της Διατριβής

Οι μικροκυστίνες μπορούν ενδεχομένως να παρουσιάσουν υψηλά επίπεδα βιοσυσσωρεύσεως σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς και μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορεί να προκαλέσουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των επιπέδων των μικροκυστινών σε καλλιεργούμενες περιοχές που αρδεύονται με ύδατα από επιφανειακά υδροφόρα συστήματα όπου υπάρχουν τοξικά στελέχη κυανοβακτηρίων. Παράλληλα, είναι επιτακτική ανάγκη να αποσαφηνιστούν οι επιδράσεις των μικροκυστινών στην φυσιολογική και αναπτυξιακή λειτουργία φυτών, που αρδεύονται με νερό επιβαρυμένο με μικροκυστίνες. Τέλος, ιδιαίτερη σημασία έχει η αποσαφήνιση της επίδρασης των μικροκυστινών στις μικροβιακές κοινότητες της ριζόσφαιρας των φυτών, καθώς όπως αναλύεται και παραπάνω στο κείμενο, οι μικροβιακές κοινότητες της ριζόσφαιρας διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στις αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών και στην αντιμετώπιση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.

Η ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στις ξενοβιοτικές ουσίες και οι αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει η αναστολή της λειτουργίας των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στον κύκλο του N και γενικότερα στην λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος μας ώθησε να μελετήσουμε την επίδραση των μικροκυστινών στην

αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα μελετήσαμε την πιθανή επίδραση των μικροκυστινών στην αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων που εμπλέκονται στον κύκλο του S.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των επιδράσεων των μικροκυστινών, αυτούσιων ή σε συνδυασμό με λοιπά συστατικά του νερού της λίμνη Κάρλας, στην αφθονία βακτηρίων, μυκήτων αλλά και σημαντικών λειτουργικών μικροβιακών ομάδων όπως είναι οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί και τα θειο-οξειδωτικά βακτήρια, στην ριζόσφαιρα φυτών *Raparus sativus*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Έδαφος, φυτά , νερό Κάρλας και μικροκυστίνες

Στο παρών πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Raphanus sativus* (ραπανάκια). Τα ραπανάκια αναπτύχθηκαν σε έδαφος, το οποίο συλλέχθηκε από το αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο, το οποίο και κοσκινίστηκε. Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε στα θερμοκήπια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος). Μεγάλη ποσότητα νερού συλλέχθηκε από τη λίμνη Κάρλα για να χρησιμοποιηθεί σε κάποιες από τις μεταχειρίσεις του πειράματος. Παράλληλα στα δείγματα νερού της λίμνης Κάρλας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης μικροκυστινών.



Εικόνα 2.1: Τα φυτά *Raphanus sativus* λίγες μέρες μετά την σπορά (αριστερά) και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (δεξιά).

### 2.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

Αρχικά έγινε η φύτευση των σπόρων ραπανακιού (*Raphanus sativus*) σε μίγμα εδάφους:περλίτη σε αναλογία 1:1 κ.ο.. Τα φυτά διαχωρίστηκαν σε πέντε ομάδες, ανάλογα

με το νερό άρδευσης, όπου ήταν και οι μεταχειρίσεις του πειράματος. Συγκεκριμένα οι μεταχειρίσεις ήταν οι εξής:

A) Η ομάδα φυτών μάρτυρα (Control), όπου τα φυτά δεχόταν άρδευση με νερό βρύσης

B) η ομάδα φυτών K, όπου τα φυτά δεχόταν άρδευση με νερό από τη λίμνη Κάρλα

Γ) η ομάδα φυτών MC2, όπου τα φυτά λάμβαναν άρδευση με νερό βρύσης που είχε εμπλουτιστεί με μικροκυστίνες σε συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/L}$ ,

Δ) η ομάδα φυτών MC12, όπου τα φυτά λάμβαναν άρδευση με νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες συγκέντρωσης 12  $\mu\text{g/L}$  και

Ε) η ομάδα φυτών MC12K, όπου τα φυτά λάμβαναν άρδευση με νερό από τη λίμνη Κάρλα το οποίο εμπλουτίστηκε με μικροκυστίνες σε τελική συγκέντρωση 12  $\mu\text{g/L}$

Σ' αυτό το στάδιο τα φυτά δεχόταν καθημερινά άρδευση, το καθένα με 2-3 ml νερού. Μετά από 9 μέρες έγινε μεταφύτευση των φυτών σε γλάστρες χωρητικότητας 2L με μίγμα εδάφους - περλίτη (1:1). Κάθε ομάδα περιελάμβανε 12 φυτά στα οποία χορηγούνταν 200 ml νερού ανάλογα με κάθε μεταχείριση και η χορήγηση γινόταν 2 έως 3 φορές την εβδομάδα. Πραγματοποιούνταν αλλαγή της θέσης των φυτών (rotation) για την αποφυγή των επιδράσεων της μικροθέσης.

Την 31<sup>η</sup> και 64<sup>η</sup> ημέρα πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες του πειράματος, όπου συλλέχθηκαν δείγματα ριζόσφαιρας από έξι φυτά ανά μεταχείριση με τυχαία επιλογή. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους για νιτρικά, αμμωνιακά, δυνητική νιτροποίηση και εξαγωγή DNA.

Η συλλογή δειγμάτων ριζόσφαιρας έγινε ως εξής: από κάθε φυτό διαχωρίζαμε την ρίζα του, την οποία ξεπλέναμε με 40 ml αποστειρωμένου νερού και συλλέγαμε σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου τύπου falcon. Τα φυτά της κάθε ομάδας χωρίστηκαν ανά δύο (έτσι είχαμε συνολικά τρία falcon ανά ομάδα). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύτηκε στα σωληνάρια τύπου falcon στους -20° C έως ότου ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων.

## 2.3 Μετρήσεις νιτρικών και αμμωνιακών στο έδαφος

Για την εκχύλιση των νιτρικών και αμμωνιακών ζυγίστηκαν 2 g του δείγματος, στα οποία προστέθηκαν 20ml KCl συγκέντρωσης 1M. Τα δείγματα αναδεύτηκαν για 30min σε περιστροφικό αναδευτήρα και στη συνέχεια με χρήση διηθητικού χαρτιού συλλέχθηκε το υπερκείμενο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των νιτρικών και αμμωνιακών.

### ➤ Προσδιορισμός Νιτρικών

Για τον προσδιορισμό των νιτρικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χλωριούχου βαναδίου ( $\text{VCl}_3$ ) (Waner et al., (2009)). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, τα νιτρώδη ( $\text{NO}_2$ ) οξειδώνονται σε νιτρικά ( $\text{NO}_3$ ) με την προσθήκη  $\text{VCl}_3$ . Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Griess και υπολογίζεται η συγκέντρωσή του με φωτομέτρηση στα 450nm με τη χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα  $\text{NO}_3^-$  συγκεντρώσεων από 0,0195 ως 5 mg N- $\text{NO}_3/\text{L}$  με διαδοχικές αραιώσεις προτύπου διαλύματος  $\text{KNO}_3$  1000 mg N/L. Σε μικροπηγάδια τιτλοδότησης προστέθηκαν 50μl δείγματος, 50μl νερού (mili Q-water), 100μl  $\text{VCl}_3$  και 50μl από τα αντιδραστήρια Griess I και II. Τα μικροπηγάδια τοποθετήθηκαν στους 37°C για μια ώρα και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 540 nm.

### ➤ Προσδιορισμός Αμμωνιακών

Για τον προσδιορισμό των αμμωνιακών στο έδαφος χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία Kandeler et al., (1988). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, κατά την οξείδωση της αμμωνίας από οξύ διχλωροισκουανιούχου νατρίου παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον, παράγεται πράσινο χρώμα.

Όπως και στον προσδιορισμό των νιτρικών, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0,0195 ως 5 mg N- $\text{NO}_3/\text{L}$  για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, με διαδοχικές αραιώσεις από διάλυμα KCl 1M. Σε σωληνάρια τύπου erpendorf προστέθηκαν 600μl δείγματος, 300μl χρωστικού διαλύματος και 120μl διαλύματος οξείδωσης και στη

συνέχεια τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 300 rpm για μισή ώρα. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πιατάκια 96 θέσεων και φωτομετρήθηκαν στα 660nm.

## 2.4. Προσδιορισμός αφθονίας μικροοργανισμών στο έδαφος

### 2.4.1. Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από 0,4 g εδάφους με το εμπορικό κιτ PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθως το DNA ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση φθορισμομέτρου Qubit® 2.0.

### 2.4.2. PCR πραγματικού χρόνου για προσδιορισμό της αφθονίας ολικών βακτηρίων και μυκήτων, νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB), αρχαίων (AOA) και θειο-οξειδωτικών βακτηρίων (SOXB)

Ο προσδιορισμός της αφθονίας των συνολικών βακτηρίων και μυκήτων, των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (AOB) και αρχαίων (AOA) και των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων (SOXB) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου.

Η καμπύλη αναφοράς για τα AOA, AOB και SOXB κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις 1:10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης από  $10^7$  έως  $10^0$ , ενώ για τα ολικά βακτήρια και μύκητες από  $10^8$  έως  $10^0$ . Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι τιμές κάθε συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων στηρίχθηκε στις τιμές της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές *amoA1F* - *amoA2R* (Rotthauwe et al., 1997) και *Arch-amoAF* – *arch-amoAR*, (Francis et al., 2005), αντίστοιχα. Στην περίπτωση της ενίσχυσης των γονιδίων των 16S rRNA και ITS των συνολικών βακτηρίων και μυκήτων αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές 341F – 534R (Muyzer et al., 1993) και ITS3F – ITS4R (White et al., 1990). Τέλος για την ενίσχυση του γονιδίου *soxB* των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων,

χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές 710F – 1184R (Tourna et al., 2014). Στους παρακάτω Πίνακες 1 και 2 αναφέρονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της κάθε μίας αντίδρασης, αντίστοιχα.

**Πίνακας 1. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση των γονιδίων *amoA* των AOA και AOB, *16S rRNA*, *ITS* και *soxB*.**

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5	1X
Forward primer (20pmol/μl)	0,2	0.4 μM
Reverse primer (20pmol/μl)	0,2	0.4 μM
BSA (10μg/μl)	0,2	200 ng/μl
ddH <sub>2</sub> O	3,4	
DNA	1	
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>10</b>	

**Πίνακας 2. Συνθήκες των αντιδράσεων PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση των γονιδίων *amoA* των AOA και AOB, *16S rRNA*, *ITS* και *soxB*.**

	AOB-AOA-16SrRNA, ITS soxB	AOB-AOA-16SrRNA, ITS soxB	
Ενεργοποίηση ενζύμου	95° C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95° C	10 – 15 – 15 – 3 – 5 sec	40 – 40 – 35 – 35 – 40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57 – 57 – 62 – 53 – 55 ° C	10 – 30 – 20 – 20 – 10 sec	
Επιμήκυνση	72° C	30 – 25 – 30 – 11 – 30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	55° C	30 sec	1 κύκλος
	95° C	0.5 sec	

## 2.5 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα ανάλυσης νιτρικών και αμμωνιακών καθώς και τα δεδομένα αφθονίας των AOA, AOB, SOXB, συνολικών βακτηρίων και μυκήτων αναλύθηκαν ξεχωριστά το καθένα με ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (two-way-ANOVA).

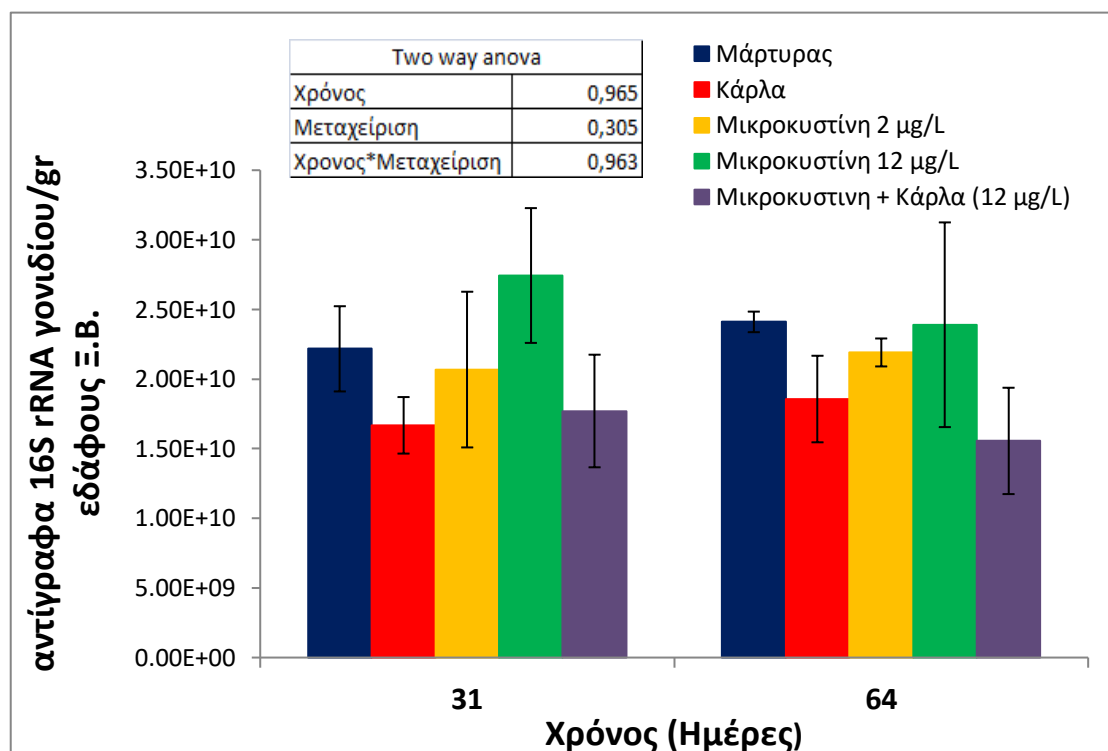


### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Επιδράσεις στην αφθονία ολικών βακτηρίων και μυκήτων στο έδαφος

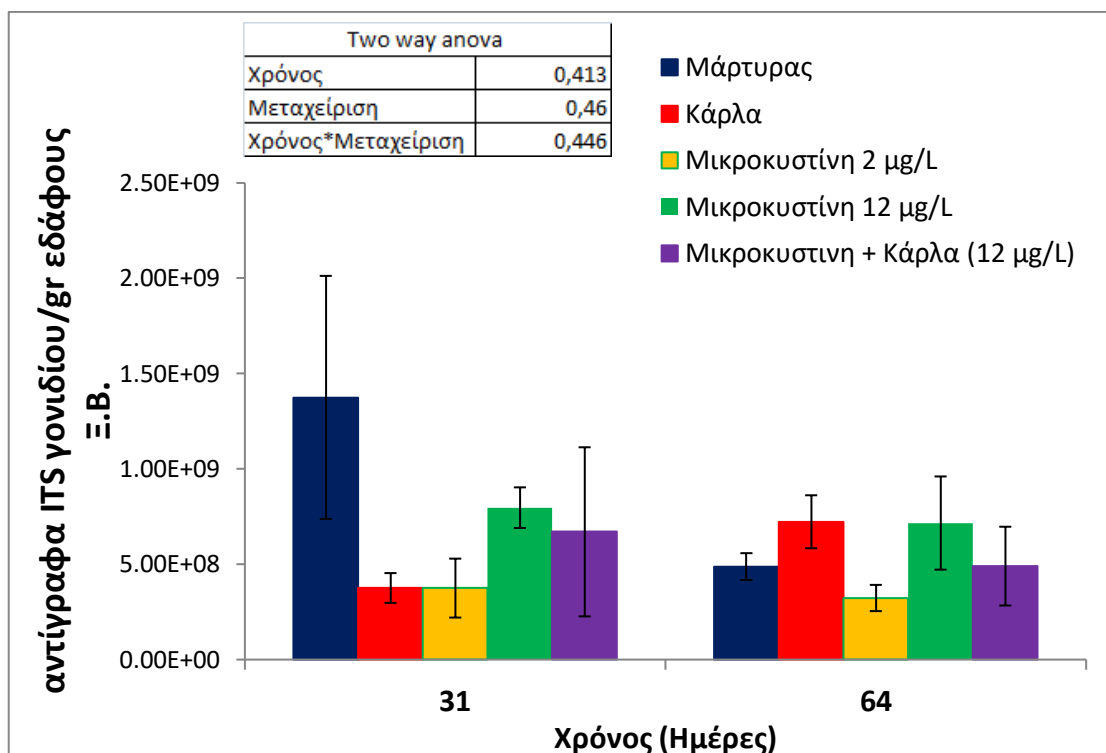
Η επίπτωση των μικροκυστινών που εμπεριέχονται στο νερό από την λίμνη Κάρλα στην αφθονία των ολικών μυκήτων και βακτηρίων της ριζόσφαιρας *Raphanus sativus* (ραπανάκια) μελετήθηκε με την χρήση τεσσάρων διαφορετικών πειραματικών ομάδων και μιας πέμπτης ομάδας ελέγχου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή ποτισμάτων των φυτών *Raphanus sativus* με νερό διαφορετικών χαρακτηριστικών. Δυο από τις πειραματικές ομάδες φυτών *Raphanus sativus* ποτίζονταν με νερό από την λίμνη Κάρλα (η μια ομάδα) ή (η άλλη ομάδα) με νερό από την λίμνη Κάρλα εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη (τελικής συγκέντρωσης 12 μg/l). Δυο επιπλέον πειραματικές ομάδες ποτίζονταν με νερό βρύσης εμπλουτισμένο με την κατάλληλη ποσότητα μικροκυστινών (ώστε να έχουμε νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες συγκέντρωσης 2μg/l ή 12μg/l). Στην ομάδα φυτών μάρτυρα εφαρμόστηκαν ποτίσματα με νερό βρύσης. Συλλέχτηκαν δείγματα από την ριζόσφαιρα του εδάφους σε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές από την έναρξη του πειράματος. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες (στις 31 και 64 ημέρες αντίστοιχα).

Αρχικά, έγινε η ανίχνευση των αντιγράφων του γονιδίου 16S r RNA που εκφράζει το σύνολο των βακτηρίων και αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην αφθονία των βακτηρίων της ριζόσφαιρας φυτών *Raphanus sativus* είτε τα φυτά ποτίζονταν με νερό από την λίμνη Κάρλα είτε με νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες ( $P = 0.305$ ). Επίσης, ο παράγοντας χρόνος φάνηκε ότι δεν οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων του πειράματος όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Η αφθονία του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 µg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 µg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 µg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  η τυπική απόκλιση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για την εκτίμηση της αφθονίας των συνολικών μυκήτων της ριζόσφαιρας, όπου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και αναλύονται στο Διάγραμμα 2. Όμοια με τα αποτελέσματα των συνολικών βακτηρίων έτσι και η αφθονία των ολικών μυκήτων δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Παρόλο που φαίνεται στις 31 ημέρες να υπάρχει μια ανάσχεση στην αφθονία των μυκήτων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που ποτίστηκαν με νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες (2 µg/L) και με νερό από την λίμνη Κάρλα σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, οι διαφορές που παρουσιάστηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

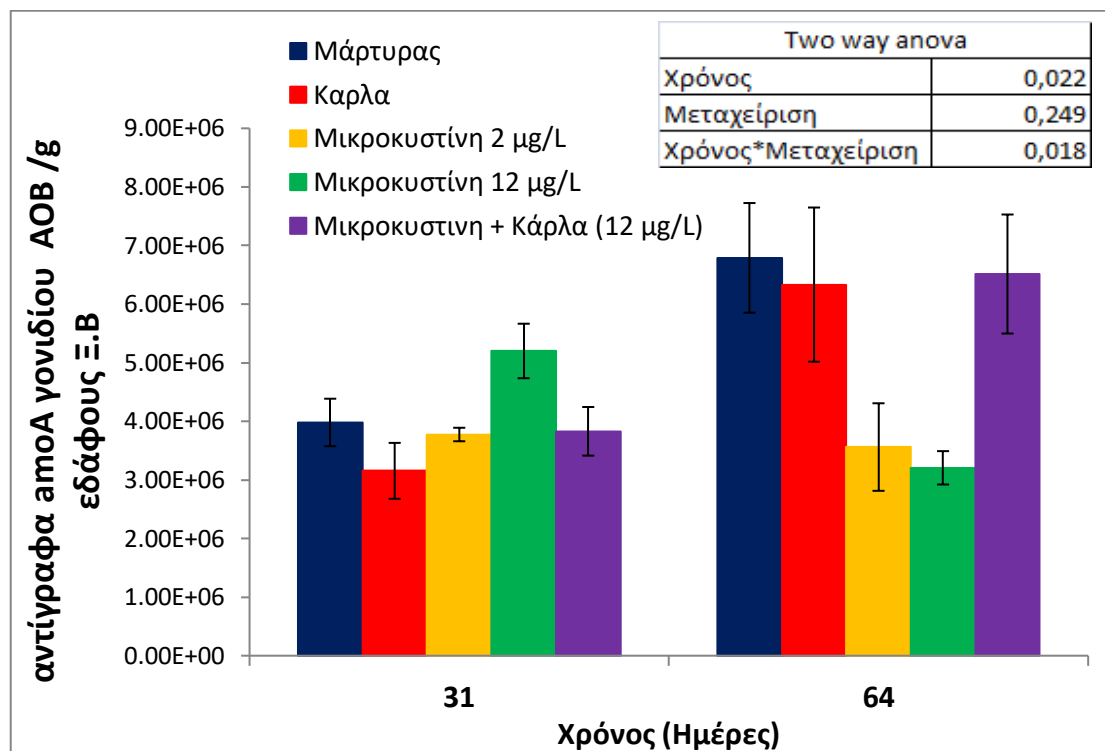


**Διάγραμμα 2.** Η αφθονία του γονιδιακού τύπου ITS στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.

### 3.2. Επιδράσεις στην νιτροδοποίηση

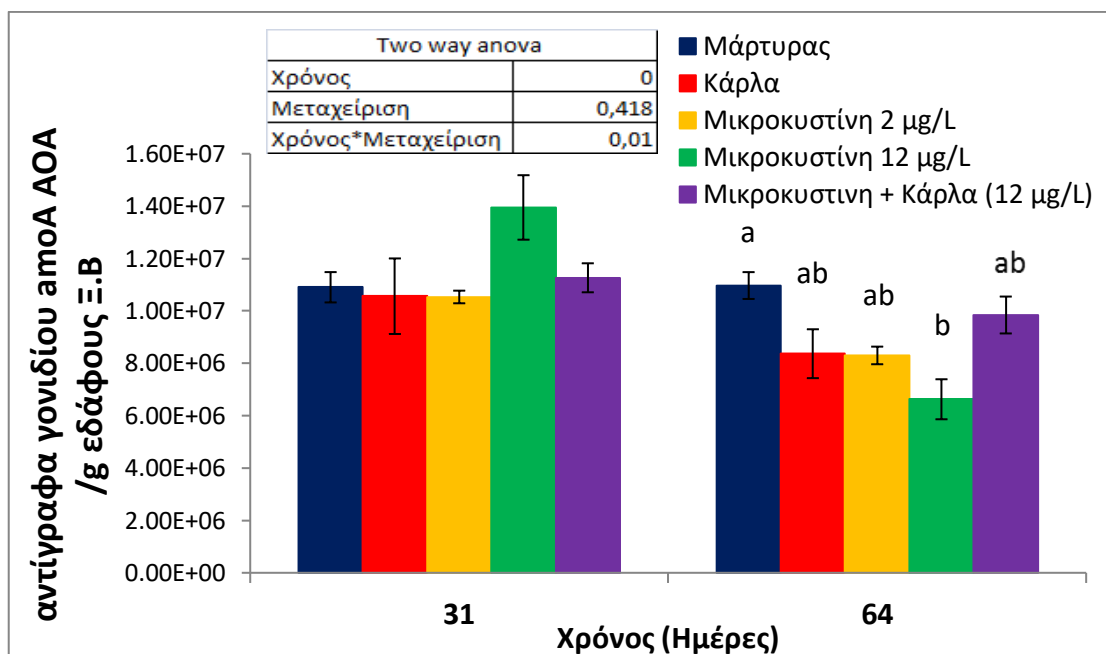
Στην συγκεκριμένη πειραματική ενότητα πραγματοποιήθηκαν εκτιμήσεις της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOB (νιτροδοποιητικών βακτηρίων) και των AOA (νιτροδοποιητικών αρχαίων) τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στα Διαγράμματα 3 και 4 αντίστοιχα. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς το χρόνο και παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταχειρίσεων και χρόνου. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3, ανεξάρτητα από το είδος της μεταχείρισης που εφαρμόστηκε, παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στην αφθονία των AOB από τις 31 στις 64 ημέρες ( $P < 0,05$ ). Επιπλέον καταγράφηκε μια μείωση της αφθονίας των AOB στις 64 ημέρες στα δείγματα που δέχτηκαν άρδευση με νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη σε δύο συγκεντρώσεις 2 και 12 μg/L χωρίς όμως οι

διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Συνολικά δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων άρδευσης των φυτών στην αφθονία των AOB.



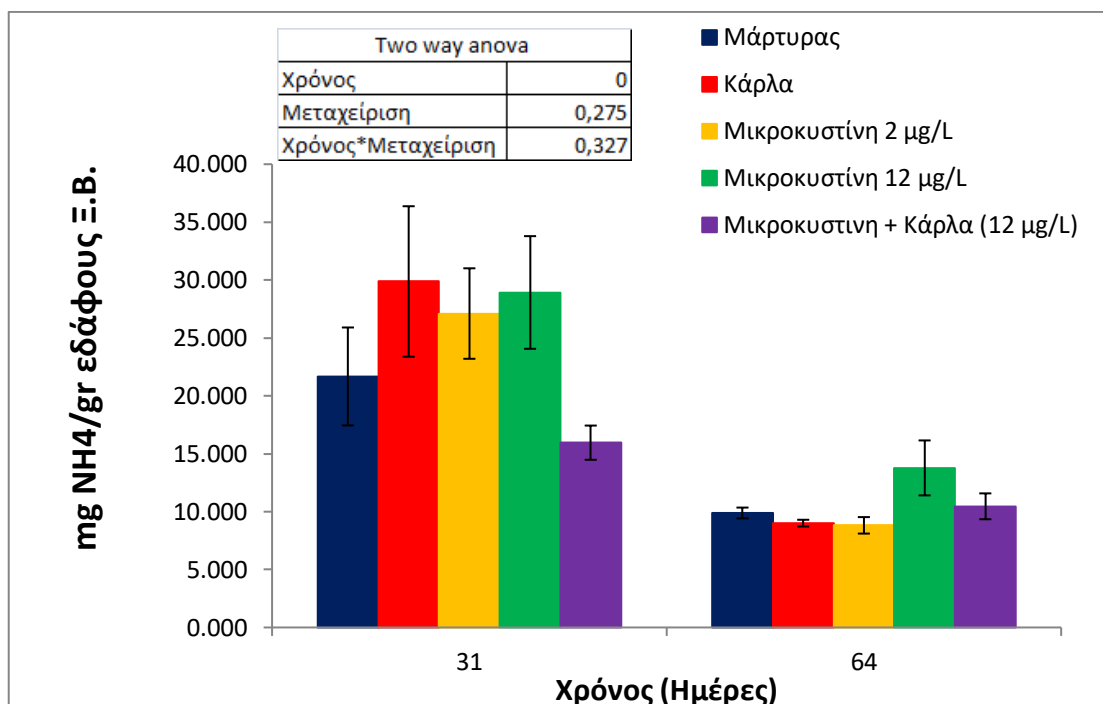
**Διάγραμμα 3.** Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.

Στην περίπτωση των AOA ο χρόνος ( $P < 0.05$ ), ως κύρια μεταβλητή, προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των AOA με αυξημένες τιμές να καταγράφονται στις 64 ημέρες ανεξάρτητα από την μεταχείριση. Αντίστοιχα δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις από τις διάφορες μεταχειρίσεις (ως κύριος παράγοντας). Τέλος καταγράφηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κύριων παραγόντων. Ειδικότερα στις 64 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην αφθονία των AOA στα φυτά που ποτίστηκαν με μικροκυστίνες συγκέντρωσης 12 μg/L σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν διέφεραν στατιστικώς μεταξύ τους αλλά και με τα φυτά του μάρτυρα (Διάγραμμα 4).



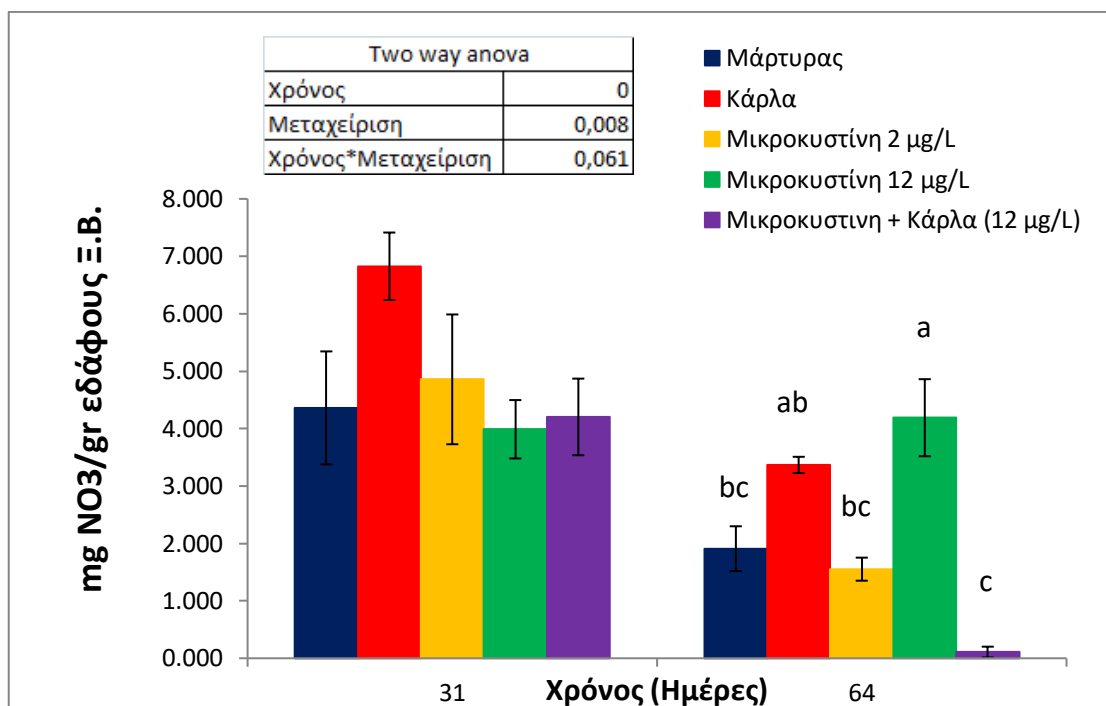
**Διάγραμμα 4.** Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των ΑΟΑ γονιδίου στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.

Περνώντας στην μελέτη της λειτουργίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών και νιτρικών στη ριζόσφαιρα των φυτών *Raphanus sativus*. Στην περίπτωση των αμμωνιακών ο μόνος παράγοντας που φάνηκε να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά ήταν ο χρόνος ( $P < 0,05$ ). Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5 η συγκέντρωση των αμμωνιακών σε όλες τις μεταχειρίσεις του πειράματος μειώθηκε στις 64 ημέρες σε σχέση με στις 31 ημέρες, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ φυτών που ποτίστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών και των φυτών του μάρτυρα και για τις δυο χρονικές στιγμές του πειράματος.



**Διάγραμμα 5.** Οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 µg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 µg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 µg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.

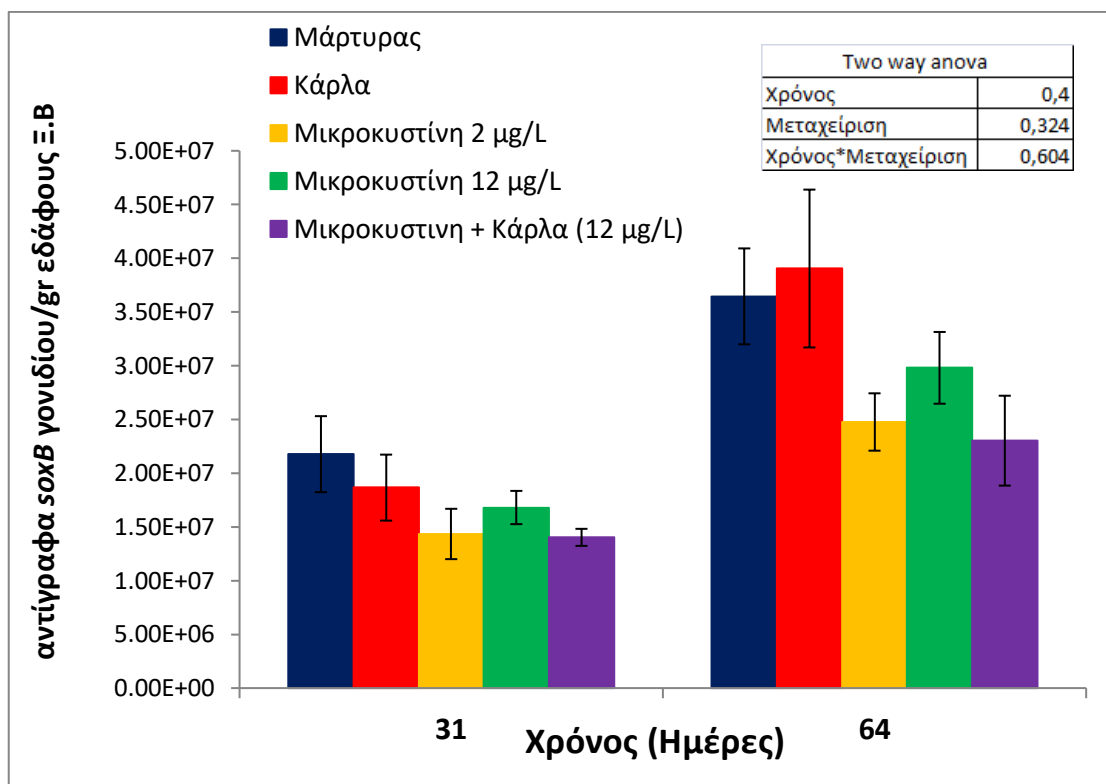
Τέλος, τόσο ο χρόνος όσο και οι διάφορες μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές (ως κύριες μεταβλητές) στις συγκεντρώσεις των νιτρικών στην ριζόσφαιρα των φυτών (Διάγραμμα 6). Ανεξάρτητα από τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν καταγράφηκε μια σημαντική μείωση των επιπέδων νιτρικών στη ριζόσφαιρα στις 64 ημέρες σε σχέση με τις 31 ημέρες. Αξιόλογο είναι να αναφερθεί ότι στις 64 ημέρες παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν άρδευση με νερό εμπλουτισμένο με μικροκυστίνες συγκέντρωσης 12 µg/L σε σχέση με όλες τις άλλες μεταχειρίσεις πλην των δειγμάτων που δέχτηκαν άρδευση με νερό της λίμνης Κάρλας. Αντίθετα στην ίδια ημέρα παρατηρήθηκε μια σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση νιτρικών στα δείγματα που αρδεύτηκαν με νερό της λίμνης Κάρλας στα οποία είχε προστεθεί μικροκυστίνη σε επίπεδο 12 µg/L σε σχέση με τις δύο παραπάνω μεταχειρίσεις.



**Διάγραμμα 6.** Οι συγκεντρώσεις νιτρικών στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκουστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκουστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκουστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.

### 3.3. Επιδράσεις στην αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων

Σε αυτήν την πειραματική ενότητα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων μέσω της ανίχνευσης του γονιδίου *soxB* στα δείγματα ριζόσφαιρας, με την βοήθεια ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων της qPCR, αυτό που διαπιστώθηκε είναι ότι δεν υπήρξε κάποια σημαντική αύξηση ή μείωση των αντιγράφων του γονιδίου *soxB* ως προς το χρόνο (Διάγραμμα 7) όπως επίσης δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστική σημαντική διαφορά στα φυτά που ποτίστηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις μικροκουστινών ως προς τα φυτά του μάρτυρα.



**Διάγραμμα 7.** Η αφθονία του *soxB* γονιδίου στα δείγματα ριζόσφαιρας που δέχτηκαν νερό βρύσης (μπλε ράβδος), νερό Κάρλας (κόκκινη ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/L (πορτοκαλί ράβδος), νερό βρύσης εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (πράσινη ράβδος) και τέλος νερό Κάρλας εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη τελικής συγκέντρωσης 12 μg/L (μωβ ράβδος). Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± η τυπική απόκλιση.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των μικροκυστινών, αυτούσιων ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες καταπόνησης που περιέχονται στο νερό της λίμνης Κάρλας, στην αφθονία βακτηρίων, μυκήτων και στην αφθονία και λειτουργία σημαντικών λειτουργικών μικροβιακών ομάδων που εμπλέκονται στον κύκλο του N και του S. Η υπόθεση της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ότι οι μικροκυστίνες σε ρεαλιστικές περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Σε δεύτερο επίπεδο μελετήσαμε την υπόθεση ότι οι αρνητικές επιδράσεις θα μεγιστοποιούνται παρουσία και άλλων παραγόντων καταπόνησης (π.χ. υψηλή αλατότητα, μέταλλα κτλ.) που περιέχονται στον νερό της λίμνης Κάρλας (Chamoglou et al, 2014; Gialis & Laspidou, 2014; Sidiropoulos et al, 2017; Skordas et al, 2015). Έτσι μελετήσαμε την επίδραση διαφόρων επιπέδων μικροκυστίνης σε νερό βρύσης ή νερό Κάρλας στη μικροβιακή κοινότητα στη ριζόσφαιρα φυτών *Raphanus sativus*.

Γενικότερα η άρδευση των φυτών *Raphanus sativus* με νερό βρύσης ή νερό της λίμνης Κάρλας που περιείχε μικροκυστίνες σε δύο ρεαλιστικά επίπεδα συγκέντρωσης δεν φαίνεται να προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία βακτηρίων και μυκήτων στην ριζόσφαιρα των φυτών. Προηγούμενες μελέτες από του Cao et al., (2017) σε έδαφος χωρίς παρουσία φυτού έδειξαν ότι η εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων μικροκυστινών (υψηλότερες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη) προκάλεσαν αρνητικές επιδράσεις μόνο στην ενζυμική δραστηριότητα των φαινολοξειδασών (στην υψηλότερη δόση των 1000 μg) ενώ αντίθετα οδήγησε σε αύξηση της μικροβιακής αναπνοής. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε παρόμοιες μελέτες χωρίς παρουσία φυτού όπου οι Corbel et al., (2015a) δεν παρατήρησαν αρνητικές επιδράσεις στην δραστηριότητα μικροβιακών ενζύμων που εμπλέκονται στους κύκλους C, P, S. Οι ίδιοι ερευνητές σε αντίστοιχες μελέτες παρουσία διαφορετικών φυτών παρατήρησαν ότι η άρδευση των φυτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις μίγματος 14 διαφορετικών μικροκυστινών δεν οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην αφθονία βακτηρίων και αρχαίων, σε συμφωνία με την δική μας μελέτη, καθώς και στην δραστηριότητα μικροβιακών ενζύμων που συμμετέχουν στους κύκλους C, P, S (Corbel et al., 2015b). Πιο πρόσφατες μελέτες από τους Khalloufi et al., (2016) έδειξαν ότι η εφαρμογή συγκεντρώσεων μικροκυστινών 100 μg/L μέσω άρδευσης σε φυτά *Medicago sativa* οδήγησαν σε σημαντικές μεταβολές στην ποικιλότητα

συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων. Ειδικότερα η εφαρμογή των μικροκυστινών οδήγησε σε σημαντική μείωση της αφθονίας και ποικιλότητας των Actinobacteria, Gemmatimonadetes, δ- και γ-proteobacteria ενώ αντιθέτως ευνόησε βακτήρια Clostridium βακτήρια που ανήκουν στα β-proteobacteria. Μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος θα μελετήσουν την απόκριση της μικροβιακής κοινότητας (βακτήρια, αρχαία και μύκητες) στην έκθεση στις μικροκυστίνες.

Περαιτέρω μελετήσαμε τις επιδράσεις των μικροκυστινών με ή χωρίς νερό Κάρλας στην αφθονία σημαντικών λειτουργικών μικροβιακών ομάδων όπως είναι τα AOA και AOB καθώς και τα SOB ενώ παράλληλα μελετήσαμε και πιθανές επιδράσεις στην λειτουργία των AOA/AOB μέσω προσδιορισμού των συγκεντρώσεων νιτρικών και αμμωνιακών στην ριζόσφαιρα των φυτών. Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί αναφέρονται ως ιδιαίτερα ως ιδιαίτερα σημαντικοί για το κύκλο του N στο έδαφος καθώς ελέγχουν το ρυθμο-καθοριστικό βήμα της διαδικασίας της νιτροποίησης, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα (Kowalchuck και Stephen 2001, Leininger et al., 2006). Μάλιστα προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει την χρήση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών ως μικροβιακούς δείκτες για την αξιολόγηση της τοξικότητας οργανικών ρυπων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Wessen and Hallin, 2011; Karpouzas et al., 2016). Γενικότερα δεν καταγράφηκαν σημαντικές επιδράσεις των διαφόρων μεταχειρίσεων με μικροκυστίνες και νερό από την λίμνη Κάρλα στην αφθονία των AOB ενώ παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της αφθονίας των AOA στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή νερού βρύσης εμπλουτισμένου με μικροκυστίνες σε επίπεδα 12 μg/L και συλλέχθηκαν 64 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα που μπορεί να οφείλονται στην χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών αλλά και στην παρουσία ή όχι φυτών στο πείραμα. Έτσι οι Corbel et al, (2015a) αρχικά παρατήρησαν ότι η εφαρμογή μικροκυστινών στο έδαφος, απουσία φυτών σε συγκεντρώσεις 0.005 to 0.1 mg equivalent MC-LR L<sup>-1</sup>, οδήγησαν σε αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης χωρίς όμως να συνοδεύεται από αύξηση της αφθονίας των AOB και AOA σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη. Ακολούθως οι ίδιοι ερευνητές σε μελέτη παρουσία φυτών (Corbel et al, 2015b) παρατήρησαν σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην αφθονία των AOB (τα AOA δεν επηρεάστηκαν) καθώς και στην δυνητική νιτροποίηση. Οι Cao et al., (2017) αναφέρουν παρόμοια αποτελέσματα όταν εφάρμοσαν >100 μg equivalent MC-LR σε δύο εδάφη απουσία φυτού. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στην

επίδραση των μικροκυστινών στην έκφραση των γονιδίων *amoA* δίνοντας έτσι μια πιο ρεαλιστική εικόνα των επιδράσεων σε επίπεδο λειτουργίας.

Παράλληλα μελετήσαμε και τις συγκεντρώσεις των νιτρικών και αμμωνιακών στην ριζόσφαιρα των φυτών μετά από εφαρμογή ποτισμάτων με νερό από την λίμνη Κάρλα. Γενικότερα καταγράφηκε μια αυξητική τάση στις συγκεντρώσεις των νιτρικών όταν πραγματοποιούνται ποτίσματα με νερό βρύσης ή οποιοδήποτε νερό εμπλουτισμένο σε μικροκυστίνες στις 31 ημέρες. Σύμφωνα με την ανάλυση που παρουσιάστηκε παραπάνω με βάση τα αποτελέσματα με qPCR, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να αποδοθούν στην σχετική αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας (βακτηρίων και αρχαίων). Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως συνέπεια του ευτροφισμού της λίμνης Κάρλας (Chamoglou et al, 2014; Gialis & Laspidou, 2014; Sidirooulos et al, 2017; Skordas et al, 2015). Με άλλα λόγια ότι η αύξηση των νιτρικών είναι συνέπεια του εμπλουτισμού του νερού της λίμνης Κάρλας με νιτρικά. Σε μια τέτοια περίπτωση όμως, θα περίμενε κάποιος αντίστοιχη αύξηση και στην περίπτωση νερού Κάρλας εμπλουτισμένου με μικροκυστίνες γεγονός που δεν επιβεβαιώνεται από αυτό το πείραμα. Αντίστοιχη αύξηση των νιτρικών είναι εμφανής και στις 64 ημέρες τόσο σε ποτίσματα με νερό από την λίμνη Κάρλα όσο και σε ποτίσματα με νερό εμπλουτισμένο Με μεγάλη ποσότητα μικροκυστινών (12 µg/L). Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι συμβατά με αντίστοιχη αύξηση αφθονίας νιτροδοποιητικών βακτηρίων ή αρχαίων. Αντίθετα δεν καταγράφηκε σημαντική επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων στην συγκέντρωση των αμμωνιακών στα ριζόσφαιρα των φυτών.

Τέλος μελετήσαμε και την επίδραση των μικροκυστινών είτε αυτόνομα είτε σε συνδυασμό με νερό της λίμνης Κάρλας στην αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει την χρήση των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων ως βιοδείκτες τοξικότητας ουσιών που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (Van Ginkel et al., 2010) ή μετάλλων (Oh et al., 2010). Νεότερες μελέτες από τους Karas et al., (2018) έδειξαν ότι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων όπως chlorpyrifos, isoproturon και tebuconazole στο έδαφος οδήγησαν σε μείωση της αφθονίας των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη δεν καταγράφηκαν σημαντικές μεταβολές στην αφθονία των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων στη ριζόσφαιρα των φυτών.

### *Συμπεράσματα-Μελλοντικές προοπτικές*

Συνολικά από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δεν προέκυψε σημαντική και συστηματική επίδραση των μικροκυστινών, στα επίπεδα που δοκιμάστηκαν και αντιστοιχούν σε επίπεδα που έχουν ανιχνευθεί σε προηγούμενες μετρήσεις στην λίμνη Κάρλα, στην αφθονία και λειτουργία μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες στο έδαφος. Με δεδομένο ότι η επίδραση των μικροκυστινών φαίνεται να είναι εξαρτώμενη από την δόση (Cao et al, 2017; Corbel et al, 2015a; Corbel et al, 2015b), ίσως να έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να αποσαφηνιστεί η επίδραση των μικροκυστινών και σε νερό βρύσης εμπλουτισμένο με άλλες (διαφορετικές από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία) συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Σε επόμενο στάδιο θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον εκτός από ποσοτική ανάλυση (που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία) να πραγματοποιηθεί και ποιοτική ανάλυση των ταξινομικών ομάδων των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας με την χρήση αλληλούχησης επόμενης γενιάς.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adair, K.L., Schwartz, E. (2008) Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA. *Microbiol Ecol* **56**: 420-426
- Anandham R, Gandhi PI, SenthilKumar M, Sridar R, Nalayini P, Sa T-M (2011) Sulfur-oxidizing bacteria: a novel bioinoculant for sulfur nutrition and crop production. In *Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management*, pp 81-107. Springer
- Antoun H (2012) Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering* **46**: 62-67
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998) Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). In *Molecular microbial ecology of the soil*, pp 57-67. Springer
- Auchtung, T.A., Shyndriayeva, G., Cavanaugh, C.M. (2011) 16S rRNA phylogenetic analysis and quantification of Korarchaeota indigenous to the hot springs of Kamchatka, Russia. *Extremophiles* **15**: 105–116
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters* **32**: 1559-1570
- Ballot A, Fastner J, Wiedner C (2010) Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Applied and environmental microbiology* **76**: 1173-1180
- Berger B, Wiesner M, Brock AK, Schreiner M, Ruppel S (2015) *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agronomy for sustainable development* **35**: 1521-1528
- Berillis P, Papadimitriou T, Petridou E, Konstantinos K, Ifigenia K (2014) Brain and liver histopathological examination of *Carassius gibelio* from a newly reconstructed lake with toxic cyanobacteria. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **14**: 213-219
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay S (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 199-209
- Bláha L, Babica P, Maršálek B (2009) Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology* **2**: 36-41
- Blahova L, Oravec M, Marsalek B, Sejnohova L, Simek Z, Blaha L (2009) The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon* **53**: 519-524

- Brient L, Lengronne M, Bertrand E, Rolland D, Sipel A, Steinmann D, Baudin I, Legeas M, Le Rouzic B, Bormans M (2008) A phycoerythrin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *Journal of environmental monitoring : JEM* **10**: 248-255
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Van Themaat EVL, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology* **64**: 807-838
- Campos A, Vasconcelos V (2010) Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International journal of molecular sciences* **11**: 268-287
- Cao Q, Rediske RR, Yao L, Xie L (2018a) Effect of microcystins on root growth, oxidative response, and exudation of rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and environmental safety* **149**: 143-149
- Cao Q, Steinman AD, Su X, Xie L (2017) Effects of microcystins contamination on soil enzyme activities and microbial community in two typical lakeside soils. *Environmental pollution* **231**: 134-142
- Cao Q, Steinman AD, Wan X, Xie L (2018b) Combined toxicity of microcystin-LR and copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere* **206**: 474-482
- Cao Q, Steinman AD, Yao L, Xie L (2018c) Effects of light, microorganisms, farming chemicals and water content on the degradation of microcystin-LR in agricultural soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **156**: 141-147
- Cao W-H, Liu J, He X-J, Mu R-L, Zhou H-L, Chen S-Y, Zhang J-S (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant physiology* **143**: 707-719
- Carmichael WW, Boyer GL (2016) Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae* **54**: 194-212
- Cesco S, Mimmo T, Tonon G, Tomasi N, Pinton R, Terzano R, Neumann G, Weisskopf L, Renella G, Landi L (2012) Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biology and Fertility of Soils* **48**: 123-149
- Chamoglou M, Papadimitriou T, Kagalou I (2014) Key-descriptors for the functioning of a Mediterranean reservoir: the case of the New lake Karla-Greece. *Environmental Processes* **1**: 127-135
- Chaudhary S, Tanvi NV, Goyal S (2018) Response of sulphur oxidizing bacterial inoculation on growth and yield parameters of mustard (*Brassica juncea* L.). *IJCS* **6**: 2452-2457
- Chen J, Han FX, Wang F, Zhang H, Shi Z (2012a) Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **76**: 193-199
- Chen J, Zhang H-Q, Hu L-B, Shi Z-Q (2013) Microcystin-LR-induced phytotoxicity in rice crown root is associated with the cross-talk between auxin and nitric oxide. *Chemosphere* **93**: 283-293
- Chen, X.-P., Zhu, Y.-G., Xia, Y., Shen, J.-P., He J.-Z. (2008) Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology* **10**: 1978-1987

- Chen J, Zhong YM, Zhang HQ, Shi ZQ (2012b) Nitrate Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Microcystin-LR-Induced Oxidative Stress in *Brassica rapa*. *Water, Air, & Soil Pollution* **223**: 4141-4152
- Chen L, Chen J, Zhang X, Xie P (2016) A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of hazardous materials* **301**: 381-399
- Chen W, Song L, Gan N, Li L (2006) Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environmental Pollution* **144**: 752-758
- Cheung MY, Liang S, Lee J (2013) Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: A review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *Journal of Microbiology* **51**: 1-10
- Christophoridis C, Argyropoulos I, Mpampouris V, Kaloudis T, Triantis T, Hiskia A (2017) Analysis of multi-class cyanotoxins in fish tissue. Application to fish from Greek lakes. In *15th International Conference on Environmental Science and Technology*
- Corbel S, Bouaïcha N, Martin-Laurent F, Crouzet O, Mougin C (2015a) Soil irrigation with toxic cyanobacterial microcystins increases soil nitrification potential. *Environmental chemistry letters* **13**: 459-463
- Corbel S, Bouaïcha N, Mougin C (2014a) Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. *Environmental Chemistry Letters* **12**: 535-541
- Corbel S, Mougin C, Bouaïcha N (2014b) Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* **96**: 1-15
- Corbel S, Mougin C, Martin-Laurent F, Crouzet O, Bru D, Nélieu S, Bouaïcha N (2015b) Evaluation of phytotoxicity and ecotoxicity potentials of a cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil–plant system. *Chemosphere* **128**: 332-340
- Dias E, Andrade M, Alverca E, Pereira P, Batoréu M, Jordan P, Silva MJ (2009) Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon* **53**: 487-495
- Dolman AM, Rucker J, Pick FR, Fastner J, Rohrlack T, Mischke U, Wiedner C (2012) Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* **7**: e38757
- El Khalloufi F, El Ghazali I, Saqrane S, Oufdou K, Vasconcelos V, Oudra B (2012) Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol Environ Saf* **79**: 199-205
- El Khalloufi F, Oufdou K, Bertrand M, Lahrouni M, Oudra B, Ortet P, Barakat M, Heulin T, Achouak W (2016) Microbiote shift in the *Medicago sativa* rhizosphere in response to cyanotoxins extract exposure. *Science of the Total Environment* **539**: 135-142

- El Khalloufi F, Oufdou K, Lahrouni M, El Ghazali I, Saqrane S, Vasconcelos V, Oudra B (2011) Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*–*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**: 431-438
- El Khalloufi F, Oufdou K, Lahrouni M, Faghire M, Peix A, Ramírez-Bahena MH, Vasconcelos V, Oudra B (2013) Physiological and antioxidant responses of *Medicago sativa*-rhizobia symbiosis to cyanobacterial toxins (Microcystins) exposure. *Toxicon* **76**: 167-177
- Erguder, T.H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M., Verstraete, W. (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 855-869
- Fan F, Zhang F, Lu Y (2011) Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 46-54
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S (2007) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7059-7066
- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, Marcos-García M, Martínez-Hidalgo P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez MdE, García-Fraile P, Rivas R (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **176**: 876-882
- Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil* **321**: 35-59
- Freitas M, Azevedo J, Pinto E, Neves J, Campos A, Vasconcelos V (2015a) Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* **116**: 59-67
- Freitas M, Campos A, Azevedo J, Barreiro A, Planchon S, Renaut J, Vasconcelos V (2015b) Lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf-proteome profiles after exposure to cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture: a concentration-dependent response. *Phytochemistry* **110**: 91-103
- Gan N, Xiao Y, Zhu L, Wu Z, Liu J, Hu C, Song L (2012) The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental microbiology* **14**: 730-742
- Gao Y, Yang Y, Ling W, Kong H, Zhu X (2011) Gradient distribution of root exudates and polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil. *Soil Science Society of America Journal* **75**: 1694-1703
- Garg N (2009) Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling: a review. In *Sustainable Agriculture*, pp 519-531. Springer
- Geisseler D, Horwath WR (2008) Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 3040-3048



- Genitsaris S, Kormas KA, Moustaka-Gouni M (2009) Microscopic eukaryotes living in a dying lake (Lake Koronia, Greece). *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 75-83
- Gialis S, Laspidou C (2014) Lake Karla and the contradictory character of Greek environmental policies: a brief historical overview. In *Proceedings to the IWA regional symposium on water. Wastewater and Environment: Traditions and Culture, Patras*
- Gkelis S, Lanaras T, Sivonen K (2015) Cyanobacterial Toxic and Bioactive Peptides in Freshwater Bodies of Greece: Concentrations, Occurrence Patterns, and Implications for Human Health. *Mar Drugs* **13**: 6319-6335
- Gkelis S, Panou M, Chronis I, Zervou S-K, Christophoridis C, Manolidi K, Ntislidou C, Triantis TM, Kaloudis T, Hiskia A (2017) Monitoring a newly re-born patient: water quality and cyanotoxin occurrence in a reconstructed shallow Mediterranean lake. *Advances in Oceanography and Limnology*
- Gkelis S, Zaoutsos N (2014) Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach. *Toxicon* **78**: 1-9
- Graham JL, Loftin KA, Meyer MT, Ziegler AC (2010) Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the Midwestern United States. *Environmental science & technology* **44**: 7361-7368
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 2134–2139
- Hatzenpichler, R. (2012) Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7501-7510
- Hayat R, Ali S, Ijaz SS, Chatha TH, Siddique MT (2008a) Estimation of N<sub>2</sub>-fixation of mung bean and mash bean through xylem uriede technique under rainfed conditions. *Pak J Bot* **40**: 723-734
- Hayat R, Ali S, Siddique MT, Chatha TH (2008b) Biological nitrogen fixation of summer legumes and their residual effects on subsequent rainfed wheat yield. *Pak J Bot* **40**: 711-722
- Herrera Paredes S, Lebeis SL (2016) Giving back to the community: microbial mechanisms of plant–soil interactions. *Functional Ecology* **30**: 1043-1052
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and soil* **311**: 1-18
- Herrmann M, Saunders AM, Schramm A (2008) Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3279-3283
- Hirsch PR, Mauchline TH (2015) The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. In *Advances in applied microbiology* Vol. 93, pp 45-71. Elsevier

- Hollocher, T., Tate, M., Nicholas, D. (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive 18O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J Biol Chem* **256**: 10834-10836
- Hollocher, T.C., Kumar, S., Nicholas, D. J. (1982) Respiration-dependent proton translocation in *Nitrosomonas europaea* and its apparent absence in *Nitrobacter agilis* during inorganic oxidations. *J Bacteriol* **149**: 1013-1020
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 59-67
- Iqbal MA, Khalid M, Shahzad SM, Ahmad M, Soleman N, Akhtar N (2012) Integrated use of *Rhizobium leguminosarum*, plant growth promoting rhizobacteria and enriched compost for improving growth, nodulation and yield of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Chilean Journal of Agricultural Research* **72**: 104
- Jia Y, Du J, Song F, Zhao G, Tian X (2012) A fungus capable of degrading microcystin-LR in the algal culture of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Applied biochemistry and biotechnology* **166**: 987-996
- Jnawali A, Ojha R, Marahatta S (2015) Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A Review. *Adv Plants Agric Res* **2**: 1-5
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and soil* **321**: 5-33
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, K.-P., Imhoff, J.F. (2010) Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidising microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol Biotechnol* **85**: 425-440
- Kagalou I, Papadimitriou T, Bacopoulos V, Leonardos I (2008) Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental monitoring and assessment* **137**: 185-195
- Kaloudis T, Meriluoto J, Blaha L (2017) Foreword to the Themed Issue “Cyanobacteria”. *Advances in Oceanography and Limnology*
- Karpouzias, 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. *Environ. ci. Pollut. Res.* **23**, 18947–18951
- Karas P.A., Baguelin C., Pertile G., Papadopoulou E.S., Nikolaki S., Storck V., Ferrari F., Trevisan M., Ferrarini A., Fornasier F., Vasileiadis S., Tsiamis G., Martin-Laurent F., Karpouzias D.G., (2018) Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of the Total Environment* **637-638**: 636-646

- Kellmann R, Ploux O, Neilan BA (2013) Neurotoxic alkaloids from cyanobacteria. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*: 39-83
- Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schloter M (2011) Influence of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* **84**: 182-186
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543–546
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbiology ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**: 485–529
- Koper, T.E., El-Sheikh, A.F., Norton, J.M., Klotz, M.G. (2004) Urease-encoding genes in ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2342–2348
- Kormas KA, Lympelopoulou DS (2013) Cyanobacterial toxin degrading bacteria: who are they? *BioMed research international* **2013**
- Kuang X, Gu J-D, Tie B, Yao B, Shao J (2016) Interactive effects of cadmium and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on the growth, antioxidative responses and accumulation of cadmium and microcystins in rice seedlings. *Ecotoxicology* **25**: 1588-1599
- Kumar, S., Nicholas, D.J.D.(1982) A protonmotive force-dependent adenosine-5" triphosphate synthesis in spheroplasts of *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* **14**: 21-25
- Lahrouni M, Oufdou K, El Khalloufi F, Baz M, Lafuente A, Dary M, Pajuelo E, Oudra B (2013) Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L.–*Rhizobium* symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 5405-5415
- Lahrouni M, Oufdou K, El Khalloufi F, Benidire L, Albert S, Göttfert M, Caviedes MA, Rodriguez-Llorente ID, Oudra B, Pajuelo E (2016) Microcystin-tolerant *Rhizobium* protects plants and improves nitrogen assimilation in *Vicia faba* irrigated with microcystin-containing waters. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 10037-10049
- Lahrouni M, Oufdou K, Faghire M, Peix A, El Khalloufi F, Vasconcelos V, Oudra B (2011) Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology* **21**: 681-687
- Lapidou C, Kofinas D, Mellios N, Latinopoulos D, Papadimitriou T (2017) Investigation of factors affecting the trophic state of a shallow Mediterranean reconstructed lake. *Ecological Engineering* **103**: 154-163
- Lee J, Lee S, Jiang X (2017a) Cyanobacterial toxins in freshwater and food: important sources of exposure to humans. *Annual review of food science and technology* **8**: 281-304

Lee S, Jiang X, Manubolu M, Riedl K, Ludsin SA, Martin JF, Lee J (2017b) Fresh produce and their soils accumulate cyanotoxins from irrigation water: Implications for public health and food security. *Food research international (Ottawa, Ont)* **102**: 234-245

Levizou E, Stataris G, Papadimitriou T, Laspidou CS, Kormas KA (2017) Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicology and environmental safety* **143**: 193-200

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., (2006). Archaea predominate among ammoniaoxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806–809

Liang C, Wang W (2014) Response and recovery of rice (*Oryza sativa*) seedlings to irrigation with microcystin-contaminated water. *Environmental Earth Sciences* **73**: 4573-4580

Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q (2009) Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes and environments*: 1204160379-1204160379

Machado J, Azevedo J, Freitas M, Pinto E, Almeida A, Vasconcelos V, Campos A (2017a) Analysis of the use of microcystin-contaminated water in the growth and nutritional quality of the root-vegetable, *Daucus carota*. *Environmental Science and Pollution Research* **24**: 752-764

Machado J, Campos A, Vasconcelos V, Freitas M (2017b) Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environmental research* **153**: 191-204

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2005) Βιολογία των Μικροοργανισμών, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Manage PM, Edwards C, Singh BK, Lawton LA (2009a) Isolation and Identification of Novel Microcystin-Degrading Bacteria. *Applied and environmental microbiology* **75**: 6924-6928

Manage PM, Edwards C, Singh BK, Lawton LA (2009b) Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6924-6928

Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, Vigani G, Mapelli F, Borin S, Abou-Hadid AF, El-Behairy UA, Sorlini C, Cherif A (2012) A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS one* **7**: e48479

Martins JC, Vasconcelos VM (2009) Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **12**: 65-82

Máthé C, M-Hamvas M, Vasas G (2013) Microcystin-LR and Cylindrospermopsin Induced Alterations in Chromatin Organization of Plant Cells. *Marine Drugs* **11**: 3689-3717

Mellios N, Papadimitriou T, Laspidou C (2016) Predictive modeling of microcystin concentrations in a hypertrophic lake by means of Adaptive Neuro Fuzzy Inference System (ANFIS). *European Water* **55**: 91-103

- Meng G, Sun Y, Fu W, Guo Z, Xu L (2011) Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells. *Toxicology* **290**: 218-229
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O (2013) State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international* **59**: 303-327
- Minz D, Ofek M, Hadar Y (2013) Plant rhizosphere microbial communities. *The prokaryotes: prokaryotic communities and ecophysiology*: 56-84
- Mitsoura A, Kagalou I, Papaioannou N, Berillis P, Mente E, Papadimitriou T (2013) The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. *International Aquatic Research* **5**: 8
- Mitsoura A, Papadimitriou T, Berillis P, Papaioanou N, Kormas K, Kagalou I (2012) HISTOPATHOLOGICAL OBSERVATIONS IN THE FISH SPECIES *Cyprinus carpio* ASSOCIATED WITH A CYANOBACTERIAL RICH LAKE.
- Mohamed H, Gomaa E (2012) Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica* **50**: 263-272
- Moustafa A, Loram JE, Hackett JD, Anderson DM, Plumley FG, Bhattacharya D (2009) Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS One* **4**: e5758
- Muyzer G, Stams AJ (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology* **6**: 441
- Nelson DM, Cann IK, Mackie RI (2010) Response of archaeal communities in the rhizosphere of maize and soybean to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *PLoS One* **5**: e15897
- Ngoma L, Babalola OO, Ahmad F (2012) Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scientific Research and Essays* **7**: 4003-4013
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* **10**:2966–2978
- Nicol, G.W., Schleper, C. (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol* **14**: 207–212
- Nikouli E, Kormas KA, Berillis P, Karayanni H, Moustaka-Gouni M (2013) Harmful and parasitic unicellular eukaryotes persist in a shallow lake under reconstruction (L. Karla, Greece). *Hydrobiologia* **718**: 73-83
- Oh, S.E., Hassan, S.H.A., Van Ginkel, S.W., 2010. A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Sensors Actuators B Chem.*  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.01.052>

- Oikonomou A, Katsiapi M, Karayanni H, Moustaka-Gouni M, Kormas KA (2012) Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal* **2012**
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics* **45**: 119-144
- Paerl H (2014) Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. *Life* **4**: 988-1012
- Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the total environment* **409**: 1739-1745
- Paerl HW, Otten TG (2013) Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology* **65**: 995-1010
- Paerl HW, Paul VJ (2012) Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* **46**: 1349-1363
- Papadimitriou T, Kagalou I, Bacopoulos V, Leonardos ID (2010) Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. *Environmental toxicology* **25**: 418-427
- Papadimitriou T, Kagalou I, Leonardos ID (2012a) Seasonally accumulation of microcystins in the various tissues of an endemic and protected fish species (*Rutilus panosi*) with different sizes. *CLEAN–Soil, Air, Water* **40**: 402-407
- Papadimitriou T, Kagalou I, Stalikas C, Pilidis G, Leonardos ID (2012b) Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology* **21**: 1155-1166
- Papadimitriou T, Katsiapi M, Kormas KA, Moustaka-Gouni M, Kagalou I (2013) Artificially-born “killer” lake: Phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Science of the total environment* **452**: 116-124
- Papadimitriou T, Katsiapi M, Vlachopoulos K, Christopoulos A, Laspidou C, Moustaka-Gouni M, Kormas K (2018) Cyanotoxins as the “common suspects” for the Dalmatian pelican (*Pelecanus crispus*) deaths in a Mediterranean reconstructed reservoir. *Environmental pollution* **234**: 779-787
- Papadimitriou T, Kormas K, Dionysiou DD, Laspidou C (2016) Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments for the degradation of cyanobacteria and microcystins in a shallow hypertrophic reservoir. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 21523-21535
- Parveen G, Ehteshamul-Haque S, Sultana V, Ara J, Athar M (2008) Suppression of root pathogens of tomato by rhizobia, *Pseudomonas aeruginosa*, and mineral fertilizers. *International journal of vegetable science* **14**: 205-215

- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B (2010) On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine drugs* **8**: 1650-1680
- Pereira AL, Azevedo J, Vasconcelos V (2016) Assessment of uptake and phytotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins or cylindrospermopsin on parsley (*Petroselinum crispum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L). *Environmental Science and Pollution Research* **24**: 1999-2009
- Pereira S, Saker ML, Vale M, Vasconcelos VM (2009) Comparison of Sensitivity of Grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Water Contaminated with Microcystins. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **83**: 81-84
- Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2008) Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environ Microbiol* **10**: 2931- 2941
- Puddick J, Prinsep MR, Wood SA, Kaufononga SA, Cary SC, Hamilton DP (2014) High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar Drugs* **12**: 5372-5395
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P., Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5368–5382
- Rastogi RP, Sinha RP, Incharoensakdi A (2014) The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **13**: 215-249
- Reimann S, Hauschild R, Hildebrandt U, Sikora R (2008) Interrelationships between *Rhizobium etli* G12 and *Glomus intraradices* and multitrophic effects in the biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**: 108-113
- Romo S, Fernández F, Ouahid Y, Barón-Sola Á (2012) Assessment of microcystins in lake water and fish (*Mugilidae*, *Liza* sp.) in the largest Spanish coastal lake. *Environmental monitoring and assessment* **184**: 939-949
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2011) Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **93**: 56-66
- Rotthauwe J-H, Witzel K-P, Liesack W, The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations, *Appl Environ Microbiol* **63** (1997), 4704–4712
- Saikia SP, Bora D, Goswami A, Mudoi KD, Gogoi A (2012) A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 1085-1102

Santoro, A.E., Francis, C.A., De Sieyes, N.R., Boehm, A.B. (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol* **10**: 1068–1079

Saqrane S, Ghazali IE, Oudra B, Bouarab L, Vasconcelos V (2008) Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **43**: 443-451

Saqrane S, Ouahid Y, El Ghazali I, Oudra B, Bouarab L, del Campo FF (2009) Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: a laboratory experimental approach. *Toxicon* **53**: 786-796

Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., Arp, D.J. (1994) Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacterio* **176**: 504-510

Schatz D, Keren Y, Vardi A, Sukenik A, Carmeli S, Borner T, Dittmann E, Kaplan A (2007) Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental microbiology* **9**: 965-970

Seo WT, Lim WJ, Kim EJ, Yun HD, Lee YH, Cho KM (2010) Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **53**: 493-503

Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML (2008) Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental microbiology* **10**: 2476-2483

Sharma N, Kapoor G, Gautam N, Neopane B (2009) Characterization of a partially purified bacteriocin of *Bacillus* sp MTCC 43 isolated from Rhizosphere of radish (*Raphanus sativus*) & its application as a potential food biopreservative

Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zhang, J.-B., He, J.-Z. (2008) Abundance and composition of ammonia oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* **10**:1601–1611

Sidiropoulos P, Chamoglou M, Kagalou I (2017) Combining conflicting, economic, and environmental pressures: Evaluation of the restored Lake Karla (Thessaly-Greece). *Ecohydrology & Hydrobiology* **17**: 177-189

Skordas K, Kelepertzis E, Kosmidis D, Panagiotaki P, Vafidis D (2015) Assessment of nutrients and heavy metals in the surface sediments of the artificially lake water reservoir Karla, Thessaly, Greece. *Environmental Earth Sciences* **73**: 4483-4493

Tamás É, Mara G, Máthé I, Lasló É, György É, Lányi S (2012) Isolation, characterization and identification of nitrogen and phosphorus mobilizing bacteria. *Environmental Engineering and Management Journal* **11**: 675-680



- Testai E, Scardala S, Vichi S, Buratti FM, Funari E (2016) Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Critical reviews in toxicology* **46**: 385-419
- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M., Stah, D.A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* **10**: 810–818
- Tourna, M., Maclean, P., Condrón, L., O'Callaghan, M., Wakelin, S.A., 2014. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on soxB functional gene analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **88**: 538–549
- Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol* **10**: 1357–1364
- Trabelsi D, Ammar HB, Mengoni A, Mhamdi R (2012) Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **54**: 1-6
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* **7**: 1985–1995
- Udvardi M, Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual review of plant biology* **64**: 781-805
- Valentine AJ, Benedito VA, Kang Y (2018) Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. *Annual Plant Reviews online*: 207-248
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research* **51**: 7-60
- Van Ginkel, S.W., Hassan, S.H.A., Oh, S.-E. (2010) Detecting endocrine disrupting compounds in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Chemosphere* **81**, 294–297
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66–74
- Verhamme, D.T., Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2011) Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME Journal* **5**: 1067-1071
- Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Bhagyaraj R (2009) Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition- A Review. *World Journal of Agricultural Sciences* **5**: 270-278
- Wanek et al. 2009 (?), A Suite of Rapid Methods for Measuring Total Dissolved Nitrogen, Inorganic N and Microbial Nitrogen in Soils, *Soil Science Society of America Journal*. (Based on Miranda et al. 2001)

- Wang Z, Xiao B, Song L, Wu X, Zhang J, Wang C (2011) Effects of microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their mixture on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds and seedlings. *Ecotoxicology* **20**: 803-814
- Watt M, Hugenholtz P, White R, Vinall K (2006) Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environmental microbiology* **8**: 871-884
- Weinert N, Piceno Y, Ding G-C, Meincke R, Heuer H, Berg G, Schloter M, Andersen G, Smalla K (2011) PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS microbiology ecology* **75**: 497-506
- Welker M, von Dohren H (2006) Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* **30**: 530-563
- Wessen, E., Hallin, S. (2011) Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers—possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol. Indic.* **11**, 1696–1698
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4618–4625
- You, J., Das, A., Dolan, E. M., Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* **43**: 1801-1809
- Yu X, Liu X, Zhu T-H, Liu G-H, Mao C (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology* **50**: 112-117
- Zaidi A, Ahmad E, Khan MS, Saif S, Rizvi A (2015) Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. *Scientia Horticulturae* **193**: 231-239
- Zamioudis C, Pieterse CM (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 139-150
- Žegura B, Volčič M, Lah TT, Filipič M (2008) Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicon* **52**: 518-525
- Zhu J, Ren X, Liu H, Liang C (2018) Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth and fruit quality of *Cucumis sativus* L. and the health risk. *Agricultural Water Management* **204**: 91-99
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews* **32**: 723-735
- Zilliges Y, Kehr JC, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, Kaplan A, Borner T, Dittmann E (2011) The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of microcystis under oxidative stress conditions. *PLoS One* **6**: e17615