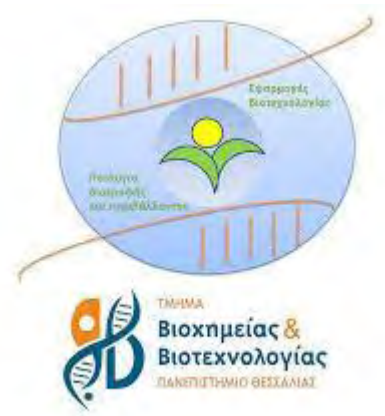




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΜΠΑΧΤΣΕΒΑΝΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της εκτός στόχου δράσης μικροβιακής τοξικότητας του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του ethoxyquin, quinone imine, και άλλων γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της εκτός
στόχου δράσης μικροβιακής τοξικότητας του κύριου
οξειδωτικού παραγώγου του ethoxyquin, quinone
imine, και άλλων γνωστών παρεμποδιστών
νιτροποίησης

In soil assessment of the efficacy and off-target
microbial toxicity of quinone imine and other
established nitrification inhibitors used in agriculture

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας
& Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσίκου Δανιέλα: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και
Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• Πρόλογος.....	5
• Συνοτομογραφίες.....	6
• Περίληψη.....	7
• Abstract.....	10
• Κεφάλαιο 1.....	12
1.1 Κύκλος αζώτου.....	12
1.2 Νιτροποίηση.....	14
1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης.....	14
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση.....	16
1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB).....	16
1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA).....	18
1.2.2.3 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB).....	20
1.2.2.4 Anammox.....	21
1.2.2.5 Comammox.....	22
1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης.....	23
1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ).....	24
1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση.....	29
1.5 Στόχοι.....	31
Κεφάλαιο 2.....	32
2. Πειραματικό μέρος.....	32
2.1 Προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους	32
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός	32
2.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία των Νιτροποιητικών μικροοργανισμών.....	34
2.3.1 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των NH_4^+ και NO_3^- στο έδαφος.....	34
2.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NH_4^+ στο έδαφος.....	34
2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NO_3^- στο έδαφος.....	34
2.3.4 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης.....	35
2.4 Εξαγωγή DNA από το έδαφος	36
2.5 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη αφθονία των Νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών.....	37
2.5.1 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB	37
2.5.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA.....	38
2.6 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτρωδοποίησης στάδια του κύκλου του N.....	39
2.6.1 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> των <i>Nitrobacter</i>	39

2.6.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> των <i>Nitrospira</i>	40
2.6.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>narG</i>	41
2.6.4 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>nirS</i>	42
2.6.5 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>nosZ</i>	43
2.7 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.....	44
2.7.1 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>16S</i> rRNA των βακτηρίων.....	44
2.7.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>16S</i> rRNA των αρχαίων της συνωμοταξίας <i>Chrenarchaeota</i>	45
2.7.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>18S</i> rRNA των μυκήτων.....	46
2.8 Ποσοτικοποίηση αντιγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων.....	47
2.9 Μελέτη της αποδόμησης των ΠΝ στο έδαφος.....	48
2.9.1 Εκχύλιση των ΠΝ από το έδαφος.....	48
2.9.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).....	49
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	50
• Κεφάλαιο 3.....	51
3. Αποτελέσματα	51
3.1 Επίδραση των ΠΝ στη λειτουργία των Νιτροποιητικών μικροοργανισμών.....	51
3.1.1 Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NH_4^+ στο έδαφος.....	51
3.1.2 Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NO_3^- στο έδαφος.....	52
3.1.3 Επίδραση των ΠΝ στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.....	53
3.2 Επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία των Νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.....	54
3.3 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτροδοποίησης στάδια του κύκλου του N.....	55
3.3.1 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου <i>nxrB</i> των <i>Nitrobacter</i> και <i>Nitrospira</i>	55
3.3.2 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών.....	56
3.4 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.....	58
3.5 Αποδόμηση των ΠΝ στο έδαφος.....	60
• Κεφάλαιο 4.....	62
4.1 Συζήτηση.....	62
4.2 Συμπέρασμα.....	67
• Κεφάλαιο 5.....	68
5. Βιβλιογραφία.....	68

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα για την καθοδήγηση, επίβλεψη και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Ευαγγελία Παπαδοπούλου για την αμέριστη βοήθεια, στήριξη και παροχή γνώσεων σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος για την άψογη συμπεριφορά τους και την προσφορά κάθε είδους βοήθειας όταν χρειάστηκε.

Τέλος, ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, κ. Τσίκου Δανιέλα για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας μέσω της συμμετοχής τους στην τριμελή επιτροπή.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NH₄⁺	Αμμωνικά ιόντα
NO	Μονοξείδιο αζώτου
NO₂⁻	Νιτρώδη ιόντα
NO₃⁻	Νιτρικά ιόντα
ΑΟΒ	Νιτρωδοποιητικά βακτήρια
ΑΟΑ	Νιτρωδοποιητικά αρχαία
ΝΟΒ	Νιτρικοποιητικά βακτήρια
ΑΜΟ	Μονοξυγενάση της αμμωνίας
ΗΑΟ	Διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης
ΝΧΡ	Νιτρώδης οξειδοαναγωγή
ΠΝ	Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
ΒΠΝ	Βιολογικοί Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
ΣΠΝ	Συνθετικοί Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
EQ	1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline (ethoxyquin)
QI	2,6-Dihydro-2,2, 4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine)
EQNL	2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline
NP	Nitrapyrin
DCD	Dicyandiamide
DMPP	3,4 -Dimethylpyrazole phosphate
qPCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νιτροποίηση αποτελεί τη ρυθμο-καθοριστική διεργασία του κύκλου του αζώτου (N) και πραγματοποιείται σε δύο στάδια από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB) ή αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea: AOA) (NH_3 προς NO_2^- «Νιτρωδοποίηση») και νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) (NO_2^- προς NO_3^- , «Νιτρικοποίηση»). Πρόσφατα βρέθηκε ότι βακτήρια του γένους *Nitrospira* sp. (μέχρι πρότινος γνωστά ως NOB), που απομονώθηκαν από τεχνητά οικοσυστήματα, έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης και ονομάστηκαν **Comammox (Complete-ammonia-oxidation)**. Τα βακτήρια αυτά φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένα σε φυσικά εδαφικά οικοσυστήματα όπου και βρέθηκε να συνεισφέρουν στη διεργασία της νιτροποίησης.

Διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N έχουν αναπτυχθεί στις μέρες μας με στόχο την ταυτόχρονη αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά και την ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (NO_3^- , N_2O) από τα αγροτικά οικοσυστήματα και κατ'έπείταση των ανεπιθύμητων περιβαλλοντικών επιπτώσεων που αυτές συνεπάγονται (ρύπανση υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και ατμόσφαιρας, αντίστοιχα). Μια από τις τεχνολογίες αυτές είναι η εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης (ΠΝ). Οι ΠΝ είναι ενώσεις που παρεμποδίζουν τη βιολογική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικό άζωτο. Οι περισσότεροι από τους διαθέσιμους ΠΝ δρουν κυρίως εναντίον των AOB, ενώ η δράση τους έναντι των AOA και των υπόλοιπων μικροβιακών ομάδων που συμμετέχουν στη νιτροποίηση (π.χ. NOB και Comammox) είτε δεν έχει μελετηθεί ακόμα, είτε είναι περιορισμένη, γεγονός που καθιστά αμφίβολη την αποτελεσματικότητά τους.

Εκτός από τις ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ως ΠΝ, άλλες αγροχημικές ουσίες που εφαρμόζονται στην κοινή γεωργική πρακτική, καθώς και οι μεταβολίτες τους, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση και θα μπορούσαν υπό προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικοί ΠΝ. Μια από τις ουσίες αυτές είναι το αντιοξειδωτικό ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl quinoline) που χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό στη βιομηχανία κρεάτων και ψαριών αλλά και στα συσκευαστήρια φρούτων για τη προστασία των μήλων από τη φυσιολογική τους αλλοίωση. Προηγούμενες μελέτες μικροκόσμων εδάφους έδειξαν πως το EQ στο έδαφος μεταβολίζεται ταχύτατα προς το μη υπολειμματικό 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine QI) (κύριος μεταβολίτης) και το έμμονο 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) (δευτερεύων μεταβολίτης), με το πρώτο (QI) να προκαλεί προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης. Ακόλουθη αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού EQ και των μεταβολικών προϊόντων του ως ΠΝ, σε υγρές καλλιέργειες επιλεγμένων εδαφογενών στελεχών AOB, AOA και NOB, σε σύγκριση με λοιπούς ΠΝ ευρείας εφαρμογής (DCD, nitrapyrin, DMPP), έδειξε ότι το EQ και κυρίως ο κύριος μεταβολίτης του QI παρουσιάζει ικανότητα αναστολής και των δύο ομάδων μικροοργανισμών (AOA και AOB) που συμμετέχουν στην νιτρωδοποίηση, με τα AOA να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τα AOB. Από τους υπόλοιπους

διαθέσιμους σήμερα ΠΝ φαίνεται πως μόνο το nitrapyrin (NP) ασκεί ανάλογη παρεμποδιστική δράση με το EQ έναντι των AOA, ενώ περιορισμένη εμφανίζεται η δράση των DCD και DMPP, που αποτελούν και τους μόνους εγκεκριμένους προς χρήση στη γεωργική παρακτική ΠΝ στην Ευρώπη.

Λαμβάνοντας υπόψη τους πιθανούς περιορισμούς στην πρόβλεψη της συμπεριφοράς των παραπάνω ουσιών στα εδαφικά οικοσυστήματα, κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της εκτός στόχου δράσης τοξικότητας τους σε πειράματα μικροκόσμων εδάφους. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των ΠΝ (α) στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, (β) στην αφθονία μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτροδοποίησης στάδια του κύκλου του αζώτου (NOB και απονιτροποιητές) και (γ) στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας (βακτήρια, αρχαία, μύκητες). Παράλληλα, εξετάστηκε η πορεία αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών στα εδαφικά δείγματα.

Για την προετοιμασία των μικροκόσμων χρησιμοποιήθηκαν δύο εδάφη με διαφοροποίηση ως προς την τιμή του pH (όξινο και αλκαλικό), στα οποία πριν την εφαρμογή των ΠΝ προστέθηκε ουρία ως πηγή N για τη μεγιστοποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών και της δράσης των μελετούμενων ουσιών.

Το pH του εδάφους αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα της επίδρασης των μελετούμενων ουσιών στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους, επηρεάζοντας την συνολική αποτελεσματικότητά τους. Το QI στη συγκέντρωση στην οποία εφαρμόστηκε, παρεμπόδισε σημαντικά τη νιτροποίηση και συνεπώς τον κίνδυνο απωλειών N και στα δύο εδάφη. Στο όξινο έδαφος το QI προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης που ήταν ισοδύναμη ή ισχυρότερη σε σχέση με αυτή του DCD και των NP και DMPP, αντίστοιχα. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA μειώθηκε μόνο στην περίπτωση των μεταχειρίσεων του QI και του DCD, αντίστοιχα, και μόνο στο τέλος του πειράματος. Στο αλκαλικό έδαφος, όλοι οι ΠΝ προκάλεσαν μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων, του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης και της αφθονίας των AOB, χωρίς ωστόσο να επηρεάσουν σημαντικά την αφθονία των AOA. Η εφαρμογή όλων των ΠΝ προκάλεσε σημαντική μείωση της αφθονίας όλων των γονιδίων (*amoA*, *nxrB*, *narG*, *nirS*, *nosZ*, *16S rRNA*, *18S rRNA*) που εξετάστηκαν στο όξινο έδαφος, στο τέλος του πειράματος. Αντίθετα, στο αλκαλικό έδαφος δεν παρατηρήθηκε ανάλογη επίδραση με μόνη εξαίρεση τα βακτήρια του γένους *Nitrobacter*, όπου παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας τους στις μεταχειρίσεις των DCD, NP και QI, στο τέλος του πειράματος. Η αφθονία των μικροοργανισμών μη στόχων της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας του εδάφους δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την εφαρμογή των ΠΝ, με εξαίρεση μία μείωση που παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις των DCD, NP και QI στην αφθονία των αρχαίων της συνωμοταξίας Crenarchaeota, στο όξινο έδαφος στο τέλος του πειράματος. Τέλος, η υπολειμματικότητα των ΠΝ στο έδαφος δε φάνηκε να έχει ξεκάθαρη συσχέτιση με τα αποτελέσματα της επίδρασης τους. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα το αντιοξειδωτικό EQ μέσω του κύριου οξειδωτικού του παραγώγου QI, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί δυναμικά ως ένας νέος ΠΝ για την αποδοτικότερη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με την

αποτελεσματικότητα των EQ και QI σε μεγαλύτερο εύρος εδαφών, αλλά και την οικοτοξικότητα τους σε επίπεδο δομής και λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας απαιτούνται για την αξιολόγηση της πιθανής χρήσης τους ως εναλλακτική και οικονομικά βιώσιμη λύση για την αποδοτικότερη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα.

Λέξεις κλειδιά: νιτροποίηση, νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί, νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί, απονιτροποιητές, μικροβιακή κοινότητα, παρεμποδιστές νιτροποίησης

ABSTRACT

Nitrification is the rate-limiting step of the nitrogen (N) cycle and is carried out in two steps by Ammonia Oxidation Bacteria (AOB) or Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) (NH_3 to NO_2^- "Nitrating") and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (NO_2^- to NO_3^- , "Nitriting"). It has recently been found that bacteria of the genus *Nitrospira sp.* (previously known as NOB), which were isolated from engineered ecosystems, have the ability to carry out both steps of the nitrification process and were named Comammox (**Complete-ammonia-oxidation**). Comammox appear to be widespread in natural soil ecosystems where they have been found to contribute to the nitrification process.

Several technologies controlling the rate of the soil processes in the N cycle have been developed and aim to increase the efficiency of N use, and reduce N losses (NO_3^- , N_2O) from agricultural ecosystems, minimizing thus potentially undesirable environmental effects such as groundwater and atmosphere pollution, respectively. One of these technologies is the application of nitrification inhibitors (NI). NIs are compounds that inhibit the biological oxidation of ammonia to nitrate. Most of the available NIs have shown a selective inhibitory effect towards AOB, while their impact on AOA and Comammox is either limited or unknown, making their efficacy questionable.

Apart from the characterized NIs, other agrochemicals can also affect the microorganisms participating in nitrification. One of these compounds is the antioxidant ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl quinoline) which is widely used as a preservative in meat and fish industry, as well as in fruit-packaging plants to prevent the physiological disorder apple scald. Previous studies have shown that EQ in soil is rapidly oxidized to the less persistent 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine: QI) (main metabolite) and the persistent 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (secondary metabolite), with the first being mainly responsible for the transient inhibition of nitrification. Following liquid culture assays assessing the impact of EQ and its oxidation derivatives, QI and EQNI, on representative soil strains of AOB, AOA and NOB, in comparison with NIs that have been used in agricultural settings (DCD, nitrapyrin, DMPP), suggested a suboptimal efficiency of dicyandiamide (DCD) and 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP), the only NIs currently registered for use in Europe, due to their selective inhibitory activity towards ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and indicated nitrapyrin as the sole NI effectively inhibiting both AOB and ammonia-oxidizing archaea (AOA). In contrast, ethoxyquin, showed high activity against AOA, attributed to its major transformation product quinone imine (QI).

To eliminate potential limitations in predicting the behavior of these NIs in soil, we aimed to assess their efficacy and off-target toxicity in soil by evaluating their impact (a) on the size and activity of soil ammonia-oxidizers, (b) on the size of other microbial groups regulating downstream to ammonia-oxidation processes in N cycle (NOB and denitrifiers), and (c) on the abundance of wider microbial groups like bacteria, fungi and Crenarchaea. At the same time, the degradation of NIs in soil samples was examined, to highlight possible correlations

between their residuals and the observed effects in the abundance and function of the microbial community.

For the microcosms setup, two soils with contrasting pH (acidic and alkaline) were amended with urea to promote the metabolic activity of ammonia-oxidizers maximizing thus the performance of the examined NIs.

Soil pH was the main driver affecting ammonia-oxidizers community size and function, influencing thus their overall soil performance. QI, significantly inhibited nitrification, minimizing thus the risk of N losses in both soils. In acidic soil QI was equally effective to DCD and more potent than NP and DMPP, while in the alkaline soil, all NIs were equally effective. NIs reduced the abundance of the other interrelated with ammonia-oxidation, functional microbial groups, such as NOB and denitrifiers, while they did not affect the size of the off-target bacterial, archaeal, and fungal communities. NIs persistence in soils was not correlated with their impact on ammonia-oxidizers. Considering the above efficacy of QI against ammonia-oxidizers in both soils, and also the unique feature of EQ to be rapidly transformed to QI in soil, we suggest that the antioxidant EQ could potentially be used as a novel NI for more efficient nitrogen conservation in agricultural soils. Further studies regarding EQ/QI efficacy/performance and off-target structural and functional microbial toxicity in a wider range of soils, are necessary to evaluate the use of EQ/QI as an alternative and economically viable solution for more efficient use of nitrogen fertilizers.

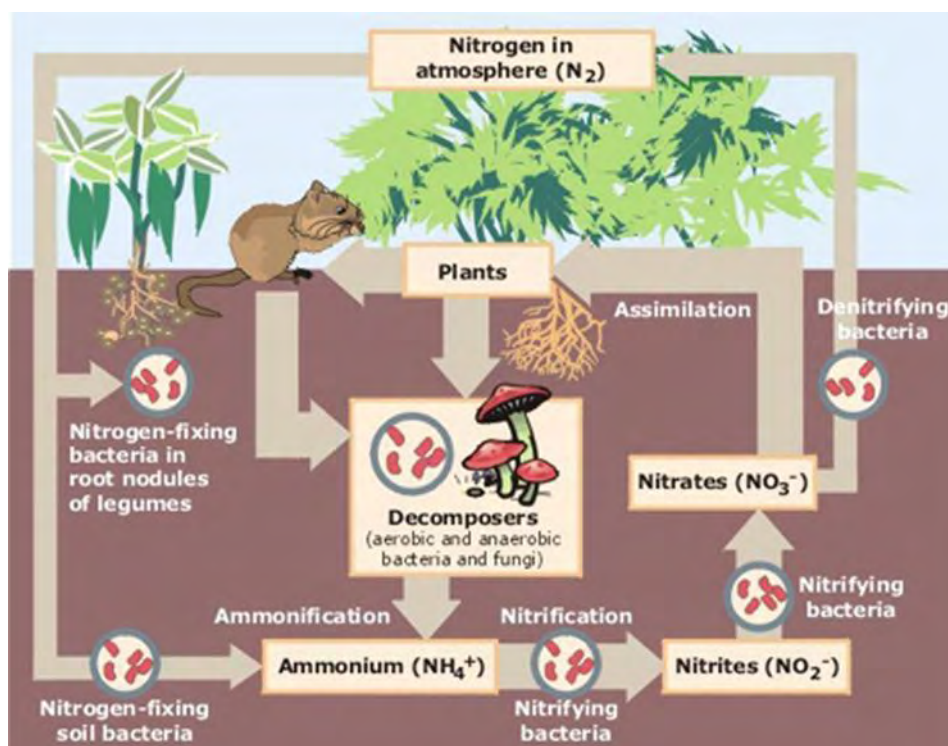
Key Words: nitrification, ammonia-oxidizers, nitrite-oxidizers, denitrifiers, microbial community, nitrification inhibitors

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Κύκλος Αζώτου

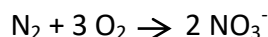
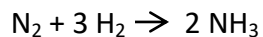
Το στοιχειακό N_2 αποτελεί το κυρίαρχο αέριο της ατμόσφαιρας, καταλαμβάνοντας περίπου το 78% του συνολικού όγκου της (Godfrey and Glass 2011). Παράλληλα, αποτελεί δομικό συστατικό για τη βιοσύνθεση των βιομορίων στο οργανισμό όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρησης της ζωής (Zerkle and Mikhail, 2017). Παρά την αφθονία στην οποία συναντάται το N_2 στην ατμόσφαιρα, η αφομοίωση του από την πλειοψηφία των οργανισμών σε αυτή τη μορφή δεν είναι εφικτή (Bernhard 2010). Έτσι απαιτείται η μετατροπή του σε άλλες αζωτούχες ενώσεις όπως η αμμωνία (NH_3), τα νιτρικά ιόντα (NO_2^-) και τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) (Bernhard 2010). Ο κύκλος του αζώτου και οι μετατροπές που υφίσταται στο περιβάλλον οφείλονται σε βιοτικές διεργασίες (Εικόνα 1). Οι βιοτικές αυτές διεργασίες περιλαμβάνουν:

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση/Ανοργανοποίηση
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση



Εικόνα 1. Ο κύκλος του αζώτου. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_Cycle.svg

Η **αζωτοδέσμευση**, είναι η διαδικασία αναγωγής του αέριου στοιχειακού N_2 σε NH_4^+ και NO_3^- . Διακρίνονται δύο τύποι αζωτοδέσμευσης: η φυσική και η βιολογική. Στη φυσική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμοσφαιράς ενώνεται είτε με το υδρογόνο των υδρατμών, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα:



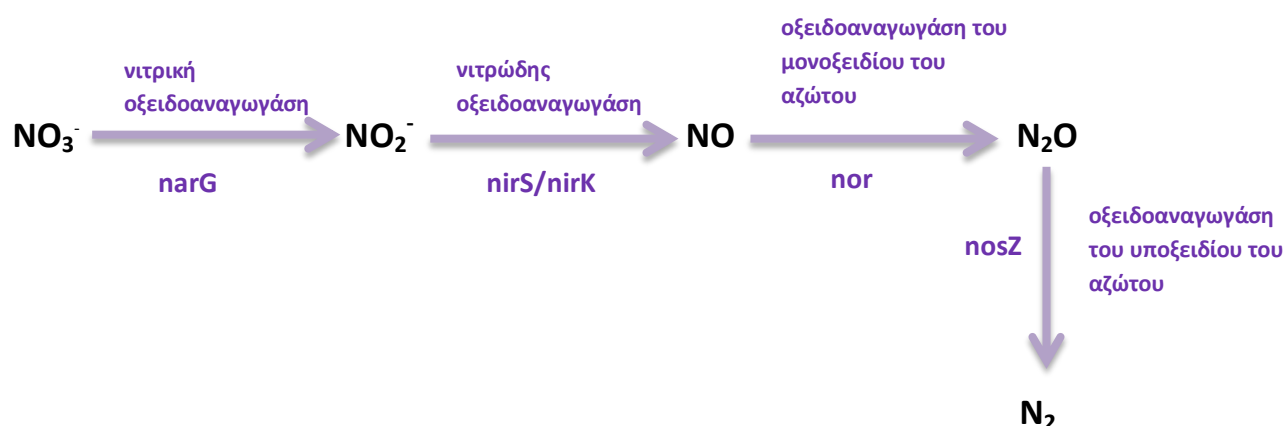
Η πραγματοποίηση αυτών των χημικών αντιδράσεων απαιτεί ενέργεια, για τη ρήξη του τριπλού δεσμού του N_2 , η οποία παρέχεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (κεραυνοί). Οι αζωτούχες ενώσεις που παράγονται λόγω της υδατοδιαλυτότητας που τις χαρακτηρίζει μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος, απ'όπου στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα φυτά. Ο τύπος αυτός της αζωτοδέσμευσης συνεισφέρει μόνο το 10% της αμμωνίας και των νιτρικών ιόντων που μεταφέρονται στα οικοσυστήματα (Bernhard 2010), ενώ το υπόλοιπο 90% των αζωτούχων ενώσεων προέρχεται από τη βιολογική αζωτοδέσμευση. Η βιολογική αζωτοδέσμευση αποτελεί μια εξειδικευμένη διαδικασία που πραγματοποιείται από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι δεσμεύουν το N_2 και το μετατρέπουν σε NH_4^+ (Bernhard 2010, Kuypers *et al.*, 2018). Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν είναι ελεύθερα ζώντα βακτήρια, που ανήκουν σε διάφορα γένη όπως *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Azococcus*, αλλά και *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, και συμβιωτικά βακτήρια, των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, καθώς και ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia* (Bernhard 2010, Santi *et al.*, 2013, Kuypers *et al.*, 2018). Η ικανότητα των παραπάνω μικροοργανισμών να δεσμεύουν το N_2 οφείλεται στο ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Franche *et al.*, 2009). Η ενέργεια που απαιτείται για τη βιολογική αζωτοδέσμευση παρέχεται στους ελεύθερους μικροοργανισμούς από την αναπνοή με τη διάσπαση της γλυκόζης και στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς από υδατάνθρακες προερχόμενους από το φυτό με το οποίο συμβιώνουν (Bernhard 2010).

Το άζωτο είναι ένα από τα στοιχεία που συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην οργανική ύλη, είτε στα περιττώματα των ζώων, είτε σε νεκρούς ιστούς (Rilling *et al.*, 2007). Η **αμμωνιοποίηση** ή **ανοργανοποίηση** είναι η διαδικασία μετατροπής αυτών των οργανικών ενώσεων σε NH_3 από μικροοργανισμούς του εδάφους που κατέχουν το γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων όπως ουρεάσες και αμινοπεπτιδάσες (Bernhard 2010). Η αμμωνιοποίηση εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας (Sylvia *et al.*, 2005).

Η **νιτροποίηση** είναι η διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα. Η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος, οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε νιτρικά ιόντα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της νιτροποίησης απαιτείται η δράση εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα (Bernhard 2010). Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η

υγρασία του εδάφους και κυρίως το pH και η διαθεσιμότητα των NH_4^+ επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία της νιτροποίησης (Bernhard 2010).

Υπό αναερόβιες συνθήκες, πραγματοποιείται αναγωγή των NO_3^- που παράχθησαν κατά τη νιτροποίηση σε στοιχειακό άζωτο ως τελικό προϊόν, μέσω της **απονιτροποίησης**. Η διεργασία της **απονιτροποίησης** περιλαμβάνει τέσσερα αναγωγικά στάδια, τα οποία πραγματοποιούνται από μια σειρά μικροοργανισμών που φέρουν το γενετικό υπόβαθρο για την έκφραση των γονιδίων *narG*, *nirS/nirK*, *nor*, *nosZ* που οδηγούν στην παραγωγή της νιτρικής οξειδοαναγωγής, νιτρώδης οξειδοαναγωγής, οξειδοαναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου και οξειδοαναγωγής του υποξειδίου του αζώτου, αντίστοιχα (Εικόνα 2) (Verbaendert *et al.*, 2011).



Εικόνα 2. Αντιδράσεις μετατροπής νιτρικών ιόντων σε στοιχειακό άζωτο (απονιτροποίηση).

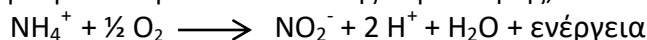
1.2 Νιτροποίηση

1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης

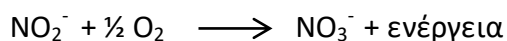
Η νιτροποίηση αποτελεί μια από τις βασικότερες βιοτικές μετατροπές του N_2 και είναι καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση του κύκλου του. Η νιτροποίηση οδηγεί στη μετατροπή των NH_4^+ στην οξειδωμένη μορφή των NO_3^- , με συνέπεια την αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά και τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους (Bernhard 2010, Schleper and Nicol 2010). Οι μικροοργανισμοί και τα ένζυμα που συμμετέχουν στη νιτροποίηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά αποδεικνύοντας τη ζωτική οικονομική σημασία και περιβαλλοντική σπουδαιότητα της διαδικασίας (You *et al.*, 2009).

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια (Εικόνα 3) (Schleper and Nicol 2010):

- I. τη νιτρωδοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση των NH_4^+ προς NO_2^- , και αποτελεί το ρυθμό-καθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης,



- II. τη νιτρικοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση NO_2^- προς NO_3^-



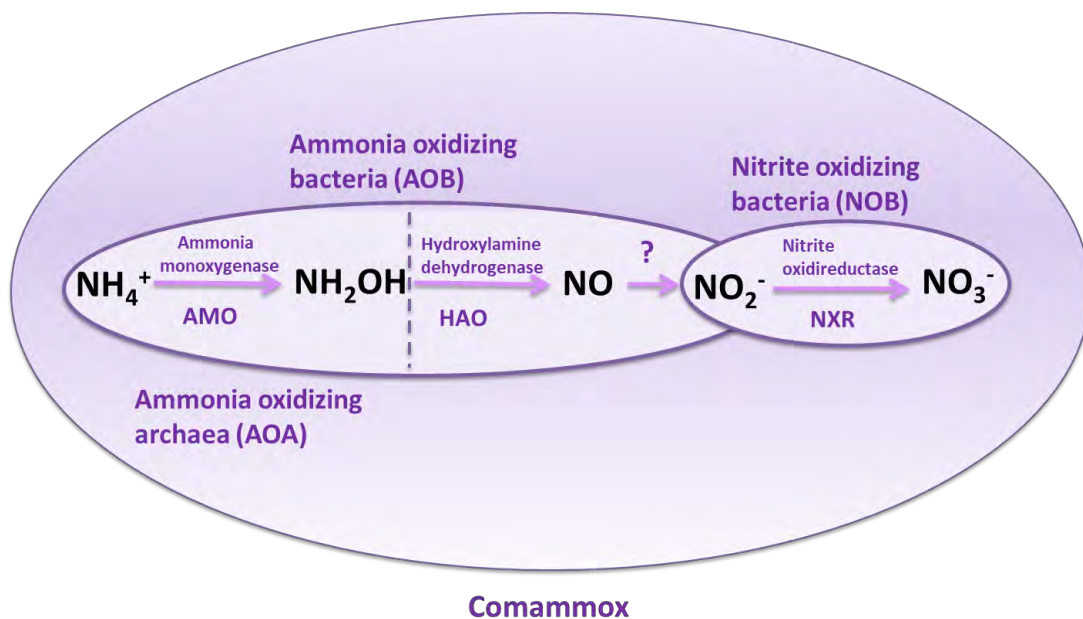
Η νιτρωδοποίηση διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους βιοχημικά στάδια (Bernhard 2010, Caranto and Lancaster 2017). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η οξείδωση των NH_4^+ προς υδροξυλαμίνη (NH_2OH) με τη δράση της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO). Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με τρεις πολυπεπτιδικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *amoA*, *amoB* και *amoC* του οπερονίου *amoCAB* και παράγεται σε νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia oxidizing Bacteria, AOB) και αρχαία (Ammonia oxidizing Archaea, AOA). Προκειμένου το ένζυμο να είναι λειτουργικό, απαιτούνται δύο ηλεκτρόνια και η σύνδεση χαλκού στην υπομονάδα *amoB* (Beeckman *et al.*, 2018, Prosser *et al.*, 2019).

Στο δεύτερο στάδιο της νιτρωδοποίησης πραγματοποιείται η οξείδωση της NH_2OH , με τελικό προϊόν τα NO_2^- , με τη δράση του ενζύμου της διυδροξυγενάσης της υδροξυλαμίνης (HAO). Η διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης είναι μια ομοτριμερής πρωτεΐνη που φέρει 24 δακτυλίους αίμης και συναντάται κυρίως στα AOB (Beeckman *et al.*, 2018, Caranto and Lancaster 2017). Μέχρι πρότινος θεωρούνταν πως η HAO συμμετέχει άμεσα στην οξείδωση της NH_2OH σε NO_2^- . Σύμφωνα με τους Caranto και Lancaster (2017), το προϊόν που παράγεται από την οξείδωση της NH_2OH είναι τελικά το NO. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί (Caranto and Lancaster 2017, Prosser *et al.*, 2019) για τη μετατροπή του NO σε NO_2^- είναι οι εξής:

- αβιοτική μετατροπή
- μετατροπή με την επίδραση της νιτρώδους οξειδοαναγωγής, καθώς το ένζυμο αυτό μπορεί να καταλύει και την αντίστροφη αντίδραση
- μετατροπή με τη βοήθεια μιας μη χαρακτηρισμένης οξειδοαναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου με επικρατέστερη την νιτροσιανίνη

Η νιτρικοποίηση περιλαμβάνει τη μετατροπή των NO_2^- σε NO_3^- με τη δράση του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR) (Bernhard 2010, Beeckman *et al.*, 2018). Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που φέρει τρεις υπομονάδες *NxrA*, *NxrB* και *NxrC*. Ανάλογα με την τοποθεσία σύνδεσης του υποστρώματος στην υπομονάδα *NxrA* συναντώνται δύο είδη του ενζύμου η περιπλασματική και η κυτταροπλασματική (Daims *et al.*, 2016).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα μέχρι πρόσφατα η νιτροποίηση θεωρούνταν μια αρθρωτή διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο βήματα από διακεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες των Daims *et al.* (2015) και van Kessel *et al.* (2015) υπέδειξαν την ύπαρξη βακτηρίων του γένους *Nitrospira* που διαθέτουν όλες τις αναγκαίες γενετικές πληροφορίες για την εκτέλεση και των δύο βημάτων της νιτροποίησης, καταρρίπτοντας έτσι την θεωρία της "αρθρωτής νιτροποίησης". Τα βακτήρια αυτά ονομάστηκαν Comammox (complete ammonia oxidation bacteria) και εντοπίζονται σε φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα (Daims *et al.*, 2015, van Kessel *et al.*, 2015).

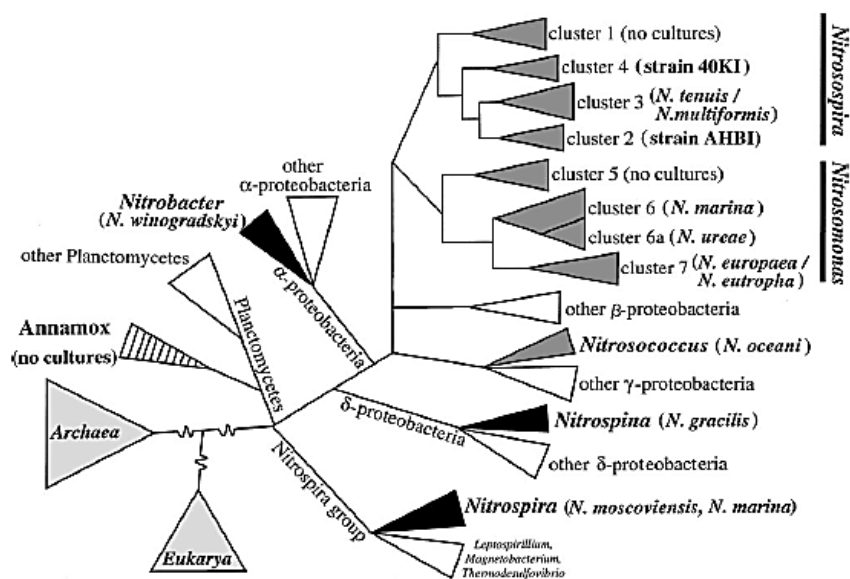


Εικόνα 3. Τα στάδια και οι ομάδες των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1890 (Winogradsky 1891). Αρκετές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα βακτήρια αυτά ανήκουν στις κλάσεις των β-πρωτεοβακτηρίων και γ-πρωτεοβακτηρίων και κατατάσσονται σε τρία γένη με φυλογενετική ανάλυση που βασίζεται στο 16S rRNA. Τα γένη αυτά ονομάστηκαν *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* (Εικόνα 4) (Kowalchuck and Stephen 2001, Di et al., 2010, Dang et al., 2018)



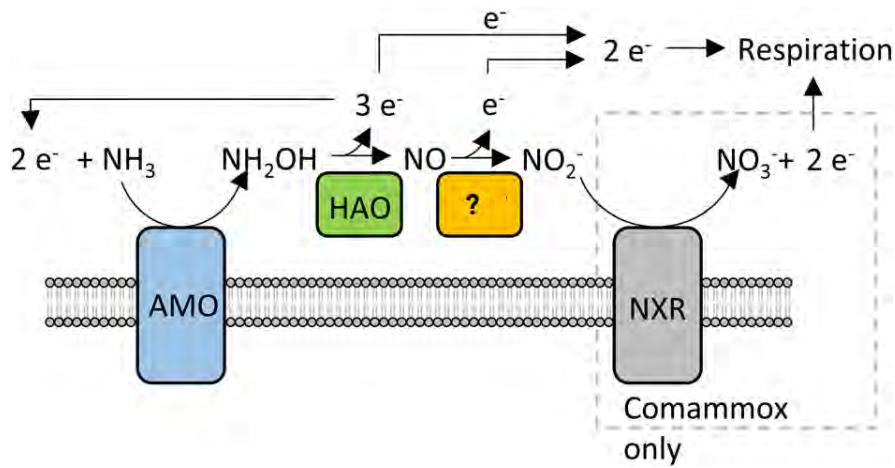
Εικόνα 4. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16S rRNA αλληλουχίες των βακτηρίων που συμμετέχουν στο κύκλο του αζώτου. Τα αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια φαίνονται με σκούρο γκρι, τα νιτροκοποιητικά βακτήρια με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές (Kowalchuck and Stephen 2001).

Η δομή των μεμβρανών, το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων, που συναντώνται στα AOB, είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην νιτροποίηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη λιπιδίων συνδεδεμένων με εστερικό δεσμό, που είναι ευάλωτος στην υδρόλυση και η ύπαρξη λιπαρών οξέων ως πλευρικές αλυσίδες στη μεμβράνη τους (Shen *et al.*, 2013). Η δομή των μεμβρανών σε κάθε μικροοργανισμό είναι αυτή που καθορίζει τη διαπερατότητα του κυττάρου και κατά συνέπεια την ευαισθησία στις ξενοβιοτικές ουσίες όπως οι ΠΝ (Shen *et al.*, 2013).

Τα AOB όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την οξειδωση της αμμωνίας. Μέσω αυτής της οξειδωσης τα AOB προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους. Η παραγόμενη αυτή ενέργεια συμβάλλει και στην καθήλωση του CO₂, που χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή άνθρακα, μέσω του κύκλου του Calvin. Με βάση λοιπόν αυτά τα στοιχεία τα AOB χαρακτηρίζονται ως χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί (Kowalchuk and Stephen 2001).

Τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα όπως αγροτικές περιοχές, λιβάδια και δάση (Gubry-Rangin *et al.*, 2010) καθώς και σε υδάτινα οικοσυστήματα (Kowalchuk and Stephen 2001). Η αφθονία τους στο έδαφος κυμαίνεται περίπου μεταξύ 10⁴-10⁶ κύτταρα AOB g⁻¹ εδάφους (Gubry-Rangin *et al.*, 2010). Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η περιεκτικότητα βαρέων μετάλλων στο έδαφος, η παρουσία ή όχι φυτών, η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και το pH του εδάφους, μπορούν να επηρεάσουν την αφθονία και τη δραστηριότητα των AOB (Gubry-Rangin *et al.*, 2010). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως αύξηση του pH του εδάφους οδηγεί σε αύξηση των μεταγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB (Nicol *et al.*, 2008). Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμα παράγοντας που φαίνεται πως επιδρά στην παραγωγή των NO₂⁻ στα AOB. Σε θερμοκρασίες 25-30°C η παραγωγή των νιτρικών ιόντων είναι σχετικά υψηλή ενώ σε θερμοκρασία 10°C η συγκέντρωση των παραγόμενων νιτρικών μειώνεται (Tourna *et al.*, 2008). Παράλληλα η θερμοκρασία αποτελεί έναν παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή και την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας των AOB σε φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα (You *et al.*, 2009).

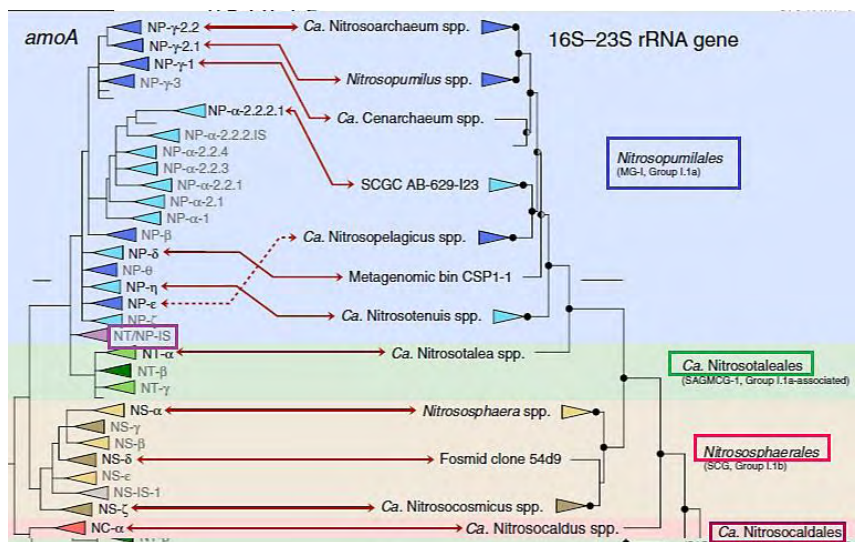
Στο μηχανισμό οξειδωσης της αμμωνίας από τα AOB συμμετέχει μια σειρά από σημαντικά ένζυμα. Ένα από αυτά είναι η διαμεμβρανική AMO, που καταλύει τη μετατροπή των NH₄⁺ σε NH₂OH και νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτούνται δύο ηλεκτρόνια. Η περιπλασματική διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης είναι το δεύτερο ένζυμο που απαιτείται για την οξειδωση της αμμωνίας. Η αντίδραση που καταλύει, είναι η μετατροπή της NH₂OH σε NO με την ταυτόχρονη ελευθέρωση τριών ηλεκτρονίων, τα δύο εκ των οποίων χρησιμοποιούνται από την AMO (Lethorvirta-Morley 2018, Caranto and Lancaster 2017, Prosser *et al.*, 2019). Ο συνολικός μηχανισμός μετατροπής του NO σε NO₂⁻ δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός με τους τρεις μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω να είναι οι επικρατέστεροι (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ο μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας και η ηλεκτρονική ροή στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Lethorvirta-Morley 2018).

1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Η δεύτερη ομάδα μικροοργανισμών που διαθέτουν τις γενετικές πληροφορίες για την οξείδωση της αμμωνίας είναι τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA). Το 2005 δημοσιεύτηκε η πρώτη έρευνα που αναφερόταν στο *Nitrosopumilus maritimus*, το πρώτο αναγνωρισμένο AOA που απομονώθηκε από θαλάσσιο περιβάλλον (Konneke *et al.*, 2005). Τα AOA ανήκουν στη συνωμοταξία των Thaumarchaeota, που διαχωρίζεται από τις συνωμοταξίες των Crenarchaeota και Euryarchaeota (Brochier-Armane *et al.*, 2008). Μετά από φυλογενετικές αναλύσεις, βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA, τα AOA κατατάχθηκαν στη κλάση *Nitrososphaeria*. Τα γένη στα οποία κατατάσσονται τα AOA είναι τα: *Ca. Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales*, *Ca. Nitrosotaleales*, *Nitrosopumilales*. Υπάρχει μια επιπλέον ομάδα AOA, η *NT/NP-Incertae sedis*, η οποία στα φυλογενετικά δέντρα τοποθετείται κοντά στη ρίζα του γένους *Nitrosopumilales* καθώς ήταν αδύνατη η ταξινόμηση της μαζί με το γένος *Nitrosopumilales* ή με το γένος *Ca. Nitrosotaleales* (Alves *et al.*, 2018) (Εικόνα 6).



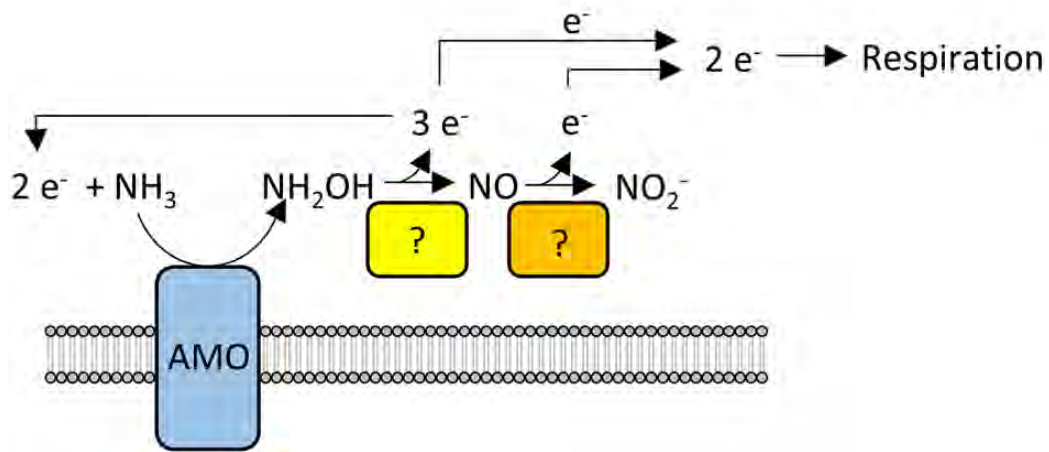
Εικόνα 6. Φυλογενετική ανάλυση AOA μετά από συνδυασμό δεδομένων που προέκυψαν από φυλογενετικές αναλύσεις, βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA (Alves *et al.*, 2018).

Η δομή των μεμβρανών των AOA διαφέρει από αυτή των AOB σε κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο. Στις μεμβράνες των AOA οι αλκυλικές αλυσίδες είναι διακλαδισμένες ισοπρενοειδείς αλυσίδες, ανθεκτικές σε οξειδωτικά μέσα (Pithser et al., 2010, Schouten et al., 2008) και συνδέονται με τον κορμό της γλυκερόλης με τη βοήθεια αιθερικού δεσμού, ο οποίος είναι πιο ανθεκτικός στην υδρόλυση από τον εστερικό δεσμό, που συναντάται στις μεμβράνες των AOB (Shen et al., 2013). Η δομή των μεμβρανών καθορίζει όπως και στα AOB τη διαπερατότητα των κυττάρων σε ξενοβιοτικές ουσίες και κατά συνέπεια σε ΠΝ.

Τα AOA φέρουν τα γονίδια για την παραγωγή της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), προκειμένου να οξειδώσουν την αμμωνία και να προσλάβουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους. Σε αντίθεση όμως με τα AOB, δεν χρησιμοποιούν το κύκλο του Calvin για τη καθήλωση του CO₂, που αποτελεί πηγή άνθρακα, αλλά το μονοπάτι του 3-υδροξυπροπιοτικού εστέρα ή του 4-υδροξυβουτυρικού εστέρα (Walker et al., 2010). Έτσι, και τα AOA χαρακτηρίζονται ως χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί (Francis et al., 2007).

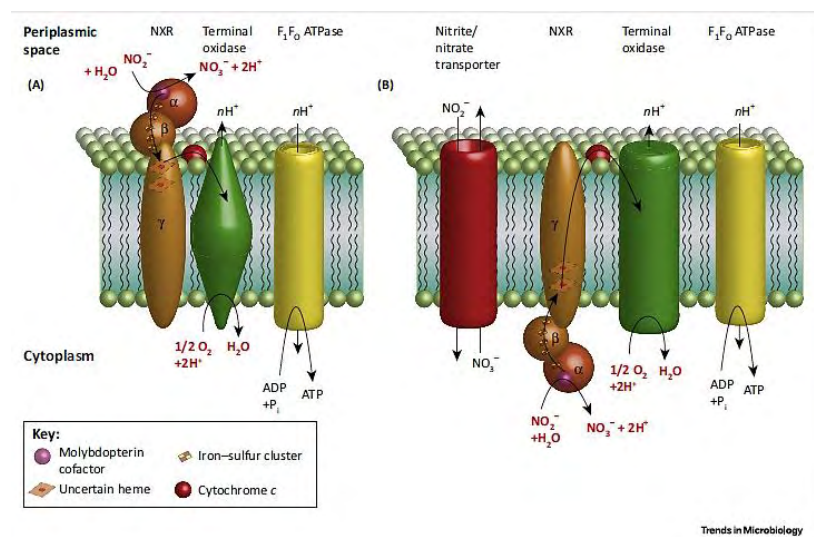
Τα AOA βρίσκονται συνήθως σε μεγαλύτερη αφθονία τόσο στα χερσαία όσο και στα θαλάσσια οικοσυστήματα σε σχέση με τα AOB (Di et al., 2018). Στο έδαφος βρέθηκε να περιέχονται περισσότερα από 10⁷ κύτταρα AOA g⁻¹ εδάφους (Gubry-Rangin et al., 2010). Τα AOA έχουν βρεθεί να συνεισφέρουν περισσότερο στην οξείδωση της αμμωνίας από τα AOB σε εδάφη με όξινο pH (Li et al., 2018). Τα AOA, όπως και τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα όπως αγροτικές περιοχές, λιβάδια, δάση, αλπικά εδάφη (Gubry-Rangin et al., 2010), αλλά και σε πολλά θαλάσσια οικοσυστήματα, αποδεικνύοντας πως είναι απαραίτητα για το κύκλο του αζώτου στους ωκεανούς. AOA έχουν βρεθεί και σε θερμές πηγές, αλλά και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (You et al., 2009). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία και τη λειτουργία των AOB στα διάφορα περιβάλλοντα επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό και τα AOA (Gubry-Rangin et al., 2010). Οι αλλαγές στη θερμοκρασία μπορούν να οδηγήσουν επιπλέον και σε αλλαγές της δομής της κοινότητας των αρχαίων (You et al., 2009).

Μετά από αλληλούχιση του γονιδιώματος των AOA επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ομόλογων γονιδίων *amoA*, *amoB* και *amoC* με αυτά των AOB (Walker et al., 2010). Σε αντίθεση με τα ομόλογα γονίδια της AMO σε AOB και AOA, κάτι αντίστοιχο δεν ισχύει στη περίπτωση της HAO (Walker et al., 2010). Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις θεωρήθηκε πως η NH₂OH δεν αποτελεί το ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή NO₂⁻ στα AOA. Σύμφωνα με τους Vajralaa et al., (2013) το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει μετά τη δράση της AMO είναι η NH₂OH, η οποία παρουσιάζει ομοιότητες με αυτή των AOB (Vajralaa et al., 2013). Η περαιτέρω οξείδωση της NH₂OH δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως. Το επικρατέστερο μονοπάτι οξείδωσης της NH₂OH, αναφέρει την NH₂OH και το NO ως συνυποστρώματα ενός μη αναγνωρισμένου ενζυμικού συμπλόκου της διυδροξυγενάσης της υδροξυλαμίνης, που χρησιμοποιεί το χαλκό ως συμπαραγοντα. Με βάση το μονοπάτι αυτό παράγονται δύο μόρια NO₂⁻ και ελευθερώνονται πέντε ηλεκτρόνια, εκ των οποίων τα δύο χρησιμοποιούνται για την οξείδωση της αμμωνίας και τα δύο για παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνοής. Από τα δύο παραγόμενα NO₂⁻, το ένα μετατρέπεται με τη δράση της νιτρώδους οξειδωαναγωγής σε NO για περαιτέρω οξείδωση (Εικόνα 7) (Lethorvirta-Morley 2018, Prosser et al., 2019).



Εικόνα 7. Πιθανός μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας από τα νιτροδοποιητικά αρχαία (Lethorvirta-Morley 2018)

Το δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, η νιτρικοποίηση επιτελείται από τα NOB. Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στη συνωμοταξία των πρωτεοβακτηρίων (Teske et al., 1994) και κατατάσσονται στα ακόλουθα γένη: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina*, *Nitrolancetus* και *Candidatus Nitromaritima*» (Liu et al., 2011, Daims et al., 2016). Τα γένη αυτά ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες των πρωτεοβακτηρίων και εμφανίζουν διαφορές σε δομικό και βιοχημικό επίπεδο (Teske et al., 1994). Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των NOB είναι η ύπαρξη των γενετικών πληροφοριών για την παραγωγή του ενζύμου της νιτρώδους οξειδωτικής αγωγάσης (NXR) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η οξείδωση των NO_2^- προς NO_3^- . Το ένζυμο αυτό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εντοπίζεται σε δύο μορφές με τα *Nitrospira*, *Nitrospina* και *Candidatus Nitromaritima* να φέρουν τη περιπλασματική, ενώ τα *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrolancetus* την κυτταροπλασματική (Daims et al., 2016). Κατά την αντίδραση πέραν της παραγωγής των NO_3^- ελευθερώνονται και δύο ηλεκτρόνια τα οποία μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καταλήγουν στην τελική οξειδάση για παραγωγή ενέργειας (Εικόνα 8) (Daims et al., 2016).



Εικόνα 8. Ο μηχανισμός οξείδωσης των νιτρώδων ιόντων προς νιτρικά από την κυτταροπλασματική και την περιπλασματική νιτρώδη οξειδωτική αγωγάση (Daims et al., 2016).

Τα NOB είναι χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί (Daims *et al.*, 2016, Lückert *et al.*, 2010). Η οξείδωση των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) συμβάλλει στην παραγωγή ενέργειας για την επιβίωση των NOB. Η πηγή άνθρακα για τα NOB είναι το CO_2 . Ο μηχανισμός καθήλωσης του CO_2 δεν είναι ίδιος για όλα τα γένη των NOB και σε πολλά από αυτά δεν έχει καθοριστεί (Lückert *et al.*, 2010).

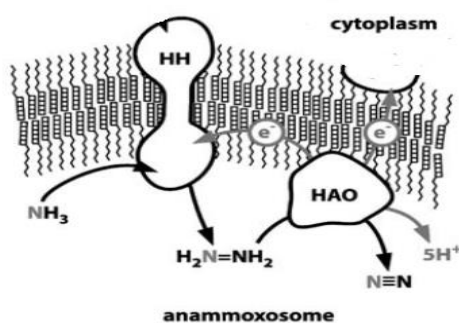
Τα NOB εντοπίζονται σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα (Lückert *et al.*, 2010, Daims *et al.*, 2016). Το γένος *Nitrospira* εμφανίζει την υψηλότερη ποικιλότητα από τα υπόλοιπα γένη και συναντάται σε μεγαλύτερη αφθονία στο έδαφος, σε ιζήματα, στους ωκεανούς αλλά και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Lückert *et al.*, 2010, Daims *et al.*, 2016).

1.2.2.4 Anammox

Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (O_2), πραγματοποιείται αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας από αναερόβια βακτήρια γνωστά ως anammox (Francis *et al.*, 2007). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στη συνωμοταξία των Planctomycetales (Francis *et al.*, 2007), και κατατάσσονται σε πέντε γένη : *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula*, *Ammoxoglobus* και *Jettenia* (Kartal *et al.*, 2013).

Τα βακτήρια αυτά οξειδώνουν την αμμωνία, χρησιμοποιώντας τα NO_2^- ως δέκτη ηλεκτρονίων έναντι του οξυγόνου (O_2) (Francis *et al.*, 2007) και οδηγούν στη παραγωγή στοιχειακού αζώτου (N_2) αντί NO_3^- (Kuenen *et al.*, 2008). Στο μονοπάτι οξείδωσης των NH_4^+ το ενδιάμεσο προϊόν είναι η υδραζίνη, η οποία με τη δράση του ενζύμου της HAO μετατρέπεται τελικά σε στοιχειακό άζωτο (N_2) (Strous *et al.*, 2004, Kuenen *et al.*, 2008, Kartal *et al.*, 2013). Το ένζυμο HAO βρίσκεται σε ένα οριοθετημένο τμήμα της μεμβράνης, γνωστό ως anammoxosome, το οποίο αποτελεί το 30% του όγκου του κυττάρου. Το anammoxosome περιβάλλεται από μεμβράνη που φέρει λιπίδια με 3 έως 5 συντηγμένους δακτυλίους κυκλοβουτανίου (ladderane λιπίδια) (Εικόνα 9) (Strous *et al.*, 2004).

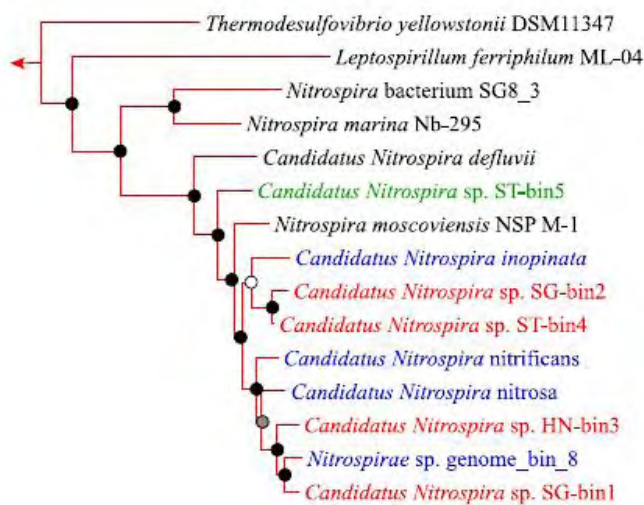
Τα anammox εντοπίζονται ευρέως σε υποξικά περιβάλλοντα αλλά και σε υδάτινα οικοσυστήματα και ιζήματα (Gao *et al.*, 2017). Η ανάπτυξη τους απαιτεί σχέσεις συνεργασίας με τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς και είναι υπεύθυνα για την απώλεια N_2 σε ποσοστό 30% στα υδάτινα οικοσυστήματα και κυρίως στους ωκεανούς (Babbitt *et al.*, 2014, Kuypers *et al.*, 2018).



Εικόνα 9. Ο μηχανισμός δράσης των anammox, που οδηγεί σε παραγωγή στοιχειακού αζώτου (Strous *et al.*, 2004).

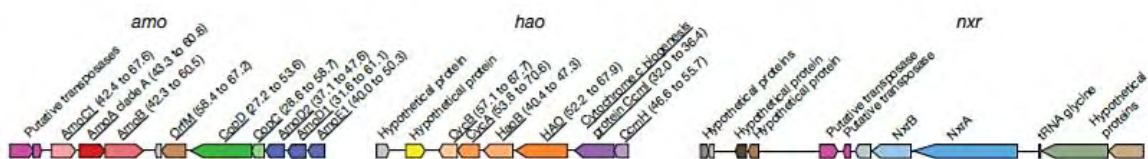
1.2.2.5 Complete ammonia oxidizers (Comammox)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η θεωρία της “αρθρωτής νιτροποίησης” καταρρίφθηκε το 2015 με την ανακάλυψη ενός νέου στελέχους, του *Candidatus Nitrospira inopinata*, που έχει την ικανότητα να εκτελεί και τα δύο βήματα της νιτροποίησης (Daims *et al.*, 2015, van Kessel *et al.*, 2015). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάστηκαν Comammox (**C**omplete **A**mmonia **O**xidation), κατατάσσονται φυλογενετικά στην ομάδα των νιτροκοποιητικών βακτηρίων (NOB) και ανήκουν στο γένος των *Nitrospira* (Εικόνα 10) (Daims *et al.*, 2015). Περαιτέρω φυλογενετικές αναλύσεις βασιζόμενες στο *amoA* γονίδιο, πρότειναν το διαχωρισμό των comammox σε δύο κλάδους A και B. Όλα τα μέχρι σήμερα απομονωμένα στελέχη comammox προέρχονται από τεχνητά οικοσυστήματα και ανήκουν στον κλάδο A (Daims *et al.*, 2015, van Kessel *et al.*, 2015).



Εικόνα 10. Τα βακτήρια του γένους *Nitrospira*, που αποδείχθηκε πως ανήκουν στα comammox. Οι αποχρώσεις μπλε και κόκκινο αντιστοιχούν στα comammox (Wang *et al.*, 2017).

Οι γονιδιωματικές αναλύσεις στο στέλεχος *Ca. N. inopinata* απέδειξαν την ύπαρξη των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή του ενζύμου NXR. Σε αντίθεση, με τα NOB που διαθέτουν πέντε παράλογα αντίγραφα των γονιδίων *nxr*, το στέλεχος *Ca. N. inopinata* διαθέτει μόνο ένα αντίγραφο. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν και τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή των ενζύμων της AMO και της HAO. Το ένζυμο της AMO των comammox μοιάζει περισσότερο με αυτό των AOB, με βασική διαφορά την ύπαρξη δύο επιπλέον αντιγράφων του *amoC* σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους (Εικόνα 11) (Daims *et al.*, 2015, van Kessel *et al.*, 2015).



Εικόνα 11. Οι θέσεις των γονιδίων των *amoCAB*, *hao* και *nxrAB* στο γονιδίωμα του *Candidatus Nitrospira inopinata* (Daims *et al.*, 2015).

Πρόσφατη έρευνα από τους Kits et al., (2017) αναφέρει πως τα Comammox έχουν υψηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα της αμμωνίας, υποδεικνύοντας πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας αποκτούν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των AOB και των AOA.

Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις έχουν αποδείξει ότι τα Comammox είναι ευρέως διαδεδομένα σε τεχνητά συστήματα (π.χ. μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων) και σε φυσικά εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα (Daims et al., 2015, Wang et al., 2017, Lawson et al., 2018). Παρόλα αυτά η καλλιέργεια τους σε θρεπτικά μέσα είναι ιδιαίτερα απαιτητική. Για τον λόγο αυτό μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί μόνο δύο βακτήρια Comammox που προέρχονται από υδάτινα οικοσυστήματα (Daims et al., 2015, van Kessel et al., 2015). Στο έδαφος έχουν εντοπιστεί comammox βακτήρια που ανήκουν και στους δύο κλάδους A, B με αυτά που ανήκουν στον κλάδο B να συνεισφέρουν περισσότερο στη διεργασία της νιτροποίησης (Wang et al., 2019).

1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου του αζώτου και συμβάλλει στη διαθεσιμότητα διαφόρων μορφών αζώτου και στην πρόσληψη αυτών από τους ζωντανούς οργανισμούς. Παράλληλα, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το περιβάλλον, τη γεωργία και κατ'επέκταση την οικονομία. (Fowler et al., 2013, Kuypers et al., 2018;).

Η οξείδωση της αμμωνίας μέσω της νιτροποίησης, συμβάλλει στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους σε υψηλά επίπεδα (Schleper and Nicol 2010), περιορίζοντας την ανάγκη της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων για τον εμπλουτισμό του. Έτσι, μειώνεται σημαντικά ο αρνητικός αντίκτυπος που παρουσίαζε η χρήση των λιπασμάτων σε περιβαλλοντικό επίπεδο, λόγω της συσσώρευσης υψηλών ποσοτήτων αζώτου και σε οικονομικό επίπεδο εξαιτίας του υψηλού τους κόστους (Subbarao et al., 2006). Παράλληλα, οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιολογική επεξεργασία αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων, προκειμένου να μειωθεί το υψηλό φορτίο αζώτου στα απόβλητα που προκύπτει λόγω της εντατικοποίησης της γεωργίας και της κτηνοτροφίας συνοδευόμενης από την αυξημένη χρήση συνθετικών λιπασμάτων. Έτσι, με τη νιτροποίηση μειώνεται το φορτίο N των αποβλήτων που καταλήγουν στο έδαφος, και περιορίζεται η συσσώρευση αζωτούχων ρύπων (Kowalchuk et al., 2001, Ge et al., 2015).

Η νιτροποίηση ωστόσο, επιφέρει και αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον, καθώς συμβάλλει στις απώλειες του αζώτου από τα αγροτικά οικοσυστήματα διαμέσου της έκλυσης των παραγόμενων NO_3^- , τα οποία λόγω του αρνητικού τους φορτίου δεν προσροφούνται στα εδαφικά κolloειδή, αλλά και μέσω της παραγωγής και εκπομπής αέριων μορφών αζώτου (N_2O , NO , N_2). Η έκλυση των παραγόμενων νιτρικών ιόντων, μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση των επιφανειακών υδάτων αλλά και του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα με τελικό αποτέλεσμα τον ευτροφισμό, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία (Di et al., 2011). Παράλληλα, τα παραγόμενα νιτρικά ιόντα ακολουθώντας τον κύκλο του N, υπόκεινται στις αντιδράσεις της απονιτροποίησης οδηγώντας σε παραγωγή αερίων αζωτούχων ενώσεων όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), που αποτελούν ατμοσφαιρικούς ρύπους. Μέσω της

εκπομπής αυτών των ενώσεων στην ατμόσφαιρα εντείνεται το πρόβλημα του φαινομένου του θερμοκηπίου αλλά και της τρύπας του όζοντος (Zaman *et al.*, 2009, Lehtovirta-Morley *et al.*, 2013). Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αρνητικές επιπτώσεις της νιτροποίησης αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N.

1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ)

Οι σύγχρονες γεωργικές πρακτικές περιλαμβάνουν την εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων λιπασμάτων για τη διατήρηση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών καθώς και της γονιμότητας του εδάφους σε υψηλά επίπεδα. Ετησίως, 10^7 τόνοι αζωτούχων λιπασμάτων χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, όμως μόνο το 50% από αυτό προσλαμβάνεται από τα φυτά, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό μετατρέπεται σε περιβαλλοντικούς ρύπους μέσω της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης (Fowler *et al.*, 2018). Προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες N, αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του αζώτου, που αναφέρονται ως αζωτούχα λιπάσματα βελτιωμένης απόδοσης (enhanced-efficiency N-fertilizer) (Feng *et al.*, 2016) με στόχο την ταυτόχρονη αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά (nitrogen use efficiency-NUE) και την ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (Feng *et al.*, 2016). Σε αυτές τις τεχνολογίες ελέγχου συμπεριλαμβάνεται και η χρήση των ΠΝ.

Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων έχουν προταθεί ως πιθανοί ΠΝ (Mc Carty 1999) με την πλειονότητα αυτών να δρουν έναντι της AMO και να αναστέλλουν το πρώτο βήμα της νιτροποίησης (Bexdur and Knowles 1989, Mc Carty 1999). Το ένζυμο της HAO δεν αποτελεί στόχο των ΠΝ διότι υψηλές συγκεντρώσεις NH_2OH έχουν αποδειχθεί τοξικές και επιβλαβείς για τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Arp and Stein 2003).

Η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής των ΠΝ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο εφαρμόζονται (Benckiser *et al.*, 2013, Gilsanza *et al.*, 2016). Έτσι, παράγοντες όπως η υγρασία του εδάφους, το pH, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα αμμωνίας επηρεάζουν την δράση τους (Wang *et al.*, 2016). Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία επηρεάζει την απόδοση των ΠΝ, ενώ το pH και τα επίπεδα της αμμωνίας επηρεάζουν τη δραστηριότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και έμμεσα την αποτελεσματικότητα των ΠΝ (Wang *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2015). Η υγρασία με τη σειρά της καθορίζει το χρόνο παραμονής και τη δράση των ΠΝ στο έδαφος σε σχέση με την υδατοδιαλυτότητα τους (Chen *et al.*, 2015).

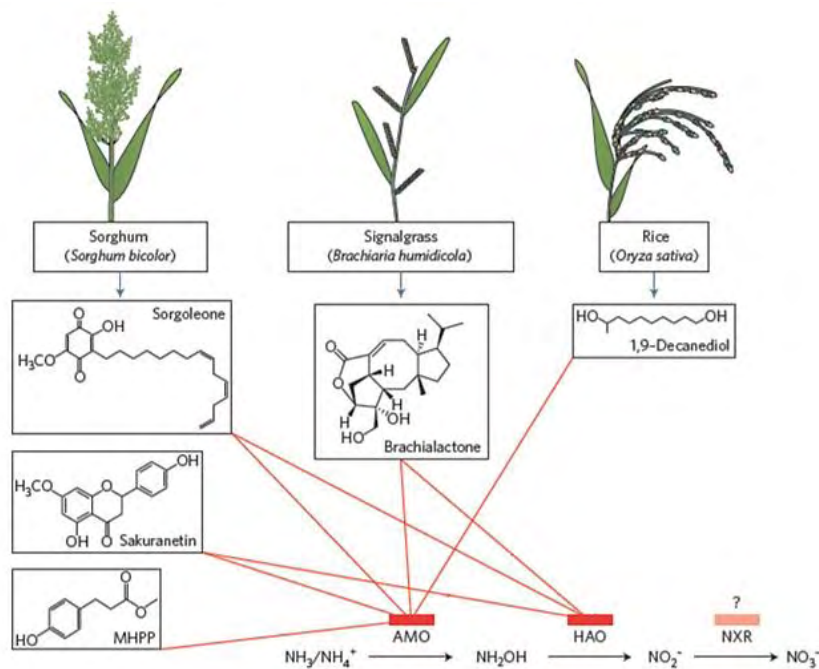
Οι ΠΝ, ιδανικά θα έπρεπε να δρουν μόνο ενάντια στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση, χωρίς να επιφέρουν επιπτώσεις στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς της μικροβιακής κοινότητας (Florio *et al.*, 2014). Το μέγεθος της επίδρασης των ΠΝ επηρεάζεται από τα δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε μικροοργανισμού (Wang *et al.*, 2016). Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δράση των ΠΝ στα AOA και τα Comammox είναι περιορισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες για τα AOB. Η ανακάλυψη των εμπορικά διαθέσιμων ΠΝ πραγματοποιήθηκε πριν την ανακάλυψη των AOA και των Comammox, συνεπώς οι έρευνες σχετικά με τους ΠΝ έχουν επικεντρωθεί στη δράση τους έναντι των AOB, ενώ μόνο πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στη δράση των ΠΝ

έναντι των AOA (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2013, Shen *et al.*, 2013, Papadopoulou *et al.*, 2020) παρά την τεκμηριωμένη αριθμητική υπεροχή τους έναντι των AOB σε αρκετά εδάφη (Leninger *et al.*, 2006, Nicol *et al.*, 2008, Gubry-Rungin *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα, περιορισμένες είναι οι γνώσεις σχετικά με τη δράση των ΠΝ σε άλλες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση όπως τα NOB και τα Comammox.

Οι ΠΝ διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τους βιολογικούς (ΒΠΝ) και τους συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ). Οι ΒΠΝ είναι χημικές ενώσεις που παράγονται και εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών. Βασική προϋπόθεση για την έκκριση των ΒΠΝ είναι η ανάπτυξη των φυτών παρουσία αμμωνίας (Subbarao *et al.*, 2007). Οι περισσότεροι ΒΠΝ δρουν αναστέλλοντας τα ένζυμα AMO και HAO (Subbarao *et al.*, 2007, Beeckman *et al.*, 2018), χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της δράσης τους (Coskun *et al.*, 2017). Η απελευθέρωση των ΒΠΝ σε συγκεκριμένο χώρο και χρόνο, ανάλογα με τις απαιτήσεις, τους προσδίδει πλεονέκτημα έναντι των ΣΠΝ, των οποίων η δράση είναι βραχυπρόθεσμη και άμεσα εξαρτώμενη από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των NH_4^+ , η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και το pH (Coskun *et al.*, 2017, Beeckman *et al.*, 2018). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την παρουσία ΒΠΝ σε πολλά οικοσυστήματα και πολλά είδη φυτών (Coskun *et al.*, 2017). Η αντίδραση αυτή των φυτών είναι πιθανό να οφείλεται στον ανταγωνισμό για το διαθέσιμο άζωτο του εδάφους με τους μικροοργανισμούς (Subbarao *et al.*, 2017). Το pH είναι ο βασικότερος παράγοντας που καθορίζει τη δράση και το είδος των ΒΠΝ που απελευθερώνονται από τα φυτά (Subbarao *et al.*, 2013, Coskun *et al.*, 2017).

Ο πρώτος ΒΠΝ ήταν η ουσία methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP) που απομονώθηκε το 2008 από το φυτό *Sorghum bicolor*. Το MHPP δρα κυρίως έναντι της AMO. Από το ίδιο φυτό έχουν απομονωθεί ακόμα δύο ΒΠΝ, οι ουσίες Sorgoleone και Sakuranetin. Οι χημικές αυτές ενώσεις δρουν έναντι της AMO και της HAO. Η Sakuranetin εμφανίζει ισχυρότερη και μεγαλύτερου εύρους δράση συγκριτικά με τη Sorgoleone, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον υδρόφιλο χαρακτήρα της (Coskun *et al.*, 2017). Ο πιο σημαντικός ΒΠΝ θεωρείται η ένωση Brachialactone που παράγεται από το φυτό *Brachiaria humidicola* και δρα έναντι και των δύο ενζύμων της νιτροδοποίησης (Coskun *et al.*, 2017). Ο πιο πρόσφατα απομονωμένος ΒΠΝ είναι η 1,9-Decanediol. Η ένωση αυτή απομονώθηκε από το ρύζι και αποτελεί μια αλκοόλη λιπαρού οξέος που αναστέλλει την AMO (Coskun *et al.*, 2017). Ως ΒΠΝ μπορούν να δράσουν και άλλες ενώσεις που παράγονται από τα φυτά όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα (Subbarao *et al.*, 2013), τερπενοειδή (Subbaro *et al.*, 2013, Coskun *et al.*, 2017) φαινύλια, μεθύλια (Subbarao *et al.*, 2013), μεθυλικοί και αιθερικοί εστέρες (Coskun *et al.*, 2017) (Εικόνα 12).

Εν κατακλείδι, οι ΒΠΝ έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν τις απώλειες του N από τα αγροτικά οικοσυστήματα και να αυξάνουν την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου (NUE). Συνεπώς, η εκμετάλλευση της δυνατότητας κάποιων φυτών να εκκρίνουν ουσίες που δρουν ως ΠΝ, ίσως αποτελεί μια σημαντική γεωργική πρακτική, με την οποία θα μειωθούν οι απώλειες N και θα περιοριστεί η χρήση των ΣΠΝ και οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις που αυτοί συνεπάγονται.

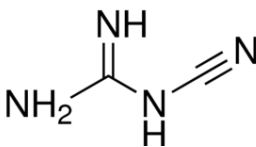
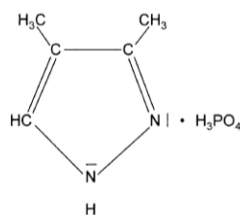
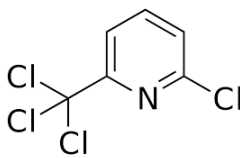
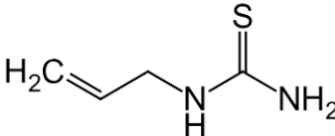
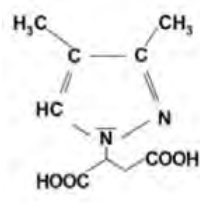


Εικόνα 12. Μερικοί από τους βιολογικούς παρεμποδιστές της νιτροποίησης, τα φυτά από τα οποία παράγονται και το σημείο δράσης τους (Coskun et al., 2017).

Η δεύτερη κατηγορία ΠΝ είναι οι συνθετικοί (ΣΠΝ). Οι παρεμποδιστές αυτοί συντίθενται χημικά. Η σύνθεσή τους υποκινήθηκε από την ανάγκη περιορισμού των απωλειών αζώτου από τα αγροτικά οικοσυστήματα, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό ως γεωργική πρακτική για την παρεμπόδιση της νιτροποίησης και την αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του αζώτου (NUE). Ωστόσο, η εφαρμογή τους παρουσιάζει μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων των δυσκολιών στην εφαρμογή, του κόστους τους, της ρύπανσης και υποβάθμισης του εδάφους, τη πιθανότητα εισχώρησης στην τροφική αλυσίδα καθώς και τη χαμηλή σταθερότητα που εμφανίζουν ορισμένοι από αυτούς (Coskun et al., 2017). Επιπλέον, ο χρόνος δράσης των ΣΠΝ είναι περιορισμένος και δεν διαρκεί περισσότερο από μερικές εβδομάδες, συχνά λιγότερο και από μια εβδομάδα (Subbarao et al., 2017). Οι ΣΠΝ εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα στη μείωση εκπομπών αέριων μορφών αζώτου, όμως είναι πιθανό να οδηγήσουν και σε εκπομπή αέριας αμμωνίας (Coskun et al., 2017).

Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων έχουν προταθεί ως πιθανοί ΠΝ (Mc Carty 1999). Οι κύριοι ΠΝ που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργική πρακτική σε παγκόσμιο επίπεδο είναι οι nitrapyrin (NP) (Goring et al., 1962), DCD (Solansky 1982) και DMPP (Zerulla et al., 2001). Άλλες χημικές ενώσεις όπως το ακετυλένιο, η allylthiourea και το DMPSA αποτελούν σημαντικούς και αποτελεσματικούς ΣΠΝ οι οποίοι ωστόσο δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην πράξη για διαφορετικούς λόγους ο καθένας (Πίνακας 1).

Πίνακα 1. Χημική δομή γνωστών συνθετικών παρεμποδιστών νιτροποίησης.

Συνθετικός αναστολέας	Χημική δομή
Dicyandiamide (DCD)	
3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP)	
2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (Nitrapyrin)	
Ακετυλένιο (C ₂ H ₂)	H—C≡C—H
Allylthiourea	
3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA)	

Το NP ανακαλύφθηκε το 1962 (Goring 1962) και φέρεται να δρα ως χηλικός παράγοντας, δεσμεύοντας το χαλκό, που είναι απαραίτητος για τη δράση της AMO (Subbarao *et al.*, 2006). Επιπρόσθετα, μπορεί να δρα ως εναλλακτικό υπόστρωμα της υπομονάδας αποB της AMO, οδηγώντας στην παραγωγή προϊόντων που αναστέλλουν τη νιτροποίηση (Vanelli and Hooper 1992). Το NP εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα τόσο έναντι των AOB όσο και των AOA (Shen *et al.*, 2013, Papadopoulou *et al.*, 2020). Ως οργανική ένωση χλωρίου

εμφανίζει μεγάλη αστάθεια (Zaman *et al.*, 2009) και μπορεί να επιφέρει προβλήματα κατά την εφαρμογή της καθώς αποτελεί διαβρωτική ουσία που μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα (Zerulla *et al.*, 2001).

Το DCD χρησιμοποιείται ευρέως ως ΠΝ λόγω της σχετικά υψηλής αποτελεσματικότητας του (Gong *et al.*, 2013). Ο τρόπος δράσης του DCD δεν είναι ακόμα γνωστός με επικρατέστερη τη δράση του ως χηλικός παράγοντας (Subbarao *et al.*, 2007). Η δράση του έχει επικεντρωθεί στα AOB όπου έχει βρέθει να προκαλεί μείωση της αφθονίας τους (Subbarao *et al.*, 2007). Το DCD είναι μια ένωση με υψηλή υδατοδιαλυτότητα και μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος (Zerulla *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2015), μη πτητική (Gong *et al.*, 2013), με υψηλό κόστος παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα (Zerulla *et al.*, 2001). Σημαντικό μειονέκτημα του συγκεκριμένου ΠΝ είναι η δημιουργία προβλημάτων φυτοτοξικότητας ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον (Zerulla *et al.*, 2001).

Ένας ακόμα ΣΠΝ που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η ένωση του 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) που επίσης εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα παρεμπόδισης της νιτροποίησης (Gong *et al.*, 2013). Το DMPP είναι μια ετεροκυκλική ένωση N (Chen *et al.*, 2015) με το μηχανισμό δράσης της να παραμένει ακόμα άγνωστος. Ο παρεμποδιστής αυτός δρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και θεωρείται πιο δραστικός από το DCD (Chen *et al.*, 2015). Το DMPP είναι μια μη πτητική ένωση με χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος (Chen *et al.*, 2015). Τόσο το DMPP όσο και το DCD δεν επηρεάζουν κάποιο άλλο μεταβολικό μονοπάτι μικροοργανισμών πέραν της οξειδωσης της αμμωνίας (Benckiser *et al.*, 2013).

Το ακετυλένιο (C_2H_2) είναι ένας αποτελεσματικός ΠΝ σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Wang *et al.*, 2016). Ο παρεμποδιστής αυτός δρα ως εναλλακτικό υπόστρωμα της AMO (Vajjala *et al.*, 2014), καθώς συνδέεται στην αποΑ υπομονάδα και εμποδίζει τη σύνδεση της υπομονάδας αποB (Gilch *et al.*, 2009). Η δράση του ασκείται τόσο στα AOB όσο και στα AOA (Gilch *et al.*, 2009) και είναι πιο ισχυρή από τη δράση του DCD (Wang *et al.*, 2016).

Η allylthiourea είναι ένας χηλικός παράγοντας που αναστέλλει το ένζυμο της AMO (Subbarao *et al.*, 2007). Η ανασταλτική δράση του είναι μη αναστρέψιμη (Li *et al.*, 2009). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη λειτουργία των AOB και σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτή των AOA (Tatari *et al.*, 2017).

Ένας από τους νεότερους ΠΝ είναι το 3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA). Οι αναφορές για τον παρεμποδιστή αυτό είναι περιορισμένες και ο μηχανισμός δράσης του παραμένει ακόμα άγνωστος (Recio *et al.*, 2018). Ωστόσο, μια πιθανή εξήγηση της δράσης του βασίζεται στη παρουσία της διμεθυλοπυραζόλης (DMP), η οποία απελευθερώνεται μετά τη διάσπαση του DMPSA (Recio *et al.*, 2018). Η δράση του όσο αναφορά την παραγωγή και την εκπομπή του υποξειδίου του αζώτου (N_2O) είναι όμοια με αυτή του DMPP (Guardia *et al.*, 2018). Το DMPSA επιπλέον είναι σταθερό σε αλκαλικές συνθήκες, γι' αυτό και μπορεί να συνδυάζεται με πολλά λιπάσματα αζώτου (Huérffano *et al.*, 2016).

Η χρήση των ΣΠΝ αποτελεί μια εύκολη γεωργική πρακτική, προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες αζώτου και να αυξηθεί η παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Η επιλογή του κατάλληλου παρεμποδιστή εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και το είδος των μικροοργανισμών που συναντώνται στο έδαφος (Benckiser *et al.*, 2013).

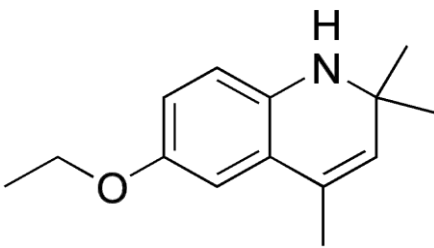
1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση

Το ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) είναι αντιοξειδωτικό της ομάδας των κινολινών (Thorisson *et al.*, 1992) που έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την οξείδωση των λιπιδίων (Baszczyk *et al.*, 2013). Η αντιοξειδωτική δράση του EQ έγκειται στην ιδιότητα του να αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που συναντά, καθώς παρεμβάλλεται προστατεύοντας άλλες ενώσεις. Τέσσερις κύριοι μεταβολίτες προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξείδωσης του EQ: 2,4,6-dimethylquinoline, quinone-imine-N-oxide, quinone-imine, και ethoxyquin 1,8-dimer (Brannegan 2000). Τα προϊόντα οξείδωσης του EQ έχουν εξίσου αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που διακρίνει το EQ από άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες (Shah *et al.*, 2005). Οι γενικές ιδιότητες του EQ παρατίθενται στο Πίνακα 2.

Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης, το EQ χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό στη βιομηχανία κρεάτων και ψαριών και στα συσκευαστήρια φρούτων για τη μετασυλεκτική προστασία των μήλων από τη φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητας τους, που εκδηλώνεται με τη μορφή της καστανόχρωσης (scald) της επιδερμίδας των καρπών (Thorisson *et al.*, 1992). Η εφαρμογή του EQ στις μονάδες αυτές οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις του EQ και χρήζουν επεξεργασίας πριν την οριστική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Εξαιτίας ωστόσο του υψηλού κόστους που ενέχει η διαχείριση των αποβλήτων και της απουσίας καθιερωμένου συστήματος διαχείρισης, καταλήγουν τελικά στο περιβάλλον μέσω απόρριψης σε γειτονικούς υδάτινους ή εδαφικούς φορείς.

Πίνακας 2. Ιδιότητες και χημική δομή του Ethoxyquin (EQ)

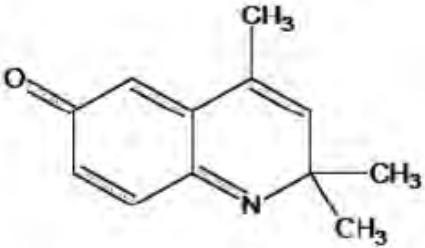
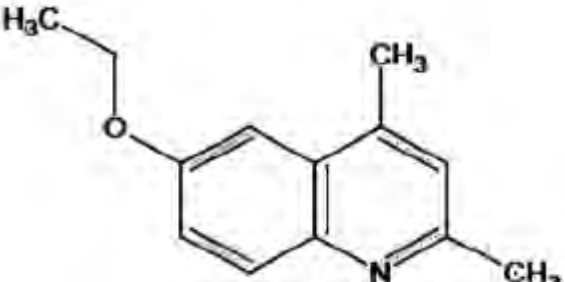
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	Ethoxyquin (EQ)
Χημικός τύπος	$C_{14}H_{19}NO$
Μοριακό βάρος	217.31 g/mol
Σημείο βρασμού	125 ° C σε 1-2 mm Hg
Ειδικό βάρος	1.028 – 1.032



Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (ΒΦΠ) έδειξαν πως το ethoxyquin (EQ) στο έδαφος και σε υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στο κύκλο του αζώτου, οξειδώνεται ταχύτατα προς δύο κύρια μεταβολικά προϊόντα, τα quinone imine (QI) και 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) (Πίνακας 3) (Karas *et al.*, 2015,

Paradourou *et al.*, 2016, Paradourou *et al.*, 2020), που εμφανίζουν αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση με το ethoxyquin (EQ) (Baszczyk *et al.*, 2013). Το QI αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη, σχηματίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και εμφανίζει μικρότερη υπολειμματικότητα σε σχέση με το έμμοιο EQNL που αποτελεί το δευτερεύοντα μεταβολίτη και σχηματίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Paradourou *et al.*, 2015, Paradourou *et al.*, 2020). Μετρήσεις σε μοριακό (RT-q-PCR *amoA* γονιδίου) και βιοχημικό επίπεδο (δυσνητική νιτροποίηση), σε δείγματα εδάφους έδειξαν προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης στο έδαφος σε όλες τις μεταχειρίσεις όπου ο κύριος μεταβολίτης QI εφαρμόστηκε ή σχηματίστηκε (QI, EQ και μίγμα QI+EQNL) (Paradourou *et al.*, 2016). Ακόλουθη αξιολόγηση της επίδρασης του EQ και των οξειδωτικών του παραγώγων σε υγρές καλλιέργειες επιλεγμένων εδαφογενών στελεχών AOB, AOA και NOB (δεδομένης της μη διαθεσιμότητας εδαφογενών στελεχών *Comammox*) σε σύγκριση με τα DCD, nitroarginin και DMPP, έδειξε ότι το EQ και κυρίως το QI παρουσιάζει ικανότητα αναστολής των AOA και AOB, με τα πρώτα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Από τους υπόλοιπους διαθέσιμους ΠΝ μόνο το nitroarginin ασκεί ανάλογη παρεμποδιστική δράση με το EQ έναντι των AOA, ενώ περιορισμένη εμφανίζεται η δράση των DCD και DMPP (Paradourou *et al.*, 2020).

Πίνακας 3. Χημική δομή των κύριων οξειδωτικών παραγώγων του EQ στο έδαφος.

Μεταβολικά προϊόντα EQ	Χημική δομή
2,6-Dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine, QI)	
2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL)	

1.5 ΣΤΟΧΟΙ

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της εκτός στόχου δράσης τοξικότητας του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του EQ, QI σε σύγκριση με τους γνωστούς PN, NP, DCD και DMPP, σε πειράματα μικροκόσμων εδάφους. Στα πλαίσια του παραπάνω κεντρικού στόχου τέθηκαν οι εξής επιμέρους στόχοι:

- I. Η μελέτη της επίδρασης των PN στην αφθονία και τη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών
- II. Η μελέτη της επίδρασης των PN στην αφθονία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε διεργασίες του κύκλου του αζώτου που έπονται της νιτρωδοποίησης και σχετίζονται λειτουργικά με αυτή, όπως τα NOB και οι απονιτροποιητές
- III. Η μελέτη της επίδρασης των PN στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της συνολικής μικροβιακής κοινότητας, όπως βακτήρια, μύκητες και αρχαία
- IV. Η μελέτη της πορείας αποδόμησης των PN στα εδαφικά δείγματα, προκειμένου να πραγματοποιηθούν συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των ουσιών και των παρατηρούμενων μεταβολών στη μικροβιακή κοινότητα.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων επιλέχθηκαν δύο εδάφη χαρακτηριστικά των αγροτικών οικοσυστημάτων στην Ελλάδα με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και διαφοροποίηση ως προς το pH (όξινο και αλκαλικό), καθώς το pH αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που βρέθηκαν να επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία των κοινοτήτων των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών στα εδαφικά οικοσυστήματα. Για τη μεγιστοποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών αλλά και της δράσης των μελετούμενων ουσιών πριν την εφαρμογή τους στους μικροκόσμους εδάφους προστέθηκε ουρία ως πηγή N.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των δύο εδαφών, προσδιορίστηκαν με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο εδαφών που συλλέχθηκαν.

Ιδιότητες	Έδαφος 1	Έδαφος 2
pH (σε H ₂ O)	7.4	5.1
Οργανική Ουσία (%)	3.6	4.4
N	0.08	0.13
C	1.8	2.2
Άμμος (%)	45.8	40.8
Ιλύς (%)	36.0	47.8
Άργιλος (%)	18.2	11.4
Μηχανική σύσταση	Πηλώδες	Πηλώδες

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των ΠΝ σε δυο εδάφη με διαφοροποίηση ως προς την τιμή του pH, ένα αλκαλικό πηλώδες έδαφος και ένα όξινο πηλώδες, που συλλέχθηκαν από επιλεγμένα αγροτεμάχια του νομού Θεσσαλίας. Συνολικά, συλλέχθηκαν 2,5 kg ανά έδαφος και αεροξηράθηκαν μερικώς για διάστημα 48 ωρών. Ακολούθησε κοσκίνισμα του εδάφους με κόσκινο διαμετρήματος πόρων 2 mm. Στην συνέχεια προστέθηκε υδατικό διάλυμα ουρίας, ως πηγή N, ώστε η τελική συγκέντρωση της ουρίας σε κάθε έδαφος να είναι 1g kg⁻¹ ξηρού βάρους εδάφους (που αντιστοιχεί σε 0.47 g -N-kg⁻¹ ξηρού βάρους εδάφους). Τα εδάφη αναδεύθηκαν επιμελώς και διατηρήθηκαν στη συνέχεια για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι πριν την εφαρμογή των ΠΝ. Κατόπιν, η συνολική ποσότητα του εδάφους διαχωρίστηκε σε 5 επιμέρους δείγματα των 500g. Σε κάθε ένα από τα επιμέρους δείγματα εδάφους προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος ενός εκ των QI, nitragrylin σε ακετονιτρίλιο (4ml διαλύματος συνολικά) λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των συγκεκριμένων ουσιών και κατάλληλος όγκος υδατικού διαλύματος DCD και DMPP, που παρασκευάστηκαν από τα αντίστοιχα εμπορικά πρότυπα των ουσιών, ώστε να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στο Πίνακα 5. Στα εδαφικά δείγματα που δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις των DCD και DMPP, προστέθηκε συμπληρωματικά αντίστοιχος όγκος ακετονιτρίλιου με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στις μεταχειρίσεις των QI και NP, προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιογένεια μεταξύ των μεταχειρίσεων. Στο τελευταίο δείγμα εδάφους προστέθηκε ανάλογη ποσότητα

ακετονιτριλίου και στη συνέχεια νερού χωρίς την προσθήκη ΠΝ προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας.

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις ΠΝ που εφαρμόστηκαν στα εδαφικά δείγματα.

Παρεμποδιστές Νιτροποίησης	Συγκέντρωση (mg kg ⁻¹ ξβ εδάφους)
Control	0
QI	10
DCD	15.38
Nitrapyrin	0.86
DMPP	1.54

Ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού ώστε να προσαρμοστεί η υγρασία του εδάφους στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Τα δείγματα εδάφους στην συνέχεια, αφού αναμίχθηκαν επιμελώς αφέθηκαν για 2-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (25±1⁰C) ώστε να επέλθει ισορροπία και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των ΠΝ. Κατόπιν, τα δείγματα διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε υπο-δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές αεροστεγείς σακούλες και επωάστηκαν στο σκοτάδι, στους 20°C.

Για τη μελέτη της επίδρασης των ΠΝ:

- στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους (συγκέντρωση NH₄⁺/NO₃⁻, ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης και αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA),
- στην αφθονία μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε μετέπειτα της νιτροδοποίησης στάδια του κύκλου του N (αφθονία του *nxB* γονιδίου των NOB και των *narG*, *nirS* και *nosZ* γονιδίων των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών)
- στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας, εκτός στόχου δράσης (αφθονία του *16s rRNA* γονιδίου των βακτηριών, αφθονία του *18S rRNA* γονιδίου των μυκήτων και την αφθονία του *16S rRNA* των Κρεναρχαίων)

καθώς και για τη μελέτη της πορείας αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών, τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν στους χρόνους 3, 7, 14, 21 και 35 ημέρες μετά την προσθήκη των ουσιών στο έδαφος και είτε αναλύθηκαν άμεσα (προσδιορισμός συγκέντρωσης NH₄⁺/NO₃⁻, προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης) είτε αποθηκεύτηκαν στους -80°C και -20°C (δείγματα που προορίζονταν για qPCR και HPLC ανάλυση, αντίστοιχα) μέχρι να αναλυθούν περαιτέρω.

Τα εμπορικά πρότυπα των ουσιών DCD (99%) και NP (≥98%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich ενώ το αναλυτικό πρότυπο του DMPP (99%) αποτέλεσε ευγενική χορηγία της εταιρείας BASF. Λόγω της απουσίας διαθέσιμων εμπορικών πρότυπων ουσιών, η σύνθεση του μεταβολικού προϊόντος του EQ, QI πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με τους Thorisson *et al.*, 1992.

2.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη λειτουργία των Νιτροποιητικών μικροοργανισμών

2.3.1 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των NH_4^+ και NO_3^- στο έδαφος

Για το σκοπό αυτό 2 g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε falcon των 50 ml όπου και προστέθηκαν 20 ml KCl 1M και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντια αναδευτήρα για 30 min. Το εκχύλισμα που προέκυψε διηθήθηκε από φίλτρο Whatman 42 σε falcon των 15ml και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση του.

2.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NH_4^+ στο έδαφος

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα οξείδωσης: 0,1 g dichloroisocyanuric acid sodium salt dihydrate διαλύθηκαν σε 100 ml dd H_2O
- NaOH 0,3M: 11,97 g NaOH διαλύθηκαν σε 1000 ml dd H_2O
- sodium salicylat: 8,5 g sodium salicylat και 63,9 mg sodium nitroprusside dihydrate διαλύθηκαν σε 50 ml dd H_2O

Αρχή της μεθόδου-Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός των NH_4^+ στα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο της Kandeler (1995). Για το σκοπό αυτό 600 μl εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε erpendorfs των 1,5 ml και κατόπιν προστέθηκαν 120 μl διαλύματος οξείδωσης για την οξείδωση του περιεχομένου στο δείγμα $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε χλωραμίνη από το άλας νατρίου του δίχλωρο-ισοκυανουρικού οξέος και 300 μl χρωματικού δείκτη, που παρασκευάστηκε με ανάμιξη διαλυμάτων 0,3 M NaOH, sodium salicylat και dd H_2O σε αναλογία 1:1:1 (ο/ο/ο), για τον σχηματισμό πράσινης ινδοφαινόλης, παρουσία φαινολικών ενώσεων στο αλκαλικό περιβάλλον. Κατόπιν ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων για 30min σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 300 rpm. Έπειτα 300μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate) και πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), στα 660nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,0195 -20 mg $\text{NH}_4\text{Cl-N L}^{-1}$.

2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NO_3^- στο έδαφος

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα χλωριούχου βαναδίου 50,9mM: 400 mg vanadium chloride διαλυθήκαν σε 50 mL 1 M HCl ακολούθησε φιλτράρισμα με τη βοήθεια Whatman φίλτρου
- Διάλυμα σουλφιναμίδης 58 mM: 5 g sulfanilamide διαλύθηκαν σε 500 mL 3 M HCl
- Διάλυμα N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,77mM: 50 mg N-naphthylethylenediamine dihydrochloride διαλύθηκαν σε 250 mL d H_2O

Αρχή της μεθόδου-Πειραματική διαδικασία:

Ο προσδιορισμός των NO_3^- στα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά μέσω σύζευξης με το αντιδραστήριο Griess, σύμφωνα με τους Miranda *et al.*, (2001). Για το σκοπό αυτό, 100 μl δείγματος και 100 μl διαλύματος χλωριούχου βαναδίου 50,9mM μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate), προκειμένου να επιτευχθεί η μετατροπή του περιεχόμενου στο δείγμα NO_3^- -N σε NO_2^- -N. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε προσθήκη 50 μl διαλύματος σουλφιναμίδης 58 mM και 50 μl υδατικού διαλύματος N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,77mM (αντιδραστήριο Griess). Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 60 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), στα 540nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,02 -5mg KNO_3 -N L^{-1} .

2.3.4 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM: 1.3214g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ διαλύθηκαν σε 1L αποσταγμένου νερού.
- Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM: Παρασκευάστηκε με αραιώση 100ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM, σε τελικό όγκο 1L με dH_2O .
- Διάλυμα NaClO_3 1,5M: 15.97 g NaClO_3 διαλύθηκαν σε 100ml dH_2O .
- Διάλυμα KCl 2M: 149.12 g KCl διαλύθηκαν σε 1L dH_2O .
- Ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl 0,19M, pH 8.5: 10.163 g NH_4Cl διαλύθηκαν σε 1L dH_2O και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,5.
- Χρωματικός δείκτης: 2 g σουλφανιλαμίδιο και 0.1 g υδροχλωρική N-(1-ναφθυλ)-αιθυλενο-διαμίνη διαλύθηκαν σε 150 ml αποσταγμένου νερού και ακολούθησε προσθήκη 20 ml πυκνού ορθο-φωσφορικού οξέος και συμπλήρωση του όγκου διαλύματος στα 200 ml με dH_2O .
- Πυκνό διάλυμα NaNO_2 (1000μg NO_2^- -N ml^{-1}): 4.926 g NaNO_2 διαλύθηκαν σε 1L dH_2O .
- Διάλυμα εργασίας NaNO_2 (10μg NO_2^- -N ml^{-1}): Προέκυψε με αραιώση 5 ml του πυκνού διαλύματος NaNO_2 σε τελικό όγκο 500 ml με αποσταγμένο νερό.

Αρχή της μεθόδου-Πειραματική διαδικασία:

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο Kandeler (1995). Συγκεκριμένα, 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη

μετατροπή του σε NO_2^- από τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Έπειτα προστέθηκε 0,1ml NaClO_3 1,5M που δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξείδωσης των νιτρωδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτρωδών (NO_2^-) αντί νιτρικών (NO_3^-) ιόντων (Belser and Mays, 1980). Ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος. Για κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάστηκε ένα δείγμα για κάθε μεταχείριση που χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ως μάρτυρας αναφοράς. Τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20°C , με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτρωδοποίησης.

Μετά το πέρας των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολούθησε προσθήκη 5 ml διαλύματος KCl 2M για τη δέσμευση των ιόντων NH_4^+ και NO_3^- , σύντομη ανάδευση και διήθηση. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0,19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- . Ακολούθησε ανάδευση για ομογενοποίηση του μίγματος και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Έπειτα 300μl από κάθε δείγματα μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate) και πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), στα 520nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα εδαφικά δείγματα νιτρωδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 ml διαλύματος NaNO_2 ($10\mu\text{g NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml, με αποσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και $1.0\mu\text{g NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$. Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και $0.5\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0,19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη (Kandeler, 1995).

2.4 Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η εξαγωγή του DNA από τα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη εξαγωγή του RNA (προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μετέπειτα πειράματα της ερευνητικής ομάδας) με τη χρήση των εμπορικών κιτ RNeasy PowerSoil DNA Elution Kit (Qiagen, Germany) και RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, Germany), αντίστοιχα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.5 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στη αφθονία των Νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των υπό μελέτη ουσιών στην αφθονία των AOB και AOA στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA (συγκέντρωσης $1\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 14, και 35 ημέρες μετά την εφαρμογή των ΠΝ. Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

2.5.1 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

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

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 6 .

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>amoA</i> -1F (20 pmol/ μl)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής <i>amoA</i> -2R (20 pmol/ μl)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.2 μL	400 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$
DNA	2 μL	2 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOB

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

2.5.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA

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

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

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 8 .

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOA

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής Arch-<i>amoAF</i> (20 pmol/μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής Arch-<i>amoAR</i> (20 pmol/μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20$\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	400ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH₂O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOA

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

2.6 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτρωδοποίησης στάδια του κύκλου του N

Για τη μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτρωδοποίησης στάδια του κύκλου του N πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA ($1\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 14, και 35 ημέρες μετά την εφαρμογή των ΠΝ. Οι μικροοργανισμοί, των οποίων η αφθονία μελετήθηκε ήταν τα NOB και οι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί. Στην περίπτωση των NOB εξετάστηκε η αφθονία *nxB* γονιδίου των βακτηρίων, που ανήκουν στα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira*. Για τη μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς μελετήθηκε η αφθονία των γονιδίων *narG*, *nirS* και *nosZ*. Η ποσοτικοποίηση όλων των μελετούμενων γονιδίων πραγματοποιήθηκε με qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

2.6.1 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των *Nitrobacter*

Για την ενίσχυση του *nxB* των *Nitrobacter* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nxB1F* και *nxB1R* (Vanparys *et al.*, 2007). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *nxB-1R*: 5'-CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA-3' [Y: C or T])
- *nxB-1F*: 5'-ACGTGGAGACCAAGCCGGG-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *nxB* γονιδίου των *Nitrobacter*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>nxB1F</i> (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής <i>nxB1R</i> (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	400ng μL^{-1}
DNA	2 μL	-
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *nxB* των *Nitrobacter*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	
Υβριδοποίηση	57 °C	20sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

2.6.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nxB* των *Nitrospira*

Για την ενίσχυση του *nxB* των *Nitrospira* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nxB169f* και *nxB638r* (Pester *et al.*, 2014). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *nxB169f*: 5'- TAC ATG TGG TGG AAC A -3'
- *nxB638r*: 5'- CGG TTC TGG TCR ATC A -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *nxB* γονιδίου των *Nitrospira*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>nxB169f</i> (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής <i>nxB638r</i> (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	400ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *nxrB* των *Nitrospira*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	56.2 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

2.6.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *narG*

Για την ενίσχυση του *narG* των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *narGf* και *narGr* (Bru et al., 2007). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *narG f*: 5'- TCG CCS ATY CCG GCS ATG TC -3'
- *narG r*: 5'-GAG TTG TAC CAG TCR GCS GAY TCS G -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *narG* γονιδίου.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>narGf</i> (20 pmol/μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής <i>narGr</i> (20 pmol/μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20$\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	400ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH₂O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *narG*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	6 κύκλοι
Υβριδοποίηση	63 °C/58 °C (1 °C/cycle)	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	11 sec	
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	34 κύκλοι
Υβριδοποίηση	60 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	11 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °C για 5sec	

2.6.4 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nirS*

Για την ενίσχυση του *nirS* των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nirSR* 3cdm και *nirSC* d3afm primers (Thorback et al., 2004). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *nirSR* 3cdm: 5'- GAS TTC GGR TGS GTC TTS AYG AA-3'
- *nirSC* d3aFm: 5'- AAC GYS AAG GAR ACS GG -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *nirS* γονιδίου.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>nirSR</i> 3cdm (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής <i>nirSC</i> d3aFm (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	200ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *nirS*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 cycle
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	6 cycles
Υβριδοποίηση	63 °C/58 °C (1 °C/cycle)	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	35 cycles
Υβριδοποίηση	60 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °C για 5sec	

2.6.5 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nosZ*

Για την ενίσχυση του *nosZ* των απονιτροποιητών χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *nosZ* 2R και *nosZ* 2F (Henry *et al.*, 2006). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *nosZ* 2F: 5'- CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT -3'
- *nosZ* 2R: 5'- CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL, με τα επιμέρους συστατικά χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *nosZ* γονιδίου.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής <i>nosZ</i> 2F (20 pmol/μl)	0.1 μL	0.2μM
Εκκινητής <i>nosZ</i> 2R (20 pmol/μl)	0.1 μL	0.2μM
BSA (20μg/μl)	0.2 μL	400ngμL ⁻¹
DNA	2 μL	2ng μl ⁻¹
ddH₂O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *nosZ*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1cycle
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	6 cycles
Υβριδοποίηση	63 °C/60 °C (1 °C/cycle)	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	36 cycles
Υβριδοποίηση	60 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °C για 5sec	

2.7 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών εκτός στόχου δράσης, πραγματοποιήθηκε qPCR στα δείγματα DNA (1ng μl⁻¹) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 14, και 35 ημέρες μετά την εφαρμογή των ΠΝ. Οι μικροοργανισμοί των οποίων η αφθονία μελετήθηκε ήταν τα βακτήρια, οι μύκητες και τα αρχαία της συνωμοταξίας Chrenarchaeota. Στη περίπτωση των βακτηρίων και των αρχαίων της συνωμοταξίας Chrenarchaeota εξετάστηκε η αφθονία του γονιδίου 16S rRNA ενώ σε αυτή των μυκήτων η αφθονία του 18S rRNA.

2.7.1 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων

Για την ενίσχυση του 16S rRNA των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Eub 338 και Eub 518 (Fierer et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Eub 338: 5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'
- Eub 518: 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής Eub 338 (20 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής Eub 518 (20 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.2 μL	400 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$
DNA	2 μL	2 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10 μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	60 °C	20sec	
Επιμήκυνση	72 °C	10 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

2.7.2 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *16S rRNA* των αρχαίων της συνωμοταξίας Crenarhaeota

Για την ενίσχυση του γονιδίου *16S rRNA* των Chrenarchaeota χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 771F και 957R (Ochsenreiter *et al.*, 2003). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- 771F: 5'- ACG GTG AGG GAT GAA AGC T -3'
- 957R: 5'- CGG CGT TGA CTC CAA TTG -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 22.

Πίνακας 22. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Chrenarchaeota.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής 771F (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής 957R (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	400ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH ₂ O	2.4 μL	-
Συνολικός όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 23. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Chrenarchaeota.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	3 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	30sec	
Επιμήκυνση	72 °C	55 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

2.7.3 Μελέτη της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *18S rRNA* των μυκήτων

Για την ενίσχυση του *18S rRNA* των μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές FR1 και FF390 (Chemidlin et al., 2011). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- FR1: 5'- AICCATTC AATCGGTAIT -3'
- FF 390: 5'- CGATAACGAACGAGACCT -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μL , με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *18S rRNA* γονιδίου των μυκήτων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μL	1x
Εκκινητής FR1 (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
Εκκινητής FF390 (20 pmol/ μL)	0.1 μL	0.2 μM
BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2 μL	200ng μL^{-1}
DNA	2 μL	2ng μL^{-1}
ddH ₂ O	2.6 μL	-
Συνολικός όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 25. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του *18S rRNA* γονιδίου των μυκήτων.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	50 °C	35sec	
Επιμήκυνση	72 °C	10 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

2.8 Ποσοτικοποίηση αντιγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων των λειτουργικών γονιδίων των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα επιμέρους δείγματα, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, με τη χρήση αραιώσεων ανασυνδιασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το εκάστοτε λειτουργικό γονίδιο (Rousidou et al., 2013). Σε κάθε περίπτωση οι τιμές του R^2 και του efficiency των πρότυπων καμπύλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση παρατίθενται στον Πίνακα 26.

Πίνακας 26. Οι τιμές του R^2 και του efficiency των πρότυπων καμπύλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων

Γονίδια	Αλκαλικό έδαφος		Όξινο έδαφος	
	Efficiency (%)	R^2	Efficiency (%)	R^2
<i>amoA</i> AOB	97,4	0,981	82,1	0,997
<i>amoA</i> AOA	100,8	0,989	91,6	0,996
<i>nxrB</i> Nitrobacter	113,3	0,991	102,7	0,991
<i>nxrB</i> Nitrospira	103,3	0,999	84,1	0,992
<i>narG</i>	72,2	0,996	95,1	0,951
<i>nirS</i>	100,6	0,991	85,5	0,997
<i>nosZ</i>	89,3	0,999	90,4	0,994
<i>16S rRNA</i> total bacteria	105,6	0,996	103,1	0,991
<i>18S rRNA</i> fungi	99,7	0,997	114,4	0,988
<i>16S rRNA</i> Chrenarchaeota	103,1	1	95,3	0,998

2.9 Μελέτη της αποδόμησης των ΠΝ στο έδαφος

Η μελέτη της πορείας αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών στο έδαφος πραγματοποιήθηκε μετά από εκχύλιση και παραλαβή τους από τα εδαφικά δείγματα που συλλέγονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση και προσδιορισμός τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC).

2.9.1 Εκχύλιση των ΠΝ από το έδαφος

Η παραλαβή του QI από το έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS (Anastasiades et al., 2003), με ελάχιστες τροποποιήσεις σύμφωνα με τους Karas et al. (2015). Η μέθοδος QuEChERS περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια: το στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο του καθαρισμού. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, 5 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon χωρητικότητας 50 ml, με καπάκι, και αναμείχθηκαν με 5 ml κρύου αποσταγμένου H₂O (4°C). Ακολούθησε σύντομη ανακίνηση, προσθήκη 10 ml διαλύτη ακετονιτριλίου και έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα αλάτων, αποτελούμενο από 4 g MgSO₄, 1 g NaCl και 1,5 g C₆H₅Na₃O₇ · H₂O και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min σε 7500 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε καθαρισμό. Συγκεκριμένα, κλάσμα όγκου 1 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml) που περιείχε 150 mg MgSO₄ και 25 mg PSA και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 30 sec και φυγοκέντρηση για 1 min σε 13000 rpm.

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

Η εκχύλιση του DCD από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Kim et al. (2014). Συγκεκριμένα, 5 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 ml και αναμείχθηκαν με 10 ml dd H₂O. Ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα, στα 250 rpm για 1 h και έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min σε 7500 rpm. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 2 ml εκχυλίσματος όπου και προστέθηκαν 80 μl 0,66M sulfuric acid και τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min σε 13000 rpm.

Για την εκχύλιση του DMPP από το έδαφος, 2 g εδαφικού δείγματος ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon χωρητικότητας 50ml, με ειδική εσωτερική υδρόφοβη επιστρώση. Έπειτα, προστέθηκαν 5ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων pH 8 (για την παρασκευή του οποίου 8,141g K₂HPO₄ και 0,444 g KH₂PO₄ διαλύθηκαν σε 1L dd H₂O), ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 10min, τοποθέτηση σε μπανάκι υπερήχων για 10min και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5min σε 7500 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε μία ακόμα φορά και ακολούθησε ένωση των υπερκειμένων και φυγοκέντρηση για 10min σε 13000 rpm.

Τέλος σε όλες τις περιπτώσεις τα επιμέρους δείγματα διηθήθηκαν διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0.45 μm και αναλύθηκαν χρωματογραφικά.

2.9.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Η πορεία της αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών στα εδαφικά δείγματα παρακολούθηθηκε με ανάλυση των εκχυλισμάτων τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης σε σύστημα HPLC-PDA SHIMADZU LC-20AD, με στήλη SHIMADZU VP-ODs διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και η θερμοκρασία της στήλης 25°C στην περίπτωση των NP και QI και 40°C στην περίπτωση των DCD και DMPP. Η εκλούση των DCD, NP και QI πραγματοποιήθηκε υπό ισοκρατικές συνθήκες, σε αντίθεση με το DMPP για το οποίο χρησιμοποιήθηκε μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης με συνολικό χρόνο έκλουσης 16 min. Συγκεκριμένα, τη στιγμή της έγχυσης του παρεμποδιστή η αναλογία της κινητής φάσης ήταν 20% μεθανόλη (A) και 80% H₂O+0.1% H₃PO₄ (B). Η αναλογία αυτή διατηρήθηκε για 30sec και το περιεχόμενο του διαλύτη A αυξήθηκε γραμμικά ούτως ώστε στα 10 min μετά την έγχυση η αναλογία των διαλυτών να είναι 60% A και 40% B. Η σύσταση αυτή διατηρήθηκε έως τα 10.9 min μετά την έγχυση και στη συνέχεια η αναλογία των διαλυτών μεταβλήθηκε γραμμικά ούτως ώστε στα 11 min μετά την έγχυση να επανέλθει στην αρχική αναλογία του 20% A και 80% B, η οποία και διατηρήθηκε έως τα 16 min προκειμένου να επέλθει σταθεροποίηση. Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των ουσιών που μελετήθηκαν, παρουσιάζονται συνολικά στον Πίνακα 27.

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

Πίνακας 27. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των μελετούμενων ουσιών

Χημική ουσία	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Ροή κινητής φάσης (mL min ⁻¹)	Μήκος κύματος (nm)
QI	ACN: H ₂ O+0.25% NH ₃	70:30	1	245
NP	ACN: H ₂ O+0.1% H ₃ PO ₄	70:30	1	269
DCD	H ₂ O	100	0.8	218
DMPP	MeOH: H ₂ O+0.1% H ₃ PO ₄	Βαθμιδωτή έκλουση	1	225

2.10 Στατιστική ανάλυση

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

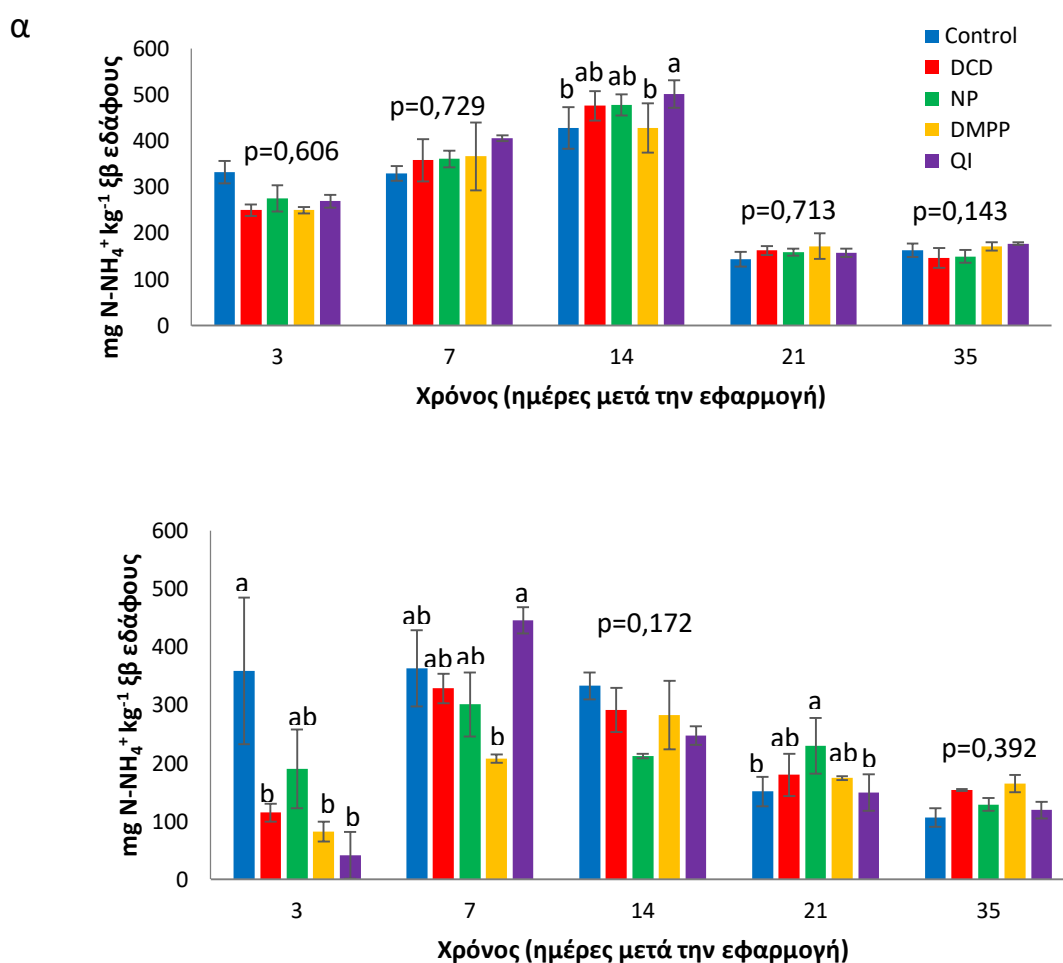
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση των ΠΝ στη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών

3.1.1 Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NH_4^+ στο έδαφος

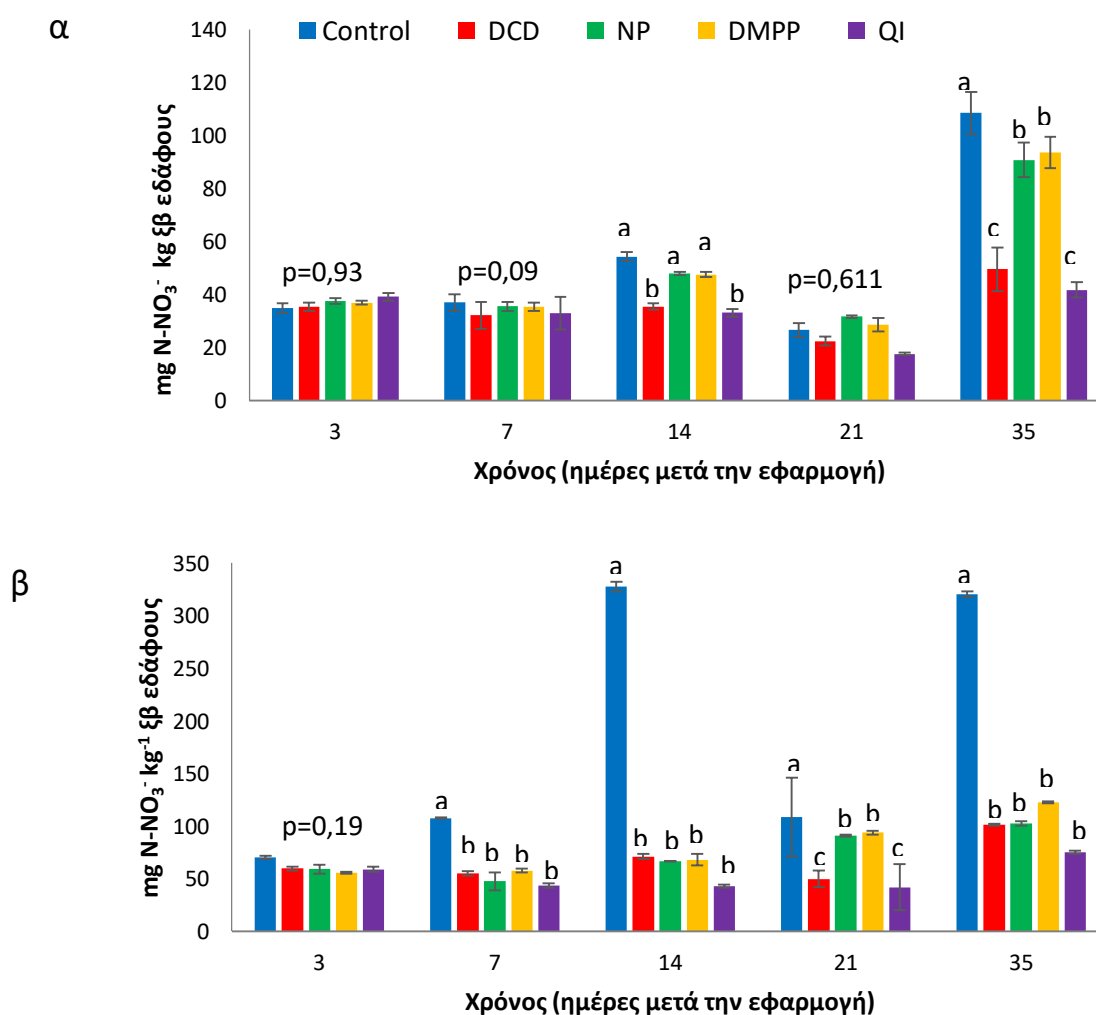
Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των εξεταζόμενων ΠΝ στη συγκέντρωση των NH_4^+ στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1α και 1β, αντίστοιχα. Στο όξινο έδαφος δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των NH_4^+ σε καμία από τις μεταχειρίσεις ($p > 0,05$). Εξάιρεση αποτέλεσε η μεταχείριση του QI, η οποία προκάλεσε παροδική αύξηση της συγκέντρωσης των NH_4^+ την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ (Διάγραμμα 1α). Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους παρατηρήθηκε παροδική αύξηση των NH_4^+ στη μεταχείριση του NP κατά την 21^η ημέρα του πειράματος. Στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το μάρτυρα ($p > 0,05$) (Διάγραμμα 1β).



Διάγραμμα 1. Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NH_4^+ στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.2 Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NO_3^- στο έδαφος

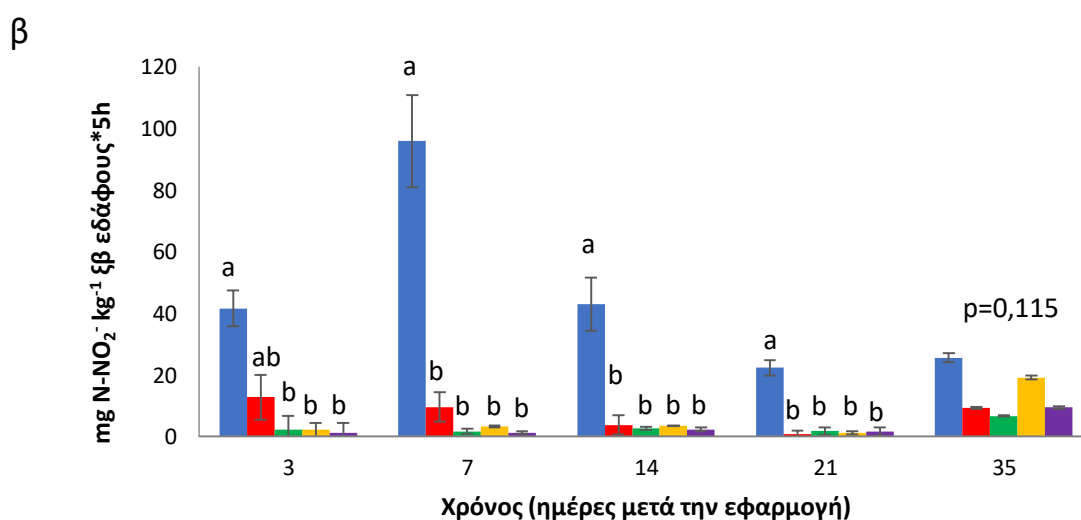
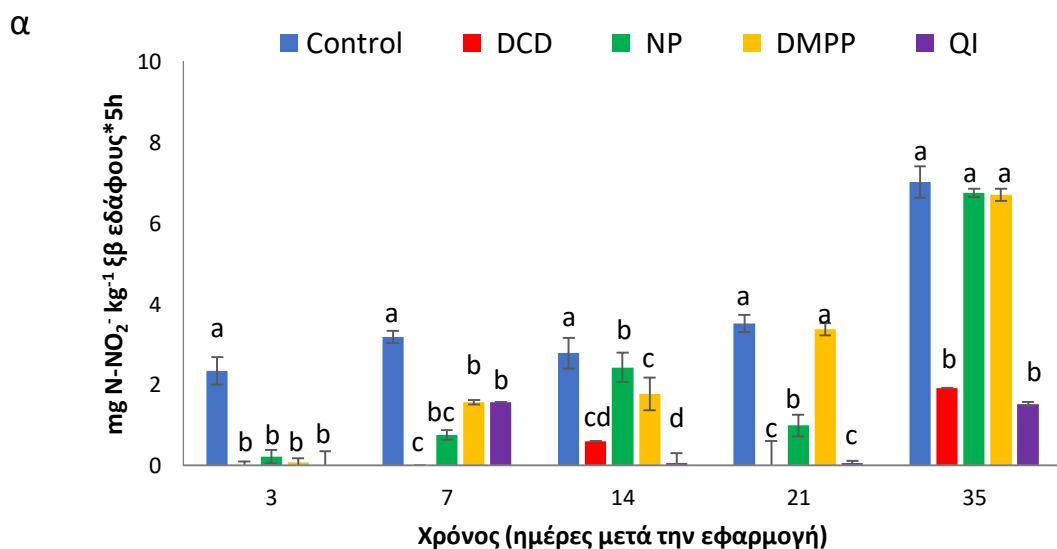
Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των μελετώμενων ουσιών στη συγκέντρωση NO_3^- στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος (Διάγραμμα 2α και 2β, αντίστοιχα). Στην περίπτωση του όξινου εδάφους παρατηρήθηκε παροδική και ανάλογη μείωση των NO_3^- στις μεταχειρίσεις του QI και του DCD, την 14^η μέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ. Την 35^η ημέρα του πειράματος, η συγκέντρωση των NO_3^- μειώθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) σε όλες τις μεταχειρίσεις συγκριτικά με το μάρτυρα, με την επίδραση των DCD και QI να είναι ισχυρότερη αυτής των NP και DMPP. Στους υπόλοιπους χρόνους όπου μελετήθηκε η συγκέντρωση των NO_3^- δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων και του μάρτυρα (Διάγραμμα 2α). Στο αλκαλικό έδαφος, από την 7^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ μέχρι και το τέλος του πειράματος, οι ΠΝ προκάλεσαν σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των NO_3^- ($p < 0,05$), με την επίδραση του QI να είναι ισοδύναμη αυτής των λοιπών ΠΝ ή παροδικά ισχυρότερη (21^η ημέρα σε σύγκριση με NP και DMPP) (Διάγραμμα 2β).



Διάγραμμα 2. Επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NO_3^- στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.3 Επίδραση των ΠΝ στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των εξεταζόμενων ΠΝ στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος παρατίθενται στα Διαγράμματα 3α και 3β, αντίστοιχα. Στο όξινο έδαφος, η εφαρμογή των DCD και QI προκάλεσε σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ($p < 0,05$) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, η οποία ήταν ισχυρότερη αυτής των NP και DMPP από την 7^η και την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή των DCD και QI, αντίστοιχα. Η εφαρμογή των NP και DMPP επίσης παρεμπόδισε το ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης ο οποίος ωστόσο επανήλθε σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 3α). Στο αλκαλικό έδαφος, όλοι οι ΠΝ προκάλεσαν σημαντική ($p < 0,05$) και ισοδύναμη μείωση του ρυθμού της δυνητικής νιτροποίησης σε σύγκριση με το μάρτυρα από την 3^η μέχρι και την 21^η ημέρα μετά την εφαρμογή τους, με εξαίρεση το DCD του οποίου η επίδραση, παρατηρήθηκε από την 7^η ημέρα μετά την εφαρμογή του (Διάγραμμα 3β).

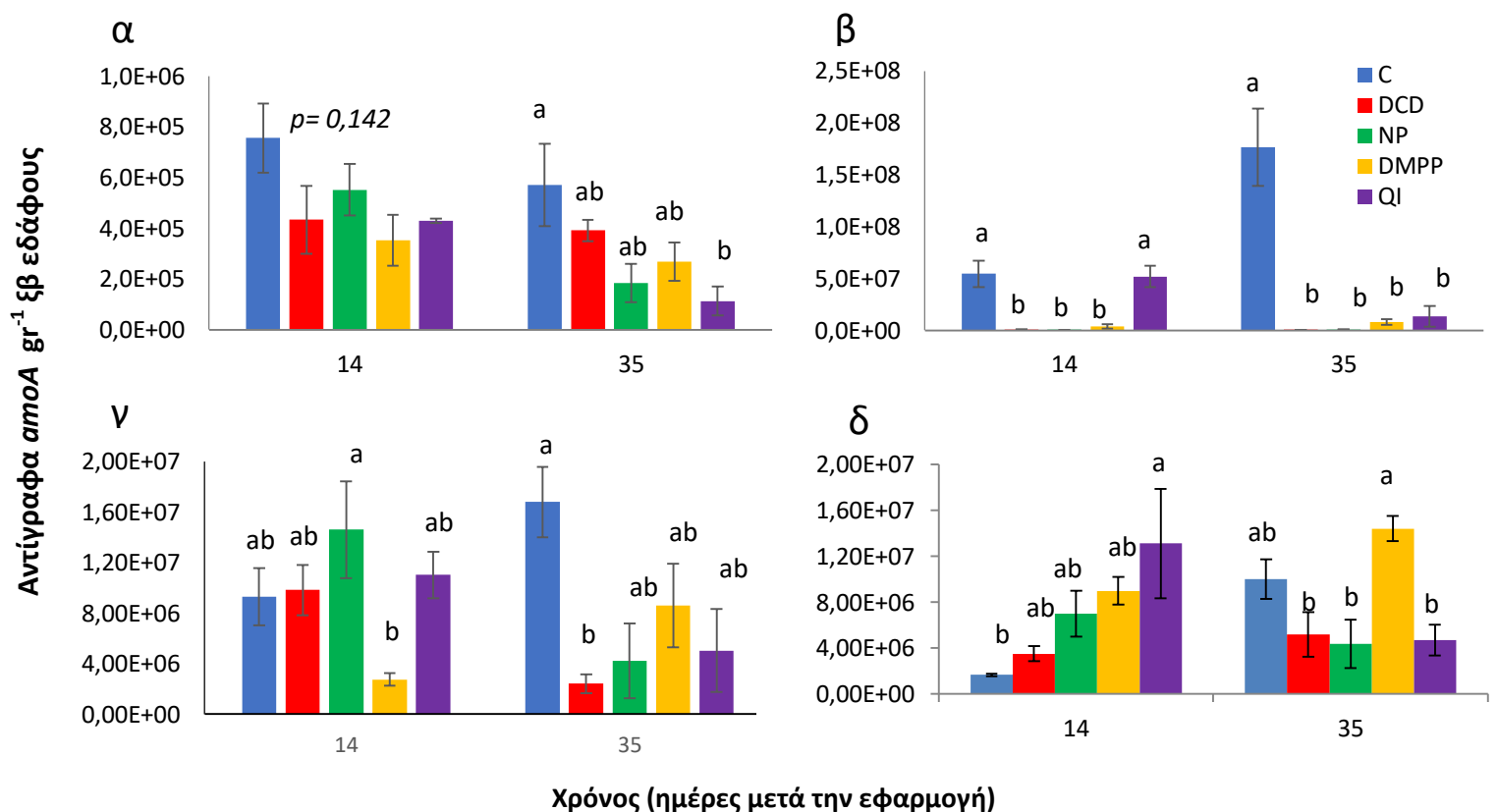


Διάγραμμα 3. Επίδραση των ΠΝ στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης ($\text{mg NO}_2^- \text{Kg}^{-1} \xi\beta \text{ εδάφους } 5\text{h}^{-1}$) στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές 53 διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2 Επίδρασης των ΠΝ στη αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 4. Στην περίπτωση των AOB στο όξινο έδαφος παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας μόνο στη μεταχείριση του QI την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή του σε σύγκριση με το μάρτυρα. Στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και στους δύο χρόνους που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία των AOB σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 4α). Στο αλκαλικό έδαφος, τα NP, DCD και DMPP προκάλεσαν ανάλογη μείωση της αφθονίας των AOB και στους δύο χρόνους που εξετάστηκαν. Αντίθετα, η μεταχείριση του QI, προκάλεσε μείωση της αφθονίας του *amoA* γονιδίου των AOB μόνο κατά την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή του σε σύγκριση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 4β).

Στην περίπτωση των AOA, στο όξινο έδαφος την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων ($p > 0,05$). Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και την 35^η ημέρα του πειράματος, με εξαίρεση τη μεταχείριση του DCD που προκάλεσε σημαντική μείωση ($p < 0,05$) στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOA (Διάγραμμα 4γ). Στο αλκαλικό έδαφος, και στους δύο χρόνους όπου μελετήθηκε η αφθονία των AOA δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων και του μάρτυρα. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η μεταχείριση του QI που προκάλεσε παροδική αύξηση της αφθονίας σε σχέση με το μάρτυρα την 14^η ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 4δ).



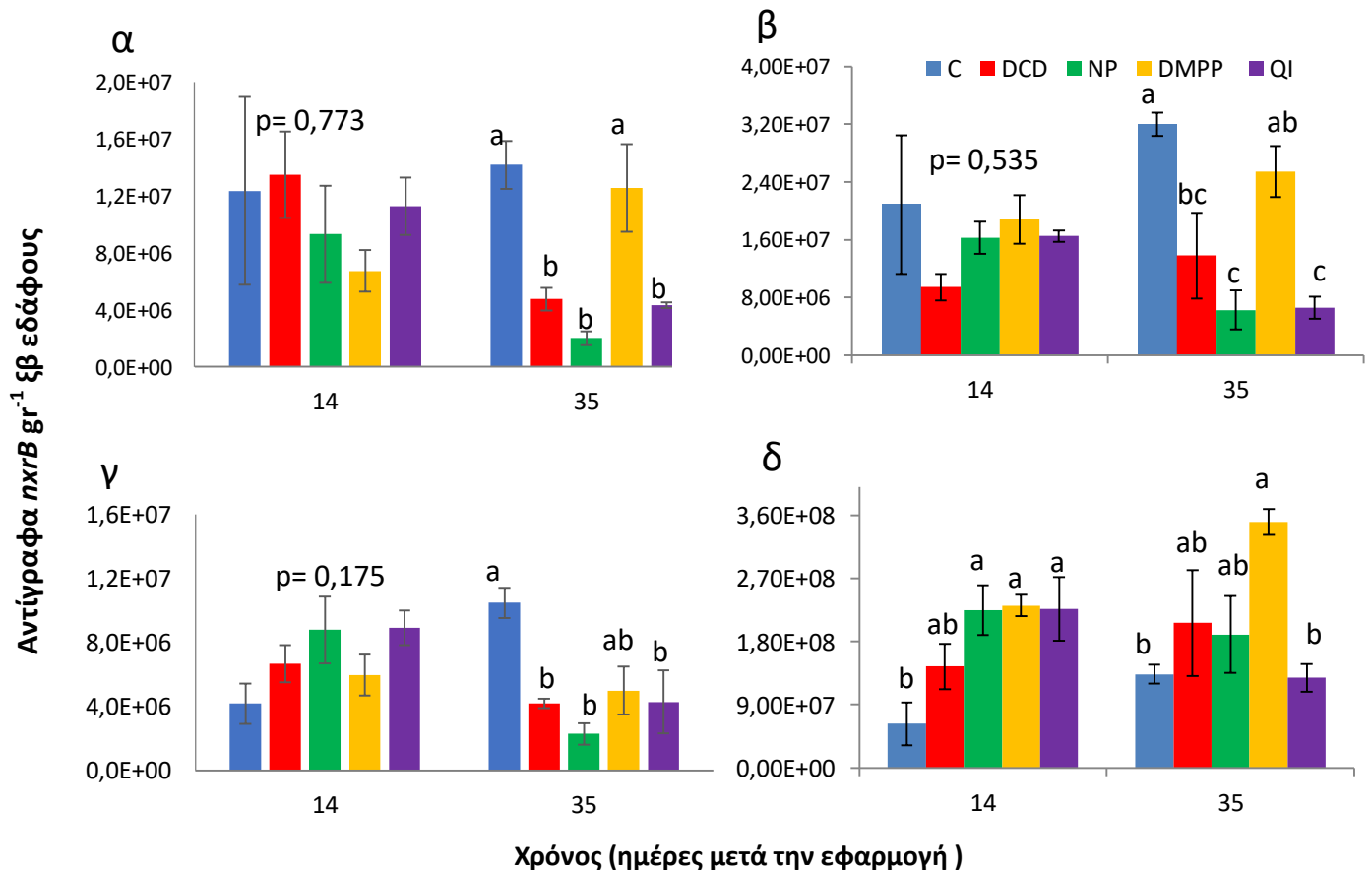
Διάγραμμα 4. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (α,β) και αρχαίων (γ, δ) στο όξινο (α,γ) και στο αλκαλικό (β, δ) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.3 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε επόμενα της νιτρωδοποίησης στάδια του κύκλου του N

3.3.1 Επίδρασης των ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των *Nitrobacter* και *Nitrospira*

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των εξεταζόμενων ΠΝ στην αφθονία του γονιδίου *nxrB* των NOB των γενών *Nitrobacter* και *Nitrospira*. Στη περίπτωση των *Nitrobacter*, στο όξινο έδαφος κατά την 14^η ημέρα του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων ($p=0,773$). Ωστόσο την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ προκλήθηκε σημαντική ($p < 0,05$) και ισοδύναμη μείωση στην αφθονία του *nxrB* των *Nitrobacter* σε όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση αυτή του DMPP (Διάγραμμα 5α). Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε στο αλκαλικό έδαφος, με την αφθονία του γονιδίου να επηρεάζεται στο τέλος του πειράματος στις μεταχειρίσεις του DCD, NP και QI (Διάγραμμα 5β).

Στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Nitrospira* στο όξινο έδαφος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αφθονίας τους ($p < 0,05$) μόνο στο τέλος του πειράματος για τις μεταχειρίσεις των DCD, NP και QI (Διάγραμμα 5γ). Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους, την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ, παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του γονιδίου *nxrB* των βακτηρίων του γένους *Nitrospira* σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε σύγκριση με το μάρτυρα, η οποία ωστόσο στην περίπτωση της εφαρμογής του DCD δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p > 0,05$). Την 35^η ημέρα του πειράματος, μόνο η μεταχείριση του DMPP συνέχισε να παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη αφθονία του *nxrB* γονιδίου των *Nitrospira* σε σχέση με το μαρτύρα ($p < 0,05$) (Διάγραμμα 5δ).



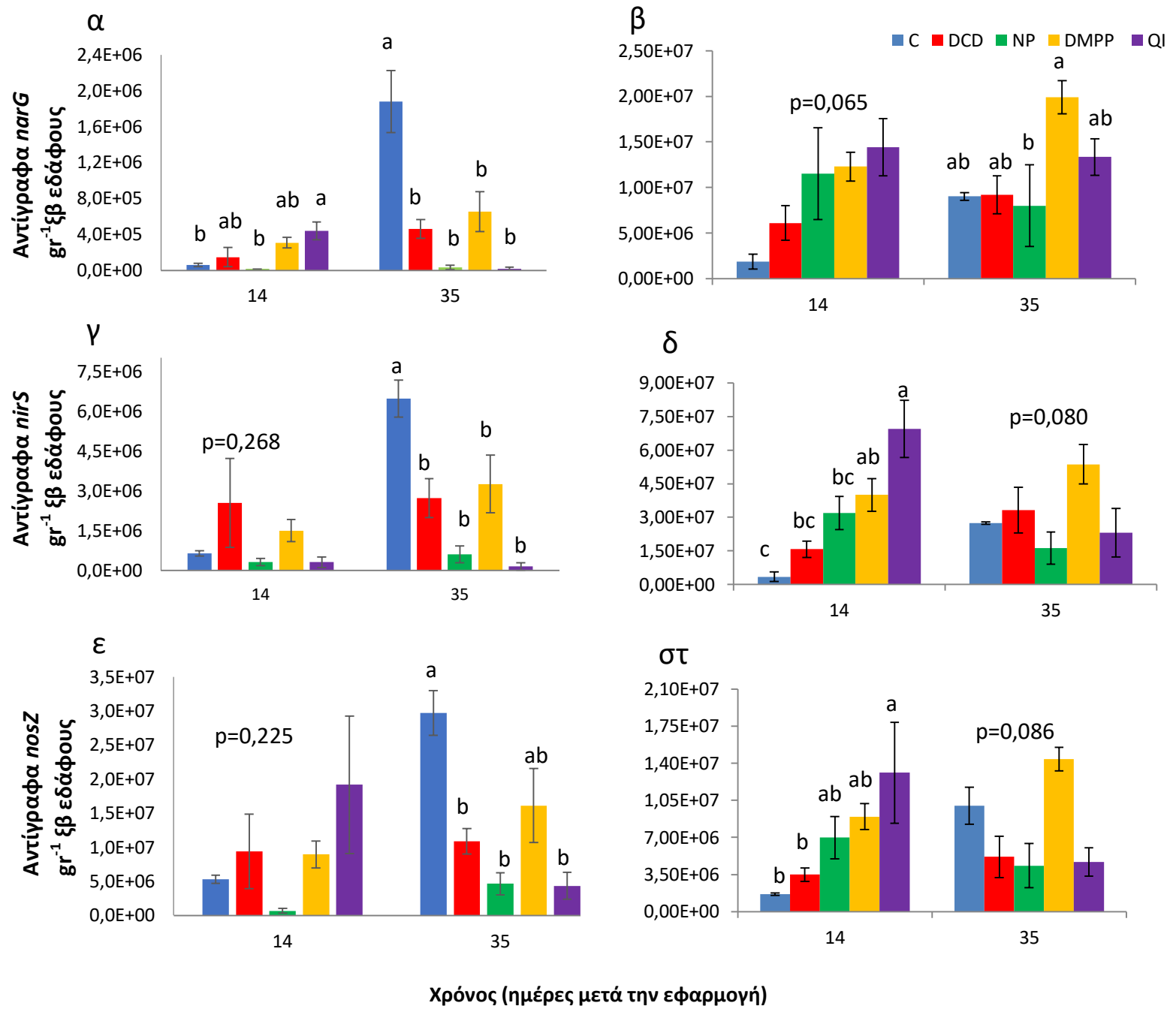
Διάγραμμα 5. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του *nxrB* γονιδίου των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων του γένους *Nitrobacter* (α,β) και *Nitrospira* (γ, δ) στο όξινο (α,γ) και στο αλκαλικό (β, δ) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος 55 αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.3.2 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται η επίδραση των ΠΝ στην ανάπτυξη των απονιτροποιητικών βακτηρίων, βασιζόμενη στην αφθονία των γονιδίων *narG*, *nirS* και *nosZ*. Στο όξινο έδαφος, την 14^η ημέρα του πειράματος παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του γονιδίου *narG* στις μεταχειρίσεις των DCD, DMPP και QI, ωστόσο μονό στην περίπτωση του QI παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) σε σχέση με τη μεταχείριση του μάρτυρα. Αντίθετα, την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αφθονίας του *narG* γονιδίου σε όλες τις μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 6α). Στο αλκαλικό έδαφος, και στους δύο χρόνους που μελετήθηκε η αφθονία του *narG*, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων των ΠΝ και του μάρτυρα. (Διάγραμμα 6β).

Η αφθονία του *nirS*, στο όξινο έδαφος επηρεάστηκε σημαντικά ($p < 0,05$) μόνο κατά την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή των ΠΝ, όπου όλοι οι ΠΝ προκάλεσαν μείωση της αφθονίας του γονιδίου *nirS*. (Διάγραμμα 6γ). Στη περίπτωση του αλκαλικού εδάφους παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του *nirS* σε όλες τις μεταχειρίσεις, με μόνο αυτές του DMPP και του QI να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το μάρτυρα ($p < 0,05$), την 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή τους. Στο τέλος του πειράματος οι διαφορές αυτές εξαλείφθηκαν και καμία μεταχείριση δεν διέφερε από το μάρτυρα ($p=0,080$) (Διάγραμμα 6δ).

Στο όξινο έδαφος η αφθονία του γονιδίου *nosZ*, την 14^η ημέρα του πειράματος δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την παρουσία των ΠΝ σε σχέση με το μάρτυρα ($p=0,225$). Ωστόσο, στο τέλος του πειράματος, τα DCD, NP και QI προκάλεσαν σημαντική ($p < 0,05$) και ισοδύναμη μείωση της αφθονίας του *nosZ* (Διάγραμμα 6ε). Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από την εφαρμογή των ΠΝ και στους δύο χρόνους που μελετήθηκαν, με εξαίρεση μια παροδική αύξηση της αφθονίας του *nosZ* γονιδίου κατά τη 14^η ημέρα μετά την εφαρμογή του QI στο έδαφος (Διάγραμμα 6στ).

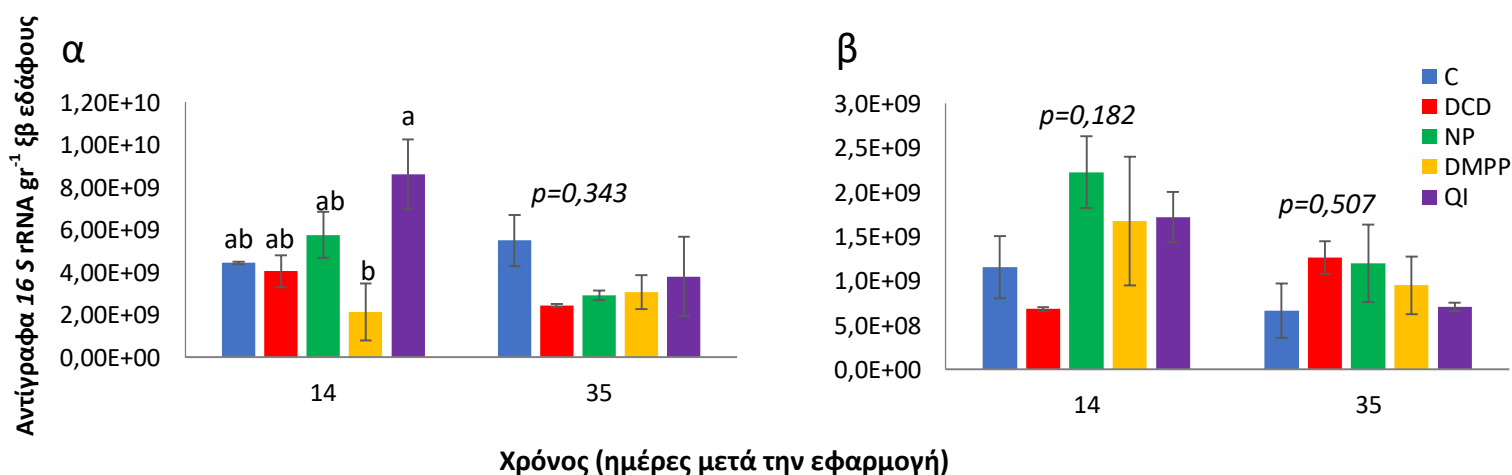


Διάγραμμα 6. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των *narG* (α,β), *nirS* (γ, δ) και *nosZ* γονιδίων (ε, στ) στο όξινο (α,γ,ε) και στο αλκαλικό (β, δ, στ) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.4 Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Στα Διαγράμματα 7,8 και 9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των ΠΝ σε βακτήρια, αρχαία της συνωμοταξίας Crenarchaeota και μύκητες, αντίστοιχα.

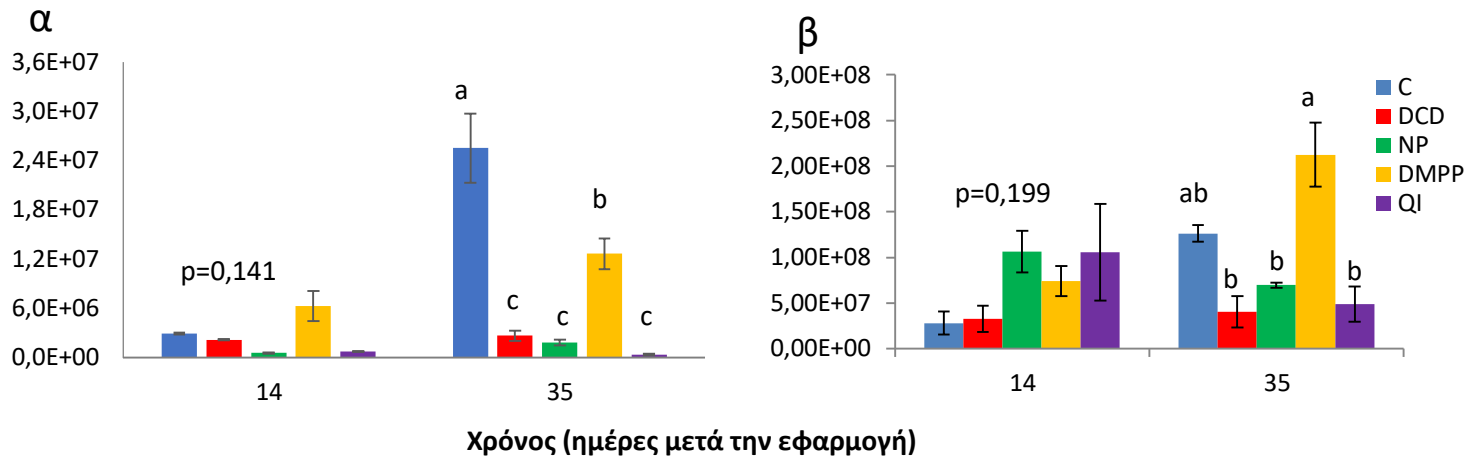
Στο όξινο έδαφος η αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων και στους δύο χρόνους που εξετάστηκαν δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την παρουσία των ΠΝ σε σχέση με τον μάρτυρα, ($p > 0,05$) (Διάγραμμα 7α). Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους, και στους δύο χρόνους που εξετάστηκε η επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων των ΠΝ και του μάρτυρα (Διάγραμμα 7β).



Διάγραμμα 7. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αφθονίας του 16S rRNA γονιδίου των αρχαίων της συνωμοταξίας Chrenarchaeota. Στο όξινο έδαφος, η εφαρμογή των ΠΝ επηρέασε σημαντικά την αφθονία του εξεταζόμενου γονιδίου ($p < 0,05$) μόνο κατά την 35^η ημέρα του πειράματος, με την επίδραση των DCD, NP και QI να είναι ισοδύναμη και ισχυρότερη αυτής του DMPP (Διάγραμμα 8α). Στο αλκαλικό έδαφος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των αρχαίων της συνωμοταξίας Chrenarchaeota από τους εξεταζόμενους ΠΝ. Μονή εξαίρεση αποτέλεσε η μεταχείριση του DMPP, που προκάλεσε αύξηση της αφθονίας σε σχέση με το μάρτυρα την 35^η ημέρα μετά την εφαρμογή του (Διάγραμμα 8β).

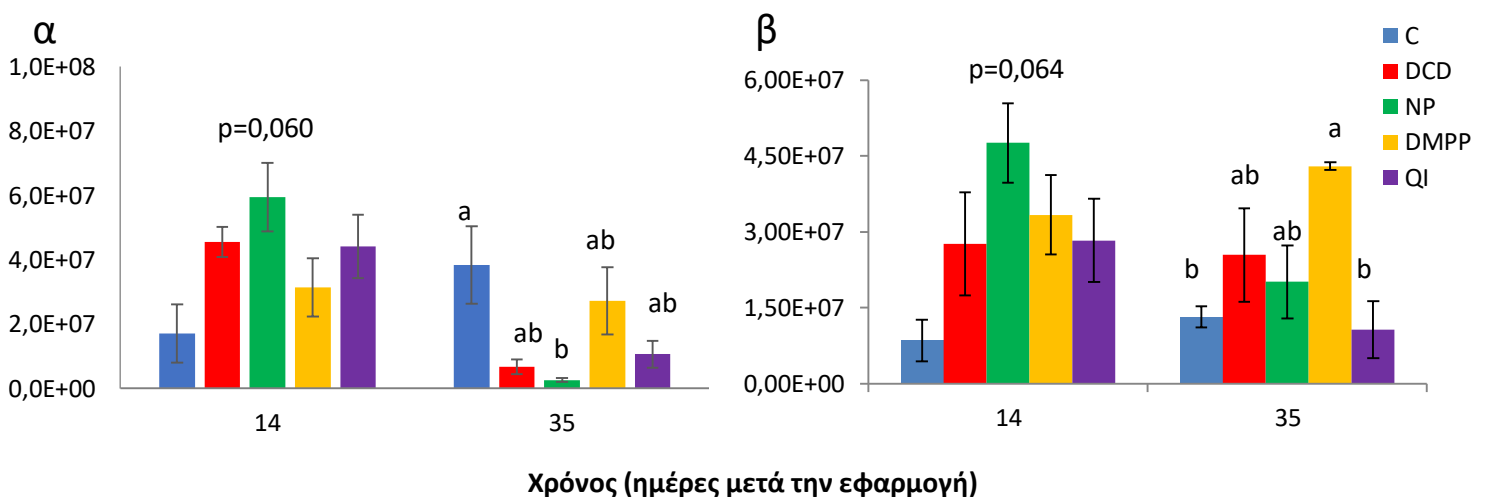
Αντίγραφα 16S rRNA gr⁻¹ β εδάφους



Διάγραμμα 8. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των αρχαίων της συνωμοταξίας Chrenarchaeota στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Στο όξινο έδαφος η αφθονία του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων δεν επηρεάστηκε μετά την εφαρμογή των ΠΝ, την 14^η ημέρα του πειράματος ($p=0,060$). Αντίθετα, στο τέλος του πειράματος, παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας του εξεταζόμενου γονιδίου σε όλες τις μεταχειρίσεις, ωστόσο μόνο αυτή του NP διέφερε στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα ($p < 0,05$) (Διάγραμμα 9α). Στη περίπτωση του αλκαλικού εδάφους, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των μεταχειρίσεων των ΠΝ και στους δύο χρόνους που εξετάστηκαν, με εξαίρεση τη μεταχείριση του DMPP όπου κατά την 35^η ημέρα του πειράματος παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων (Διάγραμμα 9β).

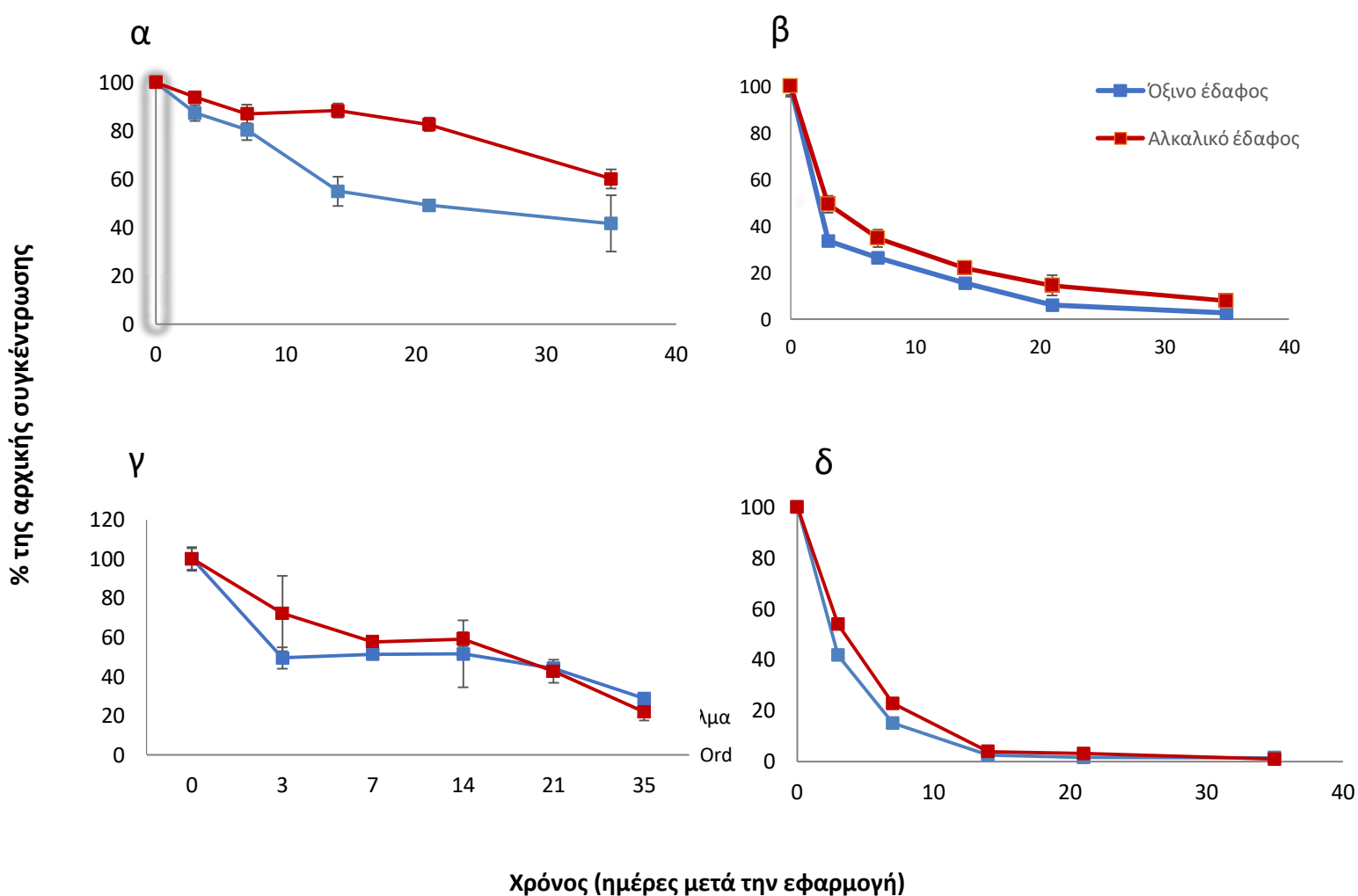
Αντίγραφα 18S rRNA gr⁻¹ β εδάφους



Διάγραμμα 9. Επίδραση των ΠΝ στην αφθονία του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων στο όξινο (α) και στο αλκαλικό (β) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.5 Αποδόμηση των ΠΝ στο έδαφος

Η πορεία αποδόμησης των ΠΝ στα δύο εδάφη απεικονίζεται στο Διάγραμμα 10. Επιπρόσθετα, στο Πίνακα 28 παρουσιάζονται οι τιμές του χρόνου ημιζωής (DT_{50}) των ΠΝ, οι τιμές του χρόνου αποδόμησης του 90% της αρχικά εφαρμοζόμενης ποσότητας των ΠΝ (DT_{90}), του ρυθμού αποδόμησης k και του σφάλματος χ^2 , όπως υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single First Order). Τη μεγαλύτερη εμμόνη στο έδαφος την παρουσίασε το DCD. Στο όξινο έδαφος ο ρυθμός αποδόμησης του DCD ήταν ταχύτερος από αυτόν στο αλκαλικό έδαφος (DT_{50s} στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος 23,06 και 57,20 ημέρες, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 10α, Πίνακας 28). Το NP αποδομήθηκε με ταχύτατο ρυθμό και στα δύο εδάφη, με την αποδόμηση του στο αλκαλικό έδαφος να παρουσιάζει μικρή υστέρηση (DT_{50s} στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος 2,82 και 5,21 ημέρες, αντίστοιχα) συγκριτικά με αυτή στο όξινο έδαφος (Διάγραμμα 10β, Πίνακας 28). Το DMPP, δεν αποδομήθηκε πλήρως στο έδαφος, ωστόσο εμφανίστηκε λιγότερο έμμοно από το DCD. Στο αλκαλικό έδαφος ο ρυθμός αποδόμησης ήταν ταχύτερος από αυτόν στο όξινο έδαφος με μικρές διαφορές στο χρόνο ημιζωής (DT_{50s} στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος 21,29 και 17,66 ημέρες, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 10γ). Ο ρυθμός αποδόμησης του QI ήταν ταχύτατος και δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στα δύο εδάφη (DT_{50s} στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος 2,46 και 3,30 ημέρες, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 10δ).



Διάγραμμα 10. Η πορεία αποδόμησης των DCD (α), NP (β), DMPP (γ) και QI (δ) στο όξινο (μπλε γραμμή) και στο αλκαλικό (κόκκινη γραμμή) έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Πίνακας 28. DT_{50} , DT_{90} , ο ρυθμός αποδόμησης k και σφάλμα χ^2 , όπως υπολογίστηκαν για τις ουσίες που μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single First Order).

Soil	Treatment	k (d^{-1})	DT_{50} (d)	DT_{90} (d)	χ^2 (%)
ACIDIC	DCD (15.38 mg Kg ⁻¹)	0.030	23.06	76.61	5.88
ALKALINE	DCD (15.38 mg Kg ⁻¹)	0.012	57.20	190.00	3.74
ACIDIC	NP (0.86 mg Kg ⁻¹)	0.246	2.82	9.38	22.37
ALKALINE	NP (0.86 mg Kg ⁻¹)	0.133	5.21	17.31	17.13
ACIDIC	DMPP (1.54mg Kg ⁻¹)	0.033	21.29	70.72	19.81
ALKALINE	DMPP (1.54 mg Kg ⁻¹)	0.039	17.66	58.67	10.13
ACIDIC	QI (10 mg Kg ⁻¹)	0.282	2.46	8.17	3.14
ALKALINE	QI (10 mg Kg ⁻¹)	0.210	3.30	10.96	2.68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Συζήτηση

Η εφαρμογή των ΣΠΝ συνδιαστικά με την αζωτούχο λίπανση αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνολογίες ελέγχου των απωλειών N από τα αγροτικά οικοσυστήματα, συμβάλλοντας τόσο στην αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά, όσο και στην ελαχιστοποίηση των απωλειών N (NO_3^- , N_2O) (Fenge *et al.*, 2016, Beeckman *et al.*, 2018). Η δράση των ουσιών αυτών έγκειται στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος με στόχο την αύξηση της διαθεσιμότητας του αμμωνιακού αζώτου στα φυτά.

Πρόσφατα ευρήματα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος από πειράματα υγρών καλλιέργειών με επιλεγμένα εδαφογενή στελέχη AOB, AOA και NOB έδειξαν πως το αντιοξειδωτικό EQ και κυρίως το κύριο οξειδωτικό του παράγωγο QI παρουσιάζει ικανότητα αναστολής των AOA, AOB και NOB με τα πρώτα να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Από τους υπόλοιπους εμπορικά διαθέσιμους ΠΝ μόνο το NP φάνηκε να ασκεί ανάλογη παρεμποδιστική δράση με το EQ έναντι των AOA και NOB, ενώ περιορισμένη εμφανίστηκε η δράση των DCD και DMPP (Paradourouli *et al.*, 2020). Ωστόσο, το NP δεν έχει έγκριση χρήσης στην Ευρώπη με αποτέλεσμα να μην υπάρχει σήμερα κάποιος διαθέσιμος ΠΝ ικανός να αναστείλει τη δράση των AOA. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου του όξινου χαρακτήρα των Ευρωπαϊκών εδαφών (μέση τιμή pH 5.8 για τα γεωργικά εδάφη και 5.5 για τους λειμώνες (Fabian *et al.*, 2014) και της τεκμηριωμένης αριθμητικής και λειτουργικής επικράτησης των AOA έναντι των AOB σε ανάλογα (όξινα) εδάφη (Nicol *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2014).

Προκειμένου να μετριάσουν τυχόν περιορισμοί στην πρόβλεψη της συμπεριφοράς των ουσιών αυτών στο εδαφικό περιβάλλον, στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα, αλλά και η εκτός στόχου δράση μικροβιακής τοξικότητας του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του EQ, QI, συγκριτικά με τους καθιερωμένους στη γεωργική πρακτική ΠΝ, DCD, NP και DMPP, σε πειράματα μικροκόσμων εδάφους. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η πορεία της αποδόμησης των παραπάνω ουσιών στο έδαφος ώστε να διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των ουσιών και των παρατηρούμενων επιδράσεων στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο εδάφη με διαφοροποίηση ως προς το pH (όξινο και αλκαλικό), που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα που καθορίζει το είδος των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν λειτουργικά στο έδαφος (Yao *et al.*, 2011; Nicol *et al.*, 2008). Για τη μεγιστοποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, αλλά και της δραστηριότητας των μελετούμενων ουσιών, οι μικρόκοσμοι εδάφους πριν την εφαρμογή των ΠΝ εμπλουτίστηκαν με άζωτο μέσω της προσθήκης ουρίας.

Όπως ήταν αναμενόμενο το pH του εδάφους αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα της επίδρασης των μελετώμενων ουσιών στη λειτουργία και την αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους. Γενικά, παρατηρήθηκε κυριαρχία των

ΑΟΑ ($9,4 \times 10^5$ έως $2,2 \times 10^7$ αντίγραφα *amoA* γονιδίου g^{-1} ξβ εδάφους) σε σχέση με τα ΑΟΒ ($1,8 \times 10^5$ έως $9,9 \times 10^5$ αντίγραφα *amoA* γονιδίου g^{-1} ξβ εδάφους) στο όξινο έδαφος και των ΑΟΒ ($3,3 \times 10^6$ έως $1,7 \times 10^8$ αντίγραφα *amoA* γονιδίου g^{-1} ξβ εδάφους) σε σχέση με τα ΑΟΑ ($7,3 \times 10^5$ έως $2,21 \times 10^7$ αντίγραφα *amoA* γονιδίου g^{-1} ξβ εδάφους) στο αλκαλικό έδαφος. Το όξινο pH του εδάφους (pH 5.1) φαίνεται ότι ευνόησε την κυριαρχία των ΑΟΑ επί των ΑΟΒ σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που τονίζουν τον σημαντικό ρολό του pH στην επιλογή της ομάδας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών που θα κυριαρχήσει στο έδαφος (Nicol *et al.*, 2008).

Το QI βρέθηκε να αναστέλλει αποτελεσματικά τη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και στα δυο εδάφη που μελετήθηκαν. Στο όξινο έδαφος το QI προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης που ήταν ισοδύναμη ή ισχυρότερη σε σχέση με αυτή του DCD και των NP και DMPP, αντίστοιχα. Η αφθονία του *amoA* γονιδίου των ΑΟΒ και ΑΟΑ μειώθηκε μόνο στην περίπτωση των μεταχειρίσεων του QI και του DCD, αντίστοιχα, και μόνο στο τέλος του πειράματος. Στο αλκαλικό έδαφος, όλοι οι εξεταζόμενοι ΠΝ προκάλεσαν μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων, του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της αφθονίας των ΑΟΒ, χωρίς ωστόσο να επηρεάσουν σημαντικά την αφθονία των ΑΟΑ.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων μελετών από τους Paradoroulou *et al.* (2016) όπου το QI σε συγκεντρώσεις έως $16,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους βρέθηκε να προκαλεί σημαντική μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και της έκφρασης του γονιδίου *amoA* τόσο των ΑΟΑ όσο και των ΑΟΒ για τουλάχιστον 30 ημέρες (Paradoroulou *et al.*, 2016). Όσον αφορά τους γνωστούς ΠΝ, ανάλογα αποτελέσματα ως προς την επίδραση τους στις συγκεντρώσεις των NO_3^- , αλλά και στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης παρατηρήθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες σε έδαφος (O'Callaghan *et al.*, 2010; Di and Cameron 2011; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015; Duncan *et al.*, 2016; Gu *et al.*, 2019).

Η συγκέντρωση των NH_4^+ στην παρούσα διατριβή επηρεάστηκε μόνο παροδικά από την παρουσία των ΠΝ. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με έναν μεγάλο αριθμό ερευνητικών εργασιών σχετικά με την επίδραση των ΠΝ στην συγκέντρωση των NH_4^+ (Li *et al.*, 2008; O'Callaghan *et al.*, 2010; Di and Cameron 2011; Liu *et al.*, 2017). Η επίδραση των ΠΝ στη συγκέντρωση των NH_4^+ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά του εδάφους, αλλά και από τις εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις των παρεμποδιστών (Liu *et al.*, 2015.) Σε προηγούμενες μελέτες εδάφους, το DCD σε συγκεντρώσεις από 7,5 έως $46,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των NH_4^+ (O'Callaghan *et al.*, 2010; Di and Cameron 2011; Ping *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2019). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση εφαρμογής του NP σε συγκέντρωση ίση με $3,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους (Liu *et al.*, 2017). Η παραπάνω συγκέντρωση του NP ωστόσο ξεπερνά τη μέση συνιστώμενη για εφαρμογή στον αγρό ($0,86 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ενώ σε πρόσθετες μελέτες όπου το NP εφαρμόστηκε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ($0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους) δε φάνηκε να επηρέασε τις συγκεντρώσεις των NH_4^+ στο έδαφος (Gu *et al.*, 2019). Στην περίπτωση του DMPP, προηγούμενες μελέτες όπου ο παρεμποδιστής εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 1–2,8 mg Kg^{-1} ξ.β. εδάφους έχουν αναφέρει την αύξηση των NH_4^+ (Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015).

Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες όπου το DMPP σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις (2,5-3,0 mg Kg⁻¹ ξ.β. εδάφους) δεν επηρέασε την συγκέντρωση των NH₄⁺ (Kleineidam *et al.*, 2012, Florio *et al.*, 2014), χωρίς η παραπάνω επίδραση να φαίνεται ότι σχετίζεται με το pH των μελετούμενων εδαφών (εύρος τιμών pH 4,6 – 8), αλλά με άλλα χαρακτηριστικά των εδαφών όπως ο οργανικός άνθρακας (εύρος 1- 6,2 %), το συνολικό N (εύρος 0,06 -2,7%) αλλά και η περιεχόμενη υγρασία.

Η επίδραση του DCD στην αφθονία των AOB, χωρίς ταυτόχρονη επίδραση στην αφθονία των AOA έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Σε πειράματα με μικροκόσμους εδαφών με εύρος pH 6,6 – 7,8 (Fu *et al.*, 2018), αλλά και σε πειράματα αγρού σε εδάφη με εύρος pH 4,3 – 7,9 (Lu *et al.*, 2019) το DCD ανέστειλε την αύξηση των AOB χωρίς ωστόσο να επηρεάσει αυτή των AOA. Το NP, στη συγκέντρωση που μελετήθηκε, προκάλεσε μείωση της αφθονίας μόνο των AOB και μόνο στο αλκαλικό έδαφος. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με άλλες ερευνητικές εργασίες όπου το NP προκάλεσε αναστολή της αύξησης των AOB σε εδάφη με ανάλογο pH (αλκαλικό) (Fisk *et al.*, 2015, Xi *et al.*, 2017). Επίσης σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι Gu *et al.* (2019) παρατήρησαν σε όξινο έδαφος ότι η αφθονία των AOA δεν επηρεάστηκε από τη παρουσία του NP, παρά την αριθμητική τους υπεροχή έναντι των AOB, των οποίων η αφθονία επίσης δεν επηρεάστηκε. Όπως το NP έτσι και το DMPP προκάλεσε μείωση της αφθονίας μόνο των AOB και μόνο στο αλκαλικό έδαφος. Σε αντίστοιχα πειράματα σε αλκαλικό έδαφος όπου μελετήθηκε η επίδραση του DMPP στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση τόσο στα AOB, όσο και στα AOA (Florio *et al.*, 2014). Αντίθετα, ορισμένοι ερευνητές παρατήρησαν επιλεκτική, ανασταλτική δράση του DMPP έναντι των AOB σε όξινο έδαφος (Kleineidam *et al.*, 2012, Dong *et al.*, 2013). Σε μετέπειτα μελέτες ωστόσο, οι Liu *et al.*, (2015) παρατήρησαν πως η εφαρμογή του DMPP σε αλκαλικό έδαφος προκάλεσε μείωση της αφθονίας των AOA και των AOB κατά 50% και 27%, αντίστοιχα, ενώ στο όξινο έδαφος παρατηρήθηκε μείωση μόνο της αφθονίας των AOA. Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις ως προς την επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών επιβεβαιώνουν τους περιορισμούς σχετικά με την πρόβλεψη της *in situ* αποτελεσματικότητας των ΠΝ, καθώς ένα πλήθος παραγόντων που αφορούν στα εδαφικά χαρακτηριστικά, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και τις γεωργικές πρακτικές μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση και τη συμπεριφορά των ΠΝ στα εδαφικά οικοσυστήματα (Vilas *et al.*, 2019).

Ελάχιστα είναι σήμερα γνωστά όσον αφορά στην επίδραση των ΠΝ στα NOB, παρά το σημαντικό λειτουργικό τους ρόλο στη διεργασία της νιτροποίησης (Daims *et al.*, 2016). Η ανασταλτική δράση των ΠΝ έναντι των NOB μπορεί να συμβάλει στη μείωση της συσσώρευσης και τελικά έκπλυσης των NO₃⁻. Ωστόσο, αν η επίδραση των ΠΝ έναντι των NOB είναι ισχυρότερη της αντίστοιχης έναντι των νιτροδοποιητών, τότε είναι πιθανόν να προκληθεί συσσώρευση NO₂⁻ στο έδαφος με αυξημένο κίνδυνο απωλειών N από τα αγροτικά οικοσυστήματα με τη μορφή αέριων οξειδίων του N (κυρίως N₂O) (Venterea *et al.*, 2015). Τα δύο κύρια γένη των NOB που επικρατούν στα εδαφικά οικοσυστήματα σε διακριτές ωστόσο οικοθέσεις είναι τα *Nitrobacter* και *Nitrospira*, με τα πρώτα να κυριαρχούν σε εδάφη με υψηλότερες συγκεντρώσεις NH₄⁺ και να εμφανίζουν υψηλότερη νιτροποιητική δραστηριότητα συγκριτικά με τα δεύτερα (Xia *et al.*, 2011; Nowka *et al.*,

2015). Εκτός από τα NOB, που συνδέονται άμεσα λειτουργικά με τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς, άλλοι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε μετέπειτα της νιτροποίησης στάδια του κύκλου του N, με σημαντικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο, όπως οι απονιτροποιητές είναι επίσης πιθανόν να επηρεάζονται από τη δράση των ΠΝ. Ωστόσο, μέχρι σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση των ΠΝ σε άλλους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του N.

Στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή όλων των ΠΝ στο όξινο έδαφος προκάλεσε σημαντική μείωση της αφθονίας του *nxrB* γονιδίου των NOB στο τέλος του πειράματος. Αντίθετα, στο αλκαλικό έδαφος δεν παρατηρήθηκε ανάλογη επίδραση με μόνη εξαίρεση τα βακτήρια του γένους *Nitrobacter*, όπου παρατηρήθηκε μείωση της αφθονίας τους στις μεταχειρίσεις των DCD, NP και QI, στο τέλος του πειράματος. Σε αντίστοιχες μελέτες μικροκόσμων εδάφους των Fu *et al.* (2018) που πραγματοποιήθηκαν σε τρία αλκαλικά εδάφη, η εφαρμογή του DCD δεν επηρέασε την ανάπτυξη των NOB, που μελετήθηκε μέσω της αφθονίας του γονιδίου *nxrA* των *Nitrospira* και των *Nitrobacter*.

Οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες μελέτες σχετικά με την επίδραση των ΠΝ στους απονιτροποιητές έχουν επικεντρωθεί κυρίως στο DCD και στο DMPP, ενώ δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για το NP. Στη παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των ΠΝ στην αφθονία των γονιδίων *narG*, *nirS* και *nosZ* στο αλκαλικό έδαφος με εξαίρεση κάποιες παροδικές αυξήσεις της αφθονίας των μελετούμενων γονιδίων δεικτών στην περίπτωση των μεταχειρίσεων των DMPP (*narG*) και QI (*nirS* και *nosZ*), χωρίς ωστόσο να παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο επίδρασης. Αντίθετα, στο όξινο έδαφος, όλοι οι ΠΝ προκάλεσαν μείωση της αφθονίας των μελετούμενων γονιδίων δεικτών στο τέλος του πειράματος, με μόνη εξαίρεση τη μεταχείριση του DMPP που δε φάνηκε να επηρεάζει την αφθονία του γονιδίου *nosZ*. Σε αντίστοιχα πειράματα μικροκόσμων εδάφους με όξινο pH, το DCD δεν επηρέασε την αφθονία των γονιδίων *narG*, *nirS* και *nosZ* στα διαφορετικά επίπεδα περιεχόμενης υγρασίας που μελετήθηκαν (Di *et al.*, 2014). Από την άλλη πλευρά τα αποτελέσματα της επίδρασης του DMPP στην αφθονία των γονιδίων των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία εμφανίζονται αντιφατικά. Έτσι ενώ αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την απουσία επίδρασης του ΠΝ στην αφθονία των γονιδίων δεικτών των απονιτροποιητών (*narG*, *nirS*, *nirK*, *nosZ*) (Florio *et al.*, 2014, Shi *et al.*, 2016a, Zhang *et al.*, 2018), σε άλλες έχει βρεθεί να αναστέλλουν (Dong *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2016b) ή ακόμα και να προωθούν (Torralbado *et al.*, 2017) την αύξηση των μελετούμενων γονιδίων δεικτών, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την επίδραση των χαρακτηριστικών του εκάστοτε εδάφους, αλλά και την συνολική επίδραση του παρεμποδιστή στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση.

Η χρήση λιπασμάτων και ΠΝ στο έδαφος μπορεί επίσης να επηρεάσει τη δομή της συνολικής μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Shen *et al.*, 2013) και τη συνολική λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος (Dong *et al.*, 2013). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των ΠΝ σε ομάδες μικροοργανισμών της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας όπως τα βακτήρια, τα αρχαία της συνωμοταξίας Crenarchaeota και οι μύκητες. Η συνολική αφθονία των μελετούμενων μικροβιακών ομάδων μη στόχων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την εφαρμογή των ΠΝ, με εξαίρεση μία μείωση που παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις των DCD, NP και QI όσον αφορά στην αφθονία των αρχαίων της

συνωμοταξίας Crenarchaeota, στο όξινο έδαφος, στο τέλος του πειράματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Guo *et al.* (2013), οι οποίοι μελέτησαν την μακροχρόνια επίδραση του DCD στην αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων και των αρχαίων σε πειράματα αγρού, συνολικής διάρκειας 7 ετών, σε τρία εδάφη με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Αντίστοιχα, άλλοι ερευνητές αναφέρουν την απουσία επίδρασης του παρεμποδιστή στη δομή της βακτηριακής μικροβιακής κοινότητας (O'Callaghan *et al.*, 2010). Αντίστοιχες, μελέτες σχετικά με την επίδραση του DMPP στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αναφέρουν την ανασταλτική δράση του έναντι της αύξησης των μυκήτων και των βακτηρίων με ταυτόχρονη επίδραση και στη δομή των κοινοτήτων των παραπάνω μικροβιακών ομάδων (Florio *et al.*, 2014, Maienza *et al.*, 2014). Άλλες μελέτες ωστόσο, αναφέρουν την απουσία ανασταλτικής δράσης του DMPP ως προς την αύξηση των βακτηρίων (Dong *et al.*, 2013).

Όσον αφορά την αποδόμηση των ΠΝ στο έδαφος, όλες οι εξεταζόμενες ουσίες αποδομήθηκαν ταχύτερα στο όξινο έδαφος συγκριτικά με το αλκαλικό έδαφος, με τις μεγαλύτερες ωστόσο διαφορές μεταξύ των δύο εδαφών να παρατηρούνται στην περίπτωση αποδόμησης του DCD. Ανάλογη υστέρηση στην αποδόμηση του DMPP μεταξύ όξινων και αλκαλικών εδαφών έχει προηγουμένως παρατηρηθεί από τους Xue *et al.* (2012). Το DCD εμφάνισε τη μεγαλύτερη εμμόνη στο έδαφος (DT_{50s} 23,1 και 57,2 στο όξινο και στο αλκαλικό έδαφος, αντίστοιχα) ακολουθούμενο από το DMPP. Σε προηγούμενες μελέτες τους οι Rajbanshi *et al.* (1992) αναφέρουν ανάλογη τιμή DT_{50} (18,5 ημέρες) για το DCD, όταν αυτό εφαρμόστηκε σε ανάλογη με την παρούσα μελέτη συγκέντρωση ($16,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους), σε όξινο (pH 6,1) αμμοπηλώδες έδαφος και επωάστηκε στην ίδια θερμοκρασία (20°C) που βάση βιβλιογραφίας φαίνεται να είναι και ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την αποδόμηση του παρεμποδιστή στο έδαφος (Rajbanshi *et al.*, 1992). Αντίθετα, τα NP και QI παρουσίασαν μικρότερη υπολειμματικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με αυτά των Παπαδοπούλου *et al.*, (2016) όπου, το QI όταν εφαρμόστηκε σε μικροκόσμους εδάφους σε αρχική συγκέντρωση ίση με $16,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ξ.β. εδάφους αποδομήθηκε πλήρως σε διάστημα 7 ημερών. Το NP στο έδαφος υπόκειται σε διεργασίες έκπλυσης, προσρόφησης και εξάτμισης, σε βαθμό που καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά του εδάφους και που επηρεάζουν την υπολειμματικότητά του (Wolt, 2000; Woodward *et al.*, 2019). Συνολικά, η υπολειμματικότητα των ΠΝ στο έδαφος δεν φάνηκε να έχει κάποια συσχέτιση με τις παρατηρούμενες επιδράσεις στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν.

4.2 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, με βάση τα ευρήματα τις παρούσας διατριβής γίνεται κατανοητό πως η αποτελεσματικότητα των ΠΝ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά του εδάφους και κυρίως το pH. Το QI, παρεμπόδισε σημαντικά τη νιτροποίηση και συνεπώς τον κίνδυνο απωλειών N και στα δύο εδάφη. Στο όξινο έδαφος η επίδραση του QI ήταν ανάλογη με αυτή του DCD και ισχυρότερη αυτής των NP και DMPP. Στο αλκαλικό έδαφος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ΠΝ ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Η εφαρμογή των ΠΝ επηρέασε την αφθονία των λειτουργικά σχετιζόμενων με τη νιτροδοποίηση μικροβιακών ομάδων που συμμετέχουν σε μετέπειτα στάδια του κύκλου του N, όπως NOB και οι απονιτροποιητές, χωρίς ωστόσο να επηρεάσει την αφθονία άλλων ομάδων μικροοργανισμών μη στόχων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και δεδομένης της ιδιότητας του EQ να μετατρέπεται ταχύτατα στο έδαφος σε QI, το αντιοξειδωτικό EQ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί δυνητικά ως ένας νέος ΠΝ για την αποδοτικότερη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των EQ και QI σε μεγαλύτερο εύρος εδαφών, αλλά και την οικοτοξικότητα τους σε επίπεδο δομής και λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας απαιτούνται για την αξιολόγηση της πιθανής χρήσης τους ως εναλλακτική και οικονομικά βιώσιμη λύση για την αποδοτικότερη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Βιβλιογραφία

- Alves, R.J.E, Minh, B.Q., von Haeseler, U., Schleper, C. (2018) Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on *amoA* genes. *Nat Commun* 9:1517.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86: 412-431.
- Arp, D.J., Stein, L.Y. (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Bio* 38: 471–495.
- Babbin, A.R., Keil, R.G., Devol, A.H., Ward, B.B. (2014) Oxygen control nitrogen loss in the ocean. *Science*, 344:406–8.
- Baszczyk, A.B., Augustyniak, A., Skolimowski, J. (2013) Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. *Intern J Food Sci*, available at <http://dx.doi.org/10.1155/2013/585931>.
- Beeckman, F., Motte, H., Beeckman, T. (2018) Nitrification in agricultural soils: impact, actors, and mitigation. *Curr Opin Biotechnol* 50: 166–173.
- Belser, L.W., Mays, E.L. (1980) Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl Environ Microb* 39:505-510.
- Benckiser, G., Christ, E., Herbert, T., Weiske, A., Blome, J., Hardt, M. (2013) The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism. *Plant and Soil* 371:257–266.
- Bernhard, A., (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, 3:25.
- Brochier-Armanete, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2006) Mesophilic Crenarchaeota: Proposal for a Third Archaeal Phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 6:245-52. doi: 10.1038/nrmicro1852.
- Bru, D., Sarr, A., Philippot, L. (2007) Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl Environ Microbiol* 73: 5971–5974.
- Caranto, J.D., Lancaster, K.M. (2017) Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *PNAS* 114:8217-8222.
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L. (2011) Validation and Application of

a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. PLoS One. 6: e24166. doi: 10.1371/journal.pone.0024166.

- Chen, Q., Qi, L., Bi, Q., Dai, P., Sun, D., Sun, C., Liu, W., Lu, L., Ni, W., Lin, X. (2015) Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:477-87.
- Coskun, D., Britto, D.T., Shi, W., Kronzucker, H.J. (2017) Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nat Plants* 3:17074.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528: 504-509.
- Daims, H., Lückner, S., Wagner, M. (2016) A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol* 24:699-712. doi:10.1016/j.tim.2016.05.004
- Dang, C., Liu, W., Lin, Y., Zheng, M., Jiang, H., Chen, Q., Ni, J. (2018) Dominant role of ammonia-oxidizing bacteria in nitrification due to ammonia accumulation in sediments of Danjiangkou reservoir, China. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3399-3410.
- Di, H. J., Cameron, K. C., Shen, J. P., Winefield, C. S., O'Callaghan, M., Bowatte, S. He, J. Z. (2010) Ammonia oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 72:386-394.
- Di, H. J. and Cameron, K. C. (2011) Inhibition of ammonium oxidation by a liquid formulation of 3,4-Dimethyl pyrazole phosphate (DMPP) compared with a dicyandiamide (DCD) solution in six New Zealand grazed grassland soils. *J Soil Sediment* 11: 1032-1039.
- Di, H.J., Cameron, K. C., Podylyan, A., Robinson, A. (2014) Effect of soil moisture status and a nitrification inhibitor, dicyandiamide, on ammonia oxidizer and denitrifier growth and nitrous oxide emissions in a grassland soil. *Soil Biol Biochem* 73 : 59-68.
- Dong, X.X., Zhang, L.L., Wu, Z.J., Zhang, H.W., Gong, P. (2013). The response of nitrifier, N-fixer and denitrifier gene copy numbers to the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate. *Plant Soil Environ* 9: 398-403.
- Duncan, E.G., O'Sullivan, C.A., Simonsen, A.K., Roper, M.M., Treble, K., Whisson, K. (2016) A composite guanyl thiourea (GTU), dicyandiamide (DCD) inhibitor improves the efficacy of nitrification inhibition in soil. *Chemosphere* 163 :1-5.
- Fabian, C., Reimann, C., Fabia, K., Birke, M., Baritz, R., Haslinger, E., The GEMAS Project Team. (2014) GEMAS: Spatial distribution of the pH of European agricultural and grazing land soil. *Applied Geochemistry* 48: 207-216.

- Feng, J., Lia, F., Dengb, A., Feng, X., Fanga, F., Zhangb, W. (2016) Integrated assessment of the impact of enhanced-efficiency nitrogen fertilizer on N₂O emission and crop yield. *Agric Ecosyst Environ* 231: 218–228.
- Fierer, N., Jackson, J.A, Vilgalys, R., Jackson, R.B. (2005) Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* 71: 4117–4120. doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
- Fisk, L.M., Maccarone, L.D., Barton, L., Murphy, D.V. (2015) Nitrapyrin decreased nitrification of nitrogen released from soil organic matter but not amoA gene abundance at high soil temperature. *Soil BiolBiochem* 88 :214-223.
- Florio, A., Clark, A.M., Hirsch, P.R., Jhurrea, D., Benedetti, A. (2014) Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazolephosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. *Biology and Fertility of Soils*. 50):795–807.
- Franché C., Lindström K., Elmerich C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321:35–59.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water column sand sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14683–14688.
- Francis, C.A., Beman, J.M., Kuypers, M.M.M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* 1: 19-27.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis S., et al.(2018) The global nitrogen cycle in the twenty first century. *Phil Trans R Soc B* 368: 20130164.
- Fu, Q., Clark, I.M, Zhu, J., Hu, H., Hirsch, P.R. (2018) The short-term effects of nitrification inhibitors on the abundance and expression of ammonia and nitrite oxidizers in a long-term field experiment comparing land management. *Biol Fertil Soils* 54:163–172 <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1249-2>.
- Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y., Li, L. (2018) Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Front Environ Sci Eng* 12:1–15.
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., Peng, Y. (2015) Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*. 140:85-98. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.004
- Gilsanza, C., Báeza, D., Misselbrook, T.H., Dhanoab, M.S., Cárdenasb, L.M. (2016) Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agric Ecosyst Environ* 216: 1–8.
- Goring, C. A. I. (1962) Control of nitrification of ammonium fertilizers and urea by 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine. *Soil Sci* 93: 211–218.

- Godfrey, L.V., Glass, J.B. (2011) The geochemical record of the ancient nitrogen cycle, nitrogen isotopes, and metal cofactors. *Methods Enzymol* 486: 483 -506.
- Gu, Y., Mi, W., Xie, Y., Ma, Q., Wu, L., Hu, Z., Dai, F. (2019) Nitrapyrin affects the abundance of ammonia oxidizers rather than community structure in a yellow clay paddy soil. *Journal of Soils and Sediments* 19:872–882.
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2010) Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiol Ecol* 74: 566-574.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., Philippot, L. (2006) Quantitative Detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* Genes in Soils. *Appl Environ Microbiol* 72: 5181–5189. doi: 10.1128/AEM.00231-06.
- Hu, H.Z., Xu, Z.H., He, J.Z. Ammonia-Oxidizing Archaea Play a Predominant Role in Acid Soil Nitrification. 2014 *Advances in Agronomy* 125: 261-302.
- Kandeler, E. (1995) Potential nitrification. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 426.
- Karas, P.A., Metsoviti, A., Vasileios, Z., Abatzi, M., Ehaliotis, C., Omirou, M., Papadopoulou, E.S., Menkissoglou-Spiroudi, U., Karpouzias, D.G. (2015) Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Sci Total Environ* 530-531: 129-139.
- Kartal, B., De Almeida, N.M., Maalcke, W.J., Op den, Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Keltjens, J.T. (2013) How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiol Rev* 3:428-461. doi:10.1111/1574-6976.12014.
- Kim, D.G., Saggarr, S., Roudier, P. (2012) The effect of nitrification inhibitors on soil ammonia emissions in nitrogen managed soils: a meta-analysis. *Nutr Cycl Agroecosyst* 93:51–64.
- Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., et al. (2017) Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature* 549: 269-272.
- Kleineidam, K., Kösmrlj, K., Kublik, S., Palmer, I., Pfab, H., Ruser, R., Fiedler, S., Schloter, M. (2012) 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.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55: 485–529.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546.

- Kuenen, J.G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* 6:320–326.
- Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal, B. (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*. 16:263-276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9.
- Lawson, C.E., Lücker, S., (2018) Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Curr Opin Biotechnol* 50:158-165.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2011) Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *PNAS* 108:15892-15897.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2013) Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. *Soil Biol Biochem* 62:129-133.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Ross, J., Hink, L., Weber, E.B., Gubry-Rangin, C., Thion, C., et al. (2016) Isolation of “*Candidatus Nitrosocosmicus franklandus*,” a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. *FEMS Microbiol Ecol* 92: 57.
- Lehtovirta-Morley, L.E. (2018) Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiol Lett* 365:142-147. doi: 10.1093/femsle/fny058.
- 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 ammonia oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806-809.
- Li, H., Chen, Y., Liang, X., Lian, Y., Li, W. (2008) Mineral-nitrogen leaching and ammonia volatilization from a rice-rapeseed system as affected by 3,4-dimethylpyrazole phosphate. *J Environ Qual* 38(5):2131-7.
- Li, Y., Chapman, S., J., Nicol, G., W, Yao, H. (2018) Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biol Biochem* 116: 290–301.
- Liu, J., You, L., Amini, M., Obersteiner, M., Herrero, M., Zehnder, A.J.B., Yang, H. (2010) A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8035–8040.
- Liu, R., Hayden, H., Suter, H., He, J., Chen, D. (2015) The effect of nitrification inhibitors in reducing nitrification and the ammonia oxidizer population in three contrasting soils. *Soils Sediments* 15:1113–1118. doi 10.1007/s11368-015-1086-6.
- Liu, T., Liang, Y., Chu, G. (2017) Nitrapyrin addition mitigates nitrous oxide emissions and raises nitrogen use efficiency in plastic-film-mulched drip-fertigated cotton field. *PLoS One* 12: e0176305. doi: 10.1371/journal.pone.0176305.

- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damsté, J.S., Spieck, E., Le Paslier, D., Daims, H. (2010) A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13479-84.
- Lu, Y., Zhang, X., Jiang, J., Kronzucker, H.J., Shen, W., Shi, W. (2019) Effects of the biological nitrification inhibitor 1,9-decanediol on nitrification and ammonia oxidizers in three agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 129 :48–59.
- Maienza, A., Bååth, E., Stazi, S.R. Benedetti, A., Grego, S., Dell'Abate, M.T. (2014) Microbial dynamics after adding bovine manure effluent together with a nitrification inhibitor (3,4 DMPP) in a microcosm experiment. *Biol Fert Soil* 50:869–877. doi:10.1007/s00374-014-0907-x.
- McCarty, G.W. (1999) Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol Fert Soil* 29: 1–9.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A. (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 5:62-71. doi: 10.1006/niox.2000.0319.
- Moir, J.L., Cameron, K.C., Di, H.J. (2007) Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use Manag* 23: 111–120.
- Muller, C., Stevens, R.J., Laughlin, R.J., Azam, F., Ottow, J.C.G. (2002) The nitrification inhibitor DMPP had no effect on denitrifying enzyme activity. *Soil BiolBiochem* 34:1825–1827.
- 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.
- Nowka, B., Daims, H., and Spieck, E. (2015). Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. *Appl Environ Microbiol* 81: 745–753.
- O'Callaghan, M., Gerard, E.M., Carter, P.E., Lardner, R., Sarathchandra, U., Burch, G., Ghani, A., Bell, N. (2010) Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil BiolBiochem* 42:1425-1436.
- Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, Bonch-Osmolovskaya L, Schleper C. (2003) Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol* 5: 787-797.
- Papadopoulou, E.S., Tsachidou, B., Sławomir, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzas, D.G. (2016) Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry: are there any effects on soil microbes? The case of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites. *Appl Environ Microbiol* 82: 747-755.
- Papadopoulou, E.S, Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou E., Katsaouni A., Thion, C., Vasileiadis, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nico, G. W., Karpouzas, D.G. (2020) Comparison of the in vitro activity of novel and established nitrification inhibitors 2 applied in agriculture:

challenging the effectiveness of the currently available 3 compounds. BioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.023168>.

- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Grongroft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., Wagner, M. (2012) amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol* 14:525-539.
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattel, T., Koch, H., Lucker, S., et al. (2014) NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environ Microbiol* 16: 3055–3071.
- Ping, G., Li, Z., Zhi-Jie, W., Zhen-Hua, C., Li-Jun, C., (2013) Responses of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Two Agricultural Soils to Nitrification Inhibitors DCD and DMPP: A Pot Experiment. *Pedosphere* 23: 729–739.
- Pinto, A.J., Marcus, D.N., Ijaz, U.Z., Bautista-de los Santos, Q.M., Dick, G.J., Raskin, L. (2016) Metagenomic evidence for the presence of comammox Nitrospira-like bacteria in a drinking water system. *MSphere* 1: e00054-15.
- Pitcher, A., Rychlik, N., Hopmans, E.C. Spieck, E., Irene, W., Rijpstra, C., Ossebaar, J., Schouten, S., Wagner, M., Sinninghe Damsté J.S. (2010) Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I. 1b Archaeon. *ISME J* 4: 542–552.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2012) Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends Microbiol* 20: 523–531.
- Prosser, J.I., Hink, L.G., Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W. (2019) Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. *Glob Chang Biol* 26:103-118. doi: 10.1111/gcb.14877.
- Rajbanshi, S.S., Benckiser, G., and Ottow, J.C.G. (1992) Effects of concentration, incubation temperature and repeated applications on degradation kinetics of dicyandiamide (DCD) in model experiments with a silt loam soil. *Biol Fertil Soils* 13:61-64
- Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wosten, H.A.B., Sollins, P. (2007) Role of proteins in soil carbon and Nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry* 85:25-44.
- Ritz, C., Streibig, J. C. (2005) Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12.
- Rousidou, C., Papadopoulou, E., Kortsinidou, M., Giannakou, I.O., Singh, B.K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Karpouzias, D.G. (2013) Bio-pesticides: harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biol Biochem* 67:98–105.
- Rothhauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712.

- Ruser, R., Schulz, R. (2015) The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils — a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 178:171-188.
- Santi, C., Bogusz, C., Franche, J. (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann.Bot.*, 111:743-67
- Schleper, C., Nicol, G.W. (2010) Ammonia oxidizing archaea: Genomes, physiology and ecology. *Adv Microb Physiol* 57: 1-41.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Baas, M., Boumann, H., Standfest, S., Könneke, M., Stahl, D.A., Sinninghe Damsté, J.S. (2008) Intact Membrane Lipids of “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*”, a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol* 74: 2433–2440.
- Shen, T.L., Stieglmeier, M., Dai, J.L., Urich, T., Schleper, C. (2013) Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol Lett* 344: 121–129.
- Shi, X., Hu, H-W., Müller, C., He, J-Z., Chen, D., Suter, H.C. (2016a) Effects of the Nitrification Inhibitor 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate on Nitrification and Nitrifiers in Two Contrasting Agricultural Soils. *Appl Environ Microbiol* 82: 5236- 5248.
- Shi, X., Hu, H., He, J., Chen, D., Suter, H.C. (2016b). Effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrification and the abundance and community composition of soil ammonia oxidizers in three land uses. *Biol Fertil Soils*. DOI 10.1007/s00374-016-1131-7.
- Solansky, S. (1982) N-Stabilisator SKW-DIDIN verbessert die Stickstoffwirkung der Gülle. *Blickfeld* 61: 1–4.
- Strous, M., Jetten, M.S. (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu Rev Microbiol* 58:99-117.
- Subbarao, G.V., Ito, O., Sahrawat, K.L., Berry, W.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., et al. (2006) Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems - Challenges and Opportunities. *Crit Rev Plant Sci* 25:303–335.
- Sylvia, D.M., Fuhrmann J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (2005) Principles and Applications of Soil Microbiol second. ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Tatari, K., Thamdrup, G., Albrechtsen, H.J., Smets, B.F. (2017) Challenges in using allylthiourea and chlorate as specific nitrification inhibitors. *Chemosphere* 182:301-305.
- Teske, W., Matzel, W. (1988). Die Beeinflussung der nitrifikationshemmenden Wirkung von Dicyandiamid durch Abbau und Verlagerung im Boden. *Arch Acker Pflanzenbau Bodenkd*, 32: 241–246.

- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., Hallin, S. (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 401–417. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.011>
- Thorisson, S., Gunstone, F.D., Hardy, R. (1992) Some oxidation products of ethoxyquin including those found in autoxidising systems. *Chem Phys Lipids* 60: 263-71.
- Torralbo, F., Menéndez, S., Barrena, I., Estavillo, J.M., Marino, D., González-Murua, C. (2017) Dimethyl pyrazol-based nitrification inhibitors effect on nitrifying and denitrifying bacteria to mitigate N₂O emission. *Scientific Reports* 7: 13810 | DOI:10.1038/s41598-017-14225-y.
- 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.* 10:1357-64.
- Walker, C.B., De La Torre, J.R., Klotz, M.G., et al. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:8818–8823.
- Wang, Q., Zhang, L.M., Shen, J.P., Du, S., Han, L., He J. (2016) Effects of dicyandiamide and acetylene on N₂O emissions and ammonia oxidizers in a fluvo-aquic soil applied with urea. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:23023-23033.
- Wang, Y., Ma, L., Mao, Y., Jiang, X., Xia, Y., Yu, K., Li, B., Zhang, T. (2017) Comammox in drinking water systems. *Water Res* 116: 332-341.
- Wang, Z., Cao, Y., Zhu-Barker X., Nicol, G.W., Wright A.L., Jia, Z., Jianga, X., (2019). Comammox *Nitrospira* clade B contributes to nitrification in soil. *Elsr Soil Biology and Biochemistry* 135: 392-395.
- Winogradsky, S. (1890) Sur les or auismes de la nitrification. *Comptes rendus de F Acadhnie des Sciences* 110:1013-1016.
- Wolt, J.D. (2000) Nitrapyrin Behavior in Soils and Environmental Considerations. *J. Environ. Qual.* 29:367-379
- Woodward, E.E., Kolpin, D.W., Zheng, W., Holm, N.L., Meppelink, S.M., Terrio, P.J., Hladik, M.L. (2019) Fate and transport of nitrapyrin in agroecosystems: Occurrence in agricultural soils, subsurface drains, and receiving streams in the Midwestern US. *Scienc of the Total Environm* 650:2830–2841
- Vajralaa, N., Martens-Habbenab, W., Sayavedra-Sotoa, L.A., Schauerc, A., Bottomleyd, P.J., Stahlb, D.A., Arpa, D.J. (2013) Hydroxylamine as an intermediate in ammoniaoxidation by globally abundant marine archaea. *PNAS.* 110: 1006-1011.
- van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lücker, S. (2015) Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528: 555–559.

- Vanparys, B., Spieck, E., Heylena, K., Wittebollec, L., Geetsc, J., Boonc, N., and De Vosa, P. (2007) The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* 30: 297–308.
- Vannelli, T., Hooper, A.B. (1992) Oxidation of Nitrapyrin to 6-Chloropicolinic Acid by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* 58:2321-2325.
- Verbaendert, I., De Vos, P., Boon, N., Heylen, K. (2011) Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. *Biochem Soc Trans* 39:254-8. doi: 10.1042/BST0390254.
- Venterea, R.T., Clough, T.J., Coulter, J.A., Breuillin-Sessoms, F., Wang P., Sadowsky M.J. (2015) Ammonium sorption and ammonia inhibition of nitrite-oxidizing bacteria explain contrasting soil N₂O production. *Sci Rep* 5, 12153.
- Vilas, M.P., Verburg, K., Thorburn, P.J., Probert, M.E., and Bonnett, G.D. (2019) A framework for analysing nitrification inhibition: A case study on 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). *Sci Total Environ* 672: 846–854
- Xi, R., Long, X., Huang, S., Yao, H. (2017) pH rather than nitrification and urease inhibitors determines the community of ammonia oxidizers in a vegetable. *AMB Expr* 7: 129. doi 10.1186/s13568-017-0426-x.
- Xia, W., Zhang, C., Zeng, X., Feng, Y., Weng, J., Lin, X., et al. (2011). Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *ISME J* 5: 1226–1236.
- Xue, Y. Wu, Z.J., Zhang, L.L, Gong, P., Dong, X.X., Nie, Y.X. (2012) Inhibitory effect of DMPP on soil nitrification as affected by soil moisture content, pH and organic matter]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 23:2663-9. PMID: 23359924.
- Yao, H., Gao Y., Nicol G. W., Campbell C. D., Prosser J. I., Zhang L., Han W., Singh B. K. (2011) Links between Ammonia Oxidizer Community Structure, Abundance, and Nitrification Potential in Acidic Soils. *Appl and Env Microb* 77: 4618-4625.
- You, J., Das, A., Dolan, E.M., Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Res* 43: 1801-1809.
- Zaman, M., Saggarr, S., Blennerhassett, J.D., Singh, J. (2009) Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system. *Soil Biol Biochem* 41: 1270-1280.
- Zerkle, A., Mikhail, S. (2017) The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle. *Geobiolog* 15: 343 -352.
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., von Locquenghien, K.H., Pasda G., et al. (2001) 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – A new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture – An introduction. *Biol Fertil Soils* 34: 79–84.

Zhang, L.M., Hu, H.W., Shen, J.P., He, J.Z. (2012) Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME J* 6: 1032–1045.

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