



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ ΣΟΥΛΤΑΝΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2022

**«In vitro αξιολόγηση της τοξικότητας  
επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε  
νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία»**

**“In vitro assessment of the toxicity of selected  
pesticides on ammonia-oxidizing bacteria and  
archaea”**

## Επιβλέπων καθηγητής

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

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δημήτριος Καρπούζας:** Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, και πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. **Σωτήριος Βασιλειάδης:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Καλλιόπη Παπαδοπούλου:** Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>6</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Εισαγωγή.....</b>	<b>9</b>
1.1 Τα γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι.....	10
1.2 Αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία.....	11
1.3. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους.....	11
1.4. Συμμετοχή των μικροοργανισμών του εδάφους στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου.....	12
1.4.1 Κύκλος αζώτου.....	12
1.4.2 Μηχανισμός νιτροποίησης.....	13
1.4.3 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση.....	13
1.4.3.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB).....	13
1.4.3.2 Νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA).....	14
1.4.3.3 Αναμμοχ.....	15
1.4.3.4 Comammox.....	15
1.4.3.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB).....	16
1.4.4 Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί ως μικροβιακοί δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων.....	16
1.5 Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	17
1.5.1 <i>Nitrosomonas communis</i> .....	17
1.5.2 <i>Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus</i> .....	17
1.6 Γεωργικά Φάρμακα και μεταβολίτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία....	18
1.6.1 Ζιζανιοκτόνα.....	18
1.6.1.1 Glyphosate και (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ (AMPA).....	18
1.6.1.2 Clethodim.....	20
1.6.1.3 Metsulfuron-methyl.....	21
1.6.2 Μυκητοκτόνα.....	22
1.6.2.1 Hymexazol.....	22
1.6.2.2 Pyraclostrobin.....	23

1.6.2.3 Etridiazole.....	24
1.6.3 Εντομοκτόνα.....	25
1.6.3.1 Chlorpyrifos και 3,5,6-trichloro -2- pyridinol (TCP).....	25
1.6.4. 3,5-Dichloroaniline (3,5-DCA).....	27
1.7 Στόχοι.....	29
<b>2 Πειραματικό μέρος.....</b>	<b>30</b>
2.1 Καλλιέργεια νιτρωδοποιητικών στελεχών <i>in vitro</i> .....	31
2.1.1 <i>Nitrosomonas communis</i> .....	31
2.1.2 <i>Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus</i> .....	32
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	34
2.3 Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών.....	36
2.4 Μελέτη της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων σε ασηπτικές, <i>in vitro</i> συνθήκες.....	36
2.5 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και υπολογισμός των τιμών EC <sub>50</sub> .....	38
<b>3 Αποτελέσματα.....</b>	<b>39</b>
3.1 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου <i>Nitrosomonas communis</i> .....	40
3.2 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτρωδοποιητικού αρχαίου <i>Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus</i> .....	46
3.3 Μελέτη της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων.....	53
<b>4 Συζήτηση.....</b>	<b>62</b>
<b>5 Συμπεράσματα.....</b>	<b>66</b>
<b>6 Βιβλιογραφία.....</b>	<b>67</b>

## Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Καθηγητή Καρπούζα Δημήτριο, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όπου βρισκόμουν κάτω από την επίβλεψή του.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά στην Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Περιβάλλοντος του Παν. Θεσσαλίας Ευαγγελία Παπαδοπούλου και την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Κολοβού για όλες τις συμβουλές τους, και την στήριξη τους καθόλα τα στάδια του πειράματος. Επίσης ευχαριστώ πολύ, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και βοήθειά τους, κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για όλη την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική- Διαγνωστικοί Δείκτες» του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

## Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα (γ.φ.) αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της συμβατικής γεωργίας για την προστασία των καλλιεργειών και ταυτόχρονα αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους που ρυθμίζονται από ένα αυστηρό πλαίσιο της ΕΕ. Αυτό βασίζεται σε καθιερωμένες δοκιμές τοξικότητας για τους υδρόβιους οργανισμούς και τους χερσαίους μακροοργανισμούς, αλλά όχι για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, παρά τον σημαντικό τους περιβαλλοντικό ρόλο. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς ως ιδανικούς μικροβιακούς δείκτες των επιπτώσεων των αβιοτικών στρεσογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ξενοβιοτικών ουσιών, στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, λόγω (1) του βασικού λειτουργικού τους ρόλου στον κύκλο του αζώτου, (2) της ευαισθησίας τους σε εξωτερικούς παράγοντες και (3) της διαθεσιμότητας καθιερωμένων εργαλείων για τη μέτρηση της λειτουργίας και της αφθονίας τους. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας της οποίας ο κύριος στόχος είναι η ανάπτυξη και η τυποποίηση πρωτοποριακών *in vitro* δοκιμών, ως ένα πρώτο συντηρητικό βήμα για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η τοξικότητα δέκα επιλεγμένων γ.φ. με διαφορετικό στόχο δράσης (ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα) σε δυο διακριτά εδαφογενή στελέχη νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, ενός AOB (*Nitrosomonas communis*) και ενός AOA (*Ca. Nitrosocosmicus franklandianus*). Η τοξικότητα προσδιορίστηκε σε λειτουργικό επίπεδο μέσω της παρακολούθησης της παραγωγής νιτρωδών σε υγρές καλλιέργειες των AOB και AOA στελεχών, υπό την παρουσία ενός εύρους διαφορετικών συγκεντρώσεων γ.φ. προκειμένου να υπολογιστούν οι τιμές  $EC_{50}$  ως σχετικά τελικά σημεία τοξικότητας. Παράλληλα μελετήθηκε και η αποδόμηση των γ.φ. με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερότητα τους στις υγρές καλλιέργειες των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών γ.φ. παρατηρήθηκαν διαφορετικά προφίλ τοξικότητας έναντι του AOB και του AOA στελεχών, με τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin και etridiazole να επιδεικνύουν σημαντική τοξικότητα και στα δυο στελέχη, ενώ το εντομοκτόνο chlorpyrifos και τα ζιζανιοκτόνα metsulfuron-methyl και glyphosate να εμφανίζουν υψηλότερη τοξικότητα έναντι του AOA και του AOB στελεχών, αντίστοιχα, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται σε θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ των AOB και των AOA ως προς τα κυτταρικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και ως προς το μεταβολισμό και την οικοφυσιολογία τους και επηρεάζεται περαιτέρω από τον ιδιαίτερο μηχανισμό δράσης του κάθε γ.φ.

## Abstract

Pesticides are an integral part of conventional agriculture for crop protection and at the same time are important environmental pollutants regulated by a strict EU regulatory framework. This is based on toxicity tests that are well-established for aquatic organisms and terrestrial macro-organisms, but not for soil micro-organisms, despite their important environmental role. Recent benchmarking studies point to ammonia-oxidizing microbes (AOM) as ideal microbial indicators of the effects of abiotic stressors on the soil microbial community due to their key functional role, their sensitivity to external perturbations, and the availability of established tools to measure their activity and abundance. This study is part of a larger research effort whose main objective is to develop and standardize innovative in vitro assays as a first conservative step to assess the toxicity of pesticides to soil microorganisms. In this context, the toxicity of ten selected pesticides with different targets of action (herbicides, insecticides, fungicides) on two distinct terrestrial ammonia-oxidizing isolates, one AOB (*Nitrosomonas communis*) and one AOA (*Ca. Nitrosocosmicus franklandianus*) was studied. Toxicity was determined at the functional level by monitoring nitrite production in liquid cultures of the AOB and AOA isolates amended with a broad range of pesticides concentrations in order to calculate EC<sub>50</sub> values as a relevant toxicity endpoint. In parallel, pesticides degradation was also monitored via HPLC in order to determine their stability in the liquid cultures of the AOM isolates. Among the different categories of the tested pesticides different toxicity profiles were observed against the AOB and AOA isolates, with the fungicides pyraclostrobin and etridiazole showing significant toxicity against both isolates, while the insecticide chlorpyrifos and the herbicides metsulfuron-methyl and glyphosate showed higher toxicity against the AOA and AOB isolate, respectively. This was probably due to fundamental differences between AOB and AOA regarding their cellular and biochemical characteristics, as well as their metabolism and ecophysiology, and was further influenced by the specific mechanism of action of each pesticide.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Τα γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι

Η χρήση των γεωργικών φαρμάκων (γ.φ.) αποτελεί καθιερωμένη γεωργική πρακτική για την προστασία των καλλιεργειών από ασθένειες, έντομα και ζιζάνια. Ωστόσο, από την αρχή της εφαρμογής τους, τα γ.φ. έχουν προκαλέσει πολλά προβλήματα όπως κινδύνους για τη ζωή των ανθρώπων και των ζώων, περιβαλλοντική ρύπανση και χρόνια παραμονή των υπολειμμάτων τους στον αέρα, το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (Singh 2012). Περαιτέρω η μετακίνηση των γ.φ. από τα σημεία εφαρμογής τους σε περιοχές εκτός στόχου δράσης δημιουργεί τρία κύρια προβλήματα: 1) οικονομικές απώλειες για τους αγρότες, 2) αναποτελεσματικό έλεγχο των εχθρών των καλλιεργειών και 3) πιθανή ρύπανση του περιβάλλοντος. Η περιβαλλοντική τύχη των γ.φ. εξαρτάται από τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους στο οποίο εφαρμόζονται (Tiryaki and Temur 2010) και καθορίζεται περαιτέρω από τρεις βασικές παραμέτρους: 1) Την αρχική κατανομή του γ.φ.: το πως δηλαδή κατανέμεται το γ.φ. μεταξύ των διαφόρων έμβιων και αβιοτικών περιβαλλοντικών συνιστωσών (οργανισμοί, νερό, έδαφος, αέρας) τη στιγμή που εφαρμόζεται. Η παράμετρος αυτή εξαρτάται από τον τύπο του σκευάσματος, το τρόπο, το χρόνο και τη διάρκεια εφαρμογής του, καθώς και από περιβαλλοντικούς και κλιματικούς παράγοντες. 2) Την υπολειμματική διάρκεια – εμμονή των γ.φ. στο περιβάλλον η οποία συνήθως εκφράζεται ως χρόνος ημιζωής ( $t_{1/2}$ ), δηλαδή ως ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η διάσπαση του 50% της ποσότητας του γ.φ. που χρησιμοποιήθηκε αρχικά. 3) Την κινητικότητα τους, που μπορεί να οδηγήσει σε ανακατανομή εντός της θέσης εφαρμογής ή μετακίνηση ορισμένης ποσότητας γ.φ. εκτός της τοποθεσίας εφαρμογής. Μετά την εφαρμογή, ένα γ.φ. μπορεί: α) να προσροφηθεί σε σωματίδια του εδάφους, στη βλάστηση ή σε άλλες επιφάνειες και να παραμείνει κοντά στο σημείο εναπόθεσης, β) να προσροφηθεί στα σωματίδια του εδάφους και να μετακινηθεί με απορροή ή με τον άνεμο, γ) να διαλυθεί σε νερό και να απορροφηθεί από τα φυτά, δ) να εξατμιστεί ή να μεταφερθεί με τον άνεμο. Η κινητικότητα ενός γ.φ. επηρεάζεται από την προσρόφηση και την υδατοδιαλυτότητα του την πτητικότητα του, αλλά και από κλιματικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως ο καιρός, η τοπογραφία, η υφή και η δομή του εδάφους (Tiryaki and Temur 2010).

Συνεπώς καθίσταται σαφές πως τα γ.φ. εξαιτίας της αδυναμίας περιορισμού τους στα σημεία εφαρμογής τους και της ιδιότητας τους να μεταφέρονται μεταξύ νερού, φυτών, εδάφους και αέρα, αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για το περιβάλλον και τους ζωντανούς οργανισμούς. Ως εκ τούτου κρίνεται απαραίτητη η καθιέρωση τυποποιημένων μεθόδων και εργαλείων για την αξιολόγηση της (οίκο)τοξικότητας τους.

## 1.2 Αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία

Στην Ευρώπη, η αξιολόγηση της τοξικότητας των γ.φ. γίνεται κατά κύριο λόγο από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA). Ακολουθείται ένα δυαδικό σύστημα, όπου πρώτα η EFSA αξιολογεί τις δραστικές ουσίες των γ.φ. με βάση τον κανονισμό (EC) No 1107/2009. και έπειτα τα κράτη μέλη αξιολογούν και εγκρίνουν τα προϊόντα σε εθνικό επίπεδο. Η νομοθεσία αυτή έχει μεταξύ άλλων ως στόχο και τον προσδιορισμό των επιπέδων περιβαλλοντικής έκθεσης στις δραστικές ουσίες των γ.φ., αλλά και τον προσδιορισμό της τοξικότητας και/ή της οικότοξικότητας τους σε οργανισμούς διαφορετικών τροφικών επιπέδων. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται ο περιβαλλοντικός κίνδυνος, διαμέσου της σύγκρισης των επιπέδων έκθεσης και τοξικότητας (Regulation 2009). Η ισχύουσα νομοθεσία βασίζεται σε δοκιμές τοξικότητας που είναι αρκετά καλά τεκμηριωμένες για τους υδρόβιους οργανισμούς και τους χερσαίους μακροοργανισμούς, αλλά όχι για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η αξιολόγηση της τοξικότητας των γ.φ. στη μικροχλωρίδα του εδάφους εξακολουθεί να βασίζεται σε απαρχαιωμένες δοκιμές ανοργανοποίησης του αζώτου που δεν μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια τις επιπτώσεις των ουσιών αυτών στις βασικές μικροβιακές λειτουργίες και τη μικροβιακή ποικιλότητα (Karpouzas 2021).

## 1.3. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους εκπληρώνουν διάφορες σημαντικές λειτουργίες, που περιλαμβάνουν: 1) τη συμβολή τους στον άμεσο περιορισμό φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων του εδάφους, παράγοντας ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, τοξικές ουσίες ή ένζυμα που προκαλούν λύση των μικροβιακών κυτταρικών τοιχωμάτων (Chandra and Kumar 2017), 2) τη βιοσύνθεση και ελευθέρωση ουσιών όπως πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες, που οδηγούν σε βελτίωση της δομής του εδάφους (Griffiths 1965; Martens and Frankenberger 1992), 3) την αποτοξικοποίηση ή διάσπαση ανθρωπογενών ρύπων όπως τοξικά μέταλλα, αρωματικές ενώσεις και γεωργικά φάρμακα (βιοαπορρύπανση) (Cao *et al.* 2009; Mustapha *et al.* 2018), 4) τη συμμετοχή τους στους κύκλους των θρεπτικών ουσιών με κυριότερους τους κύκλους του αζώτου (N) (Philippot and Germon 2005; Hayatsu, *et al.* 2010; Geisseler *et al.* 2010) του φωσφόρου (P) (Tate 1984; Richardson and Simpson 2011; Hallama *et al.* 2019), και του άνθρακα (C), συμβάλλοντας άμεσα στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και έμμεσα στον μετριασμό της υπερθέρμανσης του πλανήτη και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (Hemkemeyer *et al.* 2021). Για το λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν μελετηθεί τόσο για τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, αλλά και ως δείκτες τοξικότητας για διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται/ελευθερώνονται στο περιβάλλον, όπως τα γ.φ. (Karpouzas 2021).

## 1.4. Συμμετοχή των μικροοργανισμών του εδάφους στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου

### 1.4.1 Κύκλος αζώτου

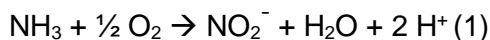
Αν και το στοιχειακό άζωτο ( $N_2$ ) αποτελεί κυρίαρχο συστατικό της ατμόσφαιρας καταλαμβάνοντας περίπου 79 % του συνολικού όγκου της, η παροχή τροφής σε ζώα και ανθρώπους περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα του δεσμευμένου σε κάποια χημική ένωση αζώτου, που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από φυτά και ζώα. Το άζωτο της ατμόσφαιρας είναι ένα αδρανές αέριο και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την πλειοψηφία ζωντανών οργανισμών (Delwiche 1970). Η εναλλαγή μεταξύ του αδρανούς αερίου  $N_2$  στην υφιστάμενη ατμόσφαιρα και του «δραστικού αζώτου» (ενώσεις αζώτου που μπορούν να αφομοιωθούν από τους έμβιους οργανισμούς) ελέγχεται πλήρως από μικροβιακές δραστηριότητες. Οι κύριες μικροβιακές διεργασίες του κύκλου του αζώτου είναι η αζωτοδέσμευση, η αμμωνιοποίηση/ανοργανοποίηση, η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση (Stein and Klotz 2016).

- **Αζωτοδέσμευση:** Είναι η διεργασία κατά την οποία ορισμένοι μικροοργανισμοί δεσμεύουν το  $N_2$  της ατμόσφαιρας και το μετατρέπουν σε αμμωνία. Επιτυγχάνεται από βακτήρια και αρχαία που κωδικοποιούν ενζυμικά σύμπλοκα νιτρογενάσης που αποτελούνται από τις πρωτεΐνες δινιτρογενάση μολυβδαινίου-σιδήρου και αναγωγή της δινιτρογενάσης βαναδίου ή σιδήρου.
- **Αμμωνιοποίηση/Ανοργανοποίηση:** Είναι η διαδικασία μετατροπής των οργανικών αζωτούχων ενώσεων σε  $NH_3$  από μικροοργανισμούς του εδάφους που διαθέτουν το γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων όπως ουρεάσες και αμινοπεπτιδάσες.
- **Νιτροποίηση:** Είναι η διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά όντα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διεργασία της νιτροποίησης απαιτείται η δράση εξειδικευμένων μικροοργανισμών, όπως: 1) νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί που οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη (νιτρωδοποίηση), 2) νιτρικοποιητικοί μικροοργανισμοί που οξειδώνουν τα νιτρώδη σε νιτρικά (νιτρικοποίηση) και 3) κομματοχ βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρικά.
- **Απονιτροποίηση:** είναι η διαδικασία κατά την οποία τα νιτρικά ιόντα ανάγονται υπό αναερόβιες συνθήκες σε μονοξείδιο του αζώτου ( $NO$ ), υποξείδιο του αζώτου ( $N_2O$ ) και στοιχειακό άζωτο ( $N_2$ ), το οποίο τελικά ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα. Πραγματοποιείται από ετερότροφους μικροοργανισμούς που μπορούν να συνδέσουν απευθείας αυτές τις τρεις αντιδράσεις με την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και να πραγματοποιήσουν απονιτροποίηση από  $NO_3^-$  σε  $N_2$ . Αυτοί οι μικροοργανισμοί αναφέρονται ως κλασικοί ή κανονικοί απονιτροποιητές (Stein and Klotz 2016).

### 1.4.2 Μηχανισμός νιτροποίησης

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια που περιλαμβάνουν τις παρακάτω αντιδράσεις (Ward 2013):

A) Νιτρωδοποίηση:



Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε δύο επιμέρους στάδια: 1) την οξείδωση της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) ή των αμμωνιακών ιόντων ( $\text{NH}_4^+$ ) προς υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) με τη δράση του ενζύμου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) και 2. την οξείδωση της υδροξυλαμίνης ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) προς νιτρώδη ιόντα ( $\text{NO}_2^-$ ) με τη δράση του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO), (Caranto and Lancaster 2017).

B) Νιτρικοποίηση:



Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται μετατροπή των νιτρωδών ιόντων σε νιτρικά ιόντα με την βοήθεια του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR) (Beekman *et al.* 2018).

Η νιτροποίηση επιτελείται από μικροοργανισμούς που διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή των ενζύμων AMO (νιτρωδοποιητικά βακτήρια -AOB, νιτρωδοποιητικά αρχαία – AOA και *compartox* βακτήρια), HAO (AOB και *compartox* βακτήρια) και NXR (νιτρικοποιητικά βακτήρια - NOB και *compartox* βακτήρια).

### 1.4.3 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

#### 1.4.3.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) αποτελούν χημειοαυτότροφους μικροοργανισμούς (Sinha and Annachhatre 2007). Συνολικά, έχουν χαρακτηριστεί πέντε γένη AOB τα οποία και ανήκουν στην συνωμοταξία των Πρωτεοβακτηρίων. Συγκεκριμένα, τέσσερα από αυτά ανήκουν στην ομοταξία των β-Πρωτεοβακτηρίων: 1) *Nitrosomonas*, 2) *Nitrosospira*, 3) *Nitrosovibrio* και 4) *Nitrosolobus*, ενώ τα AOB του γένους *Nitrosococcus* ανήκουν στην ομοταξία των γ-Πρωτεοβακτηρίων (Soliman and Eldyasti 2018).

Μορφολογικά τα γένη αυτά, διαφέρουν ως προς το σχήμα και το μέγεθος του κυττάρου, την ύπαρξη ή όχι μαστίγιων για την κίνηση των κυττάρων και τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών (Soliman and Eldyasti 2018; Sinha and Annachhatre 2007; Koops and Röser 2001). Επιπλέον σε σχέση με τη δομή των μεμβρανών των AOB, τα λίπιδια τους συνδέονται μεταξύ τους με εστερικό δεσμό, ο οποίος είναι αρκετά ευαίσθητος στην υδρόλυση, καθιστώντας τις μεμβράνες τους σχετικά ευαίσθητες σε σχέση με την διαπερατότητά τους σε ξενοβιοτικές ουσίες (Shen *et al.* 2013).

Τα AOB χρησιμοποιούν ως μοναδική πηγή ενέργειας την αμμωνία και ως πηγή άνθρακα το  $\text{CO}_2$ . Λειτουργικά συμμετέχουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, τη νιτρωδοποίηση. Στο μηχανισμό οξείδωσης της αμμωνίας από τα AOB συμμετέχει μια

σειρά από σημαντικά ένζυμα. Ένα από αυτά είναι η διαμεμβρανική AMO, που καταλύει τη μετατροπή των  $\text{NH}_4^+$  σε  $\text{NH}_2\text{OH}$ , ως ενδιάμεσο προϊόν, και νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτούνται δύο ηλεκτρόνια. Η περιπλοσματική διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης είναι το δεύτερο ένζυμο που απαιτείται για την οξειδωση της αμμωνίας. Η αντίδραση που καταλύει, είναι η μετατροπή της  $\text{NH}_2\text{OH}$  σε  $\text{NO}$  με την ταυτόχρονη ελευθέρωση τριών ηλεκτρονίων, τα δύο εκ των οποίων χρησιμοποιούνται από την AMO. Ο συνολικός μηχανισμός μετατροπής του  $\text{NO}$  σε  $\text{NO}_2^-$  δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός με τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω να είναι οι επικρατέστεροι (Soliman and Eldyasti 2018).

Τα AOB συναντώνται σε διαφορετικά χερσαία και υδατικά οικοσυστήματα. Είναι όμως ιδιαίτερα σημαντικά σε αγροτικά οικοσυστήματα καθώς επηρεάζουν τη σχετική διαθεσιμότητα των διαφόρων μορφών «δραστικού» αζώτου σε αυτά. Επηρεάζονται και λειτουργικά και η αφθονία τους από παράγοντες όπως: α) η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (Wiesmann 1994), β) η θερμοκρασία (Kim and Lee 2011) και γ) το pH (Soliman and Eldyasti 2018).

#### 1.4.3.2 Νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA)

Η δεύτερη κατηγορία μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην νιτροποίηση είναι τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA). Και τα AOA όπως τα AOB συμμετέχουν στην νιτρωδοποίηση. Η πρώτη απομόνωσή αρχαίου που είχε τη δυνατότητα να οξειδώνει την αμμωνία πραγματοποιήθηκε το 2005 (Könnike *et al.* 2005). Όπως τα AOB έτσι και τα AOA είναι υποχρεωτικά χημειοαυτότροφοι μικροοργανισμοί και εκφράζουν την AMO (Hatzenpichler 2012).

Ανήκουν στη συνωμοταξία Thaumarchaeota που διαχωρίζεται από εκείνες των Crenarchaeota και Euryarchaeota (Stahl, *et al.* 2012). Επιπλέον κατατάσσονται στην κλάση *Nitrososphaeria* που περιλαμβάνει τα γένη *Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales*, *Nitrosotaleales*, *Nitrosopumilales* (Cao *et al.* 2013).

Η δομή των μεμβρανών των AOA διαφέρει από αυτήν των AOB. Αποτελούνται από έναν κορμό γλυκερόλης, στον οποίο συνδέονται ανθεκτικές σε οξειδωτικά μέσα διακλαδισμένες ισοπρενοειδείς αλυσίδες, με τη βοήθεια αιθερικού δεσμού, ο οποίος είναι πιο ανθεκτικός στην υδρόλυση από τον αντίστοιχο εστερικό δεσμό στις μεμβράνες των AOB. Η δομή των μεμβρανών καθορίζει όπως και στα AOB τη διαπερατότητα των κυττάρων σε ξενοβιοτικές ουσίες όπως τα γεωργικά φάρμακα, (Shen *et al.* 2013).

Τα AOA, όπως και τα AOB έχει βρεθεί πως εκφράζουν την AMO. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν ισχύει και για την HAO. Ως εκ τούτου εικάζεται πως η υδροξυλαμίνη ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) δεν αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της νιτρωδοποίησης για τα AOA και πως είτε ένα άγνωστο ένζυμο υποκαθιστά την HAO στα AOA είτε η αντίδραση της οξειδωσης της αμμωνίας στα AOA αποδίδει διαφορετικό προϊόν. Ως ένα τέτοιο προϊόν έχει προταθεί το νιτροξύλιο ( $\text{HNO}$ ). Ακολούθως, το  $\text{HNO}$  θα μπορούσε να οξειδώνεται σε  $\text{NO}_2^-$  μέσω μιας οξειδοαναγωγής του νιτροξυλίου ( $\text{NxOR}$ ) (Hatzenpichler 2012).

Τέλος, τα AOA στο περιβάλλον φαίνεται να έχουν ευρεία κατανομή, τόσο σε χερσαία όσο και σε υδατικά περιβάλλοντα, ενώ σε πολλά οικοσυστήματα απαντώνται σε εντυπωσιακά μεγαλύτερη αφθονία συγκριτικά με τα AOB. Τα AOA φαίνεται να έχουν ένα ευρύ φάσμα συνθηκών ανάπτυξης και ορισμένοι οικότυποι μπορεί επίσης να είναι μοναδικοί για συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Εξαρτώνται λειτουργικά αλλά και η

αφθονία τους από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και το pH, όπου φαίνεται να ευνοούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και χαμηλότερο pH σε σχέση με τα AOB (Erguder *et al.* 2009).

#### 1.4.3.3 Anammox (Anaerobic ammonium oxidizers)

Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου πραγματοποιείται αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας από αναερόβια βακτήρια γνωστά ως anammox (Kuenen 2008). Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στη συνωμοταξία των Planctomycetes, και κατατάσσονται σε 4 κυρίως γένη : *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula* και *Ammonoxoglobus* (Francis, *et al.* 2007)

Δεδομένης της απουσίας του οξυγόνου, τα anammox βακτήρια χρησιμοποιούν ως δέκτη ηλεκτρονίων τα παραγόμενα νιτρώδη ιόντα, και καταλήγουν μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος, της υδραζίνης, στην παραγωγή N<sub>2</sub> αντί για νιτρικά ιόντα με τη δράση του ενζύμου της HAO (Strous and Jetten 2004; Francis, *et al.* 2007; Kuenen 2008).

Εμφανίζονται σε διάφορα περιβάλλοντα: θαλάσσια, παράκτια, ανοξικές λεκάνες, ζώνες ελάχιστου οξυγόνου (OMZs) στη Δυτική Αφρική, Χιλή και Περού, μαγκρόβια δάση, λίμνες– συμπεριλαμβανομένης της λίμνης Tanganyika, της δεύτερης μεγαλύτερης λίμνης στον κόσμο. Αν και η δραστηριότητα των anammox βακτηρίων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στα εδάφη, η εμφάνισή τους σε ένα τόσο ευρύ φάσμα υδάτινων περιβαλλόντων υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη διεργασία είναι ευρέως διαδεδομένη και είναι πιθανό ότι τα anammox βακτήρια μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε οποιοδήποτε οικοσύστημα βρίσκεται σε υποξική ζώνη και διαθέτει N (Francis *et al.* 2007).

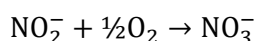
#### 1.4.3.4 Comammox (Complete ammonia oxidizers)

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η θεωρία ότι η νιτροποίηση είναι μια αρθρωτή διαδικασία δύο σταδίων: 1) της **νιτρωδοποίησης** που επιτελείται από AOB και AOA και 2) της **νιτρικοποίησης** που επιτελείται από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB). Το 2015, ωστόσο, ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά βακτήρια που έχουν την ικανότητα να επιτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης δηλαδή και τη νιτρωδοποίηση και τη νιτρικοποίηση και ονομάστηκαν comammox βακτήρια (Daims *et al.* 2015; Hu and He 2017). Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν το ένζυμο της νιτρώδους οξειδοαναγωγής για την οξειδωση των νιτρωδών σε νιτρικά, αλλά και ομόλογα ένζυμα της AMO και της HAO (Daims *et al.* 2015). Τα comammox βακτήρια ανήκουν στο γένος *Nitrospira* και στην ευρύτερη φυλογενετική ομάδα των NOB. Περαιτέρω φυλογενετικές αναλύσεις βασιζόμενες στο *amoA* γονίδιο, πρότειναν το διαχωρισμό των comammox σε δύο ομάδες A και B.

Τα comammox *Nitrospira* είναι ευρέως διαδεδομένα σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων τεχνητών συστημάτων όπως οι εγκαταστάσεις πόσιμου νερού και επεξεργασίας λυμάτων, αλλά και σε αρκετούς φυσικούς οικοτόπους, όπως σε εδάφη δασών και ορυζώνων και σε ιζήματα λιμνών.

#### 1.4.3.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) είναι υπεύθυνα για το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, την νιτρικοποίηση. Αυτά τα βακτήρια ανήκουν στη συνωμοταξία των Πρωτεοβακτηρίων και ειδικότερα κατατάσσονται στα γένη: *Nitrospira*, *Nitrolancetus*, *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus*, και *Nitrospina* (Liu *et al.* 2018). Τα πιο γνωστά είδη του γένους *Nitrobacter*, είναι χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί, που χρησιμοποιούν τα νιτρώδη ως πηγή ενέργειας και το CO<sub>2</sub> ως πηγή άνθρακα μέσω του κύκλου Calvin, όπως και τα AOB. Ωστόσο, το λιγότερο γνωστό γένος *Nitrospina*, αφθονεί στους ωκεανούς και χρησιμοποιεί την αναγωγική οδό του τρικαρβοξυλικού οξέος για τη δέσμευση του CO<sub>2</sub>. Πολλά στελέχη είναι γνωστό ότι διαθέτουν ετεροτροφικές ικανότητες και θεωρούνται μιξοτροφικά ή προαιρετικά αυτότροφα. Διαθέτουν επίσης περιορισμένες μεταβολικές ικανότητες για πρόσληψη και αποδόμηση οργανικών μορίων, και επομένως μπορούν να συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους με οργανικό άνθρακα και σε ορισμένες περιπτώσεις, να αναπτυχθούν αργά απουσία νιτρωδών όταν υπάρχουν ορισμένα οργανικά υποστρώματα (Ward 2013). Η οξειδωση των νιτρωδών γίνεται βάση της στοιχειομετρίας (Ward 2013):



Όλα τα γνωστά NOB οξειδώνουν τα νιτρώδη με τη βοήθεια του ενζύμου της οξειδοαναγωγής των νιτρωδών (NXR). Η NXR συνδέεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματική μεμβράνης των NOB και περιέχει μια υπομονάδα α (NxrA) με την καταλυτική θέση και μια υπομονάδα β (NxrB) που διοχετεύει ηλεκτρόνια που προέρχονται από τα νιτρώδη προς τα επόμενα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας. Πιθανότατα, μια υπομονάδα γ (NxrC) να λειτουργεί ως άγκυρα για σύνδεση στη μεμβράνη και για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων (Sorokin *et al.* 2012).

Τέλος, τα NOB εντοπίζονται και αυτά τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα περιβάλλοντα, συνήθως σε συνδυασμό με τα AOB και τα AOA με τα οποία αλληλεπιδρούν, για την ολοκλήρωση της διεργασίας της νιτροποίησης (Francis, *et al.* 2007; Hayatsu, *et al.* 2010; Ward 2013).

#### 1.4.4 Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί ως μικροβιακοί δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων

Όπως προαναφέρθηκε, η αξιολόγηση της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους εξακολουθεί να βασίζεται σε απαρχαιωμένες δοκιμές ανοργανοποίησης που αποτυγχάνουν να προσδιορίσουν τις επιπτώσεις στις βασικές μικροβιακές λειτουργίες και τη μικροβιακή ποικιλότητα. Επίσης, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ελέγχουν αρκετές διεργασίες όπως 1) βασικές αντιδράσεις στον κύκλο των θρεπτικών συστατικών που ρυθμίζουν τη γονιμότητα του εδάφους και την παραγωγή αερίων θερμοκηπίου, 2) αλληλεπιδράσεις με καλλιέργειες που συχνά έχουν ευεργετικό αποτέλεσμα 3) υποστήριξη της δομής του εδάφους και 4) παροχή πλούτου λειτουργικής βιοποικιλότητας που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από τη βιοτεχνολογία (Karpouzas 2021).

Για αυτό το λόγο έχουν προταθεί διάφοροι μικροοργανισμοί ως πιθανοί βιολογικοί δείκτες στο πλαίσιο ανάπτυξης νέων μεθόδων για την αξιολόγηση της τοξικότητας των ξενοβιοτικών ουσιών σε εδάφη. Οι νιτροποιητικοί και ειδικότερα οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί προτείνονται ως κατάλληλοι βιολογικοί δείκτες του εδάφους με βάση το γενετικό τους προφίλ (Ritz *et al.* 2009). Επιπλέον οι



μικροοργανισμοί αυτοί επιδεικνύουν υψηλή ευαισθησία σε περιβαλλοντικές αλλαγές σε ποικίλες κλίμακες, και συνεπώς οι μικροβιακές κοινότητες των AOB και AOA όταν μελετώνται συνδυαστικά θα μπορούσαν να είναι ένας καλός βιοδείκτης για την παρακολούθηση της επίδρασης των ξеноβιοτικών ουσιών στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Wessén and Hallin 2011). Συνολικά οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί αποτελούν καλούς δυνητικούς βιοδείκτες για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους δεδομένου ότι 1) ελέγχουν μια πολύ σημαντική λειτουργία στον κύκλο N του εδάφους 2) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην έκθεση σε γ.φ. παρέχοντας μια συνεπή και σχετική οικοτοξικολογική απόκριση 3) υπάρχει καλή γνώση του κύκλου ζωής, της οικολογίας, της βιοχημείας και της φυσιολογίας τους και 4) διατίθενται καλά τυποποιημένες μέθοδοι για τη μέτρηση της δραστηριότητας και της αφθονίας τους με ακριβή τρόπο (Karpouzas 2021).

## 1.5 Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

### 1.5.1 *Nitrosomonas communis*

Το *Nitrosomonas communis* είναι ένα AOB κοινό στα εδάφη (Koops *et al.* 1991; Tokuyama *et al.* 2004). Είναι μεσόφιλο αερόβιο β-Πρωτεοβακτήριο που ανήκει στο σύμπλεγμα *Nitrosomonas* 8 (Kozłowski *et al.* 2016). Είναι υποχρεωτικά χημειολιθότροφο βακτήριο που χρησιμοποιεί την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ως μοναδική πηγή ενέργειας, ενώ έχει ως κύρια πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα (Koops *et al.* 1991).

Το γονιδίωμα του *N. communis* περιέχει 2 οπερόνια για την AMO (*amoCAB*). Επιπλέον έχει τρία οπερόνια για την HAO (Kozłowski *et al.* 2016).

Τέλος όπως και για την πλειοψηφία των ειδών του γένους *Nitrosomonas* τα κύτταρά του είναι ελλειψοειδή έως ραβδοσχήμα, με εκτεταμένες ενδοκυτταροπλασματικές μεμβράνες και διατεταγμένα ως πεπλατυσμένα κυστίδια στο περιφερικό κυτταρόπλασμα (Koops *et al.* 1991).

### 1.5.2 *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus*, C13

Τα AOA που ανήκουν στη συνωμοταξία των Thaumarchaeota διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου. Το γένος *Candidatus Nitrosocosmicus* τοποθετείται στα *Nitrososphaerales*, μία από τις τέσσερις τάξεις των AOA. Τα στελέχη *Candidatus Nitrosocosmicus* είναι ευρέως διανεμημένα στο έδαφος (Nicol *et al.* 2019).

Το στέλεχος *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus* C13 είναι ένα μεσόφιλο, ουδετερόφιλο αυτότροφο AOA που αναπτύσσεται εντός του εύρους θερμοκρασιών 30°C–45°C και του εύρους pH 6–8,5 (Lehtovirta *et al.* 2016). Το γονιδίωμα του στελέχους περιέχει ένα αντίγραφο των *amoA*, *amoB* και *amoX* και τρία πανομοιότυπα αντίγραφα του *amoC*. Ενώ τα γονίδια *amoA* και *amoX* είναι γειτονικά, άλλες υπομονάδες AMO είναι διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα, όπως συνήθως παρατηρείται στα *Nitrososphaerales*. Τα βασικά γονίδια για το μονοπάτι καθήλωσης του άνθρακα, υπάρχουν και αυτά στο γονιδίωμα του όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς το *Ca. N. franklandianus* C13 αναπτύσσεται αυτοτροφικά χρησιμοποιώντας το HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ως μοναδική πηγή άνθρακα (Nicol *et al.* 2019).

Τέλος, τα κύτταρα του στελέχους C13 είναι μεγαλύτερα από εκείνα άλλων απομονωμένων εδαφογενών στελεχών ΑΟΑ, με όγκο περίπου  $0.7\mu\text{m}^3$ . Τα κύτταρα έχουν εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό που οδηγεί στον σχηματισμό συσσωματωμάτων και μπορεί να διευκολύνει το σχηματισμό βιοφίλμ, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα ΑΟΑ από τις επιβλαβείς επιδράσεις του χαμηλού pH και των παρεμποδιστών νιτροποίησης (Lehtovirta-Morley *et al.* 2016).

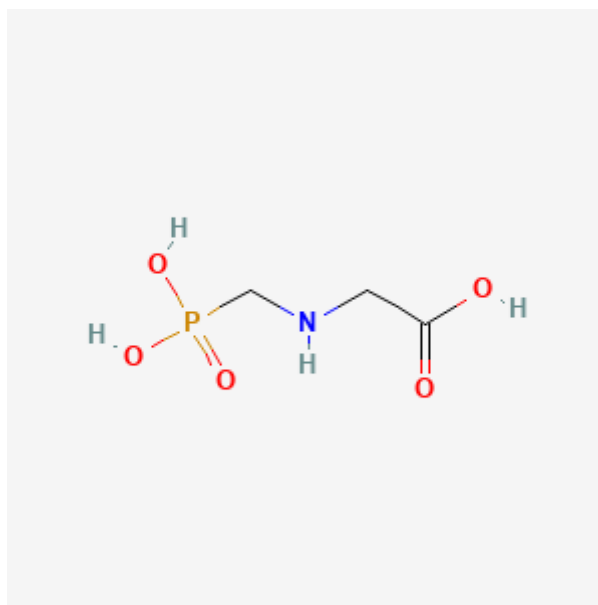
## 1.6 Γεωργικά Φάρμακα και μεταβολίτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

### 1.6.1 Ζιζανιοκτόνα

#### 1.6.1.1 Glyphosate και (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ (AMPA)

Το glyphosate είναι μια οργανοφωσφορική χημική ένωση και αποτελεί τη δραστική ουσία σκευασμάτων καταπολέμησης ζιζανίων όπως το RoundUp™. Βρίσκεται σε μορφή άοσμης λευκής σκόνης. Αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα παγκοσμίως. Τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα περιέχουν συνήθως τη δραστική ουσία σε συνδυασμό με άλλα συστατικά που βοηθούν στη βελτίωση της απορρόφησης της από το φυτό (PubChem 2022g).

Η χημική δομή του glyphosate απεικονίζεται στην Εικόνα 1 και ο μοριακός του τύπος είναι:  $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$  (PubChem 2022g).



ΕΙΚΟΝΑ 1: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ GLYPHOSATE

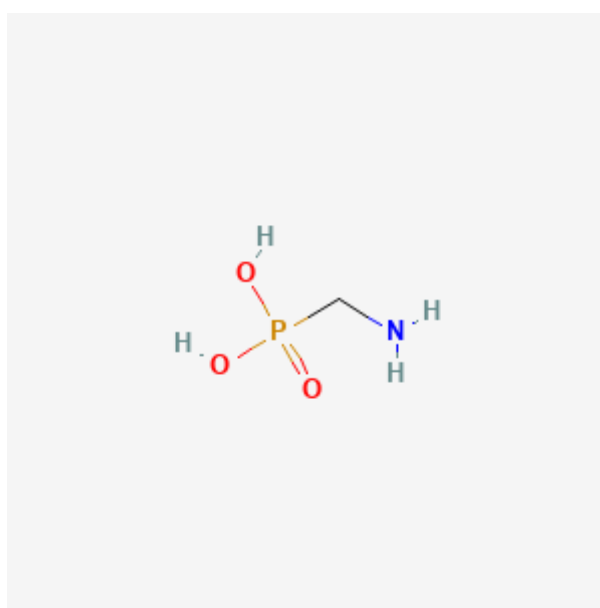
Ο τρόπος δράσης του στα φυτά είναι μέσω της αναστολής της λειτουργίας της συνθάσης του 5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικο-3-φωσφορικού οξέος [5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)], του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος οδηγεί στη σύνθεση των απαραίτητων αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη). Το glyphosate

συνεπώς ευθύνεται για τις ελλείψεις αυτών των αμινοξέων, αλλά και άλλες μεταβολικές διαταραχές που συνεπάγονται περαιτέρω την αναστολή της φωτοσύνθεσης (Reddy and Duke 2015).

Η οικοτοξικότητα της δραστικής ουσίας glyphosate είναι χαμηλή και περιορίζεται στα φυτά, σε αντίθεση με τις προστιθέμενες ουσίες που περιέχονται στα εμπορικά σκευάσματά του, για την καλύτερη απορρόφησή του από τα φυτά, οι οποίες είναι αρκετά τοξικές για τα θηλαστικά, τα πουλιά και τα ψάρια (Gonçalves *et al.* 2019).

Το AMPA ή (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ είναι μέλος της κατηγορίας των φωσφονικών οξέων τα οποία και αποτελούνται από το φωσφονικό οξύ υποκατεστημένο από μια αμινομεθυλομάδα. Είναι μεταβολίτης του ζιζανιοκτόνου glyphosate (PubChem 2022c).

Έχει μοριακό τύπο:  $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 2 (PubChem 2022c).



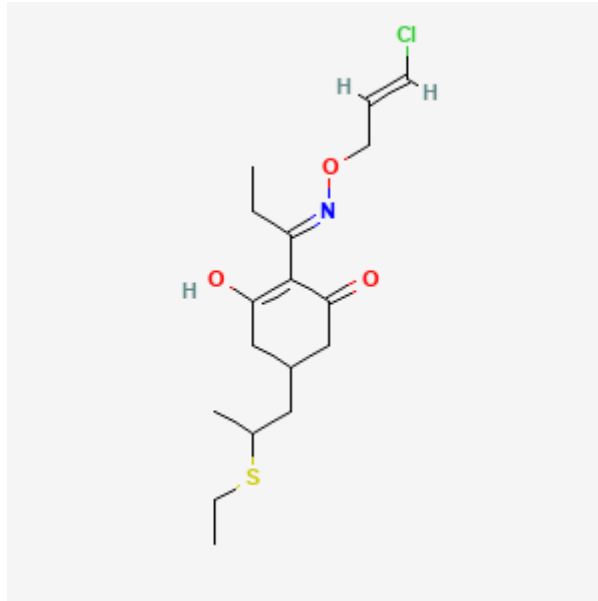
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ AMPA

Η οικοτοξικότητα του AMPA είναι αντίστοιχη ή και χαμηλότερη αυτής της μητρικής του ένωσης (Gonçalves *et al.* 2019).

### 1.6.1.2 Clethodim

Το clethodim είναι παράγωγο της κυκλοξέξανο-1,3-διόνης (cyclohexanedione) και χρησιμοποιείται ως εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο για τον έλεγχο ετήσιων και πολυετών ζιζανίων σε πλήθος καλλιεργειών, όπως, σέλινο, τριφύλλι, κωνοφόρα, βαμβάκι, κράνμπερι, σκόρδο, κρεμμύδια, καλλωπιστικά, φιστίκια, σόγια, φράουλες, ζαχαρότευτλα, ηλίανθοι και κηπευτικά (PubChem 2022e).

Ο μοριακός του τύπος είναι: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>ClNO<sub>3</sub>S (PubChem 2022e).  
Η χημική δομή του απεικονίζεται στην Εικόνα 3.



ΕΙΚΟΝΑ 3: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ CLETHODIM

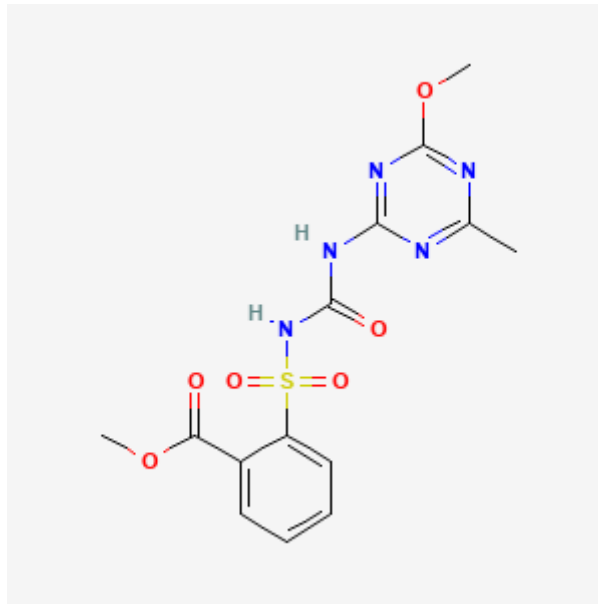
Ο τρόπος δράσης του στα φυτά έγκειται στην αναστολή της καρβοξυλάσης του ακετυλοσυνένζυμου A, που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της de novo βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, η οποία πραγματοποιείται αποκλειστικά εντός των πλαστιδίων. Ως εκ τούτου οδηγεί σε έλλειψη λιπαρών οξέων για τη βιοσύνθεση γλυκερολιπιδίων στο κύτταρο (Lichtenthaler 1990).

Η οικοτοξικότητα του περιγράφεται ως μέτρια προς υψηλή για την πλειοψηφία των οργανισμών συμπεριλαμβανόμενου των θηλαστικών, πουλιών, ψαριών και εντόμων (Lewis *et al.* 2016).

### 1.6.1.3 Metsulfuron-Methyl

Το metsulfuron-methyl είναι ζιζανιοκτόνο της ομάδας των σουλφονουριών και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των περισσότερων πλατύφυλλων ζιζανίων, και μερικών ετήσιων ζιζανίων σε κριθάρι, σιτάρι, βοσκοτόπια, και λιβάδια. Έχει μορφή λευκών κρυστάλλων και ελαφρώς γλυκιά οσμή (PubChem 2022i).

Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_{14}H_{15}N_5O_6S$ . Η χημική δομή του απεικονίζεται στην Εικόνα 4 (PubChem 2022i).



ΕΙΚΟΝΑ 4: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ METSULFURON-METHYL

Ο τρόπος δράσης του στα φυτά έγκειται στην αναστολή της συνθάσης του ακετογαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής των αμινοξέων βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη και τελικά την αναστολή του διπλασιασμού των φυτικών κυττάρων και της ανάπτυξης του φυτού. Η επιλεκτικότητα του, είναι αποτέλεσμα του γρήγορου μεταβολισμού του γ.φ. σε ανθεκτικά φυτά και του αντίστοιχα αργού μεταβολισμού του σε φυτά ευαίσθητα σε αυτό (Brown 1990).

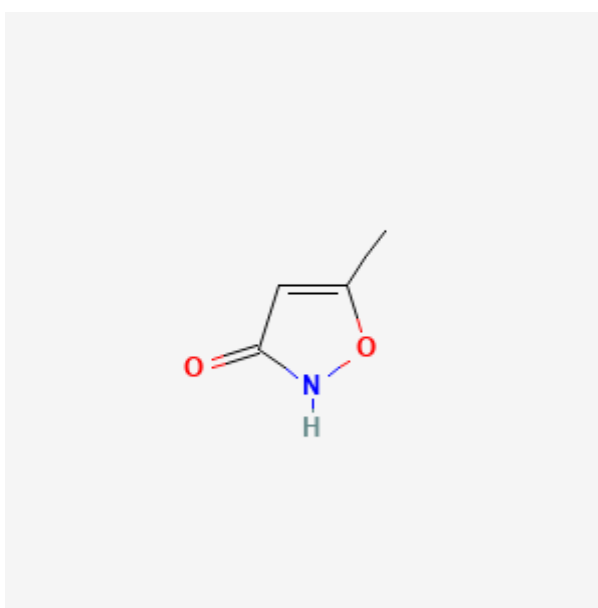
Η οικοτοξικότητα του χαρακτηρίζεται ως χαμηλή προς μέτρια σε θηλαστικά, πουλιά και ψάρια (Lewis *et al.* 2016).

## 1.6.2 Μυκητοκτόνα

### 1.6.2.1 Ηymexazol

Το hymexazol ανήκει στις ισοξαζόλες, με ένα υποκατάστατο υδροξυλίου στη θέση 3 και ένα μεθυλίου στη θέση 5. Χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως συστηματικό μυκητοκτόνο εδάφους και σπόρων για τον έλεγχο ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες που ανήκουν στα γένη *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Pythium* και *Corticium* spp. σε καλλιέργειες όπως ρύζι, ζαχαρότευτλα, κτηνοτροφικά τεύτλα, κηπευτικά, κολοκυθάκια και καλλωπιστικά. Έχει μορφή διάφανων προς ελαφρώς κίτρινων κρυστάλλων (PubChem 2022h).

Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_4H_5NO_2$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 5 (PubChem 2022h).



ΕΙΚΟΝΑ 5: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΗΥΜΕΧΑΖΟΛ

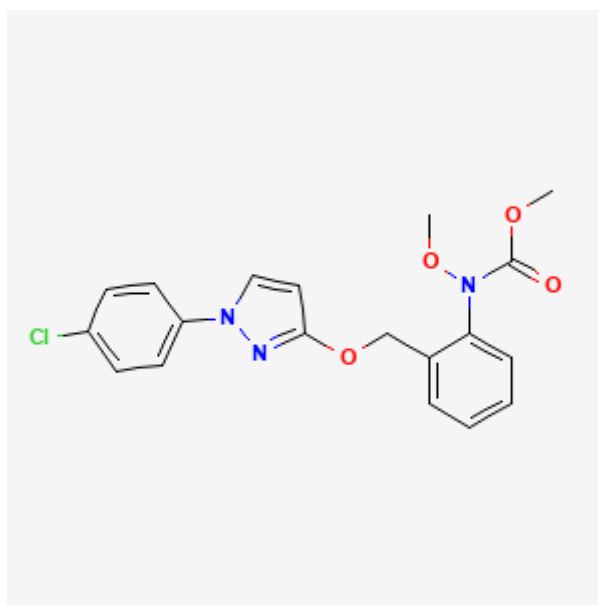
Ο τρόπος δράσης του έγκειται στην αναστολή της σύνθεσης RNA και DNA στους μύκητες. Το hymexazol μετατοπίζεται ταχέως και έχει τοπικές συστηματικές ιδιότητες κατανομής. Κατά την είσοδο στο φυτό, μετατρέπεται γρήγορα σε γλυκοζίτες. Η Ο-γλυκοσίδη έχει μυκητοτοξική δράση, ενώ η Ν-γλυκοσίδη έχει συσχετιστεί με ορισμένες επιδράσεις που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Υρεμα 2003).

Η οικοτοξικότητά του περιγράφεται ως μέτρια προς υψηλή σε θηλαστικά και πουλιά και χαμηλή σε έντομα όπως μέλισσες (Lewis *et al.* 2016).

### 1.6.2.2 Pyraclostrobin

Το pyraclostrobin είναι ένας καρβαμιδικός εστέρας που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο παθογόνων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Septoria tritici*, *Puccinia* spp. και *Pyrenophora teres* κυρίως σε σιτηρά (“PPDB (Pyraclostrobin)” 2022). Δρα ως αναστολέας του συμπλέγματος του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος-bc1 και θεωρείται περιβαλλοντικός ρύπος. Έχει μορφή λευκού έως ανοιχτού μπλε κρυσταλλικού στερεού και είναι άοσμο (PubChem 2022j).

Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 6 (PubChem 2022j)



ΕΙΚΟΝΑ 6: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ PYRACLOSTROBIN

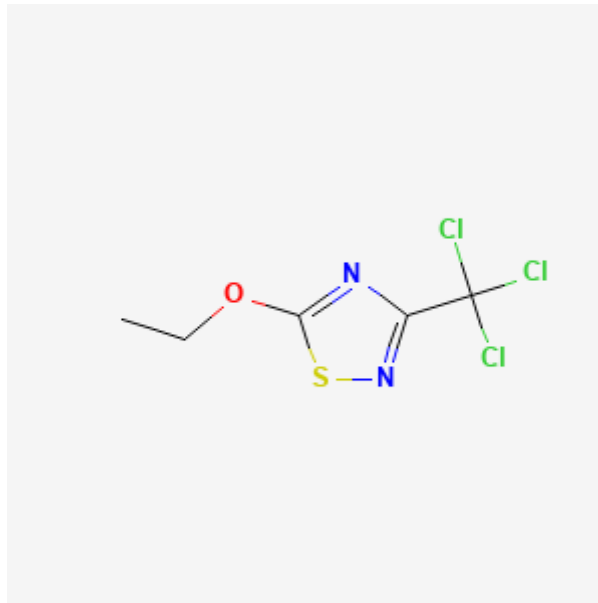
Το pyraclostrobin ως εξωτερικός αναστολέας κινόνης (quinone outside inhibitor (QoI)) δρα αναστέλλοντας την αναπνοή, μέσω της δράσης του στην εξωτερική θέση δέσμευσης της κινόνης στο σύμπλοκο του κυτοχρώματος bc1 (Karadimos, *et al.* 2005).

Το pyraclostrobin χαρακτηρίζεται από χαμηλή προς μέτρια οικοτοξικότητα για θηλαστικά, πουλιά και έντομα, αλλά υψηλή για τα ψάρια (Lewis *et al.* 2016).

### 1.6.2.3 Etridiazole

Το etridiazole είναι ένα μυκητοκτόνο που ανήκει στις θειαζόλες και έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα για τον έλεγχο των μυκήτων *Phytophthora* και *Pythium* σε λαχανικά, καλλωπιστικά και χλοοτάπητες. Έχει μορφή απαλού κίτρινου υγρού και έχει απαλή επίμονη οσμή (PubChem 2022f).

Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_5H_5Cl_3N_2OS$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 7 (PubChem 2022f).



ΕΙΚΟΝΑ 7: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ETRIDIAZOLE

Το etridiazole προκαλεί την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφατίδια, μέσω της ενεργοποίησης συνδεδεμένων με την μεμβράνη φωσφολιπασών, οδηγώντας τελικά στη λύση των μεμβρανών στους μύκητες. Είναι επίσης γνωστό για την ιδιότητα του να παρεμποδίζει και άλλους μη στοχευμένους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και αυτών που επιτελούν τη διεργασία της νιτροποίησης (Radzuhn. *et al.* 1984; Yang *et al.* 2011).

Χαρακτηρίζεται από μέτρια προς υψηλή οικοτοξικότητα για την πλειοψηφία των μακροοργανισμών αλλά και των μικροοργανισμών, καθώς δεν έχει ιδιαίτερη εκλεκτικότητα στη δράση του (Lewis *et al.* 2016).

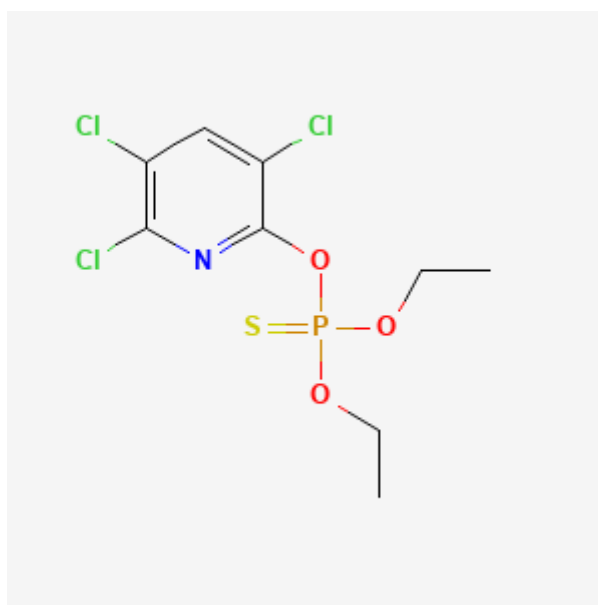


### 1.6.3 Εντομοκτόνα

#### 1.6.3.1 Chlorpyrifos και- 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)

Το chlorpyrifos είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο με ευρεία χρήση στη γεωργία για τον έλεγχο εντόμων εχθρών των καλλιεργειών, αλλά και στην κτηνοτροφία και εντός των οικιών. Συγκεκριμένα, στην κτηνοτροφία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των κροτώνων στα βοοειδή, ενώ η οικιακή του χρήση αφορά κυρίως στον έλεγχο εχθρών υγειονομικής σημασίας όπως κατσαρίδες, και ψύλλοι. Είναι λευκό στερεό κρυσταλλικής μορφής με έντονη οσμή. Δεν είναι διαλυτό στο νερό, γι' αυτό συνήθως αναμιγνύεται με έλαια πριν εφαρμοστεί σε καλλιέργειες ή ζώα. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε καλλιέργειες σε μορφή κόκκων. Είναι λευκό στερεό κρυσταλλικής μορφής με έντονη οσμή (PubChem 2022d).

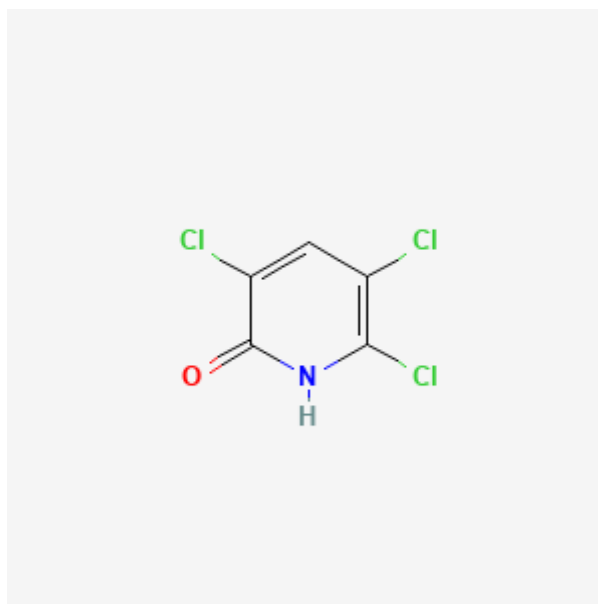
Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 8 (PubChem 2022d).



ΕΙΚΟΝΑ 8: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ CHLORPYRIFOS

Ο τρόπος δράσης του έγκειται στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, με αποτέλεσμα την αναστολή της υδρόλυσης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, και κατ' επέκταση τη δυσλειτουργία του νευρικού συστήματος στα έντομα. Καθώς αυτός ο μηχανισμός δεν είναι αποκλειστικός στα έντομα εμφανίζει τοξικότητα σε πληθώρα οργανισμών συμπεριλαμβανομένων θηλαστικών, ψαριών και πτηνών (Testai, *et al.* 2010).

Το TCP αποτελεί κύριο μεταβολικό προϊόν του εντομοκτόνου chlorpyrifos (PubChem 2022a). Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_5H_2Cl_3NO$  και η χημική του δομή απεικονίζεται στην Εικόνα 9 (PubChem 2022a).

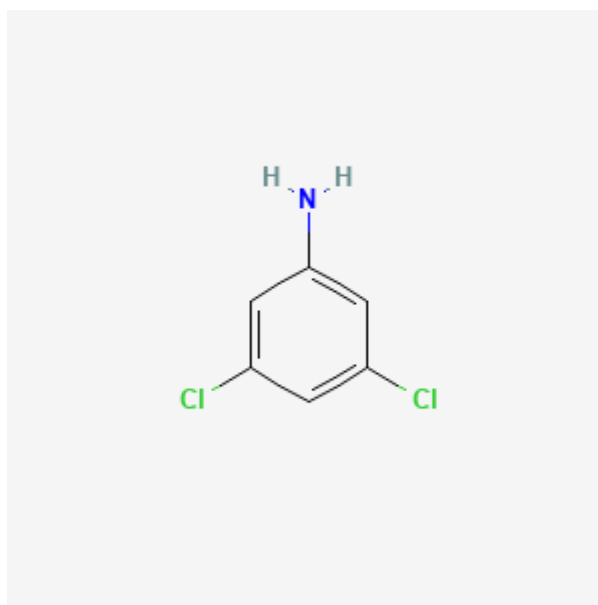


ΕΙΚΟΝΑ 9: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ TCP

Η μετατροπή του chlorpyrifos σε TCP θεωρείται αντίδραση αποτοξικοποίησης και συνεπώς το TCP είναι πολύ λιγότερο τοξικό από τη μητρική του ένωση (Testai, *et al.* 2010).

#### 1.6.4 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA)

Η 3,5-διχλωροανιλίνη αποτελεί μεταβολικό προϊόν του μυκητοκτόνου iprodione (PubChem 2022b). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας της απόκρισης των μικροβιακών κυττάρων των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών που μελετήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών της ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (Vasileiadis *et al.*, 2018). Ο μοριακός του τύπος είναι:  $C_6H_5Cl_2N$  και η χημική δομή του απεικονίζεται στην Εικόνα 10 (PubChem 2022b).



ΕΙΚΟΝΑ 10: ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ 3,5DCA

Χαρακτηρίζεται από μέτρια τοξικότητα για την πλειοψηφία των μακροοργανισμών (Lewis *et al.* 2016) και σημαντική για τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Vasileiadis *et al.*, 2018).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες όλων των παραπάνω γ.φ. περιγράφονται στον Πίνακα 1 (PubChem 2022b; 2022a; 2022c; 2022d; 2022e; 2022f; 2022g; 2022h; 2022i; 2022j; “Hymexazol Env. Fate/Transport” 2022; “PPDB(Pyraclostrobin)” 2022; Lewis *et al.* 2016).

**Πίνακας 1.** Φυσικοχημικές ιδιότητες των γ.φ. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Φυσικοχημικές ιδιότητες	Γεωργικά φάρμακα και μεταβολίτες									
	Glyphosate	AMPA	Clethodim	Metsulfuron-methyl	Hymexazol	Pyraclostrobin	Etridiazole	Chlorpyrifos	TCP	3,5-DCA
Μοριακό βάρος (g/mol)	169.07	111.04	359.9	381.37	99.09	387.8	247.5	350.6	198.43	162.01
Σημείο βρασμού (°C)	400	317	-	162.0	208	-	188.0	-	-	261.0
Σημείο τήξης (°C)	189.5	122	-80	163-166	86.5	63.7-65.2	19.9	42.0	208-209	52.0
Διαλυτότητα-νερό (mg L <sup>-1</sup> )	5-10 x10 <sup>3</sup>	314,2 x10 <sup>3</sup>	11,9	9.5x10 <sup>3</sup>	79.9 x10 <sup>3</sup>	1.9	117	1.4	2560	600
Διαλυτότητα-οργανικοί διαλύτες	Αδιάλυτο	Αδιάλυτο	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	1,74	1,51	1.16	1.45	0.55	1.87	1.497	1.4	1.67	1.58
Πτητικό	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	-	-

## 1.7 Στόχοι

Η παρούσα διατριβή αποτελεί τμήμα μιας συνολικής ερευνητικής προσπάθειας της ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος με απώτερο στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης ενός εύρους γ.φ. διαφορετικών κατηγοριών (ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα) και με διαφορετικό μηχανισμό δράσης έναντι ενός πλήθους φυλογενετικά και οικοφυσιολογικά διακριτών εδαφογενών στελεχών νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών προκειμένου να επιλεγούν συγκεκριμένα νιτρωδοποιητικά στελέχη ως κατάλληλοι μικροβιακοί δείκτες για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους στο πλαίσιο ανάπτυξης πρότυπων οικοτοξικολογικών *in vitro* δοκιμών.

Στο πλαίσιο αυτό, κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η *in vitro* αξιολόγηση της επίδρασης των επιλεγμένων γ.φ. στη λειτουργία δυο αντιπροσωπευτικών εδαφογενών στελεχών νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, ενός νιτρωδοποιητικού βακτηρίου (AOB), *Nitrosomonas communis* και ενός νιτρωδοποιητικού αρχαίου (AOA), *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus*. Η αποδόμηση των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες μελετήθηκε παράλληλα, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα τους, σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 2 Πειραματικό μέρος

### 3.1 Καλλιέργεια νιτροδοποιητικών στελεχών *in vitro*

Τα δύο νιτροδοποιητικά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, *Nitrosomonas communis* (AOB) και *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus* (AOA) αναπτύχθηκαν αερόβια, χωρίς ανακίνηση, σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο υπό ασηπτικές συνθήκες.

#### 2.1.1 *Nitrosomonas communis*

Για την καλλιέργεια του στελέχους *Nitrosomonas communis* χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο 1583-DSMZ. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι τελικές τους συγκεντρώσεις στο μέσο παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Η επώαση του AOB στελέχους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 28°C και σκοτάδι. Το θρεπτικό διάλυμα περιείχε  $\text{NH}_4^+$  σε συγκέντρωση 10mM. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε σε τιμή περίπου 7.8 με την προσθήκη διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου ( $\text{NaHCO}_3$ ) 10%. Η διατήρηση της τιμής του pH στα παραπάνω επίπεδα διαπιστώνονταν οπτικά από το ελαφρύ ροζ χρώμα που εμφανίζει η υγρή καλλιέργεια σε αυτές τις συνθήκες. Στις περιπτώσεις όπου το pH μειωνόταν εξαιτίας της παραγωγής των νιτροδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ), η επαναρύθμιση του πραγματοποιούνταν με προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$ .

**Πίνακας 2.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου 1583-DSMZ.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
$\text{NH}_4\text{Cl}$	535 mg L <sup>-1</sup>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	54 mg L <sup>-1</sup>
KCl	74 mg L <sup>-1</sup>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	49 mg L <sup>-1</sup>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	147 mg L <sup>-1</sup>
NaCl	584 mg L <sup>-1</sup>
Διάλυμα Ιχνοστοιχείων	1 ml L <sup>-1</sup>
Phenol red (0.05%), δείκτης pH	2 ml L <sup>-1</sup>

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος των ιχνοστοιχείων (trace elements solution) και οι τελικές τους συγκεντρώσεις παρατίθενται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος ιχνοστοιχείων.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
<b>HCl (1M)</b>	25 ml L <sup>-1</sup>
<b>MnSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O</b>	45 mg L <sup>-1</sup>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	49 mg L <sup>-1</sup>
<b>ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	43 mg L <sup>-1</sup>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4 H<sub>2</sub>O</b>	37 mg L <sup>-1</sup>
<b>FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	973 mg L <sup>-1</sup>
<b>CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O</b>	25 mg L <sup>-1</sup>

### 2.1.2 *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus*

Για την καλλιέργεια του στελέχους *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus* χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο Modified Fresh Water. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν τα επιμέρους διαλύματα: (i) Modified trace elements, (ii) Modified vitamin solution, (iii) Selenite-tungstate solution, και (iv) Basal Salt Solution 10X. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων και οι τελικές τους συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στους Πίνακες 4-8.

Η επώαση του AOA στελέχους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 35°C και σκοτάδι. Το θρεπτικό διάλυμα περιείχε NH<sub>4</sub><sup>+</sup> σε συγκέντρωση 1mM. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε σε τιμή 7.5 - 7.6 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (1M) (Πίνακας 8) .

**Πίνακας 4.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified Trace Elements.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	30 mg L <sup>-1</sup> (0.5 mM)
<b>MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O</b>	100 mg L <sup>-1</sup> (0.5 mM)
<b>CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	190 mg L <sup>-1</sup> (0.8 mM)
<b>NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	24 mg L <sup>-1</sup> (0.1 mM)
<b>CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	2 mg L <sup>-1</sup> (0.01mM)
<b>ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	144 mg L <sup>-1</sup> (0.5 mM)
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	36 mg L <sup>-1</sup> (0.15 mM)
<b>HCl (12.5 M)</b>	8 ml L <sup>-1</sup> (100 mM)



**Πίνακας 5.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified vitamin .

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
<b>Biotin</b>	0.02 g L <sup>-1</sup>
<b>Pyridoxine HCl</b>	0.05 g L <sup>-1</sup>
<b>Thiamine HCl</b>	0.05 g L <sup>-1</sup>
<b>Nicotinic acid</b>	0.05 g L <sup>-1</sup>
<b>Calcium pantothenate</b>	0.05 g L <sup>-1</sup>
<b>P Aminobenzoic acid</b>	0.05 g L <sup>-1</sup>
<b>Vitamin B12</b>	0.01 g L <sup>-1</sup>

**Πίνακας 6.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος selenite-tungstate solution.

Υλικά	Τελικές συγκεντρώσεις
<b>NaOH</b>	4 g L <sup>-1</sup>
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O</b>	0.6 g L <sup>-1</sup>
<b>Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	0.8 g L <sup>-1</sup>

**Πίνακας 7.** Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Basal Salts 10X.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
<b>NaCl</b>	10.0 g L <sup>-1</sup>
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	4.0 g L <sup>-1</sup>
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	1.0 g L <sup>-1</sup>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2.0 g L <sup>-1</sup>
<b>KCl</b>	5.0 g L <sup>-1</sup>

Στη συνέχεια για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου Modified Fresh Water αναμείχθηκαν τα υλικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 8 ανά λίτρο 1X Basal Salt Solution.

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

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
<b>HEPES buffer (1M)</b>	10.0 ml L <sup>-1</sup>
<b>NaHCO<sub>3</sub> (1M)</b>	2.0 ml L <sup>-1</sup>
<b>FeNaEDTA (7.5 mM)</b>	1.0 ml L <sup>-1</sup>
<b>Modified trace elements</b>	1.0 ml L <sup>-1</sup>
<b>Modified vitamin solution</b>	1.0 ml L <sup>-1</sup>
<b>NH<sub>4</sub>Cl (1M)</b>	1.0 ml L <sup>-1</sup> (1mM)
<b>Selenite-tungstate solution</b>	0.1 ml L <sup>-1</sup>

## 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Το εύρος των συγκεντρώσεων των γ.φ. που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών παρουσιάζεται αναλυτικά για κάθε κατηγορία γ.φ. στους Πίνακες 9-11. Παράλληλα με τα επιλεγμένα γ.φ., μελετήθηκε και η επίδραση του μεταβολίτη του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA) σε εύρος συγκεντρώσεων 0.31 – 310 μM (0.05 - 50 mg L<sup>-1</sup>), ως μάρτυρας της απόκρισης των μικροβιακών κυττάρων των μελετούμενων στελεχών σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (Vasileiadis *et al.*, 2018).

Για κάθε σειρά μεταχειρίσεων, 4.3 L από το κατάλληλο για κάθε στέλεχος θρεπτικό μέσο μεταφέρθηκε από τους 4°C όπου διατηρούνταν σε γυάλινα μπουκάλια Duran (5L), στους 28°C (*N. communis*) ή στους 35°C (*Ca. N. franklandianus*) για λίγες ώρες πριν τον εμβολιασμό. Αφού το μέσο έφτασε στην επιθυμητή θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του μέσου με 1% (o/o) (*N. communis*) ή 2% (o/o) (*Ca. N. franklandianus*) φρέσκιας καλλιέργειας των στελεχών στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στην αρχή της εκθετικής φάσης, η καλλιέργεια των 4.3 L διανεμήθηκε σε επιμέρους καλλιέργειες των 30ml, οι οποίες και μεταφέρθηκαν σε Duran των 100ml για την προσθήκη των γ.φ.. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Εξαιτίας της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των μελετούμενων ουσιών η προσθήκη τους στις καλλιέργειες έγινε σε 0.1% (o/o) dimethylsulfoxide (DMSO). Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πυκνά διαλύματα εργασίας κατάλληλης συγκέντρωσης των παραπάνω ουσιών σε DMSO, το οποίο προηγουμένως αποστειρώθηκε μέσω διήθησης με ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο PTFE 0.22 μm. Εξαιρέση αποτέλεσε το ζιζανιοκτόνο glyphosate και ο μεταβολίτης του AMPA, τα οποία εμφανίζουν υψηλή υδατοδιαλυτότητα γι' αυτό και για την παρασκευή των αντίστοιχων διαλυμάτων εργασίας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Για το εντομοκτόνο chlorpyrifos λόγω προβλημάτων διαλυτοποίησης των πυκνών διαλυμάτων εργασίας του σε DMSO στις υγρές καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον μεταχείριση όπου τα σχετικά διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν με προσθήκη του εμπορικού σκευάσματος Pyrinex, ένα πυκνό διάλυμα με περιεκτικότητα chlorpyrifos 48%, σε νερό. Ως μάρτυρες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες με προσθήκη αντίστοιχου με τις επιμέρους μεταχειρίσεις όγκου νερού (περίπτωση glyphosate, AMPA και εμπορικού σκευάσματος chlorpyrifos) ή DMSO (για όλες τις υπόλοιπες δραστικές ουσίες). Επίσης για τη μελέτη της αποδόμησης και ως επέκταση της σταθερότητας των γ.φ. χρησιμοποιήθηκαν αβιοτικοί μάρτυρες σε ενδεικτικές συγκεντρώσεις.

**Πίνακας 9.** Συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων που μελετήθηκαν .

<b>ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ</b>			
<b>Glyphosate</b>	<b>AMPA</b>	<b>Clethodim</b>	<b>Metsulfuron-methyl</b>
2957 μM (500 mg L <sup>-1</sup> )	4500 μM (500 mg L <sup>-1</sup> )	415 μM (150 mg L <sup>-1</sup> )	131 μM (100 mg L <sup>-1</sup> )
1478.7 μM (250 mg L <sup>-1</sup> )	900 μM (100 mg L <sup>-1</sup> )	83 μM (30 mg L <sup>-1</sup> )	13.1 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )
591 μM (100 mg L <sup>-1</sup> )	90 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )	8.3 μM (3 mg L <sup>-1</sup> )	1.31 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )
59.1 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )	9 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )	0.83 μM (0.3 mg L <sup>-1</sup> )	0.131 μM (0.1 mg L <sup>-1</sup> )
5.9 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )	-	-	-

**Πίνακας 10.** Συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων που μελετήθηκαν.

<b>ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ</b>		
<b>Hymexazol</b>	<b>Pyraclostrobin</b>	<b>Etridiazole</b>
1009 μM (100 mg L <sup>-1</sup> )	385 μM (150 mg L <sup>-1</sup> )	1010 μM (250 mg L <sup>-1</sup> )
101 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )	77 μM (30 mg L <sup>-1</sup> )	404 μM (100 mg L <sup>-1</sup> )
10 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )	7.7 μM (3 mg L <sup>-1</sup> )	40.4 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )
1 μM (0.1 mg L <sup>-1</sup> )	0.77 μM (0.3 mg L <sup>-1</sup> )	4 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )

**Πίνακας 11.** Συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων που μελετήθηκαν .

<b>ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ</b>	
<b>Chlorpyrifos</b>	<b>TCP</b>
228 μM (80 mg L <sup>-1</sup> )	164 μM (32.5 mg L <sup>-1</sup> )
114 μM (40 mg L <sup>-1</sup> )	75 μM (15 mg L <sup>-1</sup> )
29 μM (10 mg L <sup>-1</sup> )	25 μM (5 mg L <sup>-1</sup> )
2.9 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )	5 μM (1 mg L <sup>-1</sup> )

### 2.3 Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών

Η επίδραση των μελετούμενων ουσιών στη λειτουργία των επιλεγμένων στελεχών AOB και AOA ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για περίπου 2 με 4 εβδομάδες, με χρωματομετρική μέτρηση των παραγόμενων νιτροδών ιόντων των καλλιέργειών σε πλάκα μικροπιλοδότησης (96-well plate). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίων Diazotizing (0.5 g sulfanilamide σε 100mL 2.4M HCl) και Coupling (0.3g N-(1-naphthyl)-ethylenediamine HCl σε 100mL 0.12M HCl) σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας που περιείχε συνολικά 100  $\mu\text{L}$  δείγματος και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm σε microplate reader Varioskan LUX της Thermo-Fisher Scientific. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των παραγόμενων νιτροδών ιόντων πραγματοποιούνταν με βάση πρότυπες καμπύλες γνωστών συγκεντρώσεων  $\text{NaNO}_2$  (0-100  $\mu\text{M}$ ).

### 2.4 Μελέτη της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες

Η σταθερότητα των γ.φ. στις υγρές καλλιέργειες παρακολουθήθηκε με ανάλυση δειγμάτων που συλλέγονταν σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία της ανάπτυξης των στελεχών: (i) αμέσως μετά την προσθήκη των γ.φ. στις υγρές καλλιέργειες (T0) – αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, (ii) στο μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, (iii) στην αρχή της φάσης της στασιμότητας – τέλος πειραματικών μετρήσεων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC-PDA: SHIMADZU LC-20AD, με στήλη SHIMADZU VP-ODs διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20  $\mu\text{L}$  και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των επιμέρους γ.φ., παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. 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 μελετούμενων ουσιών. Οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης προέκυψαν έπειτα από την έγχυση πρότυπων διαλυμάτων των γ.φ. σε οργανικούς διαλύτες, μεθανόλη (MeOH) (chlorpyrifos, TCP, metsulfuron-methyl, hymexazol) και ακετονιτρίλιο (ACN) (3,5-DCA, etridiazole, pyraclostrobin, clethodim), σε εύρος συγκεντρώσεων 0.05-20  $\text{mg L}^{-1}$ .

Η σταθερότητα των ουσιών glyphosate και AMPA δεν προσδιορίστηκε λόγω αδυναμίας ανίχνευσης και ποσοτικού τους προσδιορισμού με τις δεδομένες αναλυτικές χρωματογραφικές συνθήκες.

**Πίνακας 12.** Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των μελετούμενων γεωργικών φαρμάκων.

Γεωργικά φάρμακα	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης (ο/ο)	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος κατακράτησης (min)	Θερμοκρασία στήλης (°C)
Clethodim	90 ACN: 10 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	255	3,8	25
Metsulfuron-methyl	55 MeOH: 45 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	224	5,1	40
Hymexazol	40 MeOH: 60 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	205	3,0	25
Pyraclostrobin	80 ACN: 20 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	275	4,2	25
Etridiazole	80 ACN: 20 H <sub>2</sub> O	220	4,3	25
Chlorpyrifos	80 MeOH: 20 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	230	18,5	25
TCP	80 MeOH: 20 H <sub>2</sub> O + 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	230	4,1	25
3,5-DCA	65 ACN: 35 H <sub>2</sub> O	220	4,6	25

## 2.4 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και υπολογισμός των τιμών $EC_{50}$

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις παραγωγής νιτρωδών ιόντων υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (two-way-ANOVA) για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης, του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασής τους. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο 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.

Τέλος πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των τιμών  $EC_{50}$ , δηλαδή της μέσης συγκέντρωσης του κάθε γ.φ. που δύναται να προκαλέσει μείωση της δραστηριότητας (συσσώρευση νιτρωδών) των AOB ή AOA κατά 50%. Η μοντελοποίηση δόσης-απόκρισης διεξήχθη χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα δεδομένα όπου οι τιμές συγκέντρωσης νιτρωδών διαιρέθηκαν με τη μέση τιμή του αντίστοιχου μάρτυρα. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο καμπυλών δόσης-απόκρισης (drc) v3.0-1, του λογισμικού R. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά μια εμπειρική προσέγγιση μοντελοποίησης για την επιλογή του καλύτερου μοντέλου προσαρμογής σύμφωνα με τους δείκτες καλής προσαρμογής, ακολουθούμενη από την επιλογή του log-logistic μοντέλου τεσσάρων παραμέτρων ως τον καλύτερο συμβιβασμό μεταξύ των δοκιμασμένων μοντέλων για τη σύγκριση τιμών τελικού σημείου.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

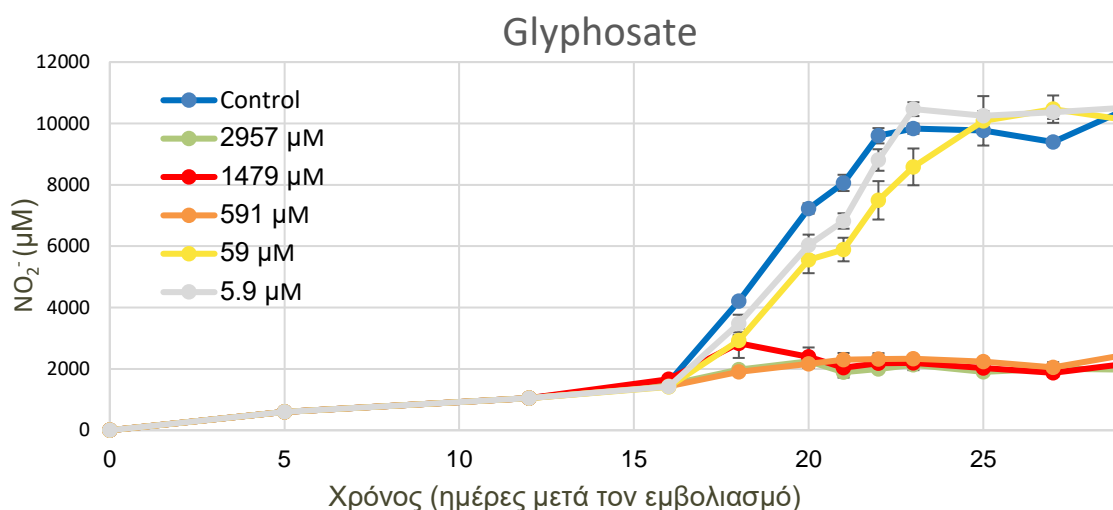
### 3 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα από τις *in vitro* δοκιμές ως προς την επίδραση των μελετούμενων γ.φ. στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ) στις υγρές καλλιέργειες των επιλεγμένων νιτρωδοποιητικών στελεχών, παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω ανά γ.φ. (ή μεταβολίτη) και ανά κατηγορία γ.φ. συγκεντρωτικά για κάθε ένα από τα νιτρωδοποιητικά στελέχη που μελετήθηκαν.

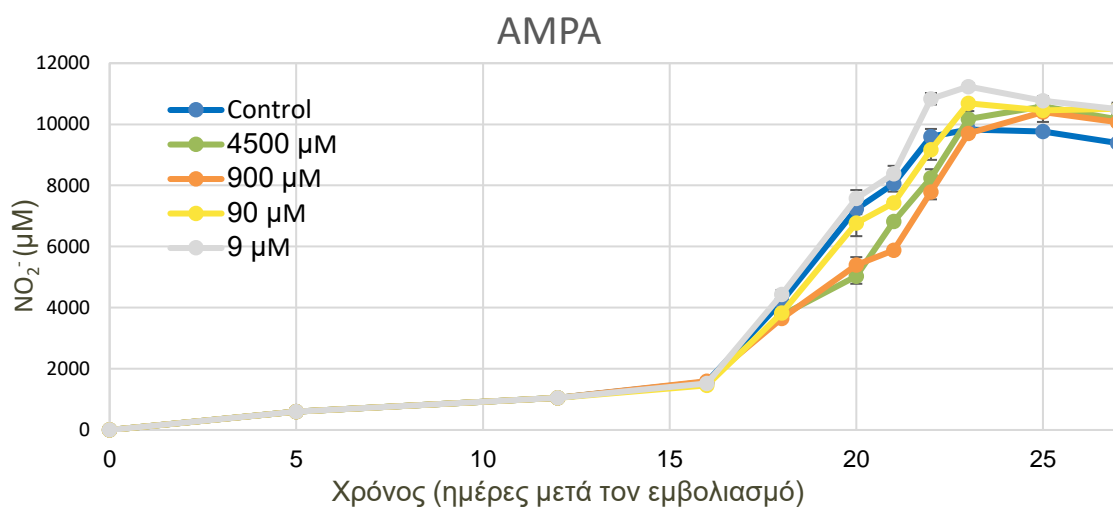
#### 3.1 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosomonas communis*

##### 1) Ζιζανιοκτόνα

(α)

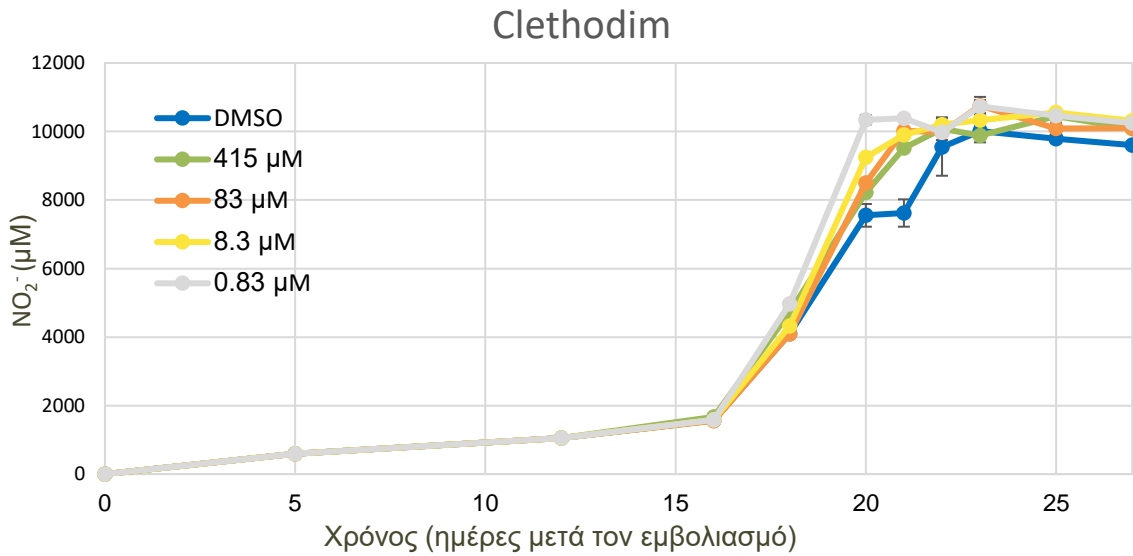


(β)

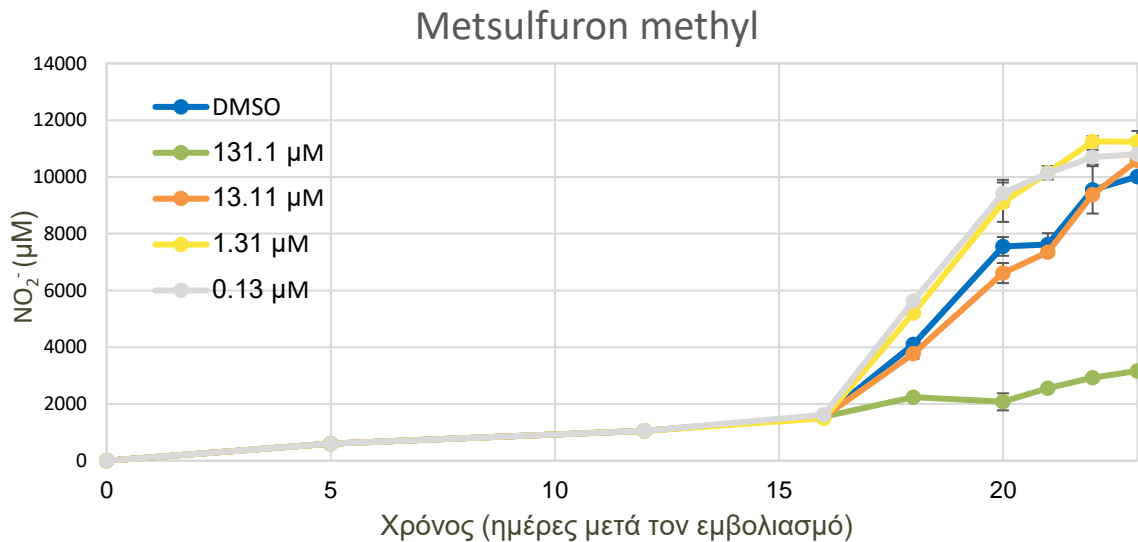




(γ)



(δ)



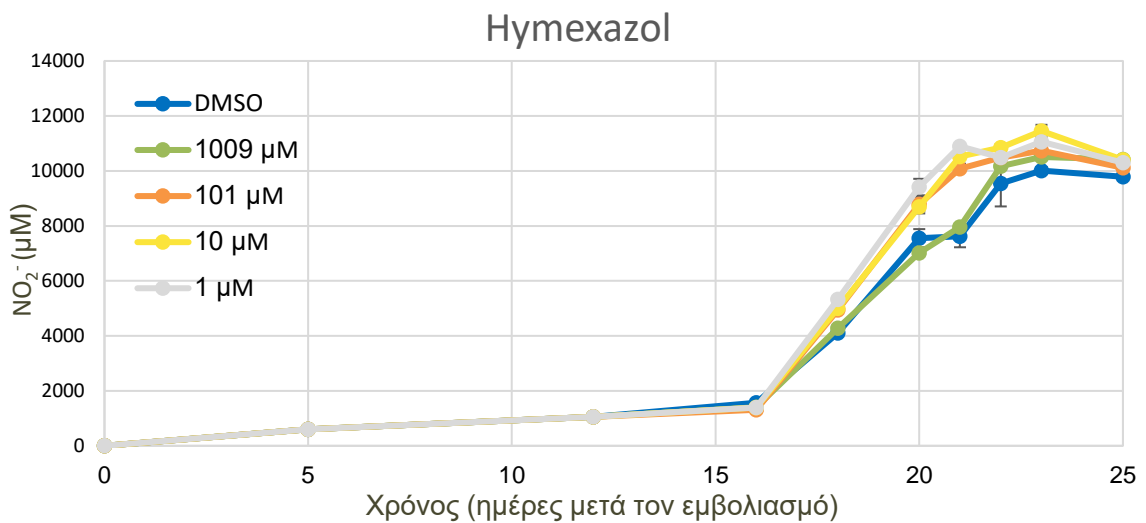
**Διάγραμμα 1.** Επίδραση των glyphosate (α), AMPA (β), clethodim (γ) και metsulfuron-methyl (δ) στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου glyphosate στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis* σε συγκεντρώσεις  $\geq 591 \mu\text{M}$  προκάλεσε πλήρη αναστολή της λειτουργίας του AOB στελέχους (Διάγραμμα 1α). Σε αντίθεση με τη μητρική ένωση, η εφαρμογή του κύριου μεταβολίτη του glyphosate, AMPA, σε συγκεντρώσεις ως και  $4500 \mu\text{M}$  δεν επηρέασε την παραγωγή των νιτρωδών από το νιτρωδοποιητικό βακτηριακό στέλεχος (Διάγραμμα 1β). Ομοίως, η προσθήκη του clethodim στις υγρές καλλιέργειες του AOB στελέχους σε συγκεντρώσεις ως και  $415 \mu\text{M}$  δε φάνηκε να ασκεί κάποια επίδραση στη

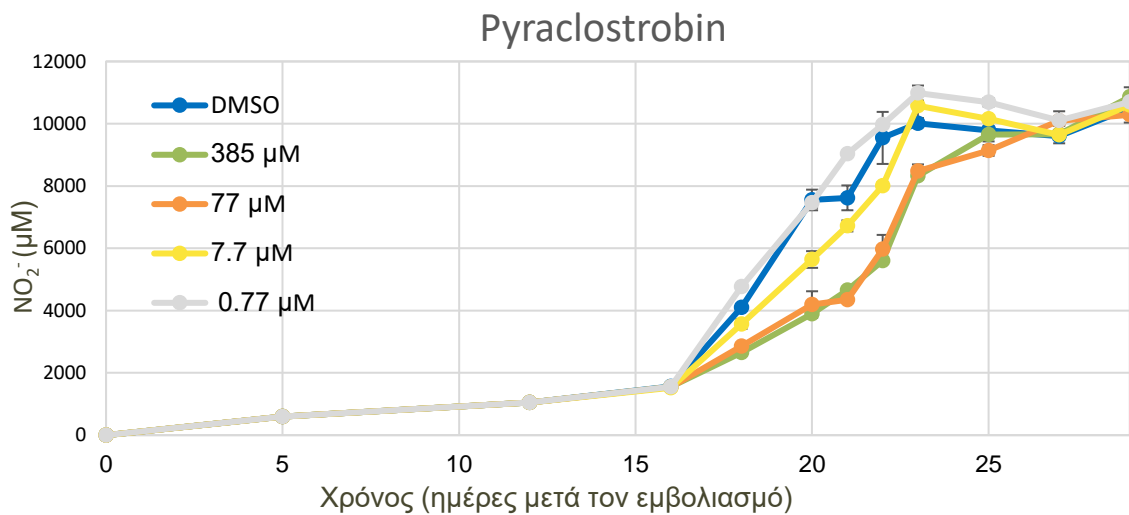
συσσώρευση των νιτρωδών συγκριτικά με τον DMSO μάρτυρα (Διάγραμμα 1γ). Τέλος, το metsulfuron-methyl προκάλεσε σημαντική αναστολή της λειτουργίας του νιτρωδοποιητικού στελέχους συγκριτικά με τον DMSO μάρτυρα μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δοκιμάστηκε (131.1 μM) (Διάγραμμα 1δ).

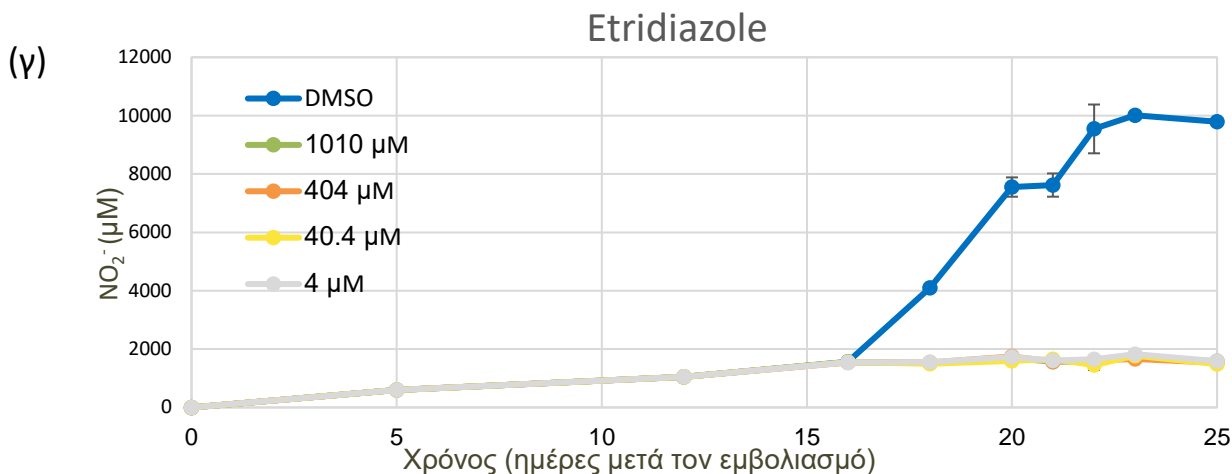
## 2) Μυκητοκτόνα

(α)



(β)

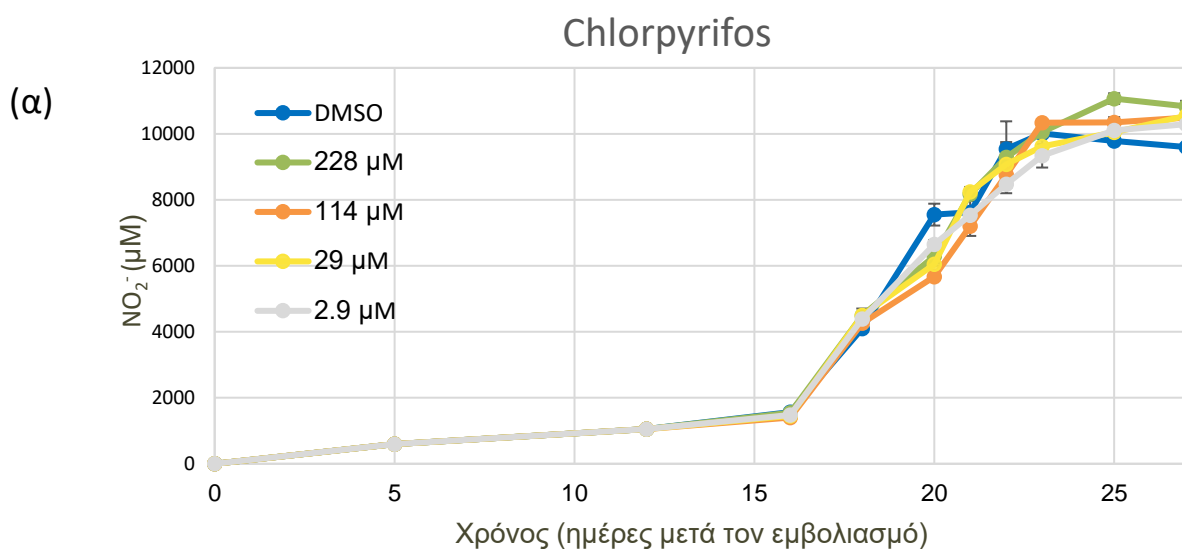


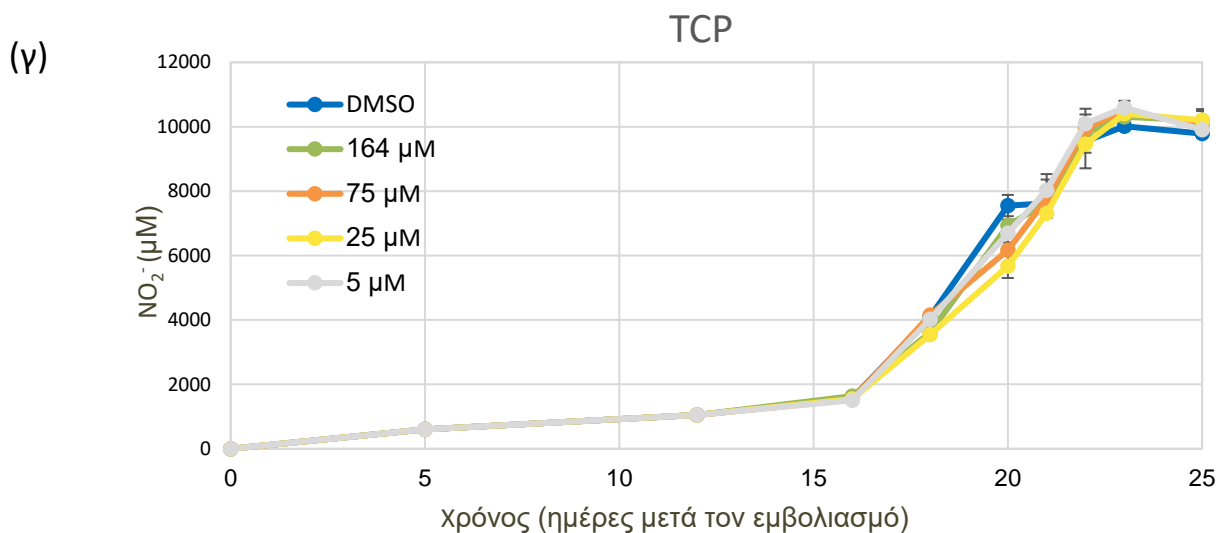
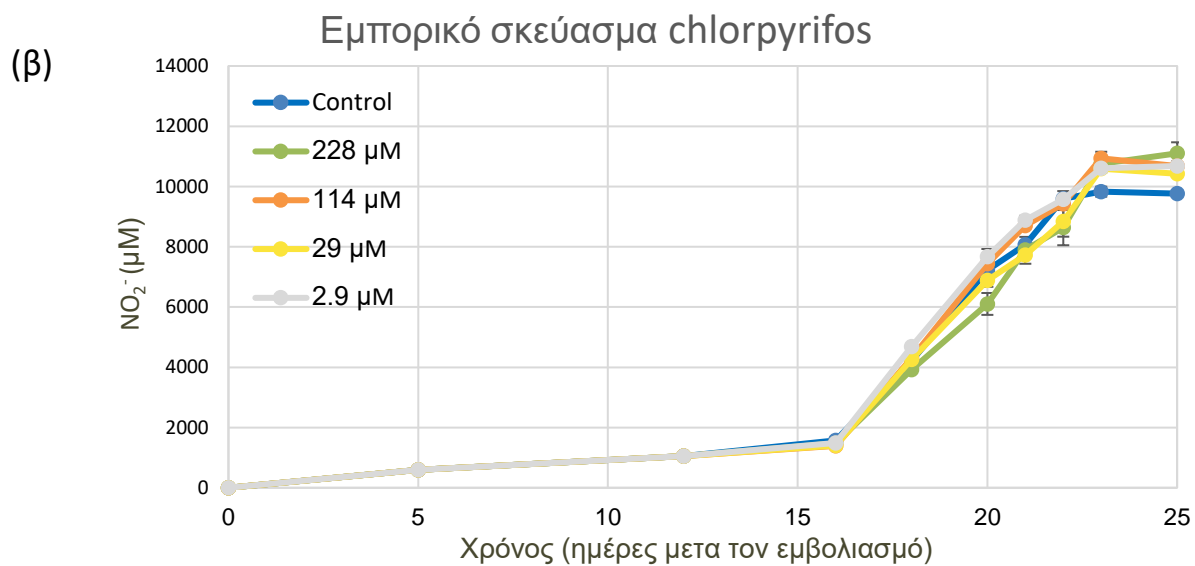


**Διάγραμμα 2.** Επίδραση των μυκητοκτόνων hymexazol (α), pyraclostrobin (β) και etridiazole (γ) στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Το μυκητοκτόνο hymexazol σε συγκεντρώσεις ως και 1009 μM, δεν επηρέασε την συσσώρευση νιτρωδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ) στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis* σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 2α). Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή του pyraclostrobin σε συγκεντρώσεις  $\geq 77\mu\text{M}$  προκάλεσε μερική αναστολή [ $\pm\text{stden}$ ] της νιτρωδοποίησης (Διάγραμμα 2β). Αντίθετα, η προσθήκη του etridiazole σε συγκεντρώσεις  $\geq 4\mu\text{M}$  προκάλεσε πλήρη αναστολή της λειτουργίας του μελετούμενου AOB στελέχους (Διάγραμμα 2γ).

### 3) Εντομοκτόνα:



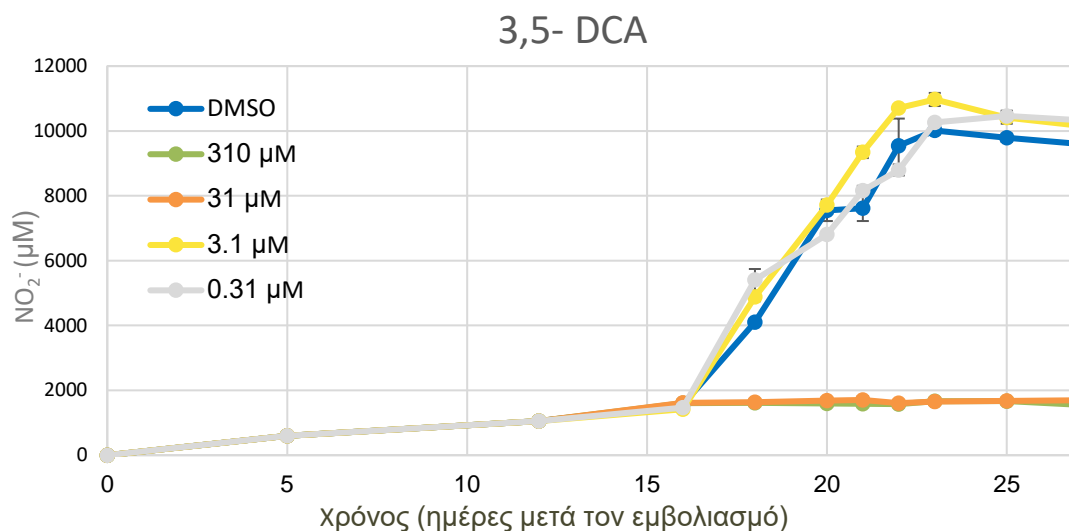


**Διάγραμμα 3.** Επίδραση του εντομοκτόνου chlorpyrifos (α), του εμπορικού του σκευάσματος Pyrinex (β) και του κύριου μεταβολίτη του TCP (γ) στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Το εντομοκτόνο chlorpyrifos σε συγκεντρώσεις ως και 228 μM δεν επηρέασε την συσσώρευση νιτρικών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ) στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis* σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 3α). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και στην περίπτωση προσθήκης του εμπορικού σκευάσματος (Pyrinex) της δραστικής ουσίας όπου και πάλι οι αντίστοιχες δόσεις που δοκιμάστηκαν δεν επηρέασαν τη λειτουργία του νιτροδοποιητικού βακτηριακού στελέχους σε σχέση με το μάρτυρα αναφοράς (Control) (Διάγραμμα 3β). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για τον κύριο μεταβολίτη του chlorpyrifos, TCP, ο οποίος δε φάνηκε να ασκεί κάποια

επίδραση στην παραγωγή των νιτρωδών όταν εφαρμόστηκε στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis* σε συγκεντρώσεις  $\leq 164 \mu\text{M}$  (Διάγραμμα 3γ).

#### 4) 3,5-DCA



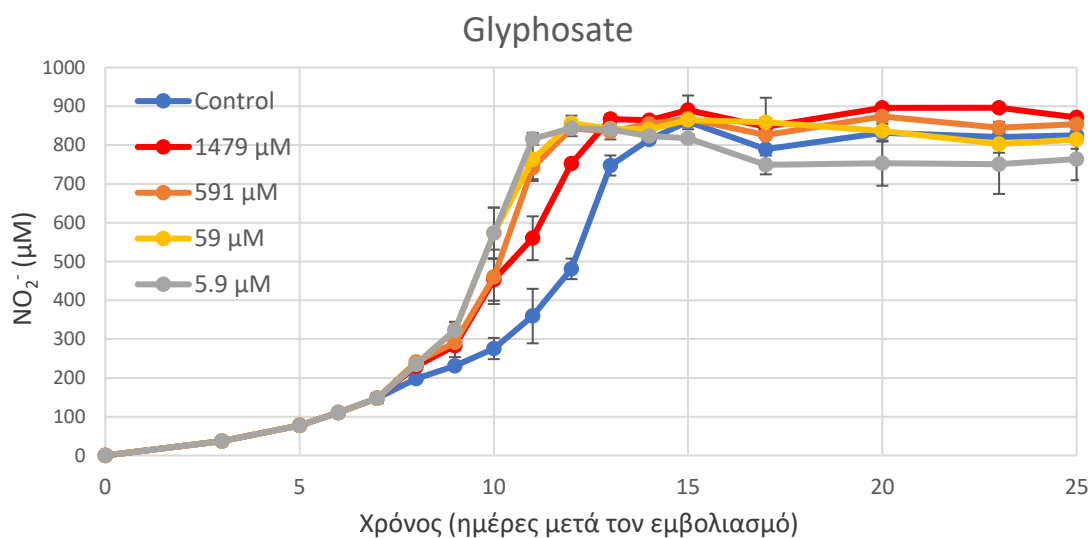
**Διάγραμμα 4.** Επίδραση του μεταβολίτη του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Τέλος, ο μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, στις συγκεντρώσεις των 31 και 310  $\mu\text{M}$ , ανέστειλε πλήρως τη λειτουργία του *N. communis* (Διάγραμμα 4).

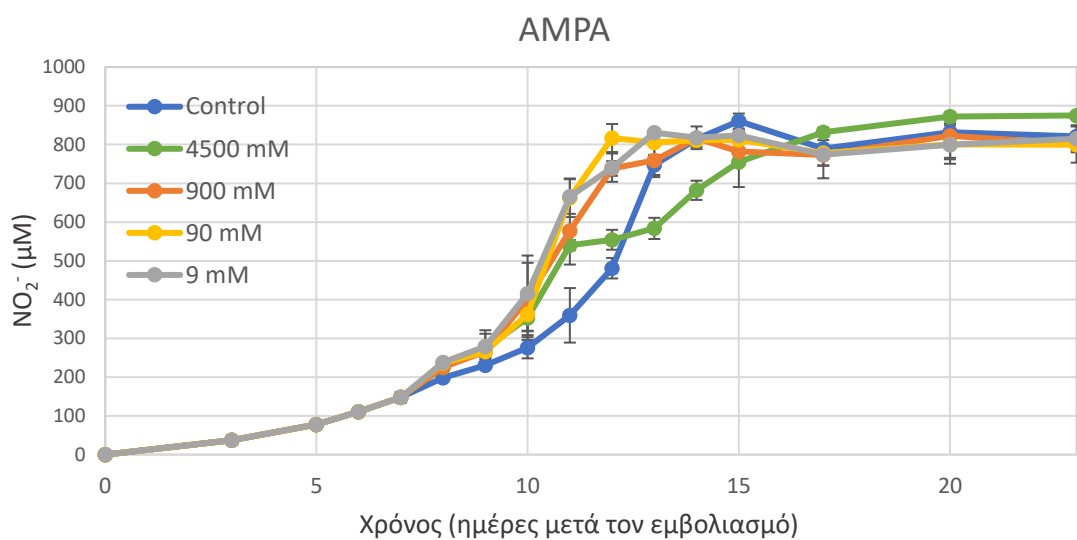
### 3.2 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτρωδοποιητικού αρχαίου *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus*

#### 1) Ζιζανιοκτόνα

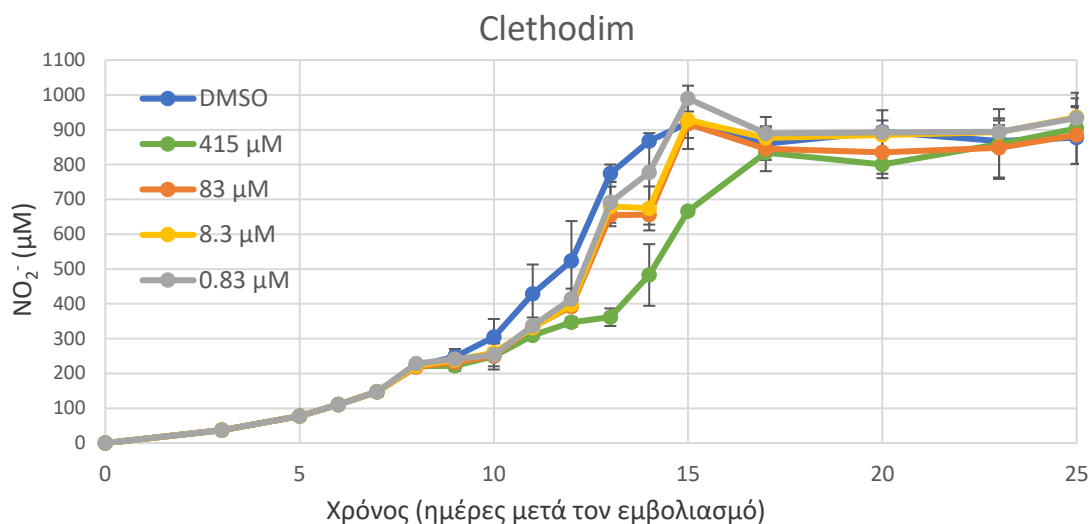
(α)



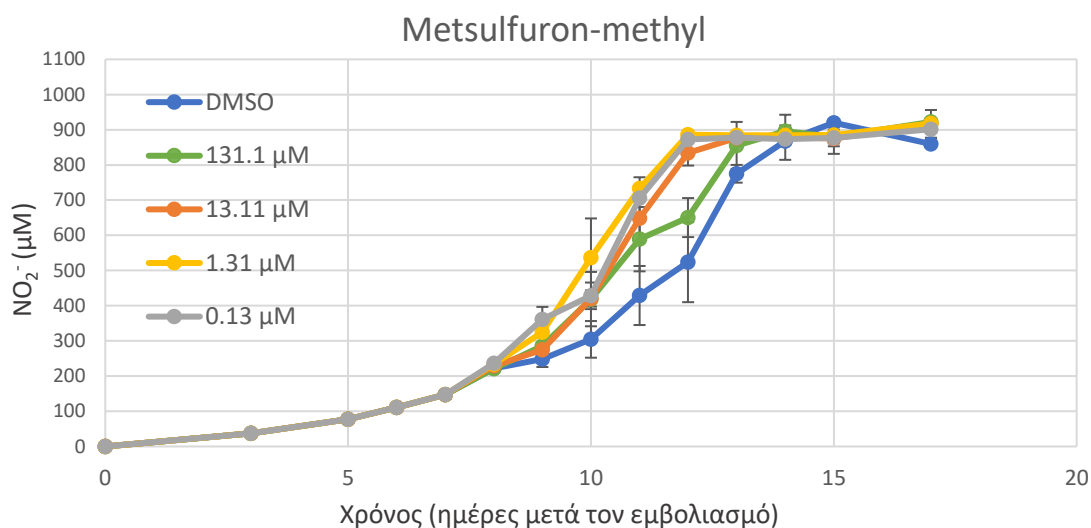
(β)



(γ)



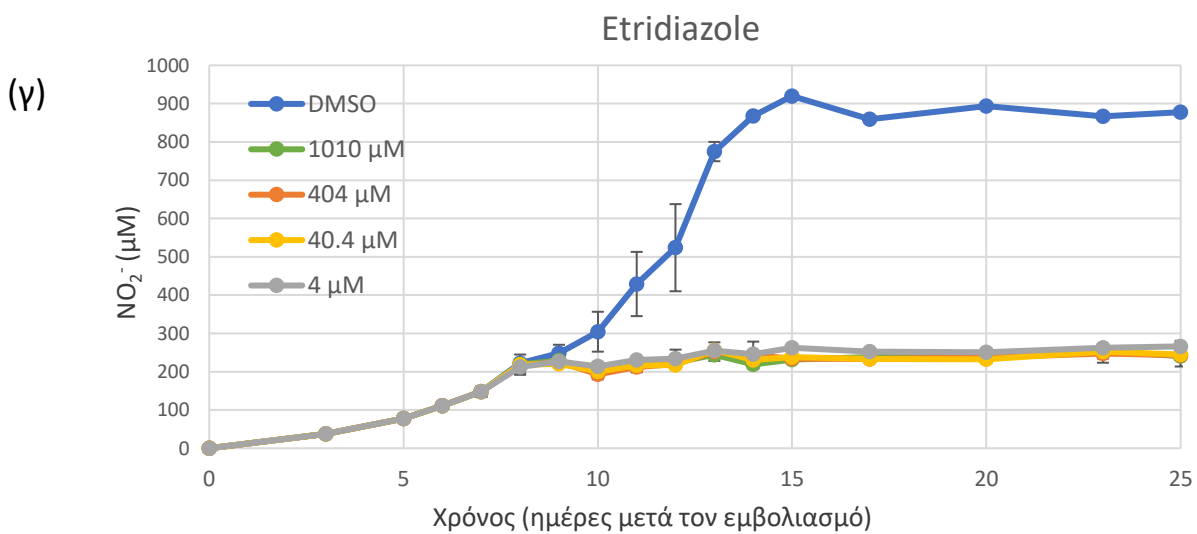
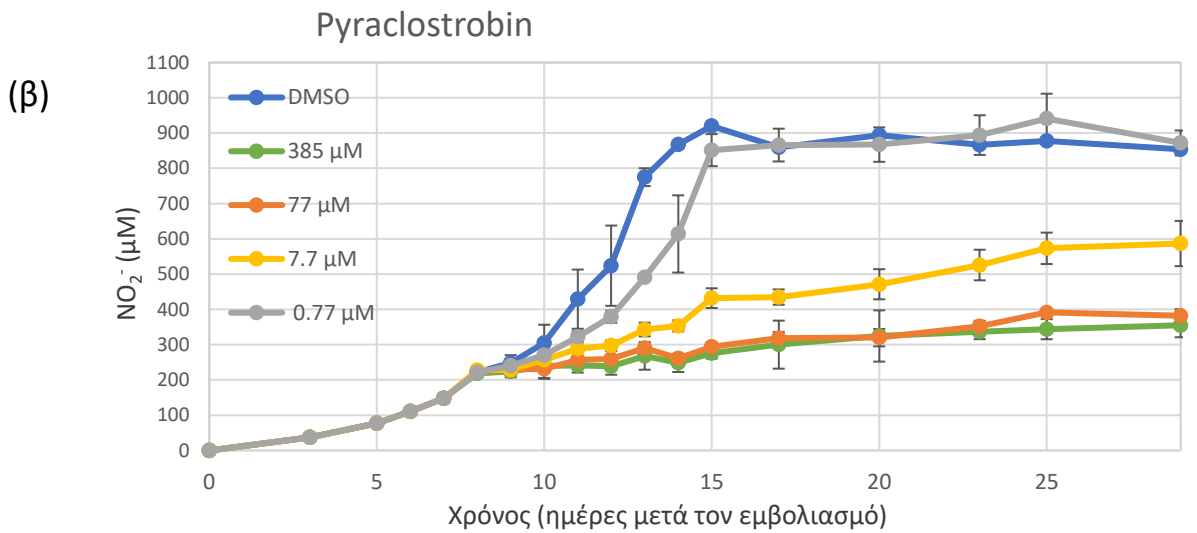
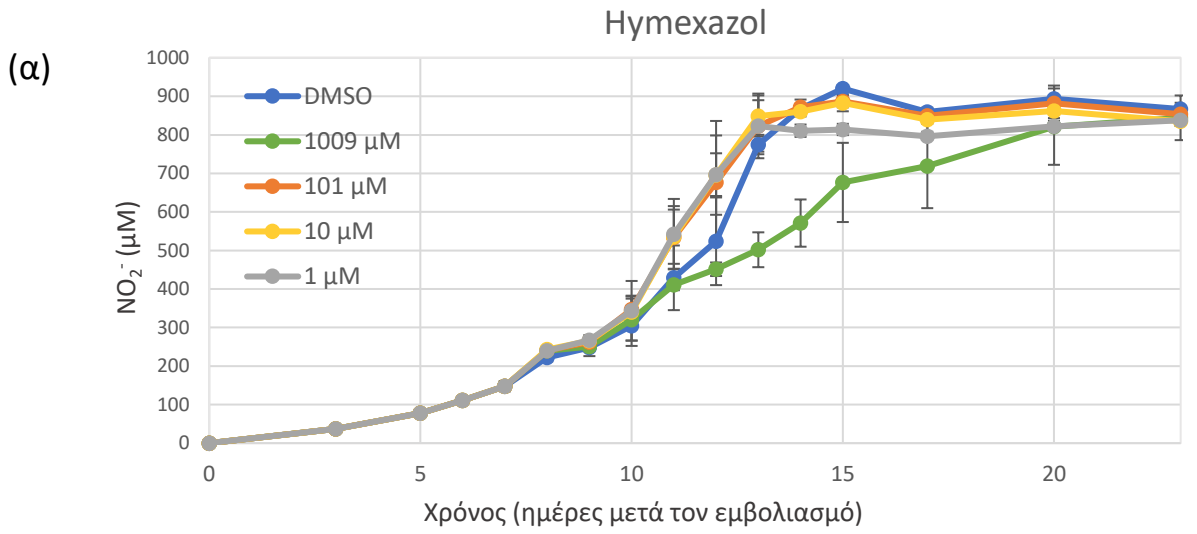
(δ)



**Διάγραμμα 5.** Επίδραση των glyphosate (α), AMPA (β), clethodim (γ) και metsulfuron-methyl (Δ) στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου glyphosate στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus* σε συγκεντρώσεις ως και 2957 μM δεν επηρέασε σημαντικά ( $p > 0.05$ ) τη λειτουργία του AOA στελέχους (Διάγραμμα 5α) και παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για τον κύριο μεταβολίτη του AMPA, σε συγκεντρώσεις ως και 4500 μM (Διάγραμμα 5β). Ομοίως, η προσθήκη των clethodim και metsulfuron-methyl στις υγρές καλλιέργειες του AOA στελέχους σε συγκεντρώσεις ως και των 415 μM και 131.1 μM, αντίστοιχα, δε φάνηκε να ασκούν κάποια επίδραση στη συσσώρευση των νιτρικών συγκριτικά με τον DMSO μάρτυρα (Διάγραμμα 5γ, δ).

## 2) Μυκητοκτόνα

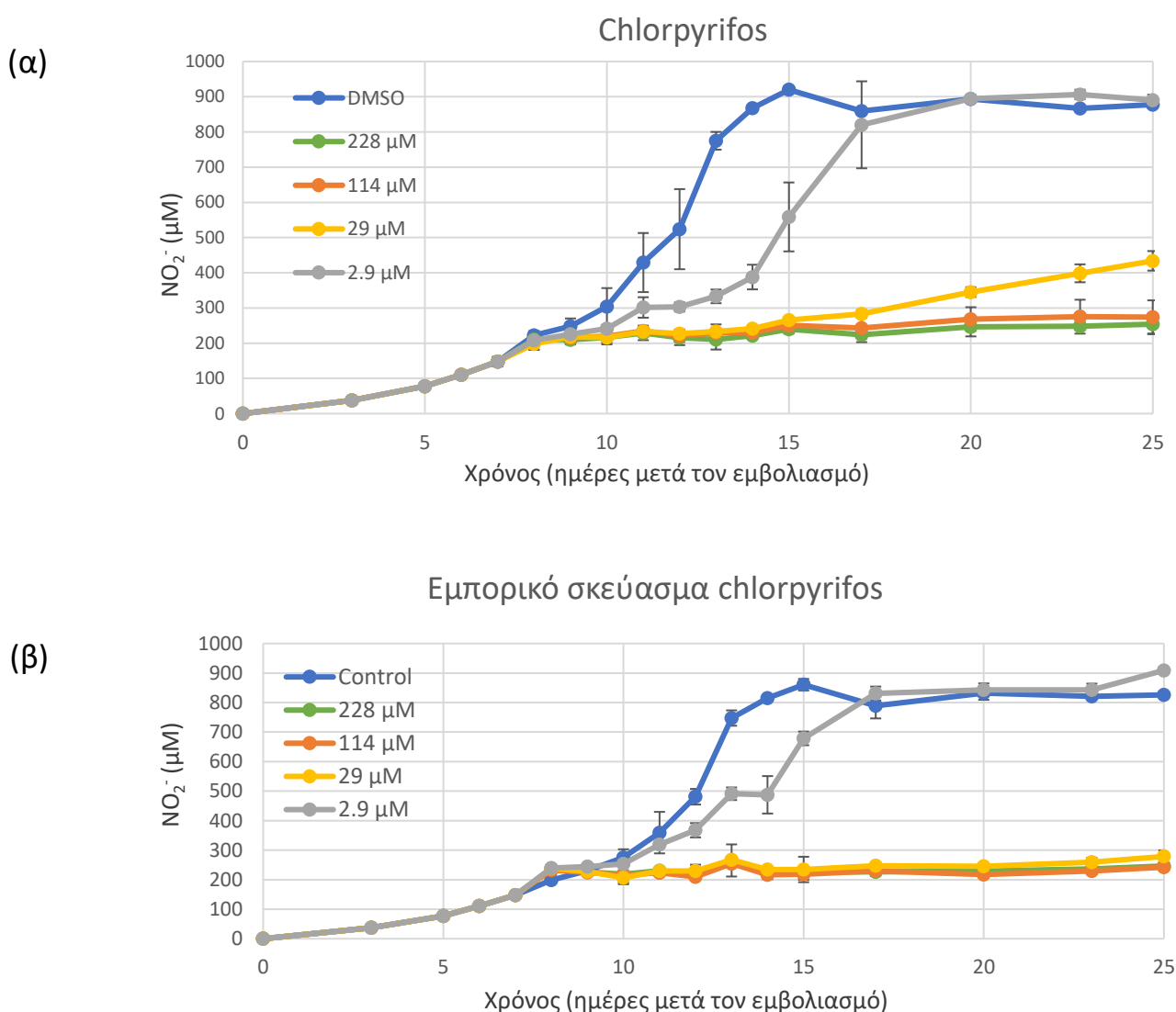




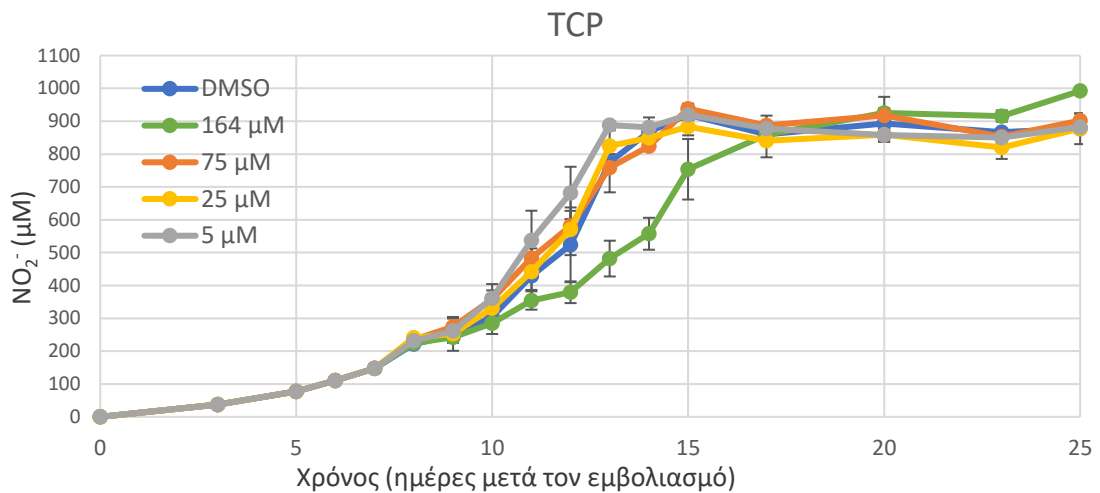
**Διάγραμμα 6.** Επίδραση των μυκητοκτόνων hymexazol (α), pyraclostrobin (β) και etridiazole (γ) στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων

Το μυκητοκτόνο hymexazol σε συγκεντρώσεις  $\leq 101 \mu\text{M}$  δεν επηρέασε την συσσώρευση νιτρωδών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ ) στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus* σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO), ενώ στη μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε ( $1009 \mu\text{M}$ ) προκάλεσε προσωρινή αναστολή της λειτουργίας του AOA στελέχους με πλήρη ανάκαμψη κατά την 20<sup>η</sup> ημέρα της επώασης (Διάγραμμα 6α). Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή του pyraclostrobin σε συγκεντρώσεις  $\geq 7.7 \mu\text{M}$ , προκάλεσε σημαντική (68,74%) στη συγκέντρωση  $7.7 \mu\text{M}$ ) ή πλήρη αναστολή της νιτρωδοποίησης (σε συγκεντρώσεις  $> 7.7 \mu\text{M}$ ) (Διάγραμμα 6β). Αντίθετα, η προσθήκη του etridiazole σε συγκεντρώσεις  $\geq 4 \mu\text{M}$  προκάλεσε πλήρη αναστολή της λειτουργίας του μελετούμενου AOA στελέχους (Διάγραμμα 6γ).

### 3) Εντομοκτόνα:



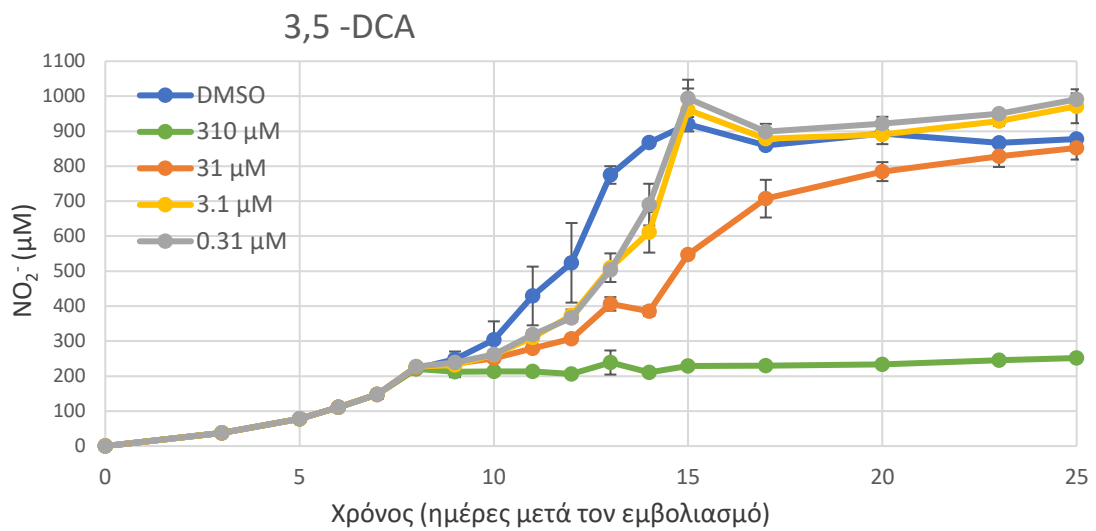
(γ)



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση του εντομοκτόνου chlorpyrifos (α), του εμπορικού του σκευάσματος (Pygipex) (β) και του κύριου μεταβολίτη του TCP (γ) στη συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Το εντομοκτόνο chlorpyrifos όταν εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις  $\geq 2.9 \mu\text{M}$  παρεμπόδισε σημαντικά (two-way-ANOVA,  $p < 0.05$ ) την συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus*, συγκριτικά με το μάρτυρα DMSO. Ωστόσο, για τη μικρότερη συγκέντρωση των  $2.9 \mu\text{M}$  η αναστολή αυτή ήταν μόνο προσωρινή και η λειτουργία του στελέχους ανακτήθηκε προς το τέλος της μελέτης (Διάγραμμα 7α). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση εφαρμογής του εμπορικού σκευάσματος της δραστικής ουσίας (Διάγραμμα 7β). Σε αντίθεση με τη μητρική του ένωση, ο μεταβολίτης TCP σε συγκεντρώσεις  $\leq 164 \mu\text{M}$  δεν επηρέασε σημαντικά ( $p > 0.05$ ) τη νιτροδοποιητική λειτουργία του AOA στελέχους (Διάγραμμα 7γ).

#### 4) 3,5-DCA



**Διάγραμμα 8.** Επίδραση του μεταβολίτη του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Τέλος, ο μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, ανέστειλε πλήρως τη λειτουργία του *Ca. N. franklandianus* μόνο όταν εφαρμόστηκε στη συγκέντρωση των 310 μM (Διάγραμμα 8).

Συγκεντρωτικά οι μέσες τιμές  $EC_{50}$  ( $\mu M$ ) για τα γεωργικά φάρμακα και τα νιτρωδοποιητικά στελέχη που μελετήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 13.** Μέσες τιμές  $EC_{50}$  ( $\mu M$ ) για τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν. Τα τυπικά σφάλματα των μέσων όρων των τιμών δίνονται στις παρενθέσεις. Ο/Οι αστερίσκος/οι υποδηλώνει/ουν ότι δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός της τιμής  $EC_{50}$  από τη στατιστική ανάλυση.

	Γεωργικό φάρμακο	<i>Ca. N. franklandianus</i>	<i>N. communis</i>
Εντομοκτόνα	Chlorpyrifos	8.84( $\pm$ 2.86)	>228**
	TCP	>164**	>164**
Ζιζανιοκτόνα	Glyphosate	>2957**	193.78( $\pm$ 39.89)
	AMPA	>4500**	>4500**
	Metsulfuron-methyl	>131.1**	22.72( $\pm$ 5.74)
	Clethodim	>416.8**	>416.8*
Μυκητοκτόνα	Pyraclostrobin	4.39 ( $\pm$ 0.906)	7.98( $\pm$ 0.40)
	Etridiazole	<4*	<4*
	Hymexazol	>1009.81**	>1009.81**
	3,5-DCA	52.81( $\pm$ 5.08)	13.55( $\pm$ 1.14)

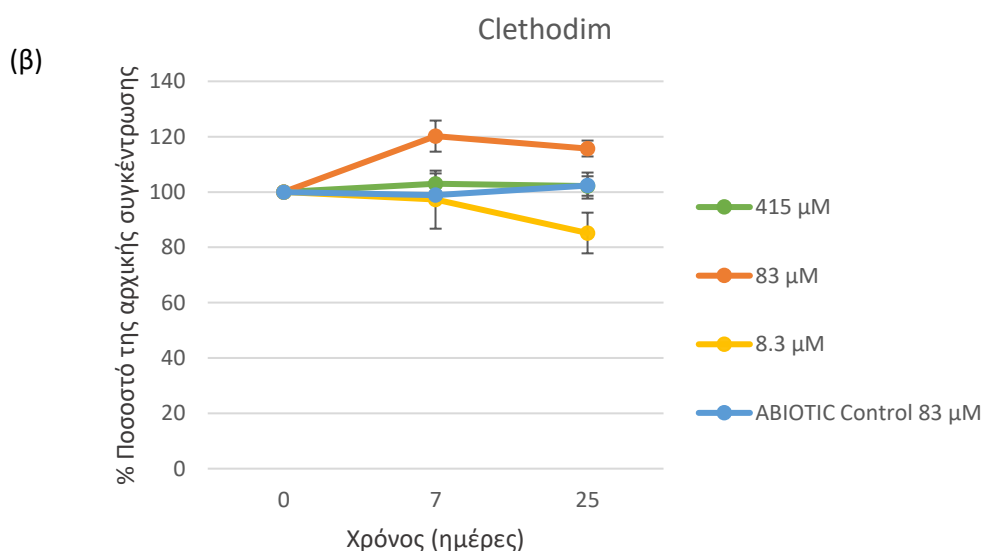
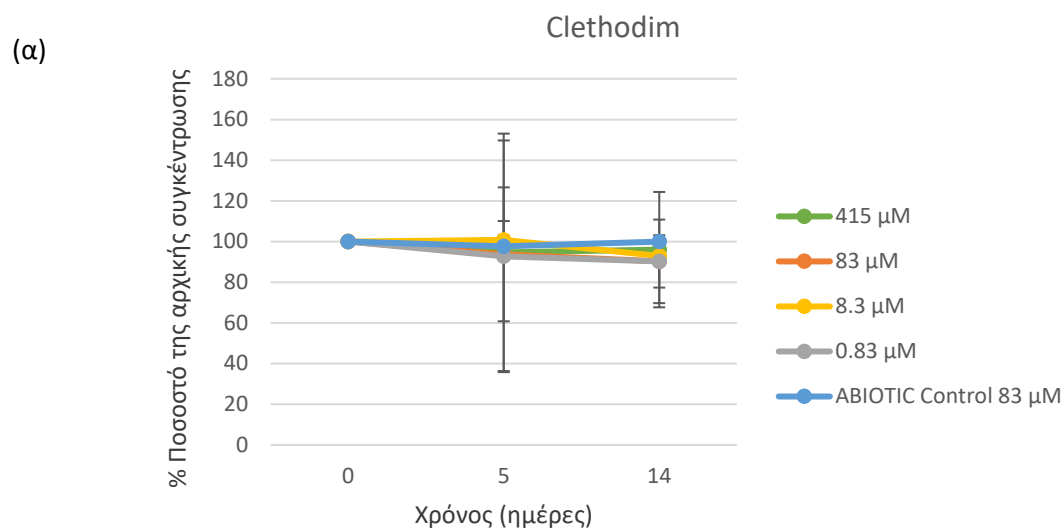
\*Ελάχιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε.

\*\* Μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε.

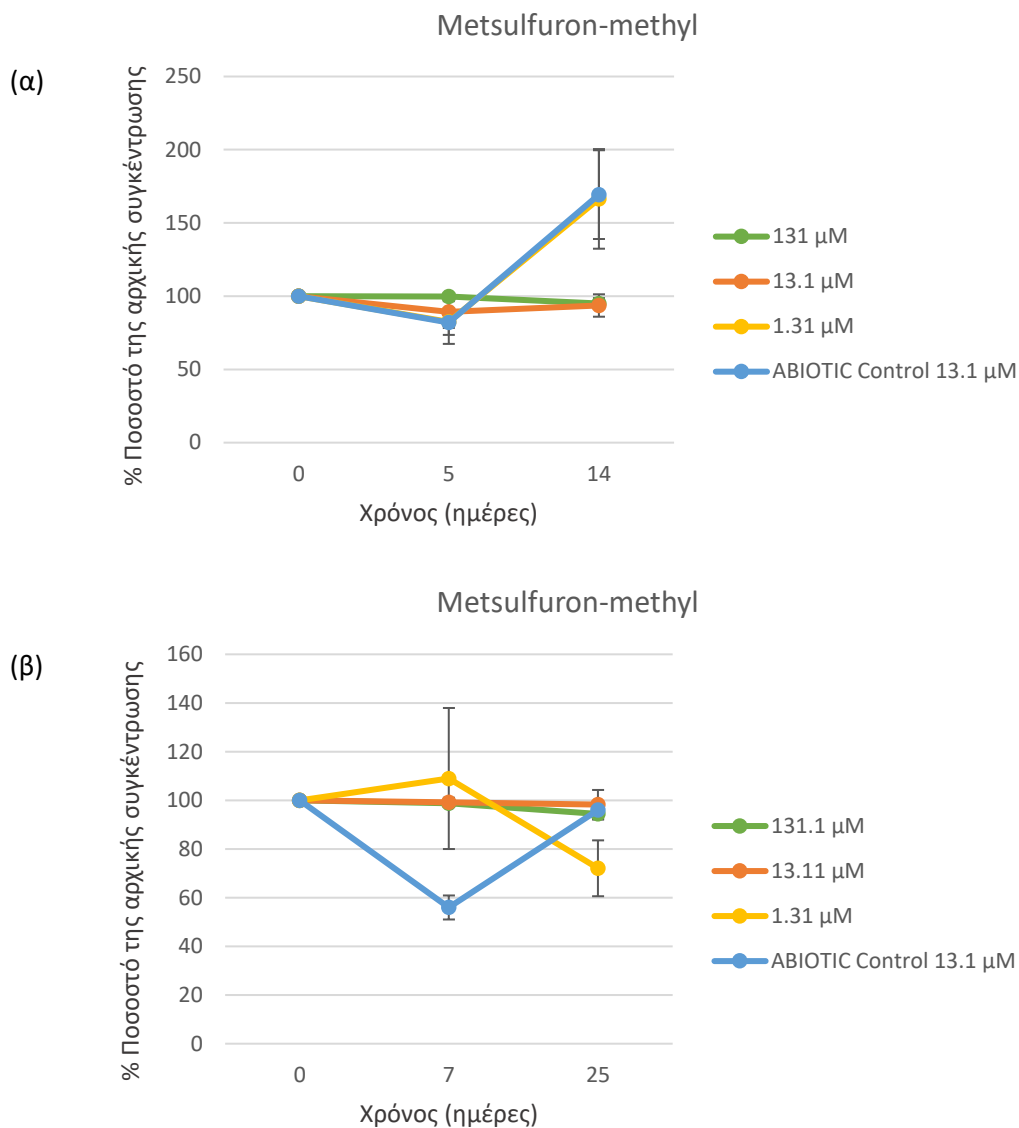
### 3.3 Μελέτη της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων

Τα αποτελέσματα από την HPLC ανάλυση σχετικά με την πορεία της αποδόμησης των μελετούμενων γεωργικών φαρμάκων, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της σταθερότητας τους στις υγρές καλλιέργειες των επιλεγμένων νιτρωδοποιητικών στελεχών κατά τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών, παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 9-16 για τις διάφορες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων.

#### 1) Ζιζανιοκτόνα



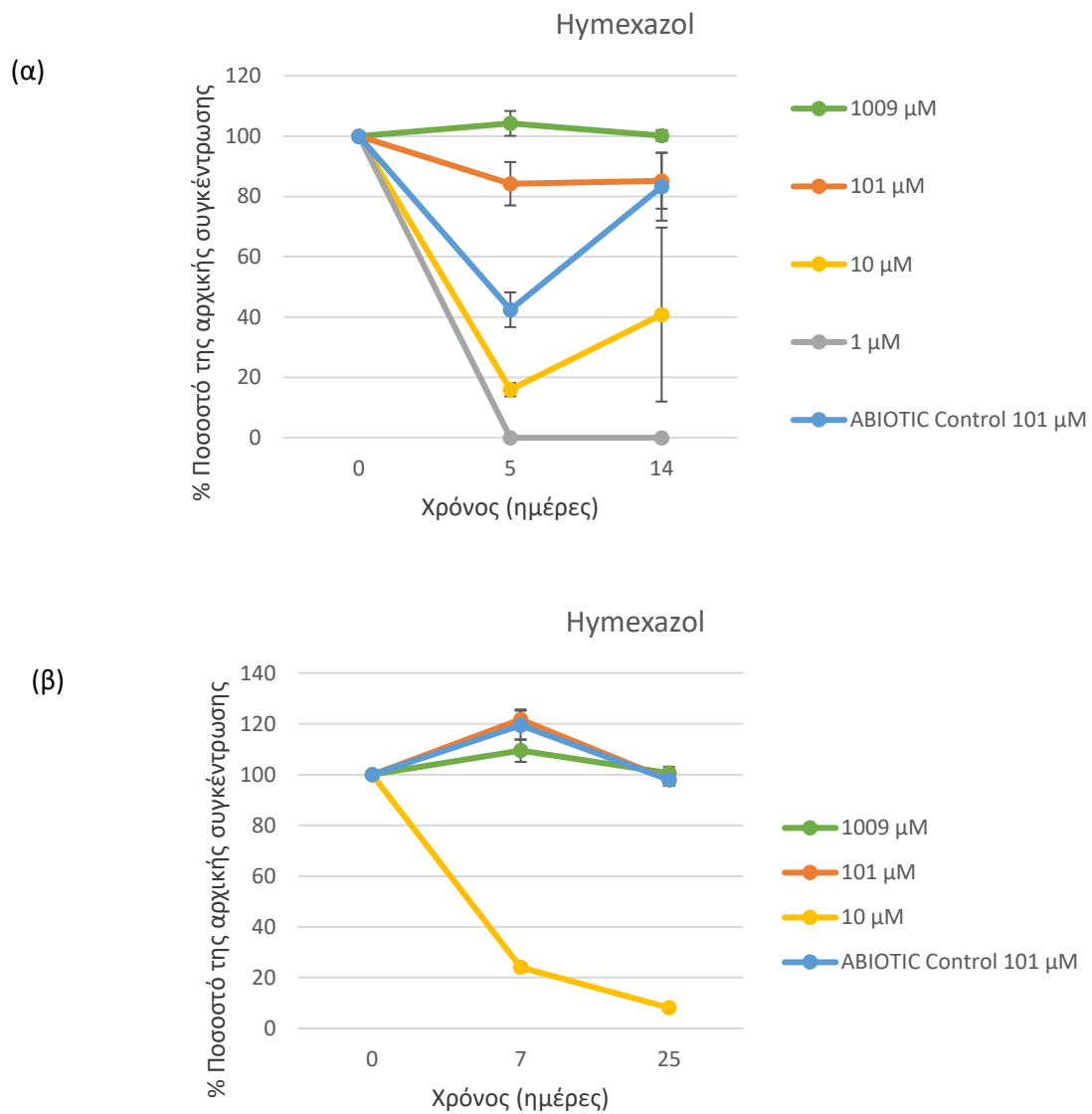
**Διάγραμμα 9.** Πορεία αποδόμησης του ζιζανιοκτόνου clethodim στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).



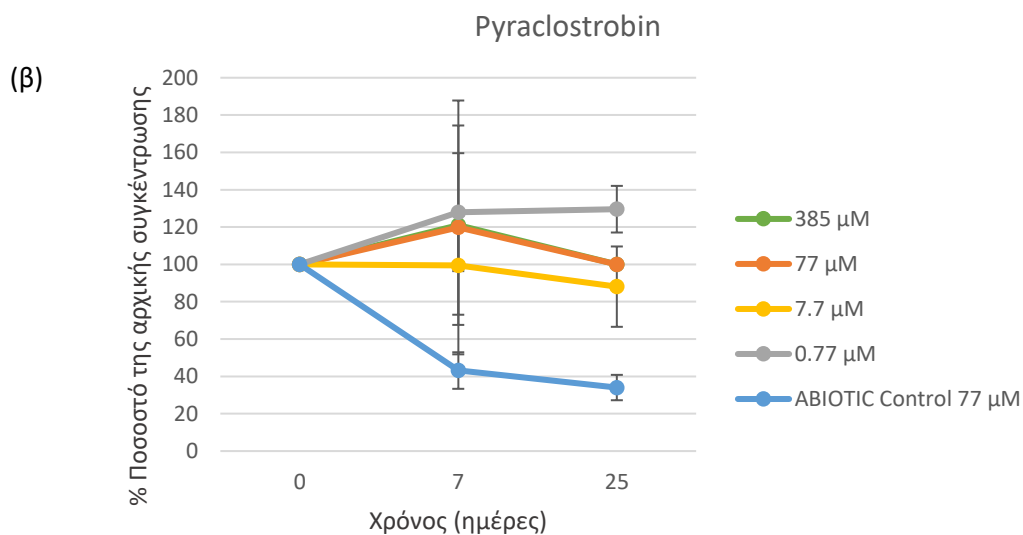
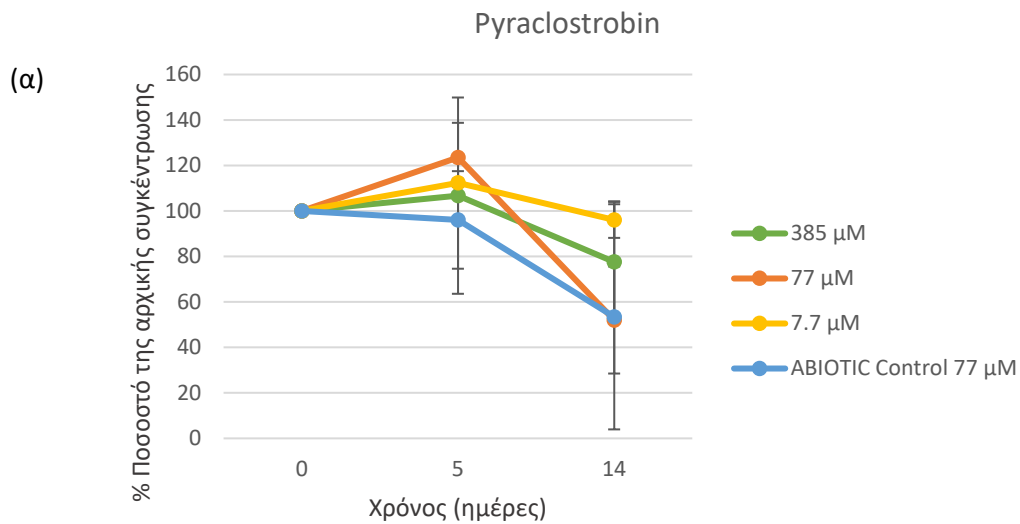
**Διάγραμμα 10.** Πορεία αποδόμησης του ζιζανιοκτόνου metsulfuron-methyl στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).

Τα ζιζανιοκτόνα clethodim και metsulfuron-methyl δεν αποδομήθηκαν σημαντικά στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*, με τις συγκεντρώσεις τους να παραμένουν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 9α, 10α). Στις καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus* παρατηρήθηκε μόνο μερική αποδόμηση (~20%) τόσο του clethodim, όσο και του metsulfuron-methyl, στις συγκεντρώσεις των 8.3 και 1.31 μM, αντίστοιχα, 25 ημέρες μετά την προσθήκη τους στις καλλιέργειες του ΑΟΑ στελέχους (Διαγράμματα 9β, 10β). Παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες (ABIOTIC Control) των ΑΟΒ και ΑΟΑ καλλιεργειών στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (83 και 13.1 μM για τα clethodim και metsulfuron-methyl, αντίστοιχα) (Διαγράμματα 9, 10).

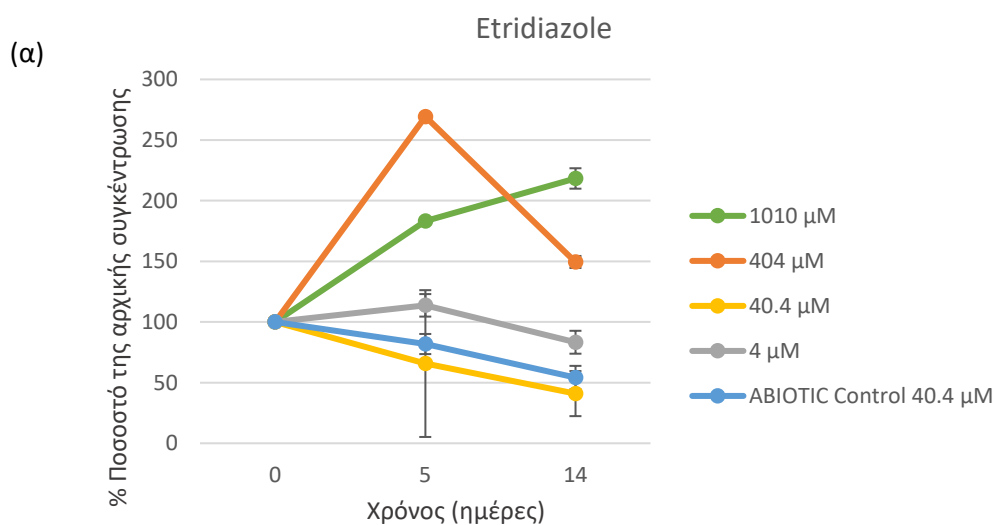
## 2) Μυκητοκτόνα



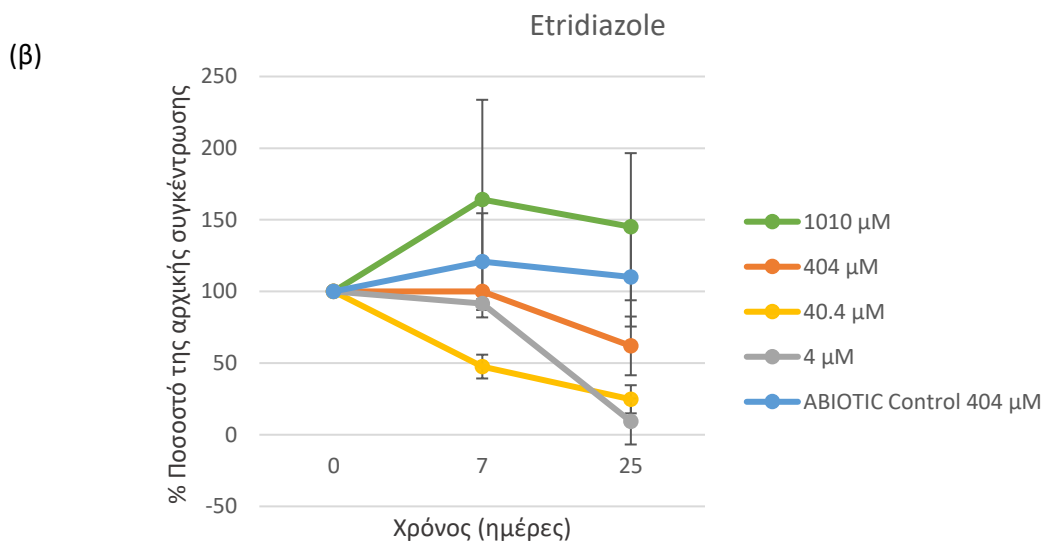
**Διάγραμμα 11.** Πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου hymexazol στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).



**Διάγραμμα 12.** Πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου pyraclostrobin στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).





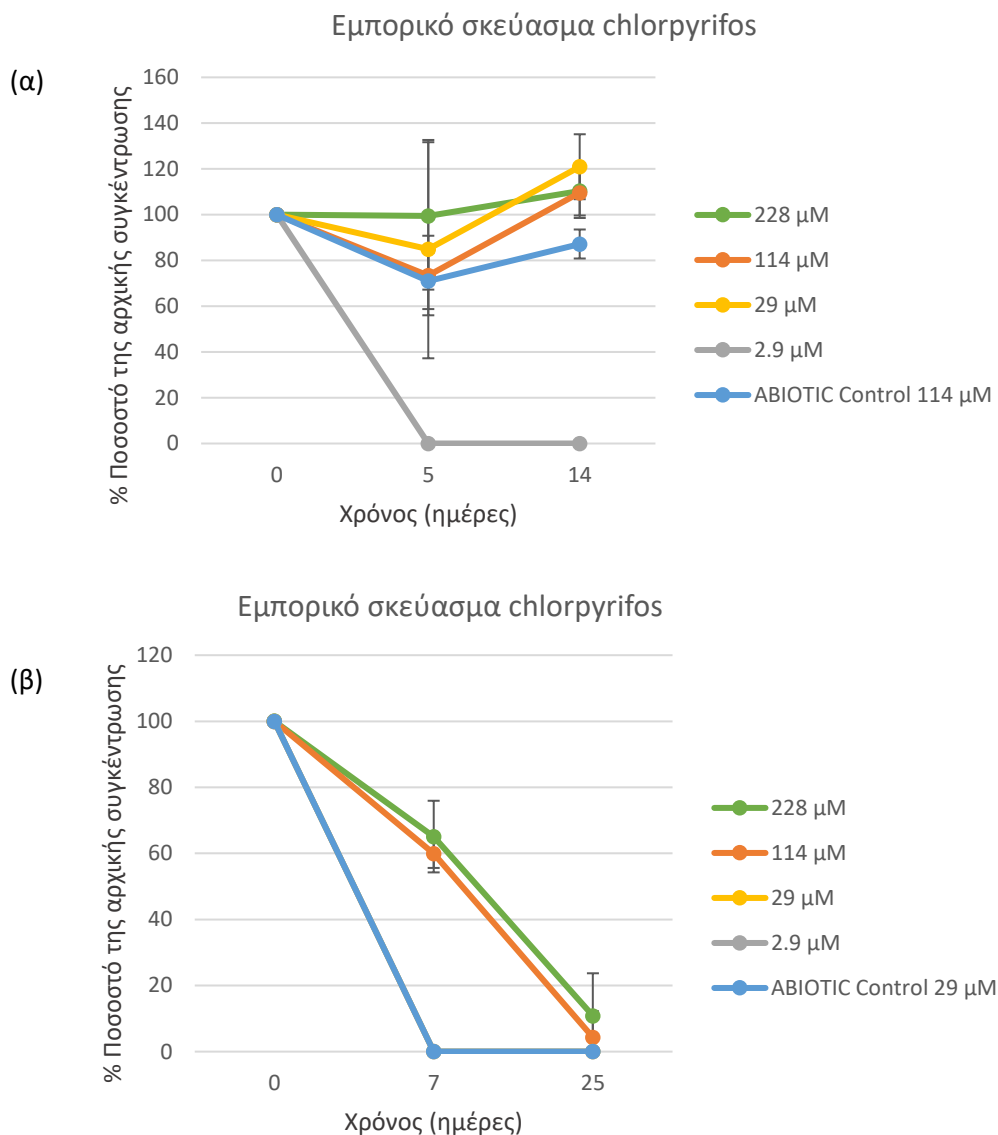


**Διάγραμμα 13.** Πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου etridiazole στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).

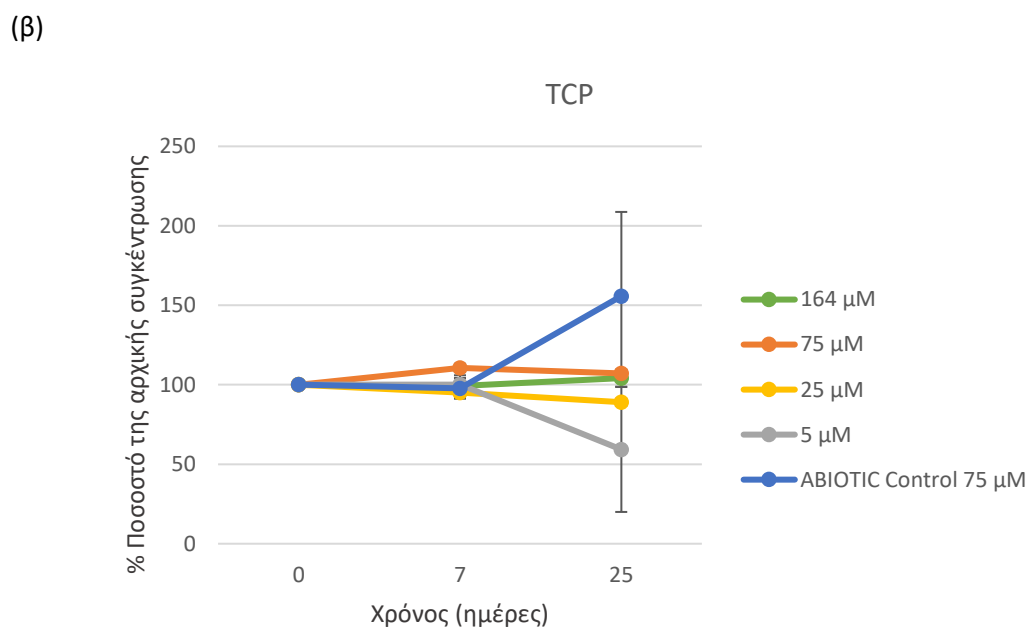
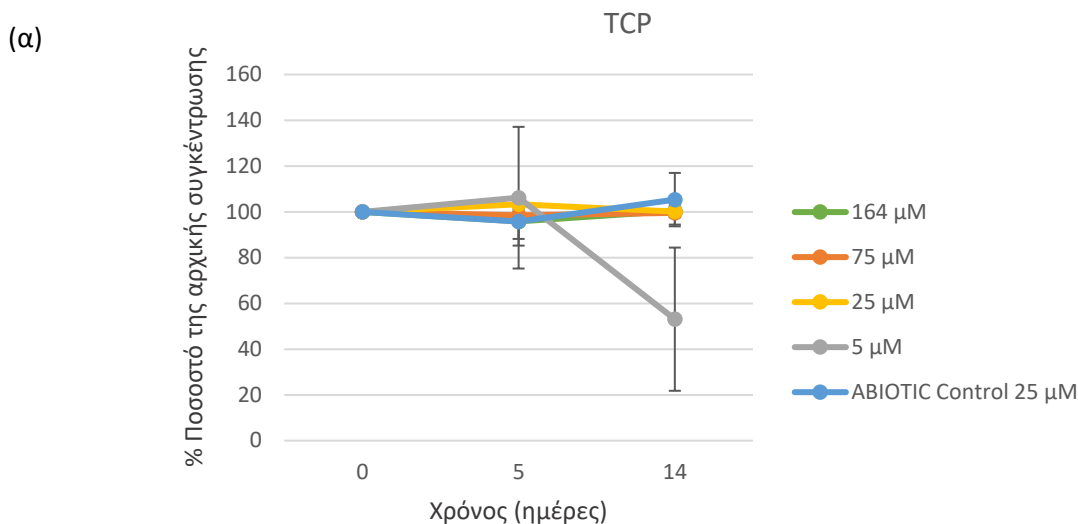
Στις καλλιέργειες του *N. communis* παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση των μυκητοκτόνων που μελετήθηκαν που κυμάνθηκε από 20 -100% (Διαγράμματα 11α, 12α, 13α). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του hymexazol, παρατηρήθηκε 100% και περίπου 80% αποδόμηση, στις συγκεντρώσεις των 1 και 10  $\mu\text{M}$ , αντίστοιχα, στις 5 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες (Διάγραμμα 11α). Για το ryraclostrobin παρατηρήθηκε 50% αποδόμηση στη συγκέντρωση των 77  $\mu\text{M}$  και 20% αποδόμηση στη συγκέντρωση των 385  $\mu\text{M}$  στις 14 ημέρες μετά την προσθήκη τους στις καλλιέργειες του (Διάγραμμα 12α). Τέλος, στην περίπτωση του etridiazole παρατηρήθηκε περίπου 20 και 50% αποδόμηση στις συγκεντρώσεις των 4 και 40.4  $\mu\text{M}$ , αντίστοιχα, στις 14 ημέρες μετά την προσθήκη τους στις καλλιέργειες του (Διάγραμμα 13α). Στις καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus* παρατηρήθηκε γρήγορη αποδόμηση του hymexazol στη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$  (80% περίπου στις 7 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες) που έφτασε στο 90% περίπου στο τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 11β). Αντίθετα, το ryraclostrobin δεν αποδομήθηκε σημαντικά στις υγρές καλλιέργειες του AOA στελέχους και οι συγκεντρώσεις του παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 12β). Τέλος, στην περίπτωση του etridiazole παρατηρήθηκε 40% αποδόμηση στη συγκέντρωση των 404  $\mu\text{M}$  και 90% αποδόμηση στις συγκεντρώσεις των 4 και 40.4  $\mu\text{M}$ , στις 25 ημέρες μετά την προσθήκη τους στις καλλιέργειες του (Διάγραμμα 13β). Παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες (ABIOTIC Control) των AOB και AOA καλλιεργειών στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, με εξαίρεση τον αβιοτικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε για το ryraclostrobin και για την καλλιέργεια του *Ca. N. franklandianus* στη συγκέντρωση των 77  $\mu\text{M}$  (Διαγράμματα 11, 12 και 13).

### 3) Εντομοκτόνα

Εξαιτίας της χαμηλής ανάκτησης (< 50%) που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της δραστικής ουσίας chlorpyrifos όταν αυτή προστέθηκε ως πρότυπο διάλυμα DMSO στις υγρές καλλιέργειες των AOB και AOA στελεχών, τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται. Αντίθετα, παρατίθενται μόνο τα αποτελέσματα από τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος του chlorpyrifos που χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά για να αντιμετωπιστεί η παραπάνω αδυναμία.



**Διάγραμμα 14.** Πορεία αποδόμησης του εντομοκτόνου chlorpyrifos όταν αυτό προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β) με τη μορφή του εμπορικού σκευάσματος Pyrinex.



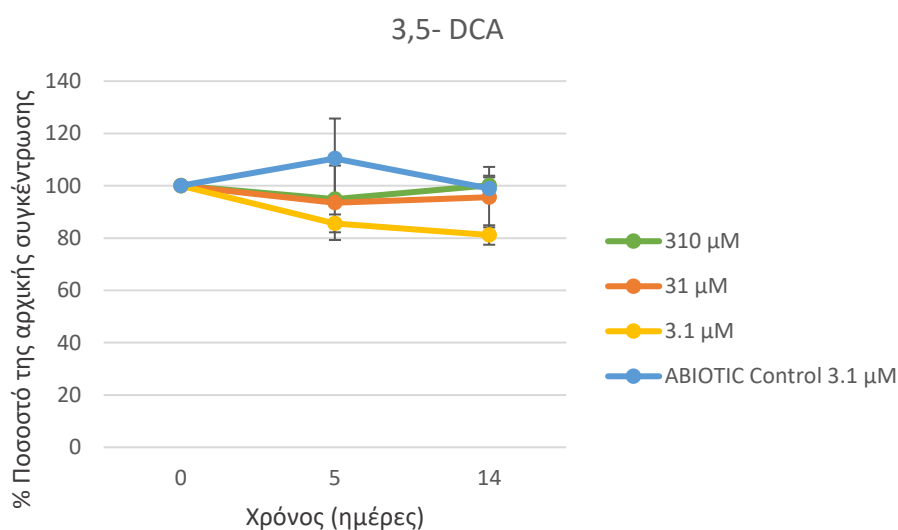
**Διάγραμμα 15.** Πορεία αποδόμησης του μεταβολίτη του εντομοκτόνου chlorpyrifos, TCP στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).

Το εντομοκτόνο chlorpyrifos δεν φαίνεται να αποδομήθηκε σημαντικά στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis*, με τις συγκεντρώσεις του να παραμένουν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με εξαίρεση τη συγκέντρωση 2,9 μM όπου πλήρης αποδόμηση του γ.φ. 5 ημέρες μετά την προσθήκη του (Διάγραμμα 14α). Αντίθετα, στις καλλιέργειες του *Ca. N. franklandianus* παρατηρήθηκε (i) πλήρης αποδόμηση του γ.φ. 5 ημέρες μετά την προσθήκη του σε συγκεντρώσεις 2,9 και 29 μM και (ii) >90% αποδόμηση του, στις συγκεντρώσεις των 114 και 228 μM, στις 25 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες (Διάγραμμα 14β). Όσον αφορά στο μεταβολίτη του chlorpyrifos, TCP, σημαντική αποδόμηση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες τόσο του AOB, όσο και του AOA στελέχους μόνο στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης των 5μM, που ανήλθε σε 50% και 40% αντίστοιχα, 14 (AOB) και 25 (AOA) ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες (Διάγραμμα 15).

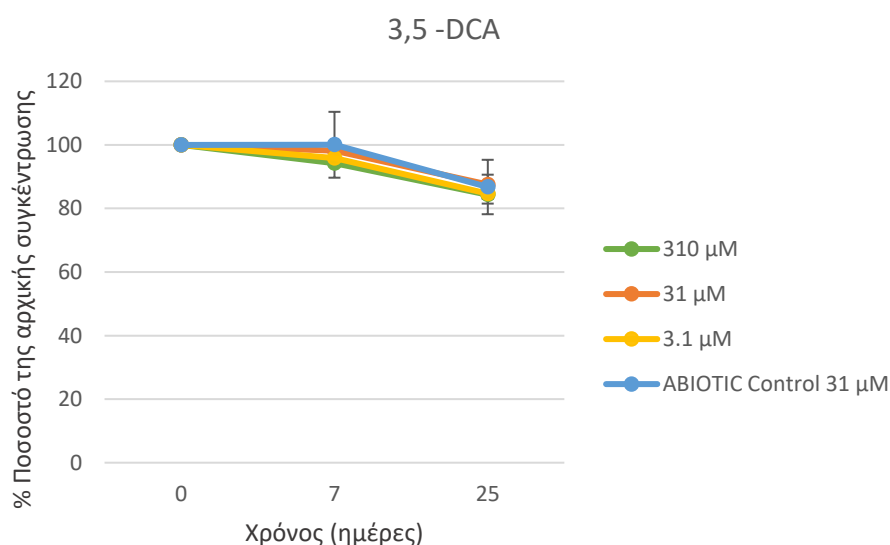
Παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες των ΑΟΒ και ΑΟΑ καλλιιεργειών στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Διαγράμματα 14, 15).

#### 4) 3,5-DCA

(α)



(β)



**Διάγραμμα 16.** Πορεία αποδόμησης του 3,5-DCA στις υγρές καλλιέργειες των *N. communis* (α) και *Ca. N. franklandianus* (β).

Όσον αφορά στο μεταβολίτη του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA παρατηρήθηκε 20% αποδόμηση του μόνο στις υγρές καλλιέργειες του *N. communis* και μόνο στη συγκέντρωση των 3.1 μM, στις 5 ημέρες μετά την προσθήκη του και παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες των ΑΟΒ και ΑΟΑ καλλιιεργειών στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Διάγραμμα 16).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση δέκα επιλεγμένων γ.φ. στη λειτουργία δύο αντιπροσωπευτικών εδαφογενών στελεχών νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών, *Nitrosomonas communis* (AOB) και *Candidatus Nitrosocosmicus franklandianus* (AOA), στο πλαίσιο μιας ευρύτερης προσπάθειας ανάπτυξης και τυποποίησης νέων οικοτοξικολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί έχουν ήδη προταθεί ως τέτοιοι δείκτες για τους λόγους που προαναφέρθηκαν στην εισαγωγή (Ενότητα 1.4.4.) (Ritz *et al.* 2009; Wessén and Hallin 2011, Karpouzias 2021). Ωστόσο, η παρούσα μελέτη συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πρώτες που διερευνούν *in vitro* την τοξικότητα των γ.φ. στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι *in vitro* δοκιμές (1) παρέχουν ένα ακριβές μέτρο της εγγενούς τοξικότητας μιας ένωσης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, (2) εντοπίζουν πιθανές διαφορές στην τοξικότητα μιας χημικής ουσίας στις διαφορετικές μικροβιακές ομάδες που επιτελούν τη διεργασία της νιτρωδοποίησης (π.χ. AOB έναντι AOA) και (3) αποτελούν ένα πολύτιμο πειραματικό εργαλείο για τη διερεύνηση των μηχανισμών τοξικότητας. Ωστόσο, τα αποτελέσματά τους ενδέχεται να αποκλίνουν από τις μελέτες εδαφικών μικροκόσμων λόγω της μειωμένης διάχυσης ή της υψηλότερης αποδόμησης των χημικών ουσιών στο έδαφος (Taylor *et al.* 2010) καθώς και της δυνητικής ικανότητας προσρόφησης των γ.φ. στο έδαφος. Παρόλο που η χρήση των *in vitro* δοκιμών έχει προταθεί ως συντηρητικό βήμα (βαθμίδα I) στις δοκιμές εκτίμησης κινδύνου των γ.φ., αντίστοιχες *in vitro* δοκιμές δεν έχουν ακόμη χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της μικροβιακής τοξικότητας των γ.φ. στο έδαφος (Karpouzias 2021). Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι οι *in vitro* μικροβιακές δοκιμές, όπως και όλες οι δοκιμές της βαθμίδας I, θα πρέπει να θεωρούνται ως απλουστευμένες δοκιμές οικοτοξικότητας χαμηλής οικολογικής σημασίας, αλλά παρόλα αυτά χρήσιμες για την απόκτηση μιας πρώτης αξιολόγησης της πιθανής τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin και etridiazole παρεμπόδισαν τη νιτρωδοποιητική λειτουργία τόσο του AOB στελέχους, *N. communis*, όσο και του AOA στελέχους, *Ca. N. franklandianus*, σε αντίθεση με το hymexazol που στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν επηρέασε κανένα από τα δυο στελέχη. Συγκεκριμένα, τα ευρήματά μας (βάση των τιμών EC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν) υποδηλώνουν ότι τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin και etridiazole σε επίπεδα συγκέντρωσης που είναι πιθανόν να απαντηθούν στο έδαφος ύστερα από τη χρήση της συνιστώμενης για εφαρμογή στον αγρό δόσης θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία τόσο των AOB όσο και των AOA στελεχών. Η υψηλή τοξικότητα της δραστικής ουσίας etridiazole, η οποία είναι γνωστή για τη δράση της ως παρεμποδιστής της νιτροποίησης, ήταν αναμενόμενη και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Stratton, *et al.* 2002). Το etridiazole προκαλεί την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφατίδια, μέσω της ενεργοποίησης των συνδεδεμένων με τη μεμβράνη φωσφολιπασών, οδηγώντας στη λύση των μεμβρανών στους μύκητες. Η δράση του ωστόσο δεν περιορίζεται μόνο στους μύκητες, αλλά είναι γνωστό πως επιδρά με τον ίδιο μηχανισμό και σε άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους, και ειδικότερα στους

νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Radzuhn *et al.* 1984; Yang *et al.* 2011). Επιπλέον, ο μηχανισμός δράσης του pyraclostrobin ως εξωτερικός αναστολέας κινόνης και η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής μέσω της παρεμπόδισης της μεταφοράς ηλεκτρονίων εντός της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να είναι η πηγή της ισχυρής τοξικότητάς που επιδεικνύει τόσο σε AOB όσο και σε AOA στελέχη (Fernández, *et al.* 2010). Συγκεκριμένα το pyraclostrobin φέρεται να δρα στην εξωτερική θέση δέσμευσης της κινόνης στο σύμπλοκο του κυτοχρώματος bc1 (Karadimos, *et al.* 2005), με το εν λόγω σύμπλοκο να απαντάται και στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Soliman, *et al.* 2018). Πέραν των προαναφερόμενων μυκητοκτόνων και ο μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, εμφάνισε σημαντική τοξικότητα και για τους δύο μικροοργανισμούς, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων *in vitro* μελετών (Vasileiadis *et al.* 2018).

Το εντομοκτόνο chlorpyrifos ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη μόνο του AOA στελέχους, ενώ αντίθετα ο κύριος μεταβολίτης του, TCP, δεν βρέθηκε να αναστέλλει τη λειτουργία κανενός από τα δύο νιτρωδοποιητικά στελέχη που μελετήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες παρατηρήσεις που καταδεικνύουν τα AOB ως πιο ευαίσθητα ως προς την επίδραση των ξενοβιοτικών ουσιών σε σύγκριση με τα AOA εξαιτίας της υψηλότερης διαπερατότητας των μεμβρανών τους από τις ουσίες αυτές (Shen *et al.* 2013). Ωστόσο, η παρατηρούμενη αρνητική επίδραση του chlorpyrifos στα AOA δε φαίνεται σχετίζεται άμεσα με τον τρόπο δράσης του εντομοκτόνου που έγκειται στην αναστολή του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, το οποίο και απουσιάζει στους μικροοργανισμούς (Testai, *et al.* 2010).

Παρά την ευαισθησία του στην πλειονότητα των μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων που εξετάστηκαν, το *Ca. N. frankladianus* εμφάνισε ανεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα glyphosate και metsulfuron- methyl, σε αντίθεση με το *N. communis* που αποδείχθηκε πιο ευαίσθητο. Αυτή η διαφορά μεταξύ της ανοχής του AOA στελέχους και της ευαισθησίας του AOB στελέχους στις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες μπορεί να προέρχεται από τους τρόπους δράσης αυτών των ζιζανιοκτόνων. Ως μέλος της οικογένειας των σουλφονουριών το metsulfuron- methyl είναι ζιζανιοκτόνο που δρα καταστέλλοντας την συνθάση του ακετογαλακτικού οξέος (ALS) των φυτών, η οποία δεν περιορίζεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συνεπώς είναι πιθανό να αναστέλλεται και στο *N. communis* (Brown 1990). Προηγούμενες μελέτες εδάφους έδειξαν ότι οι ενώσεις σουλφονουρίας (όπως π.χ. το chlorimuron-ethyl) αναστέλλουν τους πληθυσμούς των AOB και AOA του εδάφους με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Tan *et al.* 2013). Από την άλλη πλευρά το glyphosate παρεμβαίνει στο μονοπάτι του σικιμικού οξέος εμποδίζοντας τη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων, που συνδέεται με το ένζυμο 5-enolpyruvateshikimate-3-phosphate συνθάση (EPSPS) αναστέλλοντας τη λειτουργία του (Sikorski and Gruys 1997). Το μονοπάτι αυτό δεν περιορίζεται στα φυτά αλλά εμφανίζεται και στους μικροοργανισμούς και η έλλειψη επίδρασης του AMPA που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη πιθανόν δικαιολογείται από το γεγονός ότι η ένωση με τη μορφή του μεταβολίτη δεν συμμετέχει πλέον σε αυτήν την παρεμπόδιση (Reddy, *et al.* 2015). Τέλος, η περιορισμένη επίδραση του clethodim και στα δύο νιτρωδοποιητικά στελέχη είναι πιθανό να οφείλεται στη δράση του έναντι της ευκαρυωτικής καρβοξυλάσης του ακετυλοσυνένζυμου-A αλλά όχι έναντι της προκαρυωτικής (Maurprivez *et al.* 2019).

Συμπληρωματικά, τα διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας σε συγκεκριμένα γ.φ. (chlorpyrifos, glyphosate, metsulfuron- methyl ) που επέδειξε στην παρούσα μελέτη το

ΑΟΒ έναντι του ΑΟΑ στελέχους είναι πιθανόν να οφείλονται σε θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ των ΑΟΒ και των ΑΟΑ ως προς τα κυτταρικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και σε διαφορές ως προς το μεταβολισμό και τη φυσιολογία τους (Lehtovirta, *et al.* 2013; Shen *et al.* 2013).

Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα της μελέτης αποδόμησης και της σταθερότητας των γ.φ., συνολικά (1) οι αβιοτικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης με αυτό στις καλλιέργειες των ΑΟΒ και ΑΟΑ στελεχών και ως εκ τούτου η όποια αποδόμηση παρατηρήθηκε φαίνεται να οφείλεται στην επίδραση αβιοτικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία επώασης και το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και 2) παρ' ότι για κάποια από τα πολύ τοξικά φάρμακα για τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση κατά τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών (π.χ. chlorpyrifos και ΑΟΑ στέλεχος), αυτά συνέχισαν να ασκούν ισχυρή επίδραση χωρίς να παρατηρείται ανάκαμψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## 5. Συμπεράσματα

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις μελέτες που έχουν διερευνήσει τις επιπτώσεις των γ.φ. στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους βασίζονται σε πειράματα μικροκόσμων εδάφους και επικεντρώνονται στις διαφορές μεταξύ της αφθονίας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (AOB και AOA) χρησιμοποιώντας το *amoA* γονίδιο ως φυλογενετικό δείκτη. Η παρούσα μελέτη συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πρώτες που διερευνούν την οικοτοξικολογική απόκριση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών ως βιοδείκτες της τοξικότητας των γ.φ. στους μικροοργανισμούς του εδάφους με τη χρήση *in vitro* δοκιμών, ως ένα πρώτο συντηρητικό βήμα για την αξιολόγηση της τοξικότητας τους σε ποικίλους φυλογενετικά και οικοφυσιολογικά εδαφογενείς νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Συγκρίναμε την επίδραση 10 γ.φ. (και/ή μεταβολιτών τους) με ευρεία χρήση στη γεωργική πρακτική, στην ανάπτυξη και τη λειτουργία δυο απομονωμένων από έδαφος νιτρωδοποιητικών στελεχών AOB και AOA. Η κατηγοριοποίηση των γ.φ. ανά στόχο αποκάλυψε διαφορετικά προφίλ τοξικότητας έναντι του AOB και του AOA στελέχους, με μυκητοκτόνα όπως τα pyraclostrobin και etridiazole να είναι ιδιαίτερα τοξικά και για τα δυο στελέχη, ενώ εντομοκτόνα όπως το chlorpyrifos και ζιζανιοκτόνα όπως το metsulfuron-methyl να είναι περισσότερο τοξικά έναντι του AOA και του AOB στελέχους, αντίστοιχα, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται (1) στον ιδιαίτερο μηχανισμό δράσης του κάθε γ.φ. και (2) σε θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ των AOB και των AOA ως προς τα κυτταρικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και ως προς το μεταβολισμό και την οικοφυσιολογία τους.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Beeckman, Fabian, Hans Motte, and Tom Beeckman. 2018. "Nitrification in Agricultural Soils: Impact, Actors and Mitigation." *Current Opinion in Biotechnology* 50 (April): 166–73. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.014>.
- Brown, Hugh M. 1990. "Mode of Action, Crop Selectivity, and Soil Relations of the Sulfonylurea Herbicides." *Pesticide Science* 29 (3): 263–81. <https://doi.org/10.1002/ps.2780290304>.
- Cao, Bin, Karthiga Nagarajan, and Kai-Chee Loh. 2009. "Biodegradation of Aromatic Compounds: Current Status and Opportunities for Biomolecular Approaches." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2): 207–28. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>.
- Cao, Huiluo, Jean-Christophe Auguet, and Ji-Dong Gu. 2013. "Global Ecological Pattern of Ammonia-Oxidizing Archaea." Edited by Stefan Bertilsson. *PLoS ONE* 8 (2): e52853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052853>.
- Caranto, Jonathan D., and Kyle M. Lancaster. 2017. "Nitric Oxide Is an Obligate Bacterial Nitrification Intermediate Produced by Hydroxylamine Oxidoreductase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (31): 8217–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704504114>.
- Chandra, Niharika, and Sunil Kumar. 2017. "Antibiotics Producing Soil Microorganisms." *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils*, 1–18. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2_1).
- Daims, Holger, Elena V. Lebedeva, Petra Pjevac, Ping Han, Craig Herbold, Mads Albertsen, Nico Jehmlich, et al. 2015. "Complete Nitrification by Nitrospira Bacteria." *Nature* 528 (7583): 504–9. <https://doi.org/10.1038/nature16461>.
- Delwiche, C. C. 1970. "THE NITROGEN CYCLE." *Scientific American* 223 (3): 136–47. <http://www.jstor.org/stable/24925899>.
- Erguder, Tuba H., Nico Boon, Lieven Wittebolle, Massimo Marzorati, and Willy Verstraete. 2009. "Environmental Factors Shaping the Ecological Niches of Ammonia-Oxidizing Archaea." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (5): 855–69. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00179.x>.
- Fernández-Ortuño, D., J. A. Torés, A. Vicente, and A. Pérez-García. 2010. "The QoI Fungicides, the Rise and Fall of a Successful Class of Agricultural Fungicides." *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-QoI-Fungicides%2C-the-Rise-and-Fall-of-a-Class-of-Fern%C3%A1ndez-Ortu%C3%B1o-Tor%C3%A9s/9d57200200fce0eecd40ff479bb50cb55835c99a>.
- Francis, Christopher A, J Michael Beman, and Marcel M M Kuypers. 2007. "New Processes and Players in the Nitrogen Cycle: The Microbial Ecology of Anaerobic and Archaeal Ammonia Oxidation." *The ISME Journal* 1 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.8>.
- Geisseler, Daniel, William R. Horwath, Rainer Georg Joergensen, and Bernard Ludwig. 2010. "Pathways of Nitrogen Utilization by Soil Microorganisms – A Review." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (12): 2058–67. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021>.
- Gonçalves, Bruno Bastos, Percilia Cardoso Giaquinto, Douglas dos Santos Silva, Carlos de Melo e Silva Neto, Amanda Alves de Lima, Adriano Antonio Brito Darosci, Jorge Laço Portinho, Wanessa Fernandes Carvalho, and Thiago Lopes Rocha. 2019. *Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment. Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85157>.
- Griffiths, Ellis. 1965. "MICRO-ORGANISMS and SOIL STRUCTURE." *Biological Reviews* 40 (1): 129–42. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1965.tb00799.x>.
- Hallama, Moritz, Carola Pekrun, Hans Lambers, and Ellen Kandeler. 2019. "Hidden Miners – the Roles of Cover Crops and Soil Microorganisms in Phosphorus Cycling through Agroecosystems." *Plant and Soil* 434 (1–2): 7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>.

- Hatzenpichler, Roland. 2012. "Diversity, Physiology, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Archaea." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (21): 7501–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.01960-12>.
- Hayatsu, Masahito, Kanako Tago, and Masanori Saito. 2010. "Various Players in the Nitrogen Cycle: Diversity and Functions of the Microorganisms Involved in Nitrification and Denitrification." *Soil Science and Plant Nutrition*, December. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>.
- Hemkemeyer, Michael, Sanja A. Schwalb, Stefanie Heinze, Rainer Georg Joergensen, and Florian Wichern. 2021. "Functions of Elements in Soil Microorganisms." *Microbiological Research* 252 (November): 126832. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126832>.
- Hu, Hang-Wei, and Ji-Zheng He. 2017. "Comammox—a Newly Discovered Nitrification Process in the Terrestrial Nitrogen Cycle." *Journal of Soils and Sediments* 17 (12): 2709–17. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>.
- "Hymexazol Env. Fate/Transport." 2022. 2022. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/env-fate-transport/DTXSID3032622>.
- Jongseol Kim and Bora Lee. 2011. "Effect of Temperature on Nitrogen Removal and Microbial Community Composition in Nitrifying Biofilm Reactors." In *Proceedings of 2011 6th International Forum on Strategic Technology*, 476–79. Harbin, Heilongjiang, China: IEEE. <https://doi.org/10.1109/IFOST.2011.6021067>.
- Karadimos, D.A., G.S. Karaoglanidis, and K. Tzavella-Klonari. 2005. "Biological Activity and Physical Modes of Action of the Qo Inhibitor Fungicides Trifloxystrobin and Pyraclostrobin against *Cercospora Beticola*." *Crop Protection* 24 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.06.004>.
- Karpouzias, Dimitrios G. 2021. "Assessing the Effects of Pesticides on the Soil Microbial Community: Advances, Standardization of Methods and the Need for a New Regulatory Framework." In *Pesticides in Soils*, edited by M. Sonia Rodríguez-Cruz and M. Jesús Sánchez-Martín, 113:81–105. The Handbook of Environmental Chemistry. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978\\_2021\\_797](https://doi.org/10.1007/978_2021_797).
- Könneke, Martin, Anne E. Bernhard, José R. de la Torre, Christopher B. Walker, John B. Waterbury, and David A. Stahl. 2005. "Isolation of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Marine Archaeon." *Nature* 437 (7058): 543–46. <https://doi.org/10.1038/nature03911>.
- Koops, H. P., B. Bøher, U. C. Mør, A. Pommerening-Rø, and G. Stehr. 1991. "Classification of Eight New Species of Ammonia-Oxidizing Bacteria: *Nitrosomonas Communis* Sp. Nov., *Nitrosomonas Ureae* Sp. Nov., *Nitrosomonas Aestuarii* Sp. Nov., *Nitrosomonas Marina* Sp. Nov., *Nitrosomonas Nitrosa* Sp. Nov., *Nitrosomonas Eutropha* Sp. Nov., *Nitrosomonas Oligotropha* Sp. Nov. and *Nitrosomonas Halophila* Sp. Nov." *Microbiology* 137 (7): 1689–99. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-7-1689>.
- Koops, Hans-Peter, and Andreas Pommerening-Röser. 2001. "Distribution and Ecophysiology of the Nitrifying Bacteria Emphasizing Cultured Species." *FEMS Microbiology Ecology* 37 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00847.x>.
- Kozłowski, Jessica A., K. Dimitri Kits, and Lisa Y. Stein. 2016. "Genome Sequence of *Nitrosomonas Communis* Strain Nm2, a Mesophilic Ammonia-Oxidizing Bacterium Isolated from Mediterranean Soil." *Genome Announcements* 4 (1): e01541-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01541-15>.
- Kuenen, J. Gijss. 2008. "Anammox Bacteria: From Discovery to Application." *Nature Reviews Microbiology* 6 (4): 320–26. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1857>.
- Lehtovirta-Morley, Laura E., Jenna Ross, Linda Hink, Eva B. Weber, Cécile Gubry-Rangin, Cécile Thion, James I. Prosser, and Graeme W. Nicol. 2016. "Isolation

- of ‘*Candidatus Nitrosocosmicus Franklandus*’, a Novel Ureolytic Soil Archaeal Ammonia Oxidiser with Tolerance to High Ammonia Concentration.” Edited by Riks Laanbroek. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (5): fiw057. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw057>.
- Lewis, Kathleen A., John Tzilivakis, Douglas J. Warner, and Andrew Green. 2016. “An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management.” *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 22 (4): 1050–64. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- Lichtenthaler, Hartmut K. 1990. “Mode of Action of Herbicides Affecting Acetyl-CoA Carboxylase and Fatty Acid Biosynthesis.” *Zeitschrift Für Naturforschung C* 45 (5): 521–28. <https://doi.org/10.1515/znc-1990-0538>.
- Liu, Haiyang, Jia Li, Yan Zhao, Kexin Xie, Xianjin Tang, Shaoxian Wang, Zhongpei Li, et al. 2018. “Ammonia Oxidizers and Nitrite-Oxidizing Bacteria Respond Differently to Long-Term Manure Application in Four Paddy Soils of South of China.” *Science of The Total Environment* 633 (August): 641–48. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.108>.
- Martens, D. A., and W. T. Frankenberger. 1992. “Decomposition of Bacterial Polymers in Soil and Their Influence on Soil Structure.” *Biology and Fertility of Soils* 13 (2): 65–73. <https://doi.org/10.1007/BF00337337>.
- Mustapha, Mohammed, Normala Halimoon, Wan lufi Wan Johari, and Mohammed Abd Shakur. 2018. “Soil Microorganisms and Their Potential in Pesticide Biodegradation; A Review Article.” *Journal of Sustainable Agricultural Sciences* 0 (0): 0–0. <https://doi.org/10.21608/jsas.2018.3465.1061>.
- Nicol, Graeme W., Linda Hink, Cécile Gubry-Rangin, James I. Prosser, and Laura E. Lehtovirta-Morley. 2019. “Genome Sequence of ‘*Candidatus Nitrosocosmicus Franklandus*’ C13, a Terrestrial Ammonia-Oxidizing Archaeon.” Edited by Irene L. G. Newton. *Microbiology Resource Announcements* 8 (40): e00435-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00435-19>.
- Philippot, Laurent, and J. C. Germon. 2005. “Contribution of Bacteria to Initial Input and Cycling of Nitrogen in Soils.” *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*, 159–76. [https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7\\_8](https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_8).
- “PPDB(Pyraclostrobin).” 2022. 2022. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/564.htm>.
- PubChem. 2022a. “3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23017>.
- \_\_\_\_\_. 2022b. “3,5-Dichloroaniline.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12281>.
- \_\_\_\_\_. 2022c. “(Aminomethyl)Phosphonic Acid.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14017>.
- \_\_\_\_\_. 2022d. “Chlorpyrifos.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730>.
- \_\_\_\_\_. 2022e. “Clethodim.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135491728>.
- \_\_\_\_\_. 2022f. “Etridiazole.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17432>.
- \_\_\_\_\_. 2022g. “Glyphosate.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496>.
- \_\_\_\_\_. 2022h. “Hymexazol.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24781>.
- \_\_\_\_\_. 2022i. “Metsulfuron-Methyl.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52999>.
- \_\_\_\_\_. 2022j. “Pyraclostrobin.” 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6422843>.

- Radzuhn, Brigitte, and Horst Lyr. 1984. "On the Mode of Action of the Fungicide Etridiazole." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22 (1): 14–23. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90004-X).
- Reddy, Krishna N., and Stephen O. Duke. 2015. "Soybean Mineral Composition and Glyphosate Use." In *Processing and Impact on Active Components in Food*, 369–76. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00044-5>.
- Regulation. 2009. *Regulation (EC) No 1107/2009*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1107/2021-03-27>.
- Richardson, Alan E., and Richard J. Simpson. 2011. "Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus." *Plant Physiology* 156 (3): 989–96. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>.
- Ritz, Karl, Helaina I.J. Black, Colin D. Campbell, Jim A. Harris, and Claire Wood. 2009. "Selecting Biological Indicators for Monitoring Soils: A Framework for Balancing Scientific and Technical Opinion to Assist Policy Development." *Ecological Indicators* 9 (6): 1212–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.02.009>.
- Shen, Tianlin, Michaela Stieglmeier, Jiulan Dai, Tim Urich, and Christa Schleper. 2013. "Responses of the Terrestrial Ammonia-Oxidizing Archaeon *Ca. Nitrososphaera Viennensis* and the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrososphaera Multiformis* to Nitrification Inhibitors." *FEMS Microbiology Letters* 344 (2): 121–29. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12164>.
- Sikorski, James A., and Kenneth J. Gruys. 1997. "Understanding Glyphosate's Molecular Mode of Action with EPSP Synthase: Evidence Favoring an Allosteric Inhibitor Model." *Accounts of Chemical Research* 30 (1): 2–8. <https://doi.org/10.1021/ar950122>.
- Singh, Krishna M. 2012. "Dangers of Pesticide Misuse: Challenges and Strategies." *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.1989829>.
- Sinha, Banashri, and Ajit P. Annachhatre. 2007. "Partial Nitrification—Operational Parameters and Microorganisms Involved." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 6 (4): 285–313. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9116-x>.
- Soliman, Moomen, and Ahmed Eldyasti. 2018. "Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): Opportunities and Applications—a Review." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 17 (2): 285–321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>.
- Sorokin, Dimitry Y, Sebastian Lüscher, Dana Vejmelkova, Nadezhda A Kostrikina, Robbert Kleerebezem, W Irene C Rijpstra, Jaap S Sinninghe Damsté, et al. 2012. "Nitrification Expanded: Discovery, Physiology and Genomics of a Nitrite-Oxidizing Bacterium from the Phylum Chloroflexi." *The ISME Journal* 6 (12): 2245–56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>.
- Stahl, David A., and José R. de la Torre. 2012. "Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea." *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 83–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>.
- Stein, Lisa Y., and Martin G. Klotz. 2016. "The Nitrogen Cycle." *Current Biology* 26 (3): R94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>.
- Stratton, Margie Lynn, George L. Good, and Allen V. Barker. 2002. "EFFECTS OF SELECTED SOIL FUNGICIDES ON NITRIFICATION AND GROWTH OF PRIVET IN A PINE BARK MEDIUM." *Journal of Plant Nutrition* 25 (1): 159–68. <https://doi.org/10.1081/PLN-100108787>.
- Strous, Marc, and Mike S.M. Jetten. 2004. "Anaerobic Oxidation of Methane and Ammonium." *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123605>.
- Tan, Huanbo, Mingkai Xu, Xinyu Li, Huiwen Zhang, and Chenggang Zhang. 2013. "Effects of Chlorimuron-Ethyl Application with or without Urea Fertilization on Soil Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea." *Journal of Hazardous*

- Materials* 260 (September): 368–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.043>.
- Tate, K. R. 1984. "The Biological Transformation of P in Soil." In *Biological Processes and Soil Fertility*, edited by J. Tinsley and J. F. Darbyshire, 245–56. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-6101-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-94-009-6101-2_22).
- Taylor, Anne E., Lydia H. Zeglin, Sandra Dooley, David D. Myrold, and Peter J. Bottomley. 2010. "Evidence for Different Contributions of Archaea and Bacteria to the Ammonia-Oxidizing Potential of Diverse Oregon Soils." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (23): 7691–98.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01324-10>.
- Testai, Emanuela, Franca M. Buratti, and Emma Di Consiglio. 2010. "Chlorpyrifos." In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 1505–26. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00070-7>.
- Thiour-Mauprivez, Clémence, Fabrice Martin-Laurent, Christophe Calvayrac, and Lise Barthelmebs. 2019. "Effects of Herbicide on Non-Target Microorganisms: Towards a New Class of Biomarkers?" *Science of The Total Environment* 684 (September): 314–25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.230>.
- Tiryaki, Osman, and Cemile Temur. 2010. "The Fate of Pesticide in the Environment," 10.
- Tokuyama, Tatsuaki, Atsusi Mine, Kaoru Kamiyama, Ryuichi Yabe, Kazuo Satoh, Hirotohi Matsumoto, Reiji Takahashi, and Koji Itonaga. 2004. "Nitrosomonas Communis Strain YNSRA, an Ammonia-Oxidizing Bacterium, Isolated from the Reed Rhizoplane in an Aquaponics Plant." *J. BIOSCI. BIOENG.*, 4.
- Vasileiadis, S., E. Puglisi, E. S. Papadopoulou, G. Pertile, N. Suciu, R. A. Pappolla, M. Tourna, et al. 2018. "Blame It on the Metabolite: 3,5-Dichloroaniline Rather than the Parent Compound Is Responsible for the Decreasing Diversity and Function of Soil Microorganisms." Edited by Rebecca E. Parales. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (22): e01536-18.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18>.
- Ward, B.B. 2013. "Nitrification." In *Encyclopedia of Ecology*, 351–58. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>.
- Wessén, Ella, and Sara Hallin. 2011. "Abundance of Archaeal and Bacterial Ammonia Oxidizers – Possible Bioindicator for Soil Monitoring." *Ecological Indicators* 11 (6): 1696–98. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.018>.
- Wiesmann, U. 1994. "Biological Nitrogen Removal from Wastewater." In *Biotechnics/Wastewater*, 51:113–54. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.  
<https://doi.org/10.1007/BFb0008736>.
- Yang, Chao, Chantal Hamel, Vladimir Vujanovic, and Yantai Gan. 2011. "Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms." *ISRN Ecology* 2011 (October): 1–8. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>.
- Ypema, Hendrik. 2003. "Fungicides, Hymexazol," April.  
<https://doi.org/10.1002/047126363X.agr110>.