



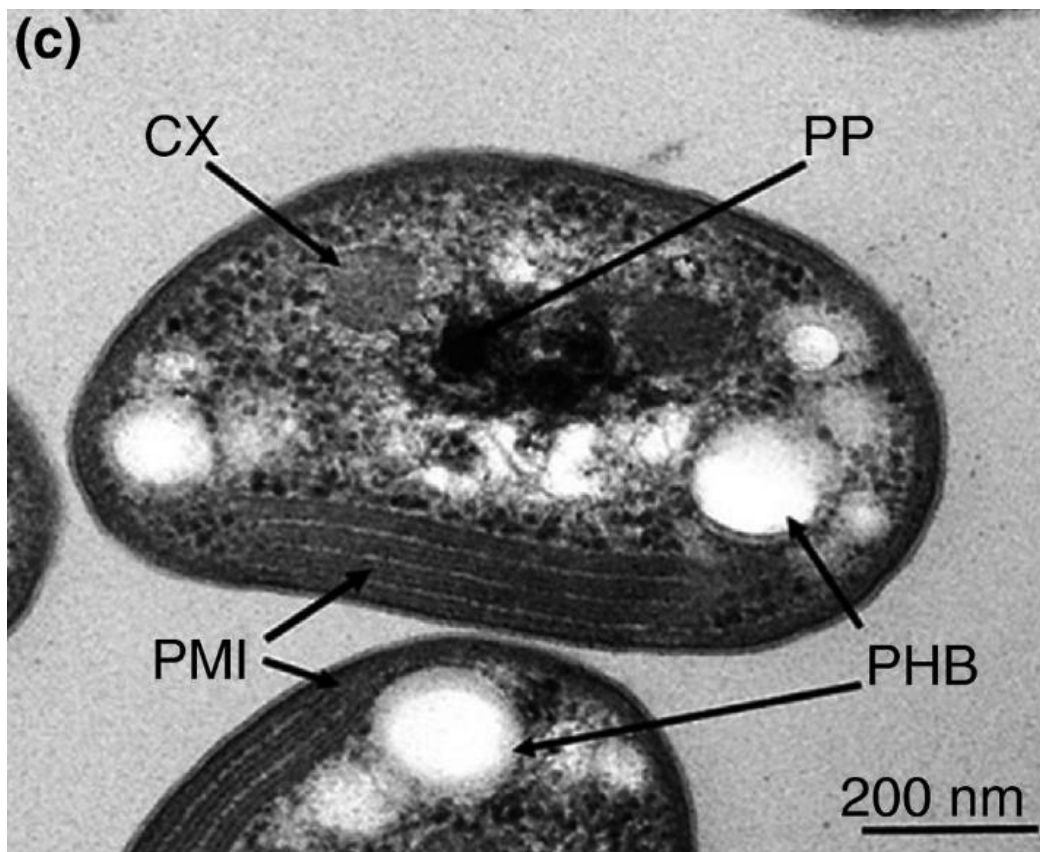
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η Επίδραση Γεωργικών Φαρμάκων στο Νιτρικοποιητικό
Βακτήριο *Nitrobacter winogradskyi* σε Συστήματα *in vitro*



Καραγιώργος Κωνσταντίνος του Γεωργίου

ΛΑΡΙΣΑ 2022

«Η Επίδραση Γεωργικών Φαρμάκων στο
Νιτρικοποιητικό Βακτήριο *Nitrobacter winogradskyi* σε
Συστήματα *in vitro*»

“The Effect of Pesticides on *Nitrobacter winogradskyi* in
in vitro Systems”

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Καρπούζας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής) Καθηγητής
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Ευαγγελία

Επίκουρος Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας,
Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-
Γονιδιοματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Τα γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι.....	7
1.2 Αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία	7
1.3 Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους	8
1.4 Συμμετοχή των μικροοργανισμών του εδάφους στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου.....	9
1.4.1 Κύκλος του αζώτου	9
1.4.2 Μηχανισμός νιτροποίησης και μικροοργανισμοί που συμμετέχουν	12
1.4.3 Νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί ως μικροβιακοί δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων.....	13
1.5 Νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	14
1.5.1 <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	14
1.6 Γεωργικά Φάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	14
1.6.1 Μυκητοκτόνα	15
1.6.2 Ζιζανιοκτόνα.....	19
1.6.3 Εντομοκτόνα.....	21
1.7 Στόχοι.....	22
2.Πειραματικό Μέρος	23
2.1 Καλλιέργεια του νιτροποιητικού βακτηρίου <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	23
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	24
2.3 Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία του νιτροποιητικού μικροοργανισμού	26
2.4 Μελέτη της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων σε <i>in vitro</i> συνθήκες	27
2.5 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και υπολογισμός των τιμών EC ₅₀	28
3. Αποτελέσματα	29
3.1. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτροποιητικού βακτηρίου <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	29
3.1.1 Μυκητοκτόνα	30
3.1.2 Ζιζανιοκτόνα.....	32
3.1.3 Εντομοκτόνα.....	34
3.2 Σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων <i>in vitro</i>	35
3.2.1 Μυκητοκτόνα	35
3.2.2 Ζιζανιοκτόνα.....	37

3.2.3 Εντομοκτόνα.....	38
4. Συζήτηση.....	40
5. Συμπεράσματα	42
6. Βιβλιογραφία.....	42

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της συμβατικής γεωργίας για την προστασία των καλλιεργειών, ενώ ταυτόχρονα έχουν χαρακτηριστεί ως περιβαλλοντικοί ρύποι με δυσμενείς επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχου, όπως οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) κατατάσσει αυτούς τους μικροοργανισμούς στους στόχους προστασίας των στρατηγικών εκτίμησης του περιβαλλοντικού κινδύνου που απορρέει από τη χρήση των γεωργικών φαρμάκων. Παρόλα αυτά, αν και υπάρχουν καλά εδραιωμένες δοκιμές τοξικότητας για χερσαίους και υδρόβιους μακροοργανισμούς, η εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους βασίζεται ακόμη σε ξεπερασμένες δοκιμές (π.χ. δοκιμή ανοργανοποίησης N). Η παρούσα μελέτη εντάσσεται σε μια ευρύτερη ερευνητική προσπάθεια ταυτοποίησης μικροβιακών δεικτών και αξιοποίησής τους στην ανάπτυξη και τυποποίηση χρήσιμων *in vitro* οικοτοξικολογικών δοκιμών, για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε *in vitro* η τοξικότητα 10 επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων με διαφορετικό στόχο δράσης (μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα εντομοκτόνα) και/ή των μεταβολιτών τους, έναντι ενός στελέχους του νιτρικοποιητικού βακτηρίου *Nitrobacter winogradskyi*. Πιο συγκεκριμένα, η τοξικότητα προσδιορίστηκε σε λειτουργικό επίπεδο μέσω της παρακολούθησης της κατανάλωσης των νιτρικών σε υγρές καλλιέργειες του υπό μελέτη μικροοργανισμού, παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων (Επίπεδα 1, 2, 3 και 4), προκειμένου να υπολογιστούν οι τιμές EC₅₀ των γεωργικών φαρμάκων, ως σχετικό τελικό σημείο τοξικότητας. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων κατά την διάρκεια των *in vitro* δοκιμών, προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερότητα τους στις υγρές καλλιέργειες του νιτρικοποιητικού στελέχους. Μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων παρατηρήθηκαν διαφορετικά προφίλ τοξικότητας έναντι του NOB στελέχους. Από τα γεωργικά φάρμακα που εξετάστηκαν, μόνο το μυκητοκτόνο etridiazole και ο μεταβολίτης του iprodione, 3,5-DCA, καθώς και το ζιζανιοκτόνο glyphosate και ο μεταβολίτης του, AMPA, παρουσίασαν τοξικότητα έναντι του *N. winogradskyi*. Το προφίλ τοξικότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων για το *N. winogradskyi* όπως προέκυψε από την παρούσα εργασία, δίνει το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση της οικοτοξικολογικής απόκρισης των νιτρικοποιητικών βακτηρίων, ως πιθανών μικροβιακών δεικτών της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων, κατά την ανάπτυξη τυποποιημένων *in vitro* οικοτοξικολογικών δοκιμών.

Abstract

Pesticides are an integral part of conventional agriculture for crop protection, while at the same time they are classified as environmental pollutants with adverse effects on non-target organisms such as soil microorganisms. The European Food Safety Authority (EFSA) has identified these microorganisms as a protection goal for the environmental risk assessment of pesticides. However, although there are well established toxicity tests for both terrestrial and aquatic macro-organisms, the assessment of the toxicity of agrochemicals to soil microorganisms is still based on outdated tests (e.g., N mineralization test). 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 *in vitro* toxicity of 10 selected pesticides with different target of action (fungicides, herbicides and insecticides), and/or their metabolites, on a terrestrial isolate of the nitrite-oxidizing bacterium (NOB) *Nitrobacter winogradskyi* was studied. Toxicity was determined at the functional level via monitoring nitrite consumption in the liquid cultures of the NOB isolate amended with a broad range of pesticides concentrations in order to calculate EC₅₀ 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 NOB isolate. Among the different categories of the tested pesticides different toxicity profiles were observed against the NOB isolate. Etridiazole, 3,5-DCA, glyphosate and its metabolite AMPA, showed significant toxicity against *N. winogradskyi*. The observed toxicity profile for *N. winogradskyi*, paves the way for further exploring the ecotoxicological response of NOB as microbial indicators of pesticides toxicity towards the development of standardized *in vitro* ecotoxicological assays.

1.Εισαγωγή

1.1 Τα γεωργικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι

Η αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών, αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών του εκθετικά αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού. Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, τα γεωργικά φάρμακα εξελίχθηκαν σε αναπόσπαστο κομμάτι των σύγχρονων καλλιεργητικών πρακτικών και συνέβαλαν ουσιαστικά στην βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών (Giri et al., 2022). Παρόλα αυτά, η μακροχρόνια και αλόγιστη χρήση τους εγείρει σημαντικές ανησυχίες, καθώς έχουν συσχετιστεί με φαινόμενα τοξικότητας σε οργανισμούς μη στόχους (π.χ. ψάρια, ωφέλιμα έντομα και μικροοργανισμοί του εδάφους), αλλά και με τη ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων, με άμεσες επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία (Aktar et al., 2009).

Ως γεωργικό φάρμακο μπορεί να οριστεί κάθε χημική ουσία ή μίγμα ουσιών που σκοπό έχει να απωθήσει, να περιορίσει ή να καταστρέψει κάποιον ανεπιθύμητο οργανισμό (US EPA, 2022d). Καθώς τα γεωργικά φάρμακα περιλαμβάνουν μια σειρά χημικών ενώσεων που παρουσιάζουν πολύ διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες μεταξύ τους, προκαλούν ποικίλες επιπτώσεις στα οικοσυστήματα, οι οποίες μερικές φορές είναι και αλληλένδετες (Hassaan et al., 2020). Επιπλέον, διαφέρει και η κινητικότητα αυτών των ενώσεων στο έδαφος, στον υδροφόρο ορίζοντα, στον αέρα και στις τροφικές αλυσίδες (Arias-Estévez, 2008). Πλέον, τα γεωργικά φάρμακα συγκαταλέγονται στους αναδυόμενους ρύπους, οι οποίοι σχετίζονται με πολλές αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον (Geissen . et al., 2015). Για παράδειγμα, η χρήση αυτών των χημικών είναι γνωστό πως δύναται να επιδρά αρνητικά σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς μη-στόχους του εδάφους και των υδάτινων οικοσυστημάτων. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων οδηγεί σε αλλοίωση της ποιότητας του εδάφους, επιδρώντας στην ικανότητα κατακράτησης νερού, τη δομή του εδάφους, και τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Ακόμη, φαινόμενα (βιο-)συσσώρευσης τέτοιων φαρμάκων σε φυτά και ζώα συνεπάγονται αυξημένη αστάθεια κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας, μείωση της βιοποικιλότητας και τελικά ανισορροπία σε επίπεδο οικοσυστήματος (Abubakar et al., 2020).

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

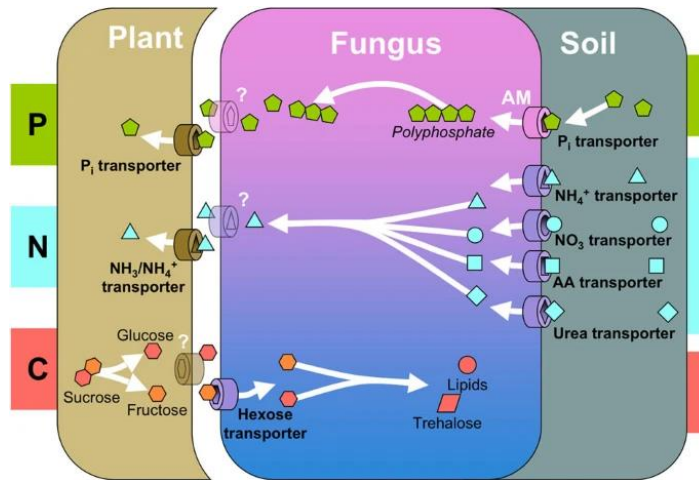
Η διάθεση γεωργικών φαρμάκων στην αγορά ρυθμίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση με τον κανονισμό 1107/2009. Στο άρθρο 29 «Απαιτήσεις για την άδεια διάθεσης στην αγορά» παράγραφος 6 αναφέρεται ότι, *οι ενιαίες αρχές για την αξιολόγηση και την αδειοδότηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων περιέχουν τις απαιτήσεις του Παραρτήματος VI της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ. Συνεπώς, μόνο αν πληρούνται οι απαιτήσεις του Παραρτήματος VI της οδηγία 91/414/ΕΟΚ μπορεί να χορηγηθεί άδεια σε ένα γεωργικό φάρμακο. Σήμερα, το εν λόγω παράρτημα ισχύει, πρακτικά अपαράλλακτο, υπό τον κανονισμό με αριθμό 546/2011 (καθώς η οδηγία 91/414/ΕΟΚ*

καταργήθηκε) και αξιολογεί τα γεωργικά φάρμακα σύμφωνα με ορισμένες αρχές και πιο συγκεκριμένα, την αποτελεσματικότητα, την απουσία ανεπιθύμητων επιδράσεων στα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα, την ελεγχόμενη επίδραση σε σπονδυλωτά-στόχους, την επίδραση στην υγεία ανθρώπων και ζώων, την επίδραση στο περιβάλλον, τις διαθέσιμες αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού και τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Αναφορικά με την επίδραση στο περιβάλλον, εξετάζεται η τύχη και η κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στο περιβάλλον καθώς και η επίδρασή του σε οργανισμούς-μη στόχους (EU law).

1.3 Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους

Το έδαφος αποτελεί το εξώτατο τμήμα της λιθόσφαιρας (Osman, 2012) και φιλοξενεί τεράστια μικροβιακή ποικιλότητα, η οποία σχετίζεται με αυξημένη σταθερότητα και παραγωγικότητα σε επίπεδο οικοσυστήματος (Maron et al., 2018). Αυτή η μεγάλη ποικιλότητα συνεπάγεται και πληθώρα υπηρεσιών-λειτουργιών από τους μικροοργανισμούς (Guimarães et al., 2010). Μερικοί γνωστοί ρόλοι των μικροοργανισμών του εδάφους είναι α) η αποδόμηση της νεκρής οργανικής ύλης, β) η αύξηση της διαθεσιμότητας θρεπτικών για τα φυτά (π.χ. αζωτοδέσμευση), γ) η σταθεροποίηση της δομής του εδάφους, δ) η απομάκρυνση ατμοσφαιρικών και άλλων ανθρωπογενών ρύπων και ε) ως πηγή λειτουργικής βιοποικιλότητας στην διάθεση της βιοτεχνολογίας (Karpouzas, 2021; Mustapha et al., 2018; Verstraete et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, η αποδόμηση της οργανικής ύλης από τους μικροοργανισμούς επιτρέπει την ανακύκλωση-απελευθέρωση των θρεπτικών στο έδαφος, αλλά και την βιοεξυγίανση (biohygienization) του εδάφους από ιούς, βακτήρια και άλλα παθογόνα των φυτών και των ζώων, αποτρέποντας έτσι την έξαρση πανδημιών (Guimarães et al., 2010). Επιπλέον, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους μπορούν να αυξήσουν την παροχή θρεπτικών μέσω της βιολογικής αζωτοδέσμευσης, κατά την οποία το αέριο άζωτο (N_2) της ατμόσφαιρας μετατρέπεται σε διαλυτές αζωτούχες ενώσεις, οι οποίες είναι διαθέσιμες στα φυτά (Verstraete et al., 2004). Επίσης, μερικοί μύκητες και βακτήρια του εδάφους έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν ανόργανο φώσφορο, κάλιο και σίδηρο εκκρίνοντας H^+ , CO_2 , οργανικά οξέα και σιδηροφορείς (Rashid et al., 2016), αυξάνοντας έτσι την διαθεσιμότητα αυτών των θρεπτικών για τα φυτά. Ακόμη, μια συγκεκριμένη ομάδα μυκήτων, που ονομάζονται μυκορριζικοί μύκητες και αποτελούν το 10% των ταυτοποιημένων ειδών μυκήτων, (Lewis, 2016), έχουν την ικανότητα να συνάπτουν συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες των περισσότερων φυτών της γης. Καθώς το μυκήλιο αυτών των μυκήτων επεκτείνεται από την ρίζα προς το έδαφος, συλλέγει θρεπτικά όπως άζωτο και φώσφορο, στην ανόργανη αλλά και οργανική μορφή τους (π.χ. αμινοξέα και ουρία), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην

αύξηση της διαθεσιμότητας τους για το φυτό, με αντάλλαγμα την παροχή υδατανθράκων από μεριάς του φυτού (Εικόνα 1) (Heijden et al., 2015).



Εικόνα 1. Οι βασικές ανταλλαγές θρεπτικών στην συμβίωση των εκτομυκορριζικών μυκήτων και των δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων με τα φυτά (Bonfante et al., 2010).

Τέλος, οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν να επιδράσουν στη δομική μονάδα του εδάφους, τα συσσωματώματα (aggregates). Ένα συσσωμάτωμα (Εικόνα 2) αποτελείται από άμμο, ιλύ, πηλό, οργανική ύλη, ριζικά τριχίδια, μικροοργανισμούς και τις εκκρίσεις τους, αλλά και από τους πόρους που προκύπτουν (Fortuna, 2012). Οι μικροοργανισμοί παράγουν κυρίως εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι μαζί με κυτταρικά υπολείμματα (cellular debris) δρουν ως παράγοντες συγκόλλησης, σταθεροποιώντας με αυτό τον τρόπο τα συσσωματώματα του εδάφους. Έτσι οι μικροοργανισμοί του εδάφους επηρεάζουν τα διάφορα χαρακτηριστικά του, όπως η ικανότητα κατακράτησης νερού, ο ρυθμός διήθησης, η διαβρωτικότητα, ο σχηματισμός φλοιού (crusting) και η ευκολία συμπίεσης (Verstraete et al., 2004).



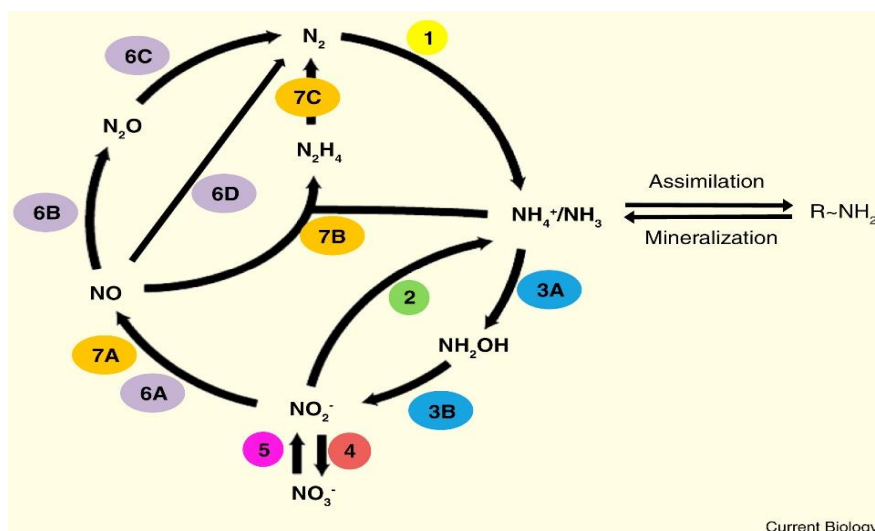
Εικόνα 2. Τυπική δομή ενός συσσωματώματος του εδάφους (Fortuna, 2012).

1.4 Συμμετοχή των μικροοργανισμών του εδάφους στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου

1.4.1 Κύκλος του αζώτου

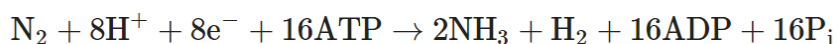
Το άζωτο είναι απαραίτητο χημικό στοιχείο για τα βιολογικά συστήματα και αποτελεί το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο της κυτταρικής βιομάζας. Εξαιτίας της παρουσίας του στα βιολογικά μακρομόρια, η πρόσληψη και η ανακύκλωσή του επιδρούν καθοριστικά στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων, καθώς και στην παραγωγικότητα σε επίπεδο οικοσυστήματος (Stein and Klotz, 2016; Ward and Jensen, 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτό το θρεπτικό στοιχείο απαντάται σε πολλές καταστάσεις οξείδωσης και μορφές, μερικές από τις οποίες είναι πιο βιοδιαθέσιμες για τους οργανισμούς από άλλες (Kuypers et al., 2018). Για παράδειγμα, το αδρανές στοιχειακό άζωτο (N_2) της ατμόσφαιρας είναι βιοδιαθέσιμο αποκλειστικά για μια ιδιαίτερα ποικιλόμορφη και σπάνια ομάδα μικροοργανισμών, τους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς (βακτήρια και αρχαία), ενώ όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί απαιτούν πιο δραστικές μορφές αζώτου για την επιβίωσή τους, όπως νιτρικά και αμμωνιακά. Συνεπώς, το άζωτο συγκαταλέγεται στους κύριους περιοριστικούς παράγοντες της ανάπτυξης των οργανισμών. Η μεγαλύτερη δεξαμενή αζώτου στη φύση είναι η δεσμευμένη σε ιζήματα και πετρώματα αμμωνία (1.8×10^{10} Tg N), η οποία όμως έχει μικρή συνεισφορά στην τροφοδοσία του κύκλου του αζώτου. Ακολουθεί το στοιχειακό άζωτο της ατμόσφαιρας (3.9×10^9 Tg N), το οργανικό άζωτο, τα νιτρικά και το υποξείδιο του αζώτου (Kuypers et al., 2018).

Ο κύκλος του αζώτου αναφέρεται στις μετατροπές που υφίσταται το άζωτο στο περιβάλλον, κυρίως εξαιτίας βιοτικών παραγόντων. Παραδοσιακά χωρίζονταν σε τρεις διεργασίες, την αζωτοδέσμευση, τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση. Ωστόσο, σήμερα χάρις την ύπαρξη εξελιγμένου εξοπλισμού και μεγάλου πλούτου δεδομένων, η αντίληψη μας για τον κύκλο του αζώτου έχει αλλάξει. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναγνωριστεί πέντε διαδικασίες μετατροπής του αζώτου στη φύση (Εικόνα 3: α) η



Εικόνα 3. Οι κύριες διεργασίες του κύκλου του αζώτου (Stein and Klotz, 2016).

αμμωνιοποίηση, β) η νιτροποίηση, γ) η απόνιτροποίηση δ) η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anammox) και ε) η αλληλομετατροπή νιτρώδων-νιτρικών (Stein and Klotz, 2016).



Εικόνα 4. Η στοιχειομετρία της βιολογικής αζωτοδέσμευσης (Einsle and Rees, 2020)

Η αμμωνιοποίηση (Εικόνα 3, διεργασίες 1 και 2) περιλαμβάνει τη βιολογική αζωτοδέσμευση, την αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών σε αμμωνία (ANRA), τη μη αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών σε αμμωνία (DNRA) και την ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου. Ειδικότερα, η βιολογική αζωτοδέσμευση (Εικόνα 3, διεργασία 1) αναφέρεται στη βιολογική διεργασία της αναγωγής του στοιχειακού αζώτου (N_2) σε αμμώνιο (NH_4^+) και λαμβάνει χώρα σε βακτήρια και αρχαία, που κωδικοποιούν τον μοναδικό γνωστό βιολογικό καταλύτη (Sippel and Einsle, 2017) αυτής της διεργασίας, το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης. Αυτό το σύμπλοκο συγκροτείται από 2 μεταλλοπρωτεΐνες, την σιδηροπρωτεΐνη (Fe), στην οποία υδρολύεται το ATP και λαμβάνονται ηλεκτρόνια χαμηλού δυναμικού από έναν ηλεκτρονιοδότη (π.χ. φερρεδοξίνη ή φλαβοδοξίνη) (Einsle and Rees, 2020), και την μολυβδαινοσιδηροπρωτεΐνη (ή τις ομόλογες σιδηροπρωτεΐνες βαναδίου-σιδήρου (VFe) και αποκλειστικά σιδήρου (Fe-Fe)), όπου λαμβάνει χώρα η αναγωγή του N_2 (Sippel and Einsle, 2017).

Η αμμωνιοποίηση περιλαμβάνει, όπως προαναφέρθηκε, τις αναερόβιες διεργασίες της αφομοιωτικής (δηλ. ενσωμάτωση στη βιομάζα) και της μη αφομοιωτικής αναγωγής νιτρώδων (NO_2^-) σε αμμωνία (NH_4^+) (Εικόνα 3, διεργασία 2), που πραγματοποιούνται από μύκητες και βακτήρια. Είναι αξιοσημείωτο ότι, παρόλο που οι δύο αυτές διεργασίες είναι πανομοιότυπες από χημικής άποψης, διαμεσολαβούνται από εξελικτικά απομακρυσμένες αναγωγάσες των νιτρώδων. Επιπλέον, η ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου είναι μια ακόμη διεργασία που οδηγεί στην απελευθέρωση αμμωνίας και πραγματοποιείται κυρίως από τους αποδομητές, που περιλαμβάνουν κατά βάση μύκητες και βακτήρια (Volk, 2013), αλλά και άλλους μικροοργανισμούς από τον κύκλο του αζώτου. Για παράδειγμα, βακτήρια του γένους *Nitrosospira* βρέθηκαν να αποδομούν αζωτούχες οργανικές ενώσεις, όπως η ουρία, προς παραγωγή αμμωνίας (Kuypers et al., 2018).

Η νιτροποίηση (Εικόνα 3, διεργασίες 3 και 4) είναι μια αερόβια διεργασία αποτελούμενη από 2 βήματα, την αρχική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (νιτρώδωση; Εικόνα 3, διεργασία 3) και την μετέπειτα οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά (νιτρικοποίηση; Εικόνα 3, διεργασία 4) (van Kessel et al., 2015). Λαμβάνει χώρα με την δράση τριών μικροβιακών ομάδων, τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν α) τα αμμωνιακά σε νιτρώδη (NO_2^-), β) τα νιτρώδη σε νιτρικά (NO_3^-) και γ) τα αμμωνιακά προς νιτρικά (NO_3^-).

Η απονιτροποίηση (Εικόνα 3, διεργασία 6) περιλαμβάνει την αναγωγή, υπό αναερόβιες συνθήκες, των νιτρώδων (NO_2^-), του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και του υποξειδίου του αζώτου (N_2O) με τελικό προϊόν το N_2 . Οι συμμετέχοντες μικροοργανισμοί μπορούν να επιτελούν μία από τις τρεις εκδοχές της, i) την κανονική απονιτροποίηση, ii) τη μερική απονιτροποίηση και iii) την εξαρτώμενη από την

οξειδωση του μεθανίου απονιτροποίηση. Πιο συγκεκριμένα, οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί που μπορούν, επιπλέον, να καταλύσουν την αντίδραση αναγωγής των νιτρικών (NO_3^-) προς νιτρώδη (NO_2^-) (διεργασία 5) και έτσι να πραγματοποιήσουν απονιτροποίηση από νιτρικά (NO_3^-) σε N_2 , αναφέρονται ως κλασσικοί ή κανονικοί απονιτροποιητές. Από την άλλη, υπάρχουν βακτήρια και αρχαία που μπορούν να καταλύσουν μόνο ορισμένα βήματα της απονιτροποίησης (μερική απονιτροποίηση), καθώς τους υπολείπονται τα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα των αντιδράσεων 5, 6B και/ή 6C. Τέλος, ένας ασυνήθιστος τρόπος απονιτροποίησης έχει παρατηρηθεί να πραγματοποιείται από το μεθανότροφο βακτήριο, *Candidatus Methylophilum* *oxyfera*, το οποίο διαβίει υπό αναερόβιες συνθήκες, ωστόσο αποσπά ενέργεια από την οξειδωση μεθανίου χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό παράγοντα το οξυγόνο. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της έκφρασης του ενζύμου, δισμουτάση του μονοξειδίου του αζώτου, το οποίο χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα δυο μόρια NO και παράγει ένα μόριο N_2 και ένα μόριο στοιχειακού οξυγόνου (O_2), το οποίο χρησιμοποιείται κατά το μεταβολισμό για την οξειδωση του μεθανίου προς μεθανόλη (Stein and Klotz, 2016).

Κατά την **αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας** (anammox - anaerobic ammonium oxidation, Εικόνα 3, διεργασία 7) χρησιμοποιούνται αμμώνιο (NH_4^+) και νιτρώδη (NO_2^-) προς σχηματισμό N_2 με ενδιάμεσα προϊόντα, μονοξείδιο του αζώτου (NO) και υδραζίνη (N_2H_4). Η διεργασία αυτή διεξάγεται μόνο από ορισμένα βακτήρια της συνομοταξίας των Planctomycetales, τα οποία διαθέτουν εξειδικευμένα οργανίδια, τα anammoxosomes. Αξίζει να σημειωθεί ότι η anammox είναι η βασική διεργασία απομάκρυνσης του αζώτου από ωκεανούς και ζώνες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξικές) (Stein and Klotz, 2016).

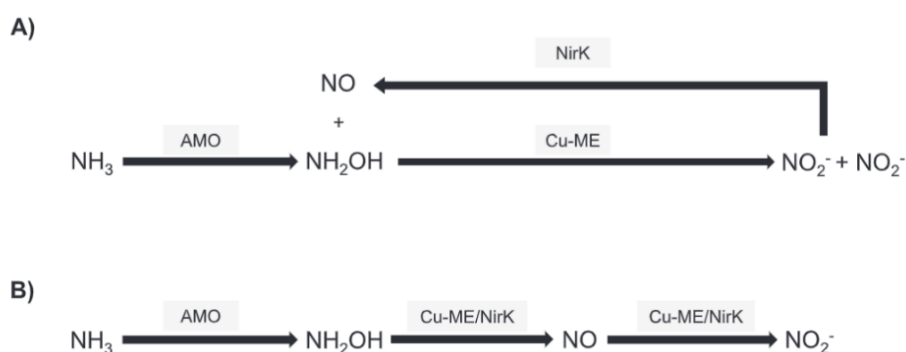
1.4.2 Μηχανισμός νιτροποίησης και μικροοργανισμοί που συμμετέχουν

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η νιτροποίηση είναι αερόβια διεργασία αποτελούμενη από δύο στάδια, τη νιτρωδοποίηση και τη νιτρικοποίηση. Συντελείται από τους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν αμμωνιακά προς νιτρώδη, αυτούς που οξειδώνουν νιτρώδη προς νιτρικά και εκείνους που μπορούν να πραγματοποιήσουν και τα δύο οξειδωτικά στάδια της μετατροπής των αμμωνιακών προς νιτρικά (comammox, COMplete AMMonia OXidation) (Stein and Klotz, 2016). Το ρυθμοκαθοριστικό βήμα της νιτροποίησης θεωρείται πως είναι η οξειδωση των αμμωνιακών προς NO_2^- (νιτρωδοποίηση) (Maliszewska-Kordybach et al., 2007).

Αναφορικά με τη νιτρωδοποίηση, αυτή συντελείται από βακτήρια comammox, του γένους *Nitrospira*, ορισμένα βακτήρια γνωστά ως νιτρωδοποιητικά βακτήρια (ammonia-oxidizing bacteria, AOB), που ανήκουν στα β- και στα γ-Πρωτεοβακτήρια, και ορισμένα αρχαία του φύλου Thaumarchaeota γνωστά ως νιτρωδοποιητικά αρχαία (ammonia-oxidizing archaea, AOA), με τα τελευταία να απαντώνται συνήθως σε μεγαλύτερη αφθονία στο περιβάλλον (Papadopoulou et al., 2016; Daims et al., 2015; Ward, 2014). Η πρώτη αντίδραση της νιτρωδοποίησης είναι η μετατροπή της αμμωνίας (NH_3) σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) και λαμβάνει χώρα σε AOB, AOA και comammox με την βοήθεια του ενζύμου, μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Όλα τα AOB και τα comammox έχουν ως επόμενο βήμα, την οξειδωση της υδροξυλαμίνης (NH_2OH) προς νιτρώδες (NO_2^-), αντίδραση που ελέγχεται από το μεταλλοένζυμο,

οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO). Από την άλλη, στα AOA, αν και υπάρχει συντήρηση για το πρώτο ένζυμο (AMO), δεν έχουν ταυτοποιηθεί ομόλογα της HAO, με το μονοπάτι οξείδωσης της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη σε αυτούς τους μικροοργανισμούς να παραμένει αδιευκρίνιστο.

Έχει προταθεί ότι, ένα χαλκούχο ενζυμικό σύμπλοκο (Cu-ME) χρησιμοποιεί NO και την παραγόμενη NH₂OH για να σχηματίσει δύο μόρια NO₂⁻, με την αναγωγή των νιτρωδών (NirK) να μετατρέπει ένα μόριο νιτρώδους σε NO (Εικόνα 5A). Μία άλλη υπόθεση υποστηρίζει ότι, ένα μη χαρακτηρισμένο ένζυμο οξειδώνει διαδοχικά την NH₂OH σε NO και το NO σε NO₂⁻ (Εικόνα 5B) (Soler-Jofra et al., 2021). Μια ακόμη ενδιαφέρουσα υπόθεση εξηγεί πως, λόγω δομικών διαφορών της AMO των AOA σε σχέση με αυτή των AOB, αυτό το ένζυμο στα AOA μπορεί στην πραγματικότητα να μην παράγει υδροξυλαμίνη, αλλά νιτροξύλιο (nitroxyl, HNO), δρώντας ουσιαστικά ως διοξυγενάση. Στην συνέχεια, το νιτροξύλιο θα μπορούσε να οξειδώνεται από μια πρωτεΐνη όμοια των πολυχαλκο-οξειδασών, με δράση οξειδοαναγωγής (nitroxyl oxidoreductase), προς νιτρώδες (Walker et al., 2010).



Εικόνα 5. Προτεινόμενα εναλλακτικά μονοπάτια για την μετατροπή της αμμωνίας στα AOA (Soler-Jofra et al., 2021).

Η οξείδωση των νιτρωδών προς νιτρικά (νιτρικοποίηση) καταλύεται από το ένζυμο, οξειδοαναγωγή των νιτρωδών (nitrite oxidoreductase, NXR). Το συγκεκριμένο ένζυμο κωδικοποιείται από αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν νιτρώδη (νιτρικοποιητικά βακτήρια, NOB), τα οποία είναι μέλη των α-, β- και γ-Πρωτεοβακτηρίων, αλλά και από τα anammox και τα comammox βακτήρια (Soler-Jofra et al., 2021; Kuypers et al., 2018).

1.4.3 Νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί ως μικροβιακοί δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν κεντρικό ρόλο στη λειτουργία των οικοσυστημάτων και ως εκ τούτου αρνητικές επιδράσεις σε αυτούς θα μπορούσαν να έχουν άμεσες συνέπειες στην ποιότητα του περιβάλλοντος και την ανθρώπινη υγεία. Με τα γεωργικά φάρμακα να θεωρούνται βασικοί παράγοντες καταπόνησης για τους μικροοργανισμούς του εδάφους, η EFSA έχει πλέον εντάξει αυτούς τους πολύτιμους μικροοργανισμούς στους στόχους προστασίας στα πλαίσια της περιβαλλοντικής εκτίμησης ρίσκου των γεωργικών φαρμάκων (Karas et al., 2018). Ωστόσο, η αξιολόγηση της τοξικότητας αυτών των χημικών στους μικροοργανισμούς του

εδάφους γίνεται ακόμη με ξεπερασμένες δοκιμές, οι οποίες αδυνατούν να προσδιορίσουν τις επιπτώσεις στην ποικιλότητα και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους και συνεπώς τις επιπτώσεις στις υπηρεσίες που παρέχουν στο οικοσύστημα (Martin-Laurent et al., 2012).

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους, όντας σε στενή επαφή με αυτό, αποτελούν ιδανικούς δείκτες της εδαφικής ρύπανσης και αυτό διότι δείχνουν να αποκρίνονται ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρύπων, ενώ αντιδρούν ταχύτατα σε αλλοιώσεις του εδάφους (Maliszewska-Kordybach et al., 2007). Παράμετροι όπως η λειτουργία, η αφθονία και η ποικιλότητα τους εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία σε οργανικούς και ανόργανους ρύπους (Subrahmanyam et al., 2014). Επειδή οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί αποτελούν μια από τις πιο ευαίσθητες στην εδαφική ρύπανση μικροβιακές ομάδες, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, και ιδιαίτερος τα AOA και AOB, για να χρησιμοποιηθούν ως ευαίσθητοι μικροβιακοί δείκτες τοξικότητας (Karas et al., 2018; Vasileiadis et al. 2018; Ollivier et al., 2012; Vasileiadis et al., 2012; Smolders et al., 2001).

1.5 Νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

1.5.1 *Nitrobacter winogradskyi*

Το *Nitrobacter winogradskyi* ανήκει στο γένος *Nitrobacter* της συνομοταξίας των α-Πρωτεοβακτηρίων. Μορφολογικά είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, ραβδόσχημο, διαιρούμενο με εκβλάστηση, με αδυναμία κίνησης. Από μεταβολικής άποψης, είναι υποχρεωτικά αερόβιο, προαιρετικά χημειολιθότροφο (οξειδώνει NO_2^-), μεσόφιλο (25-30 °C) και κοπιοτροφικό (r-strategist) (Han et al., 2018; Zhang et al., 2018; Watson, 1971). Αν και μια μεγάλη ποικιλία βακτηρίων εμπλέκεται στην νιτροποίηση, τα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira* είναι τα πιο άφθονα NOB που απαντώνται σε δείγματα εδάφους, νερού και λυμάτων. Η οικολογική σημασία των NOB έγκειται στην κατανάλωση των NO_2^- προς αποφυγή των ανασταλτικών επιδράσεων που θα είχε η συσσώρευσή τους στα AOB και AOA και συνεπώς στην διαδικασία της νιτροποίησης. Επίσης, μπορούν και ρυθμίζουν την παροχή NO_3^- για την αύξηση των φυτών (Zhang et al., 2018).

1.6 Γεωργικά Φάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση που έχουν στο νιτροποιητικό βακτήριο, *N. winogradskyi*, συνολικά 10 διαφορετικά γεωργικά φάρμακα καθώς και μεταβολίτες γεωργικών φαρμάκων. Αυτά τα φάρμακα και μεταβολίτες, που εκπροσωπούν τις τρεις κύριες ομάδες γεωργικών φαρμάκων (μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα), είναι τα εξής: hymexazol, pyraclostrobin, etridiazole, 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA, μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione που σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος επέδειξε υψηλότερη τοξικότητα συγκριτικά με τη μητρική του ένωση έναντι αντιπροσωπευτικών εδαφογενών στελεχών νιτροδοποιητικών

μικροοργανισμών (Vasileiadis et al., 2018)), glyphosate και (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ (AMPA), clethodim, metsulfuron-methyl, chlorpyrifos και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP).

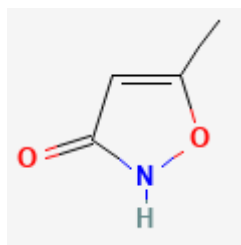
Η συμπερίληψη των μεταβολιτών των γεωργικών φαρμάκων έγινε δεδομένου ότι, οι μεταβολίτες δύναται να είναι πιο τοξικοί για οργανισμούς μη στόχους απ' ότι οι μητρικές ενώσεις από τις οποίες προήλθαν (Vasileiadis et al., 2018; Karas et al., 2018; Papadopoulou et al., 2016).

1.6.1 Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για τη διασφάλιση της παγκόσμιας επισιτιστικής ασφάλειας, καθώς οι μυκητολογικές ασθένειες συνιστούν σημαντική απειλή για την απόδοση των καλλιέργειών (Zubrod et al., 2019). Πρόκειται για παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θανάτωση, την απόθεση ή τη μετρίαση των επιπτώσεων των μυκήτων. Πολλές δραστικές ουσίες, με διάφορους μηχανισμούς δράσης (π.χ. αναστολή της μεταγωγής σήματος, αναστολή της σύνθεσης αμινοξέων και πρωτεϊνών κ.λπ.), χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα. Μερικά στοχεύουν σε ένα μόνο σημείο ενός μεταβολικού μονοπατιού του μύκητα ή σε ένα κρίσιμο ένζυμο ή πρωτεΐνη, ενώ αλλά επιδρούν σε άνω του ενός στόχους στο μεταβολισμό (Bolognesi and Merlo, 2019). Γενικά θεωρούνται χαμηλής ως μέτριας τοξικότητας, αν και ορισμένα προκαλούν τοξικότητα κατά την ανάπτυξη, ογκογένεση και διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα (Gurta, 2018).

1.6.1.1 Hymexazol

Το hymexazol ανήκει στις ισοξαζόλες (isoxazoles) και είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο που εφαρμόζεται στο έδαφος και τους σπόρους για την παροχή προστασίας από ασθένειες προκαλούμενες από μύκητες, όπως αυτούς των γενών *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Pythium* και *Corticium*. Δρα αναστέλλοντας την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των μυκήτων (Υρεμα, 2003). Χαρακτηρίζεται ως ουσία χαμηλής ως μέτριας υπολειμματικότητας (χρόνος ημιζωής στο έδαφος 6.6 – 31 ημέρες), υψηλής κινητικότητας και υψηλής τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς (EFSA, 2010). Επίσης, η EFSA έχει χαρακτηρίσει το hymexazol ως τοξική ουσία για τους ανθρώπους (Hassanen et al., 2022).

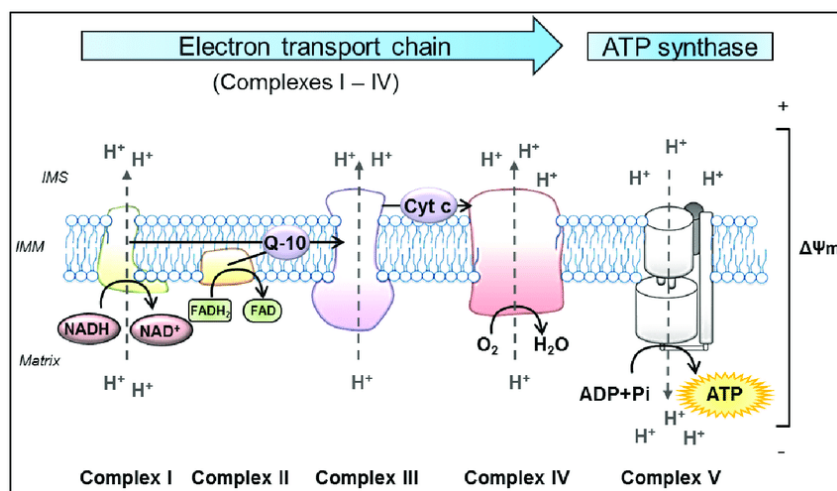


Εικόνα 6. Η χημική δομή του hymexazol

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 24781, Hymexazol. Retrieved August 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hymexazol>.

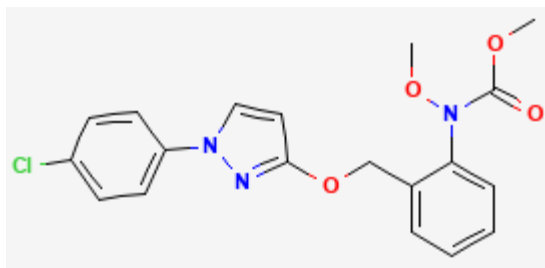
1.6.1.2 Pyraclostrobin

Το pyraclostrobin είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των στρομπιλουρινών (strobilurins), που δρα αναστέλλοντας την αναπνοή στους μύκητες, μπλοκάροντας το συμπλόκο III της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύει το κέντρο οξείδωσης της ουβικινόλης (Q_0 site) του κυτοχρώματος b. Το κυτόχρωμα b αποτελεί μέρος του κυτοχρωμικού συμπλόκου bc_1 (complex III) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης των μυκήτων και άλλων ευκαρυωτών. Αυτό το σύμπλοκο δρα οξειδώνοντας την ουβικινόλη και μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια που αποσπά στο κυτόχρωμα c (Εικόνα 7). Παρουσία στρομπιλουρινών, ωστόσο, η ουβικινόλη δεν μπορεί να οξειδωθεί και συνεπώς η μεταφορά ηλεκτρονίων σταματάει, διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή ενέργειας στον μύκητα. Έτσι τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής καταφέρνουν να έχουν πολύ ευρύ φάσμα δράσης, καλύπτοντας και τις 4 κύριες συνομοταξίες των φυτοπαθογόνων μυκήτων: Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes και Oomycetes (Zaluski et al., 2017; Lamberth 2016). Στο έδαφος, ο μέσος χρόνος ημιζωής (DT_{50}) του pyraclostrobin βρέθηκε να είναι 32 ημέρες, με τη βιοαποδόμηση να είναι η κύρια οδός απομάκρυνσής του αλλά όχι η μοναδική. Για παράδειγμα, η φωτοαποδόμηση του pyraclostrobin είναι ταχύτατη υπό ακτινοβολία UV, ενώ πιθανότατα συμμετέχουν και άλλοι μηχανισμοί αποδόμησης. Δεν είναι ευκίνητο στο έδαφος, αλλά μπορεί να εκπλυθεί στα επιφανειακά ύδατα (Fulcher et al., 2014). Το pyraclostrobin έχει σχετιστεί με αρνητικές επιδράσεις στις μέλισσες (*Apis mellifera*) (Da Costa Domingues et al., 2020; Zaluski et al., 2017) και είναι ιδιαίτερα τοξικό για υδρόβιους οργανισμούς (Li et al., 2020). Ωστόσο, δεν είναι τοξικό για τρωκτικά και άλλα θηλαστικά (οξεία έκθεση από το στόμα σε ποντικούς: $LD_{50} > 5000 \text{ mg kg}^{-1}$) (Lamberth, 2016).



Εικόνα 7. Η αναπνευστική αλυσίδα.

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-oxidative-phosphorylation-OXPHOS-in-mitochondria-The_fig1_344052910

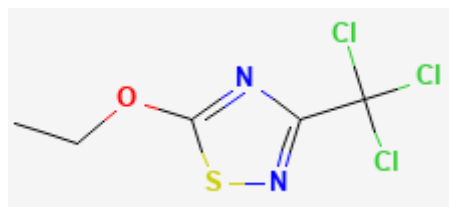


Εικόνα 8. Η χημική δομή του *pyraclostrobin*.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 6422843, Pyraclostrobin. Retrieved August 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyraclostrobin>.

1.6.1.3 Etridiazole

Το etridiazole ανήκει στις θειοδιαζόλες (thiadiazoles) και είναι αποτελεσματικό και εκλεκτικό έναντι ορισμένων μυκήτων (π.χ. *Pythium* και *Phytophthora*). Αξιοποιείται σε καλλιέργειες όπως βαμβάκι, καλαμπόκι, σιτάρι κ.λπ. (EPA US 2000a). Δρα τροποποιώντας τη δομή των λιπιδικών μεμβρανών (κυρίως της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης), ενεργοποιώντας ή απελευθερώνοντας μεμβρανοσύνδετες φωσφολιπάσες και οδηγώντας έτσι σε μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης των φωσφολιπιδίων προς την αποδόμηση. Η ενεργοποίηση ενζύμων επιδιόρθωσης της μεμβράνης, ως απάντηση, συνεπάγεται αυξημένη κατανάλωση ενέργειας και έτσι μειωμένη ανάπτυξη για τον μύκητα (Radsuhn and Lyr, 1984). Το etridiazole είναι ευκίνητη ένωση στο περιβάλλον, με υψηλή πτητικότητα και χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα. Αυτό το γεγονός το καθιστά επικίνδυνο για ρύπανση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων. Ωστόσο, χρησιμοποιείται σε μικρές δόσεις μειώνοντας τον εκτεταμένο κίνδυνο ρύπανσης. Κύρια οδό απομάκρυνσης συνιστά η εξάτμιση (volatilization) και σε μικρότερο βαθμό ο αερόβιος μεταβολισμός στο έδαφος, ενώ είναι ευάλωτο και στην εδαφική φωτόλυση. Σε πειράματα αγρού έδειξε χρόνο ημιζωής από 4 ως 33 ημέρες. Τέλος, κατά την οξεία έκθεση είναι μη τοξικό για τα πτηνά, ελαφρώς τοξικό για τα θηλαστικά, μέτρια τοξικό για τα ψάρια και υψηλά τοξικό για τα θαλάσσια φυτά μη στόχους. (EPA US 2000a, b).



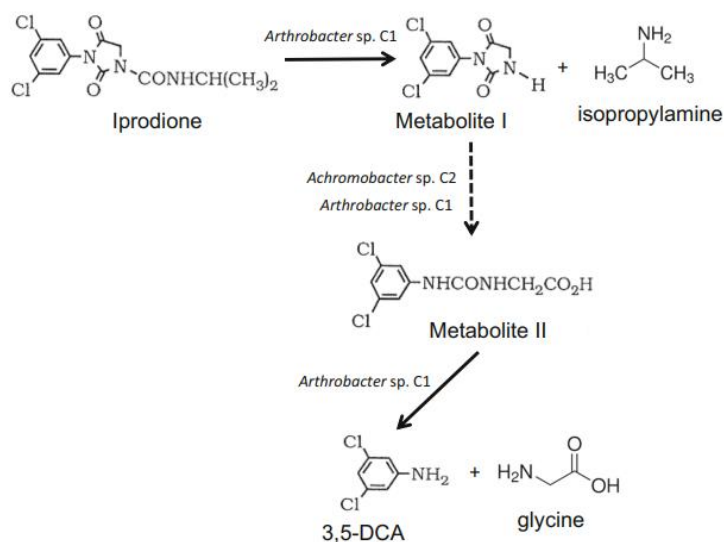
Εικόνα 9. Η χημική δομή του etridiazole.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 17432, Etridiazole. Retrieved August 29, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etridiazole>.

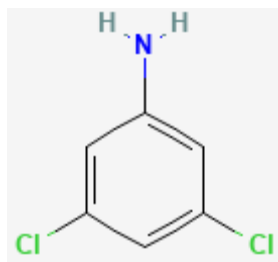
1.6.1.4 3,5- Dichloroaniline (3,5-DCA) (μεταβολίτης του iprodione)

Το iprodione είναι ένα δικαρβόξαμιδικό (dicarboximide) διασυστηματικό μυκητοκτόνο με εφαρμογή σε μια σειρά καλλιεργειών. Ειδικότερα, εφαρμόζεται για τον έλεγχο των μυκήτων που προσβάλλουν το φύλλωμα και κατά των εδαφικών μυκήτων. Έχει ιδιότητες διαταράκτη του ενδοκρινικού συστήματος και είναι πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο, ενώ χαρακτηρίζεται ως μέτριας τοξικότητας για μικρά ζώα. Παράλληλα, έχει μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος, με τους μεταβολίτες του να έχουν ανιχνευθεί σε επιφανειακά ύδατα και απορροές (drainage water) (Vasileiadis et al., 2018; Campos et al., 2016). Η μικροβιακή αποδόμηση είναι η βασική οδός απομάκρυνσης του από το έδαφος (Εικόνα 10).

Ο κύριος μεταβολίτης του iprodione στα φυτά και το περιβάλλον είναι η 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), η οποία έχει χαρακτηριστεί επιβλαβής για το περιβάλλον και υψηλά τοξική για τους οργανισμούς και τους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, ο Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος (Environmental Protection Agency, EPA) την κατατάσσει ως καρκινογόνο και από την εκτίμηση κινδύνου μέσω της διατροφής (dietary risk assessment) προέκυψε ότι είναι πιο τοξική και ανθεκτική από το iprodione, με βασικό στόχο κατά την οξεία έκθεση τα νεφρά και το ήπαρ σε αρουραίους (Lai et al., 2021; Vasileiadis et al., 2018). Επιπλέον, η 3,5-DCA χαρακτηρίζεται από υψηλότερη υπολειμματικότητα στο έδαφος (DT₅₀ 2.7–39.6 days) σε σχέση με την μητρική ουσία iprodione (Campos et al., 2016; EFSA, 2016).



Εικόνα 10. Το καταβολικό μονοπάτι του iprodione σύμφωνα με τους Campos et al., (2016).



Εικόνα 11. Η χημική δομή του 3,5-DCA.

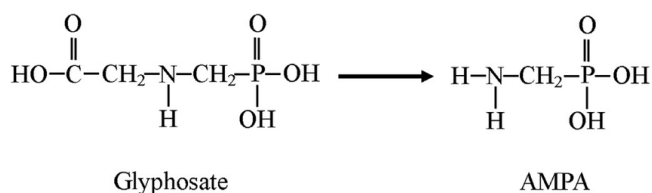
Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 12281, 3,5-Dichloroaniline. Retrieved August 29, 2022, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_5-Dichloroaniline.

1.6.2 Ζιζανιοκτόνα

Τα ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται για τον έλεγχο της ανεπιθύμητης βλάστησης (ζιζάνια). Συνήθως χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες εν σειρά (row-crop), με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της καλλιέργειας μέσω του περιορισμού της ανάπτυξης ζιζανίων. Η τοξικότητα των ζιζανιοκτόνων εξαρτάται από τον τρόπο δράσης τους και τη μέθοδο εφαρμογής τους. Τυπικά, δρουν αναστέλλοντας την κυτταρική διαίρεση, τη φωτοσύνθεση, τη βιοσύνθεση αμινοξέων ή μιμούμενα φυσικές φυτο-ορμόνες, ενώ οι μέθοδοι εφαρμογής τους περιλαμβάνουν τον ψεκασμό στο φύλλωμα και την άμεση εφαρμογή στο έδαφος και στα υδατικά συστήματα (EPA-US, 2022a)

1.6.2.1 *Glyphosate και (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ (AMPA)*

Το glyphosate καταχωρήθηκε ως γεωργικό φάρμακο από τον EPA το 1974 και έκτοτε αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα παγκοσμίως (EPA-US, 2022b). Το συγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο είναι ένα ζιζανιοκτόνο ευρέος φάσματος και δρα αναστέλλοντας την συνθάση του 3-φωσφο-5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού στο μονοπάτι του σικιμικού οξέος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) στα φυτά, στα βακτήρια και στους μύκητες (Sato et al., 2020; Funke et al., 2006). Έχει βρεθεί ότι στο έδαφος μπορεί να αποδομηθεί φωτολυτικά και να ανοργανοποιηθεί (mineralization) αεροβίως και αναεροβίως. Ο χρόνος ημιζωής του glyphosate στο έδαφος έχει βρεθεί να κυμαίνεται από 1 ημέρα (Texas, USA) ως και 130 ημέρες σε πειράματα αγρού, (Iowa, USA) (EC,2002), με κύριο μεταβολίτη το (αμινομεθυλο)φωσφονικό οξύ (aminomethylphosphonic acid, AMPA). Το glyphosate μπορεί και συσσωρεύεται σε τροφικές αλυσίδες, ενώ έχει βρεθεί πως είναι τοξικό για τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους, τους γαιοσκώληκες και υδροχαρή φυτά-μη στόχους (Singh et al., 2020).

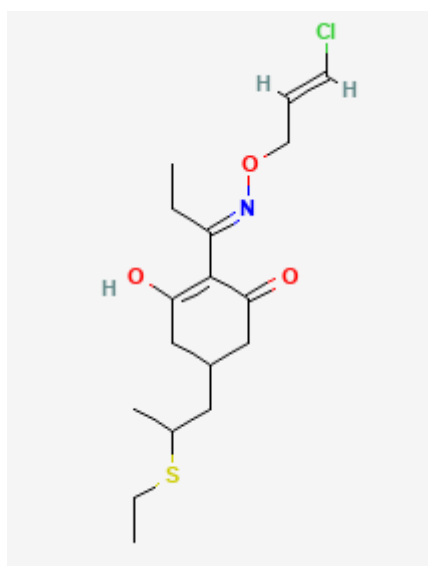


Εικόνα 12. Οι χημικές δομές του glyphosate και του μεταβολίτη AMPA.

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-glyphosate-and-its-metabolite-AMPA_fig1_247097749

1.6.2.2 Clethodim

Το clethodim ανήκει στις κυκλοεξανεδιόνες (cyclohexanediones) και είναι ένα εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο που εφαρμόζεται μεταφυτρωτικά σε διάφορες καλλιέργειες (σόγιας, βαμβாகιού, αραχίδας κ.λπ.), (Devine 2002; PubChem, 2022). Ο τρόπος δράσης του περιλαμβάνει την αναστολή του ενζύμου καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (ACCase), που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Το clethodim επιδεικνύει διαφορετική τοξικότητα στα μονοκότυλα και στα δικότυλα φυτά (επιλεκτική τοξικότητα). Πιο συγκεκριμένα, η ACCase των δικότυλων φυτών δεν εμφανίζει ευαισθησία στο clethodim. Από την άλλη, σε ορισμένα μόνο καλλιεργούμενα μονοκότυλα φυτά παρατηρούνται αυξημένοι ρυθμοί αποτοξικοποίησης του clethodim, που τα καθιστούν ανθεκτικά σε αυτό το γεωργικό φάρμακο (Devine, 2002). Κυρίαρχος τρόπος αποδόμησης του στο έδαφος είναι ο αερόβιος μεταβολισμός, ωστόσο μικρή συμμετοχή έχει και η φωτόλυση. Το clethodim χαρακτηρίζεται από μικρή υπολειμματικότητα στο έδαφος, καθώς υπό αερόβιες συνθήκες βρέθηκε να έχει χρόνο ημιζωής από 1 ως 2,6 ημέρες. Είναι πρακτικά μη τοξικό για τα πτηνά και τις μέλισσες (*Apis mellifera*), αλλά ελαφρώς τοξικό για τα ψάρια (θερμού και ψυχρού νερού) (US EPA,1992).

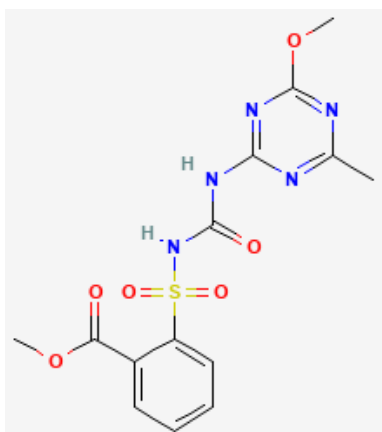


Εικόνα 13. Η χημική δομή του clethodim.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 135491728, Clethodim. Retrieved August 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clethodim>.

1.6.2.3 Metsulfuron-methyl

Το metsulfuron-methyl ανήκει σε μία ομάδα ισχυρών ζιζανιοκτόνων, των σουλφονουλουριών. Χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα δράσης, υψηλή εκλεκτικότητα, χαμηλές δόσεις εφαρμογής ($2-8 \text{ g ha}^{-1}$), πολύ χαμηλή οξεία και χρόνια τοξικότητα στα ζώα και απουσία βιοσυσσώρευσης. Δρα αναστέλλοντας την συνθάση του ακετογαλακτικού (acetolactate synthase), που είναι ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη), με συνέπεια την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και αύξησης. Η εκλεκτικότητα του είναι αποτέλεσμα του ταχύτερου μεταβολισμού του στις ανθεκτικές καλλιέργειες. Οι σουλφονουλουρίες στο έδαφος αποδομούνται σχετικά γρήγορα, με την υδρόλυση και τη μικροβιακή αποδόμηση να αποτελούν τα κύρια μονοπάτια αποδόμησης. Οι χρόνοι ημιζωής για τις σουλφονουλουρίες στον αγρό (field DT_{50}) κυμαίνονται από 1 ως 6 εβδομάδες (He et al., 2006; Brown, 1990).



Εικόνα 14. Η χημική δομή του metsulfuron-methyl.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 52999, Metsulfuron-methyl. Retrieved August 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metsulfuron-methyl>.

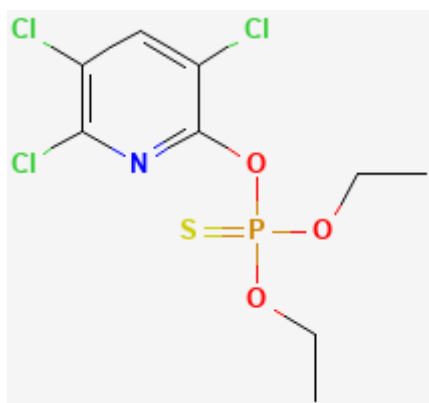
1.6.3 Εντομοκτόνα

Είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των εντόμων, σκοτώνοντας τα ή αποτρέποντας ανεπιθύμητες συμπεριφορές τους. Βρίσκουν εφαρμογή στη γεωργία, τη δημόσια υγεία, τη βιομηχανία, αλλά και σε οικιακές χρήσεις. Πολλά δρουν στο νευρικό σύστημα των εντόμων, ενώ άλλα ως ρυθμιστές της ανάπτυξης ή ως ενδοτοξίνες. Ταξινομούνται βάση του τρόπου δράσης και της δομής τους. Τα εντομοκτόνα στις ΗΠΑ χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστο σε καλλιέργειες βαμβακιού και καλαμποκιού (US EPA, 2022c). Αξίζει να σημειωθεί πως περίπου 10000 είδη εντόμων προσβάλλουν τις καλλιέργειες, με 700 από αυτά να προκαλούν σημαντικές ζημιές σε χωράφια και αποθήκες (Bolognesi and Merlo, 2019).

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

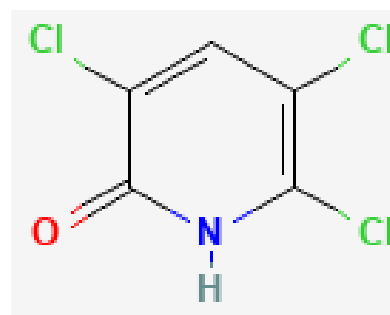
Το chlorpyrifos είναι ένα ευρέως φάσματος οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο με εφαρμογή στη γεωργία (καλαμπόκι, λαχανικά, μανιτάρια κλπ.) και την κτηνιατρική για την καταπολέμηση των εντόμων εχθρών (Kulshrestha and Kumari, 2010). Ο βασικός τρόπος δράσης του είναι ως αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης στις νευρικές συνάψεις των εντόμων (Wang et al., 2016). Η συσσώρευση ακετυλοχολίνης προκαλεί υπερδιέγερση των νευρικών κυττάρων, οδηγώντας σε νευροτοξικότητα και τελικά θάνατο (National Pesticide Information Center, 2011). Είναι αρκετά έμμοно στο έδαφος, θέτοντας σε κίνδυνο το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (Kulshrestha and Kumari, 2010), ενώ μπορεί να εισέλθει και στα επιφανειακά ύδατα (Wang et al., 2016). Στο έδαφος έχει χρόνο ημιζωής από 7 ως 120 ημέρες και δύναται να αποδομηθεί με φωτόλυση (UV), υδρόλυση, αποχλωρίωση και από μικροοργανισμούς του εδάφους. Επίσης, είναι υψηλά τοξικό για τα πτηνά, τους υδρόβιους οργανισμούς, τις μέλισσες και τους γαιοσκώληκες (*Eisenia foetida*) (Wang et al., 2016; National Pesticide Information Center, 2011).

Το chlorpyrifos έχει ως κύριο προϊόν αποδόμησης το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP). Το TCP είναι έμμοно και πιο ευκίνητη ένωση από το chlorpyrifos στο έδαφος, κάτι που οδηγεί σε εκτεταμένη ρύπανση του εδάφους και των υδάτων με αυτό το μεταβολίτη. Αν και δεν είναι ιδιαίτερα τοξική για τους υδρόβιους και χερσαίους οργανισμούς, παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα για τους μικροοργανισμούς. Συνέπεια αυτού είναι η μείωση του ρυθμού (βιο)αποδόμησης του TCP και της μητρικής του ένωσης από τις μικροβιακές κοινότητες (Cao et al., 2012).



Εικόνα 15. Η χημική δομή του chlorpyrifos.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos. Retrieved August 29, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos>.



Εικόνα 16. Η χημική δομή του TCP.

Πηγή: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 23017, 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol. Retrieved August 29, 2022, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_5_6-Trichloro-2-pyridinol.

1.7 Στόχοι

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας της ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, που στόχο έχει να ταυτοποιήσει μικροβιακούς δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων και να τους αξιοποιήσει για την ανάπτυξη και τυποποίηση χρήσιμων *in vitro* οικοτοξικολογικών δοκιμών, για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Σε αυτό το πλαίσιο, μελετήθηκαν 10 διαφορετικά γεωργικά φάρμακα (μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα) ως προς την τοξικότητά τους, έναντι ενός αντιπροσωπευτικού εδαφογενούς NOB, του *Nitrobacter winogradskyi*. Η αξιολόγηση της τοξικότητας έγινε σε λειτουργικό επίπεδο, μέσω του προσδιορισμού του ρυθμού κατανάλωσης των νιτρωδών (νιτρικοποίηση) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrobacter winogradskyi*. Ταυτόχρονα, παρακολούθηθηκε και η σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες, με απώτερο σκοπό να προσδιοριστεί το επίπεδο και η διάρκεια της έκθεσης του μικροοργανισμού στο εκάστοτε γεωργικό φάρμακο κατά την διάρκεια των *in vitro* δοκιμών.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Καλλιέργεια του νιτρικοποιητικού βακτηρίου *Nitrobacter winogradskyi*

Το νιτρικοποιητικό στέλεχος του *Nitrobacter winogradskyi* που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε αερόβια, χωρίς ανακίνηση, σε υγρό τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Skinner and Walker (MSW) (Skinner and Walker, 1961). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι τελικές τους συγκεντρώσεις στο μέσο παρατίθενται στον Πίνακα 1. Η επώαση του NOB στελέχους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 28°C και στο σκοτάδι. Το θρεπτικό διάλυμα περιείχε NO_2^- σε συγκέντρωση 10 mM. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε σε τιμή περίπου 7.9 με την προσθήκη διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO_3) 10%.

Πίνακας 1. Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSW.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
NaNO_2	0.69 g L ⁻¹
KH_2PO_4	0.2 g L ⁻¹
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.04 g L ⁻¹
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.04 g L ⁻¹
Διάλυμα FeNaEDTA (7.5 mM)	1 mL L ⁻¹
Διάλυμα Modified Trace Elements	1 mL L ⁻¹
Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης (0,05% w/v) (δείκτης pH)	1 mL L ⁻¹

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified Trace Elements παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος Modified Trace Elements.

Υλικά	Τελική συγκέντρωση
H₃BO₃	30 mg L ⁻¹ (0.5 mM)
MnCl₂ · 4H₂O	100 mg L ⁻¹ (0.5 mM)
CoCl₂ · 6H₂O	190 mg L ⁻¹ (0.8 mM)
NiCl₂ · 6H₂O	24 mg L ⁻¹ (0.1 mM)
CuCl₂ · 2H₂O	2 mg L ⁻¹ (0.01mM)
ZnSO₄ · 7H₂O	144 mg L ⁻¹ (0.5 mM)
Na₂MoO₄ · 6H₂O	36 mg L ⁻¹ (0.15 mM)
HCl (12.5 M)	8 ml L ⁻¹ (100 mM)

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη νιτροκοποιητική λειτουργία του *N. winogradskyi* μελετήθηκε σε υγρές καλλιέργειες του NOB στελέχους σε εύρος συγκεντρώσεων που αντιστοιχούσε σε 4 διαφορετικά επίπεδα έκθεσης. Τα επίπεδα αυτά ορίστηκαν σύμφωνα με την προτεινόμενη συγκέντρωση εφαρμογής στον αγρό και έχουν ως εξής: 0,1x – Επίπεδο 1, 1x – Επίπεδο 2, 10x – Επίπεδο 3 και 100x – Επίπεδο 4. Το εύρος των συγκεντρώσεων των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

4.3 L του ειδικού θρεπτικού μέσου (MSW) μεταφέρθηκαν από τους 4°C όπου διατηρούνταν σε γυάλινα μπουκάλια Duran (5L), στους 28°C για λίγες ώρες πριν τον εμβολιασμό. Αφού το μέσο έφτασε στην επιθυμητή θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του μέσου με 2% (o/o) φρέσκιας καλλιέργειας του NOB στελέχους στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στην αρχή της εκθετικής φάσης, η καλλιέργεια των 4.3 L διανεμήθηκε σε επιμέρους καλλιέργειες των 30 ml, οι οποίες και μεταφέρθηκαν σε Duran των 100 ml για την προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων. 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 mm. Εξαίρεση 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 48 EC σε νερό. Ως μάρτυρες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες με προσθήκη αντίστοιχου με τις επιμέρους μεταχειρίσεις όγκου νερού (1.5 mL ανά 30 mL καλλιέργειας; 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 γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν αβιοτικοί μάρτυρες σε ενδεικτικές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 3. Τα γεωργικά φάρμακα του πειράματος και οι δόσεις που εφαρμόστηκαν.

Γεωργικό Φάρμακο/Μεταχείριση	Δόση Μεταχείρισης (μM) - Επίπεδο
Hymexazol	1009 – Επίπεδο 4 101 – Επίπεδο 3 10 – Επίπεδο 2 1 – Επίπεδο 1
Pyraclostrobin	385 – Επίπεδο 4 77 – Επίπεδο 3 7.7 – Επίπεδο 2 0.77 – Επίπεδο 1
Etridiazole	1010 – Επίπεδο 4 404 – Επίπεδο 3 40.4 – Επίπεδο 2 4 – Επίπεδο 1
3,5-Dichloroaniline (3,5-DCA)	310 – Επίπεδο 4 31 – Επίπεδο 3 3.1 – Επίπεδο 2 0.31 – Επίπεδο 1
Glyphosate	2957 – Επίπεδο 4 591 – Επίπεδο 3 59 – Επίπεδο 2 5,9 – Επίπεδο 1
Aminomethylphosphonic acid (AMPA)	4500 – Επίπεδο 4 900 – Επίπεδο 3 90 – Επίπεδο 2 9 – Επίπεδο 1
Clethodim	415 – Επίπεδο 4 83 – Επίπεδο 3 8.3 – Επίπεδο 2 0.83 – Επίπεδο 1
Metsulfuron-methyl	131.11 – Επίπεδο 4 13.11 – Επίπεδο 3 1.31 – Επίπεδο 2 0.131 – Επίπεδο 1

Chlorpyrifos	228 – Επίπεδο 4 114 – Επίπεδο 3 29 – Επίπεδο 2 2.9 – Επίπεδο 1
Chlorpyrifos – Εμπορικό Σκεύασμα	228 – Επίπεδο 4 114 – Επίπεδο 3 29 – Επίπεδο 2 2.9 – Επίπεδο 1
3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP)	164 – Επίπεδο 4 75 – Επίπεδο 3 25 – Επίπεδο 2 5 – Επίπεδο 1

2.3 Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία του νιτρικοποιητικού μικροοργανισμού

Η επίδραση των μελετούμενων ουσιών στη νιτρικοποιητική λειτουργία του επιλεγμένου στελέχους NOB ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με χρωματομετρική μέτρηση των καταναλούμενων νιτρωδών ιόντων των καλλιεργειών σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate), με χρήση των 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), σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Griess-Posvay, όπως αυτή περιγράφεται από τους Keeney και Nelson (Keeney and Nelson, 1983). Εν συντομία, η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νιτρώδη αντιδρούν με πρωτοταγείς αρωματικές αμίνες (αντιδραστήριο diazotizing) σε όξινο περιβάλλον προς παραγωγή αλάτων διαζονίου (Εικόνα 17, αντίδραση A). Στην συνέχεια, αυτά τα άλατα αντιδρούν (σύζευξη) με αρωματικές ενώσεις (αντιδραστήριο coupling), που διαθέτουν συγκεκριμένες αμινο- ή υδροξυλομάδες, για να σχηματίσουν έγχρωμες αζω-ενώσεις (Εικόνα 17, αντίδραση B), κατάλληλες για χρωματομετρικό προσδιορισμό. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 20 μ L αντιδραστηρίων diazotizing και coupling σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας που περιείχε συνολικά 100 μ L δείγματος (Εικόνα 18) και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm σε microplate reader Varioskan LUX της Thermo-Fisher Scientific. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των νιτρωδών ιόντων πραγματοποιούνταν με βάση πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν με βάση την ανάλυση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων NaNO_2 (0-100 μ M).

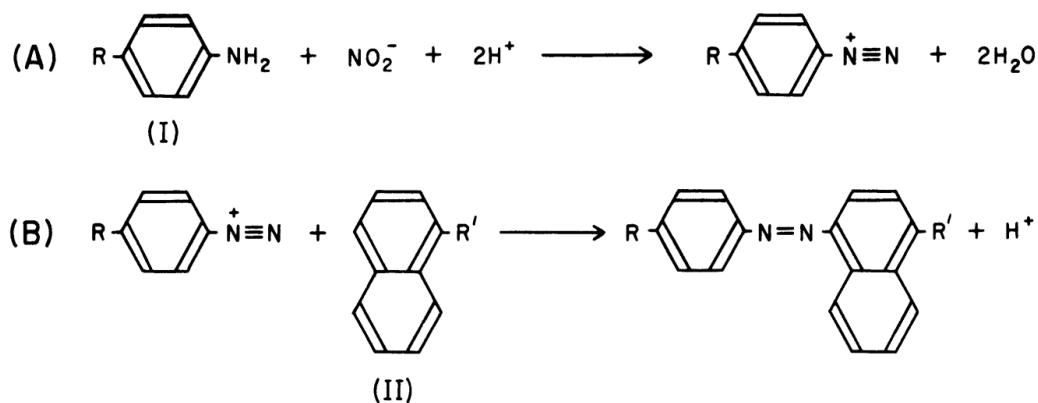
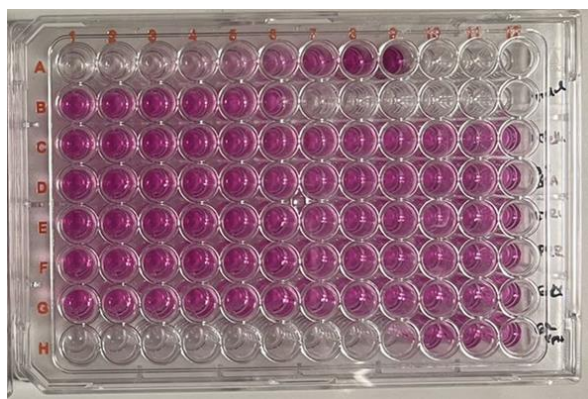


Fig. 33-3. Diazotization and coupling reactions in method for colorimetric determination of NO_2^+ :

(A) diazotization reaction—(I) Sulfanilamide ($\text{R} = -\text{SO}_2\cdot\text{NH}_2$),

(B) coupling reaction—(II) [*N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine] ($\text{R}' = -\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot\text{NH}_2$).

Εικόνα 17. Τροποποιημένη μέθοδος Griess-Ilosvay (Keeney and Nelson, 1983).



Εικόνα 18. Χρωματομετρικός προσδιορισμός νιτρωδών.

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

Για την παρακολούθηση της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων κατά την διάρκεια των *in vitro* δοκιμών, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους στις υγρές καλλιέργειες σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία της ανάπτυξης των στελεχών: (i) αμέσως μετά την προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων 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 των επιλεγμένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC-PDA (Photodiode-Array Detection) SHIMADZU LC-20AD, με προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm, η οποία ήταν συνδεδεμένη με στήλη αντίστροφης φάσης SHIMADZU VP-ODS διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μl και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min^{-1} . Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης για κάθε γεωργικό φάρμακο παρουσιάζονται λεπτομερώς στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των μελετούμενων γεωργικών φαρμάκων.

Γεωργικό Φάρμακο	Κινητή Φάση	Αναλογία Διαλυτών Κινητής Φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Θερμοκρασία στήλης (°C)
Hymexazol	MeOH ¹ : H ₂ O + 0.1 % H ₃ PO ₄	40:60	205	25
Pyraclostrobin	ACN ² : H ₂ O + 0.1 % H ₃ PO ₄	80:20	275	25
Etridiazole	ACN : H ₂ O	80:20	220	25
3,5-DCA	ACN : H ₂ O	65:35	220	25
Clethodim	ACN : H ₂ O + 0.1 % H ₃ PO ₄	90:10	255	25
Metsulfuron-methyl	MeOH : H ₂ O + 0.1% H ₃ PO ₄	55:45	224	40
Chlorpyrifos	MeOH : H ₂ O + 0.1% H ₃ PO ₄	80:20	230	25
TCP	MeOH : H ₂ O + 0.1% H ₃ PO ₄	80:20	230	25

¹MeOH: Μεθανόλη

²ACN: Ακετονιτρίλιο

Πίνακας 4. Μέθοδοι εκχύλισης των γεωργικών φαρμάκων από τις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*.

Γεωργικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (μM)	Εκχύλιση (V _{δειγ} /V _{τελ})	Διαλύτης
Hymexazol	1009, 101 & 10	1:5	MeOH ¹
Hymexazol	1	1:2	MeOH
Pyraclostrobin	385, 77 & 7.7	1:10	ACN ²
Pyraclostrobin	0.77	1:2	ACN
Etridiazole	1010, 404 & 40.4	1:10	ACN
Etridiazole	4	1:5	ACN
3,5-DCA	310 & 31	1:10	ACN
3,5-DCA	3.1&0.31	1:2	ACN
Clethodim	415, 83 & 8.3	1:10	ACN
Clethodim	0.83	1:2	ACN
Metsulfuron Methyl	131.11, 13.11 & 1.31	1:5	MeOH
Metsulfuron Methyl	0.131	1:2	MeOH
Chlorpyrifos	228, 114 & 29	1:10	MeOH
Chlorpyrifos	2.9	1:2	MeOH
TCP	164, 75, 25 & 5	1:10	MeOH

Για την εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από τις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi* πραγματοποιούνταν ανάμιξη ορισμένου όγκου διαλύτη (μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο) με ορισμένο όγκο δείγματος από την καλλιέργεια εντός σωληναρίων erpendorf των 1.5 ml, σύμφωνα με τα στοιχεία του Πίνακα 4 και ακολουθούσε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Ο τελικός όγκος της ανάμιξης ήταν 500 μl, όγκος ο οποίος και μεταφέρθηκε σε κατάλληλο φιαλίδιο προκειμένου να μετρηθεί στον σύστημα της HPLC. Πρέπει να σημειωθεί ότι, για κάθε γεωργικό φάρμακο είχε προηγηθεί η δημιουργία πρότυπη καμπύλης μέσω της παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων, με διαλύτη μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο και το εκάστοτε γεωργικό φάρμακο σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0.05 έως 20 mg L⁻¹. Αυτό έγινε με σκοπό την βαθμονόμηση του ανιχνευτή εντός της περιοχής των συγκεντρώσεων όπου παρατηρείται γραμμικότητα. Η σταθερότητα των ουσιών glyphosate και AMPA δεν

προσδιορίστηκε λόγω αδυναμίας ανίχνευσης και ποσοτικού τους προσδιορισμού με τις δεδομένες αναλυτικές χρωματογραφικές συνθήκες.

2.5 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και υπολογισμός των τιμών EC_{50}

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις της κατανάλωσης των 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 Tuckey'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 γεωργικού φαρμάκου που δύναται να προκαλέσει μείωση της νιτρικοποιητικής λειτουργίας (κατανάλωση νιτρωδών) του NOB στελέχους κατά 50%. Ο υπολογισμός των τιμών EC_{50} έγινε σύμφωνα με τους Papadopoulos et al. (2020). Πιο συγκεκριμένα, η μοντελοποίηση της σχέσης δόσης-απόκρισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα δεδομένα, όπου οι τιμές συγκέντρωσης των νιτρωδών διαιρέθηκαν με την μέση τιμή της αντίστοιχης καλλιέργειας ελέγχου. Οι αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το πακέτο dose response curves (drc) v3.0-1 package (Ritz & Streibig, 2005) του λογισμικού R (version 4.2.1). Μία σύντομη περιγραφή των μοντέλων που δοκιμάστηκαν παρατίθεται από τους Ritz et al. (2015). Αρχικά, ακολουθήθηκε μια προσέγγιση εμπειρικής μοντελοποίησης με σκοπό την επιλογή του καλύτερου μοντέλου (fitting model), σύμφωνα με τους δείκτες καλής εφαρμογής (goodness of fit) που εξετάστηκαν. Τελικά επιλέχθηκε το μοντέλο log logistic 4 παραμέτρων ως το καταλληλότερο από τα μοντέλα που δοκιμάστηκαν για την σύγκριση των μετρήσεων της μελέτης.

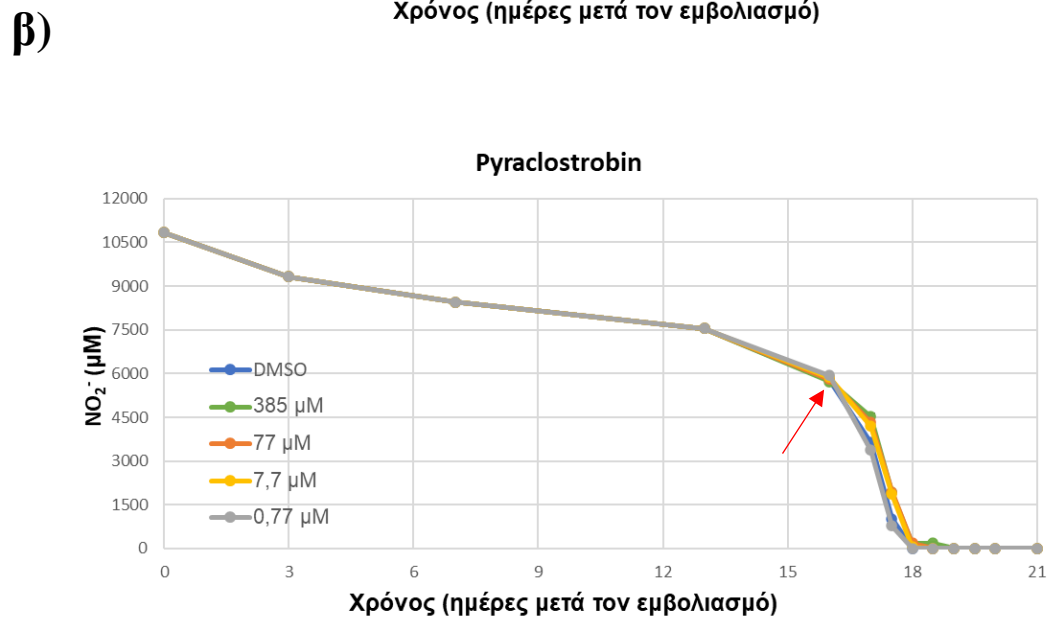
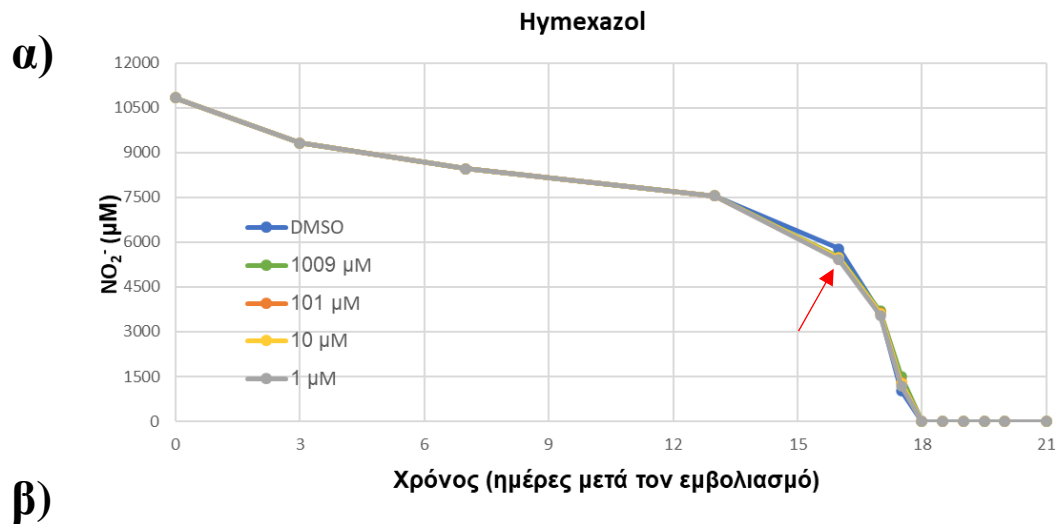
3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στο στέλεχος του νιτρικοποιητικού βακτηρίου *Nitrobacter winogradskyi*

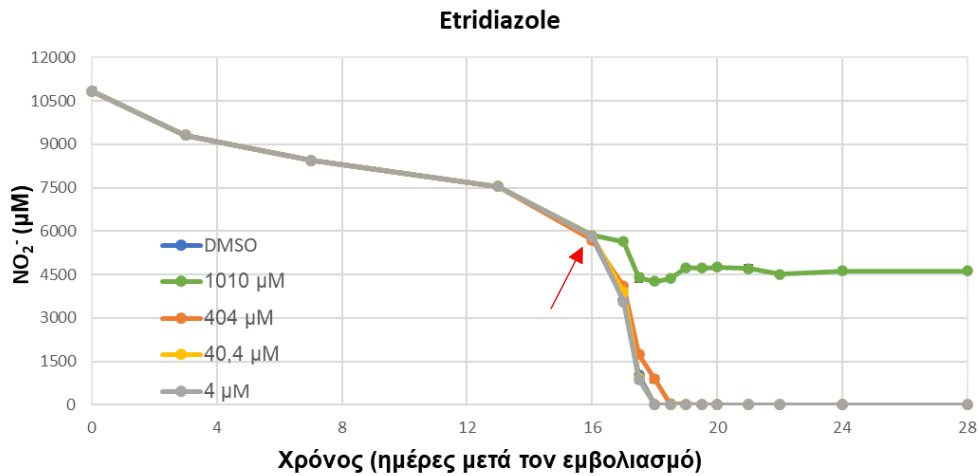
Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία του *N. winogradskyi* ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια της παραμέτρου EC_{50} (Effective Concentration 50), που ορίζεται ως η μέση συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της λειτουργίας της νιτρικοποίησης σε ποσοστό 50% συγκριτικά με το μάρτυρα αναφοράς. Οι τιμές EC_{50} που προέκυψαν για κάθε γεωργικό φάρμακο παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η τιμή EC_{50} , υπολογισμένη από το κατάλληλο μοντέλο παλινδρόμησης, θεωρείται αντικειμενική οικοτοξικολογική παράμετρος και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε

στην παρούσα μελέτη (Maliszewska-Kordybach et al., 2007). Η επίδραση των μελετούμενων γεωργικών φαρμάκων στη νιτρικοποιητική λειτουργία (κατανάλωση NO_2^-) του *N. winogradskyi* κατά τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών απεικονίζεται στα γραφήματα 1-3 για το κάθε γεωργικό φάρμακο. Πιο συγκεκριμένα, στον άξονα των τετμημένων (x) φαίνεται ο χρόνος σε ημέρες, ενώ στον άξονα y φαίνεται η (μέση) συγκέντρωση των NO_2^- της καλλιέργειας. Στο υπόμνημα απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν για το εκάστοτε γεωργικό φάρμακο. Με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι καμπύλες των καλλιέργειών ελέγχου και ειδικότερα ως Control αναφέρονται οι καλλιέργειες ελέγχου για τα υδατοδιαλυτά γεωργικά φάρμακα και ως DMSO οι καλλιέργειες ελέγχου για τα μη-υδατοδιαλυτά γεωργικά φάρμακα. Τέλος, το κόκκινο βέλος δείχνει το χρονικό σημείο όπου πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες του NOB στελέχους.

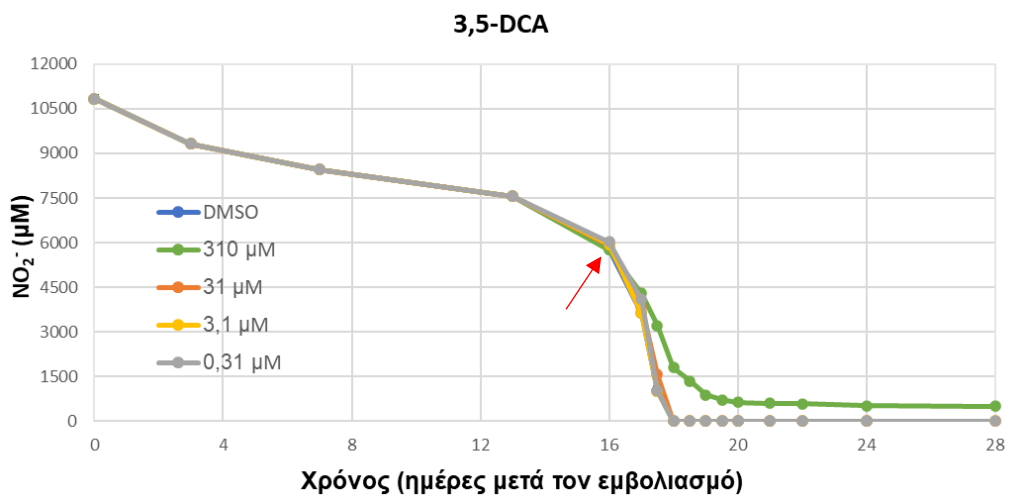
3.1.1 Μυκητοκτόνα



γ)



δ)

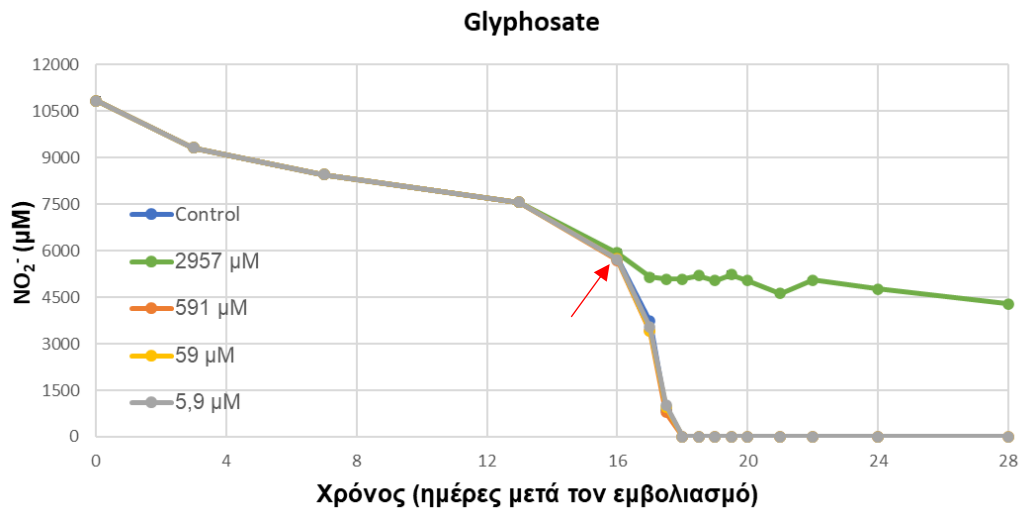


Γράφημα 1. Επίδραση των hymexazol (α), pyraclostrobin (β), etridiazole (γ) και 3,5-DCA (δ) στην κατανάλωση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

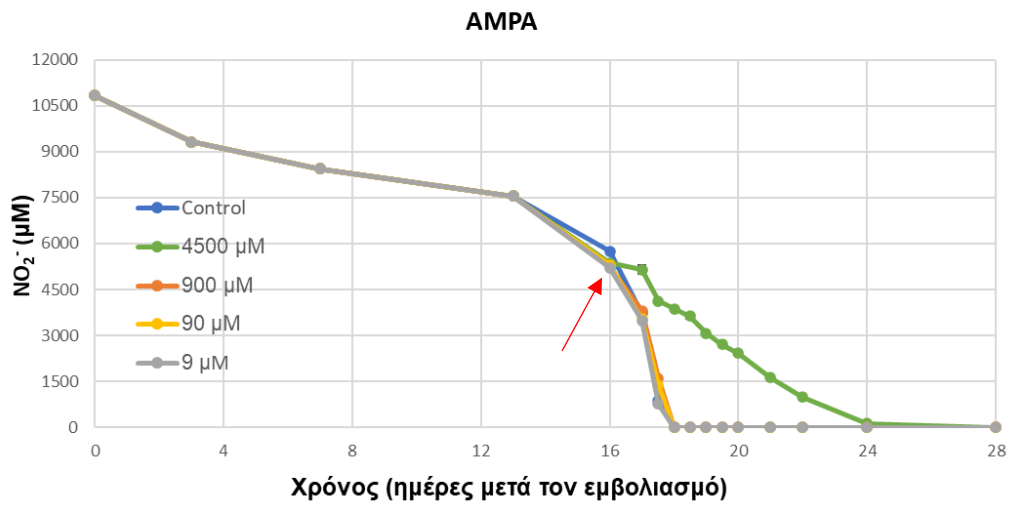
Τα μυκητοκτόνα hymexazole και pyraclostrobin στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, δεν επηρέασαν σημαντικά ($p > 0.05$) τη νιτριοποιητική λειτουργία του *N. winogradskyi*. (Γράφημα 1 α, β). Αντίθετα, το etridiazole προκάλεσε σημαντική αναστολή ($p < 0.05$) της νιτριοποιητικής λειτουργίας του *N. winogradskyi* στη μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δοκιμάστηκε (1010 µM) (Γράφημα 1γ). Τέλος, ο μεταβολίτης του iprodione, 3,5-DCA (Γράφημα 1δ), παρεμπόδισε σημαντικά ($p < 0.05$) την κατανάλωση νιτρικών στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi* μόνο στη μεταχείριση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (310 µM), ωστόσο η αναστολή αυτή ήταν μόνο προσωρινή και η λειτουργία του στελέχους επανήλθε μετά την 20^η ημέρα της *in vitro* δοκιμής ($p > 0.05$).

3.1.2 Ζιζανιοκτόνα

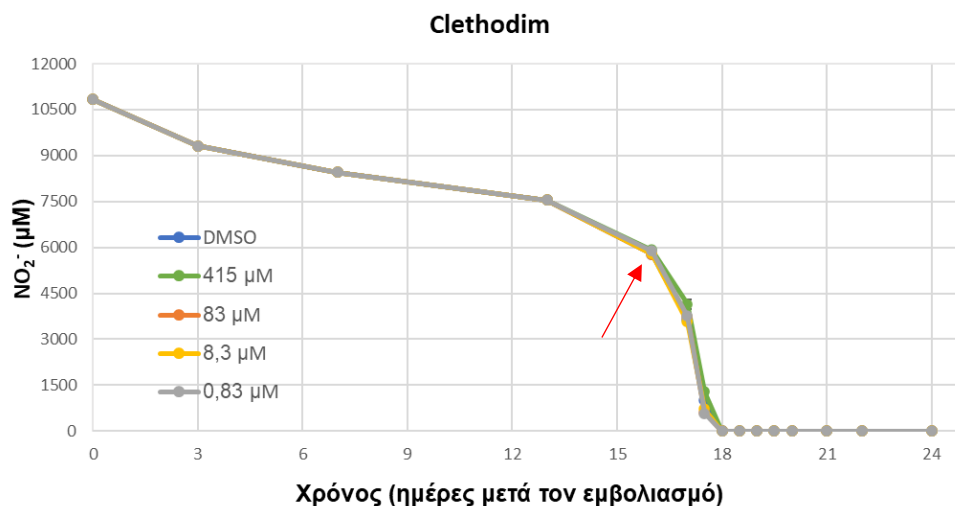
α)



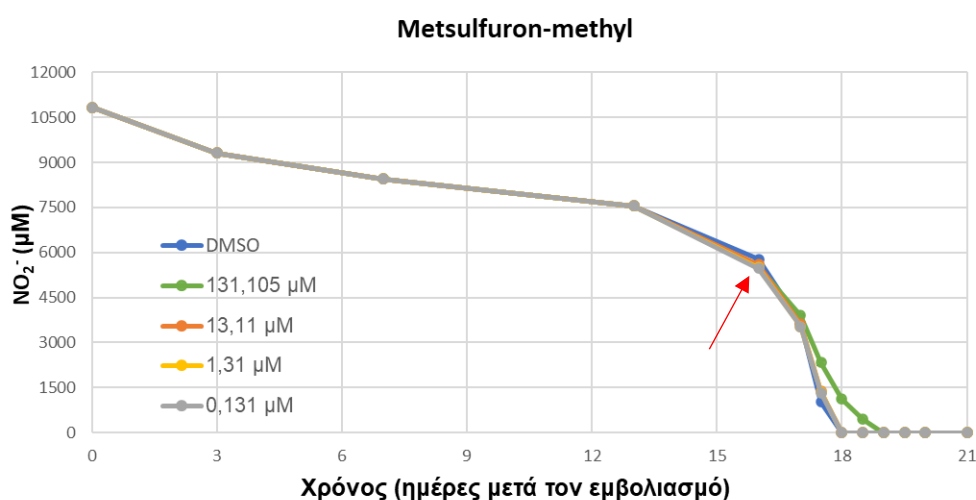
β)



γ)



δ)

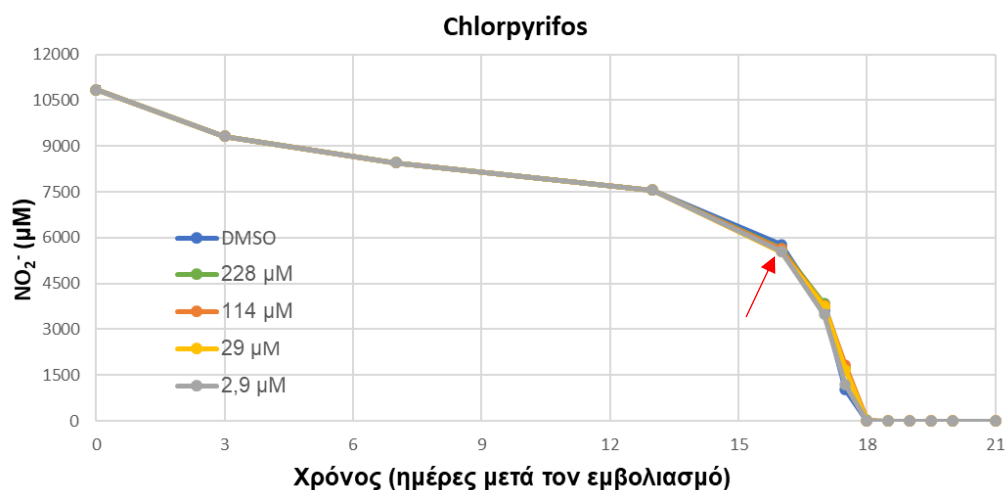


Γράφημα 2. Επίδραση των glyphosate (α), AMPA (β), clethodim (γ) και metsulfuron-methyl (δ) στην κατανάλωση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

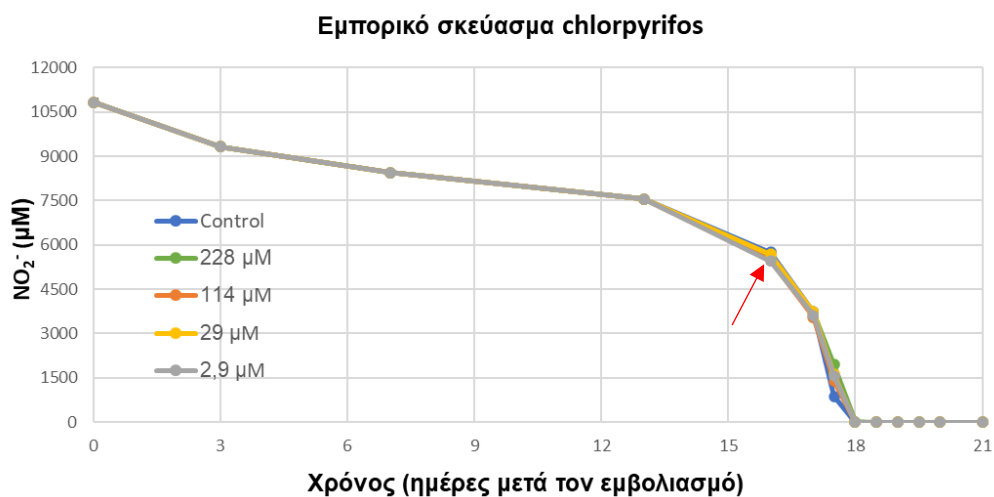
Η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου glyphosate στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi* στη συγκέντρωση των 2957 μM προκάλεσε πλήρη αναστολή της λειτουργίας του NOB στελέχους (Γράφημα 2α). Ομοίως, η εφαρμογή του κύριου μεταβολίτη του glyphosate, AMPA, στη συγκέντρωση των 4500 μM επηρέασε σημαντικά ($p < 0.05$) την κατανάλωση των νιτρωδών από το νιτροκοποιητικό βακτηριακό στέλεχος. Ωστόσο η αναστολή αυτή ήταν προσωρινή και η λειτουργία του στελέχους επανήλθε πλήρως 8 ημέρες μετά την εφαρμογή του μεταβολίτη στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi* (24^η ημέρα του πειράματος) (Γράφημα 2β). Αντίθετα η προσθήκη των clethodim και metsulfuron-methyl δεν επηρέασε σημαντικά την κατανάλωση των νιτρωδών στις υγρές καλλιέργειες του NOB στελέχους στο εύρος των συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν (Γράφημα 2γ, δ).

3.1.3 Εντομοκτόνα

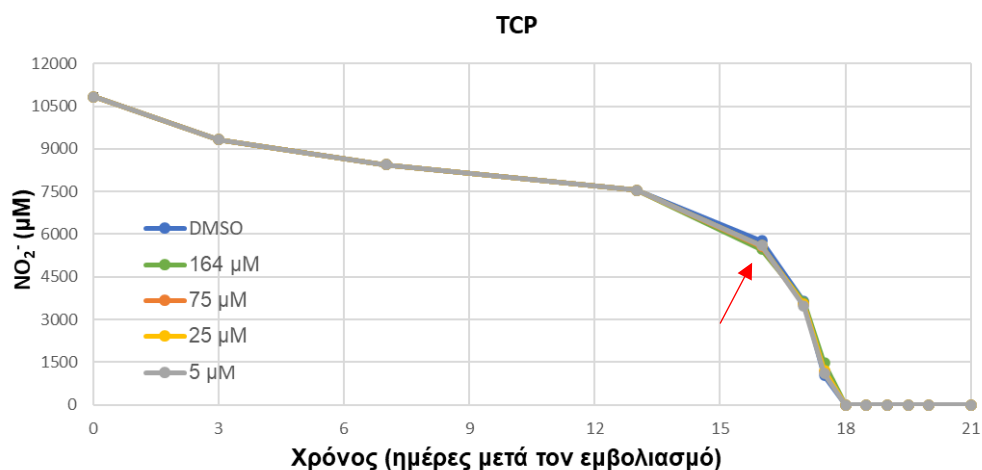
α)



β)



γ)



Γράφημα 3. Επίδραση των chlorpyrifos (α), εμπορικό σκεύασμα chlorpyrifos (β) και TCP (γ) στην κατανάλωση των νιτρικών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Η εφαρμογή του εντομοκτόνου chlorpyrifos, καθώς και του μεταβολίτη του, TCP, στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi* σε συγκεντρώσεις έως 228 και 164 μM , αντίστοιχα, δεν επηρέασε σημαντικά ($p>0.05$) τη λειτουργία του NOB στελέχους. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση εφαρμογής του εμπορικού σκευάσματος του chlorpyrifos (Γράφημα 3β).

Πίνακας 5. Μέσες τιμές EC_{50} (μM) για τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν. Τα τυπικά σφάλματα των μέσων όρων των τιμών δίνονται στις παρενθέσεις. Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} από τη στατιστική ανάλυση.

Γεωργικό Φάρμακο		<i>N. winogradskyi</i>
Μυκητοκτόνα	Hymexazol	> 1009*
	Pyraclostrobin	> 385*
	Etridiazole	798,44 (\pm 10,91)
	3,5 DCA	270,12 (\pm 21,01)
Ζιζανιοκτόνα	Glyphosate	2044,47 (\pm 92,19)
	AMPA	3866,75 (\pm 430,43)
	Clethodim	> 415*
	Metsulfuron-methyl	> 131,1*
Εντομοκτόνα	Chlorpyrifos	> 228*
	TCP	> 164*

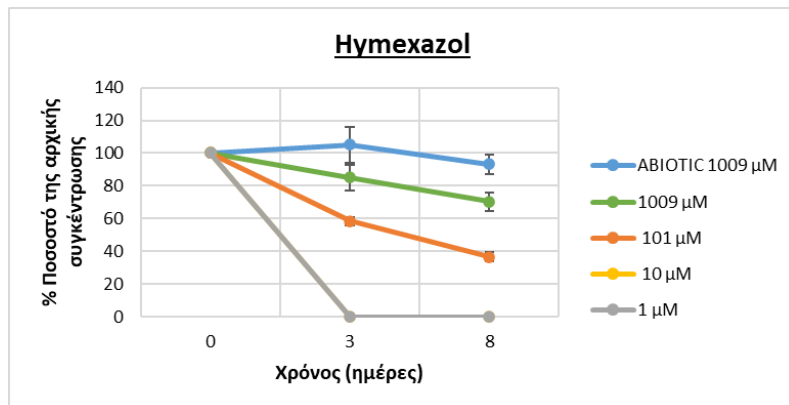
* μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε

3.2 Σταθερότητα των γεωργικών φαρμάκων *in vitro*

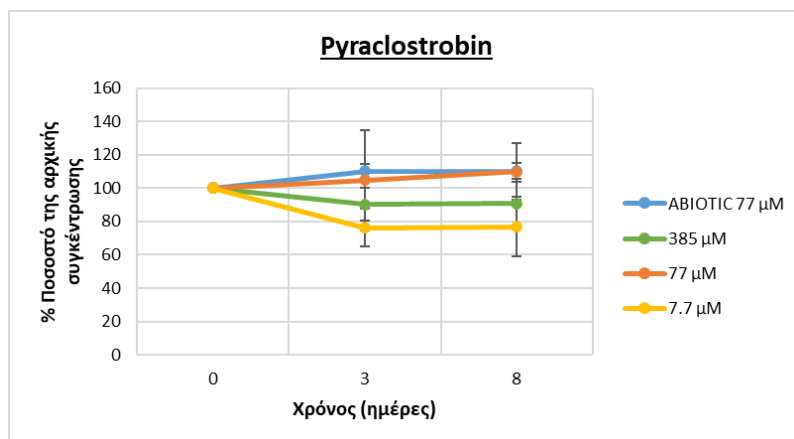
Τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης σχετικά με την πορεία της αποδόμησης των μελετούμενων γεωργικών φαρμάκων, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της σταθερότητας τους στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi* κατά τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών, παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4-6 για τις διάφορες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων.

3.2.1 Μυκητοκτόνα

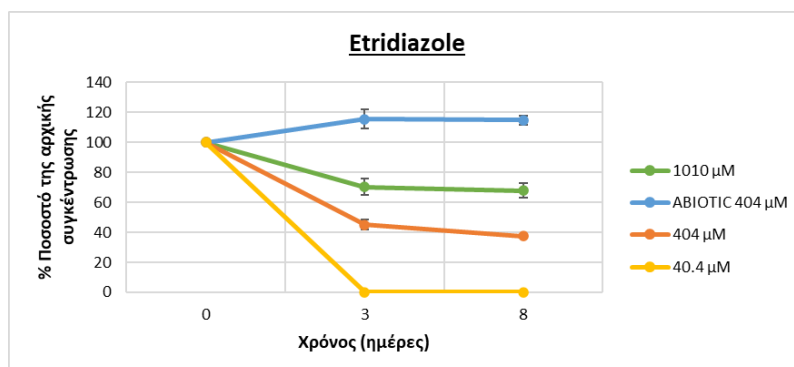
α)



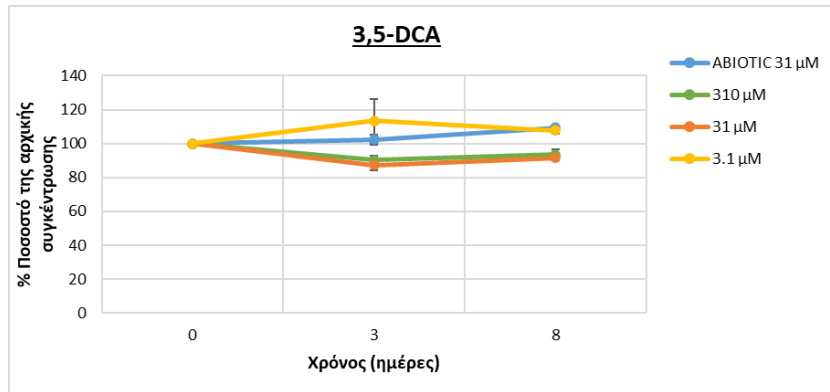
β)



γ)



δ)

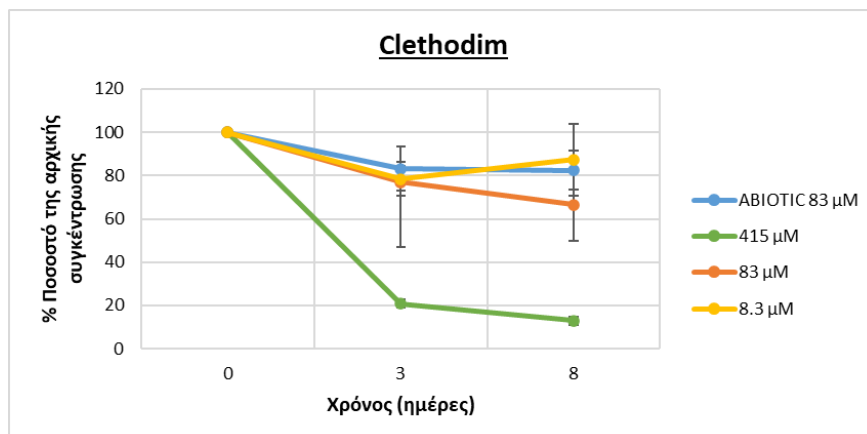


Γράφημα 4. Πορεία αποδόμησης των μυκητοκτόνων hymexazol (α), pyraclostrobin (β), etridiazole (γ), καθώς και του μεταβολίτη 3,5-DCA (δ) στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

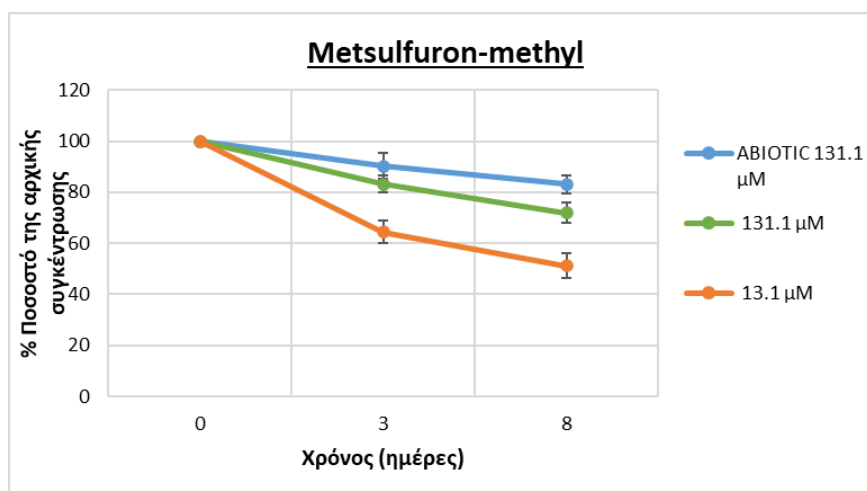
Στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi* παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση των μυκητοκτόνων hymexazol και etridiazole που κυμάνθηκε από 30-100%. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του hymexazol, παρατηρήθηκε ~30%, και 60% αποδόμηση στις συγκεντρώσεις των 1009 και 101 μM αντίστοιχα, ενώ πλήρη αποδόμηση παρατηρήθηκε στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 10 μM και 1 μM, (Γράφημα 4α). Ομοίως, για το etridiazole παρατηρήθηκε αποδόμηση ~30% και 60% στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 1010 και 404 μM, αντίστοιχα, ενώ πλήρη αποδόμηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 40.4 μM, στις 8 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες του NOB στελέχους (Γράφημα 4γ). Διαφορετικό ωστόσο μοτίβο αποδόμησης των παραπάνω μυκητοκτόνων παρατηρήθηκε για τους αβιοτικούς μάρτυρες (ABIOTIC) των καλλιεργειών του NOB στελέχους. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των αβιοτικών μαρτύρων των hymexazol και etridiazole στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις των 1009 και 404 μM που χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση καθόλη τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών. Σε αντίθεση με τα hymexazol και etridiazole, τα pyraclostrobin και 3,5-DCA δεν αποδομήθηκαν σημαντικά στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*, με τις συγκεντρώσεις τους να παραμένουν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες (ABIOTIC) των καλλιεργειών του NOB στελέχους στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (77 και 31 μM για τα pyraclostrobin και 3,5-DCA, αντίστοιχα) (Γράφημα 4β, δ).

3.2.2 Ζιζανιοκτόνα

α)



β)

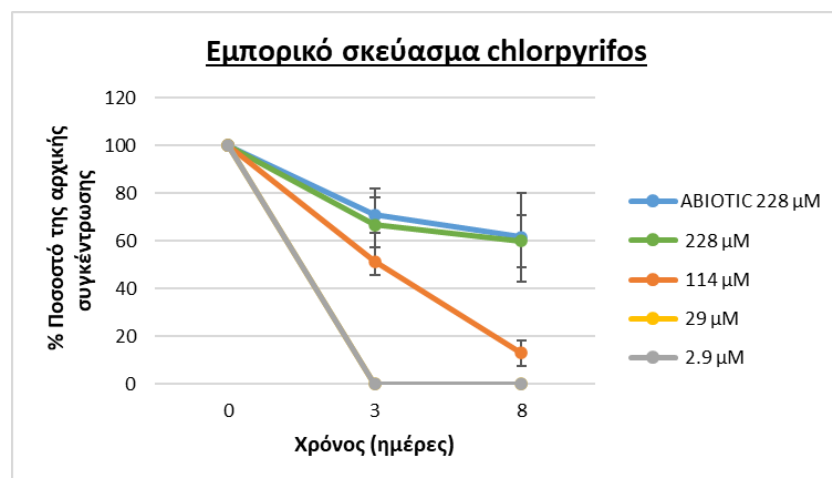


Γράφημα 5. Πορεία αποδόμησης των ζιζανιοκτόνων clethodim (α) και metsulfuron-methyl (β) στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

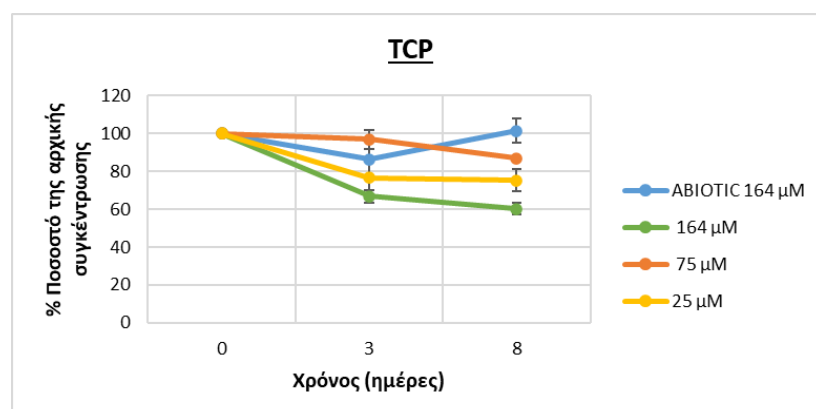
Το ζιζανιοκτόνο clethodim, 8 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi* αποδομήθηκε σε ποσοστό ~85% και 30% στις συγκεντρώσεις 415 μM και 83 μM , αντίστοιχα (Γράφημα 5α). Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση του metsulfuron-methyl, όπου 8 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες του NOB στελέχους παρατηρήθηκε 50% και 30% αποδόμηση για τις συγκεντρώσεις των 13.1 και 131 μM , αντίστοιχα (Γράφημα 5β). Τέλος, παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τους αβιοτικούς μάρτυρες των NOB καλλιεργειών στις ενδεικτικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (83 και 131.1 μM για τα clethodim και metsulfuron-methyl, αντίστοιχα) (Γράφημα 5).

3.2.3 Εντομοκτόνα

α)



β)



Γράφημα 6. Πορεία αποδόμησης των εντομοκτόνων chlorpyrifos (α) και του μεταβολίτη του TCP (β) στις υγρές καλλιέργειες του *N. winogradskyi*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

Εξαιτίας της χαμηλής ανάκτησης (< 50%) που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της δραστικής ουσίας chlorpyrifos όταν αυτή προστέθηκε ως πρότυπο διάλυμα DMSO στις υγρές καλλιέργειες του NOB στελέχους, 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. Στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi* παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση του εντομοκτόνου chlorpyrifos. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ~40% και ~85% αποδόμηση στις συγκεντρώσεις των 228 και 114 μM αντίστοιχα, 8 ημέρες μετά την προσθήκη του υδατικού διαλύματος του εντομοκτόνου σκευάσματος στις καλλιέργειες του NOB στελέχους, ενώ πλήρη αποδόμηση

παρατηρήθηκε στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 29 μM και 2.9 μM , 3 ημέρες μετά την προσθήκη του. Παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης παρατηρήθηκε και για τον αβιοτικό μάρτυρα του chlorpyrifos στην ενδεικτική συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (228 μM) (Γράφημα 6α).

Όσον αφορά στο μεταβολίτη του chlorpyrifos, TCP, 40%, 15% και 25% αποδόμηση παρατηρήθηκε 8 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi* στις συγκεντρώσεις των 164 μM , 75 μM και 25 μM , αντίστοιχα (Γράφημα 6β). Διαφορετικό ωστόσο μοτίβο αποδόμησης του μεταβολίτη παρατηρήθηκε στην περίπτωση του αβιοτικού του μάρτυρα στην ενδεικτική συγκέντρωση των 164 μM που χρησιμοποιήθηκε, όπου η συγκέντρωση του TCP στο θρεπτικό μέσο παρέμεινε σταθερή καθόλη τη διάρκεια της *in vitro* δοκιμής.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων και/ή ορισμένων εκ των κύριων μεταβολιτών τους στο νιτροκοποιητικό βακτήριο *Nitrobacter winogradskyi*, σε αξενικές υγρές καλλιέργειες. Η μελέτη αυτή εντάσσεται στο πλαίσιο μιας ευρύτερης προσπάθειας ανάπτυξης και τυποποίησης νέων οικοτοξικολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους, με απώτερο στόχο την αναθεώρηση του ισχύοντος ρυθμιστικού πλαισίου σχετικά με την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η αυξημένη ευαισθησία των νιτροποιητικών βακτηρίων του γένους *Nitrobacter* (NOB) και *Nitrosomonas* (AOB) στα γεωργικά φάρμακα αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Domsch (1972). Έκτοτε, οι μελέτες που ακολούθησαν ενίσχυσαν αυτή την αντίληψη, ωστόσο η έρευνα για νέους μικροβιακούς δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους έχει επικεντρωθεί κατά βάση στα AOB και AOA (Καρπουζας, 2021). Η *in vitro* αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων έναντι απομονωμένων μικροοργανισμών του εδάφους έχει ορισμένα πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα, καθώς *in vitro* απουσιάζουν οι βιοτικοί και οι περισσότεροι αβιοτικοί παράγοντες που απαντώνται στο έδαφος, δίνεται η δυνατότητα (1) να μελετηθεί με ακρίβεια η εγγενής τοξικότητα κάποιου γεωργικού φαρμάκου έναντι του υπό μελέτη μικροοργανισμού (σχέση δόσης-απόκρισης) και (2) να διερευνηθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί της τοξικότητας, παρατηρώντας την επίδραση της τοξικής ουσίας στις διάφορες μικροβιακές δραστηριότητες. Έτσι μελετώντας αντιπροσωπευτικά είδη από τις διάφορες λειτουργικές μικροβιακές ομάδες (π.χ. AOA, AOB και NOB) μπορούμε να αναδείξουμε χρήσιμους μικροβιακούς δείκτες, για να τους συμπεριλάβουμε στις υπάρχουσες στρατηγικές εκτίμησης κινδύνου, και παράλληλα να εμπλουτίσουμε την γνώση μας σχετικά με τη φυσιολογία αυτών των λειτουργικά σημαντικών μικροβιακών ομάδων. Τέτοιου είδους μελέτες, παρά τα πλεονεκτήματά τους, έχουν χαμηλή οικοτοξικολογική αξία και ανάλογες δοκιμές χρησιμοποιούνται μόνο ως ένα προκαταρκτικό στάδιο (βαθμίδα I) στα διάφορα σχήματα εκτίμησης κινδύνου

(Kargouzas, 2021), αποσκοπώντας σε μια αρχική εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων.

Τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin και hymexazol δεν επηρέασαν τη νιτρικοποιητική λειτουργία του *N. winogradskyi*. Η απουσία αρνητικής επίδρασης στην περίπτωση του pyraclostrobin ήταν ως ένα βαθμό αναμενόμενη, καθώς τα *Nitrobacter* δεν περιέχουν στην αναπνευστική τους αλυσίδα το σύμπλοκο III (Cyt bc₁), το οποίο αποτελεί τον κύριο στόχο της εν λόγω δραστικής ουσίας στους μύκητες (Cabello et al., 2009). Αντίθετα το μυκητοκτόνο etridiazole, ανέστειλε σημαντικά τη λειτουργία του NOB στελέχους. 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; Rodgers et al., 1982). Το etridiazole δρα έναντι των μυκήτων-στόχων του ενεργοποιώντας μεμβρανοσύνδετες φωσφολιπάσες με συνέπεια την υδρόλυση φωσφολιπιδίων των μεμβρανών και επακόλουθη αύξηση της καταπόνησης, μέχρι που σε αυξημένες συγκεντρώσεις το κύτταρο δεν μπορεί να ανταπεξέλθει και πεθαίνει. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, είναι πιθανό το etridiazole να επιδρά με τον ίδιο μηχανισμό και στο στέλεχος του *N. winogradskyi* που μελετήθηκε, καθώς στη μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (1010 μM) παρατηρήθηκε οριστική αναστολή της νιτρικοποίησης, χωρίς ανάκαμψη, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο αυτό να οφείλεται σε βακτηριοκτόνο δράση του etridiazole. Επίσης, ο μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, επέδειξε σημαντική αρνητική επίδραση στη νιτρικοποιητική λειτουργία του *N. winogradskyi*. Αν και δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την επίδραση του εν λόγω μεταβολίτη στα NOB, προηγούμενες μελέτες των Vasileiadis et al. (2018), κατέδειξαν σημαντική ανασταλτική επίδραση του 3,5-DCA στη νιτροδοποιητική λειτουργία δύο AOA (*Ca. N. frankandianus* και *Ca. N. sinensis*) και ενός AOB (*N. multiformis*) στελεχών.

Από τα ζιζανιοκτόνα που εξετάστηκαν, το glyphosate και ο μεταβολίτης του AMPA ανέστειλαν σημαντικά τη λειτουργία του *N. winogradskyi*, σε αντίθεση με τα clethodim και metsulfuron-methyl, έναντι των οποίων το *N. winogradskyi* φάνηκε να εμφανίζει ανεκτικότητα. Το glyphosate επέδειξε τη σημαντικότερη επίδραση, οδηγώντας σε πλήρη αναστολή της νιτρικοποιητικής λειτουργίας σε αντίθεση με τον κύριο μεταβολίτη του, AMPA, του οποίου η επίδραση ήταν παροδική. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι το εν λόγω γεωργικό φάρμακο δρα εμποδίζοντας το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων), το οποίο δεν απαντάται μόνο στα φυτά αλλά και στα βακτήρια και μπορεί να οδήγησε σε δημιουργία αυξοτροφίας για τα αρωματικά αμινοξέα στο NOB στέλεχος.

Από την άλλη πλευρά, τόσο το εντομοκτόνο chlorpyrifos, όσο και ο μεταβολίτης του TCP, δεν επηρέασαν τη νιτρικοποιητική λειτουργία του *N. winogradskyi*. Η απουσία τοξικότητας του chlorpyrifos στο μελετούμενο στέλεχος των NOB θα μπορούσε να εξηγηθεί από την απουσία του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης, που είναι ο μοριακός του στόχος.

Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα της μελέτης αποδόμησης και της σταθερότητας των γεωργικών φαρμάκων συνολικά οι αβιοτικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν παρόμοιο μοτίβο αποδόμησης με αυτό στις καλλιέργειες του NOB στελέχους

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. Εξαίρεση ωστόσο αποτέλεσαν οι αβιοτικοί μάρτυρες των μυκητοκτόνων hymexazol και etridiazole, καθώς και του μεταβολίτη του εντομοκτόνου chlorpyrifos, TCP, όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση των εν λόγω ουσιών καθόλη τη διάρκεια των *in vitro* δοκιμών σε αντίθεση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες του NOB στελέχους όπου προστέθηκαν οι παραπάνω ουσίες. Η παραπάνω αναντιστοιχία οφείλεται πιθανότατα σε αλληλεπίδραση μεταξύ των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων και του βακτηρίου Επιπλέον, από τα τοξικά για το *N. winogradskyi* γεωργικά φάρμακα, μόνο το etridiazole βρέθηκε να αποδομείται σημαντικά κατά την διάρκεια του πειράματος, χωρίς ωστόσο το γεγονός αυτό να έχει κάποια επίδραση στην παρατηρούμενη απόκριση του NOB στελέχους.

5. Συμπεράσματα

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια αποτελούν μια σχετικά παραμελημένη λειτουργική μικροβιακή ομάδα στην οικοτοξικολογική έρευνα για νέους μικροβιακούς δείκτες. Η παρούσα μελέτη είναι από τις λίγες που μελετούν, *in vitro*, την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα στους νιτρικοποιητές. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση 10 ευρέως χρησιμοποιούμενων γεωργικών φαρμάκων και/ή των μεταβολιτών τους στην νιτρικοποιητική δραστηριότητα του *N. winogradskyi*. Μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων παρατηρήθηκαν διαφορετικά προφίλ τοξικότητας έναντι του NOB στελέχους, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στον ιδιαίτερο μηχανισμό δράσης του κάθε γεωργικού φαρμάκου. Το μελετούμενο NOB στέλεχος φάνηκε να εμφανίζει ανεκτικότητα στο εντομοκτόνο chlorpyrifos, καθώς και το μεταβολίτη του, TCP. Αντιθέτως, το μυκητοκτόνο etridiazole και ο μεταβολίτης του μυκητοκτόνου iprodione, 3,5-DCA, επέδειξαν σημαντική ανασταλτική επίδραση στη νιτρικοποιητική λειτουργία του NOB στελέχους, σε αντιδιαστολή με τα pyraclostrobin και hymexazol, που δεν παρουσίασαν κάποια επίδραση. Τέλος, το ζιζανιοκτόνο glyphosate καθώς και ο μεταβολίτης του, AMPA, προκάλεσαν ισχυρή αναστολή της νιτρικοποίησης, σε αντίθεση με τα clethodim και metsulfuron-methyl. Συνοψίζοντας, τα δεδομένα της τοξικότητας, που παρέχονται μέσω της παρούσας εργασίας, αποτελούν το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη των νιτρικοποιητικών βακτηρίων ως αξιόπιστους και ευαίσθητους μικροβιακούς δείκτες για την ανάπτυξη τυποποιημένων *in vitro* οικοτοξικολογικών δοκιμών (βαθμίδας I), στο πλαίσιο των στρατηγικών εκτίμησης του κινδύνου των γεωργικών φαρμάκων.

6. Βιβλιογραφία

- Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., Ifemeje, J. C., & Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2020). Pesticides, History, and Classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, 29–42. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819304-4.00003-8>
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>
- Bolognesi, C., & Merlo, F. (2019). Pesticides: Human Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, 118–132. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11818-4>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Brown, H. M. (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29(3), 263–281. <https://doi.org/10.1002/ps.2780290304>
- Cabello, P., Roldán, M., Castillo, F., & Moreno-Vivián, C. (2009). Nitrogen Cycle. *Encyclopedia of Microbiology*, 299–321. <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00055-9>
- Campos, M., Karas, P. S., Perruchon, C., Papadopoulou, E. S., Christou, V., Menkissoglou-Spiroudi, U., Diez, M. C., & Karpouzas, D. G. (2016). Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 152–163. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7682-1>
- Cao, L., Liu, H., Zhang, H., Huang, K., Gu, T., Ni, H., Hong, Q., & Li, S. (2012). Characterization of a Newly Isolated Highly Effective 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol Degrading Strain *Cupriavidus pauculus* P2. *Current Microbiology*, 65(3), 231–236. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0150-3>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich,

- N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Devine, M. D. (2002). Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors. *Herbicide Classes in Development*, 103–113. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59416-8_5
- Domsch, K.H. (1972). Interactions of soil microbes and pesticides. *Symp Biol Hungary* 11:337–347.
- Da Costa, E., Domingues, C., Bello Inoue, L. V., Mathias Da Silva-Zacarin, E. C., & Malaspina, O. (2020). Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. *Environmental Pollution*, 266, 115267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>
- EFSA (2010). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol.. *EFSA Journal*, 8(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1653>
- EFSA (2016). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance iprodione. (2016, November). *EFSA Journal*, 14(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4609>
- Einsle, O., & Rees, D. C. (2020). Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chemical Reviews*, 120(12), 4969–5004. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00067>
- EPA (2000a). Fact Sheet for Etridiazole (Terrazole®). https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-084701_1-Sep-00.pdf
- EPA (2000b) Reregistration Eligibility Decision (RED) for Etridiazole (terrazole). https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-084701_1-Sep-00.pdf
- EU law - EUR-Lex. Retrieved September 5, 2022, from <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html>
- EUROPEAN COMMISSION (2002). *Review report for the active substance glyphosate*. <https://www.ciafa.org.ar/files/WwicZjTIR8oyvkVkPTLJwIeYIT8akSrDAA6iL3mh.pdf>
- Fortuna, A. (2012) The Soil Biota. *Nature Education Knowledge* 3(10):1

- Fulcher, J. M., Wayment, D. G., White, P. M., & Webber, C. L. (2014). Pyraclostrobin Wash-off from Sugarcane Leaves and Aerobic Dissipation in Agricultural Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(10), 2141–2146. <https://doi.org/10.1021/jf405506p>
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S. E., & Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>
- Giri, S.K., Verma, N., Singh, G., Gill, R., Kumar, A. (2022). Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota. In: Naeem, M., Bremont, J.F.J., Ansari, A.A., Gill, S.S. (eds) *Agrochemicals in Soil and Environment*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9310-6_3
- Guimarães, B. C., Arends, J. B., van der Ha, D., van de Wiele, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial services and their management: Recent progresses in soil bioremediation technology. *Applied Soil Ecology*, 46(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.018>
- Gupta, P. K. (2018). Toxicity of Fungicides. *Veterinary Toxicology*, 569–580. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00045-3>
- Han, S., Li, X., Luo, X., Wen, S., Chen, W., & Huang, Q. (2018). Nitrite-Oxidizing Bacteria Community Composition and Diversity Are Influenced by Fertilizer Regimes, but Are Independent of the Soil Aggregate in Acidic Subtropical Red Soil. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00885>
- Hassaan, M. A., & el Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- Hassanen, E. I., Hussien, A. M., Hassan, N. H., Ibrahim, M. A., & Mehanna, S. (2022). A Comprehensive Study on the Mechanistic Way of Hexaflumuron and Hymexazol Induced Neurobehavioral Toxicity in Rats. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03654-5>
- He, Y., Shen, D., Fang, C., He, R., & Zhu, Y. (2006). Effects of Metsulfuron-Methyl on the Microbial Population and Enzyme Activities in Wheat Rhizosphere Soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*:

- Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 41(3), 269–284.
<https://doi.org/10.1080/03601230500357298>
- Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Karas, P., Baguelin, C., Pertile, G., Papadopoulou, E., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., Ferrarini, A., Fornasier, F., Vasileiadis, S., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., & Karpouzias, D. (2018). Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of The Total Environment*, 637–638, 636–646. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.073>
- Karpouzias, D. G. (2021). Assessing the Effects of Pesticides on the Soil Microbial Community: Advances, Standardization of Methods and the Need for a New Regulatory Framework. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 81–105. <https://doi.org/10.1007/978-2021-797>
- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1983). Nitrogen: Inorganic forms. In A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 2. Chemical and microbiological properties* (pp. 643–693). ASA and SSSA. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c33>
- Kulshrestha, G., & Kumari, A. (2010). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 47(2), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0505-5>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Lai, Q., Sun, X., Li, L., Li, D., Wang, M., & Shi, H. (2021). Toxicity effects of procymidone, iprodione and their metabolite of 3,5-dichloroaniline to zebrafish. *Chemosphere*, 272, 129577. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129577>
- Lamberth, C. (2016). Complex III Inhibiting Strobilurin Esters, Amides, and Carbamates as Broad-Spectrum Fungicides. *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, 371–384. <https://doi.org/10.1002/9783527693931.ch28>
- Lewis, J. (2016). Mycorrhizal Fungi, Evolution and Diversification of. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 94–99. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800049-6.00251-1>
- Li, H., Yang, S., Li, T., Li, X., Huang, X., Gao, Y., Li, B., Lin, J., & Mu, W. (2020). Determination of pyraclostrobin dynamic residual distribution in tilapia tissues by UPLC-MS/MS under acute toxicity conditions. *Ecotoxicology and*

- Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Smreczak, B., & Janauskaite, D. (2007). Ecotoxic Effect of Phenanthrene on Nitrifying Bacteria in Soils of Different Properties. *Journal of Environmental Quality*, 36(6), 1635–1645. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0118>
- Maron, P. A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., Karimi, B., Bernard, L., Dequiedt, S., Terrat, S., Chabbi, A., & Ranjard, L. (2018). High Microbial Diversity Promotes Soil Ecosystem Functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9). <https://doi.org/10.1128/aem.02738-17>
- Martin-Laurent, F., Kandeler, E., Petric, I., Djuric, S., & Karpouzas, D. G. (2012). ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity—towards new pesticide registration regulation? *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1203–1205. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1368-0>
- Mustapha, M., Halimoon, N., Wan Johari, W. L., & Abd Shakur, M. (2018). Soil Microorganisms and Their Potential in Pesticide Biodegradation; A Review Article. *Journal of Sustainable Agricultural Sciences*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/jsas.2018.3465.1061>
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 135491728, Clethodim. Retrieved August 28, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clethodim>.
- National Pesticide Information Center (2011). Chlorpyrifos Technical Fact Sheet. . <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html>
- Ollivier, J., Wanat, N., Austruy, A., Hitmi, A., Joussein, E., Welzl, G., Munch, J. C., & Schloter, M. (2012). Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in the Root–Rhizosphere Complex of *Miscanthus × giganteus* Grown in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microbial Ecology*, 64(4), 1038–1046. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0078-y>
- Osman, K. T. (2012). Soil as a Part of the Lithosphere. *Soils*, 9–16. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2_2
- Papadopoulou, E. S., Tsachidou, B., Sułowicz, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Karpouzas, D. G. (2016). Land Spreading of Wastewaters from the Fruit-Packaging Industry and Potential Effects on Soil Microbes: Effects of the Antioxidant Ethoxyquin and Its Metabolites on Ammonia Oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 747–755. <https://doi.org/10.1128/aem.03437-15>

- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., & Karpouzas, D. G. (2020). Comparison of Novel and Established Nitrification Inhibitors Relevant to Agriculture on Soil Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581283>
- PubChem (2022). PubChem Compound Summary for CID 24781, Hymexazol. Retrieved August 28, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hymexazol>.
- Radzuhn, B., & Lyr, H. (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)
- Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, 183, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Sippel, D., & Einsle, O. (2017). The structure of vanadium nitrogenase reveals an unusual bridging ligand. *Nature Chemical Biology*, 13(9), 956–960. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2428>
- Smolders, E., Brans, K., Coppens, F., & Merckx, R. (2001). Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2469–2474. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201111>
- Soler-Jofra, A., Pérez, J., & van Loosdrecht, M. C. (2021). Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review. *Water Research*, 190, 116723. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116723>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
- Subrahmanyam, G., Shen, J. P., Liu, Y. R., Archana, G., & He, J. Z. (2014). Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term industrial effluent-polluted soils, Gujarat, Western India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4037–4050. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3678-9>
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., & Duke, S. O. (2004). Aminomethylphosphonic Acid, a Metabolite of Glyphosate, Causes Injury in Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5139–5143. <https://doi.org/10.1021/jf049605v>

- Ritz, C., & Streibig, J. C. (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software*, 12(5). <https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rodgers, G. A., & Ashworth, J. (1982). Bacteriostatic action of nitrification inhibitors. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(10), 1093–1100. <https://doi.org/10.1139/m82-163>
- Sato, N., Kishida, M., Nakano, M., Hirata, Y., & Tanaka, T. (2020). Metabolic Engineering of Shikimic Acid-Producing *Corynebacterium glutamicum* From Glucose and Cellobiose Retaining Its Phosphotransferase System Function and Pyruvate Kinase Activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.569406>
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P. K., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7519. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>
- Skinner, F. A., & Walker, N. (1961). Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Archiv Für Mikrobiologie*, 38(4), 339–349. <https://doi.org/10.1007/bf00408008>
- Stratton, M. L., Good, G. L., & Barker, A. V. (2002). EFFECTS OF SELECTED SOIL FUNGICIDES ON NITRIFICATION AND GROWTH OF PRIVET IN A PINE BARK MEDIUM. *Journal of Plant Nutrition*, 25(1), 159–168. <https://doi.org/10.1081/pln-100108787>
- Podstawka, A. (2021). *Nitrobacter winogradskyi* 255 | Type strain | DSM 10237, ATCC 25391 | BacDiveID:1796. BacDive | The Bacterial Diversity Metadatabase. Retrieved August 28, 2022, from <https://bacdive.dsmz.de/strain/1796>
- US EPA (2022a). Herbicides. <https://www.epa.gov/caddis-vol2/herbicides>
- US EPA (2022b). Glyphosate. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>
- US EPA (2022c). Insecticides.. <https://www.epa.gov/caddis-vol2/insecticides>
- US EPA (2022d). What is a Pesticide? Retrieved September 5, 2022, from <https://www.epa.gov/minimum-risk-pesticides/what-pesticide>
- US EPA (1992). Pesticide Fact Sheet (Clethodim). <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/2000QRI4.PDF?Dockey=2000QRI4.PDF>

- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Vasileiadis, S., Coppolecchia, D., Puglisi, E., Balloi, A., Mapelli, F., Hamon, R. E., Daffonchio, D., & Trevisan, M. (2012). Response of Ammonia Oxidizing Bacteria and Archaea to Acute Zinc Stress and Different Moisture Regimes in Soil. *Microbial Ecology*, 64(4), 1028–1037. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0081-3>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suci, N., Pappolla, R. A., Tourna, M., Karas, P. A., Papadimitriou, F., Kasiotakis, A., Ipsilanti, N., Ferrarini, A., Sułowicz, S., Fornasier, F., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Trevisan, M., & Karpouzas, D. G. (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. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01536-18>
- Verstraete, W., & Mertens, B. (2004). Chapter 5 The key role of soil microbes. *Vital Soil - Function, Value and Properties*, 127–157. [https://doi.org/10.1016/s0166-2481\(04\)80009-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2481(04)80009-6)
- Volk, T. J. (2013). Fungi. *Encyclopedia of Biodiversity*, 624–640. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384719-5.00062-9>
- Walker, C. B., de la Torre, J. R., Klotz, M. G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D. J., Brochier-Armanet, C., Chain, P. S. G., Chan, P. P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hügler, M., Karr, E. A., Könneke, M., Shin, M., Lawton, T. J., Lowe, T., Martens-Habbena, W., Sayavedra-Soto, L. A., . . . Stahl, D. A. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8818–8823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913533107>
- Wang, Q., Li, C., Zheng, R., & Que, X. (2016). Phytoremediation of chlorpyrifos in aqueous system by riverine macrophyte, *Acorus calamus*: toxicity and removal rate. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16241–16248. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6673-6>
- Ward, B. B., & Jensen, M. M. (2014). The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00553>
- Ward, B. B. (2014). Nitrification: An Introduction and Overview of the State of the Field. *Nitrification*, 1–8. <https://doi.org/10.1128/9781555817145.ch1>
- Watson, S. W. (1971). Taxonomic Considerations of the Family Nitrobacteraceae

- Buchanan: Requests for Opinions. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21(3), 254–270. <https://doi.org/10.1099/00207713-21-3-254>
- Ypema, H. (2003). Fungicides, Hymexazol. *Encyclopedia of Agrochemicals*.
<https://doi.org/10.1002/047126363x.agr110>
- Zaluski, R., Justulin, L. A., & Orsi, R. D. O. (2017). Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Gao, J., Shen, Q., Bai, Z., Zhuang, X., & Zhuang, G. (2018). Optimization of the medium for the growth of *Nitrobacter winogradskyi* by statistical method. *Letters in Applied Microbiology*, 67(3), 306–313. <https://doi.org/10.1111/lam.13036>
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>