

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Εργασία

***«Μελέτη της επιταχυνόμενης αποδόμησης του
παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD σε εδάφη με ή χωρίς
ιστορικό προηγούμενης εφαρμογής»***

Μαύρου Ελένη του Γεωργίου

Λάρισα, 2023

**«Μελέτη της επιταχυνόμενης αποδόμησης του παρεμποδιστή
νιτροποίησης DCD σε εδάφη με ή χωρίς ιστορικό προηγούμενης
εφαρμογής»**

***"Study of the accelerated degradation of the nitrification inhibitor DCD
in soils with and without a history of prior application"***

Τριμελής επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Επιβλέπων, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος, Μέλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καράς Παναγιώτης, Μέλος, Διδάκτορας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος.

Για την περάτωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Καρπούζα Δημήτριο για την ανάθεση της εργασίας, την επίβλεψη και τις συμβουλές του.

Η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την υποστήριξη, καθοδήγηση και βοήθεια της Dr. Chiara Perruchon, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Τμήματος, της οφείλω πολλές ευχαριστίες.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου, στους φίλους μου και ιδιαίτερα στους θείους μου, Αικατερίνη Μαρκοπούλου και Στυλιανό Πανταζή, για τη στήριξη και συμπαράσταση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.2 Ο κύκλος του αζώτου	7
1.2.1 Αζωτοδέσμευση	8
1.2.2 Αμμωνιοποίηση/ Ανοργανοποίηση αζώτου	8
1.2.3 Νιτροποίηση.....	9
1.2.5 Απονιτροποίηση	17
1.3 Σημασία της νιτροποίησης	18
1.4 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ)	19
1.4.1 Δικυανδιαμίδιο, DCD.....	20
1.4.2 Πλεονεκτήματα χρήσης του DCD	21
1.5. Σκοπός του πειράματος.....	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	23
2.2 Μετρήσεις	25
2.2.1 Προσδιορισμός των επιπέδων αμμωνιακών (NH_4^+) και νιτρικών (NO_3^-) ιόντων στο έδαφος	25
2.2.2 Προσδιορισμός του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης	26
2.2.3 Προσδιορισμός της αποδόμησης DCD στα δείγματα εδάφους	28
2.3. Στατιστική Ανάλυση.....	28
3. Αποτελέσματα	29
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ DCD ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	29
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	30
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	31
3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΕΔΑΦΟΣ.....	32
3.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ His/NoHis ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ ΑΠΟΥΣΙΑ DCD ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΥΡΙΑΣ	33
3.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ DCD AND NO-DCD TREATED SOILS.....	35
4. Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

Περίληψη

Το άζωτο είναι ένα από τα σημαντικότερα για τη ζωή στοιχεία στον πλανήτη μας. Για να είναι αφομοιώσιμο από τους μικροοργανισμούς, υφίσταται κάποιες μετατροπές στο πλαίσιο του βιογεωχημικού κύκλου του αζώτου. Ο κύκλος του αζώτου και οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτόν επηρεάζονται από τη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων, των οποίων την ανάγκη χρήσης έχει επιφέρει η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού. Ωστόσο, η εφαρμογή τους έχει συνδυαστεί με περιβαλλοντικά προβλήματα, αφού προκαλείται συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων αζώτου στο έδαφος, το οποίο μπορεί να εκπλυθεί με τη μορφή νιτρικών ή να εκλυθεί ως αέριο αζώτου μέσω της διαδικασίας της απονιτροποίησης.

Προκειμένου να περιοριστούν οι απώλειες αζώτου, παράλληλα με τα λιπάσματα γίνεται χρήση μιας ευρείας κατηγορίας χημικών ουσιών που ονομάζονται παρεμποδιστές νιτροποίησης (PN). Οι ουσίες αυτές παρεμποδίζοντας το ρυθμο-καθοριστικό βήμα της νιτροποίησης στο έδαφος, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά, ελαχιστοποιούν τις απώλειες αζώτου και βοηθούν στην συνεχή παροχή αζώτου στα φυτά.

Ένας από τους ευρεία χρησιμοποιούμενους PN αποτελεί το dicyandiamide, DCD. Σήμερα γνωρίζουμε ελάχιστα για την αποδόμηση του στο έδαφος και κυρίως, για τον ρόλο των μικροοργανισμών σε αυτήν. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η απόκριση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του DCD. Ειδικότερα, μελετήθηκε εάν η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή στο έδαφος οδηγεί σε εμφάνιση αυξημένης δράσης του έναντι των μικροοργανισμών-στόχων ή σε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και άρα, μειωμένη δράση έναντι των μικροοργανισμών αυτών.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος πάρθηκαν δείγματα από έδαφος με προηγούμενη έκθεση στο DCD (His) και έδαφος χωρίς ιστορικό έκθεσης στο DCD (NoHis). Κάθε δείγμα εδάφους υπέστη τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις: προσθήκη ουρίας και DCD (+urea + DCD), προσθήκη μόνο ουρίας (+urea), προσθήκη μόνο DCD (+DCD) και καμία προσθήκη (control). DCD και ουρία εφαρμοστήκαν στα δυο εδάφη 5 διαδοχικές φορές (5 κύκλοι) και παρακολούθηθηκαν τα επίπεδα αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων, ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης και η συγκέντρωση του DCD στο έδαφος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το DCD επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση των αμμωνιακών και των νιτρικών ιόντων, καθώς και την ικανότητα νιτροποίησης στο εκάστοτε έδαφος. Παρατηρήθηκε, επίσης, μια ταχεία αποικοδόμηση του DCD μόνο στο έδαφος χωρίς ιστορικό χρήσης DCD και μάλιστα μόνο εκεί που προστίθεται και ουρία. Η ταχεία αποδόμηση του DCD στο συγκεκριμένο έδαφος δεν συνοδεύτηκε από απώλεια ή μείωση της δράσης του.

Abstract

Nitrogen is one of the most vital components for life on our planet. To be assimilated by microorganisms, it undergoes some transformations in the nitrogen biogeochemical cycle. The nitrogen cycle and the relevant microorganisms are affected by the use of nitrogen fertilizers, whose demand has been increased by the rise in the world population. However, their application has been associated with environmental problems due to the accumulation of large amounts of reactive nitrogen in the soil, that is subject to leaching as nitrates or released as nitrous oxide in the atmosphere through denitrification.

In order to reduce nitrogen losses and ensure a sustainable use of nitrogen in soil, a diverse class of chemicals called nitrification inhibitors (Nis) are used in conjunction with fertilizers. These compounds reduce nitrogen losses and increase the amount of nitrogen available to plants by inhibiting nitrification.

One of the most widely used inhibitors is dicyandiamide (DCD). Today we know little about its degradation in the soil and specifically about the role of microorganisms in its degradation. In this thesis, we examined the response of the soil microbial community to the repeated application of DCD. It was explored whether the repeated application of DCD in the soil leads to increased activity against the target microorganisms or to accelerated microbial degradation and thus, reduced activity against the target microorganisms.

The experiment was performed in two soils: one that had prior exposure to DCD, and the second had not been previously treated with DCD. Each soil sample underwent four treatments: addition of urea and the inhibitor (+urea + DCD), addition only of urea (+urea), addition only of the inhibitor (+DCD), and no addition (control). DCD and urea were applied in each soil five consecutive times and the concentration of ammonium and nitrate, potential nitrification and the concentration of DCD were measured.

The results showed that DCD had an effect on the concentration of ammonium and nitrate and on the potential nitrification in the two soils. In contrast with what we expected, accelerated degradation of DCD was observed only in the soil with no prior history of exposure to DCD and only in the presence of urea. Still this enhanced biodegradation of DCD did not coincide with the loss of its inhibitory activity which was significant in the whole study in the specific soil.

1. Εισαγωγή

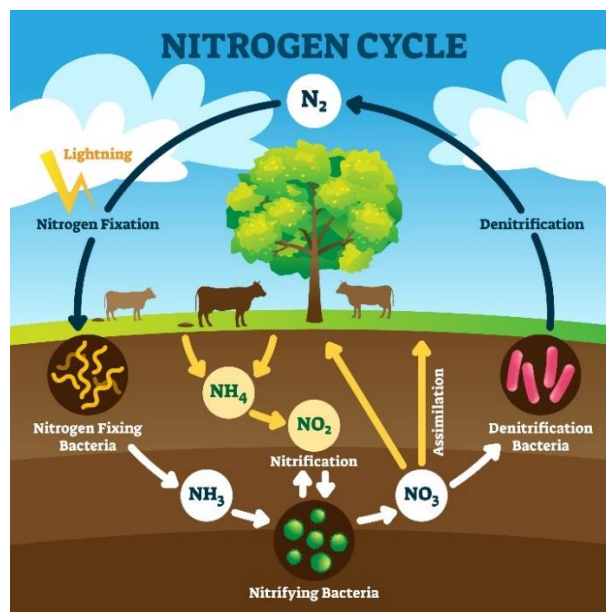
1.2 Ο κύκλος του αζώτου

Το άζωτο είναι το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο στην κυτταρική βιομάζα και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της ατμόσφαιρας της Γης (Stein & Klotz, 2016). Προκειμένου να στηριχθεί η φυτική παραγωγή χρησιμοποιούνται περίπου 120Tg συνθετικά παραγόμενων αζωτούχων λιπασμάτων σε ετήσια βάση (Gerten et al., 2020).

Ωστόσο, ο ισχυρός τριπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων αζώτου στο μόριο του N_2 το κάνει ιδιαίτερα αδρανές, κάτι που το καθιστά δύσκολα αφομοιώσιμο για άμεση χρήση από τους οργανισμούς. Για να μπορούν τα ζώα και τα φυτά να το χρησιμοποιήσουν, το αέριο άζωτο είναι απαραίτητο να μετατραπεί πρώτα σε μια χημικά πιο διαθέσιμη μορφή όπως αμμώνιο (NH_4^+), νιτρικά (NO_3^-) ή οργανικό άζωτο (π.χ. ουρία) (Stein et al., 2016). Ο κύκλος του αζώτου αποτελεί έναν βιογεωχημικό κύκλο που περιγράφει την κινητικότητα του αζώτου στο φυσικό περιβάλλον.

Οι κυριότερες μετατροπές του αζώτου στο περιβάλλον είναι:

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση/ Ανοργανοποίηση
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση



Εικόνα 1: Ο κύκλος του αζώτου και ο ρόλος των μικροοργανισμών στις επιμέρους διεργασίες

Ralls, E. (2022, September 27). Why is the Nitrogen Cycle So Important?. Earth.com.

1.2.1 Αζωτοδέσμευση

Το μοριακό αέριο άζωτο (N_2) δεσμεύεται από μικροοργανισμούς και μετατρέπεται σε βιολογικά διαθέσιμες μορφές (αμμωνία, νιτρώδη, νιτρικά) με μια διαδικασία που ονομάζεται αζωτοδέσμευση ή βιολογική δέσμευση αζώτου (Magino & Howarth, 2009). Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από ορισμένους ελεύθερους ζώντες μικροοργανισμούς, γνωστούς ως διαζώτροφους και από κυανοβακτήρια που δεσμεύουν άζωτο και άνθρακα μέσω της φωτοσύνθεσης.

Σημαντικές είναι, επίσης, οι εισροές βιολογικά σταθερού αζώτου (N) από τις συμβιωτικές σχέσεις βακτηρίων - φυτών. Οι δύο κύριες ενδοσυμβιωτικές μικροβιακές ομάδες είναι τα ριζόβια (κυρίως α -, β - πρωτεοβακτήρια) που συμβιώνουν με ψυχανθή φυτά, όπως τα φασόλια και το τριφύλλι και τα ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia* που σχηματίζουν φυμάτια στις ρίζες ορισμένων φυτών όπως θάμνους και δέντρα (Franche et al., 2008). Η αζωτοδέσμευση που πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς ονομάζεται βιολογική και από το συνολικό ποσοστό αζωτοδέσμευσης, η βιολογική κατέχει το 90% (Adamantiadou et al, 2009).

Η φυσική αζωτοδέσμευση περιλαμβάνει τη δέσμευση αζώτου που προκαλείται από γεγονότα υψηλής ενέργειας, όπως κεραυνούς, λάβα ηφαιστειών, κλπ. Από αυτά τα φυσικά φαινόμενα απελευθερώνεται υψηλή ενέργεια ικανή να σπάσει τον τριπλό δεσμό των μορίων N_2 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ατόμων αζώτου που είναι διαθέσιμα για χημική μετατροπή (Μπρουζιώτης, Α., 2019). Η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα εισέρχονται στο έδαφος με τη βροχή. Από το σύνολο της διαδικασίας της αζωτοδέσμευσης, η φυσική κατέχει το 10% (Adamantiadou et al, 2009).

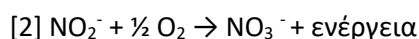
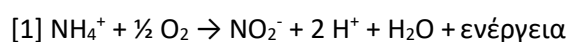
1.2.2 Αμμωνιοποίηση/ Ανοργανοποίηση αζώτου

Πρόκειται για μια βιολογική διεργασία κατά την οποία οργανικές ενώσεις που περιέχουν N όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, ουρία και συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων βακτηρίων ή μυκήτων μετατρέπονται σε NH_4^+ . Με τον θάνατο των οργανισμών, αποδομητές όπως βακτήρια και μύκητες καταναλώνουν και αποδομούν την οργανική ύλη και σημαντική ποσότητα αζώτου που περιέχεται στο νεκρό οργανισμό μετατρέπεται σε αμμώνιο. Το άζωτο σε αυτή τη μορφή είναι διαθέσιμο να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά ή να μετατραπεί σε νιτρικά μέσω της νιτροποίησης (Μπρουζιώτης, Α., 2019).

1.2.3 Νιτροποίηση

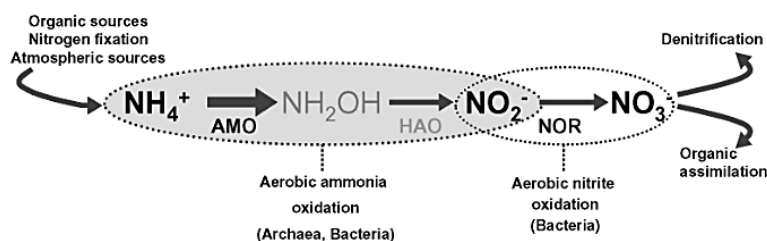
Η νιτροποίηση είναι η διαδικασία οξείδωσης του αμμωνιακού αζώτου (NH_4^+) σε νιτρώδη (NO_2^-) και στη συνέχεια σε νιτρικά (NO_3^-) (Casciotti et al., 2011), ώστε να αυξηθεί η διαθεσιμότητα αζώτου στα φυτά μέσα από τη μετατροπή του σε μια πιο αφομοιώσιμη μορφή. Πρόκειται για μια διαδικασία δύο διαδοχικών βημάτων, αυτό της νιτρωδοποίησης και αυτό της νιτρικοποίησης.

Η νιτρωδοποίηση [1] αποτελεί την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα και αποτελεί το ρυθμοκαθοριστικό βήμα της νιτροποίησης. Η νιτρικοποίηση [2] αποτελεί την οξείδωση των νιτρωδών ιόντων σε νιτρικά ιόντα. Οι δύο αντιδράσεις παρουσιάζονται παρακάτω:



Η νιτρωδοποίηση χωρίζεται σε δύο επιπλέον στάδια κατά τα οποία σχηματίζεται μια ενδιάμεση ένωση, η υδροξυλαμίνη (NH_2OH), μέσω του ενζύμου μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO). Στην πορεία η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται προς νιτρώδη με το ένζυμο οξειδοορεδουκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO) (Arg, 2009).

Η νιτρικοποίηση απαιτεί τη δράση του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NOR).



Εικόνα 2: Η διαδικασία της νιτροποίησης και οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτή

Η νιτρωδοποίηση πραγματοποιείται από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacterium, AOB) και αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea, AOA) ενώ η νιτρικοποίηση από νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite oxidizing bacteria, NOB). Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της νιτροποίησης απαιτείται η συμμετοχή μικροοργανισμών που διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα, δηλαδή της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας, της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης και της οξειδοαναγωγής των νιτρωδών (Μπρουζιώτης, Α., 2019).

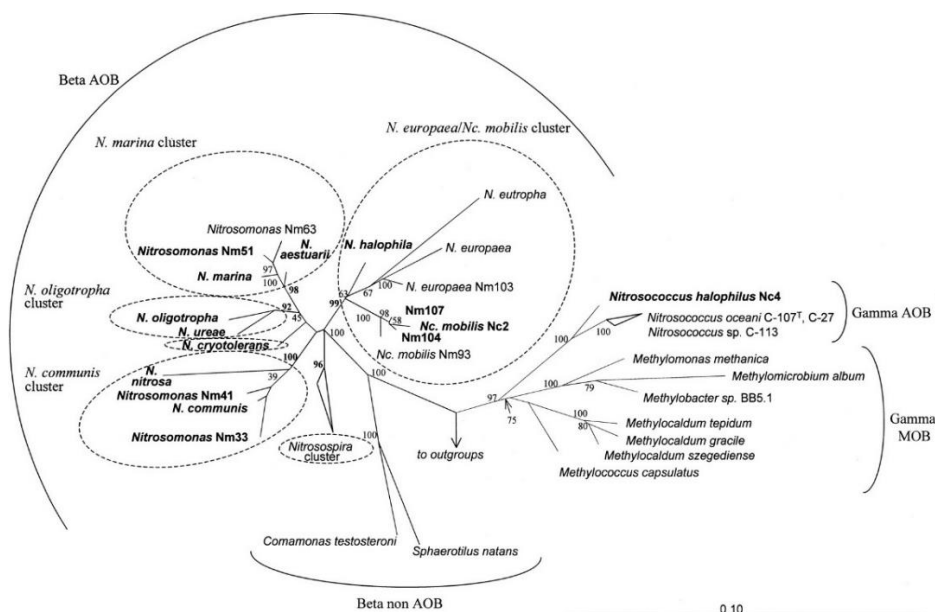
Γενικά η νιτροποίηση είναι μια διαδικασία που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Συνθήκες όπως η θερμοκρασία του εδάφους, η υγρασία και το pH μπορούν να επηρεάσουν τους ρυθμούς νιτροποίησης στο έδαφος (Izaurralde et al., 2012).

1.2.4 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

Στη νιτροποίηση συμμετέχουν βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB: *Nitrosomonas spp.*, *Nitrosococcus spp.*, *Nitrospira spp.*, *Nitrosolobus spp.*, και *Nitrosovibrio spp.*), βακτήρια που μετατρέπουν τα νιτρώδη σε νιτρικά (nitrite-oxidizing bacteria, NOB: *Nitrobacter spp.*, *Nitrococcus spp.*, *Nitrospira spp.*, και *Nitrospina spp.*). Στην οξείδωση της αμμωνίας συμμετέχουν και αρχαία (ammonia-oxidizing archaea, AOA) τα οποία, μάλιστα, υπερτερούν αριθμητικά έναντι των βακτηρίων σε ουδέτερα και όξινα εδάφη (Huang et al., 2021). Το 2015 αναγνωρίστηκαν μικροοργανισμοί που μπορούν να εκτελέσουν μόνοι τους την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά, τα comammox βακτήρια (complete ammonia oxidizing bacteria) (Daims et al., 2015).

1.2.4.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Πριν βρεθούν τα Κρεναρχαιωτικά το 2004, τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) θεωρούνταν τα μόνα που συμβάλλουν στην οξείδωση της αμμωνίας (He et al., 2018). Το 1890 επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των βακτηρίων σε αυτή τη διαδικασία με την απομόνωση ενός μικροοργανισμού οξειδωτή της αμμωνίας (Winogradsky, 1890). Τα AOB αρχικά ταξινομήθηκαν βάσει μορφολογικών κριτηρίων, κυρίως από τη διάταξη των εσωτερικών τους μεμβρανών. Το 1993 ταξινομήθηκαν πρώτη φορά με βάση τις αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA και έκτοτε μελέτες έδειξαν ότι τα βακτήρια αυτά ανήκουν στις κλάσεις β- και γ-πρωτεοβακτηρίων και κατατάσσονται στα γένη *Nitrospira*, *Nitrosomonas* και *Nitrosococcus* (Monteiro et al., 2014).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA που αντικατοπτρίζει τις σχέσεις του AOB και αρκετών οργανισμών αναφοράς (Purkhold et al., 2000)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (*amoA*) έχει αξιοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό ως μοριακός δείκτης για τη διερεύνηση της ποικιλότητας των AOB σε φυσικά οικοσυστήματα. Το ένζυμο κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο που περιλαμβάνει τρία γονίδια (*amoC*, *amoA*, και *amoB*) (Chain et al., 2003). Αν και η φυλογένεση που βασίζεται στις αλληλουχίες των γονιδίων 16S rRNA και *amoA* ήταν παρόμοια, η τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου που βασίζεται στις αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA εμφάνιζε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (Purkhold et al., 2003).

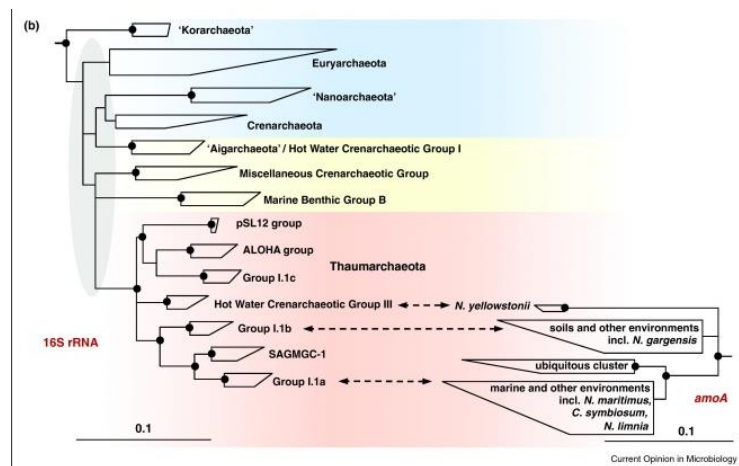
Τα AOB έχουν κατηγοριοποιηθεί στους χημειοαυτότροφους μικροοργανισμούς και έχουν το γενετικό υπόβαθρο που απαιτείται για την οξείδωση της αμμωνίας. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούν το CO₂ και παίρνουν ενέργεια από την αντίδραση οξείδωσης της αμμωνίας. Στην πορεία της εξέλιξής τους ανέπτυξαν εξειδικευμένα δίκτυα φορέων ηλεκτρονίων για να δημιουργήσουν κινητήρια δύναμη πρωτονίων, χρησιμοποιώντας την αμμωνία ως μοναδική πηγή ενέργειας (Stein, 2019).

Τα AOB βρίσκονται στα περισσότερα αερόβια περιβάλλοντα όπου η αμμωνία είναι διαθέσιμη μέσω της ανοργανοποίησης της ύλης, όπως σε λιπάσματα και απόβλητα (Kowalchuk & Stephen, 2001). Έχουν βρεθεί σε εδάφη, λίμνες, θαλάσσια οικοσυστήματα, εκβολές ποταμών, θερμές πηγές, ιζήματα, εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, συστήματα πόσιμου νερού (Stein, 2019) .

Η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) είναι ένα διαμεμβρανικό ένζυμο πολλαπλών υπομονάδων που καταλύει την πρώτη αντίδραση στη νιτροποίηση δηλαδή τη μετατροπή της αμμωνίας ή των αμμωνιακών σε υδροξυλαμίνη. Η δεύτερη αντίδραση αφορά τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη και καταλύεται από ένα ένζυμο που σχετίζεται με το περίπλασμα, την οξειδοοδουκτάση της υδροξυλαμίνης (HAO). Δύο από τα ηλεκτρόνια που παράγονται στη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιούνται για να αντισταθμίσουν την είσοδο ηλεκτρονίων της πρώτης αντίδρασης, ενώ τα άλλα δύο περνούν μέσω μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην τερματική οξειδάση, δημιουργώντας έτσι μια κινητήρια δύναμη πρωτονίου με τελικό δέκτη το O₂ (Kowalchuk & Stephen, 2001).

1.2.4.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Ο πρώτος μικροοργανισμός που φάνηκε να ανήκει στα AOA απομονώθηκε το 2005 και ήταν ο *Nitrosopumilus maritimus*, ένας θαλάσσιος οργανισμός που σχετίζεται στενά με έναν πληθυσμό πλαγκτονικών θαλάσσιων αρχαίων που εντοπίστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990 (Stahl & de la Torre, 2012). Τα AOA κατατάσσονται στο φύλο Thaumarchaeota και χωρίζονται στα lineages *Nitrosopumilales*, *Candidatus Nitrosotaleales*, *Nitrososphaerales* και *Ca. Nitrosocaldales* (Kim et al., 2021). Η κατάταξη έγινε με βάση την αλληλουχία της μονοουγενιάσης της αμμωνιάς, *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA (Stahl & de la Torre, 2012).



Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA των Thaumarchaeota (Pester et al., 2011)

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα AOA σε θάλασσες και εδάφη μπορούν να χρησιμοποιήσουν όχι μόνο την αμμωνία αλλά και οργανικές ενώσεις αζώτου όπως η ουρία ως πρόσθετη πηγή ενέργειας (Jung et al., 2016; Kitzinger et al., 2019). Έχει προταθεί, επίσης, η μεταβολική ευελιξία των AOA καθώς πέρα από την χημειοαυτοτροφική ανάπτυξή τους, υπάρχουν ενδείξεις ετερότροφου ή μιξοτροφικού μεταβολισμού (Kato et al., 2019; Ren et al., 2019).

Έχει αποδειχθεί ότι τα AOA είναι άφθονα και παρόντα σε ποικίλα περιβάλλοντα. Κάποια από αυτά είναι χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα, ιζήματα, βιοαντιδραστήρες μονάδων επεξεργασίας λυμάτων (Park et al., 2006), θερμές πηγές (Hatzepichler et al., 2008). Τα AOA εμφανίζουν ποικιλία βέλτιστων ανάπτυξης pH και θερμοκρασίας (Gubry-Rangin et al., 2017). Συγκεκριμένοι οικότυποι AOA προτιμούν χερσαία οικοσυστήματα με χαμηλό pH (Gubry-Rangin et al., 2017), κάτι που τα καθιστά μεταγραφικά πιο ενεργά από τα AOB και επομένως πρωταγωνιστές στη νιτροποίηση σε τέτοια περιβάλλοντα (Zhang et al., 2012).

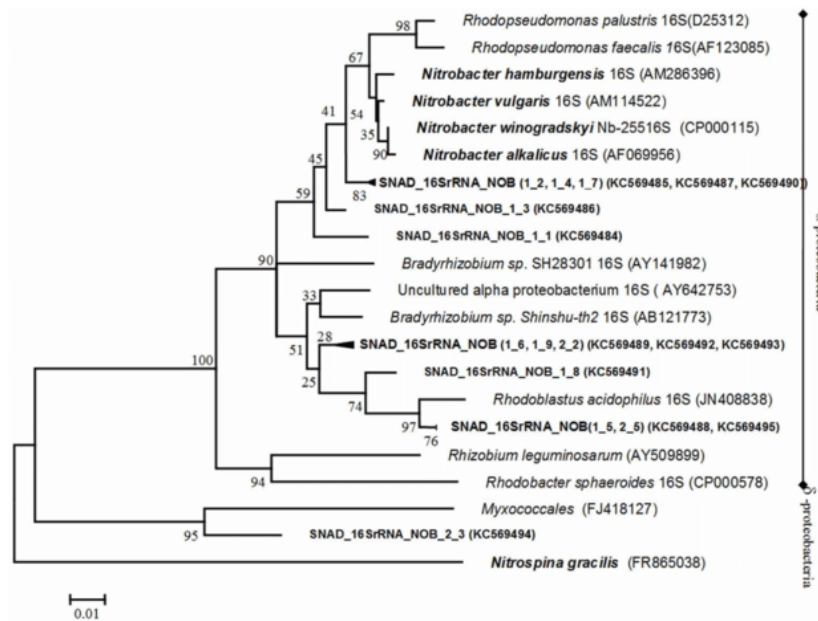
Τα AOA φέρουν ομόλογα γονίδια μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) με αυτά των βακτηρίων ώστε να λάβουν την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξή τους από την οξείδωση της αμμωνίας. Η AMO ανήκει στην οικογένεια των μονοοξυγενασών με μονοατομικό ενεργό κέντρο χαλκού (CuMMOs), οι οποίες είναι ετεροτριμερείς (Tavormina et al., 2011). Τα γονίδια *amoA*, *amoB* και *amoC* κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες των AMO και στα AOA τα αντίγραφα *amoA* και *amoB* βρίσκονται μόνο μια φορά, σε αντίθεση με τα AOB όπου μπορεί να εμφανιστούν περισσότερες (Arg et al., 2007). Η AMO των AOA αποκλίνει πολύ από αυτή των AOB σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας (Wright et al., 2020). Η χρήση του γονιδίου *amoA* ως δείκτη είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της κατανομής και της ποικιλομορφίας των AOA. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τη δομή και τη βιοχημεία της AMO των AOA και πώς διαφέρει από των AOB καθώς είναι δύσκολο να καθαριστεί η ενεργή AMO και να μελετηθεί (Wright et al., 2020).

Παλαιότερα δεν ήταν σαφές εάν η AMO στα αρχαία καταλύει την ίδια αντίδραση με την αντίστοιχη βακτηριακή, επειδή δεν είχε βρεθεί σε κανένα γονιδίωμα AOA ομόλογο HAO, ένζυμο που μετατρέπει την NH_2OH σε νιτρώδη (Walker et al., 2010). Ωστόσο ήταν σίγουρο ότι σε όλα τα πιθανά μονοπάτια συμμετέχουν δύο ηλεκτρόνια στη δημιουργία κινητήριας δύναμης πρωτονίων και οδηγούν στη διατήρηση της ενέργειας μέσω μιας ATPάσης (Bock & Wagner, 2006). Πλέον είναι γνωστό ότι η AMO των AOA κάνει ακριβώς την ίδια δουλειά με αυτή των AOB αλλά ομόλογα της HAO, που καταλύουν την οξείδωση της υδροξυλαμίνης, απουσιάζουν στα AOA. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι για την ολοκλήρωση της αντίδρασης απαιτείται ένα διαφορετικό σύστημα ενζύμων που χρήζει πειραματικής επαλήθευσης (Schatteman et al., 2022).

1.2.4.3 Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

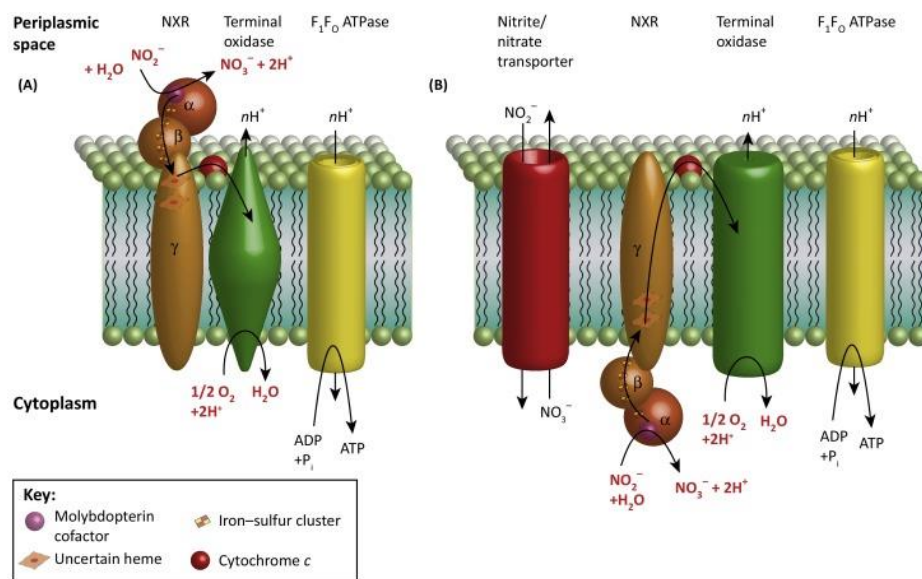
Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια εκτελούν το δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, την νιτρικοποίηση. Είναι χημειολιθοαυτοτροφικά και κερδίζουν ενέργεια από την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά (Sorokin et al., 2012). Ορισμένα μέλη *Nitrobacter* και *Nitrospira* επωφελούνται από την παρουσία απλών οργανικών ενώσεων εκτός από τα νιτρώδη και το CO_2 (Bock et al., 1990) και ορισμένα στελέχη *Nitrobacter* μπορούν να αναπτυχθούν εντελώς ετερότροφα (Bock, 1976). Το 1892 απομονώθηκε το πρώτο NOB από το γένος *Nitrobacter*. Από τότε ο αριθμός των απομονωθέντων NOB ήταν πολύ περιορισμένος λόγω των δυσκολιών ανάπτυξής τους σε εργαστηριακές συνθήκες (Sorokin et al., 2012). Τα NOB κατατάσσονται στα γένη *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrolancea* και *Candidatus Nitromaritima*, ένα νέο υποψήφιο γένος θαλάσσιου NOB. Το *Nitrospira* είναι το πιο συχνά απαντούμενο γένος NOB και είναι πανταχού παρόν στη φύση (Daims et al., 2016).

Εμφανίζονται σε πολλά εδαφικά και θαλάσσια οικοσυστήματα, σε θερμές πηγές και σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Lücker et al., 2010). Γενικά η παρουσία NOB στο περιβάλλον έχει συνδεθεί με τη νιτροποίηση (Lücker et al., 2013).



Εικόνα 5: Φυλογενετικό δέντρο των NOB βασισμένο σε αλληλουχίες γονιδίου 16S rRNA (Langone et al., 2014).

Το βασικό ένζυμο των NOB είναι η νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NXR) η οποία οξειδώνει τα νιτρώδη σε νιτρικά και μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια ανά αντίδραση στην αναπνευστική αλυσίδα (Lücker et al., 2013). Έχουν βρεθεί δύο τύποι NXRs που σχετίζονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και πιθανώς αποτελούνται από τρεις υπομονάδες NxrA, NxrB, and NxrC (Sundermeyer-Klinger et al., 1984). Το NxrA και ειδικά το NxrB αποτελούν φυλογενετικούς δείκτες για την ανίχνευση NOB. Οι δύο τύποι NXR εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και πιθανώς εξαπλώθηκαν σε διαφορετικούς οργανισμούς, προκαλώντας τη μεγάλη φυλογενετική ποικιλότητα των NOB (Lücker et al., 2010).



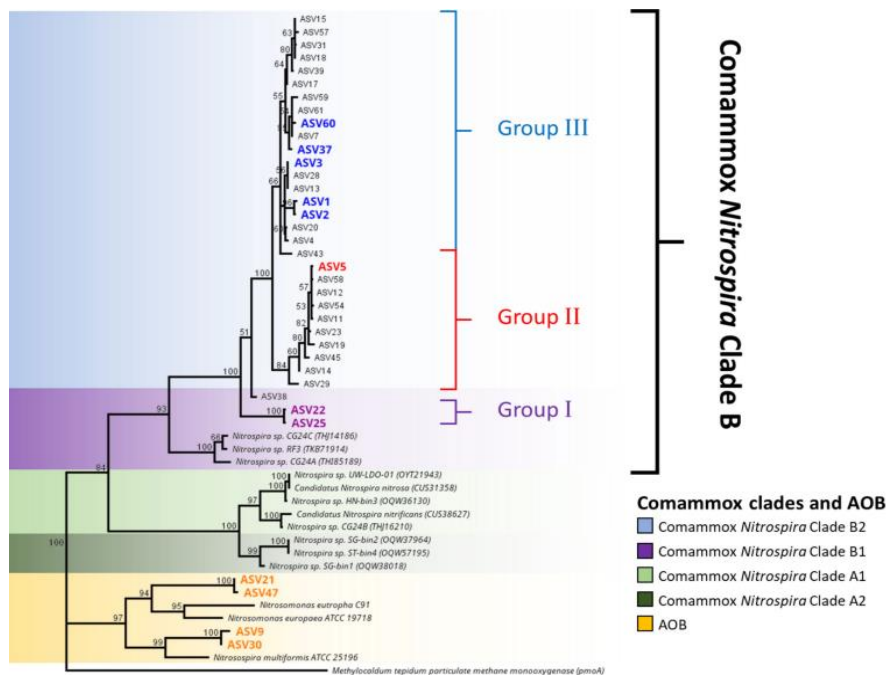
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των δύο τύπων νιτρώδων οξειδοαναγωγασών (NXR) και της υποτιθέμενης ροής ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση των νιτρωδών (Daims et al., 2016).

1.2.4.4 Comammox

Το 2015 αναγνωρίστηκαν μικροοργανισμοί που μπορούν να εκτελέσουν την πλήρη οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά, τα comammox βακτήρια (complete ammonia oxidizing bacteria) (Daims et al., 2015). Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν το πλήρες γενετικό υπόβαθρο για την οξείδωση αμμωνίας και νιτρωδών χρησιμοποιώντας τα ένζυμα μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και αφυδρογονάση της υδροξυλαμίνης (HAO) (van Kessel et al., 2015). Η NXR του comammox είναι πολύ παρόμοιο με το NXR των *Nitrospira*, ένζυμο οξείδωσης των νιτρωδών (Daims et al., 2016).

Φυλογενετικά κατατάσσονται στα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) και με μεταγονιδιωματική ανάλυση φάνηκε να ανήκουν στο γένος *Nitrospira* (Koch et al., 2018) αλλά και σε άλλα γένη των NOB. Είναι ευρέως διαδεδομένα σε χερσαία συστήματα όπως εδάφη, υγροτόπους, ιζήματα γλυκού νερού, υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες και συστήματα διανομής νερού (Huang et al., 2021). Η φυσιολογία των βακτηρίων comammox υποδηλώνει ότι είναι προσαρμοσμένα σε εξαιρετικά ολιγοτροφικά περιβάλλοντα λόγω της υψηλής συγγένειας υποστρώματος για την αμμωνία, του συγκριτικά χαμηλού ρυθμού οξείδωσης και αυξημένης ανάπτυξης σε σύγκριση με τους κανονικούς νιτροποιητές (Hu & He, 2017). Αφθονία των *Nitrospira* που υπερβαίνει τις αφθονίες των AOB και AOA στον ίδιο βίοτοπο, μπορεί να αποτελούν ένδειξη παρουσίας comammox (Palomo et al., 2016). Περαιτέρω έρευνες μπορεί να οδηγήσουν σε στρατηγικές χειρισμού κυρίως της νιτροποίησης

με σκοπό τη μεγιστοποίηση της αποδοτικότητας και τη βελτίωση της παραγωγικότητας στη γεωργία (Hu & He, 2017).



Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε αλληλουχίες του γονιδίου amoA των οξειδωτικών βακτηρίων αμμωνίας και των comammox *Nitrospira* (Hsu et al., 2022).

1.2.4.5 Anammox

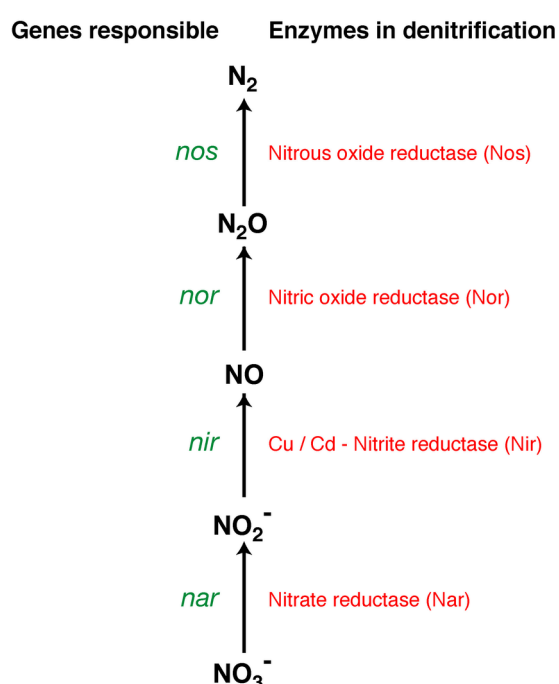
Τα αναερόβια βακτήρια οξείδωσης της αμμωνίας (anaerobic ammonium-oxidizing, anammox) είναι η τελευταία σημαντική προσθήκη στον κύκλο του αζώτου (Kartal et al., 2012) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία λυμάτων. Πρόκειται για βακτήρια που μετατρέπουν το αμμώνιο (NH_4^+) σε αέριο άζωτο (N_2) χρησιμοποιώντας ενδοκυτταρικούς δέκτες ηλεκτρονίων όπως τα νιτρώδη (NO_2^-) ή το μονοξείδιο του αζώτου (NO) (Shaw et al., 2020). Αυτό επιτυγχάνεται ενεργοποιώντας την ενδιάμεση ένωση υδραζίνη (N_2H_4), χρησιμοποιώντας την οξειδωτική δύναμη του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η υδραζίνη μέσω του ενζύμου συνθάση της υδραζίνης μετατρέπεται τελικά σε ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2). Το απαραίτητο αυτό ένζυμο υπάρχει σε ένα ενδοκυτταρικό οργανίδιο γνωστό ως αναμοξόσωμα (anammoxosome) και αποτελεί το 50-70% του κυτταρικού όγκου. Το αναμοξόσωμα περιβάλλεται από κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες αποτελούνται από λιπίδια ladderane και είναι μοναδικές στη φύση (Kartal et al., 2012).

Τα βακτήρια Anammox αναπτύσσονται αργά και υπολογίζεται ότι είναι υπεύθυνα για περισσότερο από 50% των απωλειών αζώτου στους ωκεανούς. Έχουν εντοπιστεί σε μικροβιακά συσσωματώματα που λήφθηκαν από βιολογική επεξεργασία λυμάτων, σε πολλά

θαλάσσια οικοσυστήματα με περιορισμένο οξυγόνο, συμπεριλαμβανομένων ωκεανών, θαλασσών, εκβολών ποταμών, ποταμών και μεγάλων λιμνών (Jetten et al., 2009).

1.2.5 Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι η βιοχημική διαδικασία με την οποία απονιτροποιητικά βακτήρια μετατρέπουν τα νιτρικά σε αέρια προϊόντα, δηλαδή NO, N₂O και τελικά N₂. Το πρώτο βήμα, η αναγωγή NO₃⁻ σε NO₂⁻, επιτυγχάνεται μέσω του ενζύμου αναγωγάση ή ρεδουκτάση των νιτρικών (nitrate reductase), μια μεμβρανική πρωτεΐνη. Η σύνθεση της αναγωγάσης αναστέλλεται από O₂ και γι' αυτό η απονιτροποίηση είναι μια ανοξική διαδικασία (Ντούγιας et al., 2012).



Εικόνα 7: Μονοπάτι με τα βήματα απονιτροποίησης. Αναγράφονται τα γονίδια (πράσινο) και τα ένζυμα (κόκκινο) που εμπλέκονται σε κάθε βήμα (Ginige, 2003).

Η απονιτροποίηση έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη γεωργία, λόγω απώλειας αζωτούχων λιπασμάτων. Σε άλλες διεργασίες όπως στην επεξεργασία αποβλήτων, είναι απαραίτητη, καθώς μέσω αυτής μειώνεται η ποσότητα διαθέσιμου αζώτου και αποφεύγεται ο ευτροφισμός (Ντούγιας et al., 2012).

Κάποιοι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό απονιτροποίησης είναι η διαθεσιμότητα νιτρικών, οργανικού υποστρώματος και η συγκέντρωση οξυγόνου (Butterbach-Bahl & Dappennmann, 2011). Σύμφωνα με τους Philipprot et al., το 5% όλων των βακτηρίων του εδάφους μπορεί να εκτελέσει απονιτροποίηση (2007).

Περισσότερα από 50 γένη βακτηρίων μπορούν να εκτελέσουν απονιτροποίηση (Ambus & Zechmeister-Boltenstern, 2007). Μερικοί απονιτροποιητές είναι τα *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas denitrificans*, ο *Bacillus megaterium*, το *Escherichia coli*, το *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς και ορισμένα θειούχα βακτήρια όπως ο *Thiobacillus denitrificans* (Philippot et al., 2007).

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην απονιτροποίηση είναι αναγωγάσες, οι οποίες τροφοδοτούνται με ηλεκτρόνια από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της μεμβράνης. Η απονιτροποίηση, επομένως, σχετίζεται με την βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη (Hochstein & Tomlinson, 1988).

Πολλά βακτήρια και αρχαία δεν διαθέτουν το σύνολο των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την πλήρη απονιτροποίηση, γεγονός που προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα αφού η ατελής απονιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση αζωτούχων αερίων όπως μονοξείδιο (NO) και υποξείδιο του αζώτου (N₂O), σημαντικά αέρια του θερμοκηπίου (Stein & Klotz, 2016).

1.3 Σημασία της νιτροποίησης

Το μοριακό άζωτο (N₂) αποτελεί το 78% της ατμόσφαιρας και είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη ζωή. Αυτή η μορφή, όμως, δεν είναι εύκολα αφομοιώσιμη από τους περισσότερους οργανισμούς λόγω του ισχυρού τριπλού δεσμού μεταξύ των δύο ατόμων αζώτου (Galloway et al., 2004).

Τα φυτά για να αξιοποιήσουν το άζωτο χρειάζονται τη βοήθεια νιτροποιητικών μικροοργανισμών οι οποίοι με τη διαδικασία της νιτροποίησης παρέχουν νιτρικά ιόντα σε αυτά. Έτσι διατηρείται η γονιμότητα του εδάφους, γεγονός επωφελές για τη γεωργία και την οικονομία (Subbarao et al., 2006; Qiao et al., 2015).

Στις γεωργικές δραστηριότητες οφείλεται περίπου το 70% των εκπομπών υποξειδίου του αζώτου (N₂O), ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου και σημαντικός ατμοσφαιρικός ρύπος (Signor and Cerri, 2013). Με τις διαδικασίες της νιτροποίησης και της πλήρους απονιτροποίησης επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των παραγόμενων επιβλαβών αερίων (Wrage et al., 2001).

Τα βιομηχανικά και οικιακά λύματα είναι εμπλουτισμένα με νιτρικά (Hwang et al., 2010). Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση είναι ένα καλό εργαλείο στη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων (Tchobanoglous et al., 2003).

1.4 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ)

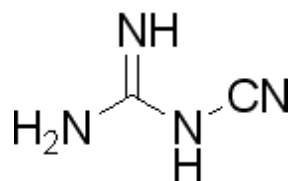
Η χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης (nitrification inhibitors, NIs) είναι μια τεχνική που μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων, να μειώσει την έκλυση νιτρικών και την εκπομπή αερίων όπως N_2O (Ruser & Schulz, 2015).

Η αποφυγή περιβαλλοντικών προβλημάτων επομένως έκανε άμεση την ανάγκη ανάπτυξης τους ώστε να μετριαστεί η εκπομπή αερίων και να αυξηθεί η παροχή αζώτου στα φυτά μέσω της επιβράδυνσης του πρώτου βήματος της νιτροποίησης, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας. Έχει αποδειχθεί ότι με την εφαρμογή ενός παρεμποδιστή νιτροποίησης στο έδαφος μειώνονται οι συγκεντρώσεις NO_3^- καθώς και οι εκπομπές N_2O (Di & Cameron, 2016) ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται πιο αποτελεσματική αξιοποίηση του διαθέσιμου αζώτου από το φυτό.

Οι ΠΝ κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: στους βιολογικούς (ΒΠΝ) και στους συνθετικούς (ΣΠΝ). Οι ΒΠΝ παράγονται από τις ρίζες διαφόρων φυτών, κυρίως αγρωστωδών αλλά και όχι μόνο, για να εμποδίσουν τη νιτροποίηση. Μικρόβια του εδάφους θα μπορούσαν επίσης να παράγουν ενώσεις που αναστέλλουν τη νιτροποίηση, αφού είναι ικανά να παράγουν ένα ευρύ φάσμα μορίων σηματοδότησης και υδρογονανθράκων, συμπεριλαμβανομένου του αιθυλενίου (Ladygina et al., 2006) που θα μπορούσαν να έχουν ανασταλτική δράση (Norton & Ouyang, 2019). Ο πρώτος βιολογικός αναστολέας απομονώθηκε το 2018 από το φυτό *Sorghum bicolor* και ονομάστηκε ΜΗΡΡ. Έκτοτε απομονώθηκαν και αναγνωρίστηκαν άλλοι τέσσερις ΒΠΝ (Coskun et al., 2017).

Οι ΣΠΝ παράγονται χημικά στο εργαστήριο και η χρήση τους εμφανίζει διάφορα προβλήματα, όπως δυσκολίες στην εφαρμογή, υψηλό κόστος, κίνδυνο ρύπανσης και τον κίνδυνο εισόδου στην τροφική αλυσίδα. Στους κυριότερους συνθετικούς αναστολείς νιτροποίησης ανήκουν η νιτραπυρίνη, το δικυανδιαμίδιο (DCD), το DMPP, το ακετυλένιο, η allylthiourea και το DMPSA (Coskun et al., 2017).

1.4.1 Δικυανδιαμίδιο, DCD



Το δικυανδιαμίδιο (DCD - $H_4C_2N_4$) είναι ένας ΣΠΝ που τις τελευταίες δεκαετίες έχει λάβει σημαντική προσοχή λόγω του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητάς του (Trenkel, 2010). Είναι μια λευκή, μη πτητική, αλκαλική, κρυσταλλική, άοσμη σκόνη (Tudi et al., 2021b). Περιέχει περίπου 65% N (Trenkel, 2010) και έχει υψηλή υδατοδιαλυτότητα 40 g/L (25 °C). Το DCD έχει ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών χρήσεων (ODDA, 1995). Είναι η πρώτη ύλη της μελαμίνης, ενδιάμεσο της σύνθεσης γεωργικών φαρμάκων και βαφών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως συστατικό σε πρόσθετα τροφίμων που έχουν εγκριθεί από την USFDA (OECD 2003) (Di & Cameron, 2016).

Σχηματίζεται από το κυαναμίδιο του ασβεστίου ($CaCN_2$), ένα λίπασμα του οποίου ένα μέρος σε υψηλή συγκέντρωση κυαναμιδίου μετατρέπεται σε δικυανδιαμίδιο (DCD) (Nommik H., 1958). Στο έδαφος, το DCD αποσυντίθεται εν μέρει αβιοτικά και εν μέρει βιοτικά από συγκεκριμένα ένζυμα και μετατρέπεται μέσω γουανυλουρίας και γουανιδίνης σε ουρία και/ή αμμωνία (Amberger 1989).

Λειτουργεί αναστέλλοντας το πρώτο βήμα της νιτροποίησης, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας μέσω απενεργοποίησης της μονοοξυγενάσης της αμμωνία (Amberger, 1989). Το DCD είναι βακτηριοστατικό, αφού αναστέλλει προσωρινά χωρίς να σκοτώνει τα βακτήρια του γένους *Nitrosomonas*, τα οποία οξειδώνουν την αμμωνία (Di & Cameron, 2016). Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι μειώνει την έκλυση NO_3^- και τις εκπομπές N_2O (Malcolm et al., 2014b). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του DCD που έχει προταθεί είναι: i) η άμεση δέσμευση και αλληλεπίδραση με την μονοοξυγενάση της αμμωνίας, μπλοκάροντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα κυτοχρώματα (Benckiser et al., 2013) και ii) απομάκρυνση του χαλκού (Cu) που δρα ως συν-παράγοντας της AMO (Ruser & Schulz, 2015).

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα του DCD στη μείωση των απωλειών έκλυσης N_2O και NO_3^- από το έδαφος εξαρτάται από την εμμονή του στο έδαφος, η οποία είναι συνάρτηση του τύπου του εδάφους και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Tudi et al., 2021). Για παράδειγμα, η θερμοκρασία του εδάφους έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα αναστολής (McGeough et al., 2016), λόγω της επίδρασης στη μικροβιακή δραστηριότητα, και επομένως στην κινητική της νιτροποίησης.

Μελέτες για μακροχρόνιες επιπτώσεις του DCD δεν έχουν γίνει πολλές. Οι Guo et al. (2013) ερευνήσαν την επίδραση της μακροχρόνιας εφαρμογής DCD στη μικροβιακή βιομάζα, στη δραστηριότητα πρωτεασών και απαμινασών και στην αφθονία βακτηρίων και αρχαίων σε τρία εδάφη βοσκοτόπων. Επτά χρόνια εφαρμογής DCD δεν επηρέασαν κανέναν από τους παράγοντες που διερευνήθηκαν και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος ΣΠΝ φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική τεχνολογία περιορισμού έκπλυσης νιτρικών και εκπομπών υποξειδίου του αζώτου, χωρίς να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην αφθονία βακτηρίων και αρχαίων αλλά ούτε σε βασικές ενζυμικές δραστηριότητες στο έδαφος (Ruser & Schulz, 2015).

1.4.2 Πλεονεκτήματα χρήσης του DCD

Το DCD παρουσιάζει χαμηλή τάση ατμών και υψηλή υδατοδιαλυτότητα, χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό ΠΝ για εφαρμογή σε εδάφη σε υγρή ή λασπώδη μορφή (Moir et al., 2007). Επιπλέον, δεν αφήνει υπολείμματα στο έδαφος, αφού διασπάται σε ουρία και στη συνέχεια σε CO₂ και NH₃ (Amberger, 1989). Η ανασταλτική δράση του περιορίζεται στους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία. Δεν φαίνεται να επηρεάζει άλλα μέλη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, όπως, τα μεθανότροφα (Moir et al., 2007) ή άλλα βακτήρια (O'Callaghan et al., 2010). Επιπλέον, πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι μετά από πολυετή χρήση δεν επηρεάζει δυσμενώς άλλες ενζυμικές δραστηριότητες (Guo et al., 2013). Τέλος, το DCD δεν φαίνεται να έχει μεταλλαξογόνο δράση, δεν είναι καρκινογόνο και δεν ενέχει κινδύνους στην ανθρώπινη υγεία (Trenkel, 2010).

1.5. Σκοπός του πειράματος

Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν γίνει για την μελέτη της αποτελεσματικότητας του DCD στα γεωργικά εδάφη τόσο ως προς την κύρια δράση του, δηλαδή την παρεμπόδιση της νιτροποίησης, όσο και ως προς τον περιορισμό διάφορων άλλων μονοπατιών όπως η παραγωγή υποξειδίου του αζώτου μέσω της οδού της απονιτροποίησης, ελάχιστα γνωρίζουμε σήμερα για την αποδόμηση του DCD στο έδαφος αλλά κυρίως τον ρόλο των μικροοργανισμών σε αυτήν. Σήμερα είναι γνωστό ότι για άλλες ομάδες χημικών που χρησιμοποιούνται στα γεωργικά εδάφη, όπως τα γεωργικά φάρμακα, η επαναλαμβανόμενη χρήση τους στα γεωργικά εδάφη οδηγεί σε απώλεια της βιολογικής τους δράσης λόγω της ανάπτυξης μικροοργανισμών που εμφανίζουν εξειδικευμένη αποδομητική δράση και τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους (Arbeli & Fuentes, 2007). Το φαινόμενο αυτό δεν έχει μελετηθεί για παραδοσιακούς ΣΠΝ όπως το DCD του οποίου η χρήση πραγματοποιείται επί σειρά ετών σε ορισμένους αγρούς.

Έτσι στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας εξετάστηκε η απόκριση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ΠΝ DCD. Ειδικότερα μελετήθηκε εάν η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή στο έδαφος οδηγεί σε εμφάνιση αυξημένης δράσης του έναντι των μικροοργανισμών-στόχων (AOM) ή σε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και δη μειωμένη δράση έναντι των AOM.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Για τη διεξαγωγή του πειράματος πάρθηκαν δύο δείγματα εδάφους από αγρούς με αχλαδιές στην περιοχή της Λάρισας. Το ένα έδαφος είχε προηγούμενη έκθεση στον αναστολέα νιτροποίησης DCD και ονομάστηκε History Soil (His). Το άλλο έδαφος δεν είχε υποστεί προηγουμένως επεξεργασία με κάποιο σταθεροποιημένο λίπασμα και επομένως ονομάστηκε Non-History Soil (NoHis).

Η υπόθεση μας ήταν ότι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή θα οδηγήσει σε ενισχυμένη βιοαποδόμηση του DCD στο έδαφος A, αλλά σε συσσώρευση υπολειμμάτων του DCD στο έδαφος B.

Κάθε έδαφος υπέστη 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις:

1^η δοκιμή: προσθήκη ουρίας και παρεμποδιστή (+u + DCD)

2^η δοκιμή: προσθήκη μόνο ουρίας (+u)

3^η δοκιμή: προσθήκη μόνο παρεμποδιστή (+DCD)

4^η δοκιμή: καμία προσθήκη (control)

Η ουρία χρησιμοποιήθηκε ως λίπασμα, δηλαδή πηγή αζώτου. Για κάθε συνδυασμό μεταχείρισης και εδάφους προετοιμάστηκαν 3 επαναλήψεις και ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 24. Σε κάθε έδαφος πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι εφαρμογής του DCD (με ή χωρίς ουρία) και κάθε κύκλος είχε διάρκεια 6 εβδομάδες. Σε κάθε κύκλο συλλέχθηκαν δείγματα εδάφους σε χρόνους 0, 7, 14, 21, 42 ημέρες και προσδιορίστηκε η αποδόμηση του DCD. Κάθε εφαρμογή περιλάμβανε δόσεις 200 mgN/kg ουρίας και 20 ug/gr εδάφους DCD.

Τα εδάφη από όλες τις μεταχειρίσεις επώαστηκαν στους 20°C και η υγρασία τους προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Η συγκέντρωση DCD και αμμωνιακών στα δύο εδάφη πριν αρχίσει το πείραμα καθώς και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο εδαφών (His, με ιστορικό χρήσης DCD και NoHis χωρίς ιστορικό χρήσης DCD) πριν την έναρξη του πειράματος.

	His Soil	NoHis Soil
DCD	0.5 ug/gr	0 ug/gr
NH₄	130 mgN/kg dry soil	10 mgN/kg dry soil
pH	6.8	7.5



Εικόνες 8 & 9: Φωτογραφίες από την προετοιμασία των δειγμάτων εδάφους με βάση τις μεταχειρίσεις που δέχθηκαν

2.2 Μετρήσεις

2.2.1 Προσδιορισμός των επιπέδων αμμωνιακών (NH_4^+) και νιτρικών (NO_3^-) ιόντων στο έδαφος

Αρχικά είναι απαραίτητος ο σχηματισμός πρότυπης καμπύλης για τη μέτρηση των NH_4^+ και NO_3^- των δειγμάτων μας, αντίστοιχα. Αφού ζυγίστηκαν 2g από κάθε δείγμα εδάφους και προστέθηκαν σε σωληνάρια falcon των 50ml, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 20ml διαλύματος KCl 1M και μετά από έντονη ανάδευση για 30 λεπτά, το κάθε διάλυμα διηθήθηκε σε σωληνάρια falcon των 15ml. Ακολούθησε φωτομέτρηση ή εναλλακτικά, διατήρηση των δειγμάτων στους -20°C έως την ημέρα της φωτομέτρησης.

ΓΙΑ ΤΑ NH_4^+ :

Χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου E. Kandeler et al.. (1988). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση του αμμωνίου σε χλωροαμίνη από το διχλωροϊσοκυανουρικό οξύ του νατρίου και στον σχηματισμό μιας πράσινης ινδοφαινόλης παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον (0,3M NaOH). Αρχικά διαλύθηκαν 0.5 ml διαλύματος αμμωνίου ρύθμισης καμπύλης σε 100 ml KCl 1M και δημιουργήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg N/L. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:2 σε 7 φιαλίδια των 2 ml με σκοπό την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 5 mgN/L έως 0.0195 mgN/L.

Σε σωληνάρια erpendorf 1.5ml προστέθηκαν 600 μl από τα πρότυπα διαλύματα και 600 μl από τα εκχυλίσματα (δείγματα). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300 μl αντιδραστηρίου χρώσης και 120 μl οξειδωτικού διαλύματος. Τα δείγματα έπειτα, εισήχθησαν σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά στις 300rpm. Έπειτα προστέθηκαν 300 μl από κάθε σωληνάριο σε μικροπλάκα 96 θέσεων και πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 660nm.

ΓΙΑ ΤΑ NO_3^- :

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χλωριούχου βαναδίου (VCl_3 / Griess) των Waner et al., (2009). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αναγωγή του νιτρικού σε νιτρώδες με ένα όξινο διάλυμα χλωριούχου βαναδίου (VCl_3) μετά την εκχύλιση με KCl. Η συγκέντρωση των νιτρικών μετρήθηκε με άμεση σύζευξη με την αντίδραση Griess και η απορρόφηση φωτομετρικά στα 540nm. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης διαλύθηκαν 0.5ml KNO_3 stock 1000mgN/L σε 100ml ddH₂O ώστε να παραχθεί διάλυμα συγκέντρωσης 5mg N/L. Με διαδοχικές αραιώσεις 1:2 προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα από 5mg N/L έως 0.02 mg N/L.

Σε σωληνάκια errendorf προστέθηκαν 100μl από κάθε διάλυμα της καμπύλης και από κάθε εκχύλισμα (δείγμα), 100μl ddH₂O για δύο μάρτυρες και στη συνέχεια 100μl χλωριούχου βαναδίου και τέλος ακόμα 100μl μείγματος αντιδραστηρίων Griess 1 και 2. Ο συνολικός τελικός όγκος ήταν 300μl. Τα διαλύματα επωάστηκαν στους 37°C για 60 λεπτά και φωτομετρήθηκαν στα 540nm.

2.2.2 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

Η δυνητική νιτροποίηση αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού του ρυθμού νιτροποίησης στο έδαφος. Ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης (potential nitrification rate) είναι ο μέγιστος ρυθμός μετατροπής των κατιόντων αμμωνίου (NH₄⁺) ή της αμμωνίας (NH₃) σε νιτρώδη (NO₂⁻) ιόντα που συμβαίνει υπό συνθήκες κορεσμού όσον αφορά την παροχή υποστρώματος (NH₄⁺/NH₃) (Hart et al., 1994). Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της Kandeler, (1995).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα (NH₄)₂SO₄ 10mM
- Διάλυμα (NH₄)₂SO₄ 1mM
- Διάλυμα NaClO₃ 1.5M
- Διάλυμα KCl 2M
- Ρυθμιστικό διάλυμα NH₄Cl 0.19M, pH 8.5
- Χρωματικός δείκτης αποτελούμενος από σουλφανιλαμίδιο και υδροχλωρική N-(1-ναφθυλ)- αιθυλενο-διαμίνη
- Πυκνό διάλυμα NaNO₂ (1000μmol NO₂⁻ -N ml⁻¹)
- Διάλυμα εργασίας NaNO₂ (10μmol NO₂⁻ -N ml⁻¹)

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. 5 g από τα εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος (NH₄)₂SO₄ 1mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε NO₂⁻ από τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς και 0.1ml NaClO₃ 1.5M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωτικής των νιτρωδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτρωδών (NO₂⁻) αντί νιτρικών (NO₃⁻) ιόντων και ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος.

2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C για 6 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20°C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτροδοποίησης.
3. Μετά το πέρας των 6 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά προστέθηκαν 5 ml διαλύματος KCl 2M για τη δέσμευση των ιόντων NH_4^+ και NO_3^- , και ακολούθησε σύντομη ανάδευση και διήθηση.
4. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19M) και 2ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- που παράγονται και με τη φωτομέτρηση καταδεικνύει την συγκέντρωσή τους στα διαλύματα.
5. Ακολούθησε ανάδευση και ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος.
6. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 5 ml αποσταγμένο νερό με 3 ml NH_4Cl 0.19M και 2ml χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520nm.

Ποσοτικός προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα εδαφικά δείγματα νιτρωδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 ml διαλύματος, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml, με αποσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και 1.0 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$. Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και 0.5 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl 0.19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520nm (Kandeler, 1995).

2.2.3 Προσδιορισμός της αποδόμησης DCD στα δείγματα εδάφους

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Για τη μέτρηση των υπολειμμάτων DCD στα δείγματα εδάφους αρχικά ζυγίστηκαν 5g από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες falcon των 50ml με 10ml ddH₂O. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στις 250rpm για 60 λεπτά στους 25°C και έπειτα φυγοκέντηση στις 7500rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, πάρθηκαν με πιπέτα 2ml από το υπερκείμενο και επωάστηκαν για 30 λεπτά με 80μl σουλφονικού οξέος 0,66M. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 13.000rpm.

Για την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του DCD χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-UV), μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων και στήλη Athena C18, 120A, (4,6 mm x 150mm, 5μm). Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 218nm. Η παραλαβή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το συνδεδεμένο λογισμικό LabSolution®. Το DCD ανιχνεύθηκε με χρόνο κατακράτησης 3,5 min. Οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς η οποία δημιουργήθηκε με παρασκευή πρότυπου διαλύματος DCD σε ακετονιτρίλιο. Από τα αρχικά πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 μg/ml.

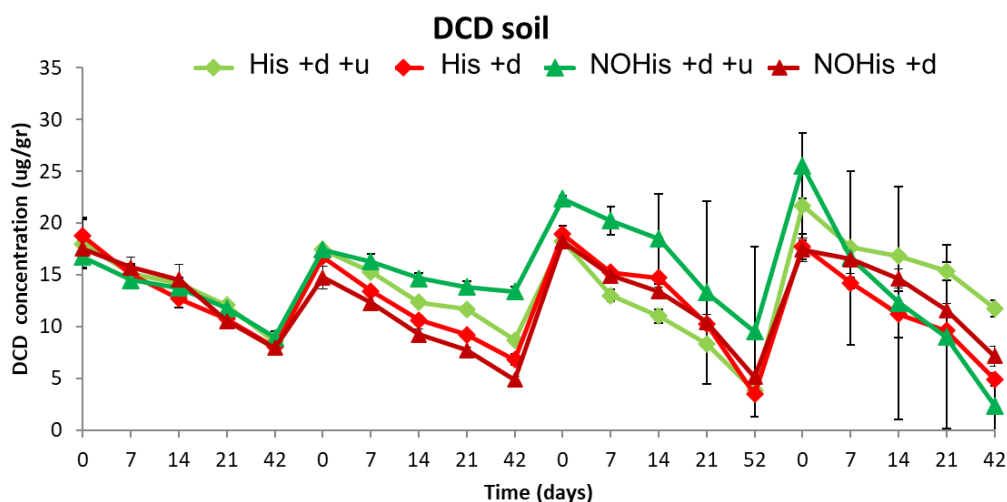
2.3. Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα ανάλυσης νιτρικών και αμμωνιακών, καθώς και τα δεδομένα δυνητικής νιτροποίησης πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20.0. Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά με ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (One way Analysis of Variance, one – way ANOVA) ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της κάθε μεταχείρισης, του χρόνου ή/και της αλληλεπίδρασής τους.

3. Αποτελέσματα

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ DCD ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Στο **Διάγραμμα 1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αποδόμησης του DCD και στα δύο εδάφη (His και NoHis) στις μεταχειρίσεις όπου δέχτηκαν DCD και/ή ουρία. Στον Πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές DT50 και DT90 για κάθε κύκλο εφαρμογής του DCD.



Διάγραμμα 1: Η πορεία αποδόμησης του DCD στα δύο εδάφη: His, με ιστορικό χρήσης DCD που δέχτηκαν εφαρμογή DCD με (DCD+d+u) ή χωρίς ουρία (DCD+d) και NoHis χωρίς ιστορικό χρήσης DCD (DCD+d+u, DCD+d). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

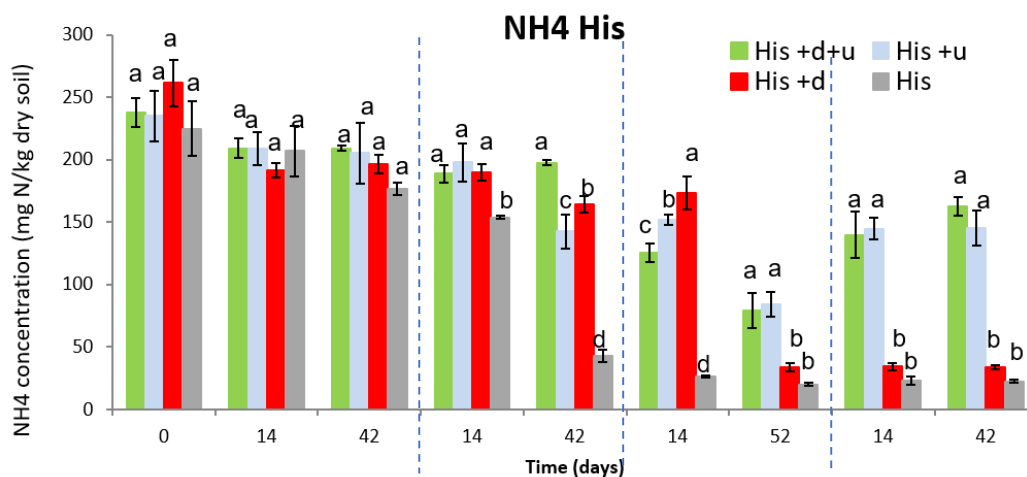
	cycle 1		cycle 2		cycle 3		cycle 4	
	DT50	DT90	DT50	DT90	DT50	DT90	DT50	DT90
his+D+U	39.38	130.8	39.28	130.5	20.36	67.65	48.29	160.4
his+D	31.25	103.8	28.55	94.85	24.15	80.23	22.73	75.51
NOhis+D+U	46.09	153.1	103.4	343.3	38.21	126.9	13.19	43.81
NOhis+D	34.77	115.5	24.1	80.05	28.17	93.56	33.75	112.1

Πίνακας: Οι τιμές DT50 και DT90 στα δύο εδάφη στις μεταχειρίσεις με προσθήκη DCD ή/και ουρίας.

Από αυτά διαπιστώνεται ότι στο έδαφος χωρίς ιστορικό χρήσης DCD όπου εφαρμόστηκε DCD και ουρία στο πλαίσιο του πειράματος (NoHis+d+u) εμφανίζεται μια σταδιακή επιτάχυνση της αποδόμησης του DCD με τις τιμές DT50 να ελαττώνονται από 46,1 και 103,4 ημέρες μετά τις πρώτες δυο εφαρμογές σε 13,2 ημέρες μετά την 4^η εφαρμογή.

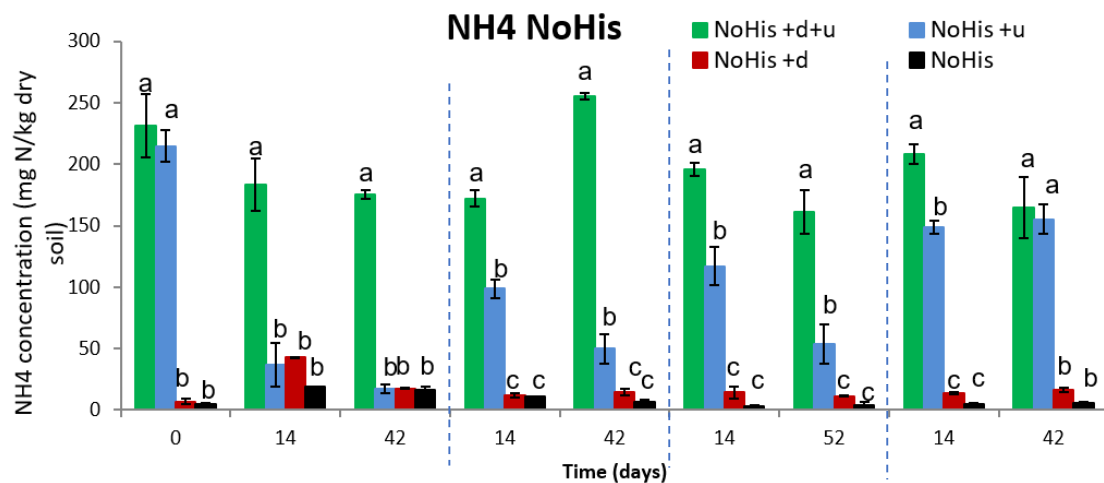
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Η συγκέντρωση αμμωνιακών στα δύο εδάφη His και NoHis παρουσιάζονται ξεχωριστά στα **Διαγράμματα 2** και **3** αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η χρονική διακύμανση της συγκέντρωσης αμμωνιακών στις τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις σε κάθε έδαφος.



Διάγραμμα 2: Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στις τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις που δέχτηκε το His έδαφος στην πορεία των κύκλων εφαρμογής. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

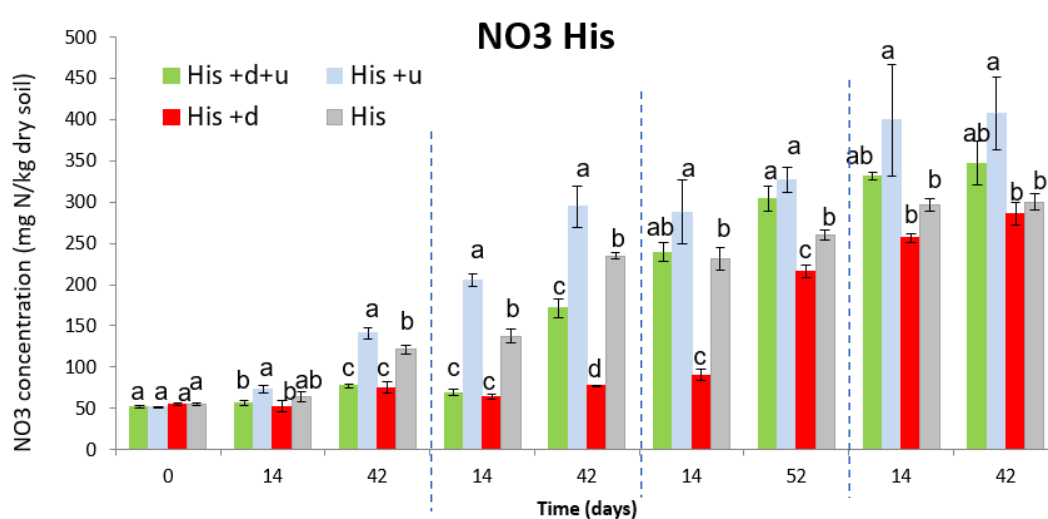
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στο His έδαφος η συγκέντρωση αμμωνιακών διαφέρει στατιστικά στη His και His +d μεταχείριση από τον 2^ο κύκλο ως το τέλος του 3^{ου}. Στον 4^ο κύκλο δεν παρουσιάζεται σημαντική διαφορά και η συγκέντρωση και στις δύο δοκιμές είναι μειωμένη.



Διάγραμμα 3: Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στις τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις που δέχτηκε το NoHis έδαφος στην πορεία των κύκλων εφαρμογής. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

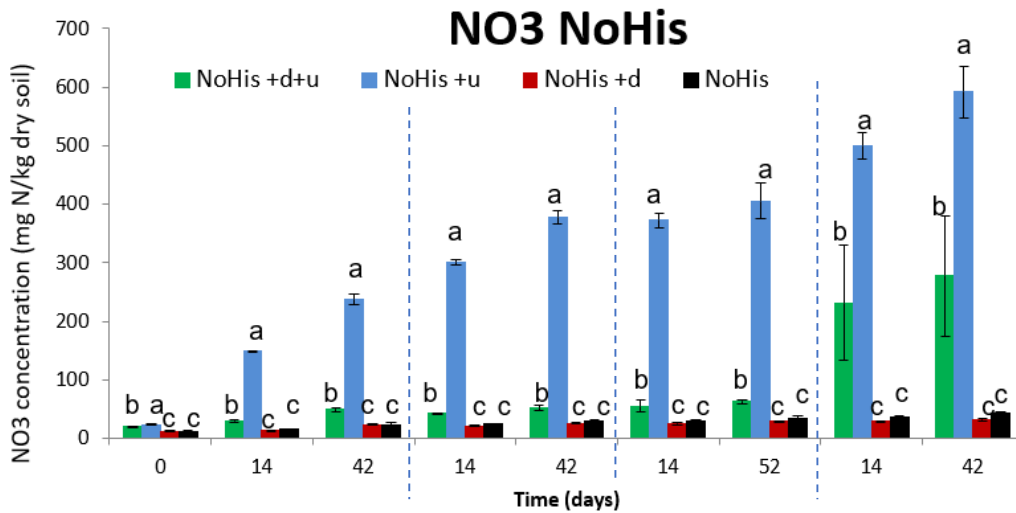
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στο NoHis έδαφος η συγκέντρωση αμμωνιακών διαφέρει σημαντικά από τον 1^ο κίβλας κύκλο στις μεταχειρίσεις **NoHis +d** και **NoHis** στις οποίες φαίνεται να είναι πολύ χαμηλότερη. Η διαφορά αυτή παύει να είναι στατιστικά σημαντική στο τέλος της 4ης εφαρμογής (42 ημέρες).

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ



Διάγραμμα 4: Οι συγκεντρώσεις νιτρικών στις τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις που δέχτηκε το His έδαφος στην πορεία των κύκλων εφαρμογής. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

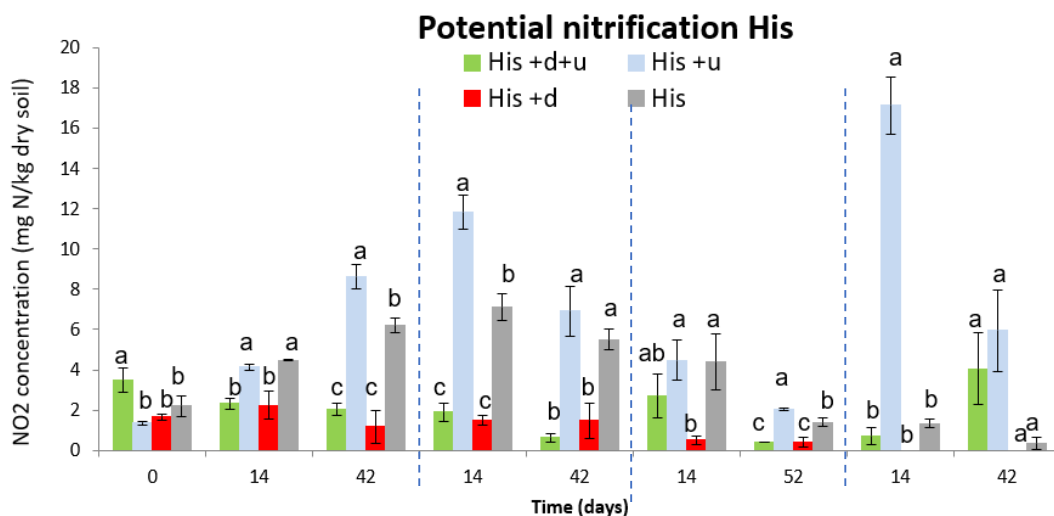
Από το **Διάγραμμα 4** φαίνεται πως στη μεταχείριση **His +d +u** η αναστολή δεν είναι σημαντική από την 3η εφαρμογή και μετά (14 ημέρες 3η εφαρμογή), ενώ ελλείπει ουρίας η ανασταλτική δράση του DCD είναι μακροχρόνια μέχρι το τέλος του 3^{ου} κύκλου. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με τα αποτελέσματα αποδόμησης όπου δεν ήταν εμφανής η ενισχυμένη βιοαποδόμηση στο His έδαφος σε αυτές τις δύο μεταχειρίσεις.



Διάγραμμα 5: Οι συγκεντρώσεις νιτρικών στις τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις που δέχτηκε το NoHis έδαφος στην πορεία των κύκλων εφαρμογής. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

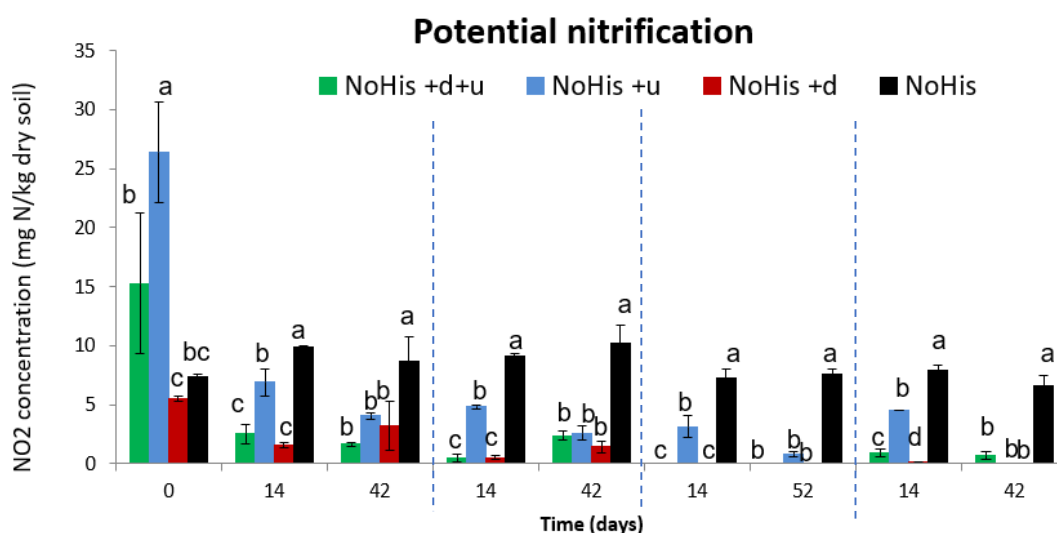
Από το **Διάγραμμα 5** συμπεραίνουμε πως η επίδραση του DCD παραμένει σημαντική στα επίπεδα των NO₃ στο NoHis έδαφος που έλαβε ουρία (έναντι του NoHis χωρίς DCD αλλά με ουρία). Αυτό δεν συμφωνεί με την ταχεία αποικοδόμηση του DCD (4η προσθήκη) στο NoHis έδαφος που έχει υποστεί επεξεργασία με DCD και ουρία. Φαίνεται ότι υπάρχει απώλεια αναστολής που εξακολουθεί να παραμένει σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με το δείγμα που δεν έχει υποστεί επεξεργασία με DCD.

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ DCD ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΕΔΑΦΟΣ



Διάγραμμα 6: Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης στις μεταχειρίσεις στο His έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

Στο His έδαφος ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης παρουσιάζεται χαμηλός από την αρχή του 1^{ου} κύκλου σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ παρατηρείται μια αύξηση στην προσθήκη μόνο ουρίας (**His +u**) στην πορεία του πειράματος.

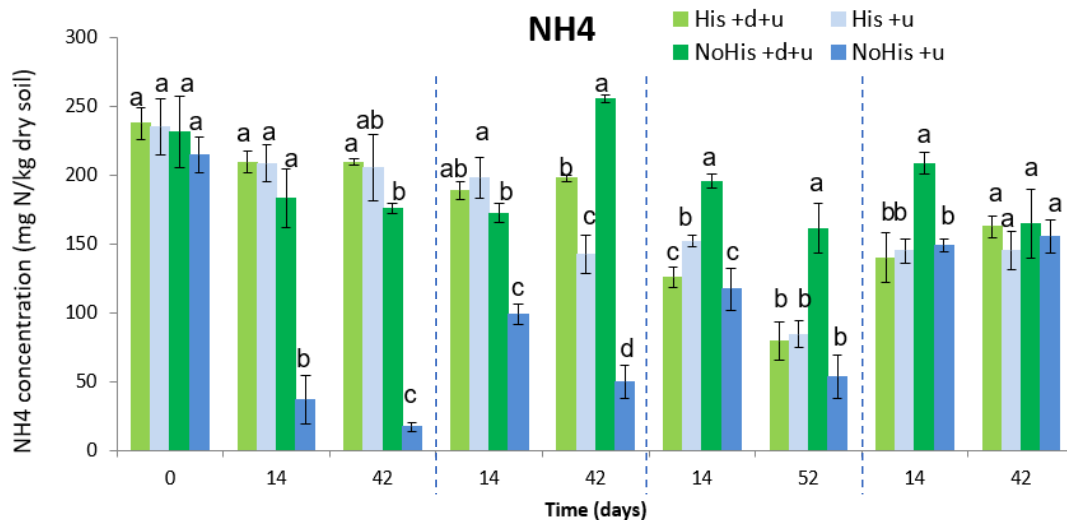


Διάγραμμα 7: Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης στις μεταχειρίσεις στο NoHis έδαφος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

Στο NoHis έδαφος ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης διαφέρει σημαντικά από την αρχή της πρώτης εφαρμογής στη μεταχείριση στην οποία προστίθεται μόνο DCD (**NoHis +d**). Γενικά σε όλες τις μεταχειρίσεις ο ρυθμός φαίνεται να παραμένει χαμηλός.

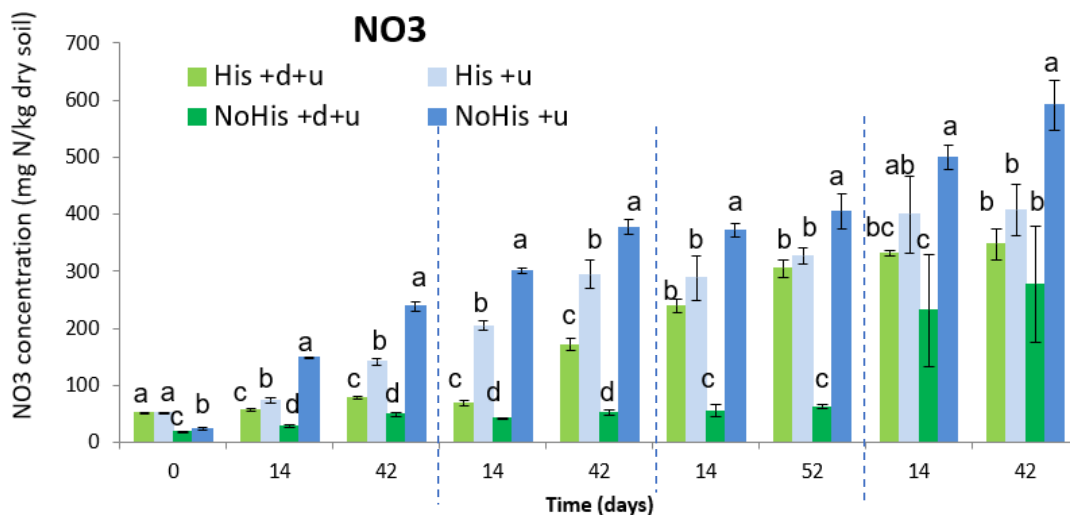
3.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ His/NoHis ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ ΑΠΟΥΣΙΑ DCD ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΥΡΙΑΣ

Η ανασταλτική επίδραση του DCD στο His έδαφος δεν είναι σημαντική όπως απεικονίζεται από τις συγκεντρώσεις NH_4 από την 3^η εφαρμογή και μετά σε σύγκριση με το NoHis έδαφος, όπου η ανασταλτική δράση είναι εμφανής μέχρι την 42^η ημέρα της 4^{ης} εφαρμογής, όπου δεν είναι εμφανείς σημαντικές διαφορές.



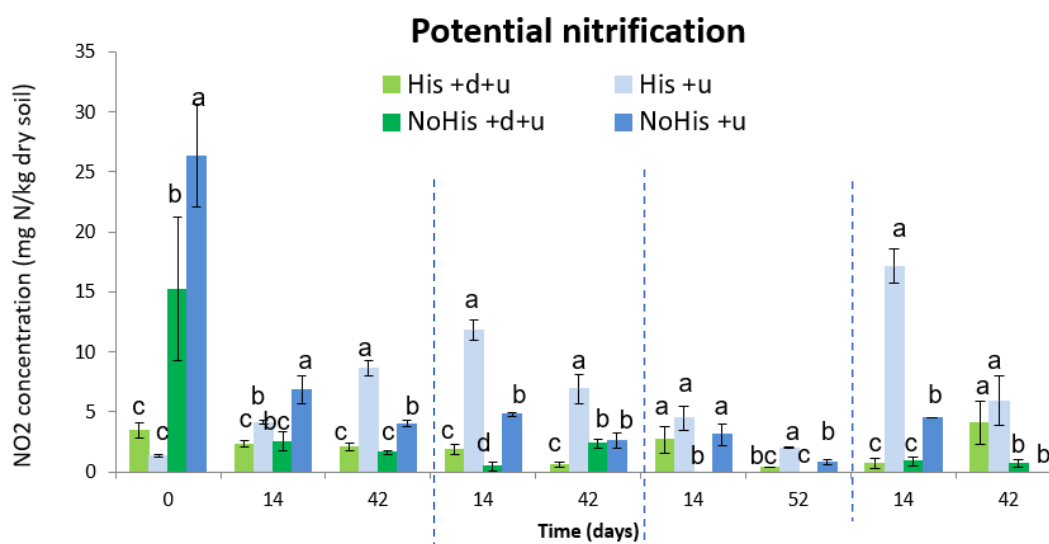
Διάγραμμα 8: Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών στο His και NoHis έδαφος με προσθήκη ουρίας ή/και DCD. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

Η ανασταλτική επίδραση του DCD στο His έδαφος δεν είναι σημαντική από την 3^η εφαρμογή και μετά σε σύγκριση με το NoHis έδαφος, όπου η ανασταλτική επίδραση στις συγκεντρώσεις NO₃ είναι εμφανής σε όλη τη μελέτη.



Διάγραμμα 9: Οι συγκεντρώσεις νιτρικών στο His και NoHis έδαφος με προσθήκη ουρίας ή/και DCD. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

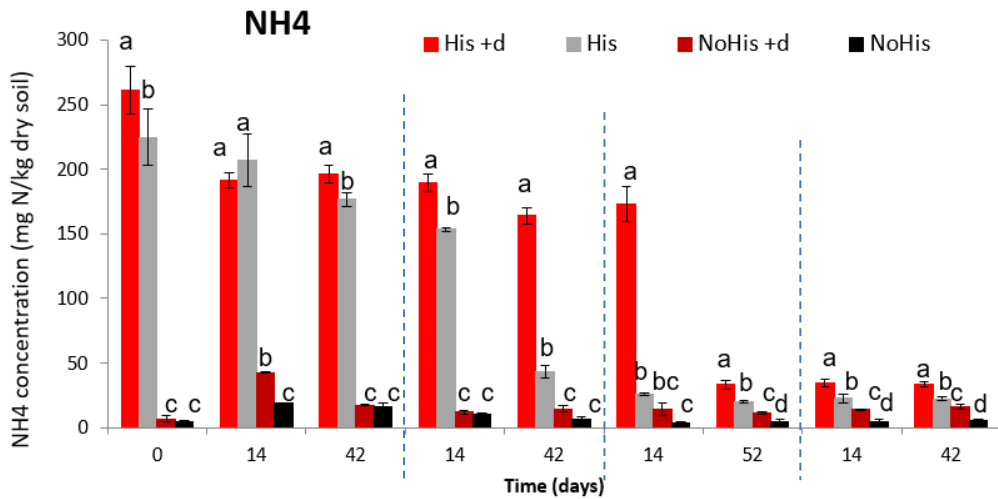
Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης στη **His+u** μεταχείριση φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένος από το τέλος του 1^{ου} κύκλου έως και το τέλος του 4^{ου} σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, στις οποίες παραμένει χαμηλός. Στη δοκιμή **NoHis+u** ενώ εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένος στην αρχή του πειράματος, στην πορεία αυτού μειώνεται. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και στη δοκιμή **NoHis+d+u**.



Διάγραμμα 10: Ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης στο His και NoHis έδαφος με προσθήκη ουρίας ή/και DCD. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

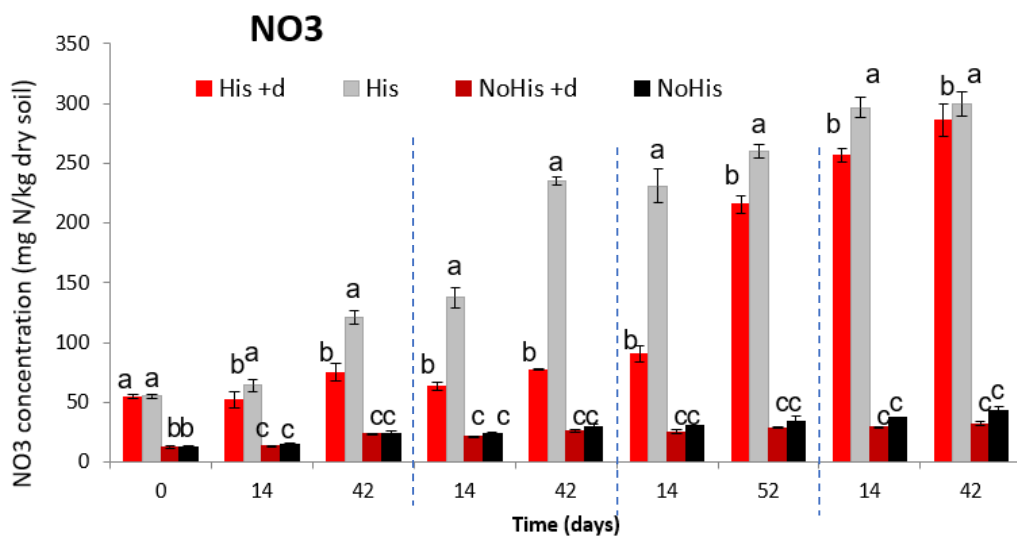
3.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ DCD AND NO-DCD TREATED SOILS

Στα παρακάτω Διαγράμματα μπορεί να διακριθεί η επίδραση του DCD στα δύο εδάφη απουσία ουρίας. Φαίνεται ότι στο His έδαφος, το οποίο έχει ήδη υψηλές ποσότητες αμμωνίου, το ανασταλτικό αποτέλεσμα DCD είναι ορατό σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ στο NoHis έδαφος (χαμηλό επίπεδο αμμωνίου), η δράση του DCD δεν είναι στατιστικά σημαντική και εμφανίζει σημαντική διαφορά μόνο στην τέταρτη εφαρμογή.



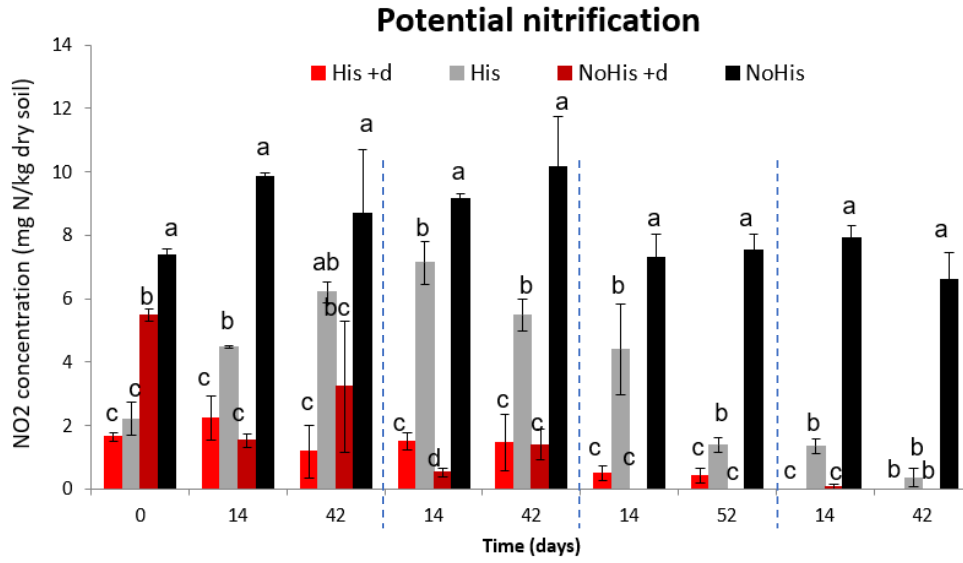
Διάγραμμα 11: Συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων μεταξύ His και NoHis εδάφους απουσία – παρουσία DCD. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

Η συγκέντρωση των νιτρικών στο His έδαφος δεν είναι αυξημένη στην αρχή λόγω δράσης του DCD, ενώ στην πορεία του πειράματος φαίνεται να αυξάνεται. Στο NoHis δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 12: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων μεταξύ His και NoHis εδάφους απουσία – παρουσία DCD. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

Στο NoHis έδαφος ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης είναι αυξημένος, ενώ με χορήγηση DCD αναστέλλεται σημαντικά. Στο His έδαφος η δράση του DCD φαίνεται να επηρεάζει τον ρυθμό, μειώνοντάς τον.



Διάγραμμα 13: Ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης μεταξύ His και NoHis εδαφών απουσία – παρουσία DCD. Οι διακεκομμένες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και διάκριση του κάθε κύκλου.

4. Συζήτηση και Συμπεράσματα

Η νιτροποίηση αποτελεί μία από τις βασικότερες διεργασίες στα γεωργικά οικοσυστήματα. Η μετατροπή της $\text{NH}_4\text{-N}$ σε $\text{NO}_3\text{-N}$ μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες N κάτι που καθιστά τον έλεγχο του κύκλου του N πρόκληση. Για τον περιορισμό απωλειών N, αλλά και για αποτελεσματικότερη χρήση του έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μηχανισμοί ελέγχου του ποσοστού νιτροποίησης. Ένας από τους συνηθέστερους είναι η χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης.

Όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες, μακροχρόνια λίπανση με N αυξάνει τον πληθυσμό και μεταβάλλει τη δομή της κοινότητας των οξειδωτικών βακτηρίων της αμμωνίας καθώς και την ικανότητα νιτροποίησης (Wang et al., 2018). Επιταχυνόμενη αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων μπορεί να οφείλεται στην τάση των μικροοργανισμών να προσλαμβάνουν ενέργεια και θρεπτικά από τον μεταβολισμό των γεωργικών φαρμάκων. Με προσθήκη των τελευταίων, δηλαδή, αυξάνεται ο αριθμός των μικροοργανισμών του εδάφους και κατ' επέκταση αυξάνεται και η ικανότητά τους για βιοαποδόμηση (Arbeli & Fuentes, 2007).

Ένας ευρέως διαδεδομένος παρεμποδιστής νιτροποίησης είναι το DCD. Αναφορές για την ιδιότητά του να αναστέλλει τη διαδικασία της νιτροποίησης έχουν γίνει σε πολλές προηγούμενες εργασίες σε μικρόκοσμους εδάφους. Το DCD αναφέρεται ότι έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι λοιπών παρεμποδιστών τα οποία αφορούν την ευκολία εφαρμογής, την επιμονή, τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα της ανασταλτικής δράσης για μεγαλύτερες περιόδους σε σχετικά υψηλότερες θερμοκρασίες (Subbarao et al., 2006). Το DCD έχει συγκεκριμένο βακτηριοστατικό αποτέλεσμα στα βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* και έχει ταξινομηθεί ως λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης (Sturm et al., 1994). Συνήθως απαιτούνται περίπου 10 έως 50 mg kg⁻¹ DCD για την αναστολή της νιτροποίησης και η ανασταλτική δράση διαρκεί συνήθως από 4 έως 8 εβδομάδες, ανάλογα με τη θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε νερό, την οργανική ύλη και το pH των εδαφών (Amberger, 1989). Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η ανασταλτική δράση μπορεί να διαρκέσει έως και έξι μήνες, καθιστώντας τους αναστολείς κατάλληλους για εφαρμογές το φθινόπωρο και το χειμώνα. Οι αναστολείς νιτροποίησης, συμπεριλαμβανομένου και το DCD, γίνονται ασταθείς και λιγότερο αποτελεσματικοί καθώς αυξάνεται η υγρασία του εδάφους (Subbarao et al., 2006).

Τα βασικά ερωτήματα στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι εάν η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή DCD σε έδαφος με προηγούμενη εφαρμογή (His) και σε έδαφος που δεν έχει δεχτεί κάποιο λίπασμα στο παρελθόν (NoHis) οδηγεί σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του συγκεκριμένου παρεμποδιστή νιτροποίησης και εάν αυτή η πιθανή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση οδηγεί σε μείωση της αποτελεσματικότητας του.

Τα αποτελέσματα μας δεν επιβεβαιώνουν την υπόθεση εργασίας που είχαμε κάνει ότι στο έδαφος με ιστορικό χρήσης DCD θα εμφανιστεί επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του ΠΝ. Αντίθετα καταγράψαμε μια επιτάχυνση της αποδόμησης του DCD στο έδαφος χωρίς ιστορικό χρήσης. Παρόλα αυτά η επιτάχυνση αυτή δεν συνοδεύτηκε από μείωση της δράσης του ως ΠΝ στο συγκεκριμένο έδαφος όπως φάνηκε από τις μετρήσεις αμμωνιακών και νιτρικών. Αντίθετα στο έδαφος με ιστορικό χρήσης DCD καταγράφηκε μια μείωση της δράσης του ΠΝ στην 4η εφαρμογή χωρίς όμως αυτή να μπορεί να αποδοθεί σε ταχύτερη αποδόμηση του DCD. Η διαφοροποίηση αυτή μεταξύ των αποτελεσμάτων αποδόμησης και μετρήσεων νιτρικών και αμμωνιακών ίσως να παραπέμπει σε υπολειμματική δράση του ΠΝ που δεν επιτρέπει την ταχεία ανάκαμψη του πληθυσμού των νιτροποιητών απουσία του DCD.

Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην βελτίωση των ήδη υπάρχουσών αλλά και στην ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων για τη ρύθμιση της νιτροποίησης σε γεωργικά συστήματα, με στόχο τη βελτιωμένη γεωργική παραγωγή και την καλυτέρευση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου. Καθώς τα γεωργικά συστήματα είναι πολύ πιο ανοιχτά από τα φυσικά, η καταστολή της νιτροποίησης στα αγρο-οικοσυστήματα θα ήταν τόσο οικονομική όσο και πιο φιλική προς το περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abian, J., Durand, G., & Barcelo, D. (1993). Analysis of chlorotriazines and their degradation products in environmental samples by selecting various operating modes in thermospray HPLC/MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1264–1273.
- Adamantiadou S.M., Georgatou M., Giapitzakis H., Lakka L., et al., 2009. Biology of Third Grade of High School, POFT.
- Amberger, A. (1989). Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 20(19–20), 1933–1955.
- Ambus, P., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2007). Denitrification and N-Cycling in Forest Ecosystems. *Biology of the Nitrogen Cycle*, 343–358.
- Arbeli, Z., & Fuentes, C. L. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26(12), 1733–1746.
- Arp, D. J. (2009). Nitrification. ELS.
- Arp, D. J., Chain, P. S., & Klotz, M. G. (2007). The Impact of Genome Analyses on Our Understanding of Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 503–528.
- Benckiser, G., Christ, E., Herbert, T., Weiske, A., Blome, J., & Hardt, M. (2013). The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphat (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism. *Plant and Soil*, 371(1–2), 257–266.
- Bock E, Wagner M. 2006. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source, p 457–495. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (ed), *The prokaryotes*, vol 2: ecophysiology and biochemistry. Springer, New York, NY.
- Bock, E. (1976). Growth of Nitrobacter in the presence of organic matter. *Archives of Microbiology*, 108(3), 305–312.
- Bock, E., Koops, H. P., Muller, U. C., & Rudert, M. (1990). A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 153(2), 105–110.
- Braschi, I., Emanuele, C., & Blasioli, S. (2011b). The Fate of Herbicides in Soil. *Herbicides and Environment*.
- Burns RG. Factors affecting pesticide loss from soil. In *Soil Biochemistry 1975*; (pp. 103- 141). Dekker, New York.
- Butterbach-Bahl, K., & Dannenmann, M. (2011). Denitrification and associated soil N₂O emissions due to agricultural activities in a changing climate. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3(5), 389–395.
- Casciotti, K. L., Buchwald, C., Santoro, A. E., & Frame, C. (2011). Assessment of Nitrogen and Oxygen Isotopic Fractionation During Nitrification and Its Expression in the Marine Environment. *Research on Nitrification and Related Processes, Part A*, 253–280.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., and et al. 2003. Complete genome sequence of the ammonia oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 185, 2759- 2773
- Coskun, Devrim; Britto, Dev T.; Shi, Weiming; Kronzucker, Herbert J. (2017). *Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. Nature Plants*, 3(6), 17074–.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.
- Daims, H., Lückner, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712.
- Di, H. J., & Cameron, K. C. (2016). Inhibition of nitrification to mitigate nitrate leaching and nitrous oxide emissions in grazed grassland: a review. *Journal of Soils and Sediments*, 16(5), 1401–1420.

- Ferguson, S. J. (1994). Denitrification and its control. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66(1–3), 89–110.
- Finley, S.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., 2010. In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1, 2, 4-trichlorobenzene. *BMC Syst. Biol.* 4 (1), 7.
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1), 35-59.
- Furukawa, K., 2003. 'Super bugs' for bioremediation. *Trends Biotechnol* 21, 187–190.
- Galloway J, Dentener F, Capone D, Boyer E, Howarth R, Seitzinger S, Asner G, Cleveland C, Green P, Holland E, Karl D, Michaels A, Porter J, Townsend A, Vörösmarty C. Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004;70(2), 153–226.
- Gangola, S., Bhatt, P., Chaudhary, P., Khati, P., Kumar, N., & Sharma, A. (2018). Bioremediation of Industrial Waste Using Microbial Metabolic Diversity. *Advances in Environmental Engineering and Green Technologies*, 1–27.
- Gangola, S., Bhatt, P., Kumar, A. J., Bhandari, G., Joshi, S., Punetha, A., Bhatt, K., & Rene, E. R. (2022). Biotechnological tools to elucidate the mechanism of pesticide degradation in the environment. *Chemosphere*, 296, 133916.
- Gavrilescu, M. (2005). Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497–526.
- Gerten, D., Heck, V., Jägermeyr, J., Bodirsky, B. L., Fetzer, I., Jalava, M., ... & Schellnhuber, H. J. (2020). Feeding ten billion people is possible within four terrestrial planetary boundaries. *Nature Sustainability*, 3(3), 200-208.
- Gubry-Rangin, C., Novotnik, B., Mandič-Mulec, I., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2017). Temperature responses of soil ammonia-oxidising archaea depend on pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 106, 61–68.
- Guo, Y. J., Di, H. J., Cameron, K. C., Li, B., Podolyan, A., Moir, J. L., Monaghan, R. M., Smith, L. C., O'Callaghan, M., Bowatte, S., Waugh, D., & He, J. Z. (2013). Effect of 7-year application of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on soil microbial biomass, protease and deaminase activities, and the abundance of bacteria and archaea in pasture soils. *Journal of Soils and Sediments*, 13(4), 753–759.
- Hart, S. C., Stark, J. M., Davidson, E. A., & Firestone, M. K. (1994). Nitrogen Mineralization, Immobilization, and Nitrification. *SSSA Book Series*, 985–1018.
- Hatzenpichler, R. (2012). Diversity, Physiology, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7501–7510.
- He, H., Zhen, Y., Mi, T., Fu, L., & Yu, Z. (2018). Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria Differentially Contribute to Ammonia Oxidation in Sediments from Adjacent Waters of Rushan Bay, China. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Hochstein, L. I., & Tomlinson, G. A. (1988). The Enzymes Associated with Denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42(1), 231–261.
- Hsu, P. C. L., Di, H. J., Cameron, K., Podolyan, A., Chau, H., Luo, J., Miller, B., Carrick, S., Johnstone, P., Ferguson, S., Wei, W., Shen, J., Zhang, L., Liu, H., Zhao, T., Wei, W., Ding, W., Pan, H., Liu, Y., & Li, B. (2022). Comammox Nitrospira Clade B is the most abundant complete ammonia oxidizer in a dairy pasture soil and inhibited by dicyandiamide and high ammonium concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Hu, H. W., & He, J. Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17(12), 2709–2717.
- Huang, L., Chakrabarti, S., Cooper, J., Perez, A., John, S. M., Daroub, S. H., & Martens-Habbena, W. (2021). Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. *ISME Communications*, 1(1).
- Hwang, Y. H., Kim, D. G., Ahn, Y. T., Moon, C. M., & Shin, H. S. (2010). Fate of nitrogen species in nitrate reduction by nanoscale zero valent iron and characterization of the reaction kinetics. *Water Science and Technology*, 61(3), 705–712.

- Jaiswal DK, Verma JP, Yadav J. Microbe induced degradation of pesticides in agricultural soils. In: *Microbe-induced Degradation of Pesticides 2017*; (pp. 167- 189). Springer, Cham.
- Jetten, M. S., Niftrik, L. V., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., & Op den Camp, H. J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(2-3), 65-84.
- Jung, M. Y., Kim, J. G., Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C., Madsen, E. L., Kim, S. J., Hong, H., Si, O. J., Kerou, M., Schleper, C., & Rhee, S. K. (2016). A hydrophobic ammonia-oxidizing archaeon of the *Nitrosocosmicus* clade isolated from coal tar-contaminated sediment. *Environmental Microbiology Reports*, 8(6), 983–992.
- Kartal, B., van Niftrik, L., Keltjens, J. T., Op den Camp, H. J., & Jetten, M. S. (2012). Anammox—Growth Physiology, Cell Biology, and Metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, 211–262.
- Kato, S., Itoh, T., Yuki, M., Nagamori, M., Ohnishi, M., Uematsu, K., Suzuki, K., Takashina, T., & Ohkuma, M. (2019). Isolation and characterization of a thermophilic sulfur- and iron-reducing thaumarchaeote from a terrestrial acidic hot spring. *The ISME Journal*, 13(10), 2465–2474.
- Kim, J. G., Gazi, K. S., Awala, S. I., Jung, M. Y., & Rhee, S. K. (2021). Ammonia-oxidizing archaea in biological interactions. *Journal of Microbiology*, 59(3), 298–310.
- Kitzinger, K., Padilla, C. C., Marchant, H. K., Hach, P. F., Herbold, C. W., Kidane, A. T., Könneke, M., Littmann, S., Mooshammer, M., Niggemann, J., Petrov, S., Richter, A., Stewart, F. J., Wagner, M., Kuypers, M. M. M., & Bristow, L. A. (2018). Cyanate and urea are substrates for nitrification by Thaumarchaeota in the marine environment. *Nature Microbiology*, 4(2), 234–243.
- Koch, H., van Kessel, M. A. H. J., & Lüscher, S. (2018). Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 177–189.
- Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 485–529.
- Ladygina, N., Dedyukhina, E., & Vainshtein, M. (2006). A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 41(5), 1001–1014.
- Langone, M., Yan, J., Haaijer, S. C. M., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., & Andreottola, G. (2014). Coexistence of nitrifying, anammox and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–809.
- Lüscher, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., & Daims, H. (2013). The Genome of *Nitrospina gracilis* Illuminates the Metabolism and Evolution of the Major Marine Nitrite Oxidizer. *Frontiers in Microbiology*, 4.
- Lüscher, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damsté, J. S. S., Spieck, E., Le Paslier, D., & Daims, H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), 13479–13484.
- M. E. Trenkel. (2010). Slow- and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture. *International Fertilizer Industry Association (IFA)*.
- Malcolm, B. J., Cameron, K. C., Edwards, G. R., & Di, H. J. (2015). Nitrogen leaching losses from lysimeters containing winter kale: the effects of urinary N rate and DCD application. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 58(1), 13-25.
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1–3), 379–392.
- Marino, R. and R. W. Howarth. 2009. Nitrogen fixation. In: G. E. Likens (ed), *Encyclopedia of Inland Waters*, Volume 2. Elsevier. Oxford. pp 65–72.

- McGeough, K., Watson, C., Müller, C., Laughlin, R., & Chadwick, D. (2016). Evidence that the efficacy of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) is affected by soil properties in UK soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 94, 222–232.
- Moir, J. L., Cameron, K. C., & Di, H. J. (2007). Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use and Management*, 23(2), 111–120.
- Monteiro, M., Séneca, J., & Magalhães, C. (2014). The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today. *Journal of Microbiology*, 52(7), 537–547.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016b). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4.
- Nommik H (1958) On decomposition of Calcium Cyanamide and Dicyandiamide in the soil. *Acta Agriculturae Scandinavica* 29,404-439
- Norton, J. M., & Stark, J. M. (2011). Regulation and Measurement of Nitrification in Terrestrial Systems. *Research on Nitrification and Related Processes, Part A*, 343–368.
- Norton, J., & Ouyang, Y. (2019). Controls and Adaptive Management of Nitrification in Agricultural Soils. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- O’Callaghan, M., Gerard, E. M., Carter, P. E., Lardner, R., Sarathchandra, U., Burch, G., Ghani, A., & Bell, N. (2010). Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1425–1436.
- ODDA (1995): Dicyandiamide – General Data/Product Range/Applications. Publisher: Odda Smelteverk AS, Odda, Norway.
- Odukkathil, G., & Vasudevan, N. (2013). Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(4), 421–444.
- Pal, R., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., Chowdhury, A., 2010. Degradation and effects of pesticides on soil microbiological parameters- A review. *Int. J. Agric. Res.* 5 (8), 625–643.
- Palomo, A., Jane Fowler, S., Gülay, A., Rasmussen, S., Sicheritz-Ponten, T., & Smets, B. F. (2016). Metagenomic analysis of rapid gravity sand filter microbial communities suggests novel physiology of *Nitrospira* spp. *The ISME Journal*, 10(11), 2569–2581.
- Park, H. D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S., & Francis, C. A. (2006). Occurrence of Ammonia-Oxidizing Archaea in Wastewater Treatment Plant Bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5643–5647.
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 300–306.
- Philippot, L., Hallin, S., & Schloter, M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in agronomy*, 96, 249-305.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5368–5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A., and Koops, H.P. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: Extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1485–1494
- Qiao C., Liu L., Hu S., Compton J. Greaver T. L., Li Q., 2015. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global Change Biology* 21:1249-1257
- Ren, M., Feng, X., Huang, Y., Wang, H., Hu, Z., Clingenpeel, S., Swan, B. K., Fonseca, M. M., Posada, D., Stepanauskas, R., Hollibaugh, J. T., Foster, P. G., Woyke, T., & Luo, H. (2019). Phylogenomics suggests

oxygen availability as a driving force in Thaumarchaeota evolution. *The ISME Journal*, 13(9), 2150–2161.

- Ruser, R., & Schulz, R. (2015). The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(2), 171–188.
- Shaw, D. R., Ali, M., Katuri, K. P., Gralnick, J. A., Reimann, J., Mesman, R., van Niftrik, L., Jetten, M. S. M., & Saikaly, P. E. (2020). Extracellular electron transfer-dependent anaerobic oxidation of ammonium by anammox bacteria. *Nature Communications*, 11(1).
- Signor, D., and Cerri, C.E.P. (2013). Nitrous oxide emissions in agricultural soils: a review. *Pesq Agropecu Trop.*, 43:322-338.
- Sorokin, D. Y., Lückner, S., Vejmekova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., Le Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M. C. M., & Daims, H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME Journal*, 6(12), 2245–2256.
- Stahl, D. A., & de la Torre, J. R. (2012). Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 83–101.
- Stein, L. Y. (2019). Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 9–15.
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. In *Current Biology* (Vol. 26, Issue 3, pp. R94–R98). Cell Press.
- Sturm, H., Buchner, A., and Zerulla, W. 1994. Gezielter dungen. Integriert. Wirtschaftlich. Umweltgerecht (directed fertilizer use – integrated economically environmentally sound). VerlagsUnion Agrar, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt.
- Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Rao IM. Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. *Plant Sciences*. 2006;25(4):303– 335.
- Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., & Bock, E. (1984). Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Archives of Microbiology*, 140(2–3), 153–158.
- Tavormina, P. L., Orphan, V. J., Kalyuzhnaya, M. G., Jetten, M. S. M., & Klotz, M. G. (2011). A novel family of functional operons encoding methane/ammonia monooxygenase-related proteins in gammaproteobacterial methanotrophs. *Environmental Microbiology Reports*, 3(1), 91–100.
- Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D., 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Mc Graw-Hill Education. Metacalf & Eddy Inc.
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112.
- 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., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559.
- Vanderborght, J., Tiktak, A., Boesten, J. J., & Vereecken, H. (2010). Effect of pesticide fate parameters and their uncertainty on the selection of ‘worst-case’ scenarios of pesticide leaching to groundwater. *Pest Management Science*, 67(3), 294–306.
- Walker CB, et al. 2010. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:8818 – 8823
- Wang, F., Chen, S., Wang, Y., Zhang, Y., Hu, C., & Liu, B. (2018). Long-Term Nitrogen Fertilization Elevates the Activity and Abundance of Nitrifying and Denitrifying Microbial Communities in an Upland Soil: Implications for Nitrogen Loss From Intensive Agricultural Systems. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Winogradsky, S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* 4, 213- 331

- Wrage, N., Velthof, G., van Beusichem, M., & Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12–13), 1723–1732.
- Wright, C. L., Schatteman, A., Crombie, A. T., Murrell, J. C., & Lehtovirta-Morley, L. E. (2020). Inhibition of Ammonia Monooxygenase from Ammonia-Oxidizing Archaea by Linear and Aromatic Alkynes. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(9).
- Zhang, L. M., Hu, H. W., Shen, J. P., & He, J. Z. (2011). Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, 6(5), 1032–1045.
- Zhou, L., Wang, S., Zou, Y., Xia, C., & Zhu, G. (2015). Species, Abundance and Function of Ammonia-oxidizing Archaea in Inland Waters across China. *Scientific Reports*, 5(1).
- Μπρουζιώτης, Α. Α. (2019). *Εκτίμηση της επίδρασης του κύριου οξειδωτικού παραγώγου του εθοχγκιν, quinone imine, στη νιτροποίηση στο έδαφος* (Master's thesis).