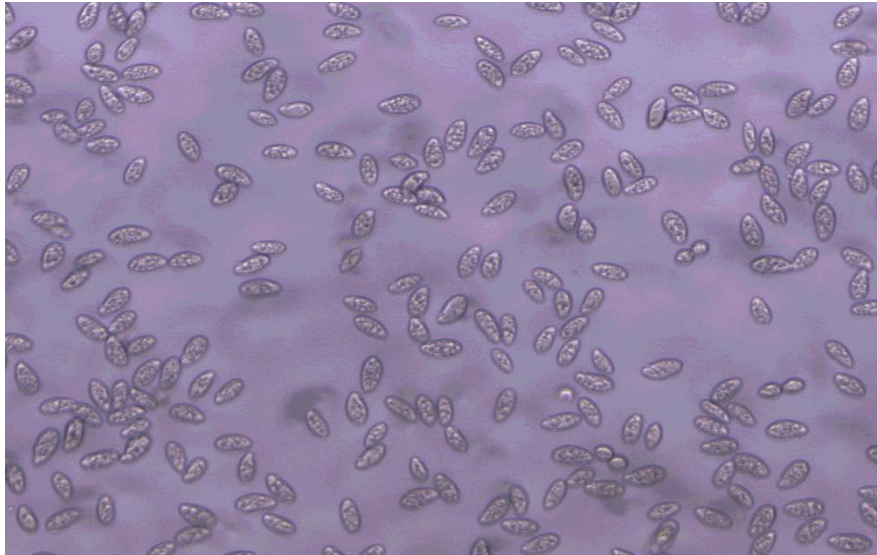




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Διαμόρφωση συνθετικών μικροβιακών κοινοπραξιών
αποτελούμενων από πρότιστα και νιτροποιητές



Βρυζίδου Ελευθερία

ΛΑΡΙΣΑ 2023

**«Διαμόρφωση συνθετικών μικροβιακών
κοινοπραξιών αποτελούμενων από πρῶτιστα και
νιτροποιητές.»**

**“Establishment of synthetic microbial
communities consisting of protists and
nitrifiers.”**

Επιβλέπων Καθηγητής:

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ.....	10-12
1.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ	
1.2.1 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (ΑΟΒ).....	12
1.2.2 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΑΡΧΑΙΑ (ΑΟΑ).....	12-13
1.2.3 ΝΙΤΡΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (ΝΟΒ).....	13
1.2.4 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΟΞΕΙΔΩΝΟΥΝ ΠΛΗΡΩΣ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ (COMMAMOΧ).....	13-14
1.2.5 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΟΞΕΙΔΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ ΣΕ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ANAMMOΧ).....	14
1.3 ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	
1.3.1 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΕΣ	
<i>Nitrosospira multiformis</i> (MG ₃).....	14
<i>Candidatus Nitrosotalea Sinensis</i> (Nd ₂).....	15
1.3.2 ΝΙΤΡΙΚΟΠΟΙΗΤΕΣ	
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> (NOB _{wino}) και <i>Nitrobacter sp.</i> (NHB1).....	15
1.4 ΠΡΩΤΙΣΤΑ.....	16
1.4.1 <i>Tetrahymena sp.</i>	17-19
ΣΚΟΠΟΣ.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ.....	21
2.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ	
2.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ.....	21-23
2.2.2 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ.....	24-25
2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ.....	25-26
2.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	
2.3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	26

2.3.2	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	26- 27
2.3.3	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	27
2.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	
2.4.1	ΜΕΤΡΗΣΗ ΝΙΤΡΩΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ.....	27
2.4.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ.....	27-28
2.4.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ.....	28
2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΝΙΤΡΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	
	ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (qPCR).....	29
2.6	ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	30
2.7	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	30-31
2.8	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	
2.8.1	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΩΝ.....	31
2.8.2	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	31-32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
3.1	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	
3.1.1	<i>Nitrobacter winogradkyi</i> (NOB _{wino}) με <i>Tetrahymena sp.</i>	33-34
3.1.2	<i>Nitrobacter sp.</i> (NOB _{NHB1}) με <i>Tetrahymena sp.</i>	35-36
3.1.3	<i>Nitrosotalea sinensis</i> (Nd ₂) με <i>Tetrahymena sp.</i>	37-38
3.1.4	<i>Nitrosospira multiformis</i> (MG ₃) με <i>Tetrahymena sp.</i>	39-43
3.2	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	44-46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		47-48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		49-52

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, που μου έδωσε την ευκαιρία να βρεθώ στο εργαστήριο της Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και να αποκτήσω την πρώτη μου εμπειρία στον τομέα της έρευνας, όντας πρόθυμος να με βοηθήσει και να με καθοδηγήσει σε όλα τα στάδια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές και τα μέλη του εργαστηρίου για την ομαλή και ευχάριστη συνεργασία και κυρίως, την μεταδιδάκτορα κ. Παπαδάτου Μαρία για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την στήριξη της, καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, τόσο κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και κατά την συγγραφή του κειμένου της πτυχιακής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη της σε όλα τα επίπεδα, κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κύκλος του αζώτου, στελεχωμένος από τα στάδια της αμμωνιοποίησης, της νιτροποίησης, της απονιτροποίησης και της αζωτοδέσμευσης, αποτελεί έναν πολύτιμο βιοχημικό κύκλο στο περιβάλλον, καθώς το άζωτο είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία για την ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών. Το στάδιο της νιτροποίησης προάγεται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η οξείδωση της αμμωνίας, συγκεκριμένα, είναι το ρυθμό-καθοριστικό βήμα της νιτροποίησης και προκύπτει από την δράση νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB και Ammonia Oxidizing Archaea: AOA), όπως επίσης και νιτρικοποιητικών βακτηρίων (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) αλλά και από βακτήρια που οξειδώνουν πλήρως την αμμωνία (COMplete AMMonia Oxidation: Commamox). Πέρα από τους προκαρυωτικούς νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, υπάρχουν ενδείξεις ότι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, τα πρώτιστα, εκκρίνουν αμμωνία. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας με στόχο την *in vitro* ανάπτυξη συνθετικών μικροβιακών κοινοπραξιών, αποτελούμενων από μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου, οι οποίες θα εφαρμοστούν σε δοκιμές επίδρασης τοξικών παραγόντων, όπως τα γεωργικά φάρμακα. Σε αυτό το πλαίσιο, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτίστων σε ρόλο θηρευτών σε μικροβιακή κοινοπραξία προκαρυωτικών νιτροποιητικών μικροοργανισμών σε ρόλο θηραμάτων, παρακολουθώντας την ανάπτυξη των πρωτίστων ταυτόχρονα με τη μεταβολική δραστηριότητα των νιτροποιητών. Τα πειράματα που διεξήχθησαν περιλάμβαναν μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτίστων *Tetrahymena sp.* με μεμονωμένες καλλιέργειες στελεχών όπως AOB του είδους *Nitrosospira multiformis*, AOA του είδους *Ca. Nitrosotalea sinensis*, και NOB των ειδών *Nitrobacter sp. NHBI* και *Nitrobacter winogradkyi*. Ακόμη, μελετήθηκε και μια συνθετική νιτροποιητική κοινοπραξία αποτελούμενη από AOB *Nitrosospira multiformis* και NOB *Nitrobacter winogradkyi*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προέκυψε πως τα πρώτιστα *Tetrahymena sp.* παρουσία των νιτροποιητών, αφενός υπόκεινται σε στρεσογόνα συνθήκη, λόγω της καλλιέργειας τους σε φτωχό για αυτά θρεπτικό μέσο, αφετέρου καταφέρνουν να επιβιώσουν για περίπου 7-8 ημέρες. Συγκρίνοντας τα δείγματα πρωτίστων παρουσία και απουσία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, προέκυψε ένδειξη πως τα πρώτιστα πιθανώς διατρέφονται με βακτηριακή λεία. Η ένδειξη αυτή, ενισχύθηκε και από την διαφοροποιημένη συμπεριφορά των νιτροποιητικών μικροοργανισμών παρουσία πρωτίστων, όπου και παρατηρήθηκε η μειωμένη μεταβολική τους δραστηριότητα. Συνοψίζοντας, η διαμόρφωση συνθετικών μικροβιακών κοινοπραξιών, μπορεί να αποτελέσει ένα καινοτόμο εργαλείο για την αξιολόγηση τόσο των σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών θηρευτών-θηραμάτων σε επίπεδο οικοσυστήματος, όσο και των επιπτώσεων τοξικών παραγόντων σε μικροβιακές κοινοπραξίες που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου.

ABSTRACT

The nitrogen cycle, composed of the processes of ammonification, nitrification, denitrification and nitrogen (N) fixation constitutes an important biochemical cycle, since nitrogen is an essential element for the growth of living organisms. Nitrification is a primary process that plays a crucial role within the N cycle and is principally driven by soil microorganisms. More specifically, the stage of ammonia oxidation is the rate-limiting step of nitrification and is mediated by the activity of ammonia oxidizing bacteria and archaea (AOB and AOA), nitrite oxidizing bacteria (NOB) and complete ammonia oxidizers (comammox). In addition to the prokaryotic nitrifiers, there is evidence of ammonia excretion by unicellular eukaryotic microorganisms, protists. The present study is part of a greater research effort that aims to establish *in vitro* synthetic microbial communities, consisting of microorganisms contributing to the N cycle. These synthetic microbial communities could then be used for assessing the effect of toxic factors such as pesticides. For that reason, the aim of this thesis was to explore the interaction between protists as predators and nitrifiers as preys was studied, by monitoring simultaneously the growth of protists and the metabolic activity of nitrifiers. The interaction of protists *Tetrahymena sp.* Was investigated with single cultures of *Nitrosospira multiformis* AOB strains, *Ca. Nitrosotalea sinensis* AOA strains and NOB strains of the species *Nitrobacter winogradkyi* and *Nitrobacter sp. NHBI*, in addition to a synthetic nitrifier community consisting of AOB *Nitrosospira multiformis* and NOB *Nitrobacter winogradkyi* was studied. The results indicated survival of *Tetrahymena sp.* for about 7-8 days, growing in the nutrient-poor medium of nitrifiers. Moreover, the results revealed predation of protists on nitrifier bacterial preys, both by protist abundance and reduced metabolic activity of nitrifying microorganisms in the presence of protists. Overall, the establishment of synthetic microbial communities, can provide an innovative tool, for assessing both predator-prey relationships at an ecosystem level and the effects of toxic agents on microbial communities which are involved in the N cycle.

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

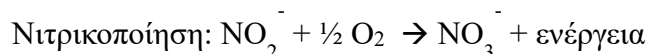
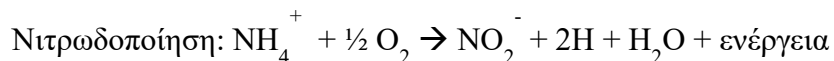
Το άζωτο λογίζεται ως ένα από τα σημαντικότερα χημικά στοιχεία για τη ζωή. Απαντάται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς ανήκει στα συστατικά απαραίτητων βιομορίων, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Επιπλέον, αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του ατμοσφαιρικού αέρα (78%). Παρόλα αυτά, η μορφή μοριακού αζώτου (N_2) στην οποία βρίσκεται είναι ιδιαίτερα αδρανής και έτσι, καθίσταται μη διαθέσιμο προς άμεση αξιοποίηση από τους οργανισμούς. Η εκμετάλλευση του αέριου αζώτου από τα φυτά και τα ζώα, προϋποθέτει την μετατροπή του σε χημικά διαθέσιμες μορφές όπως τα αμμωνιακά, τα νιτρώδη και τα νιτρικά ιόντα, αλλά και οργανικές μορφές όπως η ουρία (Stein et al, 2016).

Η εναλλαγή των μορφών του αζώτου περιγράφεται στον κύκλο του αζώτου (Εικόνα 1). Ο κύκλος του αζώτου είναι ένας πολύπλοκος γεωβιοχημικός κύκλος κατά τον οποίο το μοριακό άζωτο μετατρέπεται μέσω τεσσάρων βιοτικών διεργασιών σε νιτρικά ιόντα. Η πρώτη βιοτική διεργασία για να συμβεί αυτό, είναι η αζωτοδέσμευση, όπου μπορεί να είναι είτε φυσική, που συνεισφέρει κατά 10%, είτε βιολογική. Η φυσική αζωτοδέσμευση είναι αποτέλεσμα υψηλών ενεργειακών γεγονότων, όπως είναι οι κεραυνοί, μέσω των οποίων προκαλείται ρήξη του τριπλού δεσμού του μοριακού αζώτου και κατ' επέκταση προκύπτουν διαθέσιμα άτομα αζώτου για χημική μετατροπή. Κατά την βιολογική αζωτοδέσμευση, σημαντικό ρόλο κατέχουν οι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία έχουν την δυνατότητα να ζουν ελεύθερα σε βιότοπους όπως το έδαφος και η θάλασσα ή να συμβιώνουν με φυτά και ο ρόλος τους αφορά την δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου και τη μετατροπή του σε αμμωνία (Bernhard et al., 2010; Kuypers et al., 2018).

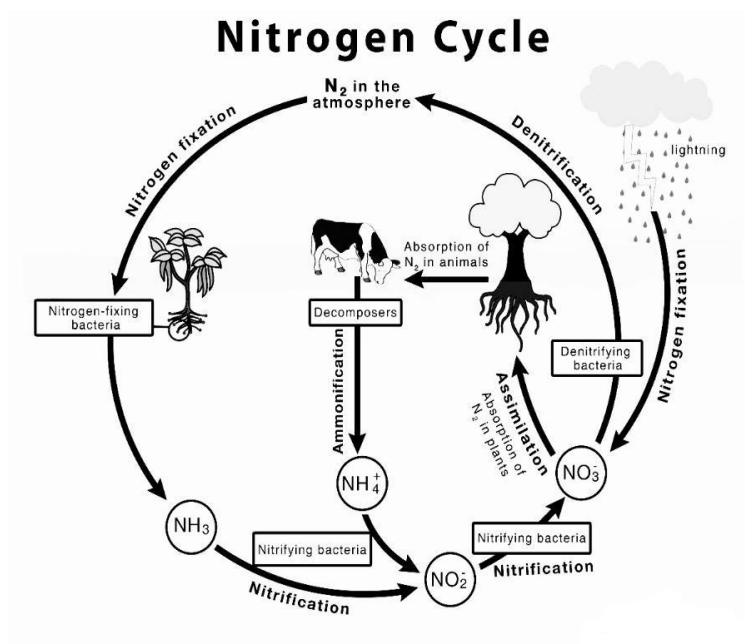
Η δεύτερη βιοτική διεργασία του κύκλου του αζώτου είναι η αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση. Οι πρωτεΐνες των φυτών, τα περιττώματα των ζώων που καταναλώνουν τα φυτά αλλά και τα πτώματα των ζώων, είναι πλούσια σε αζωτούχες ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές αξιοποιούνται από μικροοργανισμούς-αποδομητές, οι οποίοι τις μετατρέπουν σε αμμωνία, χάρη στα πρωτεολυτικά ένζυμα που διαθέτουν. Μέσω των ενζύμων αυτών αποδομούν τις πρωτεΐνες σε αμινοξέα και στη συνέχεια αυτά μετατρέπονται σε αμμωνιακά ιόντα (Bernhard et al., 2010; Kuypers et al., 2018).

Στο πλαίσιο της τρίτης βιοτικής διεργασίας, τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς που ονομάζονται νιτροποιητές σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα (NO_2^- και NO_3^-) με τη διαδικασία της νιτροποίησης. Αναλυτικότερα, η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δυο στάδια. Πρώτο στάδιο αποτελεί η νιτρωδοποίηση κατά την οποία τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται σε νιτρώδη. Για να επιτευχθεί αυτό, καταλύονται δυο επιμέρους βιοχημικά βήματα. Στο πρώτο βήμα, με την δράση του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH). Κατά το δεύτερο βήμα, το ένζυμο της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) καταλύει την οξείδωση της υδροξυλαμίνης με τελικό προϊόν τα νιτρώδη ιόντα. Η νιτρωδοποίηση καταλύεται από βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (Ammonia Oxidizing Bacteria ή AOB) και από αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία (Ammonia Oxidizing Archaea ή AOA). Δεύτερο

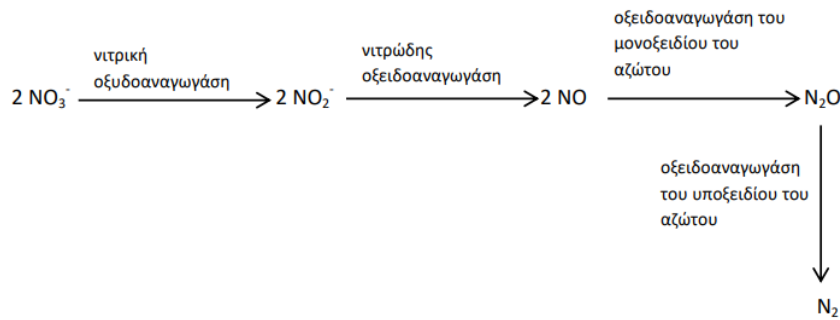
στάδιο της νιτροποίησης είναι η νιτρικοποίηση όπου τα νιτρώδη μετατρέπονται σε νιτρικά ιόντα υπό τον έλεγχο του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR). Αυτό το στάδιο πραγματοποιείται από βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη (Nitrite Oxidizing Bacteria ή NOB). Η διαδικασία της νιτροποίησης συνοψίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Τέταρτη και τελευταία βιοτική διεργασία του κύκλου του αζώτου, είναι η απονιτροποίηση και αφορά την αναγωγή των νιτρικών ιόντων που προκύπτουν από την νιτροποίηση, σε στοιχειακό άζωτο. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, τους απονιτροποιητές, με την διεξαγωγή τεσσάρων διαδοχικών αναγωγικών σταδίων κατά τη διάρκεια των οποίων τα νιτρικά ιόντα ανάγονται σε νιτρώδη ιόντα, μονοξειδίο του αζώτου, υποξειδίο του αζώτου και τελικά ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο απελευθερώνεται στο περιβάλλον (Εικόνα 2) (Bernhard et al., 2010; Kuypers et al., 2018; Zifa et al., 2011).



Εικόνα 1. Ο κύκλος του Αζώτου (Unacademy, 2020)



Εικόνα 2. Αναγωγικά στάδια νιτρικών ιόντων

1.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

1.2.1 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (ΑΟΒ)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια αποτελούν χημειολιθοαυτότροφους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που προσλαμβάνουν την απαιτούμενη ενέργεια για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους μέσω της αερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα, ενώ χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Ως προς την φυλογενετική τους κατάταξη, έχουν ταξινομηθεί σε πέντε γένη. Τα *Nitrosospira*, *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio* και *Nitrosolobus* που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια και τα *Nitrosococcus* που ανήκουν στα γ-πρωτεοβακτήρια. Ως προς την μορφολογία τους, τα ΑΟΒ παρουσιάζουν ποικιλομορφία, καθώς δύνανται να διαφέρουν ως προς το μέγεθος και το σχήμα του κυττάρου, στη δομή των μεμβρανών του κυττάρου αλλά και στην κίνηση λόγω παρουσίας ή απουσίας μαστιγίου. Αναφορικά με τις κυτταρικές μεμβράνες των ΑΟΒ, βασικό συστατικό τους αποτελούν τα λιπίδια, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με εστερικό δεσμό, συνθήκη που καθιστά τις μεμβράνες ευαίσθητες. Σχετικά με την επίτευξη της νιτρωδοποίησης, τα ΑΟΒ διαθέτουν και αξιοποιούν δύο σημαντικά ένζυμα, την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (ΑΜΟ) και την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (ΗΑΟ). Η ΑΜΟ εντοπίζεται διαμεμβρανικά και καταλύει την μετατροπή της αμμωνίας ή των αμμωνιακών ιόντων σε υδροξυλαμίνη και νερό με την συνεισφορά δύο ηλεκτρονίων προερχόμενα από το κυτόχρωμα. Η ΗΑΟ εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο του βακτηριακού κυττάρου και μετατρέπει την υδροξυλαμίνη σε νιτρώδη ιόντα, παρέχοντας τέσσερα ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα c, εκ των οποίων τα δύο αξιοποιούνται στη συνέχεια, όπως προαναφέρθηκε από την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (Cedervall et al., 2013; Madigan et al., 2009). Όσον αφορά στο περιβάλλον και στις συνθήκες που αναπτύσσονται, μπορούν να παρευρίσκονται στη πλειονότητα των οικοσυστημάτων, όπως χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, και κατά προτίμηση σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας και αμμωνιακών ιόντων όπως σε μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων και σε περιβάλλοντα με αυξημένη θερμοκρασία και pH (Nicol et al., 2008; Tourna et al., 2008).

1.2.2 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΑΡΧΑΙΑ (ΑΟΑ)

Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία, αποτελούν χημειολιθότροφους αυτότροφους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, καθώς οξειδώνουν την αμμωνία προκειμένου να προσλάβουν την αναγκαία ενέργεια για την επιβίωση τους, παρόμοια με τα ΑΟΒ. Πιο

συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός γονιδίου, του *amoA*, που είναι ομόλογο με το γονίδιο της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας που διαθέτουν τα AOB (Shen et al., 2013). Τα AOA ανήκουν στο φύλο των Thaumarcheota, και κατατάσσονται στις συνομοταξίες των Nitrosotales, Nitrosocadales, Nitrososphaerales και Nitrosopumilales (Cao et al., 2013). Όσον αφορά στην δομή των μεμβρανών τους, τα λιπίδια που τις αποτελούν, συνδέονται με αιθερικό δεσμό με πλευρικές αλυσίδες ισοπρενοειδών, καθιστώντας τις έτσι πιο ανθεκτικές από τις μεμβράνες των AOB των οποίων τα συστατικά συνδέονται με εστερικό δεσμό (Shen et al., 2013). Τα AOA απαντώνται σε θαλάσσια οικοσυστήματα, αλλά και σε υδάτινα και χερσαία ενδιαιτήματα, ακόμη και συνθήκες πολύ χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης αμμωνίας. Σχετικά με τις συνθήκες ανάπτυξής τους, τα AOA ευνοούνται σε σχετικά όξινα pH και σε υψηλότερες θερμοκρασίες συγκριτικά με τα AOB. Λογίζονται ως ευαίσθητοι μικροοργανισμοί γι' αυτό και μεταβολές σε αβιοτικές παραμέτρους, μπορούν να επηρεάσουν την δραστηριότητα και την αφθονία τους (You et al., 2009).

1.2.3 ΝΙΤΡΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (NOB)

Τα νιτροκοποιητικά βακτήρια είναι χημειολιθότροφοι αυτότροφοι μικροοργανισμοί και για να εξασφαλίσουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους, οξειδώνουν τα νιτρώδη ιόντα σε νιτρικά ιόντα υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ ως πηγή άνθρακα αξιοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα (Madigan et al., 2009). Ωστόσο, κάποια από αυτά, έχει αναγνωριστεί ότι μπορούν να λειτουργούν και να επιβιώνουν ως ετερότροφα, συνεπώς και θεωρούνται προαιρετικά αυτότροφα. Ως προς την φυλογενετική ταξινόμηση τους, ανήκουν στα πρωτεοβακτήρια και τα πιο γνωστά από αυτά κατατάσσονται στα γένη των *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrobacter*, *Nitrolancea* και ενός υποψήφιου γένους, το *Candidatus Nitromaritima* (Daims et al., 2016). Αναλυτικότερα για την νιτροκοποίηση, η ικανότητα των NOB να την καταλύουν, τα καθιστά πρωταγωνιστές στον κύκλο του αζώτου. Τα NOB φέρουν το γονίδιο *nxr* που κωδικοποιεί το ένζυμο της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR), το οποίο συνδέεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου και μέσω της δράσης του, καταλύεται η μετατροπή των νιτρώδων ιόντων σε νιτρικά (Sorokin et al., 2012). Τέλος, τα NOB αναπτύσσονται σε ευρύ φάσμα περιβάλλοντος συμπεριλαμβανομένων των χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων, όπως και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, πολλές φορές δρώντας συνεργατικά με τα AOB και AOA με αποτέλεσμα την ολοκληρωμένη διεργασία της νιτροποίησης (Daims et al., 2016).

1.2.4 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΟΞΕΙΔΩΝΟΥΝ ΠΛΗΡΩΣ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ (COMMAMOX)

Μέχρι πρόσφατα, η διεργασία της νιτροποίησης θεωρούταν πως διεξάγεται υποχρεωτικά σε δύο στάδια, την νιτρωδοποίηση και την νιτροκοποίηση, στο καθένα από τα οποία συμμετέχουν διαφορετικά είδη μικροοργανισμών (AOB και AOA στο πρώτο και NOB στο δεύτερο στάδιο). Πλέον, είναι γνωστό ότι στη φύση υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι καταλύουν στο ίδιο κύτταρο και τα δυο βήματα της νιτροποίησης και ονομάστηκαν Commamox (COMplete AMMonia Oxidation). Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια αυτά διαθέτουν γονίδια για την κωδικοποίηση ενζύμων που

δρουν στην νιτρωδοποίηση (AMO και HAO), και ενζύμων που δρουν στην νιτρικοποίηση (NXR). Τα Commaox απαντώνται σε χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα αλλά και σε τεχνητά περιβάλλοντα όπως μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015).

1.2.5 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΟΞΕΙΔΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ ΣΕ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ANAMMOX)

Τα Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation) είναι αναερόβια βακτήρια, τα οποία σε ανοξικές συνθήκες οξειδώνουν την αμμωνία. Ως προς την φυλογενετική τους ταξινόμηση, ανήκουν στο φύλο Plantomycetes και κατατάσσονται στα γένη των *Kuenenia*, *Brocadia*, *Ammonoxoglous*, *Scalindula* και *Jettenia* (Madigan et al., 2009). Αναλυτικότερα για την οξείδωση της αμμωνίας, χρησιμοποιούνται ως δέκτες ηλεκτρονίων τα νιτρώδη ιόντα αντί του οξυγόνου και παράγεται ως ενδιάμεσο προϊόν, η υδραζίνη (N_2H_4). Η υδραζίνη στη συνέχεια, με τη συμβολή του ενζύμου HAO μετατρέπεται σε ατμοσφαιρικό άζωτο και όχι νιτρικά ιόντα όπως συμβαίνει στην αερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Τα Anammox απαντώνται σε αναερόβια περιβάλλοντα όπως σε εκβολές ποταμών, ιζήματα και λίμνες και η παρουσία τους στους ωκεανούς συμβάλλει σημαντικά στην απώλεια αζώτου (Francis et al., 2007).

1.3 ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

1.3.1 ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΕΣ

Nitrosospira multiformis στέλεχος MG₃

Το στέλεχος *N. multiformis* είναι ένα βακτήριο, το οποίο οξειδώνει την αμμωνία σε νιτρώδη ιόντα (AOB). Ανήκει στα β- πρωτεοβακτήρια και είναι Gram αρνητικό βακτήριο. Ως προς τη μορφολογία και τη δομή του, διαθέτει διαμερισματοποιημένο κυτταρόπλασμα και σπειροειδές σχήμα (Watson et al., 1971). Όσον αφορά το γονιδίωμα του, το MG₃ διαθέτει ένα κυκλικό χρωμόσωμα και τρία πλασμίδια. Μεταξύ των γονιδίων που υπάρχουν στο γονιδίωμα του, συμπεριλαμβάνονται και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα AMO και HAO για την μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα αλλά και τα γονίδια για την κωδικοποίηση της νιτρικής οξειδοαναγωγής (NIR) και της οξειδοαναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NOR), ενζύμων που καταλύουν την μετατροπή των νιτρωδών ιόντων σε υποξείδιο του αζώτου (N_2O). Επιπλέον, το *N. multiformis* ως αυτότροφος μικροοργανισμός, φέρει τα απαραίτητα γονίδια για την καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα μέσω του κύκλου του Calvin και την παραγωγή ενέργειας μέσω μεταβολικών μονοπατιών όπως ο κύκλος του Krebs και η γλυκονεογένεση. Η καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα αξιοποιείται για την σύνθεση βιομορίων όπως τα αμινοξέα και τα μεμβρανικά συστατικά. Το *N. multiformis* απαντάται κυρίως σε χερσαία οικοσυστήματα σε συνθήκες ανάπτυξης θερμοκρασίας 25-30°C και pH 6.5-8 (Norton et al., 2008; Watson et al., 1971).

Candidatus Nitrosotalea Sinensis στέλεχος Nd₂

Το *Ca N. Sinensis* είναι ένα αρχαίο που έχει την ικανότητα να οξειδώνει την αμμωνία προς νιτρώδη ιόντα (AOA) και ανήκει στο φύλο των Thaumarcheota. Μορφολογικά, ομοιάζει με δυσδιάκριτη μικρή ράβδο και περιέχει εμφανή υποκυτταρικά οργανίδια. Ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης του, είναι υποχρεωτικά οξεόφιλο με σχετικά ευρύ pH για ανάπτυξη (4–6) και ιδανική θερμοκρασία τους 35°C, ενώ ευνοείται απουσία φωτός. Το *Ca N. Sinensis* απαντάται σε περιβάλλοντα που εξασφαλίζουν τις προαναφερθείσες συνθήκες αλλά και την επαρκή συγκέντρωση αμμωνίας, όπως σε χερσαία οικοσυστήματα (γεωργικά εδάφη), περιβάλλοντα γλυκού νερού και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Zhao et al., 2022).

1.3.2 ΝΙΤΡΙΚΟΠΟΙΗΤΕΣ

Nitrobacter winogradskyi στέλεχος NOB_{wino} και *Nitrobacter sp.* στέλεχος NHB1

Τα *N. winogradskyi* και *N. sp. NHB1*, είναι βακτήρια του γένους *Nitrobacter* και οξειδώνουν τα νιτρώδη ιόντα προς νιτρικά ιόντα. Ανήκουν στα α- πρωτεοβακτήρια και είναι Gram αρνητικά βακτήρια, με σχήμα ράβδου. Παρουσιάζουν αδυναμία κίνησης και διαιρούνται μέσω εκβλάστησης. Όσον αφορά το γονιδίωμα τους, είναι κυκλικό και περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τα απαραίτητα ένζυμα (NXR) για την μετατροπή των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα. Ως προς τις μεταβολικές τους λειτουργίες, χρησιμοποιούν διάφορες οργανικές πηγές άνθρακα ως ενέργεια και παράγουν ενέργεια μέσω της οξείδωσης νιτρωδών, οργανικών ενώσεων ή ανόργανων ουσιών. Αυτή η ενέργεια χρησιμοποιείται για κυτταρικές διεργασίες και την ανάπτυξη τους (Han et al., 2018; Starkenburg et al., 2008). Τα *N. winogradskyi* και *N. sp. NHB1* απαντώνται σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα. Αναφορικά με τις συνθήκες ανάπτυξης τους, και τα δύο είδη απαιτούν οξυγόνο. Ωστόσο, το *N. winogradskyi* ευνοείται σε θερμοκρασίες 25-30°C και pH 7.4-7.6, ενώ το *N. sp. NHB1*, σε θερμοκρασίες 25-28°C και pH 5-5.3 (Han et al., 2018; Grundmann et al., 2000). Η παρουσία τους στα οικοσυστήματα είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς ρυθμίζουν τόσο την κατανάλωση των νιτρωδών ιόντων, ώστε να μη συσσωρεύονται έπειτα από την δράση των νιτροδωποποιητικών μικροοργανισμών, όσο και την παροχή νιτρικών ιόντων στους ανώτερους από αυτούς οργανισμούς (όπως στα φυτά) (Han et al., 2018; Zhang et al., 2018).

1.4 ΠΡΩΤΙΣΤΑ

Τα πρώτιστα ανήκουν στα Ευκάρυα και είναι στη πλειονότητα μονοκύτταροι μικροοργανισμοί (Caron *et al.*, 2013; Fenchel *et al.*, 2006). Διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος μεγεθών, που κυμαίνεται από περίπου 3 μm, ως και αρκετά εκατοστά (Singh *et al.*, 2019). Όσον αφορά στις διατροφικές τους συνήθειες, τα πρώτιστα μπορεί να είναι φωτοαυτότροφα ή χημειοετερότροφα, δηλαδή να κατέχουν το ρόλο των παραγωγών ή των καταναλωτών, αντίστοιχα, στο περιβάλλον. Με την ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών οργανιδίων, τα αυτότροφα πρώτιστα, διαδραματίζουν ρόλο ζωτικής σημασίας στις τροφικές αλυσίδες (Singh *et al.*, 2019). Ωστόσο, η πλειονότητα των ειδών, διατρέφεται με βακτήρια ή άλλα πρώτιστα. Σχετικά με την ανάγκη τους σε οξυγόνο, τα περισσότερα από αυτά κατηγοριοποιούνται ως αερόβια. Η πλειονότητα των πρωτίστων αναπαράγεται κυρίως μέσω ασεξουαλικών μηχανισμών. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η διχοτόμηση (δυαδική σχάση), όπου ένα μητρικό κύτταρο χωρίζεται σε δύο πανομοιότυπα κύτταρα ή η πολλαπλή σχάση, όπου το μητρικό κύτταρο δημιουργεί πολλαπλά πανομοιότυπα κύτταρα (Caron *et al.*, 2013).

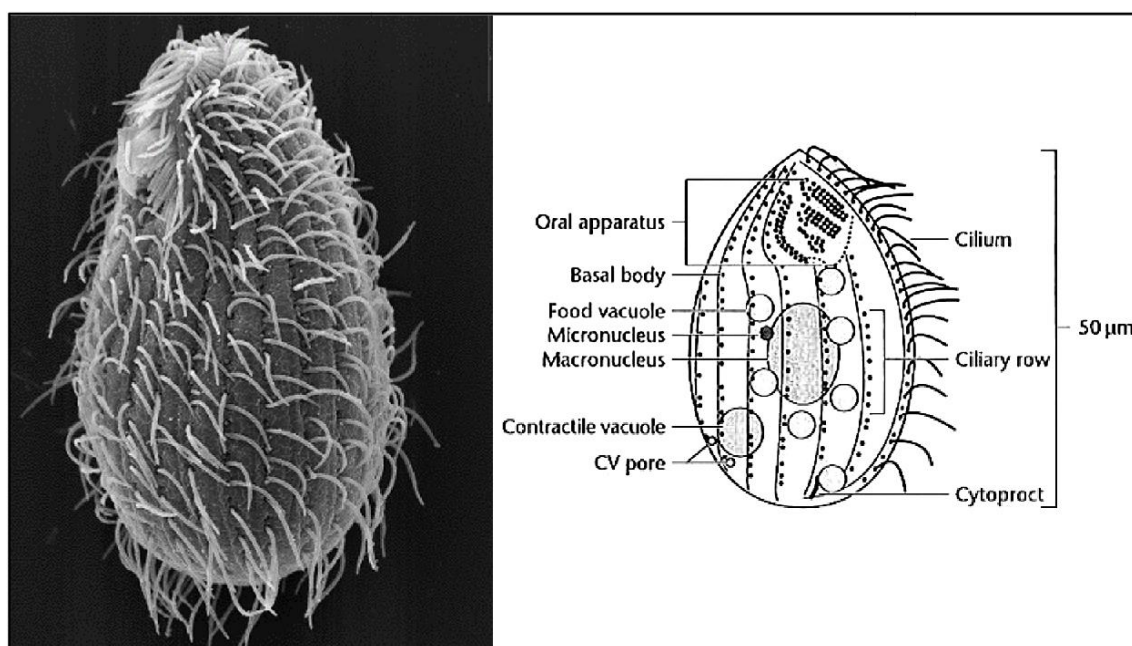
Οι εν λόγω μικροοργανισμοί είναι πανταχού παρόντες στη φύση, καθώς μπορούν να εντοπιστούν στη πλειονότητα των χερσαίων και υδάτινων βιοτόπων ως ελεύθερες μορφές ζωής ή παρασιτώντας άλλα πρώτιστα, μύκητες, φυτά και ζώα. Επιπλέον, παρατηρούνται και σε συστήματα απόρριψης λυμάτων τρεφόμενα με βακτήρια και ελέγχοντας με αυτό το τρόπο την ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών (Caron *et al.*, 2013; Fenchel *et al.*, 2006).

Τα πρώτιστα μπορούν να είναι παθογόνοι ή μη παθογόνοι μικροοργανισμοί. Κάποια από αυτά είναι υπεύθυνα για μια ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών, όπως η ελονοσία που προκαλείται από πέντε είδη του παρασίτου *Plasmodium*. Ωστόσο, πολλά από αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον. Με την ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών οργανιδίων, τα αυτότροφα πρώτιστα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή οξυγόνου. Αντίστοιχα, κάποια πρώτιστα διατρέφονται με βακτήρια και απελευθερώνουν περίσσεια ποσότητα αζώτου σε μορφή αμμωνίας, η οποία χρησιμοποιείται από άλλους οργανισμούς, όπως φυτά. Έτσι, τα πρώτιστα ευθύνονται για τη δημιουργία ενός σημαντικού τροφικού συνδέσμου για τη μεταφορά ύλης και ενέργειας από το χαμηλότερο τροφικό επίπεδο σε υψηλότερα επίπεδα (Caron *et al.*, 2013; Geisen *et al.*, 2018; Maurya *et al.*, 2020). Τρέχουσες μελέτες που βασίζονται σε μεθόδους αλληλούχησης DNA, αποδεικνύουν ότι τα πρώτιστα αποτελούν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Fenchel *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Κάποιες από τις κύριες ομαδοποιήσεις τους ως προς την μορφολογία είναι το βασίλειο των Κυψελιδωτών (Alveotes) που αποτελούνται από τα βλεφαριδοφόρα (ciliates), τα δινωμαστιγοφόρα (dinoflagellates) και τα ακροσυμπλεγματοειδή (apicomplexans) και των Στραμενόπιλων (Stramenopiles), τα οποία περιλαμβάνουν ομάδες που διαθέτουν μαστίγια με πολλές προεκτάσεις και στελεχώνονται από οργανισμούς όπως τα καφέ φύκη και τα διάτομα (Fenchel *et al.*, 2006).

1.4.1 *Tetrahymena* sp.

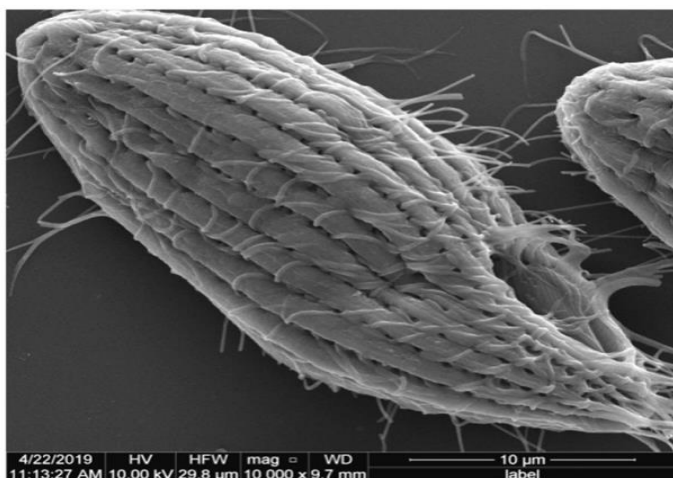
Τα πρώτιστα του γένους *Tetrahymena* ταξινομούνται στην οικογένεια των Tetrahymenidae, στην τάξη των Hymenostomatida, της ομοταξίας των Ολιγοϋμενοφόρων (Oligohymenophorea), και ανήκουν στην συνομοταξία των βλεφαριδοφόρων. Αποτελούν μη παθογόνους, ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους οργανισμούς που ζουν ελεύθεροι. Υπάρχουν δυο κύρια είδη *Tetrahymena*, τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με τον τύπο του πυρήνα που διαθέτουν, σε μικροπυρηνικά και αμικροπυρηνικά. Τα μικροπυρηνικά είδη, που αποτελούν και την πλειονότητα, έχουν έναν μακροπυρήνα, ο οποίος αποτελεί πυρήνα σωματικών κυττάρων και δρα κυρίως στον έλεγχο των μεταβολικών λειτουργιών του κυττάρου αλλά και έναν μικροπυρήνα, δηλαδή πυρήνα βλαστικής σειράς του οποίου ο ρόλος αφορά στην ρύθμιση της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Στα αμικροπυρηνικά είδη *Tetrahymena* απουσιάζει ο μικροπυρήνας και διαθέτουν μόνο μακροπυρήνα. Κάθε είδος έχει τη δική του σημασία. Τα μικροπύρηνα είδη προσδίνουν νέους συνδυασμούς γονιδίων που παρέχουν γονιδιακή συνέχεια μεταξύ των γενεών μέσω της σύντηξης γαμετών. Τα αμικροπυρηνικά είδη είναι εξαιρετικά συντηρημένα και ελέγχουν τον κυτταρικό φαινότυπο, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ιδανικά στη φυσιολογική και βιοχημική έρευνα. Το στέλεχος *Tetrahymena* που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα ερευνητική εργασία απομονώθηκε από έδαφος και ανήκει στο είδος των αμικροπυρηνικών. Τα τελευταία, αποτελούν πρωτόγονα είδη, αναπαράγονται με διχοτόμηση και ο μακροπυρήνας αποτελείται από 180 χρωμοσώματα και ελέγχει τον μεταβολισμό τους (Madigan et al. 2009; Maurya et al., 2020).

Ως προς την μορφολογία και τη δομή τους, τα *Tetrahymena* έχουν σχήμα αχλαδιού και οι διαστάσεις του κυμαίνονται μεταξύ 50-60 μm σε μήκος και 30 μm σε πλάτος. Οι βλεφαρίδες που διαθέτουν περιμετρικά σε όλη την έκταση του κυττάρου, ευνοούν την γρήγορη κίνησή τους αλλά και την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (Εικόνα 3) (Maurya et al., 2020).



Εικόνα 3. Ηλεκτρονική μικρογραφία και σχηματικό διάγραμμα του *Tetrahymena* sp. (Sachse, 2014).

Το σύστημα στόματος (oral apparatus) που εντοπίζεται στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου (Εικόνα 4), εξυπηρετεί την πρόσληψη σωματιδίων τροφής, και αποτελείται από τέσσερις μεμβρανικές δομές, και από το γεγονός αυτό προκύπτει και το όνομα *Tetra-hymena* (Maurya et al., 2020).



Εικόνα 4. Σύστημα στόματος του *Tetrahymena* sp (Maurya et al., 2020).

Τα *Tetrahymena* απορροφούν τα μόρια της τροφής τους μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης και στη συνέχεια τα αποθηκεύουν σε κενοτόπια τροφής για την πέψη. Ο ρυθμός σχηματισμού των κενοτοπίων εξαρτάται από την φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού όπως και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (pH, οξυγόνο και θερμοκρασία). Η ικανότητα σχηματισμού κενοτοπίων τροφής θα μπορούσε να αποτελεί δείκτη της τοξικότητας διαφόρων ξενοβιοτικών. Ο πρωκτικός πόρος (cytoproct) υπάρχει στο οπίσθιο άκρο του κυττάρου για την αποβολή των άπεπτων και άχρηστων ουσιών (Εικόνα 3). Τα κύτταρα *Tetrahymena* περιέχουν όλα τα κυτταροπλασματικά οργανίδια που εντοπίζονται φυσιολογικά στα ευκαρυωτικά κύτταρα όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, τα ριβοσώματα, το σύμπλεγμα Golgi, τα υπεροξειδιοσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η δομή τους αντικατοπτρίζει τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα υδάτινα και χερσαία περιβάλλοντα. Σχετικά με την κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών στη φύση, τρέφονται με βακτήρια. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση προκαρυωτικών οργανισμών με τους ευκαρυώτες στην τροφική αλυσίδα αλλά και τον έλεγχο του πληθυσμού των βακτηρίων στα προαναφερθέντα περιβάλλοντα. Η αφθονία τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης ποιότητας εδάφους και νερού. (Maurya et al., 2020).

Το είδος *Tetrahymena* αποτελεί πρότυπο οργανισμού προς μελέτη και ερευνητική αξιοποίηση, κατέχοντας πολυάριθμα πλεονεκτήματα. Πρόκειται, για ένα μικροσκοπικό ευκαρυωτικό μονοκύτταρο οργανισμό, παρόντα σε όλα τα φυσικά περιβάλλοντα. Επιπλέον, συνδυάζει χαμηλές θρεπτικές απαιτήσεις με τη δυνατότητα ανάπτυξής του σε ευρύ φάσμα θρεπτικών μέσων. Το είδος αυτών των πρωτίστων μπορεί να επιβιώσει έως και έξι μήνες σε συνθήκες αργής ανάπτυξης αλλά και να καταψυχθεί εύκολα για μακροχρόνια αποθήκευση, ενώ διαθέτει γρήγορο χρόνο πολλαπλασιασμού (3-9 ώρες) καθιστώντας το τον μοναδικό ευκαρυωτικό πρότυπο οργανισμό με αυτό το χαρακτηριστικό. Τέλος, είναι ένας ευαίσθητος μικροοργανισμός

που αποκρίνεται εμφανώς στις αλλαγές των συνθηκών στις οποίες αναπτύσσεται, μέσω της μορφολογίας και της δραστηριότητας του. Υπό στρεσογόνες συνθήκες, ως αποτέλεσμα έκθεσης τους σε τοξικές ουσίες ή σε ασυνήθιστο περιβάλλον, φαίνεται να μεταβάλλεται το σχήμα του σε σφαιρικό, να συρρικνώνεται, είτε να διογκώνεται η κυτταρική του μεμβράνη αλλά να επέρχεται και αλλαγή στην ταχύτητα κίνησης τους. Γι' αυτό, αποτελεί το πιο ευρέως διαδεδομένο είδος πρωτίστων για αξιοποίηση του ως δείκτη τοξικότητας ποικίλων τοξικών όπως γεωργικά φάρμακα και βαρέα μέταλλα (*Geisen et al., 2018; Maurya et al., 2020*).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα πρώτιστα και οι νιτροποιητικοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν μέλη των διεργασιών του κύκλου του αζώτου, ωθώντας την απελευθέρωση του αζώτου σε ιοντικές μορφές. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτίστων και νιτροποιητικών αρχαίων και βακτηρίων. Η μελέτη των αλλαγών στην ανάπτυξη των πρωτίστων και των μεταβολικών αλλαγών των προκαρυωτών που αναπτύσσονται κατά την αλληλεπίδραση τους, μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για τις σχέσεις μεταξύ τους, οδηγώντας στην διαμόρφωση σύνθετων μικροβιακών κοινοπραξιών που συμμετέχουν στον ίδιο βιοχημικό κύκλο. Απώτερο στόχο της διαμόρφωσης τέτοιων κοινοπραξιών, αποτελεί η χρήση τους ως εργαλείο για την αξιολόγηση της τοξικότητας οργανικών ρυπαντών που απαντώνται στα γεωργικά εδάφη, όπως είναι τα γεωργικά φάρμακα, αναπαριστώντας κατά το δυνατό λειτουργικές μικροβιακές κοινοπραξίες αντί δοκιμές ενός είδους.

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

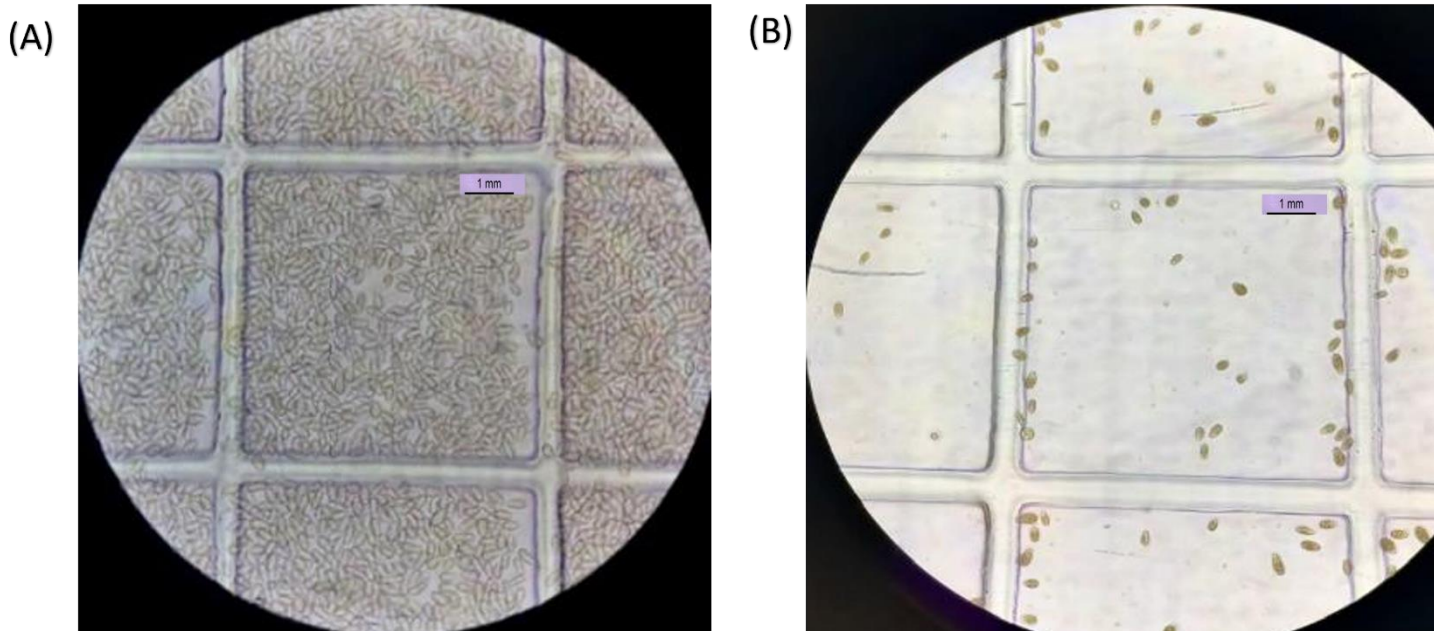
2.1 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ

Οι καλλιέργειες του στελέχους *Tetrahymena sp.* διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), ώστε να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται με ταχύ ρυθμό, για την αξιοποίησή τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Το βέλτιστο θρεπτικό ανάπτυξης των *Tetrahymena sp.*, είναι το Proteose Peptone Yeast (PPY), το οποίο συντίθεται από Proteose Peptone 1% , Yeast Extract 0,15% και 0,01mM FeCl₃. Δεδομένου ότι δεν είναι όλες οι πεπτόνες κατάλληλες για την παρασκευή του θρεπτικού, η επιλογή της κατάλληλης πεπτόνης απαιτεί προσοχή (Cassidy-Hanley,2012; Karakoc et al., 2020). Το τροποποιημένο θρεπτικό στο οποίο αναπτύχθηκαν τα *Tetrahymena* είναι το Bacteriological Peptone Yeast Extract (BPY). Το θρεπτικό υλικό αυτό συντίθεται από το Bacteriological Peptone 1%, το Yeast extract 0,15% και 0,01 M Iron Chloride/ FeCl₃. Για την παρασκευή του BPY σε duran 1 λίτρου, ζυγίστηκαν 10 g Bacteriological Peptone 1%, 1,5 g Yeast extract 0,15% και προστέθηκε σε 1 L ddH₂O. Ακολούθησε αποστείρωση του duran στους 121° C και αφού το θρεπτικό επανήλθε σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου, προστέθηκε 1 ml φιλτραρισμένου Ion Chloride σε στείρες συνθήκες. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονταν σε φλάσκες (tissue culture flasks) των 50 ml. Πριν την έναρξη της ανακαλλιέργειας, ελεγχόταν η κατάσταση κίνησης και μορφολογίας των πρωτίστων που περιέχονταν στη φλάσκα, στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται φυσιολογικά. Στη συνέχεια, σε αποστειρωμένη φλάσκα πραγματοποιούταν προσθήκη 15ml θρεπτικού υλικού BPY και 500 μl της προηγούμενης καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια τοποθετούνταν σε θερμοκρασία δωματίου. Όλη η διαδικασία λάμβανε χώρα σε στείρες συνθήκες.

2.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ

2.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ

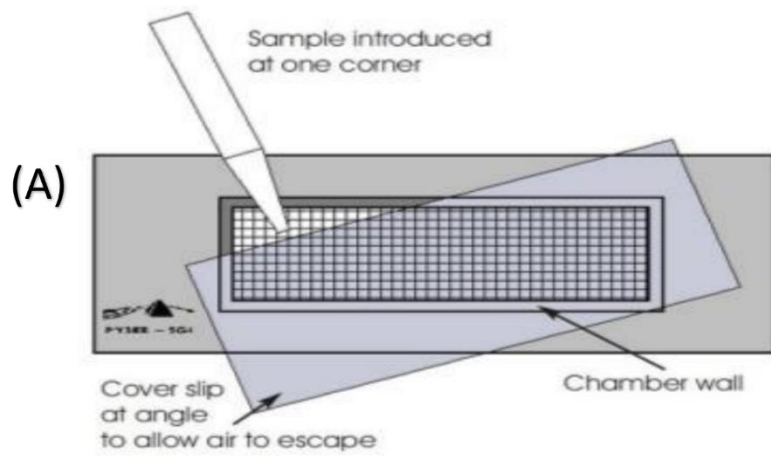
Τα δείγματα προς παρατήρηση τοποθετήθηκαν σε Eppendorfs των 2 ml. Η σταθεροποίηση και χρώση των κυττάρων ώστε να καταστεί εφικτή η διαδικασία της καταμέτρησης τους, έγινε με τη χρήση διαλύματος Lugol's Solution, στην ποσότητα των 100 μl. Σε περίπτωση αυξημένης ανάπτυξης της καλλιέργειας που καθιστούσε αδύνατη την καταμέτρηση, πραγματοποιούταν αραιώση με αρχική προσθήκη θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια ποσότητα καλλιέργειας, ανάλογης της αραιώσης. Η αραιώση πραγματοποιούταν όποτε ήταν αναγκαίο , έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε ποσότητες ικανές να μετρηθούν με το ανθρώπινο μάτι στο μικροσκόπιο, συνήθως όταν τα κύτταρα ανά τετράγωνο ξεπερνούσαν τα 30 (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Μικροσκοπική φωτογραφία πρωτίστων 10x (A): χωρίς αραιώση και (B): με αραιώση

Τελευταίο στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων για παρατήρηση στο μικροσκόπιο αποτέλεσε η μεταφορά των δειγμάτων από τα Eppendorfs στη πλάκα μέτρησης κυττάρων ή Sedgewick-Rafter Counting Chambers, η μορφή της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 6.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την ανακίνηση του Eppendorf, την λήψη 1 ml από αυτό και την εναπόθεση του εντός του chamber. Για να διεξαχθεί το τελευταίο βήμα, η καλυπτρίδα τοποθετούνταν με κλίση στο chamber, το περιεχόμενο διοχετευόταν από την γωνία εντός του chamber και στη συνέχεια η καλυπτρίδα αναπροσαρμοζόταν με αποτέλεσμα να εφάπτεται ακριβώς πάνω από την επιφάνεια του chamber (Εικόνα 6A και 6B). Το βήμα αυτό χρήζει προσοχής, καθώς είναι δυνατό να σχηματιστούν φυσαλίδες, οι οποίες δύναται να εμποδίσουν την καταμέτρηση. Σε αυτή τη περίπτωση το συγκεκριμένο chamber θα πρέπει να ξεπλυθεί και τα βήματα να επαναληφθούν. Τελευταίο στάδιο πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αποτελούσε η αναμονή διάρκειας δεκαπέντε έως είκοσι λεπτών, έτσι ώστε να τα κύτταρα να καθιζάνουν και να σταθεροποιηθούν στα chambers.



Εικόνα 6 (Α): Τρόπος πλήρωσης του chamber. (Β): Chamber πριν την πλήρωση με 1 ml καλλιέργειας πρωτίστων. (Γ): Chamber μετά την πλήρωση με 1 ml καλλιέργειας πρωτίστων.

2.2.2 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ

Η καταμέτρηση των πρωτίστων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου της εταιρίας Leica microsystems (inverted microscope) (Εικόνα 7).

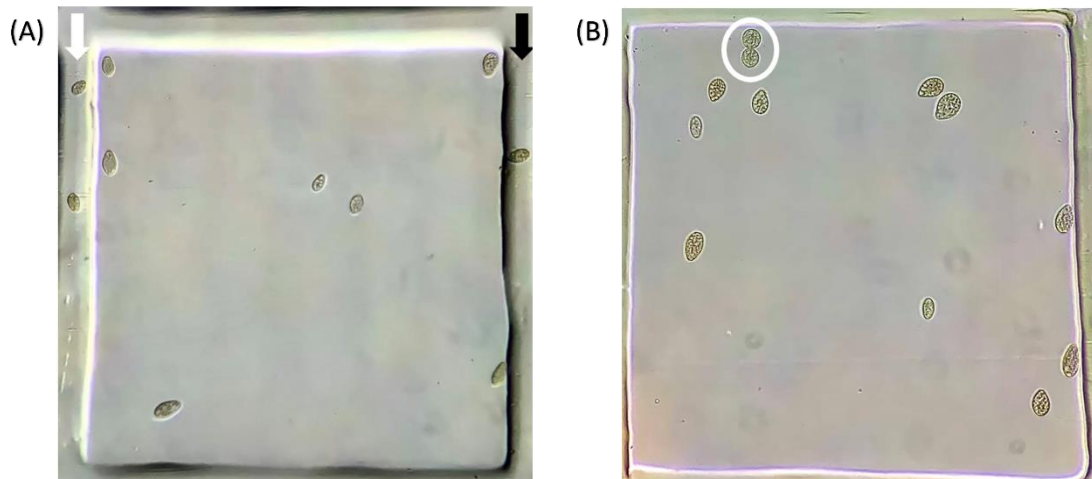
Το ανάστροφο μικροσκόπιο επιτρέπει την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων, οργανισμών ή ιστών, την δυνατότητα παρατήρησης μιας ολόκληρης καλλιέργειας ή ενός μεγάλου δείγματος στις συνθήκες που καλλιεργείται λόγω διαμόρφωσης του. Στο μικροσκόπιο ήταν εφαρμοσμένη κάμερα που επέτρεπε την λήψη φωτογραφιών των κυττάρων.



Εικόνα 7. Ανάστροφο μικροσκόπιο και δείγματα καλλιιεργειών πρωτίστων

Κάθε chamber τοποθετούταν στην ειδική θέση του ανάστροφου μικροσκοπίου και επιλεγόταν ο αντικειμενικός φακός 10x για την καταμέτρηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά τετράγωνο για τουλάχιστον 20 τετράγωνα. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης λαμβάνονταν υπόψιν οι εξής παράμετροι:

1. Για κύτταρα που συνορεύουν μεταξύ των γραμμών των τετραγώνων, μετρούνται μόνο αυτά που βρίσκονται στην δεξιά και στην κάτω πλευρά του τετραγώνου, όπως δείχνει η Εικόνα 8Α με το μαύρο βέλος). Εναλλακτικά, μπορούν να μετρηθούν μόνο αυτά που βρίσκονται στις πλευρές στην αριστερή και πάνω πλευρά του τετραγώνου (Εικόνα 8Α , λευκό βέλος).
2. Για κύτταρα που εντοπίζονται στην φάση της διχοτόμησης, αυτά μετριοούνται ως δύο, όταν φαίνονται να σχηματίζουν διακριτές μεμβράνες και τα κύτταρα διαχωρίζονται (Εικόνα 8Β).



Εικόνα 8. Μικροσκοπικές φωτογραφίες πρωτίστων μεγέθυνσης 10x. (Α): Μετριοούνται τα κύτταρα που βρίσκονται εντός του τετραγώνου και όσα βρίσκονται στη γραμμή που υποδεικνύεται από το μαύρο βέλος. (Β): Τα κύτταρα που φαίνονται κυκλωμένα βρίσκονται σε φάση διχοτόμησης και υπολογίζονται ως δύο.

Μετά την ολοκλήρωση της καταμέτρησης των κυττάρων, τα chambers και οι καλυπτρίδες ξεπλένονται προσεκτικά με απιονισμένο νερό και στεγνώνονται με τη χρήση χαρτιού εργαστηρίου έως την επόμενη χρήση τους.

2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ:

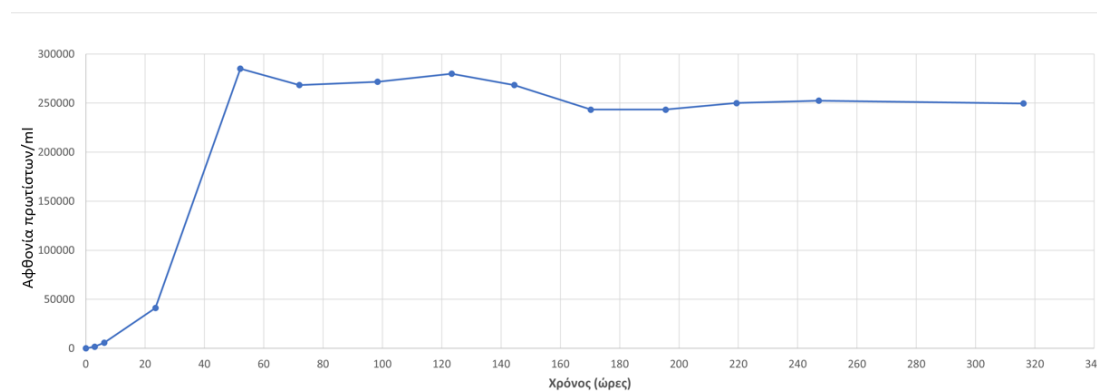
Ο πληθυσμός των κυττάρων (κύτταρα/ml) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\text{Πληθυσμός πρωτίστων} \left(\frac{\text{κύτταρα}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Αριθμός μετρημένων κυττάρων (N)} \times \text{Συντελεστής αραιώσης} \times 1000}{\text{Αριθμός μετρημένων τετραγώνων(S)} \times \text{Βάθος του Chamber (D)}}$$

Όπου ως N ορίζεται το άθροισμα των κυττάρων που μετρήθηκαν στο σύνολο των 20 τετραγώνων. Ο συντελεστής αραιώσης, προκύπτει ως 10 για την αραιώση 1:10 ή ως 100 για την αραιώση 1:100 κ.ο.κ.. Ο αριθμός 1000 είναι σταθερός και αντιστοιχεί στον αριθμό των τετραγώνων του κάθε Sedgewick-Rafter Counting Chamber. Ο συντελεστής S αντιστοιχεί στον αριθμό των τετραγώνων που μετρήθηκαν, στα πειράματα που διεξήχθησαν S=20. Τέλος ο συντελεστής D ορίζεται ως το βάθος του κάθε Sedgewick-Rafter Counting Chamber, που είναι σταθερός και ισούται με D=1.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η καμπύλη ανάπτυξης του πρωτίστου *Tetrahymena sp.*, στο θρεπτικό BPY, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για 13 ημέρες, όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 9. Για την κατασκευή της, πραγματοποιήθηκαν

μετρήσεις έπειτα από 3 και 6 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας και κατόπιν πραγματοποιούνταν μια μέτρηση κάθε ημέρα για περίπου 13 ημέρες (316 ώρες).



Εικόνα 9. Καμπύλη ανάπτυξης του *Tetrahymena sp.* Στον άξονα x'x απεικονίζεται ο χρόνος σε ώρες και στον άξονα y'γ η αφθονία των πρωτίστων/ml.

2.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

2.3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Το αρχαίο *Candidatus Nitrosotalea sinensis* αναπτύσσεται στο θρεπτικό Fresh Water 0.5mM NH₄⁺ με pH: 5-5.3 και διατηρείται σε επωαστήρα με θερμοκρασία τους 35°C στο σκοτάδι. Το *Nitrobacter sp. NHB1* αναπτύσσεται στο θρεπτικό Fresh Water 0.5mM NO₂⁻ με pH: 5-5.3 και διατηρείται σε επωαστήρα με την θερμοκρασία στους 25-28°C στο σκοτάδι. Το *Nitrobacter winogradskyi* αναπτύσσεται στο θρεπτικό Skinner and Walker 20mM NO₂⁻ με pH 7.4-7.6 και διατηρείται σε επωαστήρα με θερμοκρασία στους 28°C στο σκοτάδι. Το *Nitrosospira multififormis* αναπτύσσεται στο θρεπτικό Skinner and Walker 1mM NH₄⁺ με pH: 7.5-8 και διατηρείται σε επωαστήρα με την θερμοκρασία στους 25-30°C στο σκοτάδι.

2.3.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Η παρασκευή των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης των νιτροποιητών όπως έχει προταθεί από Skinner and Walker 1991.

ΘΡΕΠΤΙΚΟ FRESH WATER (FW)

Για το ΑΟΑ προστίθεται υπόστρωμα που περιέχει αμμωνία, ενώ για το βακτήριο *Nitrobacter sp. NHB1* προστίθεται υπόστρωμα που περιέχει νιτρώδη.

Για να παρασκευαστεί 1 L θρεπτικού FW προστέθηκαν 900 ml/L δις αποσταγμένο νερό (ddH₂O), διάλυμα βασικών αλάτων 10 x, 1M NaHCO₃ (2 ml), 7.5mM 1 ml/L FeNaEDTA (1 ml/L), 1 ml/L διαλύματος ιχνοστοιχείων, 10 ml/L MES buffer (pH: 5.2-5.3), 200μL πυκνού HCl (12.5 N) για ρύθμιση pH στη τιμή 5.0-5.3.

Το διάλυμα βασικών αλάτων προέκυψε από την ανάμειξη NaCl 170 mM (10 g/L), MgCl₂ 6H₂O 40 mM (4 g/L), CaCl₂ 9 mM (1 g/L), KH₂PO₄ 15 mM (2 g/L) και KCl 70 mM (5 g/L) σε 1 λίτρο ddH₂O.

Το NaHCO₃ (1M) προέκυψε από 16.8g NaHCO₃ σε 200ml ddH₂O.

Το FeNaEDTA (7.5mM) προέκυψε από 0.55g Fe-Na-EDTA σε 200 ml ddH₂O.

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων προέκυψε από τα εξής συστατικά: H₃BO₃ (0.5 mM) 30 mg/L, MnCl₂ 4H₂O (0.5 mM) 100 mg/L, CoCl₂ 6H₂O (0.8 mM) 190 mg/L, NiCl₂ 6H₂O (0.1 mM) 24 mg/L, CuCl₂ 2H₂O (0.01 mM) 2 mg/L, ZnSO₄ 7H₂O (0.5 mM) 144 mg/L, Na₂MoO₄ 6H₂O (0.15 mM) 36 mg/L και HCl (12.5 M) 8 ml/L σε 1 λίτρο ddH₂O.

Το MES buffer (pH: 5.2-5.3) προέκυψε από 10.67g MES 1-hydrate σε 100ml ddH₂O. Το pH ορίστηκε στη τιμή 5.2-5.3 με προσθήκη NaOH.

Στο παραπάνω θρεπτικό, για το *Nitrobacter sp. NHB1* προστίθενται 0,5 M NaNO₂, ενώ για το *Candidatus Nitrosotalea sinensis* προστίθενται 0,5 M NH₄Cl.

ΘΡΕΠΤΙΚΟ SKINNER AND WALKER (SW)

Στο θρεπτικό αυτό, για το στέλεχος *Nitrospira multiformis* προστίθεται υπόστρωμα που περιέχει αμμωνία, ενώ για το *Nitrobacter winogradskyi*, προστίθεται υπόστρωμα που περιέχει νιτρώδη.

Για να συντεθεί 1 L θρεπτικό SW προστίθενται σε 1 L ddH₂O, 0.2 g KH₂PO₄, 0.04 g CaCl₂2H₂O, 0.04 g MgSO₄7H₂O, 1 ml FeNaEDTA (7.5mM), 1 ml κόκκινο της φαινόλης (0.05%), 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων και 0.198 g (NH₄)₂SO₄. Στη συνέχεια, το θρεπτικό αποστειρώθηκε. Για την ρύθμιση του pH σε τιμή 7.5-8.0, προστέθηκε HEPES buffer (pH: 9.0-9.2) και Na₂CO₃ (5%). Για το κόκκινο της φαινόλης προστέθηκε 0.125g σε 250ml ddH₂O.

Για την καλλιέργεια του *N. multiformis* προστίθεται (NH₄)₂SO₄ (0,066 g/L) για τελική συγκέντρωση 1 mM NH₄⁺ και για το *Nitrobacter winogradskyi* προστίθεται NaNO₂ (1,38 g/L) για τελική συγκέντρωση 20 mM NO₂⁻

Για την σύνθετη μικροβιακή κοινότητα των στελεχών *N. multiformis* και *Nitrobacter winogradskyi*, προστίθενται (NH₄)₂SO₄ (0,066 g/L) για τελική συγκέντρωση 3 mM NH₄⁺.

2.3.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Σε duran 250 ml πραγματοποιούταν προσθήκη 50 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού που αναπτύσσεται ο κάθε νιτροποιητικός μικροοργανισμός και εμβόλιο 1 ml του αντίστοιχου μικροοργανισμού (0,5 ml μόνο για μεμονωμένο *N. multiformis*) από προηγούμενη καλλιέργεια μιας εβδομάδας. Όλη η διαδικασία λάμβανε χώρα σε στείρες συνθήκες.

2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΩΝ

2.4.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΝΙΤΡΩΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Η μέτρηση των νιτρωδών πραγματοποιήθηκε με χρωματομετρική μέθοδο, σύμφωνα με την μέθοδο των Wanner et al., (2009), όπου υπολογίζονταν τα καταναλωμένα ή παραγόμενα ιόντα νιτρωδών (ανάλογα τον μικροοργανισμό και το στάδιο νιτροποίησης που συμμετείχε) σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (96 well-plate). Κατά τη διαδικασία της μέτρησης μεμονωμένων στελεχών, προστίθενται αρχικά 20 μl του αντιδραστηρίου diazotizing (0,5 g σουλφανιλαμίδιο σε 100 ml 2,4 M HCl) και στη συνέχεια 20 μl coupling (0,3 g N-(1-ναφθυλ)-αιθυλενοδιαμίνη HCl σε 100 ml 0,12 M HCl) σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας που περιείχε 100 μl δείγματος καλλιέργειας. Τα νιτρώδη αντιδρούν σε όξινες συνθήκες με πρωτοταγείς αρωματικές αμίνες του αντιδραστηρίου diazotizing παράγοντας άλατα διαζωνίου. Τα άλατα αυτά ακολούθως, πραγματοποιούν αντίδραση σύζευξης με αρωματικές ενώσεις του αντιδραστηρίου coupling, των οποίων οι αμινομάδες ή οι υδροξυλομάδες σχηματίζουν έγχρωμες ενώσεις αζώτου. Έτσι, οι έγχρωμες αυτές ενώσεις επιτρέπουν την αξιοποίηση της χρωματομετρικής μεθόδου. Όσον αφορά στην μέτρηση νιτρωδών στις συνθετικές καλλιέργειες, προστίθενται αρχικά 60 μl σουλφανιλαμιδίου και 20 μl coupling. Η μέτρηση, λαμβάνει χώρα με τη χρήση του Microplate Reader με απορρόφηση στα 540 nm. Ο τελικός υπολογισμός των συγκεντρώσεων των νιτρωδών ιόντων βασίζεται σε πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν βάσει της ανάλυσης διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων NaNO_2 (0-200 μM).

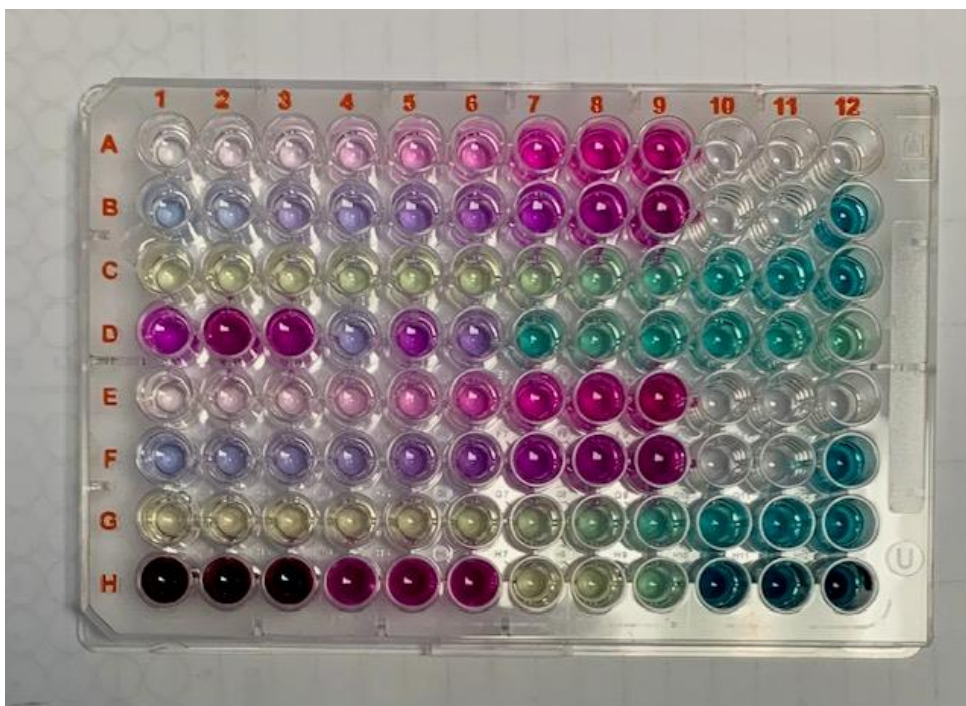
2.4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Με την ίδια χρωματομετρική μέθοδο, υπολογίζονται τα παραγόμενα νιτρικά ιόντα. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας Microplate Reader, μετράται η απορρόφηση στα 540 nm για την ανίχνευση νιτρωδών. Κατόπιν, προστίθενται 20μl χλωριούχου βαναδίου σε κάθε πηγαδάκι όπου εμπεριέχεται δείγμα προς υπολογισμό νιτρικών ιόντων και ακολουθεί επώαση της πλάκας μικροτιτλοδότησης για 90 λεπτά στους 35°C. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του συνόλου νιτρωδών και νιτρικών ιόντων, επαναλαμβάνεται η χρήση του Microplate Reader με απορρόφηση στα 540 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων, πραγματοποιείται αφαίρεση της τελικής συνολικής συγκέντρωσης της δεύτερης μέτρησης από την συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων της αρχικής μέτρησης. Ο τελικός υπολογισμός των συγκεντρώσεων των νιτρωδών και νιτρικών ιόντων βασίζεται σε πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν βάσει ανάλυσης διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων NaNO_2 και NaNO_3 (0-200 μM).

2.4.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Η συγκέντρωση αμμωνίου στα δείγματα προσδιορίζεται χρωματομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Kandeler et al., (1988) με την αντίδραση μεταξύ φαινόλης και αλκαλικού υποχλωριώδους νατρίου που παράγει μια μπλε χρωστική, την ινδοφαινόλη. Η αντίδραση επιταχύνεται με την προσθήκη νιτροπρωσσικού νατρίου ως καταλύτη. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε πηγαδάκι του 96-well plate που εισάγονται 50 μl δείγματος, προστίθενται 50 μl έγχρωμου αντιδραστηρίου (color reagent) που αποτελείται από 1:1:1 NaOH, διάλυμα σαλικυλικού νατρίου, (το οποίο περιέχει τον

καταλύτη νιτροπρωσσικού νατρίου και σαλικυλικό νάτριο) και ddH₂O, και 20 μl oxidation solution (το οποίο περιέχει διχλωροϊσοκυανουρικό οξύ νατρίου). Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανακίνηση. Η μέτρηση, λαμβάνει χώρα στο Microplate Reader με απορρόφηση στα 660 nm. Ο τελικός υπολογισμός των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών ιόντων βασίζεται σε πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν βάσει της ανάλυσης διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων NH₄Cl (0-1000 μM).



Εικόνα 10. Φωτογραφία του 96-well-plate κατά τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων.

2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΤΩΝ ΑΟΒ ΚΑΙ ΝΟΒ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση της αφθονίας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών διεξήχθη qPCR. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν το βακτηριακό *amoA* για την εξέταση της αφθονίας του MG₃ και το *nxrB* για τα νιτροποιητικά βακτήρια NOB_{NHB1} και NOB_{wino}. Για την απομόνωση του DNA πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από τις υγρές καλλιέργειες, προσλαμβάνοντας 2 ml από κάθε καλλιέργεια σε Eppendorf. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά σε 17.000 g και αφαιρούνταν με χρήση πιπέτας το υπερκείμενο. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων διατηρούνταν για μεταγενέστερη απομόνωση του DNA. Η μελέτη της αφθονίας των προαναφερθέντων γονιδίων πραγματοποιήθηκε με ενίσχυση με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο *amoA* ήταν οι:

amoA-1F: 59-GGGGTTTCTACTGGTGGT

amoA-2R: 59-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC

Και για το γονίδιο *nxB*:

nxB-1R: 5'-CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA-3'

nxB-1F: 5'-ACGTGGAGACCAAGCCGGG-3'

2.6 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΩΝ

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να προστεθούν πρώτιστα σε πληθυσμό ύψους 10^4 , ώστε η τελική αφθονία τους που θα προκύψει εντός *duram* καλλιέργειας 50 ml που αναπτύσσονται οι νιτροποιητές, να είναι περίπου 10^3 . Για κάθε εμβολιασμό σε καλλιέργεια 50 ml νιτροποιητών, λαμβάνονταν 5 ml από την καλλιέργεια των πρωτίστων που βρίσκονταν στην επιθυμητή φάση ανάπτυξης και μεταφέρονταν σε Eppendorfs των 2 ml. Στη συνέχεια, τα Eppendorfs φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά στα 21.000 g και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, τα κύτταρα καθίζαναν στον πυθμένα των Eppendorfs και το υπερκείμενο απομακρυνόταν με ήπιους χειρισμούς με τη χρήση πιπέτας. Επόμενο βήμα αποτελούσε η προσθήκη 1 ml αποστειρωμένου θρεπτικού στο οποίο αναπτύσσονται οι νιτροποιητές (FW ή SW) στα Eppendorfs και ανάδευση με χρήση αναδευτήρα vortex, έτσι ώστε να διαλυτοποιηθούν τα πρώτιστα που έχουν καθίσει και να προστεθούν στην καλλιέργεια με το καινούριο τους θρεπτικό. Τέλος, το περιεχόμενο των Eppendorfs διοχετευόταν στο *duram* που περιέχει τον κάθε μικροοργανισμό-νιτροποιητή. Οι μετρήσεις των πρωτίστων πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση, με πιο συχνές μετρήσεις κατά το πρώτο 24ωρο που αναμένονταν πιο έντονες αλλαγές στο μικροβιακό σύστημα, με τον προαναφερθέντα τρόπο με σκοπό να διαπιστωθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και η πιθανή διατροφική προτίμηση των πρωτίστων προς τους νιτροποιητές. Ο πληθυσμός ύψους 10^4 των πρωτίστων, έτσι ώστε να εμβολιαστούν στις καλλιέργειες των νιτροποιητών, επιτεύχθηκε μεταξύ των 20-36 πρώτων ωρών ανάπτυξης τους (βλέπε Εικόνα 9).

2.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel έκδοσης 2305 υπολογίζονταν οι συγκεντρώσεις των πρωτίστων και οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρικών ιόντων, όπως και η μέση τιμή (average) των επαναλήψεων του κάθε δείγματος μικροοργανισμών. Χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους τον χρόνο (σε ώρες σύμφωνα με τις ανάγκες του πειράματος) και την προαναφερθείσα μέση τιμή ανά δείγμα, προέκυπτε διάγραμμα διασποράς, το οποίο αξιοποιούταν κατά την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων. Τα διαγράμματα κατασκευάστηκαν μέσω Microsoft Excel με δεδομένα από τις μετρήσεις των πρωτίστων και τις μετρήσεις των αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρικών ιόντων. Τα δεδομένα από τις μετρήσεις αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρικών ιόντων, υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA), με πολλαπλές συγκρίσεις, οι οποίες στη συνέχεια διορθώθηκαν με *posthoc* Bonferroni για την εκτίμηση της στατιστικής διαφοράς των τιμών, του κάθε

ίόντος ξεχωριστά, μεταξύ των πειραματικών επαναλήψεων, που αφορούσαν νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς και πρώτιστα και των επαναλήψεων ελέγχου που αφορούσαν μόνο νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς απουσία πρωτίστων σε κάθε χρονικό σημείο μέτρησης. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές ληφθήκαν υπόψιν ως εξής: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

2.8.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΩΝ

Οι τέσσερις νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί, δηλαδή *Nitrobacter* sp., NHB1, *Nitrobacter winogradskyi*, *Ca. Nitrosotalea sinensis*, *Nitrospira multiformis*, μελετήθηκαν μεμονωμένα στα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης τους παρουσία και απουσία του θηρευτή *Tetrahymena* sp. Ειδικότερα, μελετήθηκε για κάθε νιτροποιητικό μικροοργανισμό η επίδραση του χρόνου εμβολιασμού του *Tetrahymena* σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης του νιτροποιητικού μικροοργανισμού. Έτσι, το *Tetrahymena* εμβολιάστηκε στις καλλιέργειες των νιτροποιητών όταν αυτοί βρίσκονταν στην πρώιμη λογαριθμική ή στην στατική φάση. Η φάση στην οποία βρίσκονταν οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί ελέγχθηκε με την μέτρηση της συγκέντρωσης νιτρώδων (NO_2^-) σε κάθε καλλιέργεια. Στα αρχικά πειράματα, για κάθε μικροοργανισμό, δημιουργήθηκαν έξι επαναλήψεις. Από αυτές, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ως επαναλήψεις πειράματος (δύο για την πρώιμη λογαριθμική φάση και δύο για την στατική φάση), και δύο ως μάρτυρες των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, στις οποίες δεν προστέθηκαν πρώτιστα.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ένα δεύτερο πείραμα όπου μελετήθηκε και η επίδραση της προσθήκης του *Tetrahymena* στο στέλεχος *N. multiformis* στο στάδιο της μέσης λογαριθμικής φάσης. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν πανομοιότυπη. Ωστόσο, στο σχεδιασμό του συγκεκριμένου πειράματος, οι πειραματικές επαναλήψεις παρουσία *N. multiformis* και *Tetrahymena* ήταν έξι, οι επαναλήψεις ελέγχου των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών *N. multiformis* απουσία πρωτίστων ήταν επίσης έξι και υπήρξαν τέσσερις επαναλήψεις ελέγχου πρωτίστων, στις οποίες τα πρώτιστα αναπτύσσονταν στο ίδιο θρεπτικό μέσο με αυτό που αναπτύσσεται το *N. multiformis* SW 1mM NH_4^+ , όμως απουσία του νιτρωδοποιητικού μικροοργανισμού.

2.8.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΟΙΝΟΠΡΑΞΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτίστων με συνθετική κοινοπραξία (SynCom₂) του νιτρωδοποιητικού βακτηριακού στελέχους *N. multiformis* και του νιτρικοποιητικού βακτηριακού στελέχους *Nitrobacter winogradskyi*. Η συγκεκριμένη κοινοπραξία αναπτύχθηκε, σε θρεπτικό μέσο SW με 3mM NH_4^+ . Το αμμώνιο του θρεπτικού καταναλωνόταν από το *N. multiformis* και παράγονταν νιτρώδη ιόντα. Τα παραχθέντα νιτρώδη ιόντα, αξιοποιούνταν από το *N. winogradskyi* και μετατρέπονταν σε νιτρικά ιόντα. Τα

πρώτιστα στην παρούσα περίπτωση, προστέθηκαν όταν η κοινοπραξία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών βρισκόταν στην μέση λογαριθμική φάση. Στο πλαίσιο της πειραματικής δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις πειράματος, που περιείχαν νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς *N. multiformis*- *N. winogradskyi* και πρώτιστα, έξι επαναλήψεις μάρτυρα της κοινοπραξίας χωρίς *Tetrahymena* και τέσσερις καλλιέργειες του *Tetrahymena* στο θρεπτικό SW απουσία της κοινοπραξίας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών.

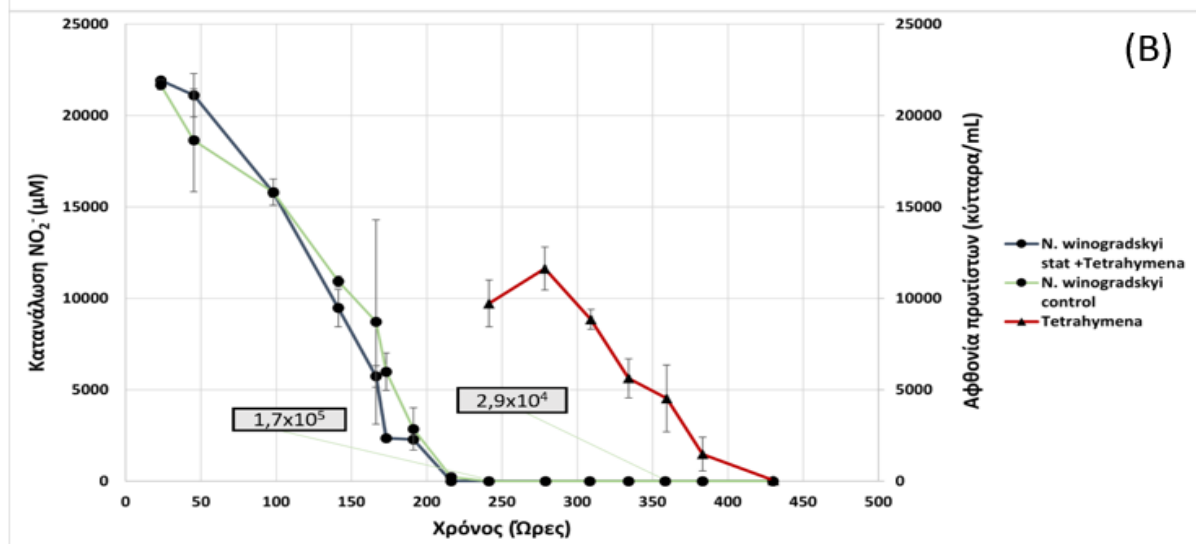
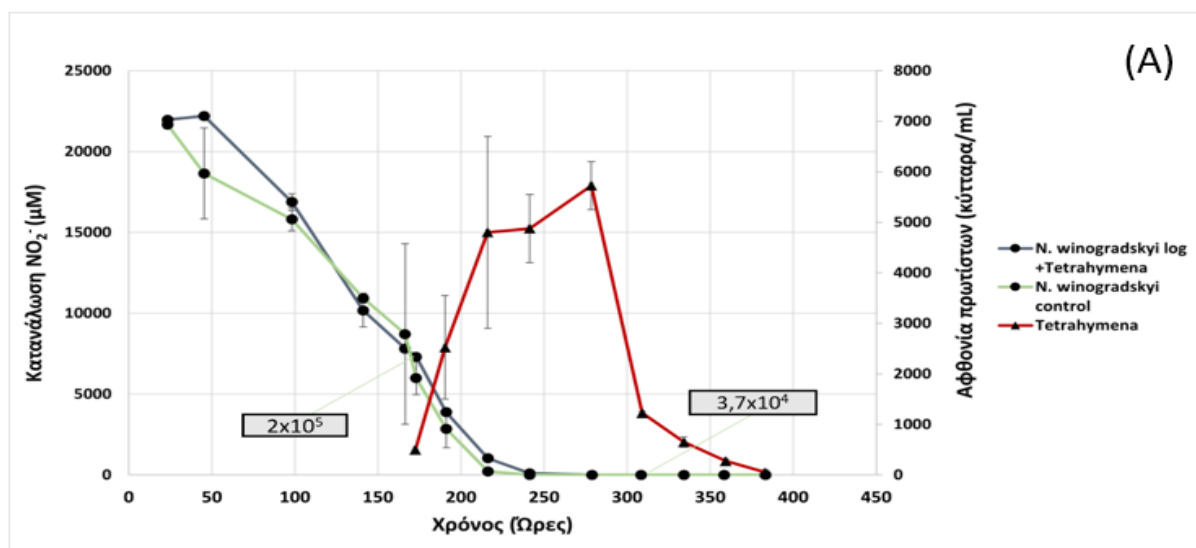
Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες ως μέρα 0 και ώρα 0 του πειράματος ορίζεται η στιγμή που εμβολιάζεται η μικροβιακή κοινοπραξία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Η φάση στην οποία βρίσκονταν οι μικροοργανισμοί και η δραστηριότητα τους ελεγχόταν με την μέτρηση της συγκέντρωσης ιόντων σε κάθε καλλιέργεια τουλάχιστον μια φορά την ημέρα. Όσον αφορά στην ανάπτυξη των πρωτίστων, ορίζεται ως ημέρα 0, η μέρα προσθήκης των πρωτίστων στις εκάστοτε καλλιέργειες νιτροποιητικών μικροοργανισμών, ωστόσο, ο χρόνος παρουσίας τους συγκεντρωτικά στα διαγράμματα, συνεχίζει να υπολογίζεται με αφετηρία, την ημέρα που ξεκίνησε το πείραμα, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού με τον νιτροποιητή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΩΝ

3.1.1 *Nitrobacter winogradskyi* (NOB_{wino}) με *Tetrahymena* sp.

Δεδομένου ότι το στέλεχος *N. winogradskyi* οξειδώνει τα νιτρώδη, η συγκέντρωση των νιτρωδών στις καλλιέργειες του, μειώνεται καθώς τα βακτήρια καταναλώνουν τα νιτρώδη του υποστρώματος, στο οποίο αναπτύσσονται. Το *N. winogradskyi* αναπτυσσόμενο σε υπόστρωμα 20mM (SW NO₂⁻), φτάνει σε λογαριθμική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ισούται με 7500 μM (Ma et al., 2014) και σε στατική φάση όταν τα νιτρώδη έχουν καταναλωθεί πλήρως. Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις, οι καλλιέργειες έφτασαν στην πρώιμη λογαριθμική φάση, την 7^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 11^A -165 ώρες πειράματος) και στην στατική φάση την 9^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 11^B -215 ώρες). Για την μελέτη κάθε φάσης ανάπτυξης ξεχωριστά, την αντίστοιχη χρονική στιγμή προστέθηκαν τα πρώτιστα σε δύο βιολογικές επαναλήψεις (επαναλήψεις πειράματος *N. winogradskyi* +*Tetrahymena*), ενώ άλλες δυο επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας του *N. winogradskyi*, απουσία πρωτίστων.



Εικόνα 11. Διάγραμμα του πειράματος *N. winogradskyi* με *Tetrahymena* που αποτυπώνει τις συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO_2^-) στον πρωτεύοντα άξονα γ'γ και την αφθονία των πρωτίστων (κύτταρα/ml) στον δευτερεύοντα άξονα γ'γ συναρτήσει του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα x'x όταν το *Tetrahymena* προστέθηκε στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi*, όταν αυτό βρισκόταν στην (Α) **πρώιμη λογαριθμική και (Β) στατική** φάση ανάπτυξης. Όπου *Tetrahymena*, τα πρώτιστα στις πειραματικές επαναλήψεις με κόκκινο χρώμα, *N. winogradskyi* log: επαναλήψεις πειράματος με *N. winogradskyi* και πρώτιστα σε λογαριθμική φάση με μπλε χρώμα, *N. winogradskyi* stat, οι επαναλήψεις του πειράματος με *N. winogradskyi* και πρώτιστα σε στατική φάση με μπλε χρώμα και *N. winogradskyi* control: επαναλήψεις ελέγχου μόνο με *N. winogradskyi* με πράσινο χρώμα. Τα γκρι πλαίσια υποδεικνύουν την αφθονία των νιτροποιητών στα αντίστοιχα χρονικά σημεία όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω q-PCR του γονιδίου *nxrB*.

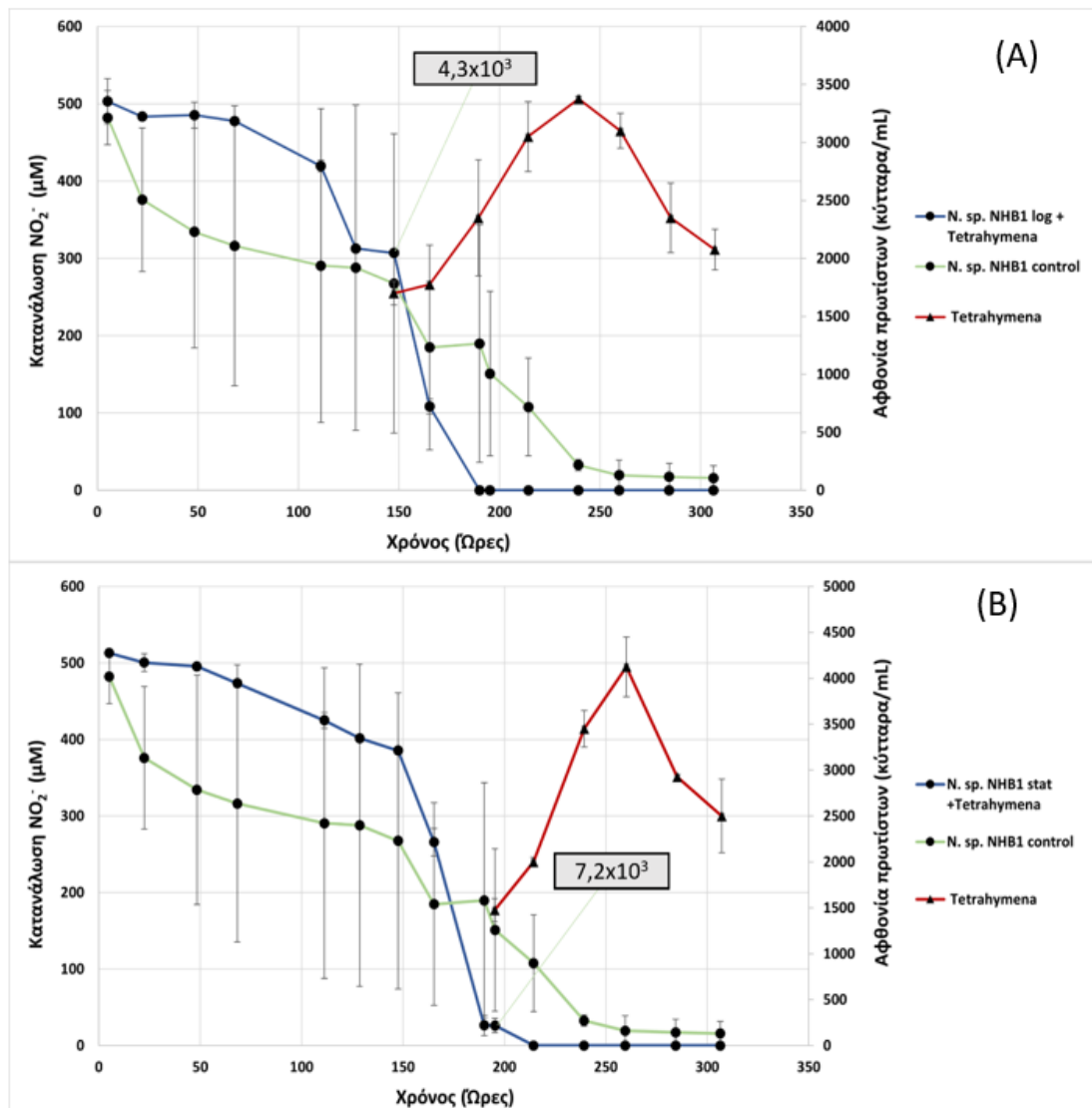
Όσον αφορά στη δραστηριότητα του *N. winogradskyi* της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, σύμφωνα με το μοτίβο κατανάλωσης νιτρωδών, φαίνεται ότι στην μεταχείριση *N. winogradskyi* παρουσία του *Tetrahymena*, η συγκέντρωση τους μειώνεται κατά την διάρκεια του πειράματος καθώς τα νιτρώδη καταναλώνονται τρεις ημέρες μετά την προσθήκη των πρωτίστων (10^{th} μέρα- 240 ώρες πειράματος). Με τον ίδιο τρόπο, φαίνεται να κινήθηκε η κατανάλωση των νιτρωδών και στην μεταχείριση του μάρτυρα *N. winogradskyi*, απουσία του *Tetrahymena*, η συγκέντρωση των οποίων επίσης μηδενίστηκε την 10^{th} μέρα (Εικόνα 11^A). Κατά την μελέτη της κατανάλωσης των νιτρωδών του *N. winogradskyi*, όταν ο εμβολιασμός των πρωτίστων πραγματοποιήθηκε στην στατική του φάση, δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων παρουσία και απουσία των πρωτίστων, όπως και αναμενόταν, και τα νιτρώδη έχοντας καταναλωθεί όλα, παρέμειναν σε συγκέντρωση ίση με μηδέν σε όλες τις μετρήσεις (Εικόνα 11^B).

Η αφθονία των βακτηρίων *N. winogradskyi*, κατόπιν διεξαγωγής ανάλυσης qPCR, φαίνεται στα γκρι πλαίσια. Κατά την μοριακή αυτή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην πρώιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των επαναλήψεων *N. winogradskyi* και *Tetrahymena*, τα βακτηριακά κύτταρα βρέθηκαν σε πληθυσμό 2×10^5 στις 165 ώρες πειράματος και $3,7 \times 10^4$ στις 300 ώρες του πειράματος, (Εικόνα 11^A). Όσον αφορά στις επαναλήψεις του πειράματος *N. winogradskyi* και *Tetrahymena* για την στατική φάση ανάπτυξης του *N. winogradskyi*, η αφθονία των βακτηριακών κυττάρων καταγράφηκε με τιμή $1,7 \times 10^5$ στις 250 ώρες του πειράματος και $2,9 \times 10^4$ στις 350 ώρες του πειράματος (Εικόνα 11^B), υποδεικνύοντας ότι κατά την πρώιμη λογαριθμική φάση ο πληθυσμός τους ήταν υψηλότερος.

Σχετικά με την αφθονία των πρωτίστων, κατά τον εμβολιασμό τους στην πρώιμη λογαριθμική φάση του *N. winogradskyi*, παρατηρήθηκε αύξηση στον πληθυσμό τους από την ημέρα εμβολιασμού τους (170 ώρες πειράματος), ο οποίος κορυφώθηκε πέντε μέρες αργότερα (280 ώρες) και έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία σε όλες τις μεταγενέστερες μετρήσεις ως την τελευταία μέρα μέτρησης (380 ώρες) (Εικόνα 11^A). Αντιθέτως, η αφθονία των πρωτίστων μετά τον εμβολιασμό τους κατά την στατική φάση του *N. winogradskyi*, σημείωσε μια πολύ μικρότερη αύξηση έως και τρεις μέρες μετά τον εμβολιασμό (275 ώρες) και έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία μέχρι την τελευταία μέτρηση (18^{th} μέρα πειράματος- 430 ώρες) (Εικόνα 11^B).

3.1.2 *Nitrobacter sp.* (NOB_{NHB1}) με *Tetrahymena sp.*

Δεδομένου ότι το *N. sp. NHB1* οξειδώνει τα νιτρώδη, η συγκέντρωση των νιτρωδών στις καλλιέργειες του, μειώνεται καθώς τα βακτήρια καταναλώνουν τα νιτρώδη του υποστρώματος, στο οποίο αναπτύσσονται. Το *N. sp. NHB1* αναπτυσσόμενο σε υπόστρωμα 0,5mM (FW NO₂⁻), φτάνει σε λογαριθμική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ισούται με 350 μM και σε στατική φάση όταν έχουν καταναλωθεί πλήρως (Papadopoulou et al., 2020). Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις, οι καλλιέργειες έφτασαν στην πρώιμη λογαριθμική φάση, την 6^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 12^A -130 ώρες πειράματος) και στη στατική φάση την 8^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 12^B -190 ώρες πειράματος). Για την μελέτη κάθε φάσης ανάπτυξης ξεχωριστά, την αντίστοιχη χρονική στιγμή προστέθηκαν τα πρώτιστα σε δύο βιολογικές επαναλήψεις (επαναλήψεις πειράματος *N. sp. NHB1* + *Tetrahymena*), ενώ άλλες δυο επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας του *N. sp. NHB1*, απουσία πρώτιστων.



Εικόνα 12. Διάγραμμα του πειράματος *N. sp. NHB1* με *Tetrahymena* που αποτυπώνει τις συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO₂⁻) στον πρωτεύοντα άξονα γ'γ και την αφθονία των πρώτιστων (κύτταρα/mL) στον δευτερεύοντα άξονα γ'γ συναρτήσει του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα x'x όταν το *Tetrahymena* προστέθηκε στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi*, όταν αυτό βρισκόταν στην (A) πρώιμη λογαριθμική και (B) στατική φάση ανάπτυξης. Όπου *Tetrahymena*, τα πρώτιστα στις πειραματικές επαναλήψεις με κόκκινο χρώμα, *N. sp. NHB1* log: επαναλήψεις πειράματος με *N. sp. NHB1* και πρώτιστα σε λογαριθμική φάση με μπλε χρώμα, *N. sp. NHB1* stat, οι επαναλήψεις του πειράματος με *N. winogradskyi* και πρώτιστα σε στατική φάση με μπλε χρώμα και *N. sp. NHB1* control: επαναλήψεις ελέγχου μόνο με *N. sp. NHB1* με πράσινο χρώμα. Τα γκρι πλαίσια υποδεικνύουν την αφθονία των νιτροποιητών στα αντίστοιχα χρονικά σημεία όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω q-PCR του γονιδίου *nxrB*.

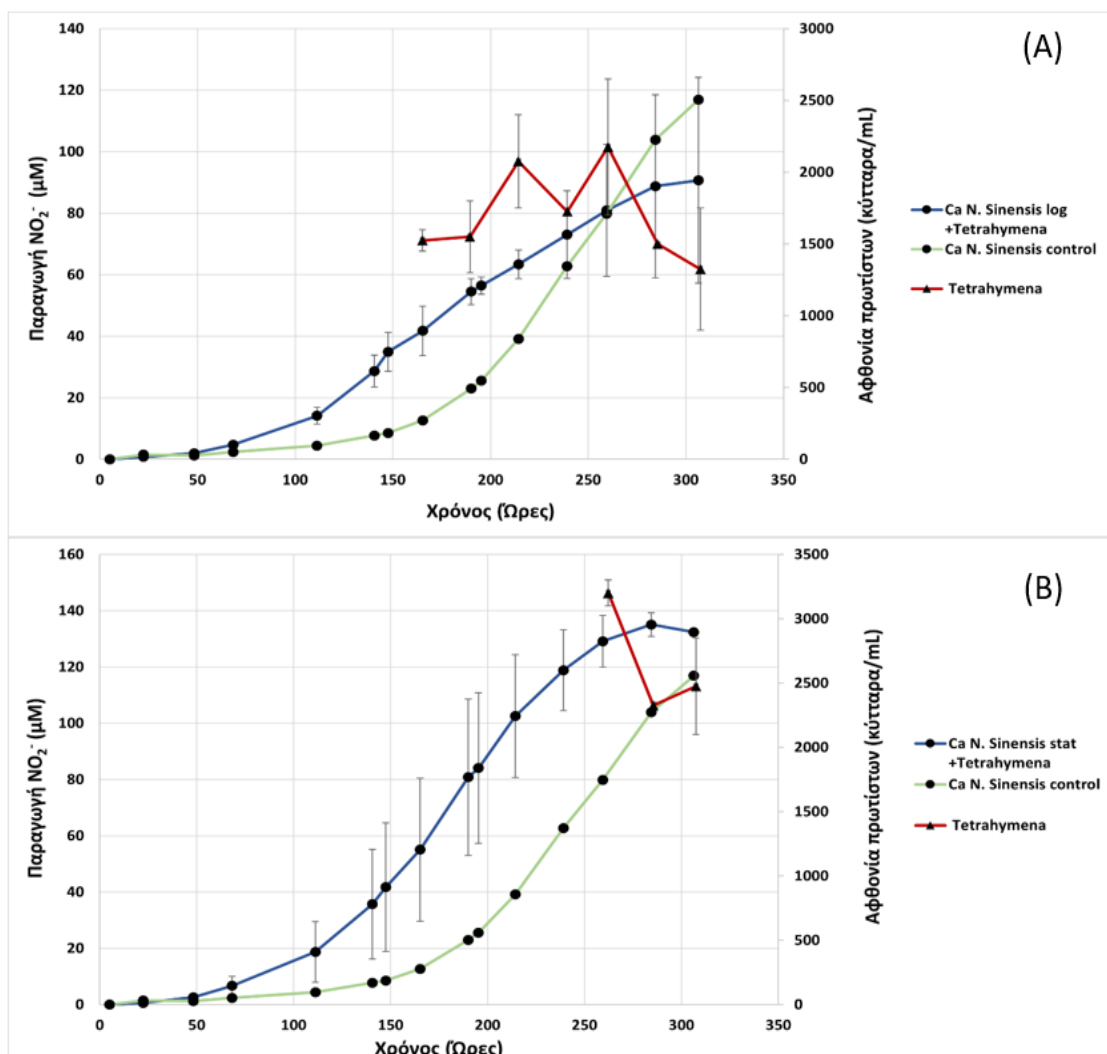
Σχετικά με την πορεία της κατανάλωσης των νιτρωδών, κατά την πρώιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης του *N. sp. NHB1*, φαίνεται ότι καταγράφηκε μια απότομη μείωση της συγκέντρωσης των νιτρωδών μια μέρα μετά την προσθήκη των πρωτίστων, ενώ δυο μέρες μετά (8^η μέρα πειράματος- 190 ώρες) καταναλώθηκαν όλα τα νιτρώδη, επομένως η συγκέντρωση τους μηδενίστηκε. Παράλληλα, στις επαναλήψεις-μάρτυρα του *N. sp. NHB1*, απουσία πρωτίστων στο ίδιο χρονικό διάστημα, η συγκέντρωση των νιτρωδών επίσης μειώθηκε, αλλά η τιμή τους παρέμεινε υψηλότερη, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, φανερώνοντας ότι τα νιτρώδη καταναλώνονταν με χαμηλότερο ρυθμό συγκριτικά με την μεταχείριση του *N. sp. NHB1* παρουσία των πρωτίστων (Εικόνα 12^A). Αναφορικά με το μοτίβο κατανάλωσης νιτρωδών από το *N. sp. NHB1* στην στατική του φάση παρουσία του *Tetrahymena*, η συγκέντρωση των νιτρωδών παρέμεινε σταθερή τις πρώτες 6 ώρες μετά την προσθήκη των πρωτίστων, ενώ μια ημέρα αργότερα (9^η μέρα πειράματος- 215 ώρες) μηδενίστηκε. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες-μάρτυρα του *N. sp. NHB1*, όπου καταγράφηκε η σταδιακή μείωση τους ως την 13^η μέρα (305 ώρες πειράματος), (Εικόνα 12^B).

Η αφθονία των βακτηρίων *N. sp. NHB1*, κατόπιν διεξαγωγής ανάλυσης qPCR, φαίνεται στα γκρι πλαίσια. Κατά την μοριακή αυτή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην πρώιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης της μεταχείρισης *N. sp. NHB1* και *Tetrahymena*, τα βακτηριακά κύτταρα βρέθηκαν σε πληθυσμό $4,3 \times 10^3$ στις 150 ώρες πειράματος (Εικόνα 12^A). Όσον αφορά στην μεταχείριση *N. sp. NHB1* και *Tetrahymena* για την στατική φάση ανάπτυξης του *N. sp. NHB1*, η αφθονία των βακτηριακών κυττάρων καταγράφηκε αυξημένη σε σχέση με αυτή της πρώιμης λογαριθμικής, με τιμή $7,2 \times 10^3$ στις 195 ώρες του πειράματος (Εικόνα 12^B).

Σχετικά με την αφθονία των πρωτίστων στην καλλιέργεια του *N. sp. NHB1* όταν αυτό βρισκόταν σε πρώιμη λογαριθμική φάση, αυξανόταν για τις πρώτες τέσσερις ημέρες (10^η μέρα πειράματος- 240 ώρες) και έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία μέχρι την τελευταία μέρα μέτρησης (305 ώρες πειράματος) (Εικόνα 12^A). Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στην αφθονία των πρωτίστων, όταν αυτά εμβολιάστηκαν στην καλλιέργεια του *N. sp. NHB1* κατά την στατική του φάση, τα οποία όμως αυξάνονταν εντονότερα τις τρεις πρώτες μέρες μετά τον εμβολιασμό, (11^η μέρα πειράματος- 260 ώρες), ενώ στη συνέχεια ελαττώνονταν σε όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις (Εικόνα 12^B).

3.1.3 *Ca Nitrosotalea sinensis* (Nd2) με *Tetrahymena* sp.

Δεδομένου ότι το στέλεχος *Ca N. sinensis* οξειδώνει την αμμωνία, η συγκέντρωση των νιτρικών στις καλλιέργειες του, αυξάνεται καθώς τα αρχαία καταναλώνουν τα αμμωνιακά του υποστρώματος στο οποίο αναπτύσσονται. Το *Ca N. sinensis* αναπτυσσόμενο σε υπόστρωμα 0,5mM NH₄⁺ (FW), φτάνει σε λογαριθμική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρικών ισούται με 40 μM και σε στατική φάση όταν η συγκέντρωση των νιτρικών ισούται με 120-150 μM (Papadopoulou et al., 2020). Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις, οι καλλιέργειες έφτασαν στην πρώιμη λογαριθμική φάση, την 6^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 13^A -140 ώρες πειράματος) και στην στατική φάση την 11^η μέρα (Εικόνα 13^B -260 ώρες πειράματος). Για την μελέτη κάθε φάσης ανάπτυξης ξεχωριστά, την αντίστοιχη χρονική στιγμή προστέθηκαν τα πρώτιστα σε δύο βιολογικές επαναλήψεις (επαναλήψεις πειράματος *Ca. N. Sinensis* + *Tetrahymena*), ενώ άλλες δυο επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας του *Ca. N. Sinensis*, απουσία πρωτίστων.



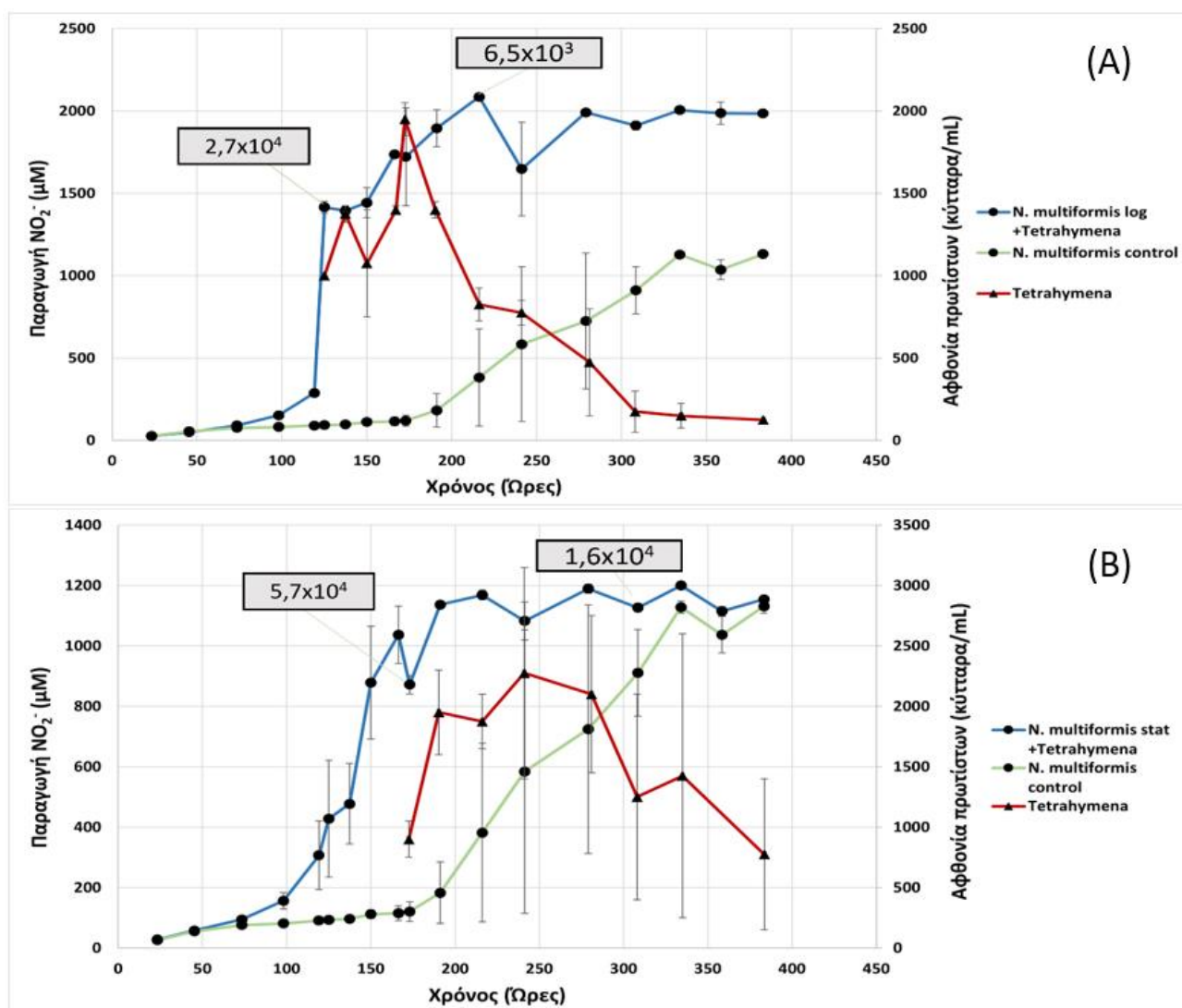
Εικόνα 13. Διάγραμμα του πειράματος *Ca N. sinensis* με *Tetrahymena* που αποτυπώνει τις συγκεντρώσεις των νιτρικών (NO₂⁻) στον πρωτεύοντα άξονα γ'γ και την αφθονία των πρωτίστων (κύτταρα/ml) στον δευτερεύοντα άξονα γ'γ συναρτήσει του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα χ'χ όταν το *Tetrahymena* προστέθηκε στις καλλιέργειες του *Ca N. sinensis*, όταν αυτό βρισκόταν στην (Α) πρώιμη λογαριθμική και (Β) στατική φάση ανάπτυξης. Όπου *Tetrahymena*, τα πρώτιστα στις πειραματικές επαναλήψεις με κόκκινο χρώμα, *Ca N. sinensis* log: επαναλήψεις πειράματος με *Ca N. sinensis* και πρώτιστα σε λογαριθμική φάση με μπλε χρώμα, *Ca N. sinensis* stat, οι επαναλήψεις του πειράματος με *Ca N. sinensis* και πρώτιστα σε στατική φάση με μπλε χρώμα και *Ca N. sinensis* control: επαναλήψεις ελέγχου μόνο με *Ca N. sinensis* με πράσινο χρώμα.

Σχετικά με την παραγωγή νιτροδών από το *Ca. N. Sinensis*, στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης του, παρουσία *Tetrahymena*, φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ήταν σταδιακή, χωρίς απότομες μεταβολές, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ταυτόχρονα, στις καλλιέργειες απουσία του *Tetrahymena*, φαίνεται ότι η συγκέντρωση των νιτροδών αυξανόταν με εντονότερο ρυθμό (Εικόνα 13^A). Συγκρίνοντας το μοτίβο παραγωγής νιτροδών στις δυο μεταχειρίσεις, διαπιστώθηκε ότι παρουσία του *Tetrahymena* προκύπτει μια επιβράδυνση της παραγωγής των νιτροδών και επιτάχυνση της εισόδου του ΑΟΑ στην στατική φάση σε σχέση με την αντίστοιχη μεταχείριση απουσία του πρωτίστου (Εικόνα 13^A). Αναφορικά με τη δραστηριότητα του *Ca. N. sinensis* της στατικής φάσης ανάπτυξης, σύμφωνα με το μοτίβο παραγωγής των νιτροδών παρουσία *Tetrahymena*, η συγκέντρωση τους παρέμεινε αρχικά σταθερή κατά τις πρώτες δύο ημέρες μετά τον εμβολιασμό και εμφάνισε μια μικρή μείωση την 13^η και τελευταία μέρα μέτρησης (206 ώρες πειράματος) (Εικόνα 13^B). Αντίστοιχα, στις καλλιέργειες του ΑΟΑ απουσία του *Tetrahymena* παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο παραγωγής νιτροδών με τις τιμές τους να είναι χαμηλότερες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος αλλά να μην παρουσιάζουν μείωση ως και την 13^η μέρα (Εικόνα 13^B).

Σχετικά με την αφθονία των πρωτίστων κατά την προσθήκη τους στη λογαριθμική φάση του *Ca. N. Sinensis*, τις πρώτες δυο μέρες μετά τον εμβολιασμό τους, παρέμεινε σταθερή, ενώ παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις μέχρι την 5^η μέρα (260 ώρες πειράματος) όπου και ξεκίνησε η πτωτική πορεία του πληθυσμού τους έως την τελευταία μέτρηση (310 ώρες) (Εικόνα 13^A). Όσον αφορά στην αφθονία των πρωτίστων, όταν αυτά εμβολιάστηκαν στην στατική φάση του *Ca. N. Sinensis*, παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση μια μέρα μετά την προσθήκη τους στις καλλιέργειες και μια μικρή αύξηση την τελευταία μέρα της μέτρησης (Εικόνα 13^B).

3.1.4 *Nitrosospira multififormis* (MG3) με *Tetrahymena* sp.

Δεδομένου ότι το στέλεχος *N. multififormis* οξειδώνει την αμμωνία, η συγκέντρωση των νιτρωδών στις καλλιέργειες του, αυξάνεται καθώς τα βακτήρια καταναλώνουν τα αμμωνιακά του υποστρώματος, στο οποίο αναπτύσσονται. Το *N. multififormis* αναπτυσσόμενο σε υπόστρωμα 1mM (SW NH_4^+), φτάνει σε λογαριθμική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ισούται με 250-300 μM και σε στατική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ισούται με 1000 μM (Paradopolou et al., 2020). Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις, οι καλλιέργειες έφτασαν στην πρώιμη λογαριθμική φάση την 5^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 14^A -120 ώρες πειράματος) και σε στατική φάση την 7^η μέρα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 14^B -170 ώρες πειράματος). Για την μελέτη κάθε φάσης ανάπτυξης ξεχωριστά, την αντίστοιχη χρονική στιγμή προστέθηκαν τα πρώτιστα σε δύο βιολογικές επαναλήψεις (επαναλήψεις πειράματος *N. multififormis* + *Tetrahymena*), ενώ άλλες δυο επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας του *N. multififormis*, απουσία πρώτιστων.



Εικόνα 14. Διάγραμμα του πειράματος *N. multiformis* με *Tetrahymena* που αποτυπώνει τις συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO_2^-) στον πρωτεύοντα άξονα γ'γ και την αφθονία των πρωτίστων (κύτταρα/ml) στον δευτερεύοντα άξονα γ'γ συναρτήσει του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα x'x όταν το *Tetrahymena* προστέθηκε στις καλλιέργειες του *N. winogradskyi*, όταν αυτό βρισκόταν στην (Α) **πρώιμη λογαριθμική και (Β) στατική** φάση ανάπτυξης. Όπου *Tetrahymena*, τα πρώτιστα στις πειραματικές επαναλήψεις με κόκκινο χρώμα, *N. multiformis* log: επαναλήψεις πειράματος με *N. multiformis* και πρώτιστα σε λογαριθμική φάση με μπλε χρώμα, *N. multiformis* stat, οι επαναλήψεις του πειράματος με *N. multiformis* και πρώτιστα σε στατική φάση με μπλε χρώμα και *N. multiformis*: επαναλήψεις ελέγχου μόνο με *N. multiformis* με πράσινο χρώμα. Τα γκρι πλαίσια υποδεικνύουν την αφθονία των νιτροποιητών στα αντίστοιχα χρονικά σημεία όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω q-PCR του γονιδίου *amoA*.

Όσον αφορά στη δραστηριότητα του *N. multiformis* της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, σύμφωνα με το μοτίβο παραγωγής νιτρωδών παρουσία των πρωτίστων, προέκυψε μια έντονη αύξηση παραγωγής νιτρωδών αμέσως μετά την προσθήκη των πρωτίστων και παρέμεινε σε υψηλές συγκεντρώσεις, έως ότου σταθεροποιήθηκε. Παράλληλα στην μεταχείριση-μάρτυρα του *N. multiformis* απουσία πρωτίστων, η συγκέντρωση των νιτρωδών αυξανόταν σταδιακά με τις τιμές να παραμένουν χαμηλότερες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, χωρίς όμως να σταθεροποιούνται. Συγκριτικά με την μεταχείριση απουσία πρωτίστων, φάνηκε ότι παρουσία του *Tetrahymena* υπήρξε επιτάχυνση παραγωγής των νιτρωδών (Εικόνα 14^A). Από το μοτίβο παραγωγής νιτρωδών του *N. multiformis* παρουσία των *Tetrahymena* όταν αυτά εμβολιάστηκαν στην στατική φάση του *N. multiformis*, φαίνεται η προσθήκη των πρωτίστων επέφερε μια μείωση της παραγωγής των νιτρωδών (170 ώρες πειράματος), ενώ ακολούθησαν μικρές αυξομειώσεις σε όλες τις μετρήσεις έως την 16^η μέρα (380 ώρες πειράματος). Παράλληλα, στην μεταχείριση απουσία πρωτίστων, η παραγωγή των νιτρωδών παρέμεινε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλλά δεν παρουσίασε αυξομειώσεις, αντ' αυτού, αυξανόταν έως την 14^η μέρα (335 ώρες πειράματος), υποδεικνύοντας ότι η παρουσία πρωτίστων οδήγησε σε αλλαγές του μοτίβου παραγωγής νιτρωδών κατά την διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 14^B).

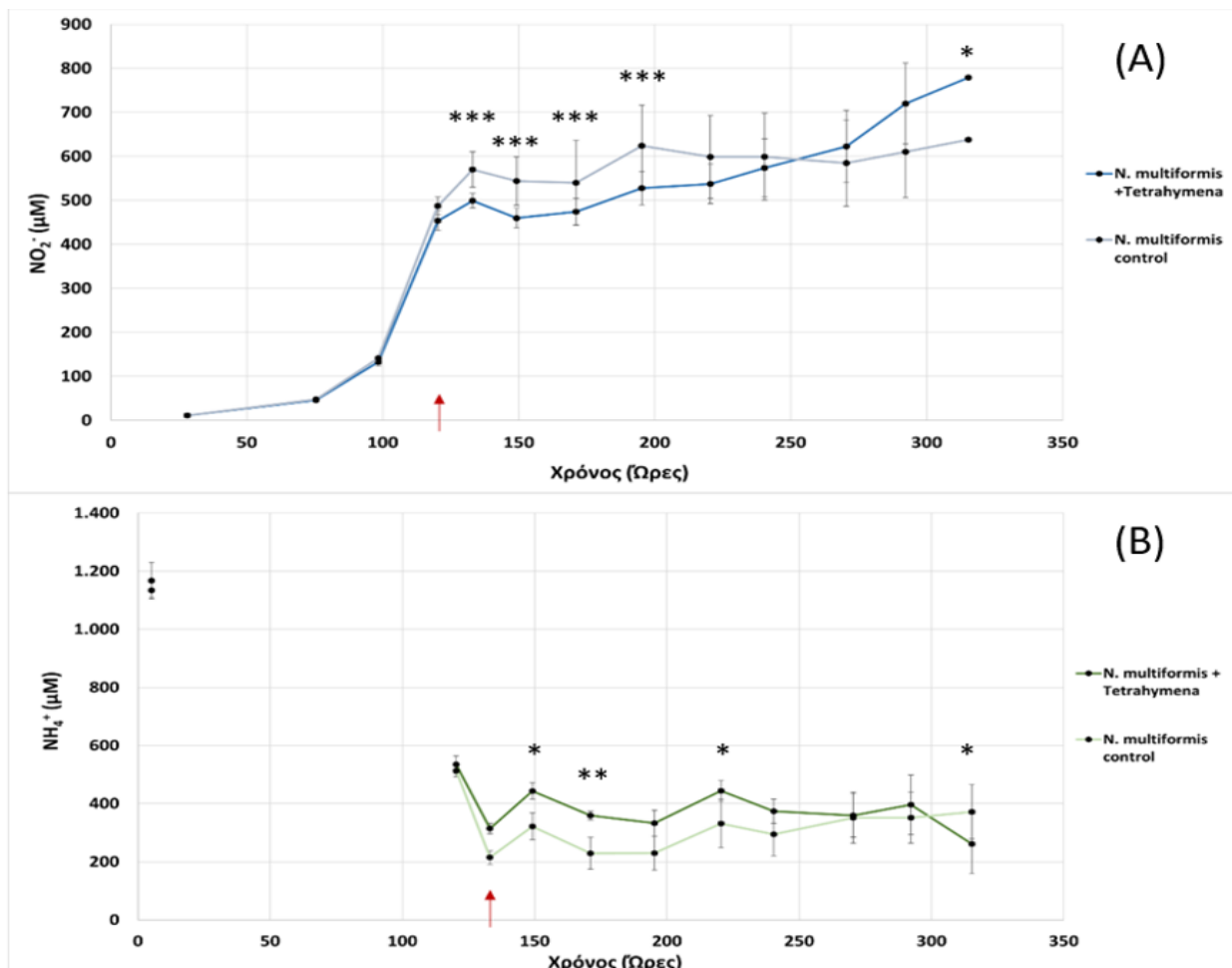
Η αφθονία του *N. multiformis*, κατόπιν διεξαγωγής ανάλυσης qPCR, φαίνεται στα γκρι πλαίσια. Κατά την μοριακή αυτή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην πρώιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης της μεταχείρισης *N. multiformis* και *Tetrahymena*, τα βακτηριακά κύτταρα βρέθηκαν $2,7 \times 10^4$ στις 125 ώρες πειράματος και $6,5 \times 10^3$ στις 215 ώρες του πειράματος, (Εικόνα 14^A). Όσον αφορά στις επαναλήψεις του *N. multiformis* και *Tetrahymena* για την στατική φάση ανάπτυξης του βακτηρίου, ο πληθυσμός των κυττάρων του βρέθηκε υψηλότερος από ότι στην λογαριθμική φάση και στις δυο χρονικές στιγμές που καταμετρήθηκε, με τιμή $5,7 \times 10^4$ κύτταρα στις 170 ώρες του πειράματος και $1,6 \times 10^4$ κύτταρα στις 310 ώρες του πειράματος (Εικόνα 14^B).

Όσον αφορά την αφθονία των πρωτίστων, όταν εμβολιάστηκαν στην πρώιμη λογαριθμική φάση του *N. multiformis*, φάνηκε ότι ο πληθυσμός τους διπλασιάστηκε έως την δεύτερη μέρα μετά την προσθήκη τους (170 ώρες), ενώ έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία έως την τελευταία μέτρηση (380 ώρες), (Εικόνα 14^A). Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό των πρωτίστων κατά τον εμβολιασμό τους στην στατική φάση του *N. multiformis*, όπου και πάλι φάνηκε να έχει διπλασιαστεί έως τις τρεις μέρες μετά τον εμβολιασμό τους (240 ώρες πειράματος), και κατόπιν να μειώνονται μέχρι την 16^η μέρα του πειράματος (380 ώρες), (Εικόνα 14^B)

Έπειτα από την μελέτη σχετικά με τα μοτίβα παραγωγής και κατανάλωσης των νιτρωδών στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς παρουσία και απουσία πρωτίστων, στις δυο διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των προκαρυωτών, επιδιώχθηκε η μελέτη του *N. multiformis* στην μέση λογαριθμική φάση ανάπτυξης του, σε μεταχειρίσεις παρουσία και απουσία πρωτίστων όσον αφορά στην κατανάλωση των αμμωνιακών και στην παραγωγή νιτρωδών. Παράλληλα, μελετήθηκε ο πληθυσμός των πρωτίστων παρουσία και απουσία του *N. multiformis* που αντικατόπτριζε την πιθανή διατροφική τους προτίμηση στο AOB.

Δεδομένου λοιπόν, ότι το *N. multiformis* φτάνει σε λογαριθμική φάση, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ισούται με 250-300 μM (Papadopoulou et al., 2020), αυτή τη φορά τα πρώτιστα προστέθηκαν στις καλλιέργειες του, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών τους είχε φτάσει στα 450 μM . Η συγκέντρωση αυτή των νιτρωδών σημειώθηκε 5 μέρες μετά τον εμβολιασμό του *N. multiformis* (120 ώρες πειράματος), όπου και προστέθηκαν τα πρώτιστα στις έξι βιολογικές επαναλήψεις της μεταχείρισης *N. multiformis* και *Tetrahymena*.

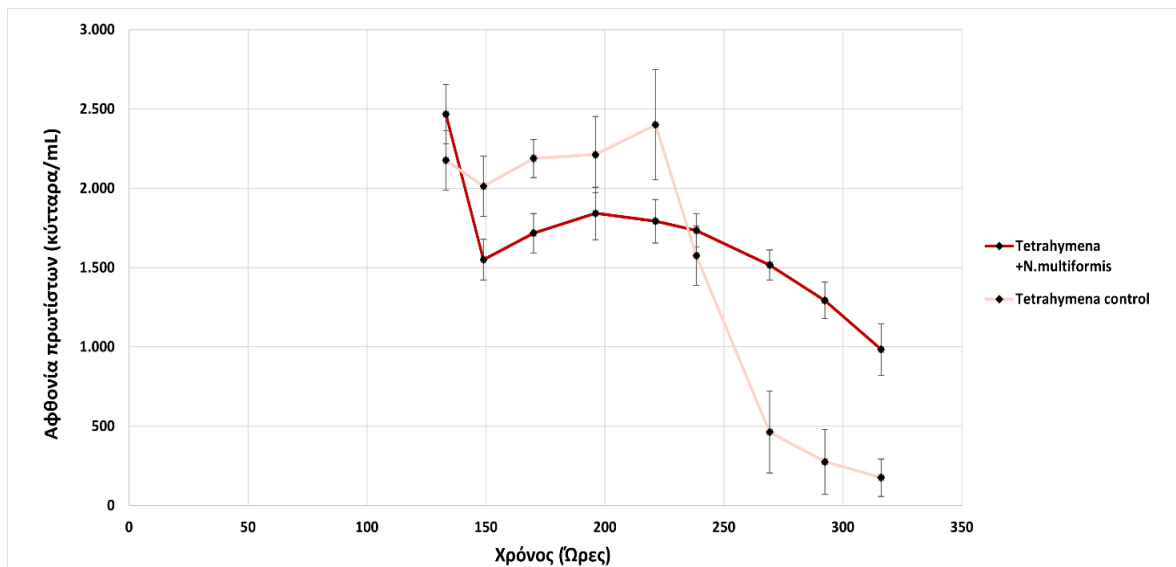
Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των ιόντων, πραγματοποιούνταν μετρήσεις κατανάλωσης αμμωνιακών (Εικόνα 15^A) και παραγωγής νιτρωδών (Εικόνα 15^B) στην μεταχείριση *N. multiformis* και *Tetrahymena* και στην μεταχείριση-μάρτυρα του *N. multiformis* απουσία πρωτίστων.



Εικόνα 15. Οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των (Α) νιτρωδών και (Β) αμμωνιακών ιόντων σε καλλιέργειες του νιτρωδοποιητικού μικροοργανισμού *N. multiformis* παρουσία ή απουσία του πρωτίστου *Tetrahymena* sp. Το *Tetrahymena* εμβολιάστηκε στην καλλιέργεια των νιτροποιητικών μικροοργανισμών κατά την μέση λογαριθμική φάση ανάπτυξης του *N. multiformis*. Οι τιμές δείχνουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων για κάθε περίπτωση. Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή που προστίθενται τα πρώτιστα στις επαναλήψεις πειράματος. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Όσον αφορά το μοτίβο παραγωγής των νιτρωδών, πριν την προσθήκη των πρωτίστων στις καλλιέργειες *N. multiformis* δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην παραγωγή τους από το NOB. Ωστόσο, στη μεταχείριση στην οποία εμβολιάστηκαν τα πρώτιστα, φάνηκε ότι η παραγωγή των νιτρωδών επιβραδύνθηκε σημαντικά έως την 8^η μέρα του πειράματος (195 ώρες), ενώ παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της παραγωγής τους, τις τελευταίες δυο ημέρες (13^η μέρα πειράματος- 315 ώρες, $p < 0.05$). Αντίθετα με το μοτίβο που παρατηρήθηκε στην μεταχείριση *N. multiformis* και *Tetrahymena*, η συγκέντρωση των νιτρωδών στην μεταχείριση-μάρτυρα του *N. multiformis* παρέμεινε σε υψηλότερες τιμές έως και την 8^η μέρα του πειράματος (195 ώρες) $p < 0.001$, και στη πορεία σταθεροποιήθηκε, ενώ μια μικρή αύξηση καταγράφηκε τις δυο τελευταίες ημέρες της μέτρησης (Εικόνα 15^Α).

Σχετικά με το μοτίβο κατανάλωσης αμμωνιακών, φαίνεται και πάλι ότι πριν την προσθήκη των πρωτίστων η συγκέντρωση των αμμωνιακών δεν διέφερε μεταξύ των δυο μεταχειρίσεων. Ωστόσο, από την στιγμή του εμβολιασμού των πρωτίστων και έπειτα, στη μεταχείριση *N. multiformis* και *Tetrahymena*, η συγκέντρωση των αμμωνιακών παρέμεινε σε υψηλές τιμές έως την 9^η μέρα του πειράματος (220 ώρες), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση τους κατά την τελευταία μέτρηση (315 ώρες πειράματος, $p < 0.05$). Με αντίθετο τρόπο κινήθηκαν τα επίπεδα των αμμωνιακών ιόντων στη μεταχείριση του *N. multiformis* απουσία πρωτίστων, στην οποία φάνηκε ότι τα αμμωνιακά καταναλώνονταν ταχύτερα έως την 9^η μέρα του πειράματος (220 ώρες), (Εικόνα 15^Β, $p < 0.05$), ενώ η συγκέντρωση τους σταθεροποιήθηκε τις τελευταίες τρεις ημέρες.



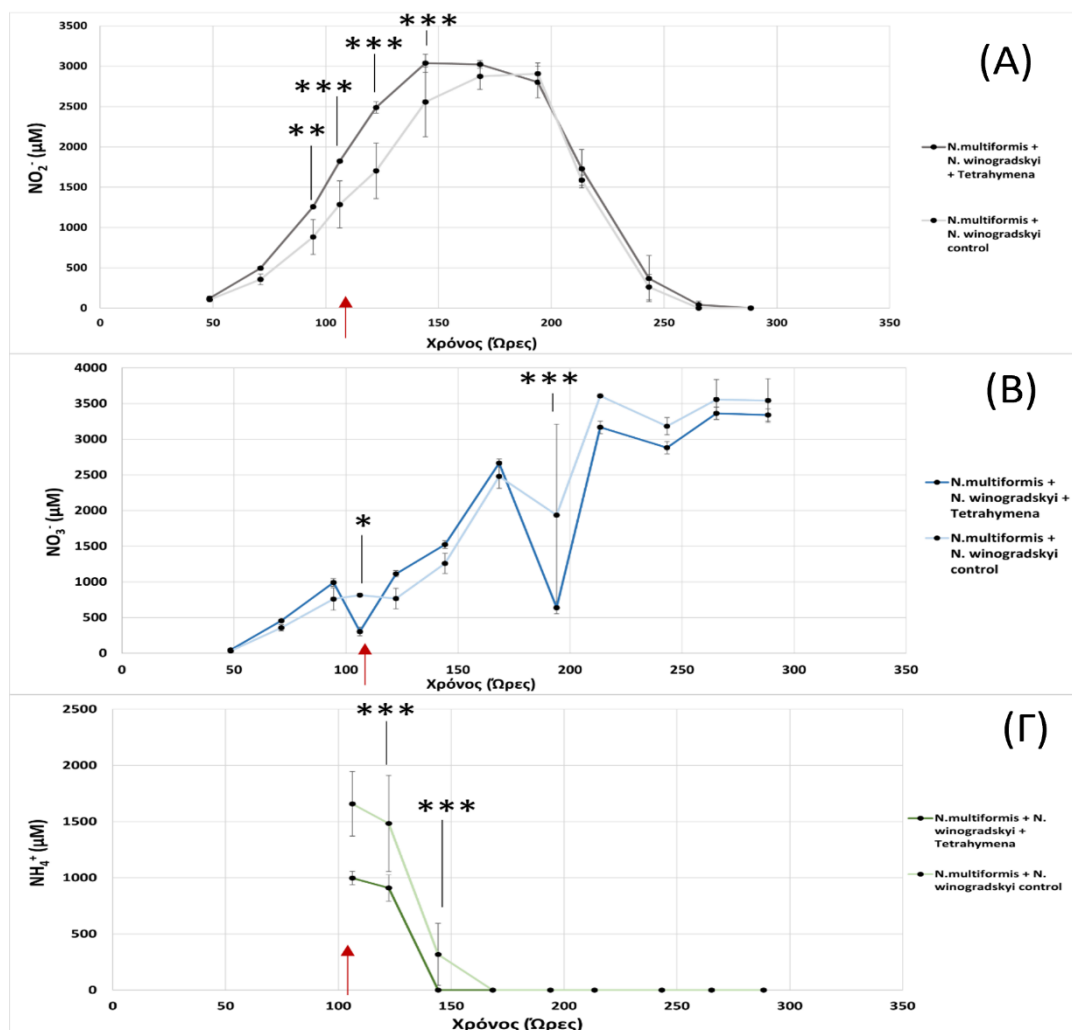
Εικόνα 16. Διάγραμμα που απεικονίζεται ο πληθυσμός των πρωτίστων στον άξονα γ'γ συναρτήσεως του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα x'x, όταν το *Tetrahymena* εμβολιάζονται σε καλλιέργειες του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *N. multiformis* κατά την μέση λογαριθμική φάση του παρουσία ή απουσία του *N. multiformis*. Οι τιμές δείχνουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων για κάθε περίπτωση.

Παράλληλα παρακολούθηθηκε και ο πληθυσμός του *Tetrahymena* παρουσία και απουσία του *N. multiformis*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 ο πληθυσμός του *Tetrahymena* παρουσία του *N. multiformis* παρουσίασε μια αρχική μείωση κατά την πρώτη μέρα μετά τον εμβολιασμό και ακολούθησε στην συνέχεια μια αργή πορεία μείωσης. Αντίθετα απουσία του θηράματος ο πληθυσμός του *Tetrahymena* παρουσίασε μια σημαντική και ταχύτατη μείωση από την 5^η ημέρα και μετά φτάνοντας σε επίπεδα πληθυσμού σημαντικά χαμηλότερα από αυτά παρουσία του θηράματος.

3.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Επόμενο βήμα, αποτέλεσε η μελέτη της σύνθετης μικροβιακής κοινοπραξίας του AOB *N. multiformis* και του NOB *N. winogradskyi* κατά την λογαριθμική της φάση σε μεταχειρίσεις παρουσία και απουσία πρωτίστων, όσον αφορά στην κατανάλωση των αμμωνιακών, στην κατανάλωση και παραγωγή νιτρωδών αλλά και στην παραγωγή νιτρικών. Παράλληλα, μελετήθηκε ο πληθυσμός των πρωτίστων που αντικατόπτριζε την πιθανή διατροφική τους προτίμηση στην συνθετική μικροβιακή κοινοπραξία AOB και NOB.

Δεδομένου ότι η συνθετική μικροβιακή κοινοπραξία των *N. multiformis* και *N. winogradskyi* βρίσκεται σε λογαριθμική φάση όταν η τιμή της συγκέντρωσης των νιτρωδών ιόντων κυμαίνεται στα 1500-2000 μM (Papadopoulou et al., 2020; Ma et al., 2014), η προσθήκη των πρωτίστων στις καλλιέργειες των *N. multiformis* και *N. winogradskyi*, πραγματοποιήθηκε τέσσερις ημέρες μετά τον εμβολιασμό των δυο βακτηρίων στο θρεπτικό τους (SW με 3M NH_4^+) (105 ώρες πειράματος). Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των ιόντων, πραγματοποιούνταν μετρήσεις κατανάλωσης αμμωνιακών (Εικόνα 17^A), συνολικής παραγωγής και κατανάλωσης νιτρωδών (Εικόνα 17^B) και κατανάλωσης νιτρικών (Εικόνα 17^Γ) στην μεταχείριση *N. multiformis* - *N. winogradskyi* και *Tetrahymena* και στην μεταχείριση-μάρτυρα των *N. multiformis* - *N. winogradskyi* απουσία πρωτίστων.

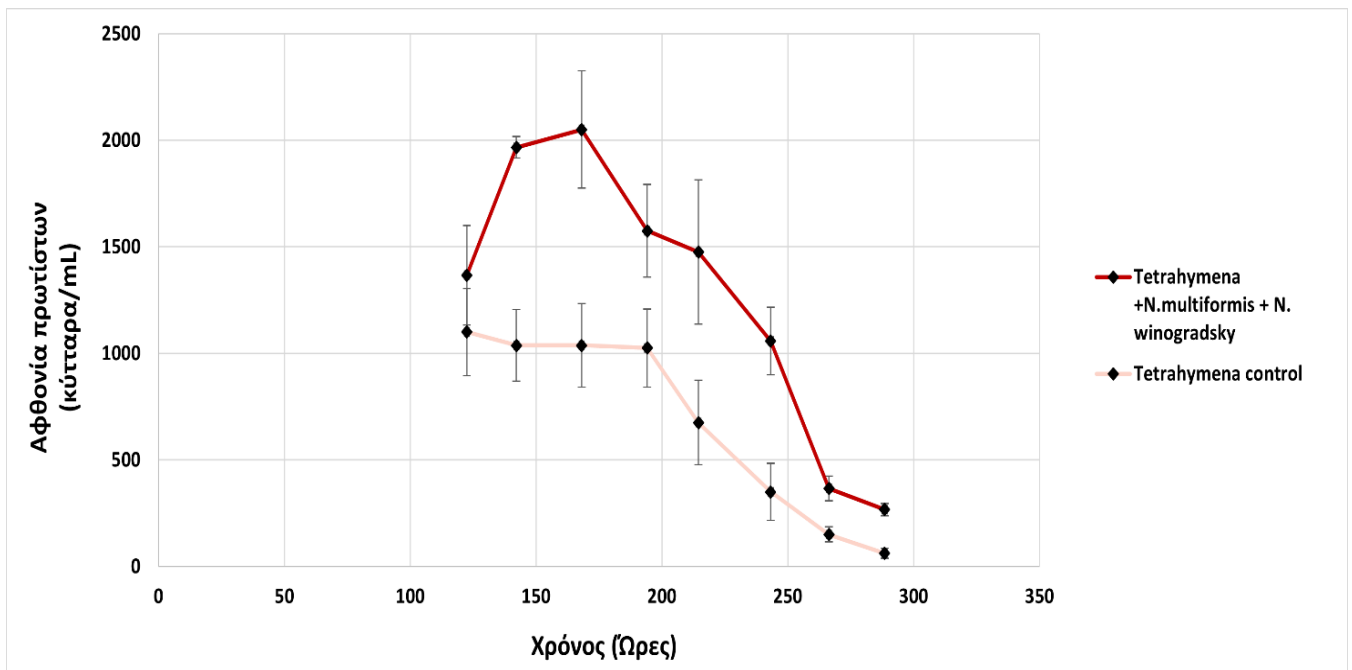


Εικόνα 17 Οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των (Α) νιτροδών (Β) νιτρικών και (Γ) αμμωνιακών ιόντων σε καλλιέργειες της συνθετικής μικροβιακής κοινοπραξίας *N. multiformis* και *N. winogradskyi* με *Tetrahymena* παρουσία ή απουσία του πρωτίστου *Tetrahymena sp.* Το *Tetrahymena* εμβολιάστηκε στην καλλιέργεια των νιτροποιητικών μικροοργανισμών κατά την **λογαριθμική** φάση ανάπτυξης των *N. multiformis* και *N. winogradskyi*. Οι τιμές δείχνουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων για κάθε περίπτωση. Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή που προστίθενται τα πρώτιστα στις επαναλήψεις πειράματος. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Όσον αφορά στην συγκέντρωση των νιτροδών, καταγράφηκαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις νιτροδών μεταξύ της μεταχείρισης των *N. multiformis* και *N. winogradskyi* παρουσία *Tetrahymena*, συγκριτικά με την μεταχείριση των *N. multiformis* και *N. winogradskyi* απουσία πρωτίστων από την 4^η μέρα πειράματος (95 ώρες) έως την 6^η μέρα πειράματος (145 ώρες), (Εικόνα 17^Α, $p < 0.001$), ενώ οι δυο μεταχειρίσεις ακολούθησαν παρόμοια πτωτική πορεία έως την τελευταία μέρα του πειράματος.

Αναφορικά με το μοτίβο παραγωγής των νιτρικών, ήταν αρχικά παρόμοιο στις δυο μεταχειρίσεις *N. multiformis* και *N. winogradskyi*. Ωστόσο, στην μεταχείριση *N. multiformis* και *N. winogradskyi* + *Tetrahymena* τα νιτρικά βρέθηκαν σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, τόσο κατά τον εμβολιασμό των πρωτίστων όπως και στις 195 ώρες του πειράματος, άρα παράγονταν με χαμηλότερο ρυθμό συγκριτικά με την μεταχείριση *N. multiformis* και *N. winogradskyi* απουσία *Tetrahymena* (Εικόνα 17^Β, $p < 0.05$ και $p < 0.001$).

Σχετικά με το μοτίβο κατανάλωσης αμμωνιακών από την μεταχείριση στην οποία εμβολιάστηκαν τα πρώτιστα (*N. multiformis* και *N. winogradskyi* και *Tetrahymena*), φαίνεται ότι η συγκέντρωση των αμμωνιακών παρέμεινε μειωμένη συγκριτικά με την μεταχείριση απουσία του *Tetrahymena sp.*, στην οποία τα αμμωνιακά δεν καταναλώνονταν εξίσου έντονα και παρέμειναν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλες τις μετρήσεις (Εικόνα 17^Γ $p < 0.001$).



Εικόνα 18. Διάγραμμα που απεικονίζεται ο πληθυσμός των πρωτίστων στον άξονα $y'g$ συναρτήσει του χρόνου μετρημένου σε ώρες στον άξονα x' , όταν το *Tetrahymena* εμβολιάζεται στη συνθετική κοινοπραξία με *N. multiformis* + *N. winogradskyi* κατά την **λογαριθμική** φάση της παρουσία ή απουσία των *N. multiformis* + *N. winogradskyi*. Οι τιμές δείχνουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων για κάθε περίπτωση.

Σχετικά με την μελέτη του πρωτίστου *Tetrahymena* παρουσία ή απουσία της μικροβιακής κοινοπραξίας, παρατηρήθηκε μια σημαντικά χαμηλότερη ανάπτυξη του *Tetrahymena* απουσία της μικροβιακής κοινοπραξίας των νιτροποιητών σε σχέση με τις καλλιέργειες όπου ήταν παρόντα τα θηράματα του *Tetrahymena* sp., (Εικόνα 18).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις συνθετικών μικροβιακών κοινοπραξιών αποτελούμενες από πρώτιστα του γένους *Tetrahymena sp.* ως θηρευτές και διάφορους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς ως θηράματα συμπεριλαμβανομένων, νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων αλλά και νιτρικοποιητικών βακτηρίων. Η ιδέα ανάπτυξης συνθετικών μικροβιακών κοινοτήτων θηρευτή-θηράματος με μέλη που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου, προήλθε από το έλλειμμα στοχευμένων μελετών πρωτίστων, παρά τις ενδείξεις ότι εκτός των βακτηρίων και των αρχαίων, τα πρώτιστα συμμετέχουν σε αυτόν εκκρίνοντας αμμωνία (Geisen *et al.*, 2018). Με αυτό το δεδομένο, η εργασία στόχευε στην μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτίστων σε τροφικό επίπεδο, αλλά και της συμμετοχής τους στον πολύτιμο για την επιβίωση των οργανισμών, γεωβιοχημικό αυτόν κύκλο.

Η επιλογή του πρώτιστου *Tetrahymena sp.* ως υποψήφιο θηρευτή βασίστηκε (1) στην αποδεδειγμένη ευκολία χειρισμού τους, (2) στην υψηλή αφθονία τους στα ενδιαίτηματα, και (3) στη δυνατότητα αξιοποίησής τους, ως δείκτες τοξικότητας λόγω της ευαισθησίας, της ευδιάκριτης μεταβολής της δραστηριότητας αλλά και των φυσιολογικών αλλαγών τους σε διαφορετικές συνθήκες (Maurya & Pandey, 2020). Το *Tetrahymena sp.* έχει ήδη ερευνηθεί σε μελέτες σχετικές με την τοξική επίδραση των γεωργικών φαρμάκων (Feng *et al.*, 2014). Για παράδειγμα, η μελέτη της επίδραση του εντομοκτόνου Novaluron, στο *Tetrahymena sp.*, έδειξε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης τους, ενώ έχουν εντοπιστεί γονίδια P450 στο γονιδίωμα τους, που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθανίου (DTT) (Maurya & Pandey, 2020).

Το εν λόγω πρώτιστο λοιπόν επιλέχθηκε, για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του με μεμονωμένα στελέχη νιτροποιητικών μικροοργανισμών, αλλά και με μια συνθετική κοινοπραξία παρουσία ενός νιτροδοποιητικού και ενός νιτρικοποιητικού βακτηρίου.

Σύμφωνα με τις πειραματικές δοκιμές των μεμονωμένων βακτηρίων σε δυο διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης τους, προτείνεται η λογαριθμική φάση για την μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με τα πρώτιστα, έναντι της στατικής, καθώς τότε εμφανίζουν εντονότερη μεταβολική δραστηριότητα παρέχοντας την δυνατότητα εκτίμησης των μεταβολών του πληθυσμού τους αλλά και μεγαλύτερη αφθονία (ύψους 10^5) με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερο ισοζύγιο με την αφθονία πρωτίστων (ύψους περίπου 10^3).

Τα μεμονωμένα πειράματα αλληλεπίδρασης που διεξήχθησαν κατά την μέση λογαριθμική φάση του *Nitrosospora multiformis* με το *Tetrahymena sp.*, αναπτυσσόμενο στο θρεπτικό μέσο του νιτροδοποιητικού βακτηρίου (SW), έδωσαν εικόνα για την συμπεριφορά των πρωτίστων, τόσο παρουσία όσο και απουσία των AOB. Αναφορικά με τα πρώτιστα, τα δεδομένα που προέρχονται από την αφθονία τους στα δείγματα έδειξαν να ευνοούνται παρουσία του στελέχους *N.multiformis*, παρέχοντας μια πρώτη ένδειξη για ενεργή θήρευση του βακτηρίου *N.multiformis* από τα πρώτιστα *Tetrahymena*. Όσον αφορά στην απόκριση του νιτροποιητή παρουσία *Tetrahymena*, αρχικά παρατηρήθηκε μείωση της μεταβολικής του δραστηριότητας,

ενώ την τελευταία μέρα του πειράματος, όπου τα πρώτιστα είχαν μειωθεί σημαντικά, εντοπίστηκε αύξηση αυτής, γεγονός που υποστηρίζει την ένδειξη θήρευσης.

Κατά τα πειράματα αλληλεπίδρασης των συνθετικών μικροβιακών κοινοπραξιών που αποτελούνται από τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς *N.multiformis*-*N. winogradskyi* και το *Tetrahymena sp*, έδειξαν ότι το τελευταίο ευνοείται παρουσία των εν λόγω νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν περαιτέρω την αρχική υπόθεση ότι οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν θηράματα για το *Tetrahymena*. Σχετικά με την απόκριση των νιτροποιητών, καταγράφηκε μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα του *N. winogradskyi* η οποία πιθανώς υποδηλώνει την διατροφική προτίμηση του *Tetrahymena* ως προς αυτό έναντι του *N.multiformis*. Παρόλα αυτά, ακόλουθες μετρήσεις που θα πραγματοποιηθούν στο μέλλον θα προσδιορίσουν με την χρήση qPCR τα επίπεδα των μελών της μικροβιακής κοινοπραξίας καθόλη την πορεία του πειράματος επιβεβαιώνοντας ή μη την ενεργή θήρευση των προκαρυωτών από το *Tetrahymena sp*.

Τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της πτυχιακής διατριβής, στοχεύουν στη δημιουργία πολύπλοκων συνθετικών κοινοπραξιών με μικροοργανισμούς ενεργούς στον κύκλο του άνθρακα. Σε συνέχεια της διαμόρφωσης αυτών των συνθετικών κοινοπραξιών, απώτερος στόχος είναι μια ευρύτερη μελέτη της επίδρασης της τοξικότητας διαφόρων γεωργικών φαρμάκων σε αυτές. Η αξιολόγηση στρεσογόνων παραγόντων σε επίπεδο εδαφικού οικοσυστήματος όπου και λαμβάνει χώρα ο κύκλος του αζώτου αποτελεί σημαντική πληροφορία για την επιστήμη. Τέτοιου είδους μελέτες έχουν τη δυνατότητα να συμβάλλουν στην εύρεση μεθόδων περιορισμού περιβαλλοντικών ρυπογόνων παραγόντων των ρύπων του περιβάλλοντος, που βασίζονται στην ελεγχόμενη δράση των μικροοργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bernhard A. The Nitrogen Cycle: *Processes, Players, and Human Impact*. *Nature Education Knowledge* 2010;3(10):25
2. Cao, H., Auguet, J.-C., & Gu, J.-D. (2013). Global Ecological Pattern of Ammonia-Oxidizing Archaea. *PLoS ONE*, 8(2), e52853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052853>.
3. Caron, David A. "Towards a molecular taxonomy for protists: benefits, risks, and applications in plankton ecology." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 60.4 (2013): 407-413.
4. Cassidy-Hanley D. M. (2012). Tetrahymena in the laboratory: strain resources, methods for culture, maintenance, and storage. *Methods in cell biology*, 109, 237–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385967-9.00008-6>
5. Cedervall, P., Hooper, A. B., & Wilmot, C. M. (2013). Structural studies of hydroxylamine oxidoreductase reveal a unique heme cofactor and a previously unidentified interaction partner. *Biochemistry*, 52(36), 6211–6218. <https://doi.org/10.1021/bi400960w>
6. Cell counting using a Sedgwick-Rafter chamber, Biomass estimation, Physiological techniques, ANACC Methods and Materials, CSIRO.
7. 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>
8. Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
9. Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2006). The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1475), 1965–1973. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1924>
10. Feng, L., Fu, C., Yuan, D., & Miao, W. (2014). A P450 gene associated with robust resistance to DDT in ciliated protozoan, Tetrahymena thermophila by efficient degradation. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 149, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.004>
11. Francis, C. A., Beman, J. M., & Kuypers, M. M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME journal*, 1(1), 19–27. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.8>
12. Geisen, S., Mitchell, E. A. D., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Fernández, L. D., Jousset, A., Krashevska, V., Singer, D., Spiegel, F. W., Walochnik, J., & Lara, E. (2018). Soil protists: a fertile

- frontier in soil biology research. *FEMS microbiology reviews*, 42(3), 293–323. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy006>
13. Grundmann, G. L., Neyra, M., & Normand, P. (2000). High-resolution phylogenetic analysis of NO₂--oxidizing Nitrobacter species using the rrs-rrl IGS sequence and rrl genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 5, 1893–1898. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1893>
 14. 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, 885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00885>
 15. Karakoç, C., Clark, A. T., & Chatzinotas, A. (2020). Diversity and coexistence are influenced by time-dependent species interactions in a predator-prey system. *Ecology Letters*, 23(6), 893-902. <https://doi.org/10.1111/ele.13500>
 16. 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>
 17. Ma, S., Zhang, D., Zhang, W., & Wang, Y. (2014). Ammonia stimulates growth and nitrite-oxidizing activity of *Nitrobacter winogradskyi*. *Biotechnology, biotechnological equipment*, 28(1), 27–32. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.901679>
 18. Madigan MT, Martinko JM, Bender K.S, Buckley D.H, Stahl D.A. Brock Biology of Microorganisms. 14th edition. Pearson Education. Inc, 2009
 19. Maurya, R., & Pandey, A. K. (2020). Importance of protozoa Tetrahymena in toxicological studies: A review. *The Science of the total environment*, 741, 140058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058>
 20. Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental microbiology*, 10(11), 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
 21. Norton, J. M., Klotz, M. G., Stein, L. Y., Arp, D. J., Bottomley, P. J., Chain, P. S., Hauser, L. J., Land, M. L., Larimer, F. W., Shin, M. W., & Starkenburg, S. R. (2008). Complete genome sequence of Nitrosospira multiformis, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Applied and environmental microbiology*, 74(11), 3559–3572. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-07>
 22. Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spirodi, 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, 581283. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581283>
23. Sachse, C. (2014). *Tetrahymena thermophila*: An expression platform for the production of viral antigens.
 24. Shen, T., Stieglmeier, M., Dai, J., Urich, T., & Schleper, C. (2013). Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS microbiology letters*, 344(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12164>
 25. Singh, A. K., Sisodia, A., Sisodia, V., & Padhi, M. (2019). Chapter 4 - Role of Microbes in Restoration Ecology and Ecosystem Services. In J. S. Singh & D. P. Singh (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. Pages 57-68. ISBN 9780444641915. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00004-3>.
 26. Skinner, F. A., and Walker, N. (1961). Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Arch. Mikrobiol.* 38, 339–349. doi: 10.1007/bf00408008
 27. Sorokin, D. Y., Lüscher, S., Vejmelkova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I., Damsté, J. S., Le Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M. C., & 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. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>
 28. Starkenburg, S. R., Larimer, F. W., Stein, L. Y., Klotz, M. G., Chain, P. S., Sayavedra-Soto, L. A., Poret-Peterson, A. T., Gentry, M. E., Arp, D. J., Ward, B., & Bottomley, P. J. (2008). Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), 2852–2863. <https://doi.org/10.1128/AEM.02311-07>
 29. Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current biology : CB*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
 30. Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental microbiology*, 10(5), 1357–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x>
 31. van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M. S., & Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
 32. Watson, S. W., Graham, L. B., Remsen, C. C., & Valois, F. W. (1971). A lobular, ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosolobus multiformis* nov.gen.nov.sp. *Archiv für Mikrobiologie*, 76(3), 183–203. <https://doi.org/10.1007/BF00409115>

33. What is nitrogen cycle. (2020). *Unacademy*. Retrieved from: <https://unacademy.com/content/neet-ug/study-material/chemistry/what-is-nitrogen-cycle/>.
34. You, J., Das, A., Dolan, E. M., & Hu, Z. (2009). Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water research*, 43(7), 1801–1809. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.016>
35. 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>
36. Zhao, J., Wang, B., Zhou, X., Alam, M. S., Fan, J., Guo, Z., Zhang, H., Gubry-Rangin, C., & Zhongjun, J. (2022). Long-Term Adaptation of Acidophilic Archaeal Ammonia Oxidisers Following Different Soil Fertilisation Histories. *Microbial ecology*, 83(2), 424–435. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01763-2>
37. Ζίφα Α, Μαμούρης Ζ, Μούτου Κ. Βιολογία. 2η έκδοση. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, 2011.

