



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

«Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

Μεταπτυχιακή Εργασία

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΝΗΜΑΤΩΔΟΚΤΟΝΟΥ ΒΙΟΑΚΤ® (*Paecilomyces lilacinus*)
ΣΤΗΝ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΚΑΙ ΑΡΧΑΙΩΝ**

ΚΟΡΤΣΙΝΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΝΗΜΑΤΩΔΟΚΤΟΝΟΥ ΒΙΟΑCT[®] (*Paecilomyces lilacinus*)
ΣΤΗΝ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΚΑΙ ΑΡΧΑΙΩΝ**

Επιβλέπων : Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

...στην οικογένειά μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για τη βοήθεια και την επιστημονική του καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ρουσίδου Κωνσταντίνα για την καταλυτική βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και τον Καρρά Παναγιώτη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία μας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Παπαδοπούλου Ευαγγελία καθώς και την κ. Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ουρανία για την συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων της Δυνητικής Νιτροποίησης στο εργαστήριό τους στη Γεωπονική Σχολή του ΑΠΘ. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την συνεχή υποστήριξη που μου παρείχε καθώς και την υπομονή και κατανόηση προς το πρόσωπό μου.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Σύγχρονη γεωργία και τάσεις	9
1.2. Γεωργικά φάρμακα	10
1.3. Συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον	11
1.4. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους	13
1.5. Επιδράσεις βιολογικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους	15
1.6. ΒΙΟΑCT® (Paecilomyces lilacinus strain 251)	16
1.7. Κύκλος του Αζώτου	17
1.8. Μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την οξειδωση της αμμωνίας	20
1.8.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB-Ammonia Oxidizing Bacteria)	20
1.8.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA-Ammonia Oxidizing Archaea)	22
1.9. Τεχνικές για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην παρούσα εργασία	24
1.10. Στόχοι της παρούσας εργασίας	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	28
2.2. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους	29
2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	30
2.4. Ποσοτικοποίηση των <i>amoA</i> γονιδίων των AOB και των AOA με qPCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)	32
2.5. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς	37
2.6. Μέτρηση Δυνητικής Νιτροποίησης	41
2.7. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1. Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα εδάφους	45
3.2. Αποτελέσματα qPCR	45
3.2.1 Η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων στην αφθονία των AOB	50
3.2.2 Επιδράσεις των διαφόρων μεταχειρίσεων στην αφθονία των AOA	52
3.3. Αποτελέσματα δυνητικής νιτροποίησης	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νιτροποίηση (μετατροπή των NH_4^+ σε NO_2^-) πραγματοποιείται στο έδαφος από χημειολιθοαυτότροφα β-πρωτεοβακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA) του φύλου Thaumarchaeota. Σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά για τις επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και ακόμη λιγότερα γνωρίζουμε για την επίδραση των βιολογικών γεωργικών φαρμάκων σε αυτούς. Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης έρευνας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος όπου βρέθηκε ότι η εφαρμογή του βιολογικού νηματωδοκτόνου BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* strain 251) προκάλεσε σημαντικές μεταβολές τόσο στην σύσταση όσο και στην αφθονία των AOB και AOA. Έτσι η παρούσα εργασία μελέτησε τον μηχανισμό της αρνητικής επίδρασης καθώς και την επίδραση του σκευάσματος στην νιτροποίηση. Για τον λόγο αυτό σε πείραμα εργαστηρίου έγινε εφαρμογή BIOACT®, γλυκόζης και σκόνης γάλακτος (περιέχονται σε ποσοστό 78 και 6% στο σκεύασμα BIOACT® αντίστοιχα) ή σπορίων του μύκητα *P. lilacinus* στο έδαφος ενώ συμπεριλήφθηκε και μάρτυρας. Πέντε, 20, 45 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή εκτιμήθηκε η αφθονία των AOB και AOA με PCR πραγματικού χρόνου (*amoA* γονίδιο) καθώς και η δυνητική νιτροποίηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή των συνεκδοχών του σκευάσματος (γλυκόζης και σκόνης γάλακτος) προκάλεσε μια παροδική μείωση στην αφθονία των AOB και AOA, ανάλογη με την μείωση που προκάλεσε το BIOACT®. Αντίθετα, η εφαρμογή των σπορίων του μύκητα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή σε σχέση με τον μάρτυρα.

Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και για την δυνητική νιτροποίηση όπου η εφαρμογή των BIOACT® ή γλυκόζης και σκόνης γάλακτος οδήγησε σε παροδική αναστολή της νιτροποίησης, ενώ καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε όταν εφαρμόστηκαν στο έδαφος τα σπόρια του μύκητα. Συνολικά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η παροδική ανασταλτική δράση του BIOACT® τόσο στην αφθονία όσο και στην λειτουργία των AOB/AOA οφείλεται σε έμμεσο εκτοπισμό τους από ταχέως αναπτυσσόμενους

ετερότροφους μικροοργανισμούς που διατρέφονται στην γλυκόζη και την σκόνη γάλακτος που ελευθερώνονται στο έδαφος με την εφαρμογή του BIOACT[®] κάτι που εξηγεί και την ανάκαμψη του πληθυσμού και της λειτουργίας τους με την πάροδο του χρόνου και την εξάντληση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σύγχρονη γεωργία και τάσεις

Κατά τον 20^ο αιώνα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας των αγροτικών οικοσυστημάτων σε παγκόσμιο επίπεδο και ειδικότερα στην Ευρώπη (Hoogeveen et al., 2001). Η γεωργία θεωρείται σε παγκόσμιο επίπεδο μια από τις σημαντικότερες απειλές για την εξαφάνιση απειλούμενων ειδών χλωρίδας και πανίδας.

Το φαινόμενο αυτό οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην εντατικοποίηση της γεωργίας λόγω της εφαρμογής της Κοινής Αγροτικής Πολιτικής στις χώρες της Ε.Ε. (Donald et al., 2001; Van Dijk, 2001). Οι σύγχρονες γεωργικές πρακτικές έχουν οδηγήσει στην εκβιομηχάνιση της γεωργίας και τη καταστροφή μικρών κλήρων με σκοπό τη δημιουργία εκτεταμένων αγροτεμαχίων. Οι πιέσεις από αυτό το μοντέλο γεωργίας είναι πολύ έντονες ιδιαίτερα στις πεδινές περιοχές, όπου τεράστιες πεδινές δασικές εκτάσεις έχουν αποψιλωθεί και υγρότοποι έχουν αποξηρανθεί με σκοπό να μετατραπούν σε καλλιεργούμενη γη. Στις πεδινές περιοχές παρατηρείται επίσης η υψηλότερη επιβάρυνση με γεωργικά φάρμακα για την αύξηση της παραγωγής με αρνητικές συνέπειες για το οικοσύστημα. Σύμφωνα με την έρευνα του Van Dijk (2001) βρέθηκε ότι ποσότητες νιτρικών πάνω από 50κιλά/εκτάριο/έτος στο έδαφος μπορούν να οδηγήσουν σε κατάρρευση του μικροβιακού του πληθυσμού. Σήμερα σε παγκόσμιο επίπεδο γίνεται προσπάθεια για την διάδοση εναλλακτικών μορφών γεωργίας κυρίως με την ανάπτυξη της βιολογικής γεωργίας. Βασικό χαρακτηριστικό της βιολογικής γεωργίας είναι η απαγόρευση της χρήσης χημικών συνθετικών γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων. Αφετηρία του συγκεκριμένου αγροτικού συστήματος θεωρείται το έδαφος και ο παραγωγός θα πρέπει να χρησιμοποιήσει πρακτικές ώστε να διατηρήσει το έδαφος 'υγιές'.

Η αμειψισπορά, η πολυκαλλιέργεια και η συγκαλλιέργεια, η χλωρή λίπανση, η χρησιμοποίηση κατάλληλης κοπριάς και εδαφοβελτιωτικού αποτελούν σημαντικά μέσα του γεωργού για τη δημιουργία ενός αειφορικού

οικοσυστήματος. Η εξέλιξη της γεωργίας στην Ελλάδα ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες (ΕΚΠΑΑ, 2001). Είδη όπως το βαμβάκι και η ελιά έχουν κυριαρχήσει κυρίως στις πεδινές περιοχές καλύπτοντας χιλιάδες στρέμματα μονοκαλλιεργειών. Όσον αφορά τη βιολογική γεωργία ξεκίνησε δειλά στην Ελλάδα και από μεμονωμένους παραγωγούς. Τα τελευταία χρόνια όμως παρατηρείται σημαντική και γοργή αύξηση του αριθμού των βιοκαλλιεργητών, που στις 31/12/2006 σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων αντιστοιχούσαν σε 25.466, των οποίων οι καλλιεργούμενες εκτάσεις αντιστοιχούσαν στο 4,5% των συνολικών καλλιεργούμενων ελληνικών εκτάσεων.

1.2. Γεωργικά φάρμακα

Τα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για τον αποτελεσματικό περιορισμό των φυτοπαράσιτων που μπορούν να μειώσουν σημαντικά την παραγωγή. Προκειμένου να προστατευθούν οι αποδόσεις πριν και μετά τη συγκομιδή, χρησιμοποιούνται γεωργικά φάρμακα. Τα προϊόντα φυτοπροστασίας ή γεωργικά φάρμακα είναι χημικές συνθέσεις με κύριο συστατικό μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες. Οι δραστικές ουσίες εγκρίνονται σε επίπεδο ΕΕ ενώ τα προϊόντα φυτοπροστασίας που εμπεριέχουν αυτές τις ουσίες εγκρίνονται σε επίπεδο Κράτους-Μέλους. Τα γεωργικά φάρμακα αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας BAYER κατασκευάζουν το parathion. Τα πρώτα χρόνια της σύνθεσής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού. Ταυτόχρονα, η προσφορά τους ήταν μεγάλη στην προστασία της δημόσιας υγείας και στη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου με την καταπολέμηση εντόμων που αποτελούσαν φορείς ασθενειών για τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά τα τελευταία 20 τουλάχιστον έτη διατυπώνονται ανησυχίες για πιθανές αρνητικές επιδράσεις τους σε οργανικούς μη-στόχους που διαβιούν στο αγροτικό περιβάλλον καθώς και

πρόκληση βλαβών στην υγεία του ανθρώπου και επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Σήμερα όλοι πλέον αναγνωρίζουν τη χρησιμότητά τους στη σύγχρονη γεωργία αλλά και το σημαντικό μερίδιο που κατέχουν στην υποβάθμιση της οικολογικής και χημικής ποιότητας των φυσικών πόρων. Τα γεωργικά φάρμακα διαχωρίζονται σε τρεις κυρίως κατηγορίες ανάλογα με τον οργανισμό-στόχο :

- Ζιζανιοκτόνα
- Εντομοκτόνα, Ακαρεοκτόνα, Νηματωδοκτόνα
- Μυκητοκτόνα

Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόζονται με διάφορους τρόπους, όπως με ψεκασμούς των υπέργειων οργάνων των φυτών, με επένδυση και προστασία των σπόρων ή άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων, με ριζοπότισμα μέσω του συστήματος άρδευσης καθώς και με απευθείας εφαρμογές στο έδαφος.

1.3. Συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Τα γεωργικά φάρμακα ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής τους, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα χαρακτηριστικά του εδάφους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες μεταφέρονται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων διεργασιών.

Στην τύχη των γεωργικών φαρμάκων συμβάλλουν βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες. Ανεξαρτήτως του τρόπου εφαρμογής τους, η τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον ελέγχεται από διάφορες διαδικασίες όπως η προσρόφηση/εκρόφηση, η έκπλυση, η διάσπαση, η εξάτμιση και η απορρόφηση τους από τα φυτά. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων είναι δυνατό να οδηγήσει υπό προϋποθέσεις στην ρύπανση της ατμόσφαιρας, των επιφανειακών και υπόγειων υδάτινων συστημάτων και των εδαφών. Ένα πολύ σημαντικό ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόζονται στον αγρό καταλήγει στο έδαφος, όπου ο χρόνος παραμονής τους (υπολλειμματικότητα), εξαρτάται από το πόσο ευαίσθητη είναι μια ουσία στις

παραπάνω διεργασίες. Παρακάτω απεικονίζεται σχηματικά η συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον:



Η **επιφανειακή απορροή** ενός γεωργικού φαρμάκου εξαρτάται από τη υπολλειμματικότητα του, από την κάλυψη, την κλίση και το είδος του εδάφους, την υγρασία του εδάφους καθώς και το ύψος και την ένταση βροχόπτωσης και ποτίσματος και μπορεί να επιφέρει ρύπανση επιφανειακών υδάτων όπως λίμνες, ποτάμια και θάλασσες. Η **έκπλυση** ενός γεωργικού φαρμάκου εξαρτάται από την υπολλειμματικότητα του και την ικανότητα προσρόφησης στα εδαφικά κolloειδή, την υγρασία του εδάφους και συνήθως οδηγεί σε ρύπανση των υπόγειων υδάτων. Με την διαδικασία της **προσρόφησης** δεσμεύονται τα μόρια των γεωργικών φαρμάκων από τα οργανικά και ανόργανα κolloειδή του εδάφους. Τέλος τα γεωργικά φάρμακα υπόκεινται σε διεργασίες αβιοτικής και βιοτικής διάσπασης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αβιοτικής αποδόμησης είναι το φαινόμενο της **φωτόλυσης**, δηλαδή της φωτοχημικής διάσπασης του μορίου ενός γεωργικού φαρμάκου στην επιφάνεια του εδάφους με την επίδραση του φωτός και ειδικότερα της

υπεριώδους ακτινοβολίας. Άλλες περιπτώσεις αβιοτικής αποδόμησης ενός ξενοβιοτικού μορίου στο εδαφικό περιβάλλον είναι διάφορες φυσικοχημικές αντιδράσεις όπως οξειδώσεις, υδρολύσεις κ.α. Στην περίπτωση της **μικροβιακής διάσπασης** του μορίου, παρατηρείται αποδόμησή του με τη βοήθεια των μικροοργανισμών του εδάφους όπως βακτήρια και μύκητες. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως βιοαποδόμηση και αποτελεί την πιο σημαντική διεργασία για τις κυριότερες ομάδες γεωργικών φαρμάκων σήμερα.

Για ορισμένα γεωργικά φάρμακα που παρουσιάζουν υψηλή τάση ατμών και συνεπώς υψηλή πτητικότητα, η διαδικασία της **εξάτμισης** αποτελεί σημαντική διεργασία απομάκρυνσης τους από το σημείο εφαρμογής τους και μπορεί να μεταφερθούν σε άλλες περιοχές με τη συμβολή των αερίων μαζών και της βροχής. Η εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου είναι ιδανική όταν :

1. Η απαιτούμενη ποσότητα δραστικής ουσίας καταλήγει, χωρίς να παρασυρθεί, ακριβώς στον προκαθορισμένο στόχο.
2. Εμμένει στο στόχο, διατηρώντας την προκαθορισμένη της συγκέντρωση και για την προκαθορισμένη χρονική διάρκεια.
3. Αποδομείται πλήρως, παράγοντας προϊόντα αβλαβή για τους άλλους οργανισμούς καθώς και για το περιβάλλον.

1.4. Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Τα γεωργικά φάρμακα που καταλήγουν στο έδαφος είναι πιθανόν να έχουν αρνητικές επιδράσεις εκτός των οργανισμών-στόχων και σε μη παθογόνους μικρό- και μακρό-οργανισμούς. Πολλά γεωργικά φάρμακα βρέθηκαν να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στη σύνθεση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας, στην αφθονία των μικροοργανισμών του εδάφους καθώς και στη ικανότητα των διαφόρων μικροοργανισμών να πραγματοποιούν σημαντικές λειτουργίες όπως η διάσπαση της οργανικής ουσίας ή η ολοκλήρωση των κύκλων αζώτου, θείου και φωσφόρου. Όλες οι παραπάνω βιολογικές διεργασίες συμβάλλουν στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και οι δυσμενείς επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων σε αυτές μπορούν να προκαλέσουν

σημαντική μείωση της παραγωγικότητας του εδαφικού οικοσυστήματος (Ingram et al., 2005; Littlefield-Wyer et al.,2008; Niewiadowska, 2004; Wang et al., 2006).

Το ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων που καταλήγει στον οργανισμό-στόχο είναι περίπου **0,1%** της εφαρμοζόμενης ποσότητας, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα καταλήγει συνήθως εκτός στόχου και κυρίως στο έδαφος με αποτέλεσμα τη σημαντική επιβάρυνση του (Carriger et al, 2006; Pimentel,1995). Τα γεωργικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εδάφους και επηρεάζουν τις μεταβολικές τους δραστηριότητες (Singh and Walker,2006), όπως την ανοργανοποίηση των οργανικών ενώσεων και τη μετατροπή τους σε θρεπτικά στοιχεία καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Έχει βρεθεί επίσης ότι τα γεωργικά φάρμακα επιδρούν δυσμενώς στη μικροβιακή μάζα και στην μικροβιακή αναπνοή (Pampulha and Oliveira, 2006; Zhou et al,2006). Αυτό συμβαίνει συνήθως επειδή μείωση στο ποσοστό αναπνοής του εδάφους αντανάκλα μείωση στη μικροβιακή μάζα (Chen et al,2001; Klose and Ajwa,2004) ενώ αντίθετα αύξηση του ποσοστού της αναπνοής υποδεικνύει συνήθως αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού (Haney et al., 2000; Wardle et al., 1994).

Ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών είναι ικανές να χρησιμοποιήσουν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους ενώ σε άλλους μικροοργανισμούς εμφανίζουν αρνητικές επιδράσεις (Johnsen et al., 2001). Επίσης, η εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό της αφθονίας και της λειτουργίας συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων οδηγώντας έτσι έμμεσα στην ενίσχυση άλλων ομάδων μικροοργανισμών με την απελευθέρωσή τους από τον ανταγωνισμό.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός επηρεάζεται από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων αλλά μετά από ένα χρονικό διάστημα προσαρμογής, ο πληθυσμός επιστρέφει στο αρχικό του επίπεδο ή ακόμη μπορεί και να αυξηθεί (Fliessbach and Mader, 2004; Niewiadowska, 2004). Υπάρχουν επίσης αναφορές που αποδεικνύουν την ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών του εδάφους να αποδομούν ταχύτατα τα γεωργικά φάρμακα στο εδαφικό περιβάλλον (Hussain et al., 2007 a,b; Kumar and Philip, 2006; Siddique et al., 2003) τα προϊόντα αποδόμησης αφομοιώνονται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Tyess et al,2006)

με αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων αποδομητικών μικροοργανισμών (Das and Mukherjee, 2000 a,b ; Jana et al,1998).

1.5. Επιδράσεις βιολογικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στη χρήση των βιολογικών γεωργικών φαρμάκων ως μια εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων που δημιουργούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα (Wang et al., 2007). Οι πιθανές επιπτώσεις των βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων σε οργανισμούς μη-στόχους και ειδικότερα στους μικροοργανισμούς του εδάφους έχει μελετηθεί ελάχιστα μέχρι σήμερα.

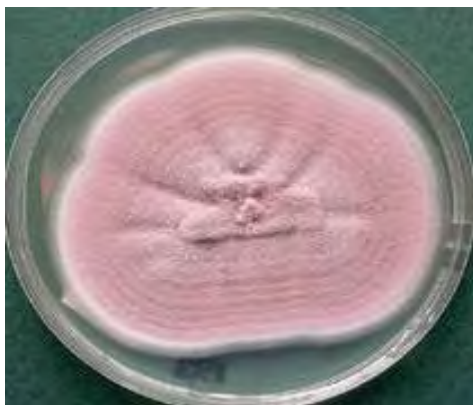
Η έλλειψη δεδομένων προέκυψε από την γενικότερη πεποίθηση ότι τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα λόγω της φυσική προέλευσης τους (βακτήρια, ιούς και μύκητες) δεν αναμένεται να έχουν αρνητικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η επίδραση ενός βιολογικού γεωργικού φαρμάκου, του Paenimyxin[®] (παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος *Paenibacillus* sp. strain B2) στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και την αφθονία των βακτηρίων συνολικά και των απονιτροποιητικών βακτηρίων ειδικότερα μελετήθηκαν με μεθόδους καλλιέργειας αλλά και με μοριακές τεχνικές (Sameh et al., 2007). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η επίδραση του Paenimyxin[®] τόσο στην αφθονία όσο και στην λειτουργία των βακτηρίων ήταν παροδική καθώς μετά από 7 έως 28 μέρες τόσο η σύσταση όσο και η αφθονία τους είχε επανέλθει στα αρχικά επίπεδα.

Σε άλλη έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση του βιολογικού νηματωδοκτόνου azadirachtin (εκχύλισμα σπόρων από το φυτό *Azadirachta indica*) σε πληθυσμούς βακτηρίων, μυκήτων, ακτινοβακτηρίων και *Azotobacter* sp. Εκτός από τον πληθυσμό του *Azotobacter* sp., η εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου azadirachtin οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού αλλά και των ενζυμικών δραστηριοτήτων των υπολοίπων μικροβιακών ομάδων στις πρώτες 15 μέρες του πειράματος. Τα βακτήρια και τα ακτινοβακτήρια επανήλθαν στα αρχικά τους επίπεδα και αυξήθηκαν σημαντικά μετά την 60^η

μέρα του πειράματος. Για του μύκητες, η ανασταλτική δράση εξακολούθησε να είναι σημαντική σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (Gopal et al., 2007).

Ανάλογες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Spyrou et al (2009), έδειξαν ότι η εφαρμογή των βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων azadirachtin και spinosad δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους σε σχέση με την εφαρμογή του καπνιστικού νηματωδοκτόνου metam sodium. Παρόμοιες μελέτες από τους Ipsilantis et al (2011) έδειξαν ότι η εφαρμογή azadirachtin οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην ενδορριζική κοινότητα των δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων σε σύγκριση με αυτές που προκλήθηκαν από το μυκητοκτόνο carbendazin.

1.6. BIOACT[®] (*Paecilomyces lilacinus* strain 251)



Στην εικόνα απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές μωβ αποικίες του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του κυμαίνεται από 24 έως 30°C (Cabanillas et al., 1989). Δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών του *Paecilomyces lilacinus* strain 251 (PL251) σε οποιοδήποτε μέσο σε

θερμοκρασίες άνω των 37°C. Το στέλεχος απομονώθηκε πρώτη φορά από μολυσμένα αυγά νηματωδών στις Φιλιππίνες και ταξινομήθηκε το 1974. Το στέλεχος PL251 προσαρμόζεται σε μεγάλο εύρος του pH του εδάφους, χαρακτηριστικό που του προσδίδει μεγάλη ανταγωνιστικότητα στα γεωργικά εδάφη σε όλο τον κόσμο. Το στέλεχος PL251 παρασιτεί και ακολούθως καταστρέφει τα αυγά, τα νεαρά και ενήλικα θηλυκά άτομα ποικίλων παθογόνων νηματωδών (*Meloidogyne* sp.) των φυτών (Kiewnick, 2006).

Αντίθετα με άλλα στελέχη του μύκητα, χρωματογραφικές αναλύσεις έδειξαν ότι το PL251 δεν παράγει τοξίνες (Mikami et al., 1989). Αποτελέσματα ερευνών σε συνδυασμό με το τοξικολογικό προφίλ θηλαστικών (EPA, 2003),

δεν υποδεικνύουν πιθανότητα κινδύνου για τη ανθρώπινη υγεία από το στέλεχος PL251 το οποίο και αποτελεί το δραστικό προϊόν του βιολογικού φυτοπροστατευτικού προϊόντος BIOACT®.



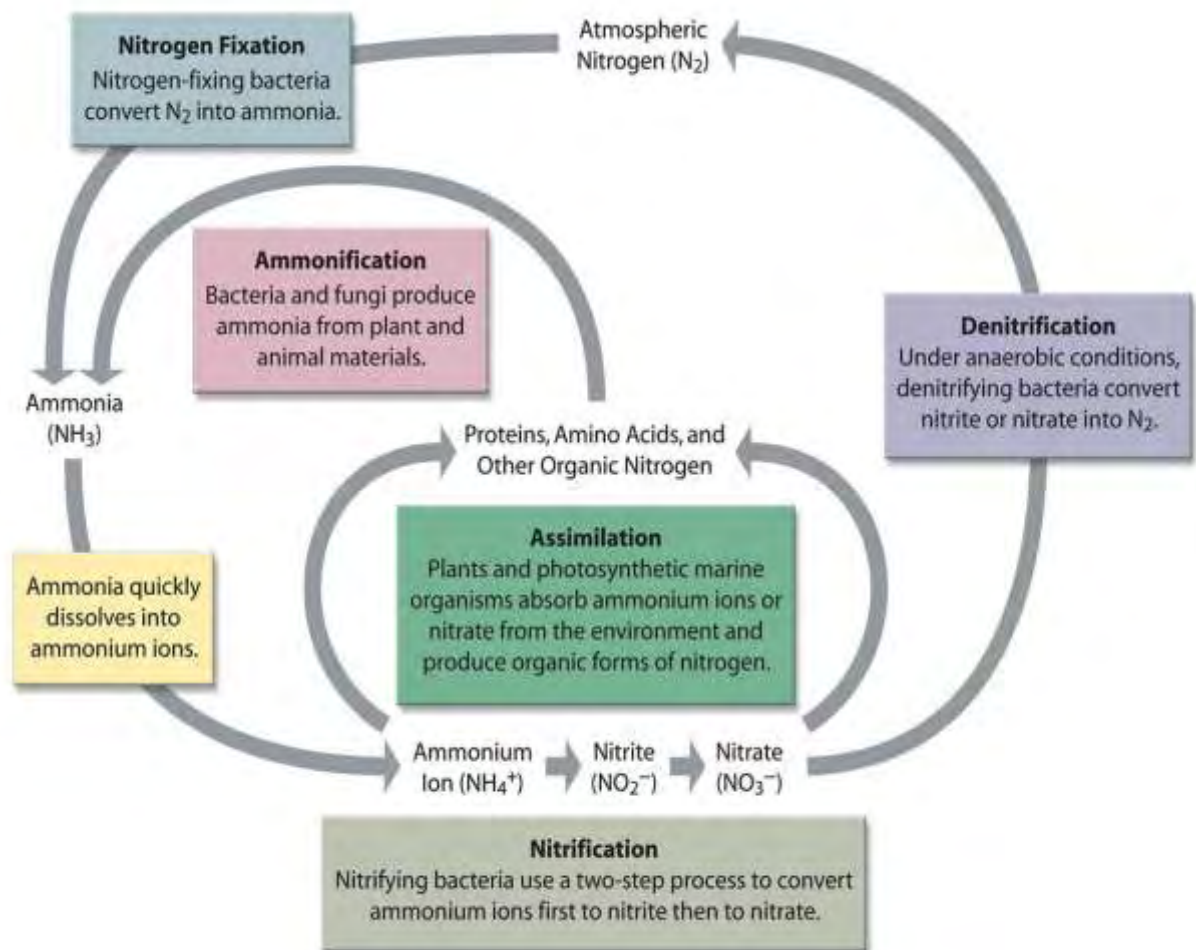
Το BIOACT® περιέχει 6% PL251 (1×10^{10} ζωντανά σπόρια του μύκητα), 6% σκόνη γάλακτος, 78% γλυκόζη και 10% νερό (Anastasiadis et al., 2008). Χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες μπανάνας, λαχανικών, φράουλας, καπνού, εσπεριδοειδών κ.α. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση του προϊόντος είναι 2 g σκευάσματος ανά φυτό (4×10^9 κονίδια/φυτό). Λόγω της περιορισμένης υπολλειμματικότητας και εμμοής του BIOACT® στο έδαφος, προτείνεται στους αγρότες η εφαρμογή να επαναλαμβάνεται κάθε 6 εβδομάδες ώστε να διατηρείται χαμηλά ο πληθυσμός των φυτοπαρασιτικών νηματωδών

καθ' όλη την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Πρόσφατα, αναφέρθηκε η ύπαρξη σχέσης μεταξύ της εφαρμογής του BIOACT® και την ανθρώπινη υγεία καθώς θεωρείται υπεύθυνο για τη δημιουργία κερατίτιδας (Malecha et al., 2006). Το σκεύασμα του PL251 διατίθεται στην αγορά και με τις εμπορικές ονομασίες MeloCown WG, BioACT WG, Nemachek (Environmental Protection Agency, 2005).

1.7. Κύκλος του Αζώτου

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία καθώς αποτελεί το 78% της αέριας σύστασης της ατμόσφαιρας και βρίσκεται υπό τη μορφή μοριακού αζώτου N_2 . Επίσης, αποτελεί βασικό συστατικό των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και άλλων δομικών βιολογικών ενώσεων. Η μεγάλη πλειονότητα των ζωντανών οργανισμών δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει το μοριακό άζωτο που βρίσκεται άφθονο στην ατμόσφαιρα και έτσι αυτό πρέπει να μετατραπεί σε κάποια άλλη πιο "εύχρηστη" μορφή. Η διαδικασία αυτή, που είναι γνωστή

ως **αζωτοδέσμευση**, πραγματοποιείται είτε με φυσικό είτε με βιολογικό τρόπο και έχει ως προϊόν της την αμμωνία (NH_3). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται ο κύκλος του αζώτου :



Η **βιολογική αζωτοδέσμευση** αποτελεί τον κύριο τρόπο μετατροπής του ελεύθερου αζώτου σε χρήσιμες, για τους οργανισμούς, χημικές ενώσεις. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικροοργανισμών του εδάφους, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία είτε ζουν ελεύθερα είτε συνηθέστερα συμβιώνουν στις ρίζες ορισμένων φυτών όπως τα ψυχανθή (όσπρια, κουκιά κλπ.). Εκεί, τα βακτήρια μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε νιτρικά ιόντα, μέρος των οποίων μεταφέρεται στα φυτά. Ως μέρος αυτής της συμβίωσης τα φυτά μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε οξειδία του αζώτου και αμινοξέα για τη

δημιουργία πρωτεϊνών και άλλων βιολογικά χρήσιμων μορίων και σε αντάλλαγμα παράγουν σάκχαρα, τα οποία χρειάζονται τα βακτήρια. Με την ολοκλήρωση τους βιολογικού τους κύκλου η φυτική βιομάζα αποτίθεται στο έδαφος και αποσυντίθεται ελευθερώνοντας οργανικές μορφές αζώτου.

Η μετατροπή οργανικών μορφών του αζώτου με τη βοήθεια βακτηρίων και μυκήτων σε αμμωνία είναι γνωστή ως **αμμωνιοποίηση**. Στο έδαφος, η αμμωνία είναι δεσμευμένη κατά κύριο λόγο στα σωματίδια αργίλου με τη μορφή NH_4^+ . Η μικροβιακή οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (NO_2^-) και στην συνέχεια σε νιτρικά (NO_3^-) ιόντα πραγματοποιείται από δύο ομάδες μικροοργανισμών και ονομάζεται **νιτροποίηση**. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν αερόβια βακτήρια (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) και αρχαία (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) που οξειδώνουν την αμμωνία και παράγουν νιτρώδη ιόντα και ονομάζονται νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί ενώ στη δεύτερη ανήκουν βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη ιόντα σε νιτρικά και ονομάζονται νιτροκοποιητικά βακτήρια (NOB-Nitrate Oxidizing Bacteria). Από τις δύο αυτές αντιδράσεις η οξειδωση των αμμωνιακών σε νιτρώδη αποτελεί το βήμα που ρυθμίζει την ταχύτητα της μετατροπής των αμμωνιακών σε νιτρικά. Τα νιτρώδη ιόντα παρόλο που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στα αερόβια περιβάλλοντα, εξαιτίας της τοξικότητάς τους προς τους οργανισμούς, η διατήρησή της συγκέντρωσής τους σε χαμηλά επίπεδα είναι απαραίτητη. Τα νιτρικά ιόντα δεν συγκρατούνται από το έδαφος με αποτέλεσμα να καταλήγουν σε επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα.

Πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι εκτός από τα βακτήρια, σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της νιτροποίησης παίζουν και αρχαία που αρχικά τοποθετήθηκαν στο φύλο Crenarchaeota (Konneke et al, 2005; Hansel et al, 2008; Tourna et al, 2008) και πρόσφατα σε νέο φύλο με το όνομα Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al, 2008). Τα φυτά και οι θαλάσσιοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αφομοιώνουν το κατιόν (NH_4^+) ή τα νιτρικά ιόντα από το περιβάλλον και παράγουν οργανικές μορφές αζώτου. Ορισμένες ομάδες οργανισμών χρησιμοποιούν ως πηγή αζώτου εκτός από την αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα για την αύξησή τους. Τέλος, υπό ανοξικές συνθήκες, απονιτροποιητικά βακτήρια μετατρέπουν τα νιτρώδη ή τα νιτρικά ιόντα σε μοριακό άζωτο (N_2), μια διεργασία που καλείται **απονιτροποίηση**. Έχει βρεθεί ότι στη φύση πραγματοποιείται και αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας

(Anammox- Anaerobic Ammonium Oxidation) από βακτήρια που ανήκουν στο φύλο Planctomycetes και μετατρέπουν άμεσα την αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα σε μοριακό άζωτο (Jetten, 2001).

1.8. Μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την οξειδωση της αμμωνίας

Τα χημειολιθοαυτότροφα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB), που ανήκουν στα β-Proteobacteria, θεωρούνταν μέχρι πρότινος οι κύριοι μικροοργανισμοί για την πραγματοποίηση της οξειδωσης της αμμωνίας (Purkhold et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες, όμως, έδειξαν ότι και μεσόφιλα αρχαία που πρόσφατα τοποθετήθηκαν στο φύλο Thaumarchaeota παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της νιτροποίησης στο έδαφος και στα υδάτινα οικοσυστήματα (Konneke et al., 2005; Hansel et al., 2008; Tourna et al., 2008). Επιπλέον, τα βακτήρια του φύλου Planctomycetes συμβάλλουν καταλυτικά στην αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας και έχουν μελετηθεί σε υδάτινα (Penton et al., 2006) και εδαφικά οικοσυστήματα (Wickramasinghe et al., 2009).

1.8.1 Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB-Ammonia Oxidizing Bacteria)

Ως φυλογενετικός δείκτης για την μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων χρησιμοποιείται συνήθως το 16S rRNA γονίδιο. Η ενίσχυση και η ανάλυση αυτού του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς και για την ανάλυση της ποικιλομορφίας των AOB (Bothe et al., 2000; Kowalchuk and Stephen, 2001; Juretschko et al., 1998; McCaig et al., 1994; Prosser and Embley, 2002; Voytek and Ward, 1995). Τα AOB χωρίζονται σε δύο μονοφυλετικές γενεαλογικές γραμμές βάση των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2000, 2003; Teske et al., 1994).

Η πρώτη γενεαλογική γραμμή περιλαμβάνει βακτήρια της τάξης β-Proteobacteria και ειδικότερα βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* (συμπεριλαμβανομένου του *Nitrosococcus mobilis*) και *Nitrosospira*

(συμπεριλαμβανομένου των *Nitrosolobus* και *Nitrosovibrio*). Η δεύτερη γενεαλογική γραμμή ανήκει στα γ-Proteobacteria και συμπεριλαμβάνει τα είδη *Nitrosococcus oceani* και *Nitrosococcus halophilus* έχουν παρατηρηθεί μόνο σε υδάτινα οικοσυστήματα. Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια που ανήκουν στα β-Proteobacteria έχουν καταταχθεί σε επτά ομάδες (clusters) σύμφωνα με φυλογενετικές αναλύσεις του 16S rRNA γονιδίου αλλά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους όπως τα χαρακτηριστικά των ενδαιτημάτων τους (Kowalchuk and Stephen, 2001).

Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης του 16S rRNA γονιδίου ως μοριακού δείκτη για την φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων είναι ότι δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη φυσιολογία των οργανισμών-στόχων (Calvo and Garcia-Gil, 2004; Kowalchuk and Stephen, 2001). Αυτό μπορεί να μετατοπίσει το φάσμα των αλληλουχιών που ενισχύονται με την PCR προς φυλογενετικά συγγενικούς αλλά φυσιολογικά και οικολογικά διαφορετικούς οργανισμούς (Bothe et al., 2000; Junier et al., 2008). Επίσης, ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών, δεν αποτελούν κυρίαρχες ομάδες, όπως οι νιτριδωποιητικοί οργανισμοί, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται εύκολα μέσω της χρήσης του 16S rRNA γονιδίου. Επομένως, μια εναλλακτική προσέγγιση για τις οικολογικές μελέτες αποτελούν λειτουργικοί δείκτες όπως γονίδια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένες λειτουργίες που επιτελούν οι συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών όπως η οξειδωση της αμμωνίας (Rotthauwe et al., 1997).

Η αμμωνία αρχικά οξειδώνεται από το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (**AMO**-Ammonia Mono Oxygenase) σε υδροξυλαμίνη (Arp et al., 2002; Köhneke et al., 2005). Το ένζυμο AMO κωδικοποιείται από τα γονίδια **amoA**, **amoB** και **amoC** που βρίσκονται σε ένα οπερόνιο με τη δομή **amoCAB** (Chain et al., 2003; Klotz et al., 2006; Norton et al., 2002, 2008; Stein et al., 2007). Υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του οπερονίου **amoCAB** στο γονιδίωμα των AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria (Chain et al., 2003; Norton et al., 2008; Stein et al., 2007), ενώ ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα των AOB που ανήκουν στα γ-Proteobacteria (Klotz et al., 2006).

Παρά το ενδεχόμενο χρήσης ολόκληρου του οπερονίου **amoCAB** για μοριακές μελέτες, μόνο ένα τμήμα του γονιδίου **amoA** χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης για τη μελέτη της ποικιλότητας των AOB (Rotthauwe et al.,

1997). Αυτό τμήμα είναι σχετικά μικρό σε μέγεθος (450 bp), σχετικά συντηρημένο και παρέχει χαμηλότερης διακριτικότητας ανάλυση σε σχέση με το 16S rRNA γονίδιο (Koops et al., 2003; Purkhold et al., 2003) , όμως, το γονίδιο *amoA* πλεονεκτεί έναντι του 16S rRNA γονιδίου λόγω της υψηλότερης εξειδίκευσής του.

Η δομή της κοινότητας των AOB έχει μελετηθεί σε διάφορα περιβάλλοντα. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε εδάφη όπου το pH βρέθηκε να επιδρά σημαντικά στη δραστηριότητα των AOB και στις βιογεωχημικές τους λειτουργίες. Αρχικές μελέτες είχαν δείξει ότι η οξείδωση της αμμωνίας σπάνια συμβαίνει σε τιμές pH κάτω από 7 (Burton and Prosser 2001). Ωστόσο, μια σειρά πρόσφατων πειραμάτων αποκάλυψε την ύπαρξη AOB που έχουν την ικανότητα να επιτελούν αποτελεσματικά την οξείδωση της αμμωνίας σε εδάφη με pH μεταξύ 4,5 και 7,5 (Nicol et al., 2008).

Η μελέτη των AOB στα θαλάσσια οικοσυστήματα με τη χρήση των γονιδίων 16S rRNA και *amoA* έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι διαδεδομένοι σε παράκτιες περιοχές, ωκεανούς ακόμα και σε πολικά περιβάλλοντα (Hollibaugh et al., 2002; O'Mullan and Ward 2005; Phillips et al., 1999). Επίσης, εκτός από την ύπαρξη AOB σε περιβάλλοντα με χαμηλές θερμοκρασίες (Hollibaugh et al., 2002), μελέτες για την διεργασία της νιτροποίησης σε υψηλές θερμοκρασίες περιέγραψαν μια κοινότητα με κυρίαρχες τις αλληλουχίες του γένους *Nitrosospira* μέσω της τεχνικής του ανοσοφθορισμού (Lebedeva et al., 2005). Η εύρεση *amoA* αλληλουχιών σε όξινης θερμής πηγής σε ορυχείο χρυσού αποκάλυψε την μεγάλη προσαρμοστικότητα συγκεκριμένων AOB σε ακραία περιβάλλοντα (Hirayama et al., 2005).

1.8.2 Νιτροδοποιητικά Αρχαία (AOA-Ammonia Oxidizing Archaea)

Ομόλογα του *amoA* γονιδίου ανιχνεύτηκαν αρχικά σε μεταγονιδιακές βιβλιοθήκες από θαλάσσια και εδαφικά περιβάλλοντα καθώς και σε AOA που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά μέσα στο εργαστήριο (Köhneke et al., 2005; Treusch et al., 2005; Venter et al., 2004). Ζευγάρια εκκινητών αναπτύχθηκαν για να ενισχύσουν το *amoA* γονίδιο των Αρχαίων (Francis et al., 2005;

Könneke et al., 2005; Park et al., 2008; Tourna et al., 2008; Treusch et al., 2005; Urakawa et al., 2008), επιτρέποντας την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των AOA (Beman et al, 2008; Mincer et al., 2007).

Η ανίχνευση των *amoA*, *amoB* και *amoC* γονιδίων σε ακαλλιέργητους συμβιωτικούς οργανισμούς Αρχαίων (Hallam et al., 2006b), ανέδειξε το σημαντικό πιθανό ρόλο των Thaumarchaeota στην νιτροποίηση σε ωκεανούς (DeLong 1992, 1998 ; Fuhrman et al., 1992; Karner et al., 2001), στο έδαφος (Ochsenreiter et al, 2003) και σε άλλα μη ακραία περιβάλλοντα (Auguet and Casamayor 2008; Perreault et al., 2007) Επιπροσθέτως, έρευνες για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των αρχαίων, απέδειξαν την παρουσία των AOA εκτός από θαλάσσια και εδαφικά περιβάλλοντα και σε περιοχές με γλυκό νερό, δείχνοντας μια φανερή προσαρμογή αυτών των μικροοργανισμών σε διαφορετικά ενδιαίτηματα (Erguder et al., 2009; Francis et al., 2005). Τα AOA έχουν επίσης ανιχνευτεί σε ακραία περιβάλλοντα καθώς αλληλουχίες των γονιδίων 16S rRNA και *amoA* των Thaumarchaeota που σχετίζονται με το γένος *N. maritimus* ανακτήθηκαν από διαφορετικά περιβάλλοντα με πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, όπως ορεινές λίμνες (Dorador, 2007; Jiang et al., 2009) και πολύ βαθιά νερά θαλασσών (Tamegai et al., 2007).

Ερευνητές χρησιμοποιώντας το *amoA* γονίδιο ανίχνευσαν την ικανότητα των Αρχαίων να συμμετέχουν στη διαδικασία της νιτροποίησης σε θερμοπηγές στη Σιβηρία και στην Ισλανδία με θερμοκρασίες να κυμαίνονται μεταξύ 82°C και 97°C και με pH κάτω από 7 (Reigstad et al., 2008). Η πρόσφατη καλλιέργεια θερμόφιλων αρχαίων επιβεβαιώνει την παρουσία νιτροδοποιητικής δραστηριότητας σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες λόγω της ύπαρξης σε αυτά των AOA (de la Torre et al., 2008; Hatzepichler et al., 2008). Σε πρόσφατες μελέτες, αλληλουχίες που σχετίζονται με τα AOA βρέθηκαν σε περιβάλλοντα με υψηλό τον δείκτη αλατότητας (Dorador, 2007; Jiang et al., 2009).

Μελέτες με την χρήση μοριακών τεχνικών όπως PCR πραγματικού χρόνου σε διάφορα περιβάλλοντα, εδαφικά και υδάτινα, κυρίως μεσόφιλα έδειξαν την σαφή πληθυσμιακή κυριαρχία των AOA σε σχέση με τα AOB (Leininger et al., 2005). Ανάλογες μελέτες και σε ακραία περιβάλλοντα έδειξε ότι ο πληθυσμός των AOA μπορεί να υπερτερεί των AOB (Jiang et al, 2009). Πρόσφατες μελέτες με την χρήση τεχνικών σημασμένων σταθερών ισοτόπων (Stable

Isotope Probing) σε συνδυασμό με άλλες μοριακές τεχνικές όπως PCR πραγματικού χρόνου ή DGGE έδειξαν ότι τα AOB και AOA κατέχουν διαφορετικά μικρό-ενδιαίτηματα και ο ρόλος τους στην νιτροποίηση στο έδαφος εξαρτάται από την συγκέντρωση του NH_4 στο έδαφος (Verhamme et al, 2011) αλλά και από την μορφή του $\text{NH}_4\text{-N}$ (οργανικές ή ανόργανες μορφές) (Levicnick-Hofferle et al, 2011).

1.9. Τεχνικές για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην παρούσα εργασία

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι μελέτης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους που ταξινομούνται κυρίως σε δύο κατηγορίες με κριτήριο την καλλιέργεια ή μη των μικροοργανισμών. Παλαιότερα, η ανάλυση των μικροοργανισμών του εδάφους στηριζόταν στη καλλιέργεια τους σε ποικίλα θρεπτικά μέσα και στην απομόνωση τους, με κύριο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Αυτό το πρόβλημα λύθηκε με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών που δεν εξαρτώνται από τη καλλιέργεια του υπό μελέτη οργανισμού και δίνουν πληροφορίες για την αφθονία (PCR πραγματικού χρόνου) ή τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων (βιβλιοθήκες κλώνων, T-RFLP, DGGE, ARISA).

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)** μπορεί να πολλαπλασιάσει ένα μόριο DNA μέχρι και ένα δισεκατομμύριο φορές, δίνοντας τεράστιες ποσότητες συγκεκριμένων γονιδίων. Στην PCR γίνεται χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση, το οποίο αντιγράφει μόρια DNA. Η τεχνική αυτή προϋποθέτει ότι γνωρίζουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του επιθυμητού γονιδίου. Αυτό είναι απαραίτητο διότι για την PCR χρειάζονται μικροί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές συμπληρωματικοί σε αλληλουχίες του γονιδίου ή των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Ο κύκλος ενίσχυσης της PCR χωρίζεται σε τρία επιμέρους στάδια :

1. Διαχωρισμός των αλυσίδων με θέρμανση
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με απότομη ψύξη

3. Σύνθεση του DNA

Αυτός ο κύκλος μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές και να ενισχύσει την αλληλουχία-στόχο εκθετικά. Αποτελεί σημαντικό εργαλείο μελέτης καθώς είναι μια απλή τεχνική, έχει υψηλή εξειδίκευση, είναι ιδιαίτερα επιλεκτική, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση πολύ μικρών ποσοτήτων DNA που υπάρχουν σε ένα δείγμα και δεν απαιτείται να είναι γνωστή η αλληλουχία του στόχου εάν είναι γνωστές οι αλληλουχίες εκατέρωθεν του.

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)** χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της αφθονίας και της έκφρασης των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα μέσω της μέτρησης του πλήθους των αντιγράφων ενός γονιδίου. Η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που προσδένονται πάνω σε αυτά χωρίς να τα καταστρέφουν και να συνεχίζεται ομαλά η ενίσχυσή τους. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της qPCR αντανακλά τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο.

Για τη σήμανση και ανίχνευση των προϊόντων της qPCR, χρησιμοποιούνται κυρίως η μη ειδική παρεμβαλλόμενη χρωστική SYBR green (Wittwer et al., 1997) και οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές TaqMan (Holland et al., 1991). Η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Στην **απόλυτη ποσοτικοποίηση**, ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος προσδιορίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ενώ στη **σχετική ποσοτικοποίηση** οι αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου εκφράζονται σχετικά με τον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου αναφοράς. Η qPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως καθώς είναι μια πολύ ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος και μπορεί να λάβει χώρα σε ποικίλες περιβαλλοντικές και εργαστηριακές συνθήκες (Cindy et al., 2009).

Η ακρίβεια αυτής της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί από αναστολείς της PCR που βρίσκονται στο περιβαλλοντικό δείγμα για τον αποκλεισμό αυτής της πιθανότητας το πείραμα διεξάγεται σε μεγαλύτερους βαθμούς διάλυσης (Stubner, 2002 ; Harms et al., 2003). Για την ακρίβεια της μικροβιακής ποσοτικοποίησης σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης ο προσεκτικός χειρισμός του δείγματος, των εκκινήτων, των ανιχνευτών και των ενζύμων κατά τη διεξαγωγή του πειράματος καθώς και η σωστή αποθήκευσή τους. Οι πρώτες

εφαρμογές της qPCR πραγματοποιήθηκαν το Νοέμβριο του 2000, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ανιχνευτές TaqMan που είχαν ως στόχο το 16S rRNA γονίδιο (Becker et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Takai & Horikoshi, 2000).

Από εκείνη τη στιγμή, η qPCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση λειτουργικών γονιδίων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην οξειδωση της αμμωνίας (Okano et al., 2004; Treusch et al., 2005; Leininger et al., 2006) και στην απονιτροποίηση (Smith et al., 2007). Με τη βοήθεια της μεθόδου της **δυναμικής νιτροποίησης (potential nitrification)** υπολογίζουμε τη μέγιστη ικανότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν NH_4^+ (κατιόν αμμωνίου) σε NO_3^- (νιτρικά) (Fortuna et al., 2003).

Είναι ένας έμμεσος τρόπος υπολογισμού των NO_3^- (νιτρικών ιόντων) μέσω ενός μαθηματικού τύπου που εκφράζει την ποσότητα των NO_2^- που απελευθερώνονται από 1 g εδάφους εντός 5 ωρών σε συνθήκες περίσσειας NH_4 υπό την μορφή $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Kandeler et al., 1995). Η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει μία ταχεία και ακριβή αξιολόγηση της ικανότητας νιτροποίησης στο εδαφικό δείγμα (Fortuna et al., 2003).

1.10. Στόχοι της παρούσας εργασίας

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας της Κωνσταντίνας Ρουσίδου έδειξαν ότι η εφαρμογή του BIOACT[®] οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές τόσο στην σύνθεση όσο και στην αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων. Οι μεταβολές αυτές ήταν παροδικές και οι μικροβιακές κοινότητες επανήλθαν στα αρχικά επίπεδα 45 ως 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Η επίδραση αυτή αρχικά αποδόθηκε είτε σε άμεσο ανταγωνισμό των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών με τον μύκητα *P. lilacinus* είτε πιθανότατα σε έμμεσο εκτοπισμό των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών από ετερότροφους πλειότροφους μικροοργανισμούς που διατρέφονται επί των λοιπών συστατικών του σκευάσματος (γλυκόζη 78% και σκόνη γάλακτος 6%), αναπτύσσονται ταχύτατα αρχικά και στην συνέχεια αφού καταναλώνουν τα συστατικά αυτά επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα επιτρέποντας την ανάπτυξη των βραδέως αναπτυσσόμενων νιτροδοποιητικών

μικροοργανισμών.

Περαιτέρω πειράματα με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν σημαντική μείωση του πληθυσμού του *P. lilacinus* στο έδαφος μεταξύ 5 και 20 ημερών μετά την εφαρμογή του BIOACT® περιορίζοντας σε σημαντικό βαθμό την πιθανότητα ύπαρξης άμεσου ανταγωνισμού του μύκητα με τα νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκε η δεύτερη υπόθεση όπως τέθηκε παραπάνω. Δηλαδή, εάν η παροδική μεταβολή στην αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων και αρχαίων αντιστοιχεί καταρχήν και σε μείωση της λειτουργίας που επιτελούν η συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί (νιτροποίηση) αλλά και εάν αυτή η μεταβολή στην αφθονία οφείλεται στον ίδιο τον μύκητα ή στα συνέκδοχα που περιέχονται στο σκεύασμα του BIOACT®.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση των επιμέρους συστατικών του βιολογικού γεωργικού φαρμάκου BIOACT® (σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* στέλεχος 251, γλυκόζη και σκόνη γάλακτος) στην αφθονία και λειτουργία των νιτροποιητικών βακτηρίων και αρχαίων. Αρχικά, 2,4 kg εδάφους ίδιου με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της μεταπτυχιακής διατριβής της κ. Κωνσταντίνας Ρουσιδου (αμμωπηλώδες, pH 5.5, οργανικός C 1.23%) διαχωρίστηκε σε 4 δείγματα των 600 g. Καθένα από αυτά τα δείγματα δέχτηκε διαφορετική μεταχείριση. Πιο συγκεκριμένα:

- ✓ Προστέθηκαν 10 mL (0.234 g/100 ml νερό) από το διάλυμα του σκευάσματος BIOACT® (συνιστώμενη δόση για να έχουμε 10^6 σπόρια/g εδάφους) – **Μεταχείριση BIOACT®**.
- ✓ Προστέθηκαν 10 mL από διάλυμα γλυκόζης και σκόνης γάλακτος Regilait (310 mg γλυκόζης + 20 mg Regilait στα 100 ml νερό) ώστε να έχουμε στο έδαφος ποσότητα των δύο αυτών συστατικών ίση με την ποσότητα που ελευθερώνεται κατά την εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του BIOACT®- **Μεταχείριση Γλυκόζης & Regilait**.
- ✓ Προστέθηκαν 10 mL από διάλυμα σπορίων του μύκητα (6×10^7 σπόρια μύκητα/ml) ώστε να προκύψει στο έδαφος συγκέντρωση σπορίων ανάλογη της συνιστώμενης δηλαδή 10^6 σπόρια/g εδάφους – **Μεταχείριση Μύκητας**. Για την προετοιμασία του διαλύματος σπορίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *P. lilacinus* από το σκεύασμα BIOACT® με επίστρωση σε θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar. Τμήματα του μυκηλίου από αναπτυσσόμενη καλλιέργεια του μύκητα εμβολιάστηκαν με την βοήθεια φελοτρυπητήρα σε υγρή καλλιέργεια Potato Dextrose Broth και

ακολούθησε επώαση στους 30°C με χαμηλή ανάδευση για διάστημα 10 ημερών. Στην συνέχεια ακολούθησε στράγγιση της καλλιέργειας του μύκητα από γάζα και ο αριθμός των σπορίων του μύκητα στην υγρή καλλιέργεια προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής. Η αρχική πυκνότητα σπορίων στο αρχικό διάλυμα που προέκυψε ήταν 5×10^{10} κύτταρα/ml.

- ✓ Προστέθηκαν 10 ml νερού χωρίς συστατικά του σκευάσματος ή τον μύκητα – **Μεταχείριση Μάρτυρας**.

Αμέσως μετά την εφαρμογή έγινε προσαρμογή της υγρασίας του εδάφους όπου χρειαζόταν με προσθήκη νερού στο 45% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους. Στη συνέχεια, τα εδάφη αναμίχθηκαν προσεκτικά (με την σειρά μάρτυρας, γλυκόζη και σκόνη γάλακτος, μύκητας και BIOACT[®] ώστε να περιοριστούν κίνδυνοι πιθανόν επιμολύνσεων μεταξύ των μεταχειρίσεων) και διαχωρίστηκαν σε δείγματα των 50g που τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους $25 \pm 2^\circ\text{C}$ και χωρίς την παρουσία φωτός. Τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν 5, 20, 45 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή και καθένα διαχωρίστηκε σε υποδείγματα των 10 και 40g. Τα 10g αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εξαγωγή DNA και τα 40g αποθηκεύτηκαν στους 4°C για μέτρηση της δυνητικής νιτροποίησης. Οι μετρήσεις της δυνητικής νιτροποίησης πραγματοποιούνται εντός 2-3 ημερών.

2.2. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους

Η εξαγωγή του DNA από το έδαφος αποτελεί το πρώτο βήμα για την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας. Για την απομόνωση του DNA έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι:

- η μέθοδος άμεσης λύσης (Ogram et al., 1987) και
- η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων (Torsvik, 1980)

Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος είτε με μηχανικό ή χημικό ή ενζυμικό τρόπο είτε με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση του κυττάρου το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Στη δεύτερη μέθοδο, τα κύτταρα πρώτα διαχωρίζονται από σωματίδια του εδάφους και ύστερα οδηγούνται σε λύση. Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο της άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων παραλαμβάνεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υψηλότερης καθαρότητας. Το DNA πρέπει να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πρωτεΐνες, καθώς η παρουσία τέτοιων ουσιών μπορεί να προκαλέσει αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR.

Ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων και εμπορικών kit είναι διαθέσιμος στην επιστημονική κοινότητα καθώς έχουν σημειωθεί αρκετές τροποποιήσεις ανάλογα με τις ανάγκες κάθε πειράματος και με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του εκχυλισμένου DNA.

Στην παρούσα εργασία, εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε από τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση στις 5, 20, 45 και 90 ημέρες. Το DNA εκχυλίστηκε από 0,5 g εδάφους από κάθε δείγμα με τη χρήση του Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το kit χρησιμοποιεί τη μέθοδο της άμεσης λύσης των κυττάρων με τη βοήθεια μηχανικών και χημικών μεθόδων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και παρατήρησή της σε υπεριώδη ακτινοβολία με σκοπό να διαπιστωθεί η ποιότητα και η ποσότητα των προϊόντων που πήραμε από την εκχύλιση του DNA.

2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με

διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Η χρώση των τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με χρωστικές που προσδένονται στο DNA, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση είναι:

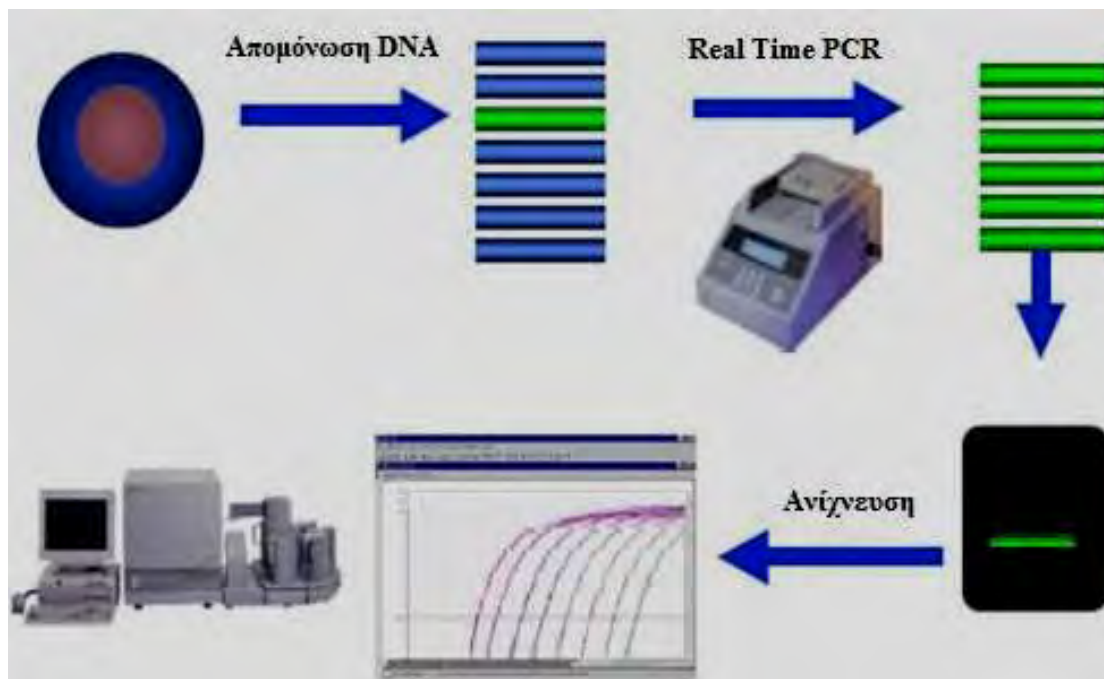
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x (Tris-acetate-EDTA): 242 g Tris Base, 57.1 ml οξικό οξύ και 100 ml EDTA (0.5M, pH 8) προστίθενται σε 1 L dH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 6x (Loading buffer): 5 ml γλυκερόλη, 1 ml Bromophenol blue, 0.5 ml 20x TAE και 3.5 ml ddH₂O
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

Η ηλεκτροφόρηση του εκχυλισμένου DNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Η πηκτή κάθε φορά παρασκευάζεται διαλύοντας με βρασμό κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε 1xTAE. Στη συνέχεια, προστίθεται στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml, αφού πρώτα έχει μειωθεί η θερμοκρασία της πηκτής.

Μόλις στερεοποιηθεί το διάλυμα, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 1xTAE και φορτώνονται 5 μl δείγματος αναμεμειγμένα με 1 μl διάλυμα φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση των δειγμάτων και την παρακολούθηση της μετακίνησης τους στη πηκτή. Αφού τοποθετηθούν όλα τα δείγματα, με τη βοήθεια τροφοδοτικού πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση στα 90V. Η παρατήρηση του DNA γίνεται με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4. Ποσοτικοποίηση των *amoA* γονιδίων των AOB και των AOA με qPCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)

Η διαδικασία της μεθόδου απεικονίζεται συνοπτικά στο παρακάτω διάγραμμα :



Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της αφθονίας και της έκφρασης των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα μέσω της μέτρησης του πλήθους των αντιγράφων ενός γονιδίου. Η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από αυτά τα μόρια μετράται σε κάθε κύκλο και συμβάλλει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Στην παρούσα μελέτη τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με την βοήθεια της χρωστικής **SYBR Green**, η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της χρωστικής είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών και για την

ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου. Αντίθετα, ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρωστικής SYBR Green είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Για να λυθεί το πρόβλημα αυτό πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο πείραμα μια **καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve)**, η οποία διευκολύνει την διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η καμπύλη αποδιάταξης δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

Από τη μέτρηση της αύξησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης προκύπτει μια **καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot)**. Η καμπύλη ενίσχυσης χωρίζεται σε 4 φάσεις:

1. Την φάση στην οποία τα επίπεδα του ενδογενή φθορισμού (background fluorescence) είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του φθορισμού που προέρχονται από τα προϊόντα των πρώτων κύκλων της PCR
2. Την εκθετική φάση
3. Την γραμμική φάση
4. την φάση κορεσμού

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης, η ποσότητα των συντιθέμενων προϊόντων είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η **τιμή Ct**. Είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτείται να πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ενίσχυσης ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο **όριο – κατώφλι (threshold)**. Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του γονιδίου στόχου τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct. Στην παρούσα μελέτη έγινε απόλυτη ποσοτικοποίηση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των άγνωστων δειγμάτων έγινε με τη

χρήση μιας καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι Ct τιμές κάθε συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων στηρίχθηκε στις τιμές Ct της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Τη φάση ενίσχυσης ακολουθεί η φάση αποδιάταξης, όπου γίνεται κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης. Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Mx3000P QPCR (Stratagen). Τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων της qPCR φαίνονται παρακάτω :

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία :

- DyNAzyme EXT DNA Polymerase, 1U/μl (Finnzymes)
- 10x Mg²⁺-free DyNAzyme EXT Buffer (Finnzymes)
- MgCl₂ 50mM (Finnzymes)
- Νουκλεοτίδια, dNTP's (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- Bovine Serum Albumin (BSA), 10mg/ml (New England Biolabs)
- Εκκινητές

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναφορά
amoA-1F	5'- GGGTTTCTACTGGTGGT-3'	Rotthauwe et al., 1997
amoA-2R	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3' K = G or T, S = G or C	

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναφορά
Arch-amoAF	5'- STAATGGTCTGGCTTAGACG-3	Francis et al., 2005
Arch-amoAR	5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'	

Συνθήκες πραγματοποίησης της qPCR για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA:

Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	20sec	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3sec	45 κύκλους
Υβριδοποίηση	AOB 57°C AOA 53°C	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	45sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C 55°C 95°C	1min 30sec 30sec	1 κύκλος

Αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA:

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 µl	1X
Forward primer (20pmol/µl) AOB: AmoA1F AOA: Arch-amoAF	0,2 µl	0.2µM
Reverse primer (20pmol/µl) AOB: AmoA2R AOA: Arch-amoAR	0,2 µl	0.2µM
Rox Low (50X)	0,4 µl	1X
BSA (10µg/µl)	0,8 µl	400ng/µl
DNA	1 µl	
ddH ₂ O	7,4 µl	
Συνολικός όγκος	20 µl	

2.5. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ήταν:

- PCR clean up kit (Macherey-Nagel)
- pGEM-T Easy vector systems (Promega)
- NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel)
- Δεκτικά *E.coli* κύτταρα
- Θρεπτικό μέσο LB: 10g NaCl, 10g Casein, 5g Yeast extract και 15g άγαρ (για την παρασκευή τριβλίων LB) διαλύονται σε 1L dH₂O και αποστειρώνονται
- Αμπικιλίνη: συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος 100mg/ml σε νερό, αποστείρωση με φίλτρο. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml (φυλάσσεται στους -20°C)
- IPTG (0.1M): 0.238g IPTG διαλύονται σε 10mL ddH₂O και το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο (φυλάσσεται στους 4°C)
- X-GAL (2%): 0.2g X-GAL διαλύονται σε 10ml διμεθυλοφορμαμίδιο και το διάλυμα αποστειρώνεται (φυλάσσεται στους -20°C)

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο *amoA*. Η κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και της καμπύλης αναφοράς έγινε ως εξής:

- Χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών *amoA1F/amoA2R* για τα AOB και *Arch-amoAF/Arch-amoAR* για τα AOA, χωρίς την φθορίζουσα χρωστική, για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου από ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

PCR αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB:

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x Mg ²⁺ -free)	5 μl	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5 μl	1,5mM
dNTP's (10mM)	1 μl	200μM από το καθένα
Forward primer amoA-1F (20pmol/μl)	1 μl	0.2μM
Reverse primer amoA-2R (20pmol/μl)	1 μl	0.2μM
BSA (10μg/μl)	2 μl	400ng/μl
Polymerase (1U/μl)	1 μl	1U/50μl
DNA	1 μl	
ddH ₂ O	36,5 μl	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB:

Αρχική Αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	1min	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	56°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	1,5min	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10min	

PCR αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA:

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x Mg ²⁺ -free)	5 μ l	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5 μ l	1,5 mM
dNTP's (10mM)	1 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer Arch-amoAF (20pmol/ μ l)	1 μ l	0.2 μ M
Reverse primer Arch-amoAR (20pmol/ μ l)	1 μ l	0.2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	2 μ l	400ng/ μ l
Polymerase (1U/ μ l)	1 μ l	1U/50 μ l
DNA	1 μ l	
ddH ₂ O	36,5 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA:

Αρχική Αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	45sec	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	53°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	15min	

- Το προϊόν ενίσχυσης καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή.

- Ακολούθησε ένθεση σε φορέα pGEM-T Easy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
- Ο μετασχηματισμός έγινε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α. Σε 80μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 2μl από την αντίδραση της λιγάσης (ligase) και πραγματοποιήθηκε μικρή ανακίνηση του δείγματος. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 50sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μl LB. Έγινε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα κύτταρα 50μl X-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και το διάλυμα απλώθηκε σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τριβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.
- Έγινε επιλογή λευκών αποικιών και εμβολιασμός σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη. Ακολούθησε επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
- Ακολούθησε PCR στα πλασμίδια που απομονώθηκαν με τα ζεύγη εκκινητών amoA1F/amoA2R για τα AOB και Arch-amoAF/Arch-amoAR για τα AOA ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του σωστού ενθέματος *amoA*.
- Ακολούθησε φωτομέτρηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Eppendorf Biophotometer) και μετατροπή της συγκέντρωσης σε αριθμό αντιγράφων του γονιδίου σύμφωνα με τον τύπο (Whelan et al., 2003):

$$DNA \text{ (copy)} = \frac{6.02 * 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) * DNA \text{ amount (g)}}{DNA \text{ length (bp)} * 660 (\text{g mol}^{-1} \text{bp}^{-1})}$$

$$AOB: DNA \text{ (copy)} = \frac{6.02 * 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) * 229 * 10^{-9} (\text{g})}{(3015 + 491) (\text{bp}) * 660 (\text{g mol}^{-1} \text{bp}^{-1})} \approx 6 * 10^{10} \text{ copies}$$

$$AOA: DNA (copy) = \frac{6.02 * 10^{23} (copies mol^{-1}) * 286 * 10^{-9} (g)}{(3015 + 635) (bp) * 660 (g mol^{-1}bp^{-1})} \approx 7 * 10^{10} copies$$

- Τέλος, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για τα AOB χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 7×10^7 έως 7×10^1 αντίγραφα γονιδίου και για τα AOA χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις από 4×10^7 έως 4×10^2 αντίγραφα γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε αραιώση.

2.6. Μέτρηση Δυνητικής Νιτροποίησης

Με τη βοήθεια της δυνητικής νιτροποίησης υπολογίζουμε τη μέγιστη ικανότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών σε μια μικροβιακή κοινότητα του εδάφους στο έδαφος να μετατρέπουν NH_4^+ (κατιόν αμμωνίου) σε NO_2^- (νιτρώδη) και στη συνέχεια να μετατρέπονται αυτά σε NO_3^- (νιτρικά) με τη δράση των νιτροποιητικών βακτηρίων (Fortuna et al., 2003). Τα δείγματα του εδάφους επωάζονται σε υπόστρωμα θειικού άλατος αμμωνίου στους $25^\circ C$ για 5 ώρες. Τα νιτρώδη που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της επώασης εκχυλίζονται με τη βοήθεια χλωριούχου καλίου και προσδιορίζονται φωτομετρικά στα 520nm. Το χλωρικό άλας του νατρίου αναστέλλει την οξειδωση των νιτρώδων ιόντων κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων (Berg and Rosswall, 1985). Τα χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

- **Διάλυμα θειικού αμμωνίου (10mM):** 1.3214gr της ουσίας $(NH_4)_2SO_4$ διαλύονται σε αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια προστίθεται στην ογκομετρική φιάλη ποσότητα αποσταγμένου νερού ώστε να φθάσει ο όγκος του διαλύματος το επίπεδο των 1000ml.
- **Διάλυμα που χρησιμοποιείται για υπόστρωμα (1mM):** Πραγματοποιείται αραιώση 100ml από το διάλυμα θειικού αμμωνίου σε 1000ml με αποσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη.

- **Διάλυμα χλωρικού άλατος του νατρίου (1.5M):** 15.97gr της ουσίας NaClO_3 διαλύονται σε αποσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη.
- **Διάλυμα χλωριούχου καλίου (2M):** 149.12gr της ουσίας KCl διαλύονται σε αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια προστίθεται στην ογκομετρική φιάλη ποσότητα αποσταγμένου νερού ώστε να φθάσει ο όγκος του διαλύματος το επίπεδο των 1000ml.
- **Ρυθμιστικό Διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (0.19M, pH 8.5):** 10g της ουσίας NH_4Cl διαλύονται σε αποσταγμένο νερό, προσαρμόζεται το pH στο 8.5 και πραγματοποιείται αραίωση με αποσταγμένο νερό ώστε ο όγκος του διαλύματος στην ογκομετρική φιάλη να φθάσει τα 1000ml.
- **Χρωματικός Δείκτης:** σε 150ml αποσταγμένου νερού διαλύονται 2g σουλφανιλαμιδίου και 0.1g N-(1-naphthyl)-ethylemediamine hydrochloride και στη συνέχεια προστίθενται 20ml πυκνού διαλύματος φωσφορικού οξέος. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώνεται με αποσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη μέχρι ο όγκος να φθάσει το όριο των 200ml. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος και δεν αποθηκεύεται. Επίσης, πρέπει να είναι άχρωμο.
- **Πρότυπο Διάλυμα (stock):** 4.9257g της ουσίας διαλύονται σε αποσταγμένο νερό και πραγματοποιείται αραίωση με αποσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος το διαλύματος στην ογκομετρική φιάλη να φθάσει το επίπεδο των 1000ml. Αποθηκεύεται στους 4°C για λίγες μόνο εβδομάδες.
- **Διάλυμα εργασίας (working solution):** Πραγματοποιείται αραίωση 5ml από το πρότυπο διάλυμα σε 500ml αποσταγμένου νερού σε ογκομετρική φιάλη.

Ζυγίζουμε 5g από το δείγμα εδάφους και τα προσθέτουμε σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml. Προσθέτουμε 20ml από το διάλυμα υποστρώματος και 0.1ml από το διάλυμα χλωρικού άλατος καλίου, αναδεύουμε ελαφρώς και κλείνουμε τις φιάλες με αλουμινόχαρτο. Επωάζουμε τις **τρεις** επαναλήψεις για

τη κάθε μεταχείριση για 5 ώρες σε επωαστικό θάλαμο με δυνατότητα ανάδευσης ταυτόχρονα και ένα δείγμα, που λήφθηκε τυχαία από οποιαδήποτε επανάληψη, αποθηκεύτηκε για 5 ώρες στους -20°C και θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Μετά το πέρας των 5 ωρών επαναφέρουμε τα δείγματα-μάρτυρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα 5ml από το διάλυμα χλωριούχου καλίου, αναδεύουμε και φιλτράρουμε τα δείγματα αμέσως. Για τη φωτομετρική ανάλυση προσθέτουμε 5ml από το διάλυμα μετά το φιλτράρισμα, 3ml από το ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και 2ml από το χρωματικό δείκτη σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, αναδεύουμε και τα αφήνουμε σε ηρεμία για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φωτομετρική ανάλυση στα 520nm.

Ο υπολογισμός των νιτροδών που απελευθερώνονται από 1g εδάφους κατά τη διάρκεια 5 ωρών γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου :

$$\frac{[(S - C) \times 25.1 \times 1000 \times 100]}{5} \times 5\% \text{ dm}$$

S: η μέση τιμή των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων

C: το αποτέλεσμα του control για τη κάθε μεταχείριση

2.7. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

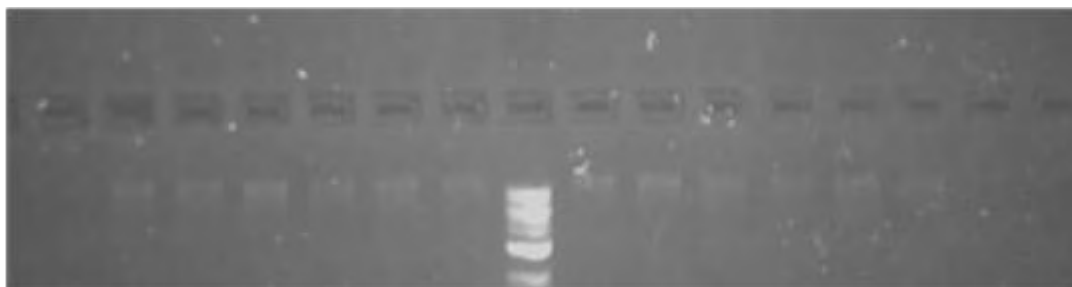
Οι αριθμοί των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB και των AOA μετατράπηκαν σε αριθμούς αντιγράφων γονιδίων ανά γραμμάριο εδάφους και ακολούθησε κατάλληλη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να διαπιστωθεί η επίδραση των παραγόντων χρόνος και μεταχείριση τόσο στην αφθονία (PCR πραγματικού χρόνου) όσο και στην λειτουργία (δυνητική νιτροποίηση) των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Οι επιδράσεις αυτές αξιολογήθηκαν με ανάλυση μεταβλητότητας δύο παραγόντων με two-way ANOVA και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05. Για τις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του

χρόνου δειγματοληψίας και των μεταχειρίσεων, χρησιμοποιήθηκε το τεστ των Ελαχίστων Σημαντικών Διαφορών (Least Significant Differences, LSD) για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των τεσσάρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο ή για την ίδια μεταχείριση στους τέσσερις χρόνους δειγματοληψίας. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο GenStat 11th Edition (VSN International Ltd).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα εδάφους

Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% για έλεγχο της απόδοσης :

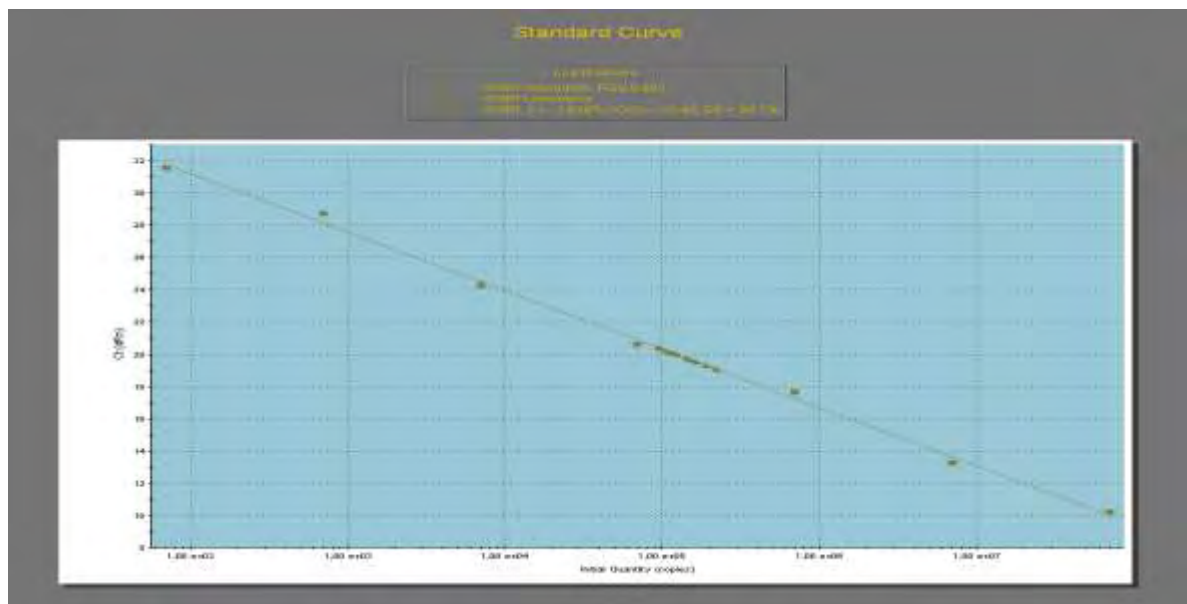


Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% εκχυλισμένου DNA από δείγματα εδάφους (20 ημέρες). Τα δείγματα 2-4 ανήκουν στο μάρτυρα, τα δείγματα από 5 έως 7 ανήκουν στη μεταχείριση με BIOACT[®], το 8 είναι DNA ladder (3μl), τα δείγματα 9 με 11 ανήκουν στη μεταχείριση του εδάφους με μίγμα γλυκόζης και Regilait ενώ τα δείγματα 12 έως 14 ανήκουν στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με σπόρια του μύκητα *Paecilomyces lilacinus*. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10μl DNA.

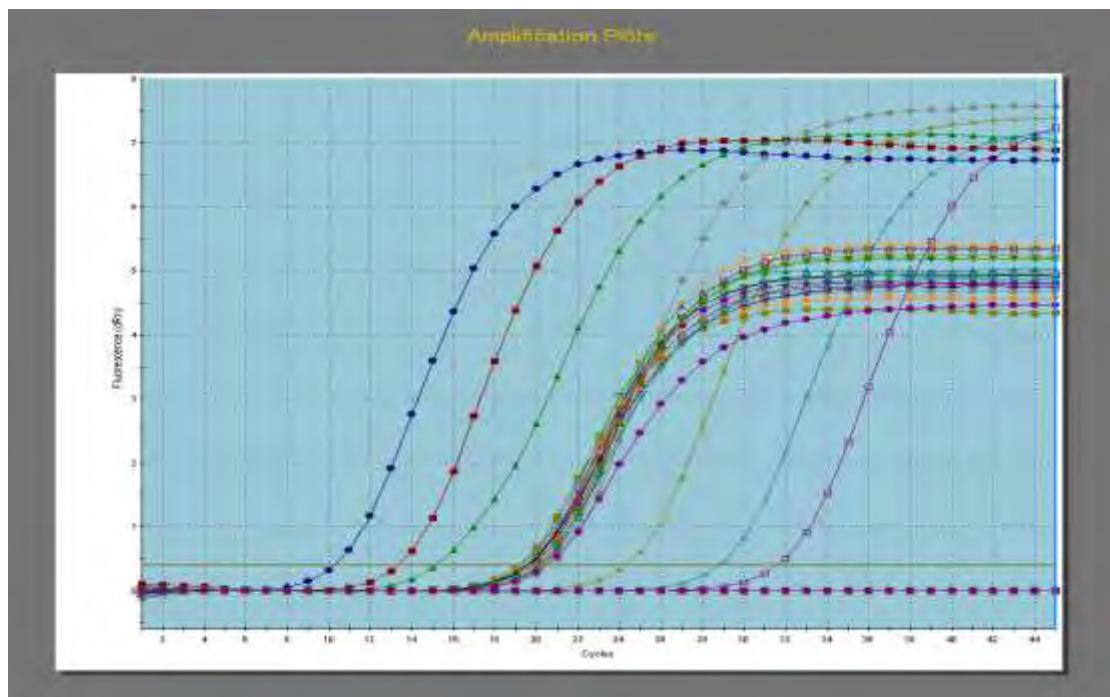
3.2. Αποτελέσματα qPCR

Η ποσοτικοποίηση των κοινοτήτων των AOB και των AOA στα δείγματα εδάφους έγινε με qPCR στοχεύοντας στο *amoA* γονίδιο. Ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στα δείγματα έγινε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιέχουν το γονίδιο *amoA*. Για τα AOB χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 7×10^7 έως 7×10^1 αντίγραφα γονιδίου και για τα AOA χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις από 4×10^7 έως 4×10^2 αντίγραφα γονιδίου. Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, ενίσχυσης και αποδιάταξης της qPCR των **AOB** :

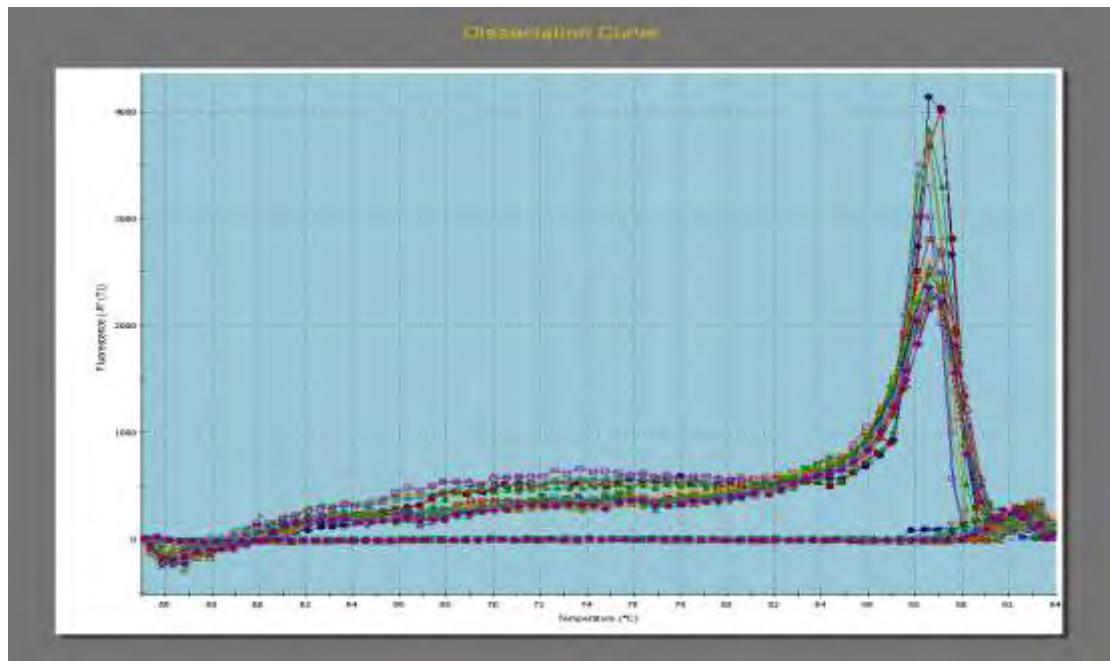
Καμπύλη αναφοράς (Standard Curve) :



Καμπύλη ενίσχυσης (Amplification Plots):



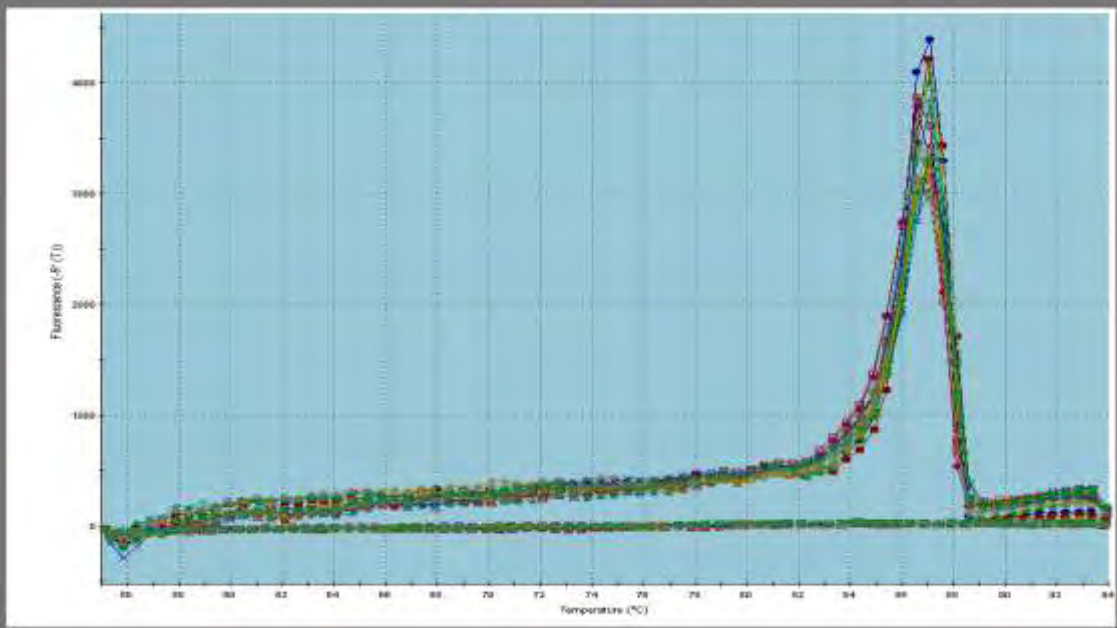
Καμπύλη αποδιάταξης (Dissociation Curve):



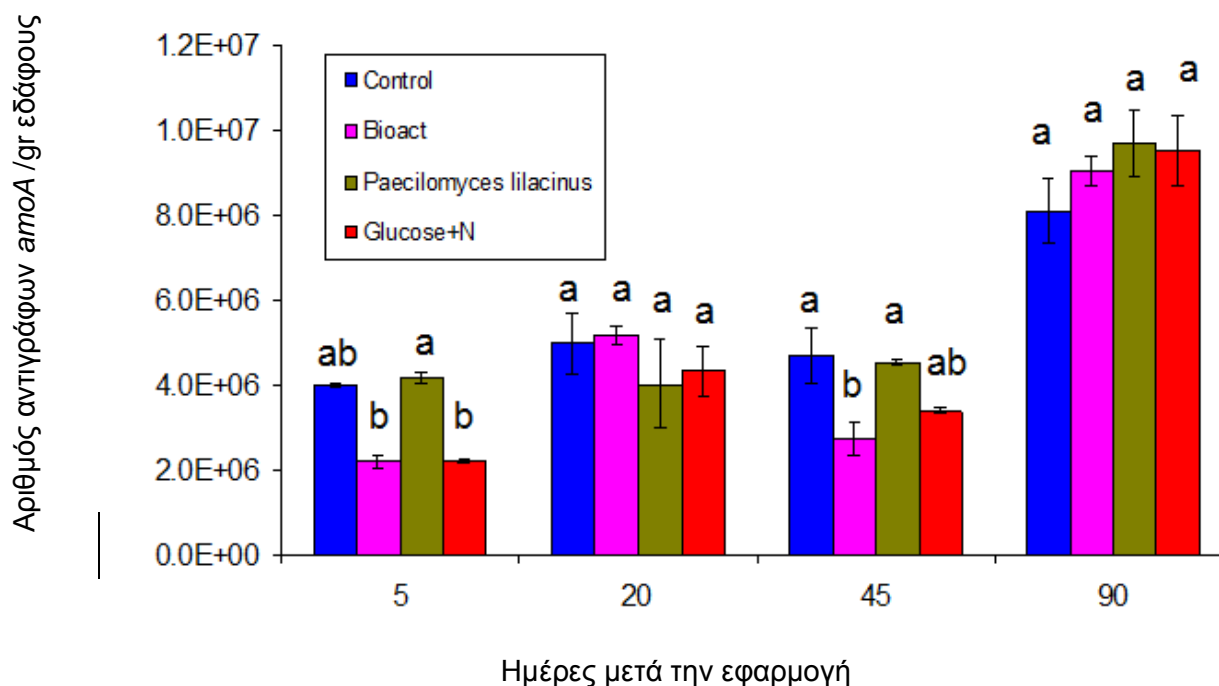
Ακολουθως παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, ενίσχυσης και αποδιάταξης της qPCR των **AOA** :

Καμπύλη αναφοράς (Standard Curve):

Dissociation Curve



3.2.1 Η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων στην αφθονία των AOB

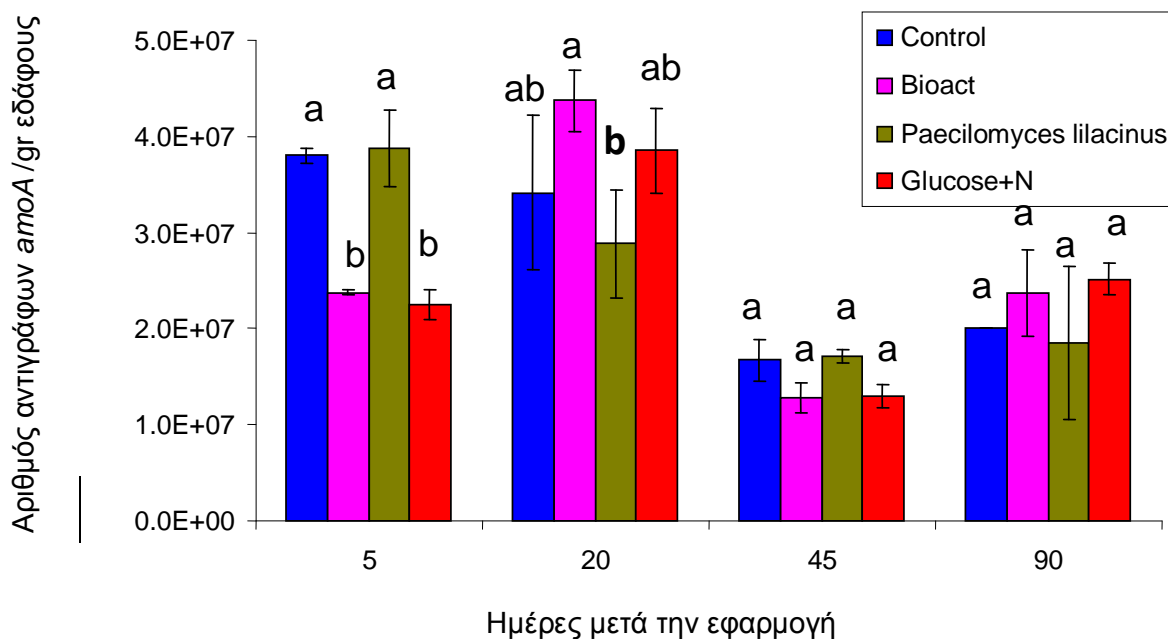


Διάγραμμα 1. Οι μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή BIOACT®, των επιμέρους συστατικών του (γλυκόζης +σκόνης γάλακτος ή σπόρια του μύκητα) και σε έδαφος-μάρτυρα. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι 5%. Η παρουσία ίδιων γραμμάτων επάνω από τις μεταχειρίσεις στον κάθε χρόνο δειγματοληψίας (5, 20, 45 και 90 ημέρες) δείχνει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου για τα AOB παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1. Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι οι διάφορες μεταχειρίσεις (ως κύριος παράγοντας) δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές ($p>0.05$) στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* των AOB. Αντίθετα ο χρόνος δειγματοληψίας (ως κύριος παράγοντας) προκάλεσε σημαντικές μεταβολές ($p<0.001$) στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB με σημαντικά χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων να καταγράφεται 5 και 45 ημέρες μετά την εφαρμογή και σημαντικά υψηλότερες

τιμές να εμφανίζονται σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Εκτός από τις κύριες επιδράσεις των δύο παραγόντων, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις ($p < 0.001$) μεταξύ των δύο παραγόντων, χρόνου και μεταχείρισης. Έτσι, η εφαρμογή των BIOACT[®] ή γλυκόζης και σκόνης γάλακτος προκάλεσε μια παροδική αλλά σημαντική μείωση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB σε σχέση με τον μάρτυρα και τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή των σποριών του μύκητα. Τα επίπεδα των αντιγράφων του *amoA* επανήλθαν σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα στις 20 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή μετά από μια νέα σημαντική μείωση που παρατηρήθηκε στις 45 ημέρες και μόνο στα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή BIOACT[®]. Συνολικά, ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή BIOACT[®] ή γλυκόζη και σκόνη γάλακτος παρουσίασε το ίδιο ακριβώς πρότυπο με παροδική μείωση στις 5 ημέρες και επαναφορά στα επίπεδα του μάρτυρα στις επόμενες δειγματοληψίες. Αντίστοιχα, παρόμοια πρότυπα μεταβολών του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB παρατηρήθηκαν στα δείγματα του μάρτυρα και στα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή των σποριών του μύκητα *P. lilacinus*.

3.2.2 Επιδράσεις των διαφόρων μεταχειρίσεων στην αφθονία των ΑΟΑ

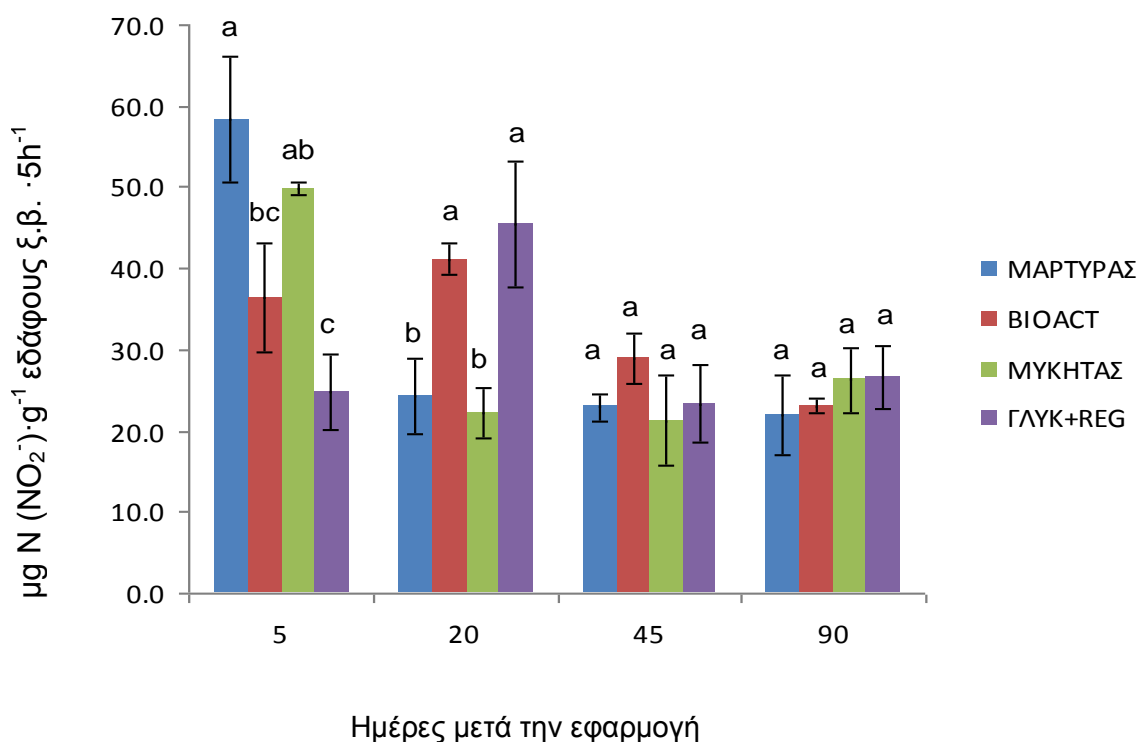


Διάγραμμα 2. Οι μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή BIOACT®, των επιμέρους συστατικών του και σε έδαφος-μάρτυρα. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι 5%. Η παρουσία ίδιων γραμμάτων επάνω από τις μεταχειρίσεις στον κάθε χρόνο δειγματοληψίας (5, 20, 45 και 90 ημέρες) δείχνει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου για τα ΑΟΑ παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι διάφορες μεταχειρίσεις (κύριος παράγοντας) δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές ($p > 0.05$) στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των ΑΟΑ. Αντίθετα ο χρόνος δειγματοληψίας ως κύριος παράγοντας προκάλεσε σημαντικές μεταβολές ($p < 0.001$) στο αριθμό των αντιγράφων του συγκεκριμένου γονιδίου ανεξάρτητα μεταχείρισης. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των ΑΟΑ παρουσίασε σημαντικά

χαμηλότερες τιμές στις 45 ημέρες μετά την εφαρμογή σε σχέση με το αριθμό των αντιγράφων στις 5 και 25 ημέρες. Εκτός των κυρίων επιδράσεων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ($p < 0.001$) μεταξύ των δύο κυρίων παραγόντων. Έτσι παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOA στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή των BIOACT[®] ή μίγματος γλυκόζης και σκόνης γάλακτος στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα του μάρτυρα και αυτών που δέχτηκαν την εφαρμογή σπορίων του μύκητα *P. lilacinus*. Η εικόνα αυτή αντιστράφηκε στις 20 ημέρες μετά την εφαρμογή όπου ο αριθμός των αντιγράφων του *amoA* στις μεταχειρίσεις BIOACT[®] ή μίγματος γλυκόζης και σκόνης γάλακτος ήταν υψηλότερος σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς όμως οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Κατά τις επόμενες δειγματοληψίες (45 και 90 ημέρες) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων. Γενικότερα, όπως και στην περίπτωση των AOB, τα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή BIOACT[®] ή γλυκόζης και σκόνης γάλακτος παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα με παροδική αλλά σημαντική μείωση στον αριθμό των *amoA* γονιδίων στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή και επαναφορά σε επίπεδα ανάλογα με τον μάρτυρα στις επόμενες δειγματοληψίες. Αντίθετα, τα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή των σπορίων του μύκητα *P. lilacinus* χωρίς τα συνέκδοχα που περιέχονται στο σκεύασμα BIOACT[®] παρουσίασαν πρότυπα μεταβολών ανάλογα με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

3.3. Αποτελέσματα δυνητικής νιτροποίησης



Διάγραμμα 3. Οι μεταβολές της δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή ΒΙΟΑCT[®], των επιμέρους συστατικών του και σε έδαφος-μάρτυρα. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι 5%. Η παρουσία ίδιων γραμμάτων επάνω από τις μεταχειρίσεις στον κάθε χρόνο δειγματοληψίας (5, 20, 45 και 90 ημέρες) δείχνει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της δυνητικής νιτροποίησης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξαν ότι ο χρόνος δειγματοληψίας επηρεάζει σημαντικά την δυνητική νιτροποίηση (κύρια επίδραση $p < 0.001$). Έτσι, οι υψηλότερες τιμές δυνητικής νιτροποίησης παρατηρήθηκαν στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή και ακολούθησε σημαντική

μείωση της δυνητικής νιτροποίησης στις 20 ημέρες και περαιτέρω σημαντική μείωση στις 45 και 90 ημέρες. Αντίθετα, το είδος μεταχείρισης, ως κύριος παράγοντας, δεν επηρέασε σημαντικά ($p > 0.05$) τα επίπεδα δυνητικής νιτροποίησης. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κυρίων παραγόντων, δηλαδή μεταχείριση και χρόνος ($p < 0.001$).

Έτσι, κατ' αναλογία με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου, παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές δυνητικής νιτροποίησης στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή BIOACT[®] και γλυκόζης + σκόνης γάλακτος και συλλέχθηκαν 5 ημέρες μετά την εφαρμογή σε σχέση με τον μάρτυρα και τα αντίστοιχα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή μόνο σπορίων του μύκητα *P. lilacinus*. Η κατάσταση αντιστράφηκε πλήρως στις 20 ημέρες όπου και παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές δυνητικής νιτροποίησης στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή BIOACT[®] και γλυκόζης+ σκόνης γάλακτος σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα μάρτυρα ή τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με σπόρια του μύκητα.

Τέλος, τα επίπεδα δυνητικής νιτροποίησης στις διάφορες μεταχειρίσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους στις δειγματοληψίες των 45 και 90 ημερών. Συνολικά και σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου, η εφαρμογή BIOACT[®] ή μίγματος γλυκόζης και σκόνης γάλακτος οδήγησε σε παρόμοιες μεταβολές της δυνητικής νιτροποίησης με μια σημαντική μείωση της νιτροποίησης στις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή, σημαντική ανάκαμψη στις 20 ημέρες σε επίπεδα υψηλότερα του μάρτυρα και επαναφορά σε επίπεδα παρόμοια με τον μάρτυρα από τις 45 ημέρες και μετά. Αντίθετα, η εφαρμογή αποκλειστικά και μόνο των σπορίων του μύκητα *P. lilacinus* δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στην δυνητική νιτροποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νιτροποίηση αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βήματα στον κύκλο του αζώτου και πραγματοποιείται αποκλειστικά από χημειολιθοαυτότροφα βακτήρια και αρχαία. Κατά τα τελευταία 10 έτη η χρήση μοριακών μεθοδολογιών βοήθησε στο να μελετηθεί ενδελεχώς ο ρόλος και η οικολογία των νιτροδοποιητικών αρχαίων και βακτηρίων. Παράλληλες έρευνες μελέτησαν την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως αγροτικές πρακτικές, εδαφολογικά χαρακτηριστικά (pH, περιεκτικότητα οργανικής ουσίας) στην δομή και λειτουργία των AOB και AOA αλλά και στους επιμέρους ρόλους τους στην νιτροποίηση *in situ* στο έδαφος (Avrahami et al, 2003 ; Nicol et al, 2008; Santoro et al, 2008; Shen et al, 2008). Μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στις επιδράσεις ανόργανων ρύπων όπως μέταλλα (Zn, Hg) στην κοινότητα των AOB και AOA (Li et al., 2009; Principi et al., 2009; Liu et al., 2010).

Αντίθετα ελάχιστες μελέτες έχουν εστιάσει στην εξακρίβωση πιθανών αρνητικών επιδράσεων γεωργικών φαρμάκων, που αποτελούν όπως έχει ειπωθεί σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης γεωργικής πρακτικής, στην κοινότητα αλλά και στην λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Έτσι, οι Li et al (2008) παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των AOB μόνο ύστερα από εφαρμογή 250 μg/g του ζιζανιοκτόνου acetochlor (200 φορές υψηλότερη της συνιστώμενης δόσης), ενώ σε ανάλογα πειράματα οι Chang et al (2001) κατέγραψαν μια αρνητική επίδραση ενός μίγματος ζιζανιοκτόνων τόσο στην λειτουργία της νιτροποίησης όσο και στην ποικιλότητα των AOB. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου simazine σε δόσεις 5 φορές της συνιστώμενης οδήγησαν σε αναστολή της νιτροποίησης και σημαντικές μεταβολές στην ποικιλότητα των AOB όχι όμως και των AOA (Hernandez et al, 2011).

Καμία μελέτη μέχρι σήμερα δεν υπάρχει στην διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με την επίδραση βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων στην συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα μικροοργανισμών. Αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας την κ.

Κωνσταντίνας Ρουσίδου έδειξαν ότι μεταξύ συνθετικών και μη συνθετικών νηματωδοκτόνων το βιολογικό σκεύασμα BIOACT[®] προκάλεσε σημαντικές μεταβολές τόσο στην σύσταση όσο και στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών με τις τελευταίες να έχουν εφήμερο χαρακτήρα. Έτσι σε συνέχεια των προηγούμενων ερευνών. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το μηχανισμό επίδρασης του βιολογικού νηματωδοκτόνου BIOACT[®] (*Paecilomyces lilacinus*) στην αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων AOB και AOA αλλά και εάν αυτή η επίδραση στον πληθυσμό συνεπάγεται και αντίστοιχη μείωση στην λειτουργία, την νιτροποίηση). Ειδικότερα αξιολογήθηκαν δύο υποθέσεις που θεωρήθηκε ότι μπορούν να εξηγήσουν την αρνητική επίδραση του BIOACT[®], έστω και πρόσκαιρη, στην αφθονία των AOB και AOA:

1) σε άμεσο ανταγωνισμό με τον μύκητα *Paecilomyces lilacinus* για χώρο και θρεπτικά στοιχεία είτε

2) σε έμμεσο ανταγωνισμό λόγω αύξησης ετερότροφων μικροοργανισμών (βακτηρίων ή μυκήτων) που ευνοούνται από την ελευθέρωση στο έδαφος γλυκόζης και σκόνης γάλακτος που περιέχονται σε ποσοστό 78% και 6% αντίστοιχα στο σκεύασμα BIOACT[®] που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Anastasiadis et al., 2008).

Οι πιθανές επιδράσεις του BIOACT[®] αλλά και των επιμέρους συστατικών του σκευάσματος δηλ. μύκητας και γλυκόζη και σκόνη γάλακτος στην αφθονία των AOA και AOB προσδιορίστηκαν με PCR πραγματικού χρόνου μέσω της μέτρησης του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στο έδαφος ενώ η επίδραση στην αντίστοιχη μικροβιακή λειτουργία, την νιτροποίηση, προσδιορίστηκε με την μέθοδο της δυναμικής νιτροποίησης.

Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν ότι και για τις δύο ομάδες νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, AOB και AOA, η εφαρμογή των συστατικών του σκευάσματος, γλυκόζης και σκόνης γάλακτος, οδήγησε σε μια παροδική μείωση της αφθονίας των AOB και AOA ίδια με αυτήν που προκλήθηκε από το ίδιο το σκεύασμα BIOACT[®]. Η αφθονία των AOB και AOA στις συγκεκριμένες μεταχειρίσεις επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα από τις 20 ημέρες και μετά. Παράλληλα, η εφαρμογή μόνο των σπορίων του μύκητα

P. lilacinus στέλεχος 251 στο έδαφος δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αφθονία των AOA και AOB σε σχέση με την μεταχείριση μάρτυρα. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν την δεύτερη υπόθεση ότι η κατανάλωση των εύκολα αφομοιώσιμων πηγών C και N (γλυκόζης και σκόνης γάλακτος αντίστοιχα) που περιέχονται στο σκεύασμα σε σημαντικά ποσοστά και ελευθερώνονται στο έδαφος με την εφαρμογή του σκευάσματος από τους ετερότροφους μικροοργανισμούς του εδάφους οδηγούν σε επικράτηση τους έναντι των AOB και AOA που χαρακτηρίζονται ως βραδέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί (Kowalchuk and Stephen 2001; Schleper and Nicol 2010). Η εξάντληση των οργανικών υποστρωμάτων που περιέχονται ως πρόσθετα στο σκεύασμα του BIOACT[®] είναι πιθανό να οδήγησε σε σταδιακή μείωση του πληθυσμού των ετερότροφων μικροοργανισμών και αντίστοιχη ανάκαμψη των λιγότερο ανταγωνιστικών στο εδαφικό οικοσύστημα AOA.

Από την άλλη μεριά, η απουσία κάποιας επίδρασης στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών όταν εμβολιάστηκαν στο έδαφος μόνο σπόρια του μύκητα στην συνιστώμενη δόση, δεν συμφωνούν με την υπόθεση της ύπαρξης άμεσου ανταγωνισμού μεταξύ του μύκητα και των AOA/AOB.

Στον αντίποδα, έχει βρεθεί ότι 6-8 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* 251 στο έδαφος, τα επίπεδά του μειώνονται και φτάνουν στα 102-103 κύτταρα ανά γραμμάριο εδάφους, δηλαδή στα φυσιολογικά επίπεδα που βρίσκεται ο συγκεκριμένος μύκητας στο έδαφος (Roumpou,2005).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της δυναμικής νιτροποίησης στις διάφορες μεταχειρίσεις έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου. Έτσι και πάλι η εφαρμογή των συστατικών του BIOACT[®] γλυκόζης και σκόνης γάλακτος ή του ίδιου του σκευάσματος οδήγησε σε μια παροδικά χαμηλότερη δυναμική νιτροποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή ενώ αντίθετα στις ίδιες μεταχειρίσεις η δυναμική νιτροποίηση ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τον μάρτυρα στις 20 ημέρες. Τα επίπεδα δυναμική νιτροποίησης στις δύο αυτές μεταχειρίσεις επέστρεψαν σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα στις 45 ημέρες μετά την εφαρμογή. Αντίθετα η εφαρμογή των σπορίων και μόνο του μύκητα δεν διαφοροποίησε την δυναμική νιτροποίηση του εδάφους σε σχέση με τον μάρτυρα σε καμία περίπτωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα

επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου και δείχνουν ότι η παροδική μείωση της αφθονίας των AOA/AOB που προκαλείται από τα συνέκδοχα του σκευάσματος BIOACT[®] και όχι από τον μύκητα οδηγεί και σε ανάλογη παροδική μείωση της ικανότητας νιτροποίησης.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα εργασία προσφέρουν σημαντικές νέες πληροφορίες για την επίδραση των βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στην ομάδα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών που αποτελούν δείκτες 'υγείας' και λειτουργίας των εδαφικών οικοσυστημάτων. Επιπλέον τα ευρήματα αυτή της μελέτης επιβεβαιώνουν την δυναμική και αυξημένη αναλυτική δυνατότητα που προσδίδουν τα νέα μοριακά εργαλεία καθώς χωρίς την χρήση τους και με την εφαρμογή μόνον μετρήσεων που στηρίζονται στην καταμέτρηση πληθυσμών σε καλλιέργειες ή στην μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας δεν θα ήταν δυνατή η διευκρίνιση των αιτίων της προσωρινής αρνητικής επίδρασης του BIOACT[®] στην κοινότητα και την λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anastasiadis IA, Giannakou IO, Prophetou-Athanasiadou DA, Gowen SR, The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus* with various practices for the control of root-knot nematodes, *Crop Protection* 27 (2008), 352-361.

Arp DJ, Sayabedra-Soto LA, Hommes NG, Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*, *Arch Microbiol* 178 (2002), 250-255.

Auguet J-C, Casamayor EO, A hotspot for cold Crenarchaeota in the neuston of high Mountain lakes, *Environ Microbiol* 10 (2008), 1080-1086.

Avrahami S, Conrad R, Braker G, Effects of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers, *Appl Environ Microbiol* 68 (2002), 5685–5692.

Becker S, Boger P, Oehlmann R & Ernst A, PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities, *Appl Environ Microbiol* 66 (2000), 4945-4953.

Beman JM, Popp BN, Francis CA, Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California, *ISME J* 2 (2008), 429–441.

Berg P, Rosswall T, Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils, *Biol Fertil Soils*, 1 (1985), 31-140.

Bothe H, Jost G, Schlöter M, Ward BB, Witzel K-P Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments, *FEMS Microbiol Rev* 24 (2000), 673–690.

Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P, Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6 (2008), 245-252.

Burton SAQ, Prosser JI, Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis, *Appl Environ Microbiol* 67 (2001), 2952–2957.

Cabanillas E, Barker KR, Nelson LA, Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* and their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato, *Journal of Nematology* 21 (1989), 164-172.

Calvo L, Garcia-Gil LJ, Use of amoB as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria, *J Microbiol Methods* 57 (2004), 69–78.

Carriger JF, Rand GM, Gardinali PR, Perry WB, Tompkins MS, Fernandez AM, Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida Canals: An ecological risk prioritization for aquatic arthropods, *Soil Sed Contam* 15 (2006), 21–45.

Chain P, Lamerdin J, Larimer F et al Complete genome sequence of the ammonia oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 185 (2003), 2759–2773.

Chang Y-J, Hussain AKMA, Stephen JR, Mullen M.D., White DC & Peacock A. (2001) Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia oxidizer communities in soil microcosm. *Environ Toxicol Chem* 20: 2462-2468.

Chen SK, Edwards CA, A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: Comparison of two soil types, *Soil Biol Biochem* 33 (2001), 1981–1991.

Cindy J. Smith, A. Mark Osborn, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology, *FEMS Microbiol Ecol* 67 (2009), 6-20.

Das AC, Mukherjee D, Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients, *Appl Soil Ecol* 14 (2000a), 55–62.

Das AC, Mukherjee D, Influence of insecticides on microbial transformation of nitrogen and phosphorus in Typic Ochragualf soil, *J Agric Food Chem* 48 (2000b), 3728–3732.

De la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Könneke M, Stahl DA Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol, *Environ Microbiol* 10 (2008), 810–818.

DeLong EF, Archaea in coastal marine environments, *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992), 5685-5689.

DeLong EF, Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles', *Curr Opin Gen Dev* 8 (1998), 649-654.

Demanou J, Monkiedje A, Njine T, Foto SM, Nola M, Serges H, Togouet Z, Kemka N, Changes in soil chemical properties and microbial activities in response to the fungicide Ridomil gold plus copper. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 1 (2004), 26–34.

Dorador C, Microbial diversity in high altitude wetlands of the Chilean altiplano: phylogeny, diversity and function, Thesis, University of Kiel, Kiel, 2007.

ΕΚΠΑΑ, Η Κατάσταση του Περιβάλλοντος, Μια Συνοπτική Έκθεση, Εθνικό Κέντρο Περιβάλλοντος και Αειφόρου Ανάπτυξης, UNEP/MAP, ΥΠΕΧΩΔΕ, Αθήνα 2001, available at www.ekpaa.gr/documents/NCESD-GR_report20012003.pdf.

Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W, Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea, *FEMS Microbiol Rev* 33 (2009), 855-869.

Fliessbach A, Mader P, Short- and long-term effects on soil microorganisms of two potato pesticide spraying sequences with either glufosinate as defoliant, *Biol Fertil Soils* 40 (2004), 268–276.

Fortuna A, Harwood RR, Robertson GP, Fisk JW, Paul EA, Seasonal changes in nitrification potential associated with application of N fertilizer and compost in maize systems of southwest Michigan, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 97(2003) 285-293.

Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB, Ubiquity and diversity of Ammonia oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean, *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005), 14683–14688.

Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA, Novel major archaeobacterial group from marine plankton, *Nature* 356 (1992), 148-149.

Gieseke A, Tarre S, Green M, de Beer D, Nitrification in a biofilm at low pH values: role of in situ microenvironments and acid tolerance, *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), 4283–4292.

Gopal M, Gupta A, Arunachalam V, Magu SP, Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities, *Biores Technol* 98 (2007), 3154–3158.

Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N et al, Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006b), 18296-18301.

Haney RL, Senseman SA, Hons FM, Zuberer DA, Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass, *Weed Sci* 48 (2000), 89–93.

Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, Francis CA, Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile, *Appl Environ Microbiol* 74 (2008), 1620–1633.

Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IM, Garrett VM, Hawkins SA, Robinson KG, Sayler GS, Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant, *Environ Sci Technol* 37 (2003), 343-351.

Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M, A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring, *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), 2134–2139.

Head IM, Hiorns WD, Embley TM, McCarthy AJ, Saunders JR, The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences, *J Gen Microbiol* 139 (1993), 1147–1153.

Hernández M, Jia Z, Conrad R & Seeger M Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 78 (2011), 511-519.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc National Acad Sci USA* 88 (1991), 7276-7280.

Hollibaugh JT, Bano N, Ducklow HW, Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia oxidizing bacteria, *Appl Environ Microbiol* 68 (2002), 1478-1484.

Hussain S, Arshad M, Saleem M, Khalid A, Biodegradation of a- and b-endosulfan by soil bacteria, *Biodegradation* 18 (2007a), 731–740.

Hussain S, Arshad M, Saleem M, Zahir ZA, Screening of soil fungi for in vitro degradation of endosulfan, *World J Microbiol Biotechnol* 23 (2007b), 939–945.

Ingram CW, Coyne MS, Williams DW, Effects of commercial diazinon and imidacloprid on microbial urease activity in soil, *J Environ Qual* 34 (2005), 1573–1580.

Ipsilantis I, Samourelis C, Karpouzas DG, The impact of botanical pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45 (2011), 147-155.

Jana TK, Debnath NC, Basak RK, Effect of insecticides on decomposition of organic matter, ammonification and nitrification in a fluventic Ustochrept, *J Indian Soc Soil Sci* 46 (1998), 133–134.

Jetten MSM, New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems, *Plant and Soil* 230 (2001), 9-19

Jiang H, Dong H, Yu B, Lv G, Deng S, Berzins N, Dai M, Diversity and abundance of ammonia oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China, *Geomicrobiology J* 26 (2009), 199–211.

Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Pesticides effects on bacterial diversity in agricultural soils—A review *Biol Fertil Soils* 33 (2001), 443–453.

Junier P, Kim OS, Hadas O, Imhoff JF, Witzel KP, Evaluation of PCR primer Selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples, *Appl Environ Microbiol* 74 (2008), 5231–5236.

Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, PommereningRöser A, Koops HP, Wagner M, Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Appl Environ Microbiol* 64 (1998), 3042–3051.

Kandeler E, Schinner F, Ohlinger R, Margesin R, *Methods in Soil Biology*, Heidelberg 1995, 146-149.

Karner MB, DeLong EF, Karl DM, Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409 (2001), 507–510.

Khan A, Williams K, Nebalain H, Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production, *FEMS Microbiology Letters* 227 (2003), 107-111.

Kiewnick S, Effect of temperature on growth, germination, germ-tube extension and survival of *Paecilomyces lilacinus* strain 251, *Biocontrol Science and Technology* 16(5) (2006), 535-546.

Kinney CA, Mandernack KW, Mosier AR, Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil, *Soil Biol Biochem* 37 (2005), 837–850.

Klose S, Ajwa HA, Enzymes activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives, *Soil Biol Biochem* 36 (2004), 1625–1635.

Klotz MG, Arp DJ, Chain PS et al, Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707, *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), 6299–6315.

Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA, Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon, *Nature* 437 (2005), 543–546.

Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Röser A, Timmermann G, Wagner M, The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes*, Springer (2003), New York

Kowalchuk GA, Stephen JR, Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology, *Annu Rev Microbiol* 55 (2001), 485–529.

Kumar M, Philip L, Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for

complete mineralization of endosulfan, *J Environ Sci Health B* 41 (2006), 81–96.

Lebedeva EV, Alawi M, Fiencke C, Namsaraev B, Bock E, Spieck E Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone, *FEMS Microbiol Ecol* 54 (2005), 297–306.

Leininger S, Urich T, Schloter M et al, Archaea predominate among ammonia oxidizing prokaryotes in soils, *Nature* 442 (2006), 806–809.

Levičnik-Höfferle Š, Nicol GW, Ausec L, Mandić-Mulec I, Prosser JI (2011), Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen, *Fems Microbiology Ecology*: In press (DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01275.x).

Li X, Zhang H, Wu M, Su Z, Zhang C, Impact of acetochlor on ammonia oxidizing bacteria in microcosm soils. *Journal of Environmental Sciences* 20 (2008), 1126-1131.

Li X, Zhu Y-G, Cavagnaro T.R., Chen M, Shun J, Chen X, Qiao M, Do ammonia-oxidizing archaea respond to soil Cu contamination similarly as ammonia-oxidizing bacteria? *Plant Soil* 324 (2009), 209-217.

Littlefield-Wyer JG, Brooks P, Katouli M, Application of biochemical fingerprinting and fatty acid methyl ester profiling to assess the effect of the pesticide Atradox on aquatic microbial communities, *Environ Pollut* 153 (2008), 393–400.

Mahía J, Cabaneiro A, Carballas T, Dí'az-Ravín a M, Microbial biomass and C mineralization in agricultural soils as affected by atrazine addition, *Biol Fertil Soils* 45 (2008), 99–105.

Malecha MA, Tarigopula S, Malecha MJ, Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* keratitis in a patient with a history of herpes simplex

virus keratitis, *Cornea* 25(10) (2006), 1240-1242.

McCaig AE, Embley TM, Prosser JI, Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers, *FEMS Microbiol Lett* 120 (1994), 363–367.

McTavish H, Fuchs JA, Hooper AB, Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*, *J Bacteriol* 175 (1993), 2436-2440.

Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, Preston C, Karl DM, DeLong EF, Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre, *Environ Microbiol* 9 (2007), 1162–1175.

Niewiadomska A, Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pretense* L), *Pol J Environ Stud* 13 (2004), 403–410.

Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI, The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria, *Environ Microbiol* 10 (2008), 2966–2978

Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG, Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia oxidizing bacteria, *Arch Microbiol* 177 (2002), 139–149.

Norton JM, Klotz MG, Stein LY et al, Complete genome sequence of *Nitrosospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment, *Appl Environ Microbiol* 74 (2008), 3559–3572.

Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, Bonch-Osmolovskaya L, Schleper C, Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR, *Environ Microbiol* 5 (2003), 787-797.

Ogram A, Sayler GS, Barkay T, The extraction and purification of microbial DNA from sediments, *Journal of Microbiological Methods* 7 (1987), 57-66.

Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM et al, Application of real-time PCR to

study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil, *Appl Environ Microbiol* 70 (2004), 1008–1016.

O'Mullan GD, Ward BB, Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California, *Appl Environ Microbiol* 71 (2005), 697–705.

Pamela Principi, Federica Villa , Barbara Giussani, Elisabetta Zanardini, Francesca Cappitelli and Claudia Sorlini, The Effect of Copper on The Structure of the Ammonia-Oxidizing Microbial Community in an Activated Sludge Wastewater Treatment Plant. *Microbial Ecology* 57 (2009), 215-220.

Pampulha ME, Oliveira A, Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms, *Curr Microbiol* 53 (2006), 238–243.

Park S-J, Park B-J, Rhee S-K, Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and *amoA* genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments, *Extremophiles* 12 (2008), 605-615.

Penton CR, Devol AH, Tiedje JM, Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments, *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), 6829–6832.

Perreault NN, Andersen DT, Pollard WH, Greer CW, Whyte LG, Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic, *Appl Environ Microbiol* 73 (2007), 1532-1543.

Phillips CJ, Smith Z, Embley TM, Prosser JI, Phylogenetic differences between particle associated and planktonic ammonia oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in the northwestern Mediterranean Sea, *Appl Environ Microbiol* 65 (1999), 779–786.

PF Donald, RE Green, MF Health, Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations, *Proc R Soc London (B)* 268 (2001) 25-29.

Pimentel D, Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics, *J Agric Environ Ethics* 8 (1995), 17–29.

Prosser JL, Embley TM, Cultivation-based and molecular approaches to characterization of terrestrial and aquatic nitrifiers, *Antonie Van Leeuwenhoek* 81 (2002), 165-179.

Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops H-P, Wagner M, Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, *Appl Environ Microbiol* 66 (2000), 5368–5382.

Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening-Röser A, Koops HP, 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the *Nitrosomonas*, *Int J Syst Evol Microbiol* 53 (2003), 1485–1494.

Reigstad LJ, Richter A, Daims H, Urich T, Schwark L, Schleper C, Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka, *FEMS Microbiol Ecol* 64 (2008), 167–174.

Rotthauwe J-H, Witzel K-P, Liesack W, The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations, *Appl Environ Microbiol* 63 (1997), 4704–4712.

Santoro AE, Francis CA, De Sieyes NR, Boehm AB, Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary, *Environ Microbiol* 10 (2008), 1068–1079.

Sameh S, Fabrice ML, Nadine R, Silvio G, Diederik VT, Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities, *Pest Manag Sci* 63 (2007), 269–275.

Schleper C, Nicol GW, Ammonia Oxidizing Archaea: Genomes, Physiology and Ecology. *Advances in Microbial Physiology*. 57 (2010), 1-41.

Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB, He JZ, Abundance and composition

of ammonia oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam, *Environ Microbiol* 10 (2008),1601–1611.

Siddique T, Okeke BC, Arshad M, Frankenberger WT Jr, Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms, *J Environ Qual* 32 (2003), 47–54.

Singh BK, Walker A, Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiol Rev* 30 (2006), 428–471.

Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF & Osborn AM, Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments, *Appl Environ Microbiol* 73 (2007), 3612-3622.

Spyrou IM, Karpouzas DG, Menkissoglu-Spiroudi U, Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 58(4) (2009), 715-727.

Stein LY, Arp DJ, Berube PM et al, Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation, *Environ Microbiol* 9 (2007), 2993–3007.

Stubner S, Enumeration of 16S rRNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real time PCR with SybrGreen detection, *J Microbiol Methods* 50 (2002), 155-164.

Suzuki MT, Taylor LT & DeLong EF, Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes. In mixed microbial populations via 5'-nuclease assays, *Appl Environ Microbiol* 66 (2000), 4605-4614.

Takai K, Horikoshi K, Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes, *Appl Environ Microbiol* 66 (2000), 5066- 5072.

Tamegai H, Aoki R, Arakawa S, Kato C, Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: genes for

nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA, *Extremophiles* 11 (2007), 269–275.

Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA, Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, *J Bacteriol* 176 (1994), 6623-6630.

Torsvik VL, Isolation of bacterial DNA from soil, *Soil Biology and Biochemistry* 12 (1980), 15-21.

Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI, Growth, activity and emperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms, *Environ Microbiol* 10 (2008), 1357–1364.

Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C, Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling, *Environ Microbiol* 7 (2005), 1985–1995.

Tyess DL, Shea PJ, Parkhurst AM, Mineralization potential of atrazine and degradation intermediates from clustered characteristics in inoculated soils, *Soil Sed Contam* 15 (2006), 87–102.

Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, Tsuneda S, Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems, *Appl Environ Microbiol* 74 (2008), 894-900.

Van Dijk, Biodiversity and multifunctionality in European agriculture: priorities, current initiatives and possible new directions, Paper presented at the ECNC seminar in Brussels in March 2001, Geneva, UNEP-ROE.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF et al, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science* 304 (2004), 66–74.

Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms, *ISME Journal* 5 (2011), 1067-1071.

Wang MC, Gong M, Zang HB, Hua XM, Yao J, Pang YJ, Yang YH, Effect of methamidophos and urea application on microbial communities in soil as determined by microbial biomass and community level physiological profiles, *J Environ Sci Health B* 41 (2006), 399–413.

Wang J, Lu Y, Shen G, Combined effects of cadmium and butachlor on soil enzyme activities and microbial community structure, *Environ Geol* 51 (2007), 1093–1284.

Wardle DA, Nicholson KS, Rahman A, Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter, *NZ J Agric Res* 37 (1994), 29–39.

Wickramasinghe S, Borin M, Kotagama SW, Cochard R, Anceno AJ, Shipin OV, Multi functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol Eng* 35 (2009), 898-907.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *BioTechniques* 22 (1997), 130-138.

Yu-Rong Liu, Yuan-Ming Zheng, Ju-Pei Shen, Li-Mei Zhang, Ji-Zheng He, Effects of mercury on the activity and community composition of soil ammonia oxidizers. *Environmental Science and Pollution Research* 17 (2010), 1237-1244.

Y.R. Hoogeveen, J.E. Petersen, P. Gabrielsen, Agriculture and Biodiversity in Europe, Background report to the High-Level European Conference on Agriculture and Biodiversity, 5-7 June 2001, Paris, STRA-CO/ AGRI, Council of Europe/UNEP.

Zhou Y, Liu W, Ye H, Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aqisols, II. Soil respiration Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 17 (2006), 1305–1309.

www.minagric.gr

www.efsa.europa.eu

www.epa.gov