



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro μελέτη της επίδρασης των μεταβολικών
προϊόντων του αντιοξειδωτικού ethoxyquin
(EQ) σε νιτροδοποιητικά βακτήρια

ΜΠΑΧΤΣΕΒΑΝΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

In vitro μελέτη της επίδρασης των μεταβολικών προϊόντων του αντιοξειδωτικού ethoxyquin (EQ) σε νιτροδοποιητικά βακτήρια

In vitro study on the effect of the metabolic products of the antioxidant ethoxyquin (EQ) on ammonia-oxidizing bacteria.

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαθθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• Πρόλογος.....	4
• Συντομογραφίες.....	5
• Περίληψη.....	6
• Abstract.....	8
• Κεφάλαιο 1.....	10
1.1 Κύκλος αζώτου.....	10
1.2 Νιτροποίηση.....	13
1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης.....	13
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση.....	14
1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB).....	14
1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA).....	16
1.2.2.3 Comammox.....	19
1.2.2.4 Anammox.....	20
1.2.2.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)	21
1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης.....	22
1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ).....	23
1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση.....	29
1.5 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια που μελετήθηκαν	31
1.5.1 <i>Nitrosomonas europaea</i>	31
1.5.2 <i>Nitrospira multiformis</i>	33
1.6 Στόχοι.....	34
Κεφάλαιο 2.....	35
2. Πειραματικό μέρος.....	35
2.1 Καλλιέργεια στελεχών AOB <i>in vitro</i>	35
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός	35
2.3 Μελέτη της επίδρασης στη λειτουργία των AOB.....	37
2.4 Απομόνωση DNA από τα κύτταρα των AOB	37
2.5 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB (qPCR).....	38
2.6 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες.....	39
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	40
• Κεφάλαιο 3.....	41
3. Αποτελέσματα	41
3.1 Επίδραση ethoxyquin στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια.....	41
3.1.1 Επίδραση του Ethoxyquin στο στέλεχος του <i>Nitrosomonas europaea</i>	41
3.1.2 Επίδραση του Ethoxyquin στο στέλεχος του <i>Nitrospira multiformis</i>	44
3.2 Επίδραση του Quinone imine (QI) στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια	47
3.2.1 Επίδραση του QI στο στέλεχος του <i>Nitrosomonas europaea</i>	47
3.2.2 Επίδραση του QI στο στέλεχος του <i>Nitrospira multiformis</i>	49
3.3 Επίδραση του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια.....	51
3.3.1 Επίδραση του EQNL το στέλεχος του <i>Nitrosomonas europaea</i>	51

3.3.2 Επίδραση του EQNL στο στέλεχος του <i>Nitrosospira multiformis</i>	54
• Κεφάλαιο 4.....	56
4.1 Συζήτηση.....	56
4.2 Συμπέρασμα.....	58
• Κεφάλαιο 5.....	59
5. Βιβλιογραφία.....	59

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα για την καθοδήγηση, επίβλεψη και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Ευαγγελία Παπαδοπούλου για την αμέριστη βοήθεια, στήριξη και παροχή γνώσεων σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος για την άψογη συμπεριφορά τους και την προσφορά κάθε είδους βοήθειας όταν χρειάστηκε.

Τέλος ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Πρόεδρο του τμήματος, κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας μέσω της συμμετοχής τους στην τριμελή επιτροπή.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΟΒ	Νιτρωδοποιητικά βακτήρια
ΑΟΑ	Νιτρωδοποιητικά αρχαία
ΝΟΒ	Νιτρικοποιητικά βακτήρια
ΑΜΟ	Μονοξυγενάση της αμμωνίας
ΗΑΟ	Οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης
ΝΧΡ	Νιτρώδης οξειδοαναγωγή
ΠΝ	Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
ΒΠΝ	Βιολογικοί Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
ΣΠΝ	Συνθετικοί Παρεμποδιστές Νιτροποίησης
ΕQ	1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline (ethoxyquin)
QI	2,6-Dihydro-2,2, 4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine)
EQNL	2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline
NP	Nitrapyrin
DCD	Dicyandiamide
qPCR	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction)
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
LOQ	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νιτροποίηση αποτελεί τη ρυθμο-καθοριστική διεργασία του κύκλου του αζώτου (N) και πραγματοποιείται σε δύο στάδια από νιτροδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB) ή αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea: AOA) (NH_3 προς NO_2^- «Νιτροδοποίηση») και νιτρικοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) (NO_2^- προς NO_3^- , «Νιτρικοποίηση»). Πρόσφατα βρέθηκε ότι βακτήρια του γένους *Nitrospira* sp. (μέχρι πρότινος γνωστά ως NOB), που απομονώθηκαν από υδάτινα οικοσυστήματα, έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης και ονομάστηκαν **Comammox (Complete-ammonia-oxidation)**. Τα βακτήρια αυτά φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένα στο έδαφος, ωστόσο άγνωστος παραμένει ο πραγματικός οικολογικός τους ρόλος στον κύκλο του αζώτου στα εδαφικά οικοσυστήματα.

Διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N έχουν αναπτυχθεί στις μέρες μας με στόχο την ταυτόχρονη αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά και την ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (NO_3^- , N_2O) από τα αγρο-οικοσυστήματα και κατ'επέκταση των ανεπιθύμητων περιβαλλοντικών επιπτώσεων που αυτές συνεπάγονται (ρύπανση υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και ατμόσφαιρας, αντίστοιχα). Μια από τις τεχνολογίες αυτές είναι η εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης (ΠΝ). Οι ΠΝ είναι ενώσεις που παρεμποδίζουν τη βιολογική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικό άζωτο. Οι περισσότεροι από τους διαθέσιμους ΠΝ δρουν κυρίως εναντίον των AOB, ενώ η δράση τους έναντι των AOA είτε δεν έχει μελετηθεί ακόμα, είτε είναι περιορισμένη, γεγονός που καθιστά αμφίβολη την αποτελεσματικότητά τους.

Το ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl quinoline) είναι μια αντιοξειδωτική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό στη βιομηχανία κρεάτων και ψαριών αλλά και στα συσκευαστήρια φρούτων για τη προστασία των μήλων από τη φυσιολογική τους αλλοίωση. Προηγούμενες μελέτες μικροκόσμων εδάφους έδειξαν πως το EQ στο έδαφος μεταβολίζεται ταχύτατα προς το μη υπολειμματικό 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinoneimine (quinone imine QI) (κύριος μεταβολίτης) και το έμμοιο 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) (δευτερεύων μεταβολίτης), με το πρώτο (QI) να προκαλεί προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης. Ακόλουθες *in vitro* μελέτες της επίδρασης του EQ σε αντιπροσωπευτικά εδαφογενή στελέχη των AOB (*Nitrosomonas europaea* και *Nitrospira multiformis*) κατέδειξαν αναστολή της αύξησης και της λειτουργίας των επιλεγμένων στελεχών των AOB σε επίπεδα συγκεντρώσεων 460 μM , που συνέπεσαν με το σχηματισμό του μεταβολίτη QI στις υγρές καλλιέργειες.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να διευκρινίσει τα επίπεδα στα οποία επιτυγχάνεται ικανοποιητική αναστολή από τα μεταβολικά προϊόντα του EQ, QI και EQNL στα AOB. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε *in vitro* η ανασταλτική δράση των QI (0,27-540 μM) και EQNL (0,5-500 μM) στην αύξηση (q-PCR - αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB) και τη λειτουργία (παραγωγή και συσσώρευση NO_2^-) δυο αντιπροσωπευτικών εδαφογενών AOB, *Nitrosomonas europaea* και *Nitrospira multiformis*, σε σχέση με δυο γνωστούς ΠΝ ευρείας εφαρμογής, τους nitaryrin (NP) (50 μM) και dicyandiamide (DCD) (10mM).

Παράλληλα, μελετήθηκε η πορεία της διάσπασης των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες προκειμένου, να ελεγχθεί η σταθερότητα των ουσιών αυτών σε ασηπτικές *in vitro* συνθήκες και να αναδειχθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των μεταβολιτών και των παρατηρούμενων μεταβολών στην αφθονία και τη λειτουργία των AOB.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το QI παρουσίασε σημαντικά ισχυρότερη ανασταλτική δράση από το EQNL, παρά την μικρότερη υπολειμματικότητα του, αναστέλλοντας σημαντικά την αύξηση και τη λειτουργία των μελετούμενων στελεχών AOB, *N. europaea* και *N. multiformis*, σε συγκεντρώσεις $\geq 270\mu\text{M}$ και $\geq 135\mu\text{M}$, αντίστοιχα. Αντίθετα, το EQNL προκάλεσε πλήρη αναστολή της νιτρωδοποίησης μόνο στην περίπτωση του *N. multiformis* και μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση εφαρμογής του (500 μM). Οι γνωστοί ΠΝ nitraryrin και DCD παρότι προκάλεσαν μείωση της νιτρωδοποιητικής δραστηριότητας και των δυο στελεχών των AOB που μελετήθηκαν, επηρέασαν μόνο προσωρινά την αφθονία τους. Το στέλεχος του *N. multiformis* επέδειξε γενικά μεγαλύτερη ευαισθησία στις μελετούμενες ουσίες σε σχέση με το *N. europaea*.

Συμπερασματικά η επίδραση του EQ στη νιτρωδοποίηση φαίνεται να οφείλεται στο σχηματισμό του κύριου μεταβολίτη QI, ο οποίος και φαίνεται να ασκεί σημαντική ανασταλτική επίδραση στα AOB, που είναι ισοδύναμη ή ισχυρότερη σε σχέση με αυτή των ευρέως χρησιμοποιούμενων ΠΝ nitraryrin και DCD. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη ανασταλτική δράση του ethoxyquin (EQ), και των μεταβολικών του προϊόντων του (QI, EQNL) και στις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτρωδοποίηση (AOA και Commox) μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός νέου, καθολικού και αποτελεσματικού ΠΝ.

ABSTRACT

Nitrification is the rate-limiting step of the nitrogen cycle (N) and is carried out in two steps by Ammonia Oxidation Bacteria (AOB) or Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) (NH_3 to NO_2^- "Nitrating") and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (NO_2^- to NO_3^- , "Nitriting"). It has recently been found that bacteria of the genus *Nitrospira sp.* (previously known as NOB), which were isolated from aquatic ecosystems, have the ability to carry out both steps of the nitrification process and were named Comammox (**Complete-ammonia-oxidation**). This new guild appears to be ubiquitous in soil, however, their true ecological role in N cycling in terrestrial ecosystems remains unknown.

Several technologies controlling the rate of the soil processes in the N cycle have been developed nowadays and aim to increase the efficiency of N use, and reduce N losses (NO_3^- , N_2O) from agricultural ecosystems, minimizing thus potentially undesirable environmental effects such as groundwater and atmosphere contamination, respectively. One of these technologies is the application of nitrification inhibitors (NI). NI are compounds that inhibit the biological oxidation of ammonia to nitrate. Most of the available NIs have shown a selective inhibitory activity towards AOB, while their impact on AOA is either limited or unknown, making their efficacy questionable.

Ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline) is an antioxidant that is widely used as a preservative in the meat and fish industry as well as in fruit packaging industry to protect apples from their physiological deterioration. Previous studies have shown that EQ in soil is rapidly oxidized to the less persistent 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine: QI) (main metabolite) and the persistent 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (secondary metabolite), with the first being mainly responsible for the transient inhibition of nitrification. Following *in vitro* studies on the effect of EQ on representative soil AOB strains (*Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira multiformis*) demonstrated inhibition of growth and function in the selected AOB strains at a concentration of 460 μM which coincided with the formation of the QI in liquid cultures.

The main aim of the present study is to investigate the range of inhibition of the oxidation derivatives of EQ, QI and EQNL, on AOB. For this purpose, we studied *in vitro* the inhibitory effect of both QI (0.27-540 μM) and EQNL (0.5-500 μM) on the growth (q-PCR-abundance of the *amoA* gene of AOB) and functional activity (NO_2^- production and accumulation) of representative soil strains of AOB, *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira multiformis*, in comparison with two known and heavily used NIs, nitapyrin (50 μM) and dicyandiamide (DCD) (10mM). The dissipation of QI and EQNL in the liquid cultures of AOB was determined in parallel, to test the stability of these substances under *in vitro* sterile conditions, and to highlight possible correlations between the persistence of EQ derivatives and the observed inhibitory effects. According to the results of these studies, QI showed a stronger inhibitory effect than EQNL, despite its lower residual and significantly inhibited the growth and function on *N. europaea* and *N. multiformis* at concentrations $\geq 270 \mu\text{M}$ and $\geq 135 \mu\text{M}$, respectively. In contrast, EQNL caused complete inhibition of nitrification only in the case of

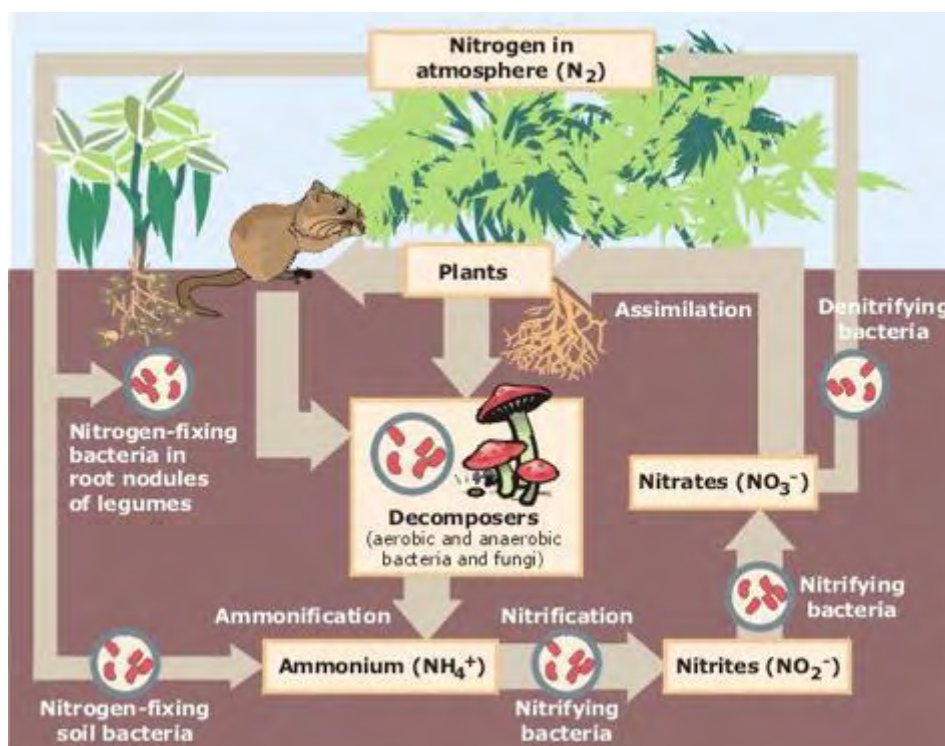
N. multiformis and at its maximum concentration (500 μM). The widely used NIs, nitrapyrin and DCD, induced significant reductions in the nitrification activity of both AOB strains and temporarily affected their growth. *N. multiformis* was consistently more sensitive than *N. europaea* to the chemicals tested.

In conclusion, the effect of EQ on nitrification seems to be a function of the formation of QI, which appears to exert a strong inhibitory effect on AOB which is equivalent or even higher than the effects of the widely used NIs, nitrapyrin and DCD. Further studies will look into the inhibitory effect of EQ and its derivatives on other groups of microorganisms participating in the nitrification process (AOA, Commamox, NOB) with final aim the development of a new, universal and effective NI.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Κύκλος Αζώτου

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα βασικότερα στοιχεία για την ανάπτυξη και την αύξηση των οργανισμών, καθώς είναι το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων [1]. Ταυτόχρονα είναι το κυριότερο συστατικό της ατμόσφαιρας καταλαμβάνοντας το 80% του συνολικού όγκου της ατμόσφαιρας όπου απαντάται με τη μορφή μοριακού αζώτου (N_2). Ωστόσο η αέρια μορφή του αζώτου (N_2) δεν μπορεί να απορροφηθεί από την πλειοψηφία των οργανισμών. Έτσι, απαιτείται η μετατροπή του σε άλλες αζωτούχες ενώσεις, όπως αμμωνία (NH_3), νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) και νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να προσληφθούν από τα φυτά και κατ'έπείταση, μέσω της τροφικής αλυσίδας, από τους υπόλοιπους οργανισμούς [2]. Ο κύκλος του αζώτου και οι μετατροπές που υφίσταται στο περιβάλλον οφείλονται σε βιοτικές διεργασίες (Εικόνα 1) [2].

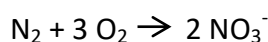
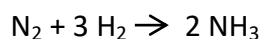


Εικόνα 1. Ο κύκλος του αζώτου. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitrogen_Cycle.svg

Οι βασικότερες από αυτές τις βιοτικές μετατροπές του αζώτου στο περιβάλλον είναι:

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση/Ανοργανοποίηση
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση

Η **αζωτοδέσμευση** είναι η μετατροπή του ατμοσφαιρικού μοριακού αζώτου (N₂) σε άλλες αζωτούχες ενώσεις (αμμωνία, νιτρώδη ιόντα, νιτρικά ιόντα). Διακρίνονται δύο τύποι αζωτοδέσμευσης: η φυσική και η βιολογική. Στη φυσική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμοσφαιράς ενώνεται είτε με το υδρογόνο των υδρατμών, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα:

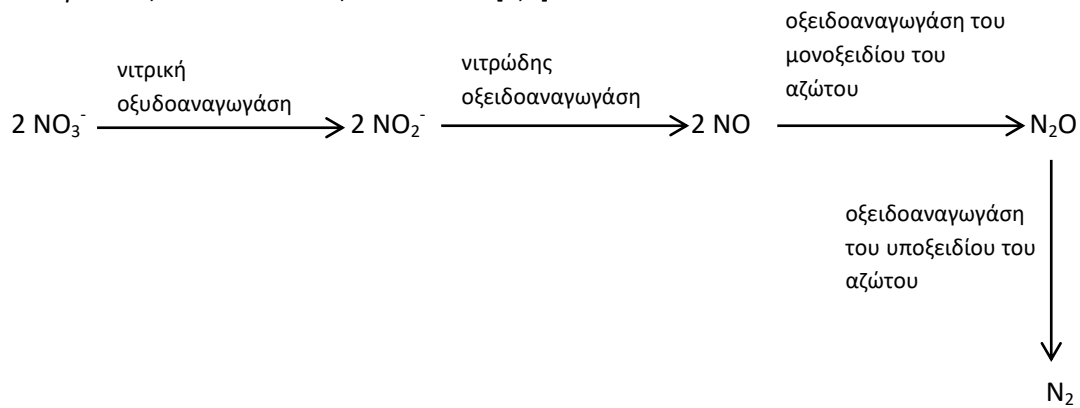


Η πραγματοποίηση αυτών των χημικών αντιδράσεων απαιτεί ενέργεια, η οποία παρέχεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (κεραυνοί). Οι αζωτούχες ενώσεις που παράγονται λόγω της υδατοδιαλυτότητας, που τις χαρακτηρίζει, μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος, απ'όπου στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα φυτά. Ο τύπος αυτός της αζωτοδέσμευσης συνεισφέρει μόνο το 10% της αμμωνίας και των νιτρικών ιόντων που μεταφέρονται στα οικοσυστήματα [2], ενώ το υπόλοιπο 90% των αζωτούχων αυτών ενώσεων προέρχεται από τη βιολογική αζωτοδέσμευση. Η **βιολογική αζωτοδέσμευση** είναι η διεργασία κατά την οποία ορισμένοι μικροοργανισμοί δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και το μετατρέπουν σε αμμωνία. Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν είναι ελεύθερα ζώντα βακτήρια, που ανήκουν σε διάφορα γένη όπως *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Azococcus* αλλά και *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, και συμβιωτικά βακτήρια, των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, καθώς και ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia*. Η ενέργεια που απαιτείται για τη βιολογική αζωτοδέσμευση παρέχεται στους ελεύθερους μικροοργανισμούς από την αναπνοή με τη διάσπαση της γλυκόζης και στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς από υδατάνθρακες προερχόμενους από το φυτό με το οποίο συμβιώνουν [1,2].

Η **αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση** είναι η διαδικασία μετατροπής οργανικών ενώσεων σε αμμωνία από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Το άζωτο είναι ένα από τα στοιχεία που συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην οργανική ύλη, είτε στα περιττώματα των ζώων, είτε σε νεκρούς ιστούς κάθε οργανισμού. Οι ενώσεις του αζώτου που κυριαρχούν στους οργανισμούς είναι μεγαλομοριακές ενώσεις πλούσιες σε ενέργεια, κυρίως πρωτεΐνες. Κατά την αμμωνιοποίηση, ενώσεις όπως οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, η ουρία αλλά και συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων βακτηρίων μετατρέπονται σε αμμωνία με την δράση υδρολυτικών ενζύμων (ουρεάσες, αμινοπεπτιδάσες) που παράγονται από μικροοργανισμούς του εδάφους. Η τύχη της παραγόμενης αμμωνίας εξαρτάται από τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών του εδάφους [1,2].

Η **νιτροποίηση** είναι η διαδικασία μετατροπής της αμμωνίας σε νιτρικά και νιτρώδη ιόντα. Η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος, οξειδώνεται σε νιτρώδη ιόντα τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε νιτρικά ιόντα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της νιτροποίησης απαιτείται η δράση εξειδικευμένων μικροοργανισμών που διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα. Η πλειοψηφία των φυτών παραλαμβάνει το απαιτούμενο άζωτο υπό τη μορφή των νιτρικών ιόντων, τα οποία στη συνέχεια θα αναχθούν στο εσωτερικό των κυττάρων σε αμμωνία, αμινοξέα και πρωτεΐνες [1,2].

Η **απονιτροποίηση** είναι η διαδικασία με την οποία τα νιτρικά ιόντα ανάγονται υπό αναερόβιες συνθήκες σε μονοξείδιο του αζώτου (NO), υποξείδιο του αζώτου (N₂O) και ατμοσφαιρικό άζωτο (N₂), το οποίο τελικά απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα (Εικόνα 2). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς που διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή των ενζύμων που συμμετέχουν στην απονιτροποίηση. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι ετερότροφα βακτήρια και βακτήρια από διάφορα γένη όπως *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Halobacterium*, *Paracoccus* [1,2].



Εικόνα 2. Αντιδράσεις μετατροπής νιτρικών ιόντων σε ατμοσφαιρικό άζωτο (απονιτροποίηση).

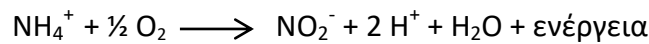
1.2 Νιτροποίηση

1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης

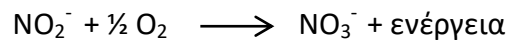
Η νιτροποίηση αποτελεί μια από τις βασικότερες βιοτικές μετατροπές του αζώτου και είναι τεράστιας σημασίας για την ολοκλήρωση του κύκλου του. Η νιτροποίηση οδηγεί στη μετατροπή της αμμωνίας (NH_3) στην οξειδωμένη και περισσότερο αφομοιώσιμη μορφή αζώτου, τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-), με συνέπεια την αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά και τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους [2,3]. Οι μικροοργανισμοί αλλά και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην νιτροποίηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά, εξαιτίας της ζωτικής οικονομικής σημασίας και της περιβαλλοντικής σπουδαιότητας της διαδικασίας αυτής [4].

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια (Εικόνα 3) [2]:

- I. τη νιτρωδοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) προς νιτρώδη ιόντα (NO_2^-), και αποτελεί το ρυθμό-καθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης,



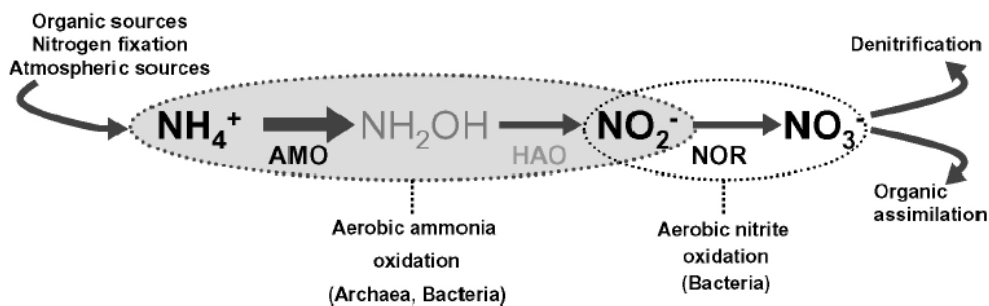
- II. τη νιτρικοποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) προς νιτρικά ιόντα (NO_3^-)



Η νιτρωδοποίηση ως διαδικασία διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους βιοχημικά στάδια [2,5] :

- I. την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) προς υδροξυλαμίνη (NH_2OH) με τη δράση του ενζύμου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO)
- II. την οξείδωση της υδροξυλαμίνης (NH_2OH) προς νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) με τη δράση του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO).

Η νιτρικοποίηση περιλαμβάνει τη μετατροπή των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-), που παράγονται κατά την νιτρωδοποίηση, σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) με τη δράση του ενζύμου της νιτρώδης οξειδοαναγωγής (NXR) [2,6].



Εικόνα 3. Τα στάδια της νιτροποίησης.

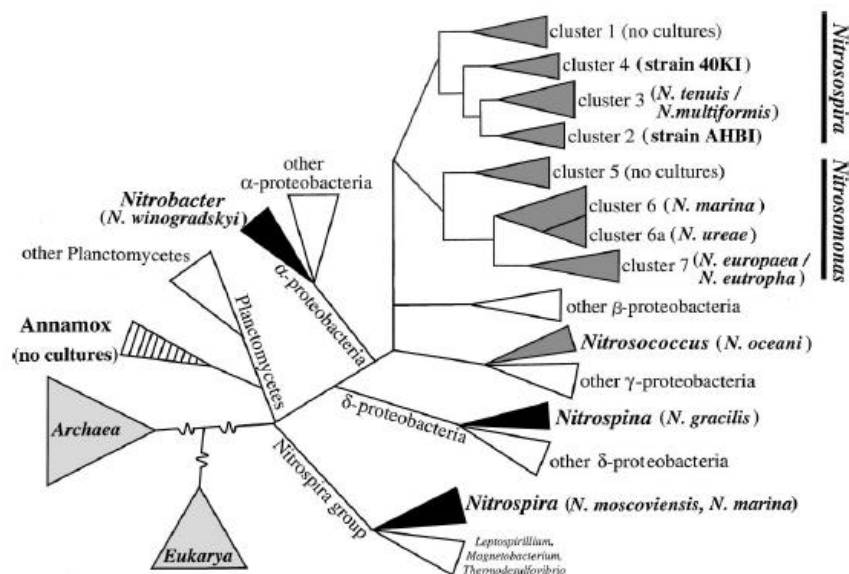
Η νιτροποίηση επιτελείται από μικροοργανισμούς που διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή των ενζύμων μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO), νιτρώδη οξειδοαναγωγή (NXR). Η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με τρεις πολυπεπτιδικές υπομονάδες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *amoA*, *amoB*, *amoC* του οπερονίου *amoCAB*, και παράγεται σε νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία. Προκειμένου να λειτουργήσει το ένζυμο απαιτεί δύο ηλεκτρόνια και τη σύνδεση χαλκού στην υπομονάδα *amoB* [6,8]. Το ένζυμο της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) είναι μια ομοτριμερής πρωτεΐνη που φέρει 24 δακτυλίους αίμης και συναντάται κυρίως σε AOB [5,6]. Η νιτρώδης οξειδοαναγωγή (NXR) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που φέρει δακτυλίους αίμης και απαντάται σε νιτροκοποιητικά βακτήρια [6,8].

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα μέχρι πρόσφατα η νιτροποίηση θεωρούνταν μια αρθρωτή διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο βήματα από διακεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες των Daims et al. [7], υπέδειξαν την ύπαρξη βακτηρίων του γένους *Nitrospira* sp., που διαθέτουν όλες τις αναγκαίες γενετικές πληροφορίες για την εκτέλεση και των δύο βημάτων της νιτροποίησης, καταρρίπτοντας έτσι την θεωρία της “αρθρωτής νιτροποίησης”. Τα βακτήρια αυτά ονομάστηκαν Comammox (**complete ammonia oxidation bacteria**) και εντοπίζονται σε φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα [31].

1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB) απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1890 [10]. Αρκετές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα βακτήρια αυτά ανήκουν στις κλάσεις των β-πρωτεοβακτηρίων και γ-πρωτεοβακτηρίων και κατατάσσονται σε τρία γένη με φυλογένεση που βασίζεται στο 16S rRNA. Τα γένη αυτά ονομάστηκαν *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* (Εικόνα 4) [9,11,12].



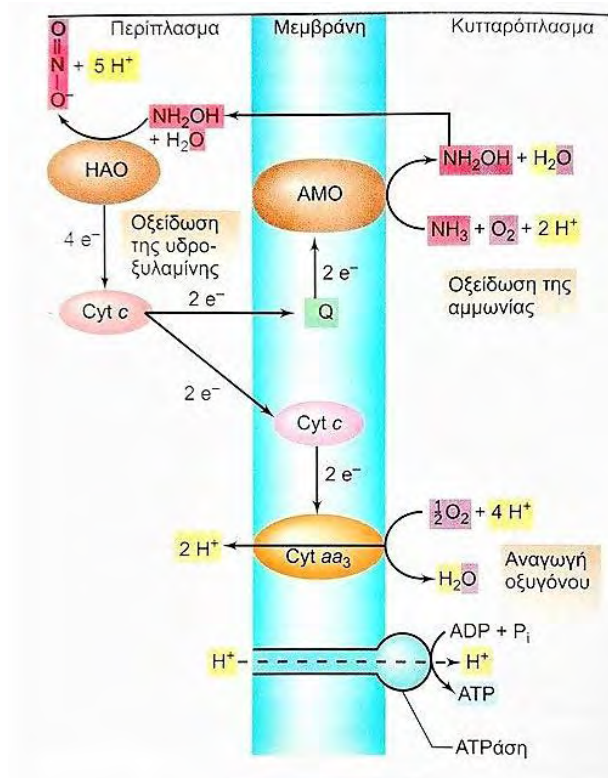
Εικόνα 4. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16SrRNA αλληλουχίες των βακτηρίων που συμμετέχουν στο κύκλο του αζώτου. Τα αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια φαίνονται με σκούρο γκρι, τα νιτροκοποιητικά βακτήρια με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές. [9]

Οι προκαρυωτικοί αυτοί μικροοργανισμοί διαφέρουν μεταξύ τους εξαιτίας της δομής των μεμβρανών τους. Χαρακτηριστικό αποτελεί η ύπαρξη λιπιδίων συνδεδεμένων με εστερικό δεσμό, που είναι ευάλωτος στην υδρόλυση και η ύπαρξη λιπαρών οξέων ως πλευρικές αλυσίδες [13]. Η δομή των μεμβρανών σε κάθε μικροοργανισμό είναι αυτή που καθορίζει τη διαπερατότητα του κυττάρου και κατά συνέπεια την ευαισθησία στις ξενοβιοτικές ουσίες και τους παρεμποδιστές [13].

Τα AOB όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την οξείδωση της αμμωνίας. Μέσω αυτής της οξείδωσης τα AOB προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους. Η παραγόμενη αυτή ενέργεια συμβάλει και στην καθήλωση του CO₂, που χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή άνθρακα, μέσω του κύκλου του Calvin [14]. Με βάση λοιπόν αυτά τα στοιχεία τα AOB χαρακτηρίζονται ως χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί [9].

Τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα όπως αγροτικές περιοχές, λιβάδια, δάση, αλπικά εδάφη [15], καθώς και σε θαλάσσια οικοσυστήματα [9]. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο σημαντικά στα αγροτικά οικοσυστήματα για την οξείδωση της αμμωνίας [12]. Η αφθονία τους στο έδαφος υπολογίζεται ότι κυμαίνεται περίπου μεταξύ 10⁴-10⁶ κύτταρα AOB/g εδάφους [15]. Παράγοντες όπως η περιεκτικότητα στο έδαφος βαρέων μετάλλων, η παρουσία ή όχι φυτών, η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και το pH του εδάφους, μπορούν να αυξήσουν την αφθονία και τη δραστικότητα των AOB [15]. Πρόσφατες μελέτες από τους Nicol et al. [16], έδειξαν πως αύξηση του pH του εδάφους οδηγεί σε αύξηση των μεταγράφων του *amoA* των AOB [16]. Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμα παράγοντας που φαίνεται πως επιδρά στην παραγωγή των νιτρωδών ιόντων στα AOB [4]. Σε θερμοκρασίες 25-30°C η παραγωγή των νιτρωδών ιόντων είναι σχετικά υψηλή ενώ σε θερμοκρασία 10°C η συγκέντρωση των νιτρωδών μειώνεται [17].

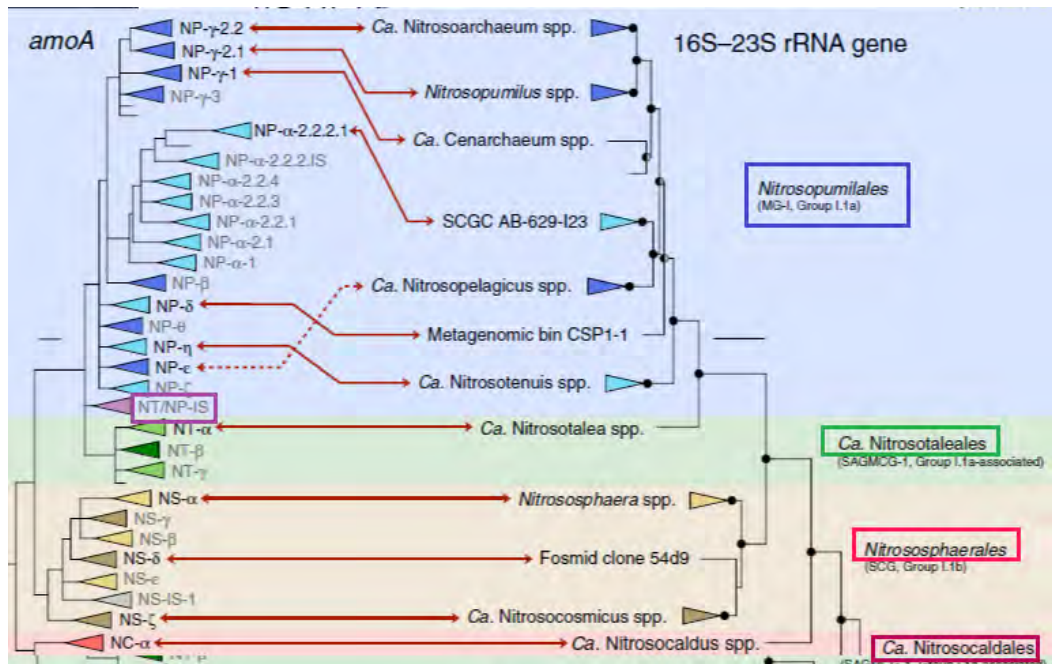
Στο μηχανισμό οξείδωσης της αμμωνίας από τα AOB συμμετέχουν σημαντικά ένζυμα. Ένα από αυτά είναι η διαμεμβρανική μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), που καταλύει τη μετατροπή της αμμωνίας (NH₃) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) σε υδροξυλαμίνη (NH₂OH) και νερό (H₂O). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτούνται δύο ηλεκτρόνια. Η περιπλασματική οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) είναι το δεύτερο ένζυμο που απαιτείται για την οξείδωση της αμμωνίας. Η αντίδραση που καταλύει αυτό το ένζυμο είναι η μετατροπή της υδροξυλαμίνης (NH₂OH) σε νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻), αποσπώντας τέσσερα ηλεκτρόνια, από τα οποία τα δύο μέσω του κυτοχρώματος c παραχωρούνται στην μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Τα δύο ηλεκτρόνια που απομένουν διέρχονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στη τελική οξειδάση για τη δημιουργία κινητήριας δύναμης πρωτονίων με τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο O₂ (Εικόνα 5) [5,8,9].



Εικόνα 5. Ο μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας και η ηλεκτρονιακή ροή στα νιτροδοποιητικά βακτήρια [8].

1.2.2.2 Νιτροδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Η δεύτερη ομάδα μικροοργανισμών που διαθέτουν τις γενετικές πληροφορίες για την οξείδωση της αμμωνίας είναι τα νιτροδοποιητικά Αρχαία (AOA). Το 2005 δημοσιεύτηκε η πρώτη έρευνα που αναφερόταν στο *Nitrososphaera*, το πρώτο αναγνωρισμένο AOA που απομονώθηκε από θαλάσσιο περιβάλλον [18,19]. Τα AOA ανήκουν στο φύλο των Thaumarchaeota, που διαχωρίζεται από τα φύλα Crenarchaeota και Euryarchaeota [20]. Μετά από φυλογενετικές αναλύσεις, βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA, τα AOA κατατάχθηκαν στη κλάση *Nitrososphaeria*. Τα γένη στα οποία κατατάσσονται τα AOA είναι τα: *Ca. Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales*, *Ca. Nitrosotaleales*, *Nitrososphaerales*. Υπάρχει μια επιπλέον ομάδα AOA, η *NT/NP-Incertae sedis*, η οποία στα φυλογενετικά δέντρα τοποθετείται κοντά στη ρίζα του γένους *Nitrososphaerales* καθώς ήταν αδύνατη η ταξινόμηση της μαζί με το γένος *Nitrososphaerales* ή με το γένος *Ca. Nitrosotaleales* (Εικόνα 6) [21].



Εικόνα 6. Φυλογενετική ανάλυση AOA μετά από συνδυασμό δεδομένων που προέκυψαν από φυλογενετικές αναλύσεις, βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA [21].

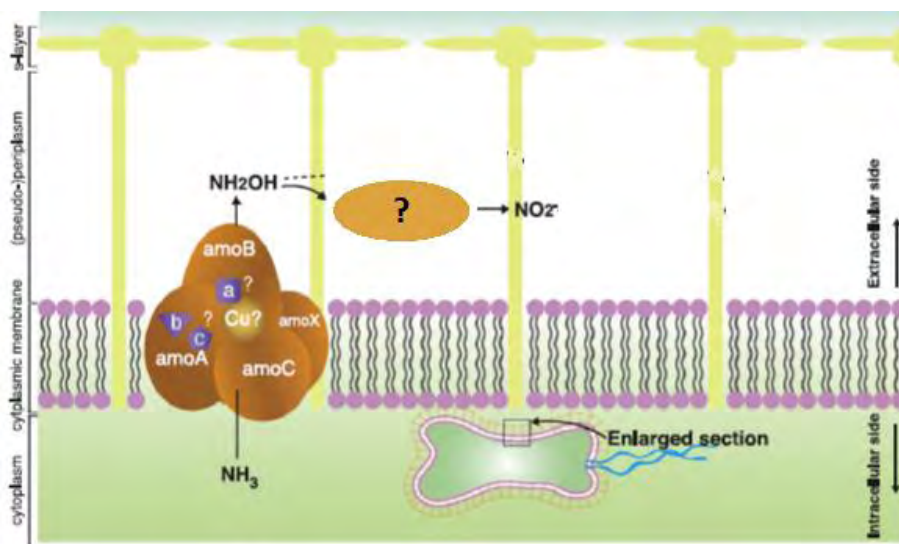
Η δομή των μεμβρανών των AOA διαφέρει από αυτή των AOB σε κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο. Στις μεμβράνες των AOA οι αλκυλικές αλυσίδες είναι διακλαδισμένες ισοπρενοειδής αλυσίδες, ανθεκτικές σε οξειδωτικά μέσα [22,23] και συνδέονται με τον κορμό της γλυκερόλης με τη βοήθεια αιθερικού δεσμού, ο οποίος είναι πιο ανθεκτικός στην υδρόλυση από τον εστερικό δεσμό, που συναντάται στις μεμβράνες των AOB [3]. Η δομή των μεμβρανών καθορίζει όπως και στα AOB τη διαπερατότητα των κυττάρων σε ξενοβιοτικές ουσίες και κατά συνέπεια σε παρεμποδιστές της νιτροποίησης.

Τα AOA φέρουν τα γονίδια για την παραγωγή της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), προκειμένου να οξειδώσουν την αμμωνία και να προσλάβουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους. Σε αντίθεση όμως με τα AOB, δεν χρησιμοποιούν το κύκλο του Calvin για τη καθήλωση του CO₂, που αποτελεί πηγή άνθρακα, αλλά το μονοπάτι του 3-υδροξυπροπιονικού εστέρα ή του 4-υδροξυβουτυρικού εστέρα [24]. Έτσι, και τα AOA χαρακτηρίζονται ως χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί [25].

Τα AOA βρίσκονται συνήθως σε μεγαλύτερη αφθονία τόσο στα χερσαία όσο και στα θαλάσσια οικοσυστήματα σε σχέση με τα AOB [12]. Στο έδαφος βρέθηκε να περιέχονται περισσότερα από 10⁷ κύτταρα AOA/g εδάφους [15]. Τα AOA συνεισφέρουν περισσότερο στην οξείδωση της αμμωνίας από τα AOB σε εδάφη με όξινο pH [26]. Τα AOA, όπως και τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα όπως αγροτικές περιοχές, λιβάδια, δάση, αλπικά εδάφη [15], αλλά και σε πολλά θαλάσσια οικοσυστήματα, αποδεικνύοντας πως είναι απαραίτητα για το κύκλο του αζώτου στους ωκεανούς. AOA έχουν βρεθεί και σε θερμές πηγές, αλλά και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων [4]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία και τη λειτουργικότητα των AOB στα διάφορα περιβάλλοντα

επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό και τα AOA [15]. Οι αλλαγές στη θερμοκρασία μπορούν να οδηγήσουν επιπλέον και σε αλλαγές της δομής της κοινότητας των αρχαίων [4].

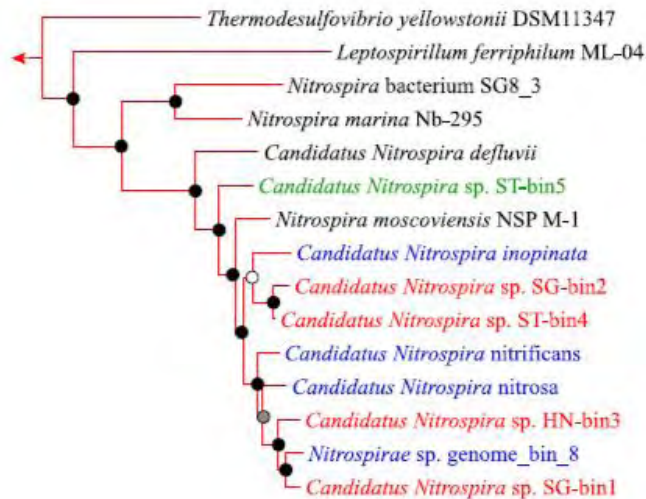
Μετά από αλληλούχηση του γονιδιώματος των AOA επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ομόλογων γονιδίων *amoA*, *amoB*, *amoC* με αυτά των βακτηρίων, ωστόσο δεν εντοπίστηκαν ομόλογα γονίδια για το ένζυμο της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) [24]. Έτσι, θεωρήθηκε πως πιθανόν η υδροξυλαμίνη (NH_2OH) δεν αποτελεί το ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή των νιτρικών ιόντων (NO_2^-). Προτάθηκαν τρία μονοπάτια, με τα δύο από αυτά να έχουν ως ενδιάμεσο προϊόν την υδροξυλαμίνη (NH_2OH), αλλά να διαφέρουν ως προς την προέλευση των ηλεκτρονίων που απαιτεί η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) για να δράσει. Το ένα μονοπάτι συνάδει με αυτό των AOB, με ένα ένζυμο του τύπου CuHAO να οξειδώνει την υδροξυλαμίνη (NH_2OH) και να παράγονται τέσσερα ηλεκτρόνια με τα δύο εξ αυτών να καταλήγουν στην μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Στο άλλο μονοπάτι εικάζεται πως η παράγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα νιτρικά ιόντα (NO_2^-) μέσω του ένζυμο CuNIR αποτελεί την κύρια πηγή ηλεκτρονίων για την μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) [19,27]. Όσον αφορά το τρίτο μονοπάτι, ως ενδιάμεσο προϊόν της οξείδωσης της αμμωνίας προτείνεται το νιτροξύλιο (HNO), το οποίο οξειδώνεται σε νιτρικά ιόντα (NO_2^-) [19,27]. Οι Vajralaa et al., [27] ανέφεραν τελικά, πως το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει μετά τη δράση της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) στα AOA είναι τελικά η υδροξυλαμίνη (NH_2OH), η οποία παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με την παραγόμενη υδροξυλαμίνη (NH_2OH) των AOB (Εικόνα 7). Ο τρόπος ωστόσο με τον οποίο οξειδώνεται η υδροξυλαμίνη (NH_2OH) στα AOA δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα [6].



Εικόνα 7. Πιθανός μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας από τα νιτροδοποιητικά αρχαία [6].

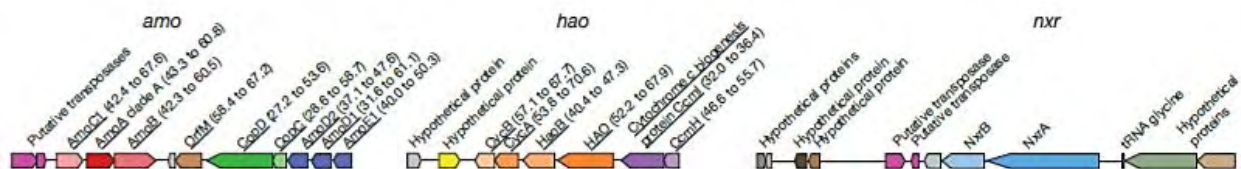
1.2.2.3 Comammox

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η θεωρία της “αρθρωτής νιτροποίησης” καταρρίφθηκε το 2015 με την ανακάλυψη ενός νέου στελέχους, το *Candidatus Nitrospira inopinata*, που ανήκει στα *Nitrospira* και έχει την ικανότητα να εκτελεί και τα δύο βήματα της νιτροποίησης [7,30]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάστηκαν Comammox, κατατάσσονται φυλογενετικά στην ομάδα των νιτρικοποιητικών βακτηρίων (NOB) και ανήκουν στο γένος των *Nitrospira* (Εικόνα 8) [7].



Εικόνα 8. Τα βακτηρία που γένους *Nitrospira*, που αποδείχθηκε πως ανήκουν στα comammox. Οι αποχρώσεις μπλε και κόκκινο αντιστοιχούν στα comammox [29].

Οι γονιδιωματικές αναλύσεις στο στέλεχος *Ca. N. inopinata* απέδειξαν την ύπαρξη των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή του ενζύμου NXR. Σε αντίθεση, με τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) που διαθέτουν πέντε παράλογα αντίγραφα των γονιδίων *nxrAB*, το στέλεχος *Ca. N. inopinata* διαθέτει μόνο ένα αντίγραφο. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν και τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή των ενζύμων της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) και της οξειδοαναγωγάσης της υδροξυλαμίνης (HAO). Βασική διαφορά μεταξύ των Comammox και των AOB είναι η ύπαρξη, πέραν του οπερονίου *amoCAB*, δύο επιπλέον *amoC* γονιδίων σε άλλους γενετικούς τόπους (Εικόνα 9) [7,30].



Εικόνα 9. Οι θέσεις των γονιδίων των *amoCAB*, *hao* και *nxrAB* στο γονιδίωμα του *Candidatus Nitrospira inopinata* [7].

Πρόσφατη έρευνα από τους Kits et al., [96] αναφέρει πως τα Comammox έχουν υψηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα της αμμωνίας, υποδεικνύοντας πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας αποκτούν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των AOB και των AOA.

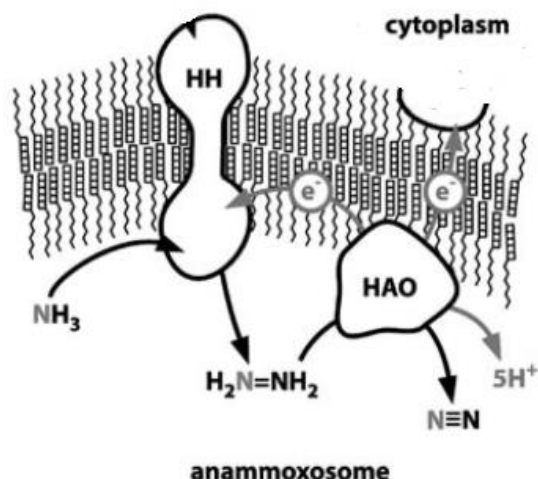
Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις που ακολούθησαν έδειξαν ότι τα Comammox είναι ευρέως διαδεδομένα σε τεχνητά συστήματα (π.χ. μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων) και σε φυσικά εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα [31]. Παρόλα αυτά η καλλιέργεια τους σε θρεπτικά μέσα είναι ιδιαίτερα απαιτητική. Για τον λόγο αυτό μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί μόνο δύο βακτήρια Comammox που προέρχονται από υδάτινα οικοσυστήματα [7,30]. Ωστόσο, η ύπαρξη των *Nitrospira* σε χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα, σε αγροτικές περιοχές, σε μηχανικά οικοσυστήματα όπως μονάδες επεξεργασίας πόσιμου νερού και συστήματα διανομής και επεξεργασίας λυμάτων, ίσως προδίδει τη πιθανή παρουσία των Comammox σε αυτά τα περιβάλλοντα [6,7,28,29].

Εν κατακλείδι, τα Comammox είναι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να καταλύουν τη μετατροπή της αμμωνίας (NH_4^+) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) καθώς διαθέτουν το γενετικό υλικό για την παραγωγή των απαραίτητων ενζύμων, όμως ο ακριβής οικολογικός ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

1.2.2.4 Anammox

Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (O_2), πραγματοποιείται αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας από αναερόβια βακτήρια γνωστά ως anammox [25]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στο φύλο των Planctomycetales [25], και κατατάσσονται σε τέσσερα γένη : *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula* και *Ammoxoglobus* [35].

Τα βακτήρια αυτά οξειδώνουν την αμμωνία, χρησιμοποιώντας τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) ως δέκτη ηλεκτρονίων έναντι του οξυγόνου (O_2) [25] και οδηγούν στη παραγωγή ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2) αντί νιτρικών ιόντων (NO_3^-) [36]. Στο μονοπάτι οξειδωσης της αμμωνίας το ενδιάμεσο προϊόν είναι η υδραζίνη [36], η οποία με τη δράση του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) μετατρέπεται τελικά σε ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) [35]. Το ένζυμο της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) βρίσκεται σε ένα οριοθετημένο τμήμα της μεμβράνης, γνωστό ως anammoxosome, το οποίο αποτελεί το 30% του όγκου του κυττάρου. Το anammoxosome περιβάλλεται από μεμβράνη που φέρει λιπίδια με 3 έως 5 συντηγμένους δακτυλίους κυκλοβουτανίου (ladderane λιπίδια) (Εικόνα 10) [35].

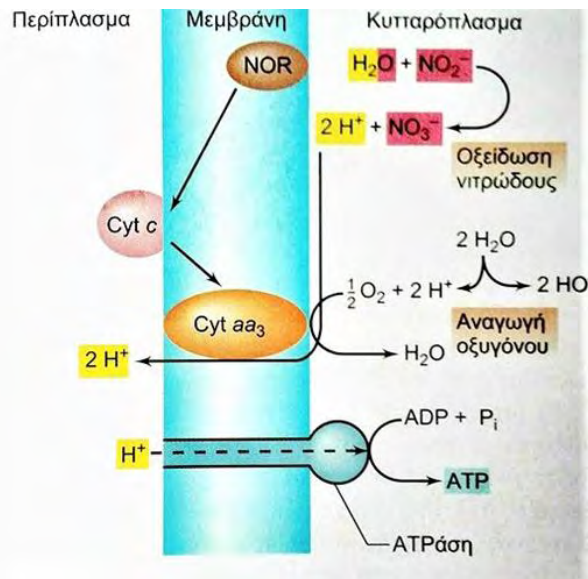


Εικόνα 10. Ο μηχανισμός δράσης των αναμμοξ, που οδηγεί σε παραγωγή αέριου αζώτου [35].

Τα αναμμοξ έχουν εντοπιστεί σε ζώνες με θαλάσσια ή παράκτια ιζήματα, σε εκβολές ποταμών, σε ζώνες με ελάχιστο οξυγόνο στη δυτική Αφρική, στη Χιλή και στο Περού, σε θαλάσσιο πάγο και σε λίμνες [25]. Τα αναμμοξ είναι υπεύθυνα για απώλεια του αζώτου σε ποσοστό 24-67% στα θαλάσσια ιζήματα και για την απώλεια σημαντικών κλασμάτων αζώτου στους ωκεανούς [25].

1.2.2.5 Νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB)

Το δεύτερο βήμα της νιτροποίησης, η νιτρικοποίηση, εκτελείται από τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB). Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στο φύλο των πρωτεοβακτηρίων [32] και κατατάσσονται στα ακόλουθα έξι γένη: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina* και *Nitrolancetus* [33]. Τα γένη αυτά ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες των πρωτεοβακτηρίων [32] και εμφανίζουν διαφορές σε δομικό και βιοχημικό επίπεδο [8]. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των NOB είναι η ύπαρξη των γενετικών πληροφοριών για την παραγωγή του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η οξείδωση των νιτρώδων ιόντων (NO_2^-) προς νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Κατά την αντίδραση πέραν της παραγωγής των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) παράγονται και δύο ηλεκτρόνια τα οποία μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καταλήγουν στην τελική οξειδάση για παραγωγή ενέργειας (Εικόνα 11) [8].



Εικόνα 11. Ο μηχανισμός οξείδωσης των νιτρωδών ιόντων προς νιτρικά [8] .

Τα NOB είναι χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί [34,14]. Η οξείδωση των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-) συμβάλει στην παραγωγή ενέργειας για την επιβίωση των NOB. Η πηγή άνθρακα για τα NOB είναι το CO_2 . Ο μηχανισμός καθήλωσης του CO_2 δεν είναι ίδιος για όλα τα γένη των NOB και σε πολλά από αυτά δεν έχει καθοριστεί [8].

Το γένος των *Nitrospira* είναι το πιο ποικιλόμορφο από τα υπόλοιπα γένη και συναντάται σε μεγαλύτερη αφθονία. Τα στελέχη των *Nitrospira* εμφανίζονται σε πολλά οικοσυστήματα όπως στο έδαφος, στους ωκεανούς, στις θερμές πηγές ακόμα και σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων [34].

1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου του αζώτου και έχει ιδιαίτερη σημασία για τη γεωργία, τη μεταχείριση των αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων και το περιβάλλον.

Με τη νιτροποίηση διασφαλίζεται η μετατροπή της αμμωνίας (NH_3) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) στην πιο αφομοιώσιμη για τα φυτά μορφή του αζώτου, τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Η μετατροπή αυτή συμβάλει στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους σε υψηλά επίπεδα [3], περιορίζοντας τη χρήση λιπασμάτων αζώτου για τον εμπλουτισμό του εδάφους. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται σημαντικά ο αρνητικός αντίκτυπος που παρουσιάζει η χρήση των λιπασμάτων σε περιβαλλοντικό επίπεδο, λόγω της συσσώρευσης υψηλών ποσοτήτων αζώτου και σε οικονομικό επίπεδο εξαιτίας του υψηλού τους κόστους. Παράλληλα, οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιολογική επεξεργασία αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων, προκειμένου να μειωθεί το υψηλό φορτίο αζώτου στα απόβλητα που προκύπτει εξαιτίας της επέκτασης της κτηνοτροφίας, της γεωργίας και της βιομηχανικής παραγωγής αζώτου. Έτσι, με τη νιτροποίηση αποφεύγεται η περιβαλλοντική ρύπανση, που προκαλούν τα απόβλητα που

καταλήγουν στο έδαφος, από τη συσσώρευση τοξικών αλάτων αμμωνίας [9]. Η παρουσία της αμμωνίας στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα μπορεί να οδηγήσει σε εκπομπή αέριας αμμωνίας, η οποία σχηματίζεται όταν τα αμμωνιακά ιόντα βρίσκονται σε αλκαλικό pH [41]. Η εκπομπή της αέριας αμμωνίας είναι πιθανό να προκαλέσει σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα όπως μόλυνση του νερού, ευτροφισμό και μείωση του pH του εδάφους, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη των φυτών και των μικροοργανισμών [40].

Η νιτροποίηση ωστόσο, επιφέρει και αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον, καθώς συμβάλει στις απώλειες του αζώτου από τα αγροτικά οικοσυστήματα διαμέσου της έκπλυσης των παραγόμενων NO_3^- και της παραγωγής και εκπομπής αέριων μορφών αζώτου (N_2O , NO , N_2). Η έκπλυση των παραγόμενων νιτρικών ιόντων, μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση των επιφανειακών υδάτων αλλά και του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα με τελικό αποτέλεσμα τον ευτροφισμό, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία [38]. Παράλληλα, τα παραγόμενα νιτρικά ιόντα ακολουθώντας τον κύκλο του N, υπόκεινται στις αντιδράσεις της απονιτροποίησης οδηγώντας σε παραγωγή αέριων αζωτούχων ενώσεων όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) και το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2), που αποτελούν ατμοσφαιρικούς ρύπους. Μέσω της εκπομπής αυτών των ενώσεων στην ατμόσφαιρα εντείνεται το πρόβλημα του φαινομένου του θερμοκηπίου αλλά και της τρύπας του όζοντος [42]. Για την αντιμετώπιση των αρνητικών επιπτώσεων της νιτροποίησης αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N.

1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΠΝ)

Ετησίως περίπου 10^7 τόνοι αζωτούχων λιπασμάτων χρησιμοποιούνται στις καλλιεργούμενες εκτάσεις παγκοσμίως, με μόνο το 50% αυτών να αφομοιώνεται από τα φυτά [43]. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση των διαθέσιμων ενώσεων του N που προκύπτουν μέσω νιτροποίησης (NO_3^-) και επακόλουθης απονιτροποίησης (N_2O) σε μείζονες ρύπους. Με βάση αυτά τα δεδομένα αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες «ελέγχου» των διεργασιών του κύκλου του N, που αναφέρονται ως αζωτούχα λιπάσματα βελτιωμένης απόδοσης (enhanced-efficiency N-fertilizer) [44], με στόχο την ταυτόχρονη αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά (nitrogen use efficiency – NUE), και την ελαχιστοποίηση των απωλειών του N. Μία από τις τεχνολογίες αυτές είναι η εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης (ΠΝ). Όλοι οι παρεμποδιστές νιτροποίησης που είναι διαθέσιμοι στην αγορά σήμερα δρουν στο πρώτο βήμα της νιτροποίησης (νιτρωδοποίηση) [40,44,45].

Η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής των ΠΝ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο χρησιμοποιούνται [48,50]. Έτσι, παράγοντες όπως η υγρασία του εδάφους, το pH και η θερμοκρασία έχουν βρεθεί να επηρεάζουν τη δράση τους [51]. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C οι ΠΝ εμφανίζουν χαμηλότερη σταθερότητα. Παράλληλα, με τη θερμοκρασία καθορίζεται και ο ρυθμός αποδόμησής τους από τους μικροοργανισμούς του εδάφους [52]. Η υγρασία με τη σειρά της καθορίζει το

χρόνο παραμονής και τη δράση των ΠΝ στο έδαφος με βάση την υδατοδιαλυτότητα τους [52].

Οι ΠΝ, ιδανικά δεν θα πρέπει να επιδρούν σε άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους πέραν από τα βακτήρια και τα αρχαία που συμμετέχουν στο κύκλο του αζώτου [53]. Το μέγεθος της επίδρασης των ΠΝ οφείλεται στα δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε μικροοργανισμού. Γενικά, τα ΑΟΑ φαίνεται να εμφανίζουν μικρότερη ευαισθησία στους ΠΝ σε σχέση με τα ΑΟΒ εξαιτίας θεμελιωδών κυτταρικών και μεταβολικών τους διαφορών [51]. Ωστόσο, οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δράση των ΠΝ στα ΑΟΑ είναι περιορισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες για τα ΑΟΒ [54].

Οι ΠΝ διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στους βιολογικούς (ΒΠΝ) και τους συνθετικούς παρεμποδιστές νιτροποίησης (ΣΠΝ).

Οι ΒΠΝ παράγονται από τα φυτά. Απαραίτητη προϋπόθεση για την έκκριση των ΒΠΝ από τις ρίζες των φυτών, αποτελεί η ανάπτυξη των φυτών παρουσία αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) [55]. Οι περισσότεροι ΒΠΝ δρουν και αναστέλλουν τα ένζυμα της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (ΑΜΟ) και της οξειδοαναγωγάσης της υδοξυλαμίνης (ΗΑΟ) [6,55], ωστόσο ο μηχανισμός αυτός καθ' αυτός είναι ακόμα άγνωστος [56]. Η απελευθέρωση των ΒΠΝ σε συγκεκριμένο χώρο και χρόνο, ανάλογα με τις απαιτήσεις, τους προσδίδει πλεονέκτημα έναντι των ΣΠΝ, των οποίων τα αποτελέσματα είναι βραχυπρόθεσμα και εξαρτώνται από συνθήκες όπως η συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και το pH [6,56]. Όσον αφορά το χώρο έκκρισης των ΒΠΝ, αυτός είναι η περιοχή της ριζόσφαιρας όπου παρατηρείται υψηλή δραστηριότητα οξείδωσης της αμμωνίας [56]. Η αντίδραση αυτή των φυτών είναι πιθανόν να οφείλεται στον ανταγωνισμό για το διαθέσιμο αζώτο στο έδαφος, με τους μικροοργανισμούς [57]. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την παρουσία ΒΠΝ σε πολλά οικοσυστήματα και πολλά είδη φυτών [56]. Η παρεμπόδιση της νιτροποίησης με ΒΠΝ, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επεξηγηθεί πως το ίδιο το περιβάλλον ελέγχει τη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) και των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) στο έδαφος [56]. Η απελευθέρωση των ΒΠΝ λαμβάνει χώρα στα τριχίδια των ριζών. Η έκκριση μπορεί να συμβεί μέσω ειδικών μεταφορέων, αντιμεταφορέων, διάχυσης και εξωκυττάρωσης [56]. Το pH είναι ένας βασικός παράγοντας που καθορίζει τη δράση και το είδος των ΒΠΝ που απελευθερώνονται από τα φυτά [56,58].

Οι ΒΠΝ που έχουν απομονωθεί προς το παρόν από τις ρίζες φυτών είναι [56]:

- I. Sorgoleone
- II. Sakuranetin
- III. methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP)
- IV. Brachialactone
- V. 1,9-Decanediol
- VI. Λινολενικό οξύ (LA)
- VII. Λινελαϊκό οξύ (LN)
- VIII. Τερπενοειδή

Το φυτό *Sorghum bicolor* μέσω των ριζών του απελευθερώνει τον ΒΠΝ, Sorgoleone (Εικόνα 12). Ο παρεμποδιστής αυτός είναι μια p-βενζοκινόνη [56], που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας υδροκινόνης για κεφαλή και για ουρά ένα λιπαρό οξύ που καταλήγει σε διπλό δεσμό [59]. Το Sorgoleone είναι μια υδρόφοβη ένωση γι' αυτό και παραμένει κοντά στη ρίζα μετά την έκκριση του [59]. Η δράση του αναστολέα ασκείται τόσο στη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) όσο και στην οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) [59,59]. Παράλληλα, αυτή η ένωση χρησιμοποιείται και ως ισχυρό ζιζανιοκτόνο [56].

Η Sakuranetin είναι μια ακόμα ουσία που δρα ως ΒΠΝ (Εικόνα 12). Εκκρίνεται και αυτή η ουσία από το φυτό *Sorghum bicolor* και είναι μια υδροφιλική φλαβόνη που κινείται περαιτέρω από το σημείο έκκρισης λόγω της διαλυτότητας της στο νερό, βελτιώνοντας έτσι την ικανότητα της να ελέγχει τη νιτροποίηση πέραν της ριζόσφαιρας [56,59]. Ως ΠΝ δρα στη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και στην οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) [56,59]. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό αυτής της ουσίας είναι ότι δρα ως φυτοαλεξίνη, συμβάλλοντας έτσι στην άμυνα των φυτών και ιδιαίτερα του ρυζιού [56].

Ο πρώτος βιολογικός αναστολέας νιτροποίησης απομονώθηκε το 2008 από το φυτό *Sorghum bicolor* και ήταν το methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (MHPP) (Εικόνα 12). Η ένωση αυτή είναι ένα υδρόφιλο φαινυλοπροπανοειδές με μέτρια δραστικότητα ως ΠΝ [56]. Η δράση του περιορίζεται στην αναστολή της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [56]. Το MHPP δρα επιπρόσθετα, στον ορμονικό έλεγχο της ανάπτυξης της ρίζας στο φυτό *Arabidopsis thaliana* [56]. Το MHPP παρουσιάζει ασθενέστερη δραστικότητα και από τη Sorgoleone και από τη Sakuranetin. Ωστόσο, η Sakuranetin είναι ισχυρότερη και από τη Sorgoleone [56].

Η Brachialactone θεωρείται ο πιο σημαντικός ΒΠΝ στο φυτό *Brachiaria humidicola* (Εικόνα 12) [56]. Η ένωση αυτή είναι ένα κυκλικό δι-τερπένιο που δρα και αναστέλλει τόσο στη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) όσο και στην οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) [56].

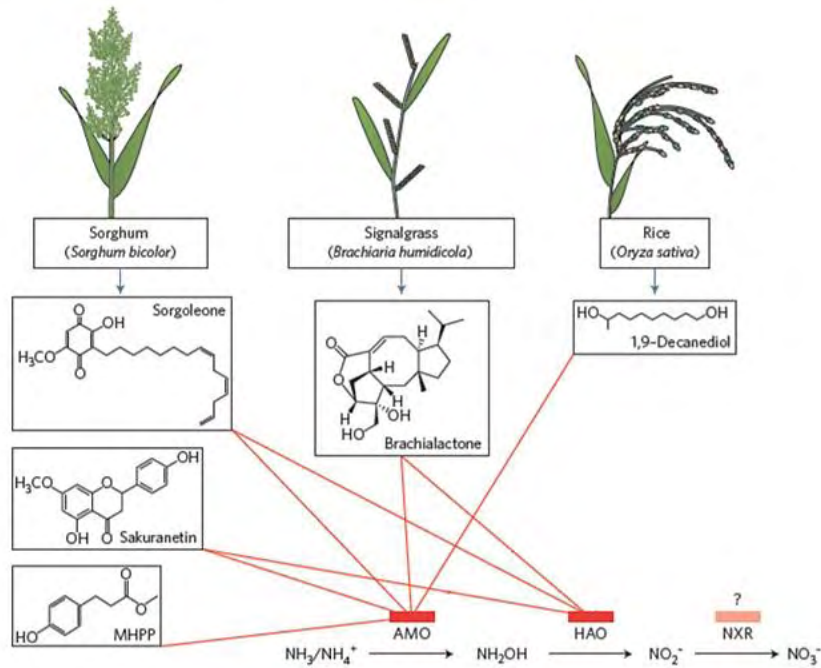
Ο πιο πρόσφατα απομονωμένος ΒΠΝ είναι η 1,9-Decanediol (Εικόνα 12). Η ένωση αυτή απομονώθηκε από το ρύζι και αποτελεί μια λιπαρή αλκοόλη. Η παρεμπόδιση της νιτροποίησης που επιφέρει οφείλεται στη δράση της στο ένζυμο της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [56].

Ως ΒΠΝ μπορούν να δράσουν και ενώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στο φυτό *Brachiaria humidicola*. Τέτοιες ενώσεις αποτελούν το λινολενικό οξύ (LA) και το λινελαϊκό οξύ (LN). Οι ενώσεις αυτές δρουν και αναστέλλουν και τα δύο ένζυμα τις νιτροποίησης. Η δράση τους ωστόσο, είναι αρκετά ασθενής [58].

Τα τερπενοειδή σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να παρεμποδίσουν τη νιτροποίηση. Ωστόσο, οι κύριες λειτουργίες αυτών των ενώσεων σχετίζονται με ενδοκυτταρικές δραστηριότητες και την άμυνα του φυτού [56]. Υψηλές συγκεντρώσεις μονοτερπενοειδών, σε συγκεκριμένα οικοσυστήματα, έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη νιτροποίηση μέσω απενεργοποίησης της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [58].

Γενικά, ενώσεις όπως φαινύλια, μεθύλια [58] μεθυλικοί και αιθερικοί εστέρες [56] έχει αποδειχθεί πως έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση, δρώντας είτε στη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) είτε στην οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO).

Εν κατακλείδι, οι ΒΠΝ έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την απώλεια του αζώτου και να αυξάνουν την αποδοτικότητα χρήσης του αζώτου (NUE). Συνεπώς, η εκμετάλλευση της δυνατότητας κάποιων φυτών να εκκρίνουν ουσίες που δρουν ως ΠΝ, ίσως αποτελεί μια σημαντική γεωργική πρακτική, με τη οποία θα μειωθούν οι απώλειες αζώτου καθώς και η χρήση των ΣΠΝ και των πιθανών αρνητικών συνεπειών τους για το περιβάλλον.



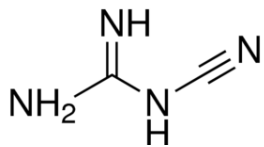
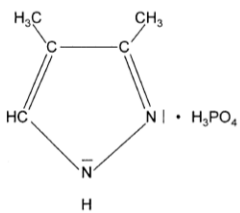
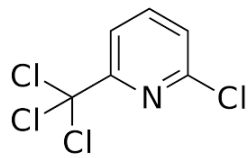
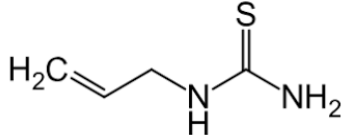
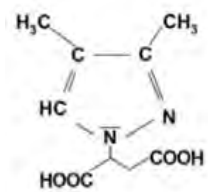
Εικόνα 12. Μερικοί από τους βιολογικούς παρεμποδιστές της νιτροποίησης, τα φυτά από τα οποία παράγονται και το σημείο δράσης τους [56].

Η δεύτερη κατηγορία ΠΝ είναι οι συνθετικοί (ΣΠΝ). Οι παρεμποδιστές αυτοί συντίθενται χημικά. Η σύνθεσή τους υποκινήθηκε από την ανάγκη περιορισμού των απωλειών αζώτου από τα αγροτικά οικοσυστήματα, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό ως γεωργική πρακτική για την παρεμπόδιση της νιτροποίησης και την αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του αζώτου (NUE). Ωστόσο, η εφαρμογή τους παρουσιάζει μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων των δυσκολιών στην εφαρμογή, το κόστος εφαρμογής τους, τη ρύπανση και την υποβάθμιση του εδάφους, τη πιθανότητα εισχώρησης στην τροφική αλυσίδα καθώς και τη χαμηλή σταθερότητα που εμφανίζουν ορισμένοι από αυτούς [56]. Επιπλέον, ο χρόνος δράσης των ΣΠΝ είναι περιορισμένος και δεν διαρκεί περισσότερο από μερικές εβδομάδες, συχνά λιγότερο και από μια εβδομάδα [57]. Οι ΣΠΝ εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα στη μείωση εκπομπών αέριων μορφών αζώτου, όμως είναι πιθανό να οδηγήσουν και σε εκπομπή αέριας αμμωνίας [56].

Οι κυριότεροι στους ΣΠΝ είναι οι εξής (Πίνακας 1):

- I. Dicyandiamide (DCD)
- II. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate(DMPP)
- III. Nitrapyrin
- IV. Ακετυλένιο (C₂H₂)
- V. Allylthiourea
- VI. 3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA)

Πίνακα 1. Οι συνθετικοί αναστολείς νιτροποίησης με τις χημικές δομές του .

Συνθετικός αναστολέας	Χημική δομή
Dicyandiamide (DCD)	
3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP)	
2-Chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (Nitrapyrin)	
Ακετυλένιο (C ₂ H ₂)	H—C≡C—H
Allylthiourea	
3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA)	

Το Dicyandiamide (DCD) χρησιμοποιείται ευρέως ως ΠΝ λόγω της σχετικά υψηλής αποτελεσματικότητας του ως παρεμποδιστής της νιτροποίησης [60]. Δρα ως χηλικός παράγοντας, απορροφώντας το χαλκό που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [55]. Παράλληλα, μπορεί να μπλοκάρει το κυτόχρωμα που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στην μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) [48]. Η δράση του DCD επικεντρώνεται στα AOB όπου και έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την αφθονία τους [55]. Το DCD είναι μια ένωση διαλυτή στο νερό με μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος [49, 61], είναι μη πτητική [60] και εμφανίζει υψηλό κόστος παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα [49]. Η εφαρμογή του DCD οδηγεί σε μείωση εκπομπής υπεροξειδίου του αζώτου (N_2O) και αύξηση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών με εξαίρεση αυτή των φρούτων [39]. Ωστόσο, το DCD μπορεί να οδηγήσει και σε εκπομπή αέριας αμμωνίας [41], η οποία αντιμετωπίζεται με συνδυασμό του παρεμποδιστή με λιπάσματα αζώτου [41]. Επιπλέον, το DCD μπορεί να προκαλέσει προβλήματα φυτοτοξικότητας ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον [49].

Ένας ακόμα ΣΠΝ που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η ένωση 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) που επίσης εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην παρεμπόδιση της νιτροποίησης [60]. Το DMPP είναι μια ετεροκυκλική ένωση αζώτου [61] που δρα ως χηλικός παράγοντας και απορροφά το χαλκό αναστέλλοντας έτσι τη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) [55]. Ο παρεμποδιστής αυτός δρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις [49] και θεωρείται πιο δραστικός παρεμποδιστής από το DCD [61]. Η δράση του είναι πιο ισχυρή έναντι των AOB, όπου και μειώνει την αφθονία τους [61]. Το DMPP είναι μη πτητική ένωση [38] με χαμηλή κινητικότητα και αργή αποδόμηση, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το χρόνο δράσης του [61]. Όπως και το DCD έτσι και το DMPP μειώνει την εκπομπή υπεροξειδίου του αζώτου (N_2O) και αυξάνει την παραγωγικότητα των καλλιεργειών με εξαίρεση αυτή των βοσκοτόπων [39]. Η αποτελεσματικότητα του αυξάνεται όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με λιπάσματα αζώτου [38]. Τόσο το DMPP όσο και το DCD δεν επηρεάζουν κάποιο άλλο μεταβολικό μονοπάτι των μικροοργανισμών πέραν αυτού της οξείδωσης της αμμωνίας [48].

Το nitrapyrin (NP) ανακαλύφθηκε το 1962 [49]. Δρα στο ένζυμο της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [49], αφού είναι ένας χηλικός παράγοντας [49] που απορροφά το χαλκό που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου. Το NP είναι αποτελεσματικό έναντι τόσο των AOB όσο και των AOA [49,51]. Παράλληλα, εμφανίζει υψηλότερη αποτελεσματικότητα από το DCD και όμοια αποτελεσματικότητα με το DMPP [47], ωστόσο παρουσιάζει μεγαλύτερη αστάθεια και από τους δύο αναστολείς [42]. Ως οργανική ένωση χλωρίου, το NP μπορεί να επιφέρει προβλήματα κατά την εφαρμογή του καθώς είναι μια διαβρωτική ουσία που μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα [49]. Σε κατάλληλες συνθήκες και συγκεντρώσεις είναι ένας αποτελεσματικός ΠΝ.

Το ακετυλένιο (C_2H_2) είναι ένας αποτελεσματικός ΠΝ σε χαμηλές συγκεντρώσεις [51]. Ο παρεμποδιστής αυτός δρα ως υπόστρωμα "αυτοκτονίας" της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [62], καθώς συνδέεται στην αποΑ υπομονάδα και εμποδίζει τη σύνδεση της υπομονάδας αποΒ [63]. Το ακετυλένιο αναστέλλει αποτελεσματικά και μη αναστρέψιμα τη μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) [63,64]. Η δράση του ασκείται τόσο στα AOB όσο και

στα AOA [63] και είναι πιο ισχυρή από τη δράση του DCD [51]. Το ακετυλένιο δρα και μειώνει την απώλεια του αζώτου απουσία οξυγόνου [65].

Η allylthiourea είναι ένας χηλικός παράγοντας που αναστέλλει το ένζυμο της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [55]. Η ανασταλτική δράση του είναι μη αναστρέψιμη [66]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη λειτουργία των AOB και σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτή των AOA [67]. Σε κάθε περίπτωση η allylthiourea παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη νιτροποίηση και μειώνει τις απώλειες αζώτου.

Ένας από τους νεότερους ΠΝ είναι το 3,4-dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA). Οι αναφορές για τον παρεμποδιστή αυτό είναι περιορισμένες με αποτέλεσμα ο μηχανισμός δράσης του να είναι ακόμα άγνωστος [68]. Ωστόσο, μια πιθανή εξήγηση της δράσης του βασίζεται στη παρουσία της διμεθυλοπυραζόλης (DMP), η οποία απελευθερώνεται μετά τη διάσπαση του DMPSA [68]. Η δράση του όσο αναφορά τη ροή του υπεροξειδίου του αζώτου (N_2O) και την παραγωγικότητα είναι όμοια με αυτή του DMPP [60]. Το DMPSA επιπλέον είναι σταθερό σε αλκαλικές συνθήκες, γι' αυτό και μπορεί να συνδυάζεται με πολλά λιπάσματα αζώτου [69].

Η χρήση των ΣΠΝ αποτελεί μια εύκολη γεωργική πρακτική, προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες αζώτου και να αυξηθεί η παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Η επιλογή του κατάλληλου παρεμποδιστή εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος [48] και το είδος των μικροοργανισμών που συναντώνται στο έδαφος [48]. Αρκετοί από τους ΠΝ, όπως τα DCD, DMPP, NP και Allylthiourea [6,13] δεν φαίνεται να εμφανίζουν δράση έναντι των AOA παρά μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην επιλεκτική δράση των συγκεκριμένων παρεμποδιστών στα AOB ή στην περιορισμένη συμμετοχή των AOA στη νιτροποίηση στα εδάφη που εφαρμόζεται ο παρεμποδιστής [70]. Συνεπώς, είναι σημαντική η χρήση ακόμα και η ανακάλυψη νέων ΠΝ που θα δρουν τόσο στα AOB όσο και στα AOA.

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται σχετικά με την επίδραση των ΠΝ στα Comammox, αφού πρώτα διαλευκανθεί ο ακριβής οικολογικός τους ρόλος τους στη νιτροποίηση στο έδαφος. Ωστόσο, σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες, ΠΝ όπως τα allylthiourea, octyne και chlorate μπορούν να παρεμποδίσουν τη δράση των Comammox [7,30].

1.4 Το αντιοξειδωτικό Ethoxyquin και η επίδραση του στη νιτροποίηση

Η χρήση διαφόρων αγροχημικών ουσιών αποτελεί κοινή γεωργική πρακτική για τη βελτίωση και την προστασία των καλλιεργειών και τη διασφάλιση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων. Στις τάξεις των αγροχημικών συμπεριλαμβάνονται ουσίες όπως τα γεωργικά φάρμακα, τα λιπάσματα και τα βελτιωτικά εδάφους. Τελικός αποδέκτης των ουσιών αυτών, ανεξάρτητα από τον τρόπο χρήσης και εφαρμογής τους, είναι το έδαφος, όπου και αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Παραδείγματα γεωργικών φαρμάκων που επιδρούν στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς, που αποτελούν εν δυνάμει βιοδείκτες της φυσιολογικής κατάστασης της μικροβιακής λειτουργίας στο έδαφος [71], έχουν ήδη

αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν τα εντομοκτόνα chlordane και BHC [72] που βρέθηκαν να αναστέλλουν το μηχανισμό της νιτροποίησης και να μειώνουν την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών [72]. Πιο πρόσφατα παραδείγματα αποτελούν το καπνιστικό εδάφους dazomet και το μυκητοκτόνο ortho-rhenylphenol [73,77] που βρέθηκαν να καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου *amoA* [73] και να επιβραδύνουν το ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος [77], αντίστοιχα.

Το ethoxyquin (EQ) (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) είναι αντιοξειδωτικό της ομάδας των κινολινών [74] που έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την οξείδωση των λιπιδίων [75]. Η αντιοξειδωτική δράση του EQ έγκειται στην ιδιότητα του να αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που συναντά, καθώς παρεμβάλλεται προστατεύοντας άλλες ενώσεις. Τέσσερις κύριοι μεταβολίτες προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξείδωσης του EQ: 2,4,6-dimethylquinoline, quinone-imine-N-oxide, quinone-imine, και ethoxyquin 1,8-dimer [78]. Τα προϊόντα οξείδωσης του EQ έχουν εξίσου αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που διακρίνει το EQ από άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες [79]. Οι γενικές ιδιότητες του EQ παρατίθενται στο Πίνακα 2.

Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης, το EQ χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό στη βιομηχανία κρεάτων και ψαριών και στα συσκευαστήρια φρούτων για τη μετασυλεκτική προστασία των μήλων από τη φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητας τους, που εκδηλώνεται με τη μορφή της καστανόχρωσης (scald) της επιδερμίδας των καρπών [74]. Η εφαρμογή του EQ στις μονάδες αυτές οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις του EQ και χρήζουν επεξεργασίας πριν την οριστική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Εξαιτίας ωστόσο του υψηλού κόστους που ενέχει η διαχείριση των αποβλήτων και της απουσίας καθιερωμένου συστήματος διαχείρισης, καταλήγουν τελικά στο περιβάλλον μέσω απόρριψης σε γειτονικούς υδάτινους ή εδαφικούς φορείς.

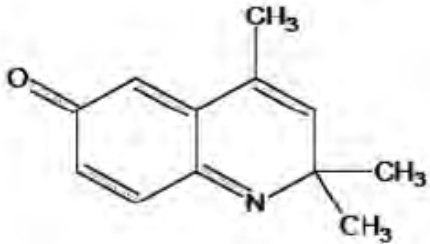

Πίνακας 2. Οι ιδιότητες και η χημική δομή του Ethoxyquin (EQ)

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	Ethoxyquin (EQ)
Χημικός τύπος	$C_{14}H_{19}NO$
Μοριακό βάρος	217.31 g/mol
Σημείο βρασμού	125 ° C σε 1-2 mm Hg
Ειδικό βάρος	1.028 – 1.032

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (ΒΦΠ) έδειξαν πως το ethoxyquin (EQ) στο έδαφος οξειδώνεται ταχύτατα προς δύο κύρια μεταβολικά προϊόντα, τα quinone imine (QI) και 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) (Πίνακας 3) [76, 77], που εμφανίζουν όμοια αντιοξειδωτική δράση με το ethoxyquin (EQ) [75]. Το QI αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη, σχηματίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και εμφανίζει μικρότερη υπολειμματικότητα σε σχέση με το έμμονο EQNL που αποτελεί το δευτερεύοντα μεταβολίτη και σχηματίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις [77]. Ακόλουθες μετρήσεις σε μοριακό (RT-q-PCR *amoA* γονιδίου) και βιοχημικό επίπεδο (δυσνητική νιτροποίηση) έδειξαν προσωρινή αναστολή της νιτροποίησης στο έδαφος σε όλες τις μεταχειρίσεις όπου ο κύριος μεταβολίτης QI εφαρμόστηκε ή σχηματίστηκε (QI, EQ και μίγμα QI+EQNL) [77]. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω ενώσεων στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη νιτροποίηση παραμένει άγνωστος.

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή θα μελετηθεί η επίδραση των μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI και EQNL σε δύο αντιπροσωπευτικά εδαφογενή στελέχη των AOB, τα *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*.

Πίνακας 3. Χημικές δομές μεταβολικών προϊόντων του EQ στο έδαφος.

Μεταβολικά προϊόντα EQ	Χημική δομή
2,6-Dihydro-2,2, 4-trimethyl-6-quinone imine (quinone imine, QI)	
2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL)	

1.5 Νιτρωδοποιητικά Βακτηρία που μελετήθηκαν

1.5.1 *Nitrosomonas europaea*

Το είδος αυτό αποτελεί το πιο μελετημένο AOB που συμμετέχει στο κύκλο του αζώτου [80]. Το *Nitrosomonas europaea* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, που ανήκει στα β-πρωτεοβακτήρια και έχει σχήμα βακίλου [81]. Απαντάται σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας και ανόργανα άλατα, όπως το έδαφος, τα λύματα, το γλυκό νερό

και συχνά σε ρυπασμένες περιοχές με υψηλά επίπεδα αζωτούχων ενώσεων [81]. Όπως και τα περισσότερα είδη του γένους *Nitrosomonas*, έτσι και το *Nitrosomonas europaea* αναπτύσσεται βέλτιστα σε εύρος θερμοκρασίας 20-30°C, εύρος pH 6-9 [8] και απουσία φωτός [81].

Το γονιδίωμα του *Nitrosomonas europaea* είναι οργανωμένο σε ένα κυκλικό χρωμόσωμα. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν υπέδειξαν πως το γονιδίωμα διαιρείται σε δύο άνισα αντίγραφα, από τα οποία παράγονται περίπου 2460 πρωτεΐνες [81]. Το *Nitrosomonas europaea* είναι ένας χημειολιθότροφος μικροοργανισμός, όπως όλα τα AOB. Το στέλεχος φέρει δύο αντίγραφα του οπερονίου *amoCAB* για τη παραγωγή της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετατροπή της αμμωνίας (NH₃) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) σε υδροξυλαμίνη (NH₂OH). Για τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης (NH₂OH) σε νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻) το στέλεχος διαθέτει ένα αντίγραφο για κάθε υπομονάδα του τριμερούς ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO) (Εικόνα 13) [81].



Εικόνα 13. Η διάταξη των γονιδίων οξείδωσης της αμμωνίας στο *N. europaea* [81].

Τέλος, για παραγωγή N₂O φέρει τα απαραίτητα γονίδια των ενζύμων της νιτρικής οξειδοαναγωγής (NIR) και της οξειδοαναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NOR) [81]. Το ένζυμο NOR οδηγεί σε σημαντική εκπομπή N₂O [81,82].

Η πηγή άνθρακα για το στέλεχος είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), γι' αυτό και θεωρείται αυτότροφος μικροοργανισμός. Η καθήλωση του CO₂ πραγματοποιείται μέσω του κύκλου του Calvin. Παράλληλα, στο στέλεχος έχουν ταυτοποιηθεί και τα απαραίτητα γονίδια για τη γλυκόλυση, γλυκονεογένεση και το κύκλο του Krebs. Ο άνθρακας που καθηλώνεται από το κύκλο του Calvin, χρησιμοποιείται για να καλύψει τις απαιτήσεις του στελέχους σχετικά με τη σύνθεση των βιολογικών μακρομορίων όπως λιπίδια, αμινοξέα, συστατικά κυτταρικού τοιχώματος. Η σύνθεση αυτή πραγματοποιείται με τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων, τα οποία παράγονται από το *N. europaea* [81].

Σε αντίθεση με την πληθώρα των γονιδίων σύνθεσης, τα γονίδια για το καταβολισμό οργανικών ενώσεων είναι περιορισμένα. Κατά τη γονιδιωματική ανάλυση δεν ταυτοποιήθηκαν γονίδια καταβολισμού πουρινών, πυριμιδινών και των περισσότερων αμινοξέων. Παρ' όλα αυτά γονίδια ενζύμων για το καταβολισμό των λιπαρών οξέων ταυτοποιήθηκαν στο γονιδίωμα του στελέχους [81].

Το *N. europaea* φέρει επιπλέον, μεγάλο αριθμό γονιδίων για μεταφορείς ανόργανων στοιχείων, ενώ τα συστήματα μεταφοράς οργανικών στοιχείων είναι πιο περιορισμένα. Στο στέλεχος παράγονται μεταφορείς ABC για μεταφορά θειϊκών ιόντων, νιτρικών ιόντων και μερικών οργανικών ενώσεων. Επιπλέον, υπάρχουν συστήματα μεταφοράς μαννόζης και φρουκτόζης καθώς και δευτερεύοντες μεταφορείς για μεταφορά χαλκού, καλίου και

αμμωνίας. Η πρόσληψη του σιδήρου από το περιβάλλον πραγματοποιείται από αρκετούς υποδοχείς οι οποίοι σχετίζονται με περισσότερα από 20 γονίδια. Ωστόσο, στο στέλεχος συναντώνται γονίδια για την παραγωγή μιας μόνο σιδηροφόρου πρωτεΐνης [81].

Το *N. europaea* έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές έρευνες για μελέτη της επίδρασης διάφορων ΠΝ στα ΑΟΒ. Τα DCD και NP σε συγκεντρώσεις 300 και 1 ppm, αντίστοιχα, βρέθηκαν να αναστέλλουν αποτελεσματικά τη παραγωγή νιτρικών ιόντων, προκαλώντας μείωση κατά 73% και 93%, αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα, δρώντας στο ένζυμο της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) [83,84]. Το ακετυλένιο [62] και η allylthiourea [86] σε δόσεις 20 και 10μΜ, αντίστοιχα, βρέθηκε να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *N. europaea*. Επιπρόσθετα, μελέτες που αφορούν στη δράση των ΒΠΝ που παράγονται από τα φυτά *Sorghum bicolor* και *Brachiaria humidicola*, έδειξαν αναστολή της νιτρωδοποίησης στο *N. europaea*.

1.5.2 *Nitrosospira multiformis*

Το δεύτερο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δράσης των μεταβολικών προϊόντων του ethoxyquin (EQ), ανήκει στο είδος *Nitrosospira multiformis*. Το είδος αυτό είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που ανήκει στα β-πρωτεοβακτήρια [88], με σχήμα λοβού και με διαμερισματοποιημένο κυτταρόπλασμα [89]. Το *N. multiformis* απομονώνεται από ουδέτερα εδάφη και παίζει κύριο ρόλο στη χερσαία ολοκλήρωση του κύκλου του αζώτου [88]. Όπως, τα περισσότερα στελέχη του γένους *Nitrosospira*, έτσι και το *N. multiformis* αναπτύσσεται βέλτιστα σε εύρος θερμοκρασίας 25-30°C, εύρος pH 6.6-7.5 σε αερόβιες συνθήκες και απουσία φωτός [89].

Το γονιδίωμα του *N. multiformis* είναι οργανωμένο σε ένα κυκλικό χρωμόσωμα και σε τρία πλασμίδια. Συνολικά, παράγονται περίπου 2827 πρωτεΐνες από το γονιδίωμα του βακτηρίου [90]. Το *N. multiformis*, όπως και τα ΑΟΒ, είναι χημειολιθότροφος μικροοργανισμός. Γονιδιωματικές αναλύσεις έδειξαν την ύπαρξη τριών αντιγράφων του οπερονίου *amoCAB* και δύο επιπλέον αντιγράφων του γονιδίου *amoC* για την παραγωγή της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), που καταλύει την μετατροπή της αμμωνίας (NH₃) ή των αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) σε υδροξυλαμίνη (NH₂OH). Ο ίδιος αριθμός αντιγράφων βρέθηκε και για την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO), που καταλύει τη μετατροπή της υδροξυλαμίνης (NH₂OH) σε νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻) [90]. Τέλος, για τη παραγωγή N₂O από τα νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻) φέρει τα απαραίτητα γονίδια των ενζύμων της νιτρικής οξειδοαναγωγής (NIR) και της οξειδοαναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NOR) [90]. Τα επίπεδα εκπομπής N₂O είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα στο *N. europaea*, ωστόσο εξακολουθούν να είναι σημαντικά [90].

Το *N. multiformis* είναι αυτότροφος μικροοργανισμός και διαθέτει ένα αντίγραφο του οπερονίου *cbb*, που περιλαμβάνει όλα τα γονίδια για την εκτέλεση του κύκλου του Calvin μέσω του οποίου γίνεται η καθήλωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Ο καθηλωμένος άνθρακας χρησιμοποιείται προκειμένου ο μικροοργανισμός να παράγει απαραίτητα βιολογικά μακρομόρια για την επιβίωση του, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος [90]. Παράλληλα, το στέλεχος διαθέτει στο γονιδίωμα όλα τα απαραίτητα γονίδια για την πραγματοποίηση του κύκλου του Krebs καθώς και τα γονίδια

για τη γλυκόλυση, τη γλυκονογένεση και το κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Μέσω αυτών των μονοπατιών, ο μικροοργανισμός παράγει ενέργεια [90], ωστόσο η απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη του στελέχους παρέχεται αυστηρά από την οξείδωση της αμμωνίας [90]. Το γονιδίωμα του *N. multiformis* περιέχει μεγάλο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια για τη μεταγωγή σήματος, αποδεικνύοντας πιθανώς την ικανότητα του οργανισμού να προσαρμόζεται στις περιβαλλοντικές μεταβολές [39,54,90].

Το *N. multiformis* φέρει επιπλέον ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με μεταφορείς ανόργανων και οργανικών στοιχείων. Με τη βοήθεια γονιδιωματικών αναλύσεων ταυτοποιήθηκαν γονίδια μεταφοράς ανόργανου αζώτου, μεταφορείς ABC που συμβάλλουν στη πρόσληψη πεπτιδίων, φωσφορικών ιόντων, ιόντων μαγνησίου και ψευδαργύρου, μεταφορείς ιόντων και κυρίως καλίου. Τέτοιου είδους μεταφορείς καλίου δεν εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του *N. europaea*. Η μεταφορά του σιδήρου στο *N. multiformis* πραγματοποιείται από ειδικούς υποδοχείς που κωδικοποιούνται από 29 περίπου γονίδια ένας σχετικά μικρός αριθμός σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αριθμό στο *N. europaea* [90].

Το *N. multiformis* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της επίδρασης διάφορων ΠΝ στα AOB. Σύμφωνα με τους Shen et al. [13], το NP δεν προκάλεσε σημαντική αναστολή της νιτρωδοποιητικής δραστηριότητας του στελέχους *N. multiformis*, ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (173 μM) ενώ αντίθετα η allylthiourea βρέθηκε να προκαλεί σημαντική αναστολή της νιτρωδοποιητικής δραστηριότητας του στελέχους σε συγκεντρώσεις 0.2-0.4 μM [13]. Επιπρόσθετα, ο παρεμποδιστής DCD βρέθηκε να προκαλεί μείωση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* στο *N. multiformis* [13]. Στην ίδια μελέτη συγκέντρωση του DCD ίση με 100 μM προκάλεσε πλήρη αναστολή της παραγωγής νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) [13]. Όπως το *N. europaea* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δράσης ΒΠΝ, έτσι και το *N. multiformis* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πειραματικές μελέτες όπου και αποδείχθηκε η αναστολή της νιτροποίησης στο στέλεχος μετά από εμβολιασμό με εκχυλίσματα ιστών από τις ρίζες των φυτών [56].

1.6 ΣΤΟΧΟΙ

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του επιπέδου αναστολής της νιτροποίησης στα AOB από τους μεταβολίτες του EQ, QI και EQNL. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση των QI και EQNL στην αύξηση (αφθονία *amoA* γονιδίου, qPCR) και τη λειτουργία (παραγωγή NO_2^- στις υγρές καλλιέργειες) δυο αντιπροσωπευτικών εδαφογενών στελεχών των AOB, *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multiformis*, σε σύγκριση με τους γνωστούς και εμπορικά διαδεδομένους ΠΝ, nitaryrin και dicyandiamide (DCD). Η αποδόμηση των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες μελετήθηκε παράλληλα, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα τους σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες αλλά και για να πραγματοποιηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας των ουσιών και των παρατηρούμενων μεταβολών στην αφθονία και τη λειτουργία των AOB.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Καλλιέργεια στελεχών AOB *in vitro*

Τα δύο στελέχη των AOB, *Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multififormis*, διατέθηκαν από την συλλογή του Prof. G. Nicol (Ecole Centrale de Lyon, France). Τα παραπάνω στελέχη αναπτύχθηκαν αερόβια, χωρίς ανακίνηση, σε θρεπτικό μέσο Skinner και Walker [91], υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι τελικές τους συγκεντρώσεις στο μέσο παρατίθενται στο Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Υλικά και συγκεντρώσεις στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Skinner και Walker.

ΥΛΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 mM NH_4^+ (0.066 g L ⁻¹)
KH_2PO_4	1.47 mM (0.2 g L ⁻¹)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.27 mM (0.04 g L ⁻¹)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.16 mM (0.04 g L ⁻¹)
phenol red (0.05%)/δείκτης pH	1.41 μM (1 ml L ⁻¹)
FeNaEDTA (7.5 mM, in parcel)	7.5 μM (1 ml L ⁻¹)
Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (1M)	1 mM (1 ml L ⁻¹)

Η επώαση των βακτηρίων έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 28 °C και σκοτάδι. Το θρεπτικό διάλυμα περιείχε NH_4^+ , σε συγκέντρωση 1mM. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε σε τιμή μεταξύ 7.5-8.0 με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (1M). Η διατήρηση της τιμής του pH στα παραπάνω επίπεδα διαπιστώνονταν οπτικά από το ελαφρύ ροζ χρώμα που εμφανίζει η υγρή καλλιέργεια σε αυτές τις συνθήκες. Στις περιπτώσεις όπου το pH μειωνόταν εξαιτίας της παραγωγής των νιτρικών ιόντων (NO_2^-), η επαναρύθμιση του πραγματοποιούνταν με προσθήκη κατάλληλου όγκου διτανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3).

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Η επίδραση των μεταβολικών προϊόντων του EQ στα επιλεγμένα στελέχη των AOB μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν μεταξύ 0.27-540 μM (0.05-100 mg L⁻¹) και 0.5-500 μM (0.1-100 mgL⁻¹), για τα QI και EQNL, αντίστοιχα (Πίνακας 5). Το εύρος των συγκεντρώσεων επιλέχθηκε με βάση τα ευρήματα προηγούμενων μελετών με μικροκόσμους εδάφους [77]. Για κάθε μεταχείριση, 50 mL από το θρεπτικό μέσο μεταφέρονταν από τους 4°C όπου διατηρούνταν, σε γυάλινα μπουκάλια

Duran (100mL) που τοποθετούνταν στους 28 °C για λίγες ώρες πριν τον εμβολιασμό. Αφού το μέσο έφτανε στην επιθυμητή θερμοκρασία πραγματοποιούνταν εμβολιασμός του μέσου με 1% (ο/ο) φρέσκιας καλλιέργειας των στελεχών στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Παράλληλα με τα QI και EQNL, μελετήθηκαν συγκριτικά και τα επίπεδα αναστολής των γνωστών παρεμποδιστών νιτροποίησης, nitrarygin (NP) και dicyandiamide (DCD). Οι παραπάνω ουσίες προστέθηκαν στις καλλιέργειες των μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις 11.54 mg L⁻¹ (50 μM) και 840.8 mg L⁻¹ (10 mM), αντίστοιχα, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [92] βρέθηκε να παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση. Τα εμπορικά πρότυπα των ουσιών dicyandiamide (DCD) (99%) και nitrarygin (NP) (≥98%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Λόγω της απουσίας διαθέσιμων εμπορικών πρότυπων ουσιών, η σύνθεση των δυο μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI και EQNL πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με τους Thorisson et al. [74].

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

EQNL		QI	
mgL ⁻¹	μM	mgL ⁻¹	μM
100	500	100	540
25	125	50	270
5	25	25	135
1	5	5	27
0.1	0.5	0.5	2.7
-	-	0.05	0.27

Εξαιτίας της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των ουσιών QI, EQNL και NP η προσθήκη τους στις καλλιέργειες έγινε σε 0.1% (ο/ο) dimethylsulfoxide (DMSO). Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πυκνά διαλύματα εργασίας κατάλληλης συγκέντρωσης των παραπάνω ουσιών σε DMSO, το οποίο προηγουμένως αποστειρώθηκε μέσω διήθησης με ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο PTFE 0.22 mm. Αντίθετα, το DCD εμφανίζει υψηλή υδατοδιαλυτότητα γι' αυτό και για την παρασκευή του αντίστοιχου διαλύματος εργασίας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Το σύνολο των μεταχειρίσεων που μελετήθηκαν καθώς και οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Περιγραφή των μεταχειρίσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Μεταχείριση	Συγκέντρωση διαλύματοςεργασίας (working stock)
Control	χωρίς προσθήκη ΠΝ
DMSO	προσθήκη DMSO
EQNL500μM	EQNL 100 mgmL ⁻¹
EQNL 125μM	EQNL 25mgmL ⁻¹
EQNL 25μM	EQNL 5mgmL ⁻¹
EQNL 5μM	EQNL 1mgmL ⁻¹
EQNL 0.5μM	EQNL 0.1mgmL ⁻¹
QI 540μM	QI 100 mgmL ⁻¹
QI270μM	QI 50 mgmL ⁻¹
QI 135μM	QI 25 mgmL ⁻¹
QI 27μM	QI 5 mgmL ⁻¹
QI 2.7μM	QI 0.5 mgmL ⁻¹
QI 0.27μM	QI 0.05 mgmL ⁻¹
Nitrapyrin 50μM	Nitrapyrin 11.54mgmL ⁻¹
DCD 10mM (840.8 mgL ⁻¹)	DCD 840.8 mgmL ⁻¹

2.3 Μελέτη της επίδρασης των QI και EQNL στη λειτουργία των AOB

Η επίδραση των μελετούμενων ουσιών στη λειτουργία των επιλεγμένων στελεχών των AOB ελέγχονταν σε καθημερινή βάση, ανά 12 ώρες, για χρονικό διάστημα περίπου δυο εβδομάδων με μέτρηση των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων χρωματομετρικά σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν στα 540nm με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer). Για τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια diazotizing (0.5 g sulfanilamide σε 100 mL 2.4 M HCl) και coupling (0.3 g N-(1-naphthyl)-ethylenediamine HCl σε 100 mL 0.12 M HCl) σε ποσότητες 20 μL το καθένα, για κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοδότησης που περιείχε 100μL δείγματος, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Keeney and Nelson [93]. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων πραγματοποιήθηκε με βάση πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων NaNO₂-NO₂⁻ (0-100 μM).

2.4 Απομόνωση DNA από τα κύτταρα των AOB

Σε τακτά χρονικά διαστήματα και με βάση τις μετρήσεις των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες, συλλέγονταν δείγματα καλλιέργειας από κάθε μεταχείριση. Για το σκοπό αυτό, 2 mL από κάθε μεταχείριση μεταφερόταν σε eppendorfs. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 17,000xg για 10 min, προκειμένου να αφαιρεθεί το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων να χρησιμοποιηθεί για τη απομόνωση του DNA.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένους χρόνους, με το εμπορικό kit NucleoSpin Tissue Genomic DNA from Tissue (MACHERY-NAGEL, Germany) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την απομόνωση του DNA, τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C για την περαιτέρω ανάλυση τους (qPCR).

2.5 Μελέτη της επίδρασης των QI και EQNL στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των *N. europaea* και *N. multiformis* πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R [94]. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'
- *amoA*-2R: 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μ L, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στο Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του *amoA* γονιδίου των AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μ L	1x
Εκκινητής <i>amoA</i> -1F (20 pmol/ μ l)	0.1 μ L	0.2 μ M
Εκκινητής <i>amoA</i> -2R (20 pmol/ μ l)	0.1 μ L	0.2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	0.2 μ L	200ng μ L ⁻¹
DNA	2 μ L	-
ddH ₂ O	2.6 μ L	-
Συνολικός όγκος	10 μ L	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου των AOB.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	
Υβριδοποίηση	57 °C	10 sec	40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95 °C 65-95 °C	1min 0.5 °Cγια 5sec	

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOB στα επιμέρους δείγματα, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς, με τη χρήση αραιώσεων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης (1.88×10^8 - 1.88×10^1 αντίγραφα του γονιδίου *amoA* μL^{-1}) που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο των AOB, σύμφωνα με τους Rousidou et al. [95]. Τα χαρακτηριστικά (efficiency, R^2) των πρότυπων καμπύλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά (efficiency, R^2) των πρότυπων καμπύλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB, στις επιμέρους *in vitro* δοκιμές.

AOB και ουσία	Efficiency (%)	R^2
<i>Nitrosomonas europaea</i> & EQNL	82.3	0.994
<i>Nitrosomonas europaea</i> & QI	86.0	0.995
<i>Nitrospira multiformis</i> & EQNL	85.0	0.993
<i>Nitrospira multiformis</i> & QI	85.5	0.996

2.6 Μελέτη της πορείας αποδόμησης των ουσιών στις υγρές καλλιέργειες

Η πορεία της αποδόμησης των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες παρακολούθηθηκε με ανάλυση δειγμάτων που συλλέγονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC-PDA: SHIMADZU LC-20AD, με στήλη SHIMADZU VP-ODs διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 mL min^{-1} . Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των QI και EQNL, παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των QI και EQNL.

Χημική ουσία	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Θερμοκρασία στήλης ($^{\circ}\text{C}$)
QI	ACN: $\text{H}_2\text{O}+0.25\% \text{NH}_3$	70:30	245	25
EQNL	ACN: $\text{H}_2\text{O}+0.25\% \text{NH}_3$	70:30	230	25

Για τις ανάγκες της ανάλυσης δείγμα από κάθε μεταχείριση μεταφερόταν σε ειδικό φιαλίδιο, στο οποίο είχε προστεθεί προηγουμένως κατάλληλος όγκος ακετονιτριλίου για την εκχύλιση της εκάστοτε ουσίας από το υδατικό θρεπτικό διάλυμα της καλλιέργειας. Ο έλεγχος της γραμμικότητας της ανταπόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση κάθε δραστικής ουσίας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων των μελετούμενων ουσιών (0.05-10 mg/L).

2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 20.0. Τα δεδομένα από τις μετρήσεις παραγωγής νιτρωδών ιόντων και αφθονίας του *amoA* γονιδίου υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (two-way-ANOVA) για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης, του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασής τους. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο κύριων παραγόντων ($p \leq 0.05$) χρησιμοποιήθηκε το Tuckey's post-hoc test προκειμένου να ανιχνευθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο χωριστά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

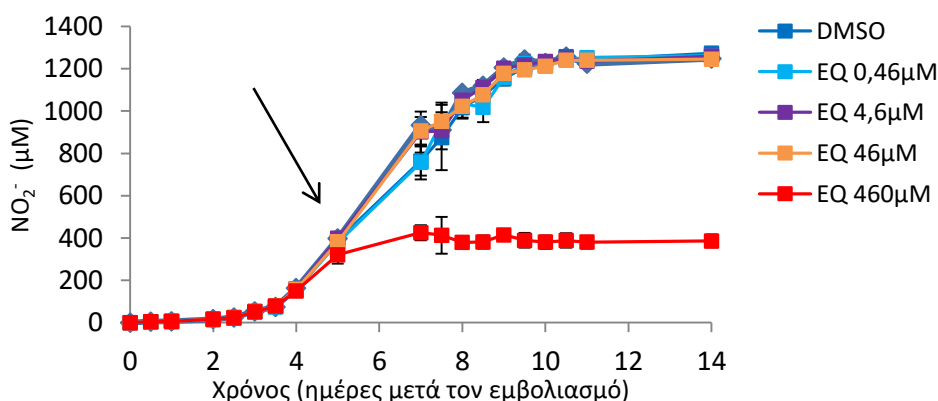
3. Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση ethoxyquin στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια

Σε προηγούμενα πειράματα που διεξήχθησαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μελετήθηκε η επίδραση του αντιοξειδωτικού EQ στα στελέχη των AOB *Nitrosomonas europaea* και *Nitrospira multififormis* σε υγρές καλλιέργειες και σε εύρος συγκεντρώσεων που κυμάνθηκε μεταξύ 0.46-460 μM (0.1-100 mgL^{-1}). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται συνοπτικά για τη διευκόλυνση της παρακολούθησης των περαιτέρω πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και αφορούσαν στην αντίστοιχη επίδραση των μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI και EQNL, στα παραπάνω στελέχη.

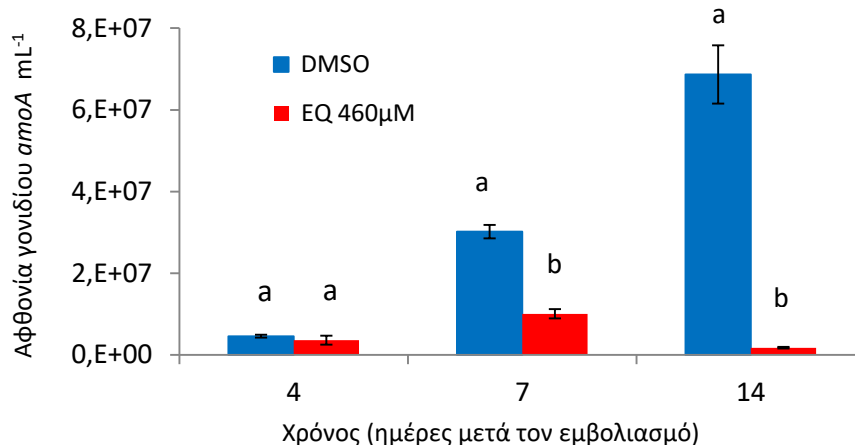
3.1.1 Επίδραση του Ethoxyquin στο στέλεχος του *Nitrosomonas europaea*

Η συσσώρευση νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* μειώθηκε σημαντικά μόνο στην περίπτωση της μεταχείρισης με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQ (460 μM), σημειώνοντας ποσοστό μείωσης ίσο με 69.7% (± 2.4) σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 1).



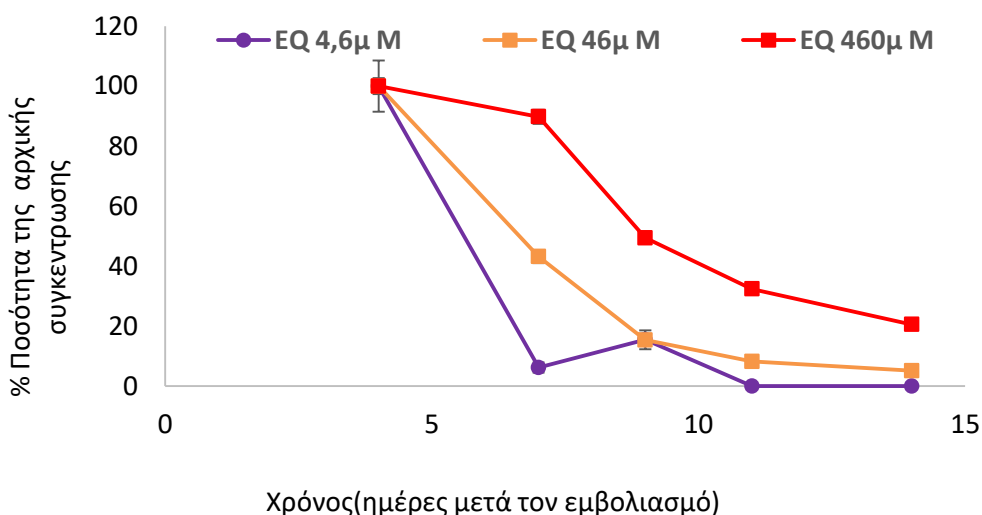
Διάγραμμα 1. Η επίδραση του EQ στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τη χρονική στιγμή κατά την οποία προστέθηκε το EQ στις υγρές καλλιέργειες.

Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του EQ στην αύξηση του *N. europaea*. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν οι 4 (αμέσως πριν την προσθήκη του EQ), 7 και 14 ημέρες, μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2, η υψηλότερη συγκέντρωση του EQ (460 μM), προκάλεσε μείωση της αφθονίας του *amoA* γονιδίου των AOB κατά 3- και 39- φορές περίπου κατά την 7^η και 14^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (3^η και 10^η μέρα μετά την προσθήκη του EQ), αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (one-way-ANOVA, $p < 0.01$).



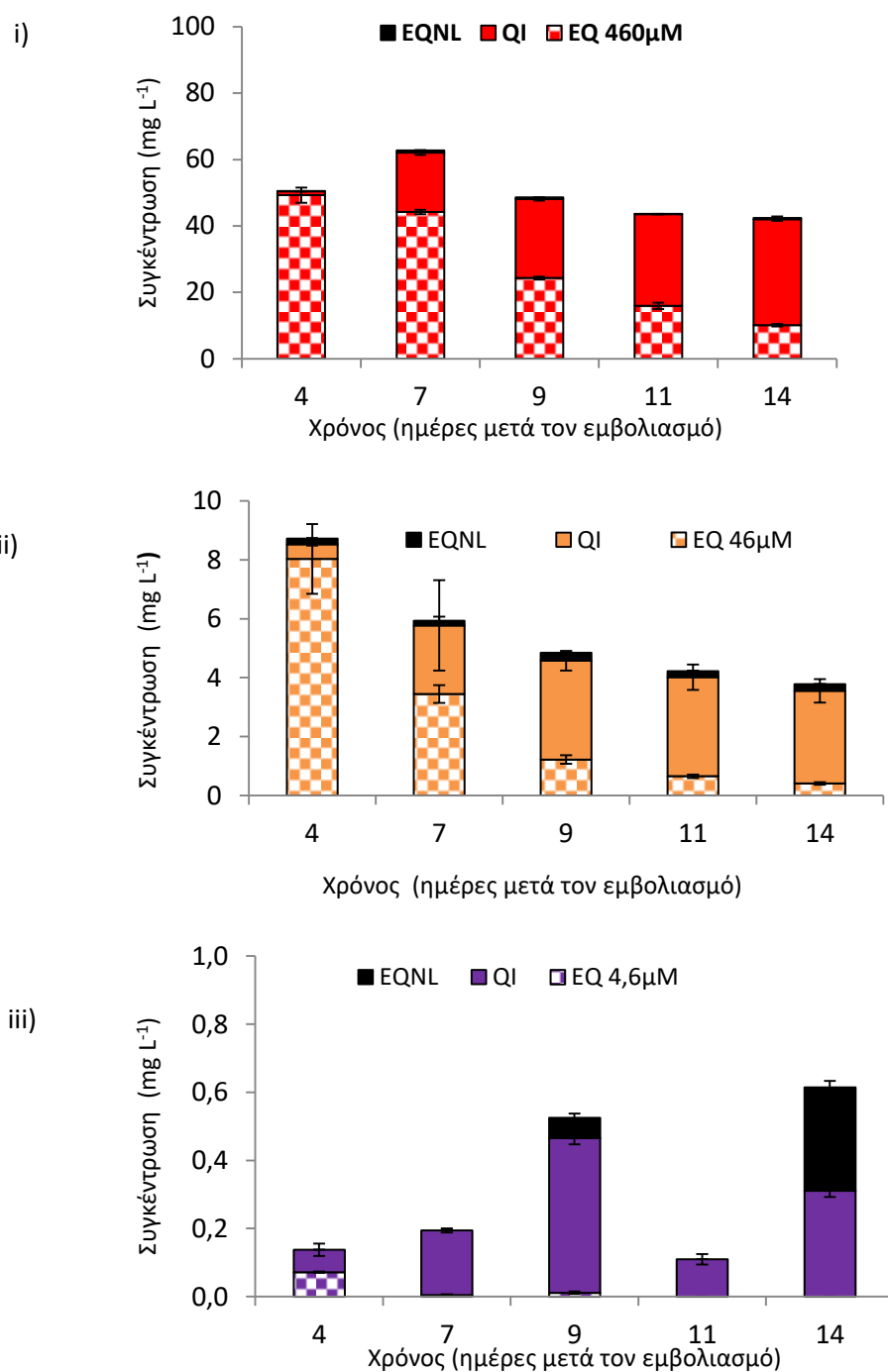
Διάγραμμα 2. Η επίδραση του EQ (460 μM) στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα από την HPLC ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της αποδόμησης και του μεταβολισμού του EQ κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3 και 4 για τις διάφορες συγκεντρώσεις του EQ. Το πρότυπο αποδόμησης του EQ στις *in vitro* καλλιέργειες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3. Το EQ αποδομήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια του πειράματος, εμφανίζοντας ποσοστό αποδόμησης 79.5% επί της αρχικής συγκέντρωσης του κατά την 14^η ημέρα του πειράματος, στην περίπτωση εφαρμογής της υψηλότερης συγκέντρωσης του (460 μM). Στην περίπτωση εφαρμογής των χαμηλότερων συγκεντρώσεων του EQ, 46 και 4.6 μM, τα ποσοστά αποδόμησης που παρατηρήθηκαν ήταν 94.9% και 100%, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3. Πορεία αποδόμησης του ethoxyquin στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*.

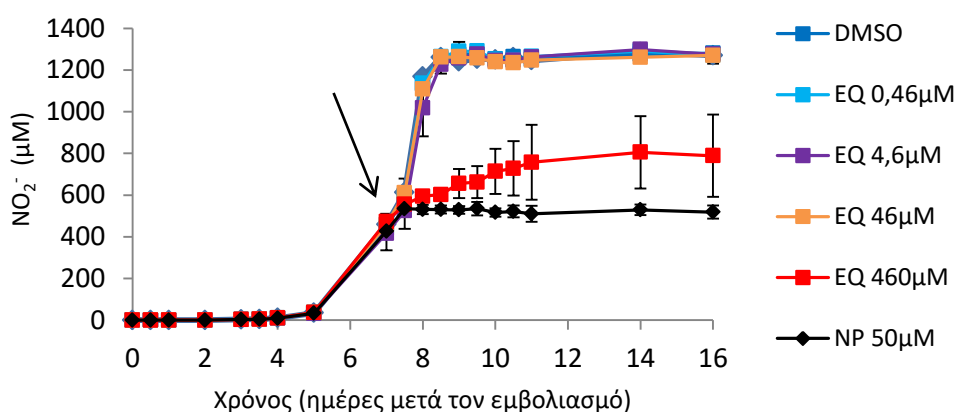
Το EQ στη συγκέντρωση 460 μM (100 mg L^{-1}), οξειδώθηκε ταχέως σε QI και EQNL, με το QI να είναι ο κύριος μεταβολίτης και να συνιστά περίπου το 20% και το 60% της συνολικής υπολειμματικής συγκέντρωσης του EQ την 7^η και την 14^η ημέρα, αντίστοιχα. Ο δευτερεύων μεταβολίτης, EQNL σχηματίστηκε σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, που παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι μέγιστες παρατηρούμενες συγκεντρώσεις ήταν 31.86 και 0.44 mg L^{-1} για τα QI και EQNL, αντίστοιχα. Παρόμοιο, μοτίβο διάσπασης του EQ παρατηρήθηκε και στα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης (46 και 4.6 μM) τα οποία δεν βρέθηκαν να παρεμποδίσουν την αύξηση και τη λειτουργία του *N. euroraea* (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Αποδόμηση και μεταβολισμός του EQ που εφαρμόστηκε στις συγκεντρώσεις: (i) 460 μM (ii) 46 μM (iii) 4.6 μM στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

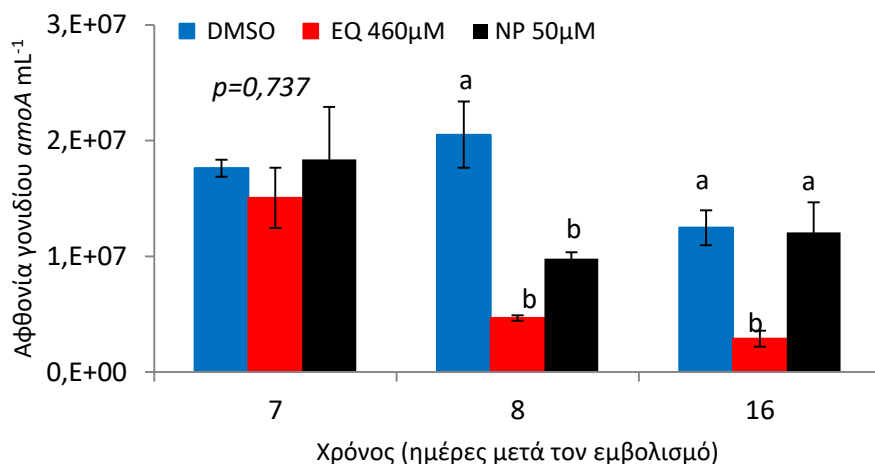
3.1.2 Επίδραση του Εθοxyquin στο στέλεχος του *Nitrosospira multiformis*

Στην περίπτωση των υγρών καλλιιεργειών του *Nitrosospira multiformis*, όπως και στις υγρές καλλιιεργειες του *N. europaea*, η εφαρμογή του EQ προκάλεσε σημαντική μείωση της συσσώρευσης νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) μόνο στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQ, 460 μM , με τα επίπεδα αναστολής να φτάνουν το 38.4% (± 15.4) σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (one-way ANOVA, $p < 0.05$). Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή του NP (50 μM) προκάλεσε 59.5% (± 2.5) αναστολή της νιτρωδοποίησης (Διάγραμμα 5), χωρίς ωστόσο το ποσοστό αυτό να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το αντίστοιχο για το EQ 460 μM ($p = 0.079$).



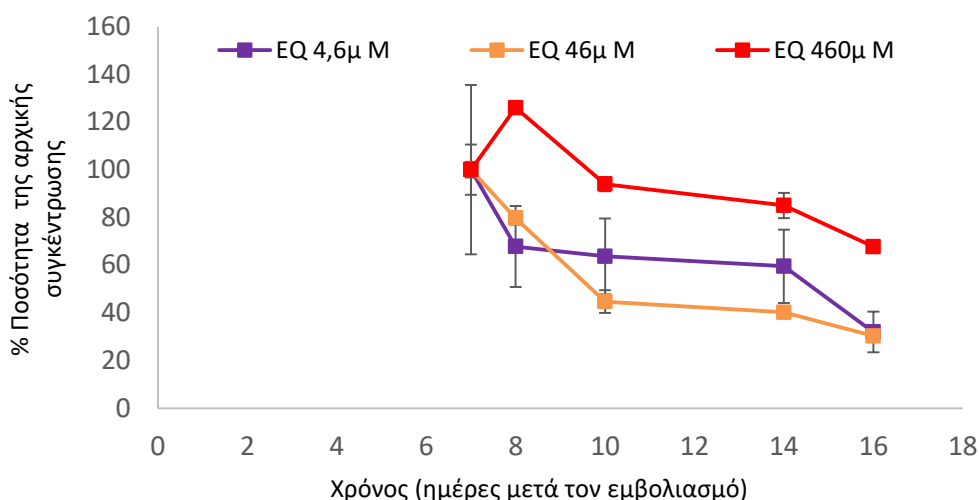
Διάγραμμα 5. Η επίδραση των EQ και NP στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιιεργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τον χρόνο στον οποίο προστέθηκαν οι μελετούμενες ουσίες στις υγρές καλλιιεργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του EQ στην αύξηση του *Nitrosospira multiformis*, υπέδειξαν σημαντική μείωση στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση EQ 460 μM . Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν η 7^η (αμέσως πριν την προσθήκη του EQ), η 8^η και η 16^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών. Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξεως του 22.8% (± 2.0) και 23.2% (± 9.5) (one-way-ANOVA, $p < 0.01$) την 8^η ημέρα και την 16^η ημέρα, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα DMSO. Το NP, παρά την σημαντική ανασταλτική επίδρασή του στη λειτουργία του *N. multiformis*, κατέστειλε την αύξηση του στελέχους μόνο προσωρινά, κατά την πρώτη ημέρα μετά την προσθήκη (8^η ημέρα) της ουσίας στις υγρές καλλιιεργειες, οδηγώντας περίπου σε διπλάσια μείωση της αφθονίας του γονιδίου *amoA* των AOB (one-way-ANOVA, $p = 0,014$). Ωστόσο, η αφθονία του γονιδίου *amoA* αυξήθηκε σε επίπεδα ίσα με αυτά του μάρτυρα (DMSO) κατά την 16^η ημέρα από τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών (Διάγραμμα 6).



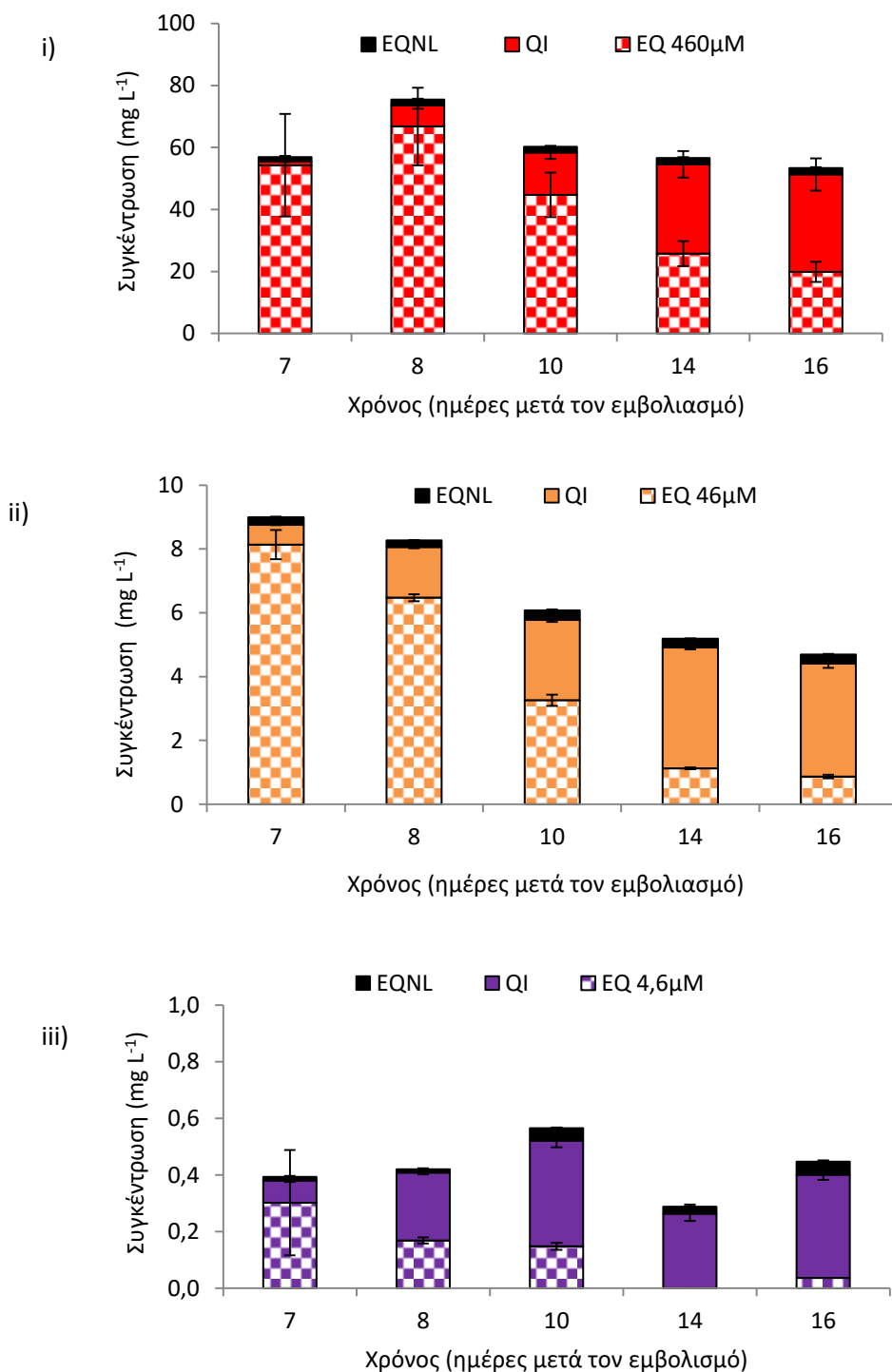
Διάγραμμα 6. Η επίδραση των EQ (460 μM) και NP (50 μM) στη αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης, για την παρακολούθηση της αποδόμησης του μεταβολισμού του EQ στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 7 και 8, για τις διάφορες συγκεντρώσεις του EQ και είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στην περίπτωση των υγρών καλλιεργειών του *N. euroraesa*. Το πρότυπο αποδόμησης του EQ στις *in vitro* καλλιέργειες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7. Το EQ αποδομήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια του πειράματος, εμφανίζοντας ποσοστό αποδόμησης 32.8% επί της αρχικής του συγκέντρωσης κατά την 16^η ημέρα του πειράματος στην περίπτωση εφαρμογής της υψηλότερης συγκέντρωσης (460 μM). Στην περίπτωση εφαρμογής των χαμηλότερων συγκεντρώσεων του EQ, 46 και 4.6 μM, τα ποσοστά αποδόμησης που παρατηρήθηκαν κατά την 16^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (11^η ημέρα μετά την εφαρμογή του EQ) ήταν 69,8% και 68,8%, επί της αρχικής τους συγκέντρωσης, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 7. Πορεία αποδόμησης του EQ στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*.

Το EQ στη συγκέντρωση 460 μM (100 mg L^{-1}), οξειδώθηκε πολύ γρήγορα σε QI και EQNL, με το QI να είναι ο κύριος μεταβολίτης και να εμφανίζει τα μεγαλύτερα επίπεδα της συνολικής υπολειμματικής συγκέντρωσης του EQ. Ο δευτερεύων μεταβολίτης, EQNL σχηματίστηκε σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, που παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι μέγιστες παρατηρούμενες συγκεντρώσεις ήταν 31.4 και 2.1 mg L^{-1} για τα QI και EQNL, αντίστοιχα. Όμοιο, μοτίβο διάσπασης του EQ παρατηρήθηκε και στα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης (46 και 4.6 μM), που δε βρέθηκε να αναστέλλουν την αύξηση και τη λειτουργία του *Nitrospira multiformis* (Διάγραμμα 8).

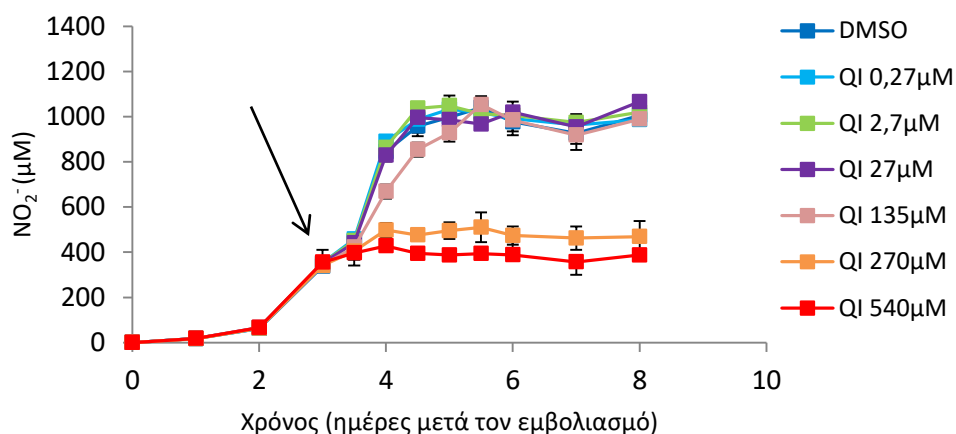


Διάγραμμα 8. Αποδόμηση και μεταβολισμός του EQ που εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις: (i) 460 μM (ii) 46 μM (iii) 4.6 μM στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων.

3.2 Επίδραση του Quinone imine (QI) στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια

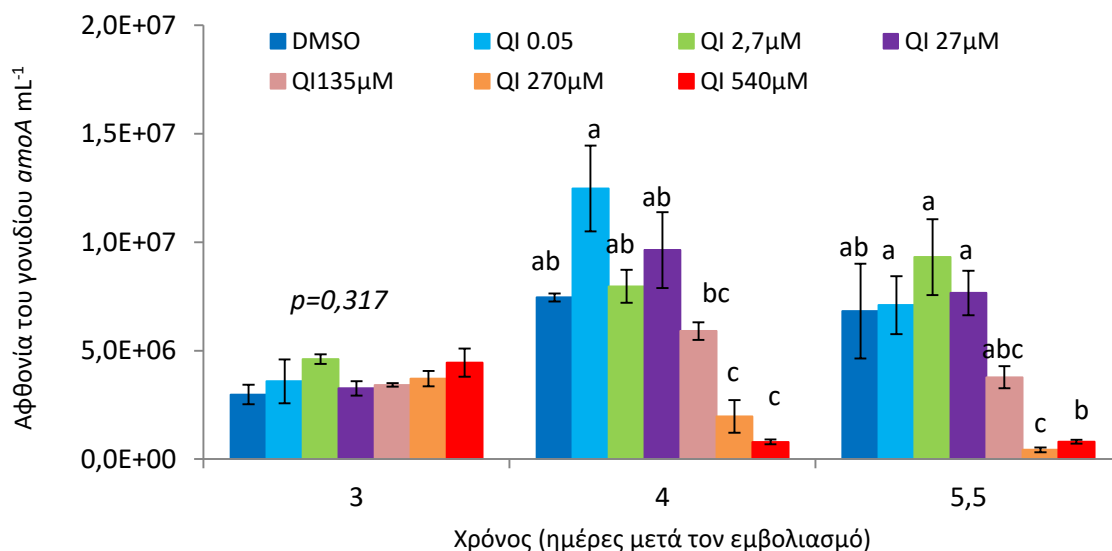
3.2.1 Επίδραση του QI στο στέλεχος του *Nitrosomonas europaea*

Το Διάγραμμα 9 απεικονίζει τη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι μεταχειρίσεις που φαίνεται να παρεμπόδισαν σημαντικά τη λειτουργία του στελέχους σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) ήταν αυτές των 540 και 270 μM . Η παραγωγή των νιτρωδών ιόντων παρουσίασε σημαντική μείωση και στη μεταχείριση του QI 135 μM , ωστόσο η επίδραση αυτή ήταν μόνο προσωρινή και η παραγωγή των νιτρωδών ιόντων επανήλθε σε επίπεδα ανάλογα με αυτά του μάρτυρα (DMSO) στις 5 περίπου ημέρες μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (2 περίπου μέρες μετά την προσθήκη του QI).



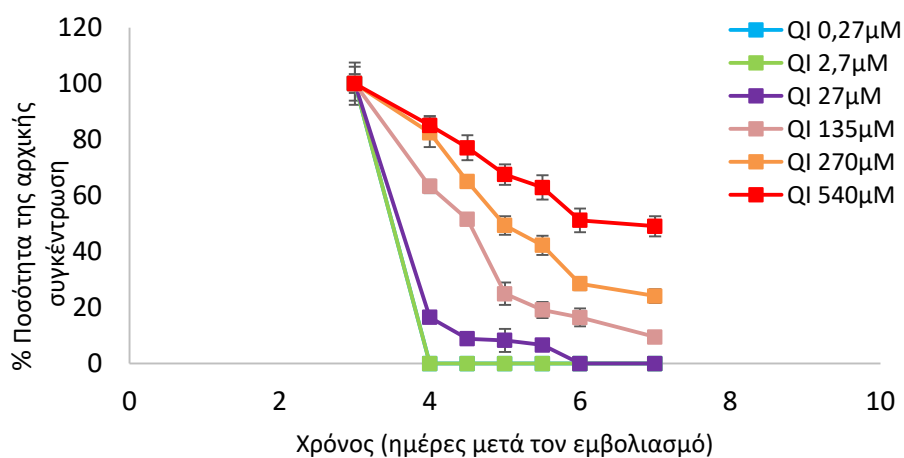
Διάγραμμα 9. Η επίδραση του QI στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τον χρόνο στον οποίο προστέθηκε το QI στις υγρές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του QI στην αύξηση του *Nitrosomonas europaea* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονταν από τους χρόνους των 3 (ημέρα αμέσως πριν την προσθήκη του QI), 4 και 5.5 ημερών. Αμέσως πριν την προσθήκη των μελετούμενων ουσιών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα αντίγραφα του *amoA* γονιδίου των AOB μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων ($p=0.317$). Η αφθονία του γονιδίου *amoA*, μειώθηκε σημαντικά στις μεταχειρίσεις 540 μM και 270 μM , κατά την 4^η και 5.5^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (1 και 1.5 ημέρες μετά την προσθήκη του QI στις υγρές καλλιέργειες), σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO).



Διάγραμμα 10. Η επίδραση του QI στη αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες *N. euoraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

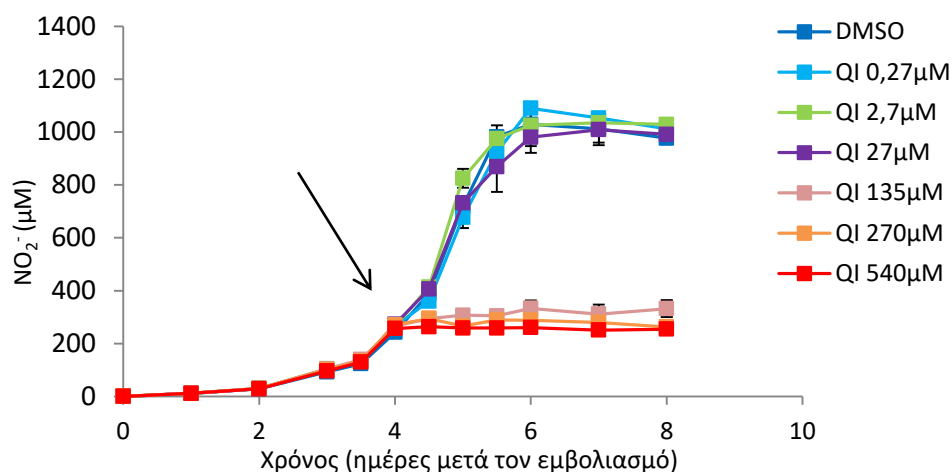
Η πορεία της αποδόμησης του QI στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrosomonas euoraea* παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11. Γενικά, παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αποδόμησης αυξανόμενης της συγκέντρωσης. Έτσι, κατά την 7^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (4 ημέρες μετά την προσθήκη του QI στις υγρές καλλιέργειες) το QI στην περίπτωση των μεταχειρίσεων 540, 270 και 135 μM παρουσίασε ποσοστά αποδόμησης 50.9%, 76.0% και 90.5%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά αποδόμησης των υπόλοιπων μεταχειρίσεων (QI 27 και QI 2.7 μM) για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα, ήταν περίπου 100%. Αποτελέσματα για την αποδόμηση του QI στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.27 μM) δεν παρουσιάζονται γιατί στην περίπτωση αυτή ο μεταβολίτης ανιχνεύονταν σε επίπεδα μικρότερα από το LOQ συστήματος (0.27 μM).



Διάγραμμα 11. Η πορεία αποδόμησης του Quinone imine (QI) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrosomonas euoraea*.

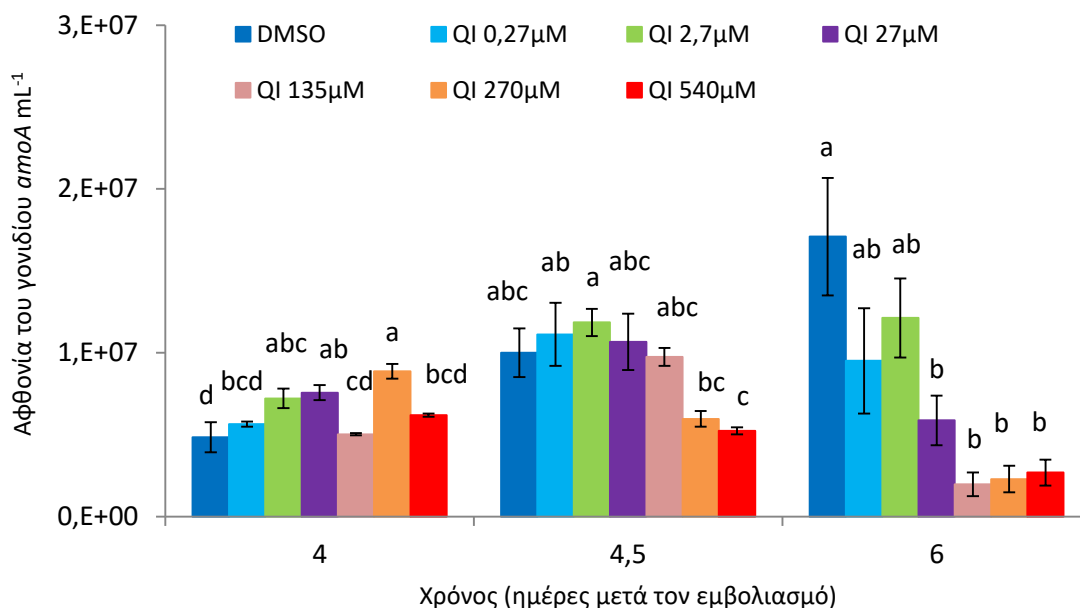
3.2.2 Επίδραση του Quinone imine (QI) στο στέλεχος του *Nitrosospira multiformis*

Η συσσώρευση νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* σημείωσε σημαντική μείωση στις μεταχειρίσεις του QI 540, 270 και 135 μM , σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 12).



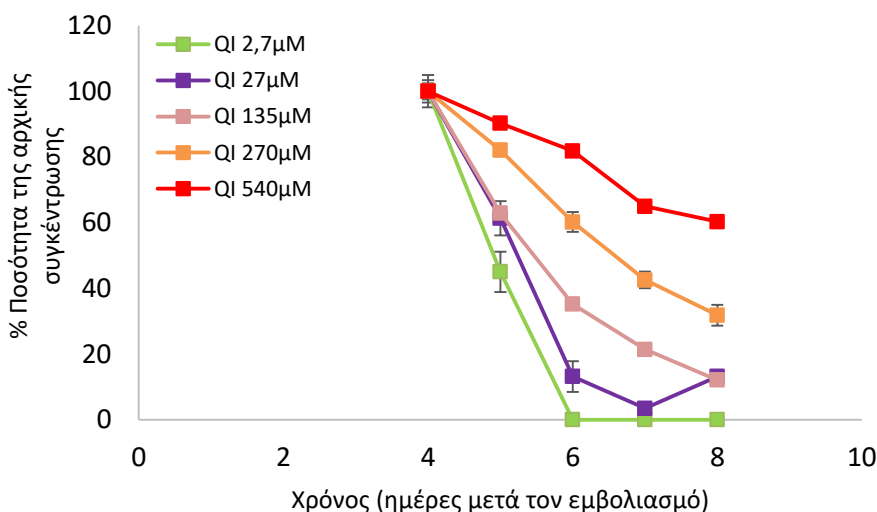
Διάγραμμα 12. Η επίδραση του QI στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τον χρόνο στον οποίο προστέθηκε ο μεταβολίτης στις υγρές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του QI στην αύξηση του στελέχους παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 13. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν η 4^η (αμέσως πριν την προσθήκη του QI στις υγρές καλλιέργειες), η 4.5^η και η 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Αμέσως πριν την προσθήκη του μεταβολίτη παρουσιάστηκαν διαφορές στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων που δε φαίνεται ωστόσο να επηρέασαν την έκβαση των αποτελεσμάτων στους χρόνους που ακολούθησαν. Διαφορές ως προς την αφθονία του γονιδίου *amoA* παρατηρούνται ήδη στις 12 περίπου ώρες από τη προσθήκη του QI (4.5^η ημέρα) στις υγρές καλλιέργειες, ωστόσο καμία από τις μεταχειρίσεις δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μάρτυρα. Αντίθετα, την 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (2 ημέρες μετά την προσθήκη του QI στις υγρές καλλιέργειες) παρατηρείται ξεκάθαρη μείωση της αφθονίας του *amoA* γονιδίου, στις μεταχειρίσεις του QI 540, 270, 135 και 27 μM οι οποίες και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το μάρτυρα.



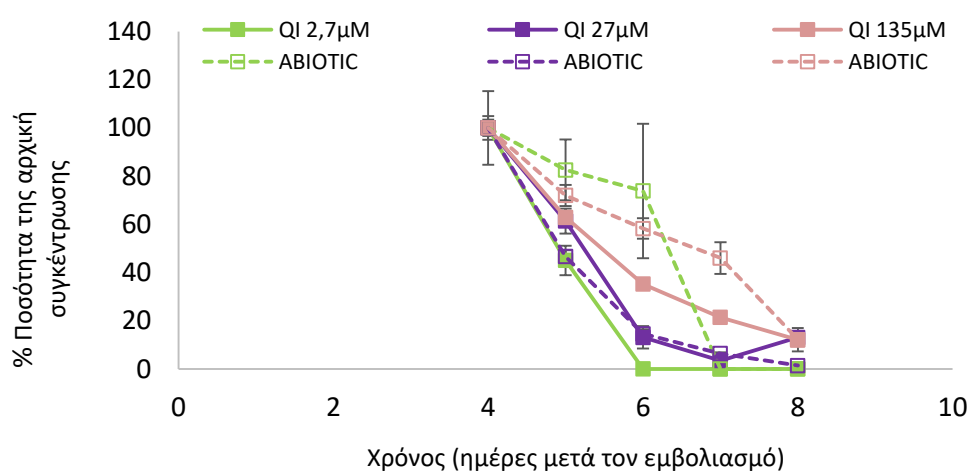
Διάγραμμα 13. Η επίδραση του QI στη αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της αποδόμησης του QI στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 14. Το QI στη μεταχείριση των 540 μM παρουσιάζει ποσοστό διάσπασης 39.7% επί της αρχικής συγκέντρωσης κατά την 8^η ημέρα του πειράματος και μαζί με τη μεταχείριση των 270 μM, με ποσοστό αποδόμησης 68.2%, εμφανίζουν το βραδύτερο ρυθμό αποδόμησης του μεταβολίτη. Την 8^η ημέρα του πειράματος το QI στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 135, 27 και 2.7 μM, παρουσιάζει παρόμοια και υψηλότερα ποσοστά αποδόμησης (87.9, 86.9 και 100% επί της αρχικής συγκέντρωσης, αντίστοιχα). Αποτελέσματα για την αποδόμηση του QI στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.27 μM) δεν παρουσιάζονται γιατί στην περίπτωση αυτή ο μεταβολίτης ανιχνεύονταν σε επίπεδα μικρότερα από το LOQ συστήματος (0.27 μM).



Διάγραμμα 14. Πορεία αποδόμησης του Quinone imine (QI) στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrosospira multiformis*.

Παράλληλα με την αποδόμηση του QI στις υγρές καλλιέργειες του *Nitrosospira multiformis* μελετήθηκε ενδεικτικά (συγκεντρώσεις 135, 27 και 2.7 μM) και η αβιοτική διάσπαση του μεταβολίτη στο θρεπτικό μέσο Skinner and Walker που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές. Η πορεία της αβιοτικής αποδόμησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του QI σε σύγκριση με αυτή στις υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15. Στις μεταχειρίσεις των 135 και 2.7 μM παρατηρήθηκε υστέρηση στην αποδόμηση του QI στο μη εμβολιασμένο με το στέλεχος θρεπτικό μέσο. Αντίθετα, στην περίπτωση της μεταχείρισης των 27 μM η πορεία της αποδόμησης του QI ακολούθησε το ίδιο πρότυπο στο εμβολιασμένο ή μη θρεπτικό μέσο (Διάγραμμα 15).

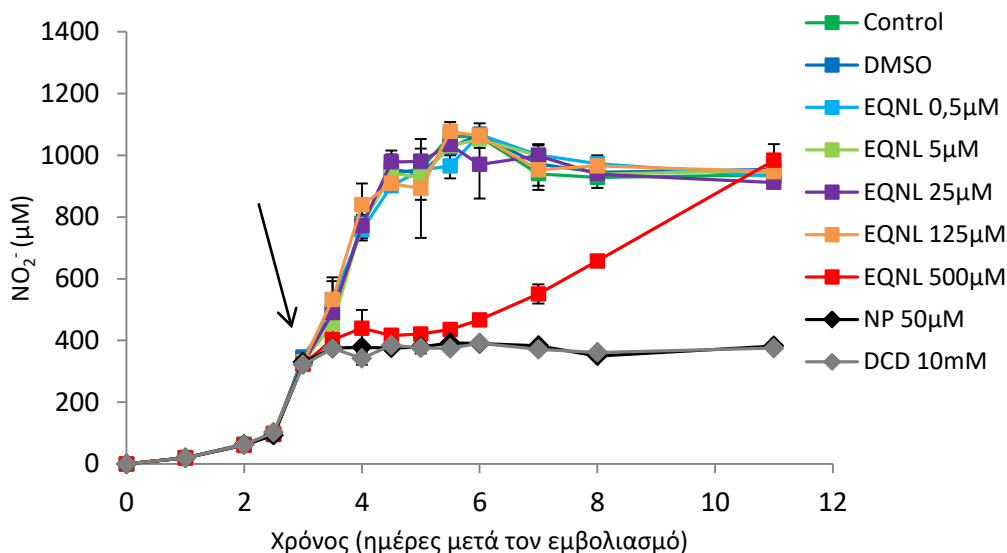


Διάγραμμα 15. Πορεία αποδόμησης του Quinone imine (QI) σε θρεπτικό μέσο Skinner and Walker που εμβολιάστηκε (συμπαγείς γραμμές) ή όχι (διακεκομμένες γραμμές) με το στέλεχος του *Nitrosospira multiformis*

3.3. Επίδραση του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) στα νιτροδοποιητικά βακτήρια

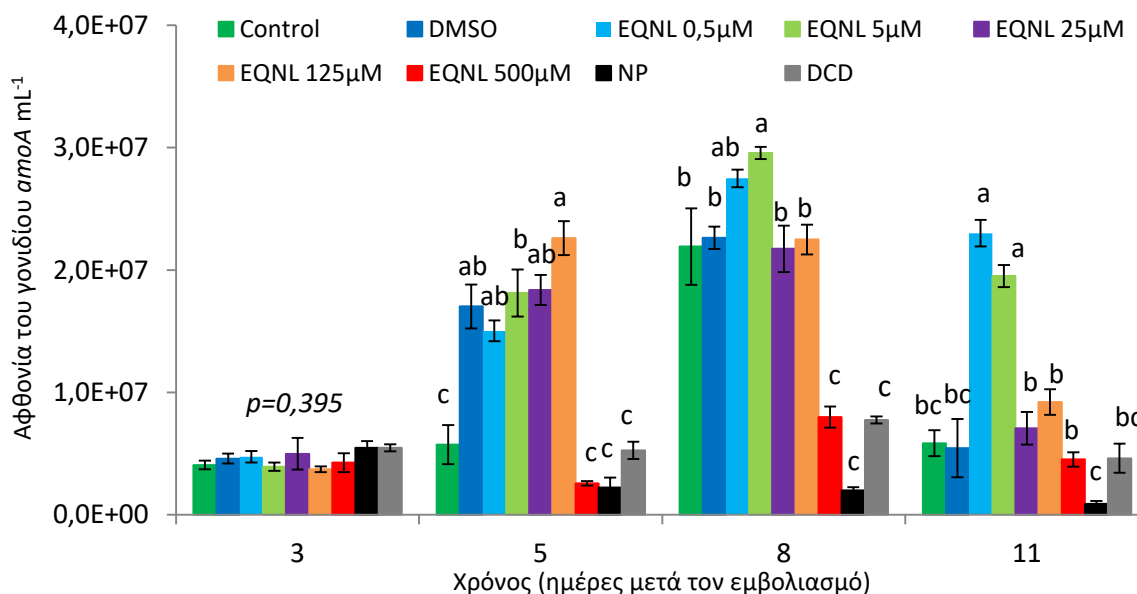
3.3.1 Επίδραση του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) το στέλεχος του *Nitrosomonas euroraea*

Το EQNL όταν εφαρμόστηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση (500 μM) παρεμπόδισε σημαντικά (two-way-ANOVA, $p < 0.05$) την συσσώρευση των νιτροδών ιόντων (NO_2^-) στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*, ωστόσο η αναστολή αυτή ήταν μόνο προσωρινή και η λειτουργία του στελέχους ανακτήθηκε προς το τέλος της μελέτης. Η ανασταλτική δράση του EQNL υπολογίστηκε σε σύγκριση με το μάρτυρα DMSO. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή των παρεμποδιστών NP και DCD προκάλεσε σημαντική και σταθερή αναστολή της παραγωγής νιτροδών ιόντων (NO_2^-) (Διάγραμμα 16).



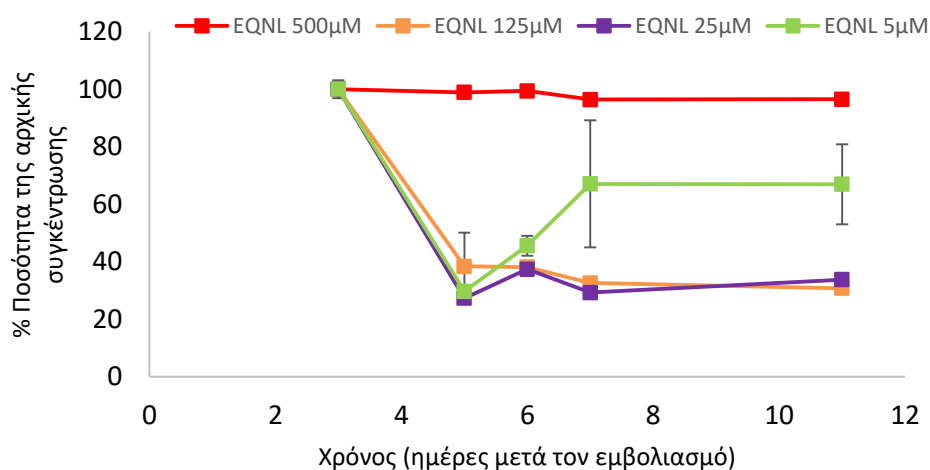
Διάγραμμα 16. Η επίδραση των EQNL, NP και DCD στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τον χρόνο στον οποίο προστέθηκαν οι μελετούμενες ουσίες στις υγρές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του EQNL στην αύξηση του *Nitrosomonas europaea* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 17. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν η 3^η (αμέσως πριν την προσθήκη των EQNL, NP και DCD), η 5^η, η 8^η και η 11^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Αμέσως πριν την προσθήκη των μελετούμενων ουσιών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό των αντιγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων ($p=0.395$). Η αφθονία του γονιδίου *amoA* στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση EQNL 500 μM μειώθηκε σημαντικά από την 5^η έως και την 8^η ημέρα του πειράματος. Ωστόσο, την 11^η μέρα παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των αντιγράφων σε επίπεδα που δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τη μεταχείριση του μάρτυρα (DMSO). Η μεταχείριση του NP, οδήγησε σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* των AOB, μόνο κατά την 5^η και 8^η ημέρα μετά την προσθήκη του παρεμποδιστή στις υγρές καλλιέργειες, σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) χωρίς όμως να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τις μεταχειρίσεις EQNL 500 μM και DCD. Η μεταχείριση του DCD οδήγησε σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων του *amoA* των AOB, μόνο κατά την 8^η ημέρα μετά την προσθήκη του παρεμποδιστή στις υγρές καλλιέργειες, σε σχέση με το μάρτυρα (Control), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά την ίδια χρονική στιγμή με τη μεταχείριση EQNL 500 μM.



Διάγραμμα 17. Επίδραση των EQNL, NP και DCD στη αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

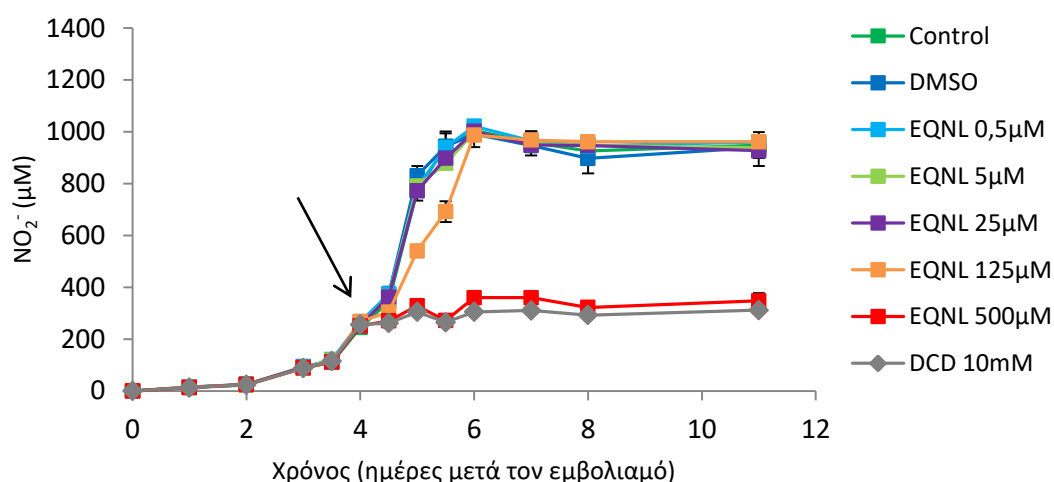
Τα αποτελέσματα από την παρακολούθηση της αποδόμησης του EQNL κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18. Το EQNL στην υψηλότερη συγκέντρωση του (500 μM) εμφανίζεται έμμοιο με ποσοστό αποδόμησης μόλις 3.5% επί της αρχικής συγκέντρωσης κατά την 11^η ημέρα από τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (8^η ημέρα από την προσθήκη του EQNL). Τα αντίστοιχα ποσοστά αποδόμησης του μεταβολίτη που παρατηρήθηκαν στις μεταχειρίσεις των 125, 25, και 5 μM κατά την 11^η ημέρα από τον εμβολιασμό των καλλιεργειών, ήταν 69.2%, 66.2% και 39.9% επί της αρχικής συγκέντρωσης, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της αποδόμησης των χαμηλότερων συγκεντρώσεων του EQNL (0.5 και 0.05 μM) δεν παρουσιάζονται γιατί στις περιπτώσεις αυτές ο μεταβολίτης ανιχνεύονταν σε συγκέντρωση μικρότερη από το LOQ (LOQ = 0.025 μM).



Διάγραμμα 18. Πορεία αποδόμησης του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) στις υγρές καλλιέργειες του *N. euroraea*.

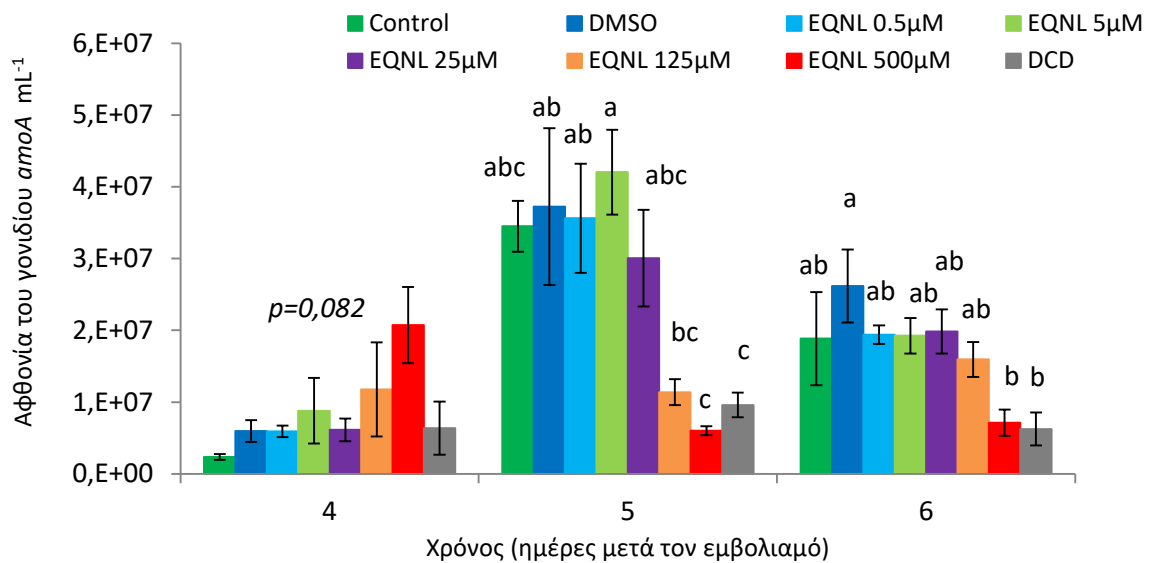
3.3.2 Επίδραση του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) στο στέλεχος του *Nitrosospira multififormis*

Στην περίπτωση των υγρών καλλιιεργειών του *N. multififormis*, η εφαρμογή του EQNL προκάλεσε σημαντική μείωση της συσσώρευσης των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-), μόνο στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQNL (500 μM) συγκριτικά με το μάρτυρα (DMSO). Όμοια ήταν η επίδραση και του γνωστού παρεμποδιστή DCD, που μελετήθηκε συγκριτικά. Όταν το EQNL εφαρμόστηκε στις υγρές καλλιιεργειες σε συγκέντρωση 125 μM παρατηρήθηκε μόνο προσωρινή αναστολή της παραγωγής νιτρωδών ιόντων (Διάγραμμα 19).



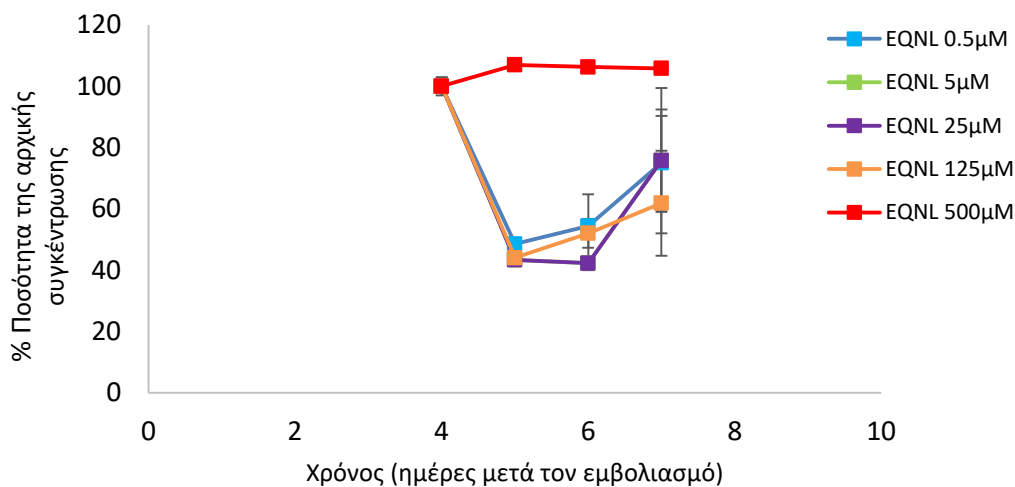
Διάγραμμα 19. Η επίδραση των EQNL και DCD στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιιεργειες του *N. multififormis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Το βέλος υποδεικνύει τον χρόνο στον οποίο προστέθηκαν οι μελετούμενες ουσίες στις υγρές καλλιιεργειες.

Τα αποτελέσματα της qPCR, που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του EQNL στην αύξηση του *Nitrosospira multififormis* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 20. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της qPCR ήταν η 4^η (αμέσως πριν την προσθήκη των EQNL και DCD στις υγρές καλλιιεργειες), η 5^η και η 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών. Αμέσως πριν την προσθήκη των μελετούμενων ουσιών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα αντίγραφα του *amoA* γονιδίου των AOB μεταξύ των μεταχειρίσεων ($p=0.082$). Η αφθονία του γονιδίου *amoA* στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση του EQNL (500 μM) μειώθηκε σημαντικά μόνο κατά την 6^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών, σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO). Αντίθετα, στη μεταχείριση με συγκέντρωση EQNL 125 μM δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα (DMSO) και τη μεταχείριση EQNL 500 μM στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Η μεταχείριση του DCD επηρέασε την αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB σε σχέση με το μάρτυρα (Control) αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Διάγραμμα 20. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των EQNL και DCD στη αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριπλών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της διάσπασης του EQNL στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 21. Το EQNL στην υψηλότερη συγκέντρωση, 500 µM, εμφανίζεται έμμοно, χωρίς να παρατηρείται σημαντικό ποσοστό διάσπασης του 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών (3 ημέρες μετά την προσθήκη του στις υγρές καλλιέργειες). Ωστόσο, στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης στην περίπτωση της εφαρμογής του μεταβολίτη στις συγκεντρώσεις 125, 25 και 5 µM (38.5%, 24.5% και 25.6%, αντίστοιχα). Όπως και στις αντίστοιχες δοκιμές στην περίπτωση του *N. euroraea* τα αποτελέσματα της αποδόμησης του EQNL στην περίπτωση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων (0.5 και 0.05 µM) δεν παρουσιάζονται γιατί στις περιπτώσεις αυτές ο μεταβολίτης ανιχνεύονταν σε συγκέντρωση μικρότερη από το LOQ του συστήματος.



Διάγραμμα 21. Πορεία αποδόμησης του 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline (EQNL) στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. Συζήτηση

Η χρήση των συνθετικών παρεμποδιστών της νιτροποίησης αποτελεί μια από τις πιο κοινές τεχνολογίες ελέγχου των απωλειών N από τα αγροτικά οικοσυστήματα, συμβάλλοντας τόσο στην αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης του N από τα φυτά, όσο και στην ελαχιστοποίηση των απωλειών του N (NO_3^- , N_2O) [6,44]. Η πλειοψηφία των διαθέσιμων σήμερα ΣΠΝ δρουν στο στάδιο της νιτροδοποίησης [39]. Ωστόσο, αρκετοί από αυτούς, όπως το DMPP και η allylthiourea, είναι αποτελεσματικοί έναντι των AOB, όμως δεν είναι ταυτόχρονα αποτελεσματικοί έναντι και των AOA, πιθανόν εξαιτίας της επιλεκτικής τους δράσης που οφείλεται στις βιοχημικές και δομικές διαφορές που εμφανίζουν μεταξύ τους αυτές οι δύο ομάδες μικροοργανισμών [13,70]. Περιορισμένες είναι επίσης οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των ΠΝ στα Comammox λόγω της έλλειψης των απαραίτητων στοιχείων σχετικά με το ρόλο τους στη νιτροποίηση του εδάφους. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν την ευαισθησία ειδών Comammox προερχόμενων από υδάτινο περιβάλλον σε παρεμποδιστές όπως οι allylthiourea, octyne και chlorate [7,30]. Με βάση τα παραπάνω η παρεμπόδιση της νιτροποίησης από τους διαθέσιμους ΠΝ καθίσταται ως ένα βαθμό αμφίβολη, καθώς παρότι αναστέλλουν αποτελεσματικά τα AOB, η επίδραση τους στις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών (AOA και Comammox), που μπορούν επίσης να επιτελέσουν τη λειτουργία της νιτροδοποίησης, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Στο πλαίσιο αυτό η χρήση ΠΝ με καθολική δράση έναντι όλων των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη νιτροποίηση είναι καθοριστικής σημασίας από γεωργικό-οικονομικής και περιβαλλοντικής σκοπιάς. Το EQ είναι μια αντιοξειδωτική ουσία που χρησιμοποιείται στα συσκευαστήρια φρούτων για την πρόληψη της φυσιολογικής υποβάθμισης της ποιότητας κυρίως των μήλων [75]. Μεγάλες ποσότητες του EQ καταλήγουν στο έδαφος εξαιτίας της έλλειψης των κατάλληλων υποδομών επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων σε αυτές τις μονάδες. Το EQ στο έδαφος οξειδώνεται ταχέως σχηματίζοντας δύο μεταβολικά προϊόντα, το μη υπολειμματικό QI (κύριος μεταβολίτης) και το έμμοно EQNL (δευτερεύων μεταβολίτης) [76]. Σε προηγούμενα πειράματα μικροκόσμων εδάφους βρέθηκε πως το EQ, και κυρίως ο κύριος μεταβολίτης του QI, αναστέλλουν τη νιτροποίηση και επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *amoA* τόσο των AOB όσο και των AOA [77].

Ακόλουθες *in vitro* μελέτες της επίδρασης του EQ σε αντιπροσωπευτικά εδαφογενή στελέχη των AOB (*Nitrosomonas europaea* και *Nitrosospira multififormis*), επιβεβαίωσαν το παραπάνω πρότυπο αποδόμησης του EQ και σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες, και κατέδειξαν αναστολή της αύξησης (αφθονία *amoA* γονιδίου) και της λειτουργίας (παραγωγή NO_2^-) των επιλεγμένων στελεχών των AOB, σε επίπεδα συγκεντρώσεων 460 μM , που συνέπεσαν με το σχηματισμό του μεταβολίτη QI στις υγρές καλλιέργειες.

Σε συνέχεια των παραπάνω μελετών, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της επίδρασης των μεταβολικών προϊόντων του EQ, QI και EQNL στα επιλεγμένα στελέχη

των AOB, σε σύγκριση με τους γνωστούς και ευρέως χρησιμοποιούμενους ΣΠΝ, ΝΡ και DCD. Η αξιολόγηση των επιδράσεων των QI και EQNL πραγματοποιήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων που επιλέχθηκαν με βάση τα ευρήματα των προηγούμενων *in vitro* και *in situ* [77] μελετών. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η πορεία αποδόμησης τους στις υγρές καλλιέργειες των AOB ώστε να συσχετιστεί η υπολειμματικότητα των ουσιών με την επίδραση που ασκούν στα μελετούμενα στελέχη των AOB.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την αποδόμηση των QI και EQNL στις υγρές καλλιέργειες των AOB, βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των προηγούμενων μελετών από τους Paradorouli et al. [77] με μικροκόσμους εδάφους, αλλά και με αυτά των *in vitro* δοκιμών του EQ, που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του εργαστηρίου ΒΦΠ και παρουσιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής διατριβής (Διαγράμματα 3,4, 7,8), και επιβεβαιώνουν τη μη έμμονη (Διαγράμματα 11, 14) και έμμονη φύση (Διαγράμματα 18, 21) των δυο ουσιών, QI και EQNL, αντίστοιχα.

Ο κύριος μεταβολίτης QI παρά τη χαμηλότερη υπολειμματικότητα του, παρουσίασε μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των AOB σε σύγκριση με το έμμονο EQNL. Πιο συγκεκριμένα, το QI προκάλεσε αναστολή τόσο στην παραγωγή και συσσώρευση νιτρωδών ιόντων όσο και στην αφθονία του *amoA* γονιδίου, σε σύγκριση με το μάρτυρα (DMSO), σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων σε σχέση με το EQNL και στα δύο στελέχη των AOB που μελετήθηκαν, *N. europaea* (\geq QI 270 μ M) και *N. multiformis* (\geq QI 135 μ M). Το EQNL αντίθετα, προκάλεσε αναστολή της αύξησης και της λειτουργίας των μελετούμενων AOB, μόνιμη (*N. multiformis*) ή προσωρινή (*N. europaea*), μόνο στη μεταχείριση με την υψηλότερη συγκέντρωση (EQNL 500 μ M). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών με μικροκόσμους εδάφους [77], όπου το QI προκάλεσε σημαντική μείωση στο ρυθμό παραγωγής των νιτρωδών ιόντων αλλά και στην αφθονία των μεταγράφων του γονιδίου *amoA* σε σύγκριση με το μάρτυρα [77]. Αντίθετα, το EQNL παρά την υψηλότερη υπολειμματικότητα του, δεν επηρέασε σημαντικά τη νιτρωδοποιητική δραστηριότητα των AOB ούτε και την αφθονία του γονιδίου *amoA* σε σύγκριση με το μάρτυρα, υποδεικνύοντας πως το QI είναι ο πιο δραστικός μεταβολίτης του EQ.

Τα δύο στελέχη των AOB που μελετήθηκαν εμφάνισαν διαφορετική ευαισθησία στους μεταβολίτες QI και EQNL, με το *N. multiformis* να είναι σε κάθε περίπτωση πιο ευαίσθητο από το *N. europaea*. Το QI προκάλεσε μόνιμη αναστολή στην αύξηση και νιτρωδοποιητική λειτουργία του *N. multiformis* σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων (\geq QI 135 μ M) σε σχέση με το *N. europaea*, του οποίου η αύξηση και η νιτρωδοποιητική δραστηριότητα περιορίστηκε σημαντικά μόνο σε συγκεντρώσεις \geq 270 μ M. Ανάλογη ευαισθησία έναντι του *N. europaea* εμφάνισε το *N. multiformis* και στις μεταχειρίσεις του EQNL, με τη μεταχείριση EQNL 500 μ M να προκαλεί μόνιμη παρεμπόδιση της νιτρωδοποίησης στο *N. multiformis* και μόνο προσωρινή παρεμπόδιση στο *N. europaea*. Επιπλέον, η νιτρωδοποιητική δραστηριότητα του *N. multiformis* αναστάλθηκε προσωρινά και στη μεταχείριση EQNL 125 μ M, επιβεβαιώνοντας τη μεγαλύτερη ευαισθησία του στη συγκεκριμένη ουσία, σε σχέση με το στέλεχος του *N. europaea*. Σε προηγούμενες μελέτες των Shen et al. [13] το *N. multiformis* παρουσίασε ευαισθησία στην allylthiourea σε επίπεδα συγκέντρωσης 0.2-0.4 μ M, ενώ η ίδια ουσία βρέθηκε να επηρεάζει το *N. europaea* σε μεγαλύτερα επίπεδα

συγκεντρώσεων (10 μM) [86]. Ωστόσο, η παρατηρούμενη στην παρούσα διατριβή ευαισθησία του *N. multiformis* στα μεταβολικά προϊόντα του EQ δεν αποτελεί κανόνα και για όλους τους ΠΝ. Ευρήματα προηγούμενων μελετών έδειξαν πως ο ΣΠΝ DCD αναστέλλει αποτελεσματικά και τα δύο στελέχη [13,70,71], ενώ η NP βρέθηκε να αναστέλλει αποτελεσματικά τη νιτρωδοποιητική δραστηριότητα του *N. europaea* [85], όχι όμως και αυτή του *N. multiformis* [13]. Σε προηγούμενες επίσης μελέτες βρέθηκε ότι το NP αναστέλλει κυρίως την ανάπτυξη των *Nirosomonas*, ενώ δεν μπορεί να αναστείλει ικανοποιητικά την ανάπτυξη των *Nitrosospira* και *Nitrosolobus* [97].

Στην παρούσα διατριβή το NP στο επίπεδο συγκέντρωσης που εφαρμόστηκε (50 μM) προκάλεσε μόνιμη αναστολή στην παραγωγή νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*, ενώ η αφθονία του γονιδίου *amoA* επηρεάστηκε μόνο προσωρινά. Αντίθετα, οι Shen et al. [13] σε αντίστοιχες *in vitro* μελέτες δεν παρατήρησαν σημαντική επίδραση του NP όταν αυτό εφαρμόστηκε στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* σε εύρος συγκεντρώσεων 40-173 μM . Στην ίδια μελέτη, οι Shen et al., [13] παρατήρησαν σημαντική αναστολή της νιτρωδοποίησης σε υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* από το DCD όταν αυτό εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 40-100 μM [13]. Στην παρούσα διατριβή η συγκέντρωση του DCD που μελετήθηκε (10 mM) ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τις αντίστοιχες στη μελέτη των Shen et al., [13] και βρέθηκε να αναστέλλει πλήρως την παραγωγή των νιτρωδών ιόντων, χωρίς όμως να επιδρά σημαντικά στην αφθονία του γονιδίου *amoA*. Στις υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* τόσο το DCD (10 mM) όσο και το NP (50 μM) προκάλεσαν μόνιμη αναστολή στη παραγωγή και συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων, ενώ επηρέασαν σημαντικά την αφθονία του γονιδίου *amoA* μόνο προσωρινά. Σε αντίστοιχες μελέτες με υγρές καλλιέργειες του *N. europaea* παρατηρήθηκε αναστολή της νιτρωδοποίησης από το NP σε συγκεντρώσεις $\geq 10 \mu\text{M}$ [85] και από το DCD σε συγκεντρώσεις $\geq 200 \text{ ppm}$ [83].

4.2 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, όλα τα στοιχεία που αναφέρθηκαν υποδεικνύουν πως το QI εμφανίζει ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση από το EQNL στην αύξηση και τη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων και φαίνεται να είναι ο κύριος υπεύθυνος της αρνητικής επίδρασης του EQ στη νιτρωδοποίηση που παρατηρήθηκε τόσο σε επίπεδο μικροκόσμων εδάφους, όσο και στις *in vitro* δοκιμές. Επιπρόσθετα, το QI φαίνεται να ασκεί ισχυρότερη και μεγαλύτερης διάρκειας ανασταλτική δράση στην αφθονία των AOB σε σχέση με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ΠΝ, NP και DCD. Μεταξύ των δύο AOB που αξιολογήθηκαν στις *in vitro* δοκιμές, το *N. europaea* εμφανίζει χαμηλότερη ευαισθησία από αυτό του *N. multiformis* στα QI και EQNL. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του EQ και των μεταβολικών του προϊόντων παραμένει ακόμα άγνωστος και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την πλήρη διευκρίνιση του. Η επιβεβαίωση της ανασταλτικής δράσης των EQ και QI και στις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών με λειτουργικό ρόλο στη νιτρωδοποίηση (AOA και Comptox) είναι πιθανό να συμβάλει στην ανάπτυξη ενός νέου καθολικού αναστολέα της νιτροποίησης, που θα συνεισφέρει στην αποτελεσματικότερη χρήση του αζώτου στα αγροτικά οικοσυστήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Βιβλιογραφία

1. Bernhard A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 2010;3(10):25..
2. Ζίφα Α, Μαμούρης Ζ, Μούτου Κ. Βιολογία. 2η έκδοση. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2011.
3. Schleper C, Nicol GW. Ammonia oxidizing archaea: Genomes, physiology and ecology. *Adv Microb Physiol* 2010;1(41):57
4. You J, Das A, Dolan EM, Hu Z. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* 2009;43:1801-1809.
5. Caranto JD, Lancaster K M. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *PNAS* 2017;114(31):8217-8222.
6. Beekman F, Motte H, Beekman T. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology* 2018 ;50:166–173
7. Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, et.al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 2015; 528(7583):504-509.
8. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*. 10th edition. Pearson Education. Inc, 2003
9. Kowalchuk GA, Stephen JR, Ammonia-oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol* 2001;55:485-529.
10. Winogradsky S. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur* 1891;5:577–16.
11. Dang C, Liu W, Lin Y, Zheng M, Jiang H, Chen Q, Ni J. Dominant role of ammonia-oxidizing bacteria in nitrification due to ammonia accumulation in sediments of Danjiangkou reservoir, China. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102(7):3399-3410
12. Di JH, Cameron KC, Shen J, Winefield CS, O’Callaghan M, Bowatte S, He JZ. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;72(3):386-94.
13. Shen T, Stieglmeier M, Dai J, Urich T, Schleper C. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multififormis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol Lett* 2013;344(2):121-9.
14. Bock E, Wagner M. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. *The Prokaryotes* 2006;2:457–495.
15. Gubry-Rangin C, Nicol GW, Prosser JI. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;74(3):566-74.
16. 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.* 2008;10(11):2966-78.

17. Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol.* 2008;10(5):1357-64.
18. Konneke M, Bernhard AE, De La Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 2005;437: 543–546.
19. Stahl DA, R. de la Torre J. Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:83-101.
20. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(3):245-52.
21. Alves RJE, Minh BQ, Urich, von Haeseler, Schleper. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on *amoA* genes. *Nat Commun.* 2018;9(1):1517.
22. Pitcher A, Rychlik N, Hopmans EC, Spieck E, Rijpstra WIC, Ossebaar J, Schouten S, et al. Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I.1b Archaeon. *ISME J.* 2010;4(4):542-52.
23. Schouten S, Hopmans EC, Baas M, Boumann H, Standfest S, Könneke M, Stahl D A, Sinninghe Damsté J S. Intact Membrane Lipids of “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*”, a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol* 2008;74: 2433–2440.
24. Walker CB, De La Torre JR, Klotz MG, et al. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:8818–8823.
25. Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* 2007;1(1):19-27.
26. Li Y, Chapman SJ, Nicol GW, Yao H. Nitrification and nitrifiers in acid soils. *Soil Biology and Biochemistry* 2018;116:290-301
27. Vajralaa N, Martens-Habbenab W, Sayavedra-Sotoa LA, Schauerc A, Bottomleyd PJ, Stahlb DA, Arpa DJ. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *PNAS* 2013;110(3)1006-1011.
28. Lawson CE, Lüscher S, Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Curr Opin Biotechnol* 2018;50:158-165.
29. Wang Y, Ma L, Mao Y, Jiang X, Xia Y, Yu K, Li B, Zhang T. Comammox in drinking water systems. *Water Res* 2017;116:332-34.
30. van Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, Jetten, Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 2015;524(7583):555-9.
31. Pinto AJ, Marcus DN, Ijaz UZ, Bautista-de Lase Santos QM, Dick GJ, Raskin L. Metagenomic Evidence for the Presence of Comammox *Nitrospira*-Like Bacteria in a Drinking Water System. *mSphere.* 2015;30;1(1).
32. Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* 1994;176(21):6623-30.

33. Liu H, Li J, Zhao Y, Xie K, Tang X, Wang S, Li Z, Liao Y, Xu J1, Di H, Li Y. Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China. *Sci Total Environ* 2018;633:641-648.
34. Lückner S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, Rattei T, Damsté JS, Spieck E, Le Paslier D, Daims H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(30):13479-84.
35. Strous M, Jetten MS. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:99-117.
36. Kuenen JG. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* 2008;6:320–326.
37. van de Graaft AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MM, Gijs Kuenen J. Metabolic pathway of anaerobic ammoniumoxidation on the basis of ISN studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 1997;143:2415-2421.
38. Di HJ, Cameron KC. Inhibition of ammonium oxidation by a liquid formulation of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) compared with a dicyandiamide (DCD) solution in six New Zealand grazed grassland soils. *J Soils Sediments* 2011;11:1032–1039.
39. Qiao C, Liu L, Hu S, Compton JE, Greaver TL, Li Q. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Glob Chang Biol* 2015;21(3):1249-57.
40. McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol Fertil Soils* 1999;29:1–9
41. Kim DG, Sagggar S, Roudier P. The effect of nitrification inhibitors on soil ammonia emissions in nitrogen managed soils: a meta-analysis. *Nutr Cycl Agroecosyst* 2012;93:51–64.
42. Zaman M, Sagggar S, Blennerhassett JD, Singh J. Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system. *Soil Biology and Biochemistry* 2009;41(6):1270-1280.
43. Liu J, You L, Amini M, Obersteiner M, Herrero M, Zehnder AJB, Yangd H. A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):8035–8040.
44. Feng J, Li F, Deng A, Feng X, Fang F, Zhang W. Integrated assessment of the impact of enhanced-efficiency nitrogen fertilizer on N₂O emission and crop yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2016;231:218–228.
45. Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP, Ono H, Moreta DE, Salcedo AF, Yoshihashi AT, Ishikawa T, et al. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(41):17302-7.
46. Bédard C, Knowles R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev*. 1989;53(1):68-84.
47. Liu T, Liang Y, Chu G. Nitrapyrin addition mitigates nitrous oxide emissions and raises nitrogen use efficiency in plastic-film-mulched drip-fertilized cotton field. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176305.
48. Benckiser G, Christ E, Herbert T, Weiske A, Blome J, Hardt M. The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism. *Plant and Soil* 2013;371(1–2):257–266.

49. Zerulla W, Barth T, Dressel J, Erhardt K, Horchler von Locquenghien K, Pasda G, Rädle M, et.al. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol Fertil Soils* 2001;34:79–84.
50. Gilsanza C, Báeza D, Misselbrook TH, Dhanoab MS, Cárdenasb LM. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2016;216:1–8.
51. Wang Q, Zhang LM, Shen JP, Du S, Han L, He J. Effects of dicyandiamide and acetylene on N₂O emissions and ammonia oxidizers in a fluvo-aquic soil applied with urea. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23(22):23023-23033.
52. Chen Q, Qi L, Bi Q, Dai P, Sun D, Sun C, Liu W, Lu L, Ni W, Lin X. Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(1):477-87.
53. Florio A, Clark IM, Hirsch PR, Jhurrea D, Benedetti A. Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazolephosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. *Biology and Fertility of Soils* 2014;50(5):795–807.
54. O’Callaghan M, Gerard EM, Carter PE, Lardner R, Sarathchandra U, Burch G, Ghani A, et.al. Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry* 2010;42(9):1425-1436.
55. Subbarao GV, Rondon M, Ito O, Ishikawa T, Rao IM, Nakahara K, Lascano C, Berry WL. Biological nitrification inhibition (BNI)—is it a widespread phenomenon?. *Plant and Soil* 2007;294(1-2):5–18.
56. Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nat Plants* 2017;3:17074.
57. Subbarao GV, Arango J, Masahiro K, Hooper AM, Yoshihashi T, Ando Y, Nakahara K, et.al.. Genetic mitigation strategies to tackle agricultural GHG emissions: The case for biological nitrification inhibition technology. *Plant Sci* 2017;262:165-168.
58. Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Rao IM, Ishitani M, Hash CT, Kishii M, et.al.. A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Ann Bot* 2013;112(2):297-316.
59. Subbarao GV, Nakahara K, Ishikawa T, Ono H, Yoshida M, Yoshihashi T, Zhu Y, et.al.. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil* 2013;366(1–2):243–259.
60. Gong P, Zhang L, Wu Z, Chen Z, Chen L. Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Two Agricultural Soils to Nitrification Inhibitors DCD and DMPP: A Pot Experiment. *Pedosphere* 2013;23(6): 729–739.
61. Chen Q, Qi L, Bi Q, Dai P, Sun D, Sun C, Liu W, Lu L, Ni W, Lin X. Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99(1):477-87.
62. Vajrala N, Bottomley PJ, Stahl DA, Arp DJ, Sayavedra-Soto LA. Cycloheximide prevents the de novo polypeptide synthesis required to recover from acetylene inhibition in *Nitrosopumilus maritimus*. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;88(3):495-502.

63. Gilch S, Gilch M, Lorenz MW, Meyer O, Schmidt I. Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 2009;155(1):279-84.
64. Hyman MR, Arp DJ. $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J Biol Chem* 1992;267(3):1534-1545.
65. Hyman MR, Wood PM. Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem J* 1985;227(3):719–725.
66. Li H, Chen Y, Liang X, Lian Y, Li W. Mineral-nitrogen leaching and ammonia volatilization from a rice-rapeseed system as affected by 3,4-dimethylpyrazole phosphate. *J Environ Qual* 2009;38(5):2131-7.
67. Tatari K, Gülay, Thamdrup, Albrechtsen HJ, Smets BF. Challenges in using allylthiourea and chlorate as specific nitrification inhibitors. *Chemosphere* 2017;182:301-305.
68. Recio J, Vallejo A, Le-Noë J, Garnier J, García-Marco S, Álvarez JM, Sanz-Cobena A. The effect of nitrification inhibitors on NH_3 and N_2O emissions in highly N fertilized irrigated Mediterranean cropping systems. *Sci Total Environ* 2018;636:427-436.
69. Huérfano X, Fuertes-Mendizábal T, Fernández-Diez K, Estavillo JM, González-Murua C, Menéndez S. The new nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole succinic (DMPSA) as an alternative to DMPP for reducing N_2O emissions from wheat crops under humid Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 2016;80:78-87.
70. Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schloter M. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 2011;84(1):182-6.
71. Wessén E, Hallin S. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers- Possible bioindicator. *Ecological Indicators* 2011;11:1696–1698.
72. Sahrawat KL. Effect of pesticides on nitrification. *Pesticides* 1974.
73. Jacobsen CS, Hjelmsø MH. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 2014;27:15-20.
74. Thorisson S, Gunstone FD, Hardy R. Some oxidation products of ethoxyquin including those found in autoxidising systems. *Chem Phys Lipids* 1992;60(3):263-71.
75. Błaszczyk A, Augustyniak A, Skolimowski J. Ethoxyquin: An Antioxidant Used in Animal Feed. *Int J Food Sci* 2013;2013:585931.
76. Karas P, Metsoviti A, Zisis V, Ehaliotis C, Omirou M, Papadopoulou ES, Menkissoglou-Spiroudi U, Manta S, Komiotis D, Karpouzas DG. Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Sci Total Environ* 2015;530-531:129-139.
77. Papadopoulou ES, Tsachidou B, Sułowicz S, Menkissoglu-Spiroudi U, Karpouzas DG. Land Spreading of Wastewaters from the Fruit-Packaging Industry and Potential Effects on Soil Microbes: Effects of the Antioxidant Ethoxyquin and Its Metabolites on Ammonia Oxidizers. *Appl Environ Microbiol* 2015;82(2):747-55.

78. Brannegan DR. Analysis of Ethoxyquin and its oxidation products using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detection. 2000. pp51&52.
79. Shah, AG, Pierson JA, Pavlostathis SG. Fate and effect of the antioxidant ethoxyquin on a mixed methanogenic culture. *Water Research* 2005;39: 4251–4263.
80. JGI Genome Portal. www.genome.jgi.doe.gov/portal/niteu/niteu.home.html.
81. Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, Hauser L, et.al. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 2003;185(9):2759-73.
82. Kozłowski JA, Kits KD, Stein LY. Comparison of Nitrogen Oxide Metabolism among Diverse Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Front Microbiol* 2016;7: 1090.
83. Zacherl B, Amberger A. Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertilizer research* 1990;22(1):37–44.
84. Moir JL, Cameron KC, Di HJ. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use and Management* 2007;23(2):111-120.
85. Vannelli T, Hooper AB. Oxidation of Nitrapyrin to 6-Chloropicolinic Acid by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58(7):2321-2325.
86. Hooper AB, Terry KR. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J Bacteriol* 1973;115(2):480-5.
87. Hynes RK. Commentary on 'Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*'. *FEMS Microbiol Lett* 2017;1:364(10).
88. NCDI Genome. www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1338.
89. Watson SW, Graham LB, Remsen CC, Valois FW. A lobular, ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosolobus multiformis* Nov. Gen. Nov. sp. *Archiv für Mikrobiologie* 1971;76(3):183-203.
90. Norton JM, Klotz MG, Stein LY, Arp DJ, Bottomley PJ, Chain PS, Hauser LJ, et.al.. Complete genome sequence of *Nitrospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(11):3559-72.
91. Skinner FA, Walker N. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Archives in Microbiology* 1961;38 339–349.
92. Lehtovirta-Morley LE, Verhamme DT, Nicol GW, Prosser JI. Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. *Soil Biology & Biochemistry* 2013;62:129-133.
93. Keeney DR, Nelson DW. Nitrogen in organic forms. In A. L. Page et al., Eds. *Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy No. 9.* American Society of Agronomy, Madison, WI. 1982. pp. 643-698.
94. Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(12): 4704–4712.
95. Rousidou C, Papadopoulou SE, Kortsinidou M, Giannakou O, Singh D, U. Menkissoglou-Spiroudi BK, Karpouzias DG. Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology & Biochemistry* 2013;67:98-105.

96. Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva EV, Han P, Bulaev A, Pjevac P, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature* 017;549(7671):269-272.
97. Belser LW, Schmidt E. Inhibitory Effect of Nitrapyrin on Three Genera of Ammonia-Oxidizing Nitrifiers. *Appl Environ Microbiol.* 1981;41(3):819–821.