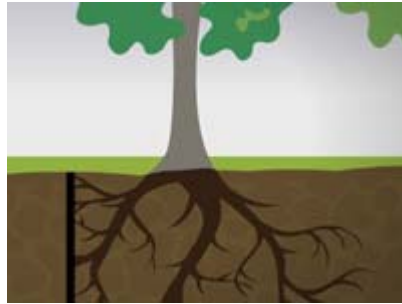


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ Α.Φ.Π. & Γ.Μ.
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Ειδίκευση: Διαχείριση Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας

Μεταπτυχιακή Διατριβή με θέμα:

**«Επίδραση του Παρεμποδιστή Νιτροποίησης Δικυανοδιαμίδη (DCD) στις
Μικροβιακές Ισορροπίες του Εδάφους»**

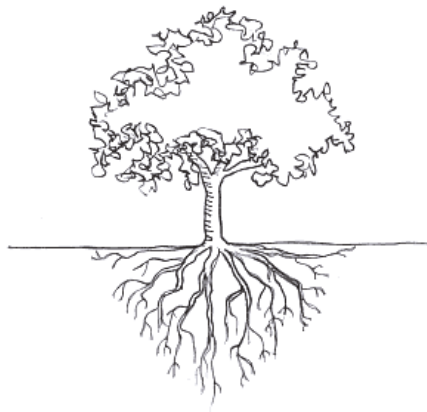


Δημητρίου Θεοδώρα

Επιβλέπων: Οιχαλιώτης Κ.

Συμβουλευτική Επιτροπή:
Μάσσας Ιωάννης
Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης

Αθήνα 2010



Στη μητέρα μου Ελένη,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά την επιτυχή διεξαγωγή αυτής της εργασίας οφείλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κώστα Οιχαλιώτη τόσο για την ανάθεση της εργασίας όσο και για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια αυτής. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Μάσσα και τον κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη οι οποίοι αποδέχτηκαν να είναι στην τριμελή επιτροπή παρακολούθησης της εργασίας. Στον κ. Χατζηπαυλίδη οφείλω ένα επιπλέον ευχαριστώ για την παραχώρηση του Εργαστηρίου της Μικροβιολογίας στο οποίο πραγματοποιήθηκε μέρος των πειραμάτων.

Επίσης μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Ουρανία Μενγκίσογλου και την υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Παπαδοπούλου για την φιλοξενία τους στο Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας της Γεωπονικής Σχολής του Α.Π.Θ. καθώς και το Δημήτρη Καρπούζα ο οποίος ήταν ο ενδιάμεσος κρίκος για τη μετάβαση μου εκεί.

Η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια του υπεύθυνου του Εργαστηρίου Εδαφολογίας Στέλιου Δάλλα, της φοιτήτριας Υλιάνας Μαζανίτου και του υποψήφιου Διδάκτορα Γιάννη Αναστόπουλου με τους οποίους μοιράστηκα πολλές ώρες εργαστηριακής δουλειάς.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υπομονή τους, την υλική και ηθική συμπαράσταση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της επίδρασης του παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Για το σκοπό αυτό εδαφικό δείγμα από την περιοχή της Καλαμάτας χρησιμοποιήθηκε σε πλήθος πειραμάτων.

Αρχικά στα δείγματα εφαρμόστηκαν έξι μεταχειρίσεις που αφορούν στην παρουσία οργανικής ουσίας (υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου-YAE) ή/και παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αναπνευστική δραστηριότητα των μικροοργανισμών των εδαφικών δειγμάτων και ακολούθησε ο υπολογισμός της μικροβιακής βιομάζας με τη μέθοδο ατμισμού-εκχύλισης. Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) για τον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν σε κάθε δείγμα.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων έδειξαν ότι τα δείγματα με παρουσία YAE εμφάνισαν πολλαπλάσιο ρυθμό αναπνευστικής δραστηριότητας από τα δείγματα χωρίς την παρουσία YAE.

Η εφαρμογή DCD, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με YAE δεν φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τον ρυθμό της μικροβιακής δραστηριότητας σε οποιαδήποτε από τις δύο θερμοκρασίες (10 °C, 20 °C). Ωστόσο για τη συνδυασμένη εφαρμογή YAE και DCD παρατηρήθηκαν ενδείξεις καταπόνησης του μικροβιακού πληθυσμού.

Τέλος η ανάλυση λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων έδειξε διαφοροποίηση των δειγμάτων της μεταχείρισης YAE, ωστόσο για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται ανάλυση περισσότερων δειγμάτων.

ABSTRACT

The objective of this project was to define the effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on soil microbial communities. For this purpose the microbial activity rate, microbial biomass and phospholipid fatty acids of microbial cell membranes (PLFA) were determined.

Soil samples from Kalamata were incubated in two temperatures (10 and 20 °C) under several treatments in order to measure the soil microbial respiration. The chlorophorm fumigation-extraction method was used to define microbial biomass.

Results indicate that the presence of DCD does not affect microbial respiration although high values of the indicator qCO_2 show stress on the soil ecosystem. In addition, Phospholipid Fatty Acid Analysis and the statistical analysis PCA differentiated the samples with the olive mill waste (OMW) treatment. More samples need to be analyzed to exclude secure results.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αζωτο στα εδαφικά οικοσυστήματα	1
1.2 Ανοργανοποίηση (Mineralization) -Ακινητοποίηση (Immobilization)	2
1.3 Απώλειες αζώτου	4
1.4 Νιτρορύπανση και τρόποι ελέγχου	6
1.5 Νιτροποίηση και παρεμποδιστές νιτροποίησης	8
1.6 Χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης σαν διαχειριστικό εργαλείο	13
1.7 Περιορισμοί στη χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης	15
1.8 Τεχνικές ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους	16
1.8.1 Μικροβιακή βιομάζα	16
1.8.2 Μικροβιακή δραστηριότητα	19
1.8.3 Μεταβολικός συντελεστής ή Μικροβιακό μεταβολικό πηλίκιο (microbial metabolic quotient, qCO ₂)	21
1.8.4 Ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων	22
1.8.5 Βιοχημικές τεχνικές	23
1.8.6 Μοριακές τεχνικές	26
1.9 Στόχος	27

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδαφικού δείγματος	29
2.2 Προσδιορισμός της αναπνευστικής δραστηριότητας	29
2.3 Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας	34
2.4 Προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με την ανάλυση PLFA	35

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδαφικού δείγματος	41
3.2 Προσδιορισμός αναπνευστικής δραστηριότητας	41
3.3 Προσδιορισμός μικροβιακής βιομάζας	44
3.4 Ανάλυση λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA)	46

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Άζωτο στα εδαφικά οικοσυστήματα

Το άζωτο είναι ένα από τα βασικά συστατικά όλων των ζωντανών οργανισμών καθώς περιέχεται σε πολλά βιομόρια όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, μόρια που αποτελούν τη βάση όλων των μορφών ζωής (Habbell and Kidder 2003). Αν και το μοριακό άζωτο αποτελεί το 78% κατ' όγκο της ατμόσφαιρας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από τους οργανισμούς. Σημαντικό μέρος των διαδικασιών μετασχηματισμού του αζώτου στις διάφορες μορφές του πραγματοποιείται στα εδαφικά οικοσυστήματα στα πλαίσια των διεργασιών που συμβαίνουν στο βιογεωχημικό κύκλο του στοιχείου.

Το ποσοστό του ολικού αζώτου στα εδαφικά οικοσυστήματα όπως αναφέρουν οι Schulten and Schnitzer (1998) κυμαίνεται από 0,01% έως 1,61%. Ωστόσο μπορεί να φτάσει πάνω από 2,5% στα οργανικά εδάφη. Από το ολικό άζωτο το οποίο βρίσκεται στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους περίπου 2% βρίσκεται σε ανόργανη μορφή στο εδαφικό διάλυμα. Οι ανόργανες μορφές που συναντώνται συνήθως είναι ιόντα αμμωνιακά (NH_4^+), νιτρικά (NO_3^-), ίχνη νιτρωδών (NO_2^-) και το μοριακό άζωτο (N_2). Τα NO_2^- είναι ασταθείς μορφές και γρήγορα οξειδώνονται προς νιτρικά ιόντα με τη διαδικασία της νιτροποίησης. Οι μορφές του αζώτου οι οποίες είναι δυνατό να απορροφηθούν από τους φυτικούς οργανισμούς είναι κυρίως τα NO_3^- και τα NH_4^+ . Επίσης άλλες ανόργανες μορφές στις οποίες συναντάται το άζωτο είναι τα αέρια οξείδια N_2O και NO τα οποία προκύπτουν κατά τη διαδικασία της απονιτροποίησης και απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα.

Το ανόργανο άζωτο του εδάφους μπορεί να προκύψει είτε από την αερόβια αποσύνθεση (αποδόμηση) οργανικής ύλης είτε από την προσθήκη αζωτούχων λιπασμάτων στις καλλιεργούμενες εκτάσεις. Κοινά ανόργανα αζωτούχα βιομηχανικά λιπάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται είναι η θεική αμμωνία $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ με περιεκτικότητα 21% σε άζωτο και η νιτρική αμμωνία NH_4NO_3 με περιεκτικότητα 33,5-35% (Camberato 2001).

Το μεγαλύτερο ποσοστό του αζώτου (>95 %) στο έδαφος βρίσκεται σε οργανική μορφή (μικροβιακή, ζωική, φυτική βιομάζα και χούμος) γεγονός που

το καθιστά μη άμεσα εκμεταλλεύσιμο από τα φυτά. Το δεσμευμένο στις οργανικές ενώσεις άζωτο μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου έπειτα από την αποικοδόμηση των οργανικών ενώσεων. Μία οργανική ένωση η οποία χρησιμοποιείται και σαν λίπασμα είναι η ουρία $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Η ένωση αυτή έχει περιεκτικότητα σε άζωτο 46% w/w το οποίο όμως δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στα φυτά. Η ουρία στο έδαφος μετατρέπεται σε αμμώνιο με τη δράση ενός ενζύμου, της ουρεάσης, γι' αυτό χαρακτηρίζεται σαν λίπασμα βραδείας απελευθέρωσης αζώτου (Addiscott et al. 1991). Επίσης ουρία απελευθερώνεται στο έδαφος και από τις απεκκρίσεις πολλών ζωικών οργανισμών.

Το άζωτο μεταπίπτει από την οργανική στην ανόργανη μορφή του και το αντίστροφο μέσα από ποικίλες βιοχημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στο έδαφος.

1.2 Ανοργανοποίηση (Mineralization) -Ακίνητοποίηση (Immobilization)

Κεντρικό στοιχείο στις ροές και τη διαθεσιμότητα των διαφόρων μορφών του αζώτου στο έδαφος είναι η ισορροπία μεταξύ δύο αντίθετων διεργασιών της ανοργανοποίησης (mineralization) και της ακίνητοποίησης (immobilization) (Šimek and Cooper 2001). Οι διεργασίες αυτές συνδέονται με τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών που αποτελούν την ετεροτροφική μικροβιακή βιομάζα του εδάφους.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποδομούν τα οργανικά υλικά έτσι ώστε να ικανοποιήσουν τις ανάγκες τους σε ενέργεια και δομικό άνθρακα. Κατά την εξέλιξη της αποδόμησης των οργανικών υλικών στο έδαφος, υπάρχει συνεχής απώλεια C με τη μορφή CO_2 μέσω της μικροβιακής αναπνοής. Παράλληλα το άζωτο το οποίο είναι ενσωματωμένο στις οργανικές ενώσεις μετατρέπεται και πάλι στην ανόργανη μορφή του. Αυτή η απελευθέρωση NH_4^+ ή NH_3 μέσω μίας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων οξειδωτικής διάσπασης της οργανικής ουσίας του εδάφους (αμινοποίηση, αμμωνιοποίηση) από έναν μεγάλο αριθμό μη εξειδικευμένων μικροοργανισμών ονομάζεται ανοργανοποίηση (Nielsen 2006).

Αντίθετα η ακίνητοποίηση περιλαμβάνει την αφομοίωση και ενσωμάτωση των ανόργανων μορφών αζώτου σε οργανικά συστατικά της ετεροτροφικής και μη βιομάζας. Αν και η ακίνητοποίηση του αζώτου θα

μπορούσε να θεωρηθεί ως μία ανεπιθύμητη διεργασία που καθιστά το άζωτο προσωρινά μη διαθέσιμο για τα φυτά, η συμμετοχή της στη δυναμική του αζώτου στο έδαφος είναι σημαντική. Η ακινητοποίηση συμβάλλει στη συγκράτηση του ευκίνητου αυτού θρεπτικού στοιχείου στο έδαφος, περιορίζοντας έτσι τη διαφυγή του προς την ατμόσφαιρα και τους υδάτινους αποδέκτες.

Το ποσό του ανόργανου αζώτου που τελικά είναι διαθέσιμο στα φυτά (συνήθως ως NH_4^+ ή NO_3^-) εξαρτάται από τη διαφορά μεταξύ των ρυθμών των δύο αυτών αντίθετων διεργασιών, της ανοργανοποίησης και ακινητοποίησης (net mineralization).



Σχήμα 1: Δυναμική ισορροπία μεταξύ ανοργανοποίησης και ακινητοποίησης του εδαφικού αζώτου (Nielsen 2006).

Για να προκύψει ανόργανο άζωτο διαθέσιμο στα φυτά είναι απαραίτητη η μικρή επανακινητοποίηση του σε σύγκριση με την παράλληλη ανοργανοποίηση που πραγματοποιείται. Ο ρυθμός της ανοργανοποίησης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη φύση του οργανικού υλικού που αποσυντίθεται (πηλίκιο C/N) και από τη σύσταση και τις ανάγκες των εδαφικών οργανισμών σε άζωτο.

Αν ο λόγος C/N του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος από αυτόν των μικροοργανισμών, δε θα ελευθερωθεί ανόργανο άζωτο κατά την αποσύνθεση. Αντίθετα οι μικροοργανισμοί θα συμπληρώσουν τις απαιτήσεις τους από το ανόργανο άζωτο του εδάφους (ακινητοποίηση), μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα του στοιχείου για τα φυτά (Hodge et al. 2000). Αυτό συμβαίνει συνήθως όταν ο λόγος C/N είναι μεγαλύτερος του 20. Αντίθετα όσο μικρότερος από 20 είναι ο λόγος C/N των οργανικών υλικών τόσο πιο σίγουρο είναι ότι η αποδόμησή τους στο έδαφος θα αφήσει άμεσο περίσσειμα ανόργανου αζώτου για τις ρίζες των φυτών (Οιχαλιώτης 2003).

Στην πραγματικότητα η πρόβλεψη της συγκέντρωσης του ανόργανου αζώτου στο έδαφος είναι αρκετά δύσκολη διότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Εκτός από την ετερογένεια στη σύσταση των μικροοργανισμών του εδάφους και στην κατανομή της οργανικής ουσίας στο έδαφος, η ανοργανοποίηση επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως είναι η υφή και δομή εδάφους, η θερμοκρασία, η υγρασία, η διαθεσιμότητα O_2 , η συγκέντρωση CO_2 . Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη του αζώτου που θα ελευθερωθεί και θα είναι τελικά διαθέσιμο για πρόσληψη από τα φυτά (Šimek et al. 2001).

1.3 Απώλειες αζώτου

Στα φυσικά οικοσυστήματα και ιδιαίτερα στα ώριμα και ισοροπημένα φυσικά οικοσυστήματα οι απώλειες αζώτου σε οποιαδήποτε μορφή είναι ελάχιστες. Αυτό συμβαίνει διότι κάθε είδος έρχεται να καλύψει συγκεκριμένη οικοθέση στην οποία πραγματοποιείται απορρόφηση αζώτου με τον αποτελεσματικότερο τρόπο. Με λίγα λόγια το άζωτο το οποίο απελευθερώνεται από μία ομάδα οργανισμών δεσμεύεται άμεσα από άλλη. Δεν παραμένει ελεύθερο για μεγάλο χρονικό διάστημα οπότε αποφεύγεται ο κίνδυνος απομάκρυνσης του από το έδαφος (Addiscot et al. 1991).

Δεν ισχύει όμως το ίδιο για τα διαταραγμένα οικοσυστήματα και τις αγροτικές καλλιέργειες. Μια έκταση η οποία καλλιεργείται μένει για κάποιο διάστημα, ειδικά μετά τη συγκομιδή της καλλιέργειας, χωρίς φυτική κάλυψη. Η έλλειψη ριζών από το έδαφος αυξάνει τις πιθανότητες απομάκρυνσης του αζώτου. Επιπλέον στις καλλιεργούμενες περιοχές όπου προστίθενται αζωτούχα λιπάσματα για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής μεγάλο μέρος του αζώτου δεν απορροφάται από τα φυτά αλλά απομακρύνεται από τα εδαφικά οικοσυστήματα. Οι απώλειες αυτές λαμβάνουν χώρα με ποικίλους μηχανισμούς.

Η έκπλυση (leaching) των νιτρικών (NO_3^-) είναι ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς (Nielsen 2006). Οι απώλειες των νιτρικών με αυτόν τον τρόπο οφείλονται κυρίως στο ηλεκτρικό φορτίο της αργίλου το οποίο εξαρτάται από την ποσότητα και τον τύπο των αργιλικών ορυκτών αλλά και

από το pH. Στις αγροτικές καλλιέργειες όπου το pH κυμαίνεται από 5,0 έως 8 η άργιλος έχει αρνητικό φορτίο. Αυτό σημαίνει ότι τα θετικά φορτισμένα ιόντα του εδαφικού διαλύματος όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, αμμώνιο έλκονται από το αρνητικό φορτίο της άργιλου και της οργανικής ουσίας και συγκρατούνται στην επιφάνειά τους. Αντίθετα τα ανιόντα του εδαφικού διαλύματος όπως τα νιτρικά και τα νιτρώδη απωθούνται. Αυτός είναι ο βασικός λόγος για τον οποίο τα ιόντα αυτά εκπλένονται πολύ εύκολα. Τα νιτρικά (και τα νιτρώδη στην σπάνια περίπτωση που θα συσσωρευτούν) είναι πιθανό να απομακρυνθούν από το έδαφος είτε με την επιφανειακή απορροή και να καταλήξουν σε επιφανειακούς υδάτινους αποδέκτες είτε με την διήθηση και να καταλήξουν στους υπόγειους υδροφορείς. Αποτέλεσμα είναι διάφορα περιβαλλοντικά προβλήματα όπως το φαινόμενο του ευτροφισμού και η νιτρορύπανση.

Η μετατροπή των ανόργανων ιόντων αζώτου σε αέρια μορφή και η επιστροφή τους στην ατμόσφαιρα είναι άλλος ένας τρόπος απομάκρυνσης του αζώτου από το έδαφος. Οι σημαντικότερες διεργασίες αυτής της μορφής είναι η απονιτροποίηση των νιτρικών ιόντων και η αεριοποίηση της αμμωνίας (Barnard and Leadley 2005). Η απονιτροποίηση, δηλαδή η αναγωγή των νιτρικών ιόντων σταδιακά σε μοριακό άζωτο μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα από χημικές ή βιολογικές διεργασίες.

Η χημική απονιτροποίηση εντοπίζεται σε ορισμένα όξινα εδάφη ($\text{pH} < 5.5$) και είναι περιορισμένης σημασίας για τα γεωργικά εδάφη, όπου κυριαρχεί η βιολογική απονιτροποίηση (Sánchez et al. 2001). Η βιολογική απονιτροποίηση πραγματοποιείται με τη δράση χημειοτερότροφων βακτηρίων. Όταν τα εδάφη είναι κορεσμένα με νερό, το οξυγόνο διαχέεται αργά με συνέπεια να μην αναπληρώνεται και να λαμβάνει χώρα αναερόβια αποσύνθεση. Μερικοί αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν το οξυγόνο με τα NO_2^- και NO_3^- ως τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν να είναι αέρια N_2O και N_2 , τα οποία διαφεύγουν στην ατμόσφαιρα (Azam and Faroog 2003). Τα αέρια αυτά αντιδρούν με το στρατοσφαιρικό όζον και συμμετέχουν στη μείωση της συγκέντρωσής του. Εκτιμάται ότι οι απώλειες αζώτου λόγω απονιτροποίησης μπορούν να κυμαίνονται από 2,5-50 % του προστιθέμενου αζώτου, ανάλογα με

τις συνθήκες και την καλλιέργεια (Šimek et al. 2001). Επίσης αέρια N_2O είναι δυνατόν να σχηματιστούν και κατά τη διαδικασία της νιτροποίησης σαν παραπροϊόντα, η ποσότητα των οποίων είναι όμως σχεδόν αμελητέα.

Μία εξίσου σημαντική οδός διαφυγής του αζώτου προς την ατμόσφαιρα είναι η εξαέρωση της αμμωνίας. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως σε αλκαλικά ή ουδέτερα εδάφη κατά την αποσύνθεση των οργανικών υπολειμμάτων κοντά στην επιφάνεια του εδάφους ή μετά την επιφανειακή εφαρμογή αμμωνιακών λιπασμάτων, ουρίας ή κοπριάς. Το ποσοστό του αζώτου που χάνεται από τα λιπάσματα λόγω της εξαέρωσης της NH_3 μπορεί να φτάσει έως και >50%, ανάλογα τον τύπο του λιπάσματος, τον τρόπο εφαρμογής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις ιδιότητες του εδάφους (Sommer et al. 2004).

Τέλος το άζωτο απομακρύνεται από τα καλλιεργούμενα εδάφη με τη συγκομιδή της καλλιέργειας αφού το άζωτο που έχει ενσωματωθεί στην φυτική βιομάζα, κυρίως αφομοιωμένο σε πρωτεϊνική μορφή, απομακρύνεται (Addiscot et al. 1991).

1.4 Νιτρορύπανση και τρόποι ελέγχου

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα νιτρικά ιόντα είναι ιδιαίτερος ευκίνητα στο εδαφικό διάλυμα. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν εύκολα να διαλυθούν στο νερό της βροχής ή ακόμα και στο νερό άρδευσης και να καταλήξουν σε υδάτινους αποδέκτες δημιουργώντας προβλήματα όπως η νιτρορύπανση. Η απομάκρυνση του αζώτου παρατηρείται όταν η διαθέσιμη ποσότητα NO_3^- από τα ανόργανα λιπάσματα ή και από τη χρήση κοπριάς υπερβαίνει τις εποχιακές απαιτήσεις της καλλιέργειας, ενώ η ένταση του φαινομένου εξαρτάται από το κλίμα (θερμοκρασία, ύψος βροχοπτώσεων), τον τύπο του εδάφους, και τον τύπο της καλλιεργητικής εκμετάλλευσης (Γεωργίλα 2006).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στο πόσιμο νερό δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 50 mg/l. Η υψηλή συγκέντρωση τους προκαλεί προβλήματα στα οικοσυστήματα αλλά και στην ανθρώπινη υγεία. Η υποβάθμιση της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων, η ανάπτυξη του φαινομένου του ευτροφισμού και η ρύπανση των υπόγειων

υδροφορέων είναι ορισμένα από τα προβλήματα που προκαλούνται στα οικοσυστήματα.

Η σημαντικότερη πηγή της νιτρορύπανσης είναι οι αγροτικές δραστηριότητες, γεωργικές και κτηνοτροφικές, οπότε ο έλεγχος της νιτρορύπανσης ξεκινάει από τον έλεγχο των παραπάνω δραστηριοτήτων. Η εντατική καλλιέργεια και οι πρακτικές για μέγιστες αποδόσεις είναι αυτές που οδήγησαν σε πλεονασματική αζωτούχο λίπανση και υπερεκμετάλλευση των εδαφικών πόρων. Ωστόσο η ικανοποίηση της ζήτησης για τη γεωργική παραγωγή μπορεί να επιτευχθεί παράλληλα με τη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων στο περιβάλλον με την υιοθέτηση εναλλακτικών πρακτικών διαχείρισης των θρεπτικών απαιτήσεων των φυτών (Addiscot et al. 1991).

Η προσθήκη οργανικών υλικών, η αμειψισπορά, η ενσωμάτωση φυτικής βιομάζας στο έδαφος (χλωρή λίπανση) και ο εμβολιασμός του εδάφους με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι κάποιες από τις πρακτικές που εφαρμόζονται ήδη. Ουσιαστικά πρόκειται για εμπλουτισμό του εδάφους με άζωτο χωρίς τη χρήση βιομηχανικών ευδιάλυτων λιπασμάτων.

Τα οργανικά λιπάσματα περιλαμβάνουν κάθε φυσικό οργανικό υλικό που περιέχει μέρος των θρεπτικών στοιχείων σε οργανική μορφή, ενώ ταυτόχρονα δεν περιέχει τοξικές ουσίες ή παθογόνους μικροοργανισμούς. Η οργανική λίπανση επιδρά στα φυτά μέσω της σταδιακής απελευθέρωσης θρεπτικών στοιχείων που προέρχονται από την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης. Επιπλέον τα οργανικά λιπάσματα βελτιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους (Σιδηράς 2005).

Η αμειψισπορά δηλαδή η εναλλαγή καλλιέργειας και ιδιαίτερα η χρήση ψυχανθών βοηθά στον εμπλουτισμό του εδάφους με άζωτο. Εάν αυτή συνδυαστεί και με χλωρή λίπανση μπορεί να έχει σημαντικά αποτελέσματα.

Η χλωρή λίπανση περιλαμβάνει την καλλιέργεια κάποιου φυτικού είδους με σκοπό τη διακοπή του κύκλου βλάστησης και την ενσωμάτωση της βιομάζας στο έδαφος, σε στάδιο όπου το άζωτο και τα λοιπά θρεπτικά στοιχεία βρίσκονται στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση. Οι χλωρές λιπάνσεις αποτελούν κομβικό σημείο στο βιολογικό τρόπο παραγωγής τόσο για τη θρέψη των καλλιεργειών, ιδιαίτερα όσον αφορά στην κάλυψη των απαιτήσεων σε άζωτο (Σιδηράς 2005), όσο και για τις ευεργετικές επιπτώσεις στις φυσικές/βιοχημικές

ιδιότητες του εδάφους, όπως την αύξηση της οργανικής ουσίας, την ανοργανοποίηση του αζώτου, τον περιορισμό της διάβρωσης και της έκπλυσης NO_3^- (Tonitto et al. 2005).

Τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται έρευνα για τη χρήση ελεύθερων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με σκοπό τον περιορισμό ακόμα και την αντικατάσταση των βιομηχανικών λιπασμάτων. Τα βακτήρια αυτά προάγουν την καλλιέργεια όχι μόνο με τη δέσμευση του αζώτου αλλά και με την παραγωγή φυτοορμονών και βιταμινών, τη δημιουργία ανθεκτικότητας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, την αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και τη διαλυτοποίηση του φωσφόρου (Kennedy et al. 2004). Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί ότι ο εμβολιασμός του εδάφους με βακτήρια *Azotobacter* αντικατέστησε έως και το 50 % λιπασματικού αζώτου (ουρία) στο σιτάρι (Kennedy et al. 2004). Όμως τα αποτελέσματα δεν είναι σταθερά ούτε πάντα ενθαρρυντικά με αποτέλεσμα τα μικροβιακά εμβόλια ελεύθερων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων να μην έχουν τύχει ευρείας αποδοχής.

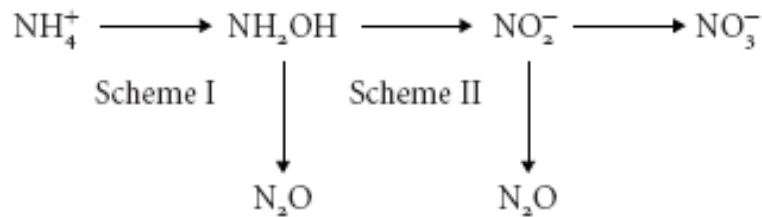
Επίσης έρευνα πραγματοποιείται στη χρήση χημικών ουσιών για τον έλεγχο της νιτροποίησης. Η νιτροποίηση, η μετατροπή δηλαδή του αμμωνιακού σε νιτρικό άζωτο, ευθύνεται για την απώλεια του αζώτου είτε με την έκπλυση των νιτρικών είτε με την απονιτροποίηση και τη μετατροπή του σε αέριο άζωτο. Χημικές ουσίες οι οποίες ονομάζονται παρεμποδιστές νιτροποίησης είναι δυνατό να επιβραδύνουν ή ακόμα και να σταματήσουν τη διαδικασία της νιτροποίησης, άρα και την απώλεια αζώτου (Subbarao et al. 2006).

1.5 Νιτροποίηση και παρεμποδιστές νιτροποίησης

Για να γίνει κατανοητή η δράση των παρεμποδιστών νιτροποίησης είναι σημαντικό να γίνει σύντομη αναφορά στη διαδικασία της νιτροποίησης. Νιτροποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία η αμμωνία (NH_3) και η ιονισμένη της μορφή, το αμμώνιο (NH_4^+), μετατρέπονται με τη βοήθεια μικροοργανισμών του εδάφους σε νιτρικά ανιόντα (NO_3^-) (Singh and Verna 2007).

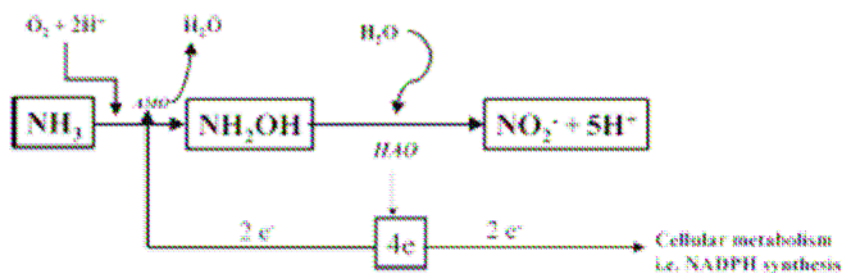
Η νιτροποίηση διενεργείται σε δύο στάδια (Σχήμα 2) από χημειοαυτότροφα αερόβια βακτήρια (νιτροποιητές), τα οποία χρησιμοποιούν το

οξυγόνο ως τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Σε κάθε στάδιο της νιτροποίησης δρα διαφορετική κατηγορία μικροοργανισμών.



Σχήμα 2: Απλοποιημένος μηχανισμός της νιτροποίησης (Singh and Verma 2007).

Στο πρώτο στάδιο η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) με τη βοήθεια του ενζύμου αμμωνιακή μονοοξυγενάση (AMO). Στη συνέχεια η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται σε νιτρώδη, αντίδραση στην οποία συμμετέχει το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO). Από την οξείδωση αυτή απελευθερώνονται 4 ηλεκτρόνια, 2 από τα οποία επιστρέφουν στην AMO για τη συνέχιση της οξείδωσης της αμμωνίας (Σχήμα 3). Τα υπόλοιπα 2 ηλεκτρόνια ικανοποιούν τις αναγωγικές ανάγκες του κυττάρου. Γίνεται φανερό ότι για τη συνέχιση της λειτουργίας της AMO είναι απαραίτητη η συνοξείδωση του προϊόντος της αντίδρασης που καταλύει. Το γεγονός αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κινητική των αντιδράσεων όταν το υπόστρωμα δεν είναι η αμμωνία (Subbarao et al. 2006).

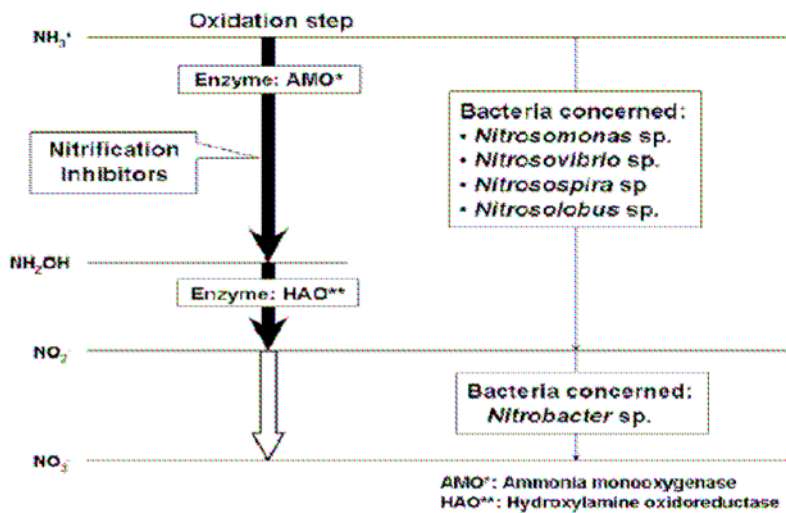


Σχήμα 3: Αντιδράσεις της νιτροποίησης που καταλύονται από τα ένζυμα AMO και HAO (Subbarao et al 2006).

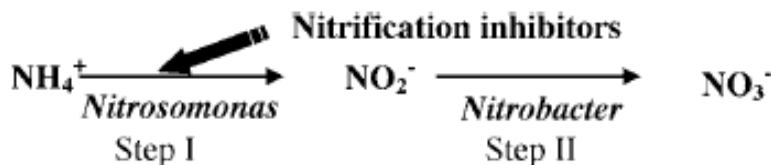
Η νιτροποίηση είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από μικροοργανισμούς επομένως επηρεάζεται από κάθε παράγοντα που θα

μπορούσε να βλάψει την καλή λειτουργία των μικροοργανισμών αυτών. Τέτοιοι παράγοντες είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση οξυγόνου, η υγρασία του εδάφους κ.α. (Puttana et al. 1999).

Σημαντικό ρόλο μπορούν να διαδραματίσουν διάφορες χημικές ουσίες, η παρουσία των οποίων εμποδίζει τη νιτροποίηση, οι ουσίες αυτές λόγω της ιδιότητάς τους ονομάζονται παρεμποδιστές νιτροποίησης (nitrification inhibitors). Έχει βρεθεί ότι δρουν έναντι του ενζύμου αμμωνιακή μονοοξυγενάση (AMO) με αποτέλεσμα να επιβραδύνουν ή και να αναστέλλουν την οξείδωση της αμμωνίας (NH_3) σε νιτρώδη (NO_2^-), συνήθως χωρίς να επηρεάζουν την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά (NO_3^-) (McCarty 1999). Δηλαδή οι παρεμποδιστές δρουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης όπως φαίνεται στα Σχήματα 4 και 5.



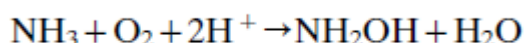
Σχήμα 4: Δράση των παρεμποδιστών νιτροποίησης (Singh and Verma 2007).



Σχήμα 5: Δράση παρεμποδιστών νιτροποίησης στην οξείδωση της αμμωνίας (Singh and Verma 2007).

Η AMO είναι ένζυμο το οποίο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των χημειοαυτότροφων αερόβιων βακτηρίων που δρουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης. Στην αντίδραση στην οποία λαμβάνει μέρος η AMO κατά τη νιτροποίηση ένα άτομο οξυγόνου από το O₂ αντιδρά με την αμμωνία (NH₃) σχηματίζοντας υδροξυλαμίνη (NH₂OH) σύμφωνα με την αντίδραση 1 (Irigoyen et al 2003). Το άλλο άτομο οξυγόνου ανάγεται σχηματίζοντας H₂O.

(1)



Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης είναι οι ουσίες οι οποίες μπορούν να δράσουν σαν εναλλακτικά υποστρώματα για την AMO εμποδίζοντας τη σύνδεση της αμμωνίας με το ένζυμο, άρα και την πορεία της νιτροποίησης. Έχει βρεθεί ότι πάνω από 60 ουσίες μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία της AMO και μάλιστα διαφορετικά υποστρώματα μπορούν να την επηρεάσουν με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Παρεμποδιστές νιτροποίησης και μηχανισμοί δράσης τους (Subbarao et al. 2006).

TABLE 1
Inhibitors and Mechanism-based (suicidal) inactivators of ammonia monooxygenase enzymatic pathway
(adapted from Arp and Stein, 2003)

Mode of action	Examples	Comments	References
I. Inhibitors			
a. Competitive vs. NH ₃	Methane, ethylene, carbon monoxide	Alternative substrates	Keener and Arp, 1993
b. Noncompetitive vs. NH ₃	Ethane, Propane, <i>n</i> -Butane, Chloromethane, Chloroethane, <i>n</i> -Chloropropane, Bromomethane, Bromoethane, Iodomethane, Iodoethane,	Alternative substrates	Keener and Arp, 1993
c. Metal Chelators	Thiourea, carbon disulfide, potassium cyanide	Cu-selective	Hooper and Terry, 1973; Hyman <i>et al.</i> , 1990
II. Mechanism-based (suicidal) Inhibitors	Alkynes, allylsulfide, <i>p</i> -anisidine	Requires enzyme turnover with O ₂	Hyman <i>et al.</i> , 1988; Juliette <i>et al.</i> , 1993

1) Σύνδεση του υποστρώματος στο μόριο του ενζύμου (ανταγωνιστική δράση με την NH₃, είτε μη- ανταγωνιστική δράση με την NH₃) είτε σχηματισμός χηλικών ενώσεων)

Όπως αναφέρει ο McCarty (1999) τα υποστρώματα ανάλογα με τη φύση τους μπορεί να έχουν ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική δράση με την

αμμωνία. Η σύνδεση και η οξείδωση των υποστρωμάτων με ανταγωνιστική δράση πραγματοποιείται στο ενεργό μέρος του ενζύμου, στο σημείο ακριβώς που πραγματοποιείται η οξείδωση της αμμωνίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της νιτροποίησης. Αντίθετα η σύνδεση των μη ανταγωνιστικών υποστρωμάτων πραγματοποιείται σε σημείο της AMO διαφορετικό από το σημείο οξείδωσης της αμμωνίας. Σ' αυτή την περίπτωση η νιτροποίηση πραγματοποιείται αλλά με χαμηλούς ρυθμούς.

Επίσης σαν παρεμποδιστές νιτροποίησης δρουν ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως η θειουρία. Ο μηχανισμός που προτάθηκε για την παρεμπόδιση της οξείδωσης της αμμωνίας από τη θειουρία βασίστηκε στο ότι η AMO περιέχει χαλκό. Η παρεμπόδιση πιθανότατα οφείλεται το σχηματισμό ενός συμπλόκου με το ενεργό μέρος του χαλκού (χηλική ένωση), όπου ο τερματικός δεσμός C=S θα συνεπάγεται σχηματισμό ιοντικού δακτυλίου.

2) Μια δεύτερη κατηγορία μηχανισμών βασίζεται στο σχηματισμό προϊόντων που απενεργοποιούν την AMO (suicide or mechanism-based inhibitors).

Στην κατηγορία αυτή των παρεμποδιστών ανήκουν ουσίες από την οξείδωση των οποίων προκύπτουν πολύ δραστικά προϊόντα. Τα προϊόντα αυτά αναστέλλουν τη λειτουργία της AMO με μη αντιστρεπτό τρόπο καθώς μεταβάλλουν τη δομή του ενζύμου. Για την επαναλειτουργία απαιτείται εκ νέου σύνθεση των πρωτεϊνών του ενζύμου. Το ακετυλένιο (C_2H_2) και το τριχλωροαιθάνιο TCE είναι τέτοιοι παρεμποδιστές. Επίσης ουσίες που περιέχουν θείο όπως είναι ορισμένα αμινοξέα και κάποια παρασιτοκτόνα φαίνεται να έχουν παρεμποδιστική δράση καθώς από την οξείδωσή τους σχηματίζονται πτητικές ενώσεις του θείου που καταστρέφουν το ένζυμο (Singh and Verma 2007).

3) Παρεμπόδιση της δημιουργίας των αναγωγικών παραγόντων οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη δράση της AMO.

Η κινητική των αντιδράσεων όπου συμμετέχει η AMO είναι ιδιαίτερος περίπλοκη καθώς για την οξείδωση οποιουδήποτε υποστρώματος είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναγωγικών παραγόντων. Οι αναγωγικοί αυτοί παράγοντες στη νιτροποίηση συνήθως παρέχονται από την οξείδωση της

υδροξυλαμίνης (το προϊόν της αντίδρασης 1). Η απαίτηση αυτή μπορεί εναλλακτικά να καλυφθεί με την οξείδωση της υδραζίνης (N_2H_4).

Σε πολλά φυσικά οικοσυστήματα όπου το άζωτο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μηχανισμοί έτσι ώστε να μειώνονται οι απώλειες του αζώτου και να χρησιμοποιείται πιο αποτελεσματικά για την επιβίωση, την παραγωγικότητα και τη σταθερότητα των οικοσυστημάτων.

Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η μείωση της νιτροποίησης. Αυτό επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση από τα φυτά οργανικών ουσιών οι οποίες παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση (Subbarao et al 2006). Οι ουσίες αυτές είτε εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών απευθείας στο έδαφος είτε αποθηκεύονται στους ιστούς τους και απελευθερώνονται κατά την αποικοδόμηση των νεκρών τμημάτων τους. Οι ουσίες αυτές είναι ουσιαστικά οι ρυθμιστές της νιτροποίησης στο έδαφος. Επιπλέον διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι οι φαινόλες και τα τερπενοειδή φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση λόγω της αντιβακτηριακής τους δράσης και της επίδρασης της στους νιτροποιητές (Subbarao et al 2007).

1.6 Χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης σαν διαχειριστικό εργαλείο

Πολλά συστατικά έχουν προταθεί να χρησιμοποιηθούν ως παρεμποδιστές νιτροποίησης, αρκετά από αυτά φαίνονται στον Πίνακα 2. Ωστόσο λίγα μόνο έχουν αξιολογηθεί στο πεδίο ως προς την αποτελεσματικότητά τους και ακόμα λιγότερα έχουν χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες. Οι περιοχές όπου έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως στις ΗΠΑ, στην Ευρώπη και την Ιαπωνία (Chen et al. 2008).

Η νιτραπυρίνη και το DCD είναι ουσιαστικά τα ευρέως χρησιμοποιούμενα συστατικά, ενώ πρόσφατα χρησιμοποιείται το DMPP κυρίως στην Ευρώπη. Το τελευταίο φαίνεται να εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τη νιτραπυρίνη και το DCD κυρίως σε ότι αφορά στην ευκολία εφαρμογής, στη διάρκεια, στη σταθερότητα και στην αποτελεσματικότητα για μεγάλες χρονικές περιόδους και κάτω από υψηλές θερμοκρασίες.

Η χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης φιλοδοξεί να μετριάσει τα προβλήματα που προκύπτουν από την αγροτική δραστηριότητα, κυρίως την έκπλυση των νιτρικών και τις εκπομπές αερίων NO και N₂O.

Πίνακας 2: Παρεμποδιστές νιτροποίησης που χρησιμοποιούνται συχνότερα στη γεωργία (Chen et al 2008).

Commonly used nitrification inhibitors in agriculture			
Name (chemical, trademark)	Solubility in water(g L ⁻¹)	Relative volatility	Mode of application
2-chloro-6-(trichloromethyl)pyridine. (Nitrapyrin; N-Serve)	0.04 (at 20C)	High	Suitable with anhydrous ammonia with injection into the soil
2-amino-4-chloro methyl pyrimidine	1.25 (at 20C)	High	Coatings on solid nitrogen fertilizers
Dicyandiamide, cyanoguanidine, DCD	23.0 (at 13C)	Low	Blending with urea or other solid nitrogen fertilizers
DMPP		Low	Blend with urea or other solid nitrogen fertilizers

Όπως αναφέρθηκε ήδη με την εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης σε καλλιεργούμενες περιοχές αποτρέπεται η μετατροπή του αζώτου σε νιτρώδη (άρα και σε νιτρικά) και η μορφή η οποία κυριαρχεί στο εδαφικό διάλυμα είναι το αμμώνιο. Το αμμώνιο συγκρατείται στις κολλοειδείς επιφάνειες των αργίλων και της οργανικής ουσίας και το άζωτο προστατεύεται τόσο από την έκπλυση όσο και από τη μετατροπή του σε αέρια οξείδια NO και N₂O. Υπολογίζεται ότι το ποσοστό του προστιθέμενου αζώτου που χάνεται σε μορφή N₂O από τις αγροτικές περιοχές μπορεί να φτάνει σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και το 35-45%. Η άρδευση με κατάκλυση, ειδικά σε βαριά εδάφη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης/απονιτροποίησης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων N₂O στην ατμόσφαιρα (Azam and Farooq 2003). Αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην Πορτογαλία με χρήση DCD στο εργαστήριο δείχνουν μέχρι και 80% μείωση των εκπομπών N₂O (Carneiro et al 2009) καθώς και πτώση έως 65% της έκπλυσης των νιτρικών (Singh and Verna 2007).

Επιπλέον οι παρεμποδιστές νιτροποίησης μπορούν έμμεσα να επηρεάσουν την ανάπτυξη της καλλιέργειας βελτιώνοντας την αντοχή σε ασθένειες και παράσιτα. Ελαττωμένη νιτροποίηση σημαίνει υψηλή συγκέντρωση NH₄⁺ στο έδαφος κι αυτό με τη σειρά του αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Για παράδειγμα τρεις ασθένειες του σιταριού που

οφείλονται στους μικροοργανισμούς *Cercospora* sp., *Gaeummaromyces graminis* και *Fysarium* sp. καταπολεμήθηκαν με χρήση νιτραπυρίνης (Subbarao et al 2007).

Η μείωση των απωλειών αζώτου αυτόματα σημαίνει μείωση καταναλισκόμενης ενέργειας τόσο από την παραγωγή όσο και από τη μεταφορά των αζωτούχων λιπασμάτων. Αλλά και τα φυτά παρουσιάζουν μείωση της καταναλισκόμενης ενέργειας αφού δεν απαιτείται η ενεργοβόρα αναγωγή του νιτρικής μορφής αζώτου προκειμένου να αναβολίσουν το ανόργανο άζωτο σε αμινοξέα. Επίσης σημαντικό είναι το χρηματικό όφελος των παραγωγών τόσο από τη μικρότερη απαιτούμενη ποσότητα λιπασμάτων αλλά και τη μικρότερη συχνότητα των εφαρμογών της αζωτούχου λίπανσης στις καλλιέργειες.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως οι παρεμποδιστές νιτροποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν διαχειριστικό εργαλείο του αζώτου στις καλλιεργούμενες περιοχές, παρέχοντας οικονομικό και οικολογικό όφελος.

1.7 Περιορισμοί στη χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης

Το κόστος για την εφαρμογή σε καλλιέργεια παρεμποδιστών νιτροποίησης κυμαίνεται από US\$ 25 έως 35 ha⁻¹ (οι τιμές αφορούν το DCD και τη νιτραπυρίνη), κόστος το οποίο αγγίζει το 25-30% του συνολικού κόστους του λιπάσματος (Chen et al 2008).

Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες καλλιέργειες δεν ευνοούνται από την υψηλή συγκέντρωση NH₄⁺. Έτσι οι παρεμποδιστές νιτροποίησης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως πανάκεια.

Οι υψηλές θερμοκρασίες και η υψηλή τιμή εδαφικού pH επιταχύνουν τη νιτροποίηση. Σ' αυτές όμως τις συνθήκες οι μέχρι σήμερα διαθέσιμοι παρεμποδιστές νιτροποίησης δεν μπορούν να δράσουν και αυτό είναι ιδιαίτερα περιοριστικό για τις πιο θερμές κλιματικά χώρες. Επίσης δεν έχει εφαρμοστεί εντατική χρήση αυτών των ουσιών έτσι ώστε να είναι απόλυτα εμφανή τα αποτελέσματα της χρήσης τους. Στις ΗΠΑ μόνο στο 1,16% των καλλιεργειών έχει χρησιμοποιηθεί DCD ή νιτραπυρίνη ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στη δυτική Ευρώπη είναι στο 0,29% των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Όπως γίνεται φανερό η χρήση των παρεμποδιστών νιτροποίησης δεν έχει υιοθετηθεί ακόμα

από τους καλλιεργητές και αυτό οφείλεται στην έλλειψη πληροφόρησης των καλλιεργητών καθώς και στο υψηλό κόστος που φτάνει να είναι 8 φορές υψηλότερο από πολλά συμβατικά λιπάσματα.

1.8 Τεχνικές ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους

Οι μικροοργανισμοί που ζουν στο έδαφος έχουν κυρίαρχο ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους των στοιχείων καθώς και στη λειτουργία των οικοσυστημάτων. Εξαιτίας του γεγονότος ότι συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και στην απελευθέρωση θρεπτικών στοιχείων επηρεάζουν τη συγκέντρωση των θρεπτικών, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους καθώς και την πρωτογενή παραγωγή. Επιπλέον οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως είναι η αστική ανάπτυξη, η εντατική καλλιέργεια, η χρήση εντομοκτόνων και η ρύπανση επηρεάζουν τη μικροβιακή ποικιλότητα και τη δραστηριότητα του εδάφους. Ως εκ τούτου η μελέτη των μικροοργανισμών του εδάφους είναι σημαντική για την κατανόηση των διεργασιών που συμβαίνουν στα εδαφικά οικοσυστήματα.

Οι μέθοδοι για την μελέτη των μικροοργανισμών του εδάφους χωρίζονται σε τρεις ευρείες κατηγορίες: στη μελέτη της μικροβιακής βιομάζας (microbial biomass), του ρυθμού της μικροβιακής δραστηριότητας (activity rates) και της μικροβιακής ποικιλότητας (microbial diversity)(Van Antwerpen et al. 2005).

1.8.1 Μικροβιακή βιομάζα

Η εδαφική μικροβιακή βιομάζα αναφέρεται στη μάζα των εδαφικών μικροοργανισμών που ζουν σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ο υπολογισμός της εδαφικής μικροβιακής βιομάζας παρέχει πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των αναμενόμενων μεταβολών του εδάφους σε οργανική ουσία, που προκαλείται από τις διάφορες μεθόδους διαχείρισης των εδαφών, για την αξιολόγηση της ποιότητας του εδάφους, για την εκτίμηση της ταχύτητας ακινητοποίησης-ανοργανοποίησης αζώτου στο έδαφος και τον υπολογισμό των εποχιακών διακυμάνσεων στη μικροβιακή

βιομάζα και τέλος χρησιμεύει ως δείκτης παρουσίας τοξικών παραγόντων (π.χ. τοξικότητα μετάλλων-οργανικών ρυπαντών) (Nielsen and Winding 2002).

Επιπλέον, οι μετρήσεις του άνθρακα και των θρεπτικών συστατικών που περιλαμβάνονται στη μικροβιακή βιομάζα, παρέχουν μια βάση για τις μελέτες των μετασχηματισμών και την προσομοίωση των κύκλων της εδαφικής οργανικής ουσίας, δεδομένου ότι η μικροβιακή βιομάζα είναι ένα από τα πλέον διακριτά και ευπροσδιόριστα συστατικά της. Ο Dalal (1998) αναφέρει ότι η οργανική ουσία που περιέχεται στη βιομάζα των μικροοργανισμών του εδάφους δεν ξεπερνά το 5% του συνόλου της οργανικής ουσίας του εδάφους.

Ο υπολογισμός της μικροβιακής βιομάζας του εδάφους μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η άμεση καταμέτρηση των εδαφικών μικροοργανισμών και η εκτίμηση της συνολικής μάζας τους είναι ένας χρονοβόρος και επίπονος ερευνητικός στόχος. Η διασπορά του εδάφους σε νερό και η εξέταση λεπτών υμενίων αυτής της διασποράς με μικροσκοπία μετά από χρώση, είναι η βασική τεχνική με την οποία καταμετρώνται τα μικροβιακά κύτταρα και δίνεται μια εκτίμηση του όγκου των μικροοργανισμών. Η μέση πυκνότητα των κυττάρων των μικροοργανισμών απαιτείται να είναι γνωστή για τη μετατροπή του όγκου σε μάζα.

Επίσης άμεσος προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA). Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των μεμβρανών των εδαφικών μικροοργανισμών σε σχετικά σταθερή αναλογία με την συνολική βιομάζα τους. Το σύνολο τους μπορεί να δώσει μια εικόνα για την εδαφική μικροβιακή βιομάζα (Baath and Anderson 2003). Η τεχνική αυτή όμως εμφανίζει περισσότερες δυνατότητες και χρησιμοποιείται κυρίως για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων, όπως αναφέρεται σε επόμενη παράγραφο.

Οι έμμεσες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας είναι απλούστερες, πιο γρήγορες και λιγότερο επίπονες σε σχέση με τις άμεσες μεθόδους. Ο υπολογισμός της μικροβιακής αναπνοής που εξαρτάται άμεσα από το υπόστρωμα (Substrate Induced Respiration-SIR) είναι μία από αυτές. Υπολογίζει τη βιομάζα εδαφικού δείγματος μετρώντας τη μεταβολή στο ρυθμό της μικροβιακής αναπνοής ($\text{ml CO}_2/\text{h}$) αμέσως μετά την προσθήκη

υποστρώματος που διασπάται εύκολα (π.χ. γλυκόζη) (Nielsen et al. 2002). Ωστόσο και η μέθοδος αυτή εμφανίζει κάποιους περιορισμούς ο σημαντικότερος από τους οποίους είναι ότι υπολογίζει τη βιομάζα των μεταβολικά ενεργών μικροοργανισμών του εδάφους και μάλιστα εκείνων που αντιδρούν στην παρουσία συγκεκριμένου υποστρώματος (Dalal 1998). Επίσης βασίζεται στην υπόθεση ότι ο μέσος μεταβολικός συντελεστής της βιομάζας (metabolic quotient, qCO_2) είναι παρόμοιος για μικροβιακές κοινότητες διαφορετικής σύνθεσης, τουλάχιστον κατά τα πρώτα στάδια αντίδρασης στην υπερπροσφορά υποστρώματος.

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι συστατικό όλων των ζωντανών μικροβιακών κυττάρων. Μπορεί να βρεθεί σε νεκρά κύτταρα ή εξωκυτταρικά στο έδαφος όπου όμως αποδομείται πολύ γρήγορα. Συνεπώς η συγκέντρωση της ATP μπορεί να δώσει μία εκτίμηση της βιομάζας των ζωντανών μικροβιακών κυττάρων του εδάφους. Συνήθως η ATP εκχυλίζεται από το έδαφος με όξινα αντιδραστήρια και ο υπολογισμός γίνεται με το σύστημα λουσιφερίνης-λουσιφεράσης. Η αναλογία C:ATP είναι περίπου 200 αν και μπορεί να ποικίλει από 120-240 (Dalal 1998).

Οι περιορισμοί αυτής της μεθόδου είναι ότι η ATP αποσυντίθεται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον μετά το θάνατο των μικροβιακών κυττάρων η ATP που απελευθερώνεται απορροφάται ταχέως από την άργιλο και αυτό ίσως επηρεάζει στον υπολογισμό της πραγματικής ATP των ζώντων μικροοργανισμών (Wen et al 2005).

Η άτμιση με χλωροφόρμιο είναι η πιο κοινή έμμεση μέθοδος. Θεωρείται ότι με αυτή μπορεί να υπολογιστεί το μεγαλύτερο μέρος της μικροβιακής βιομάζας, αν και ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν επηρεάζονται από την άτμιση. Ο προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας με άτμιση με χλωροφόρμιο μπορεί να πραγματοποιηθεί με α) άτμιση-επάση (Chlorophorm Fumigation Incubation-CFI) και β) άτμιση-εκχύλιση (Chlorophorm Fumigation Extraction-CFE). Και στις δύο περιπτώσεις οι ατμοί του χλωροφορμίου σκοτώνουν τους μικροοργανισμούς του εδάφους οι οποίοι υπολογίζονται ποσοτικά είτε από το CO_2 που προκύπτει έπειτα από επάση του ατμισμένου και επανεμβολιασμένου με μικροοργανισμούς δείγματος (CFI) είτε από την άμεση εκχύλιση και υπολογισμό του περιεχόμενου στο έδαφος άνθρακα (CFE).

(Nielsen et al. 2002). Στην δεύτερη περίπτωση αντί για εκχυλισμένο άνθρακα μπορεί κανείς να μετρήσει το εκχυλισμένο άζωτο, εκτιμώντας έτσι την μικροβιακή βιομάζα αζώτου.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνότερα και θεωρείται η απλούστερη αξιόπιστη διαδικασία είναι η μέθοδος ατμισμού-εκχύλισης (CFE) (Jenkinson et al 2004). Η αρχή της μεθόδου είναι η εκτίμηση του μικροβιακού άνθρακα από τη διαφορά ολικού άνθρακα (ή αζώτου) στα εκχυλίσματα ατμισμένου και μη ατμισμένου εδάφους (αντίδραση με νινυδρίνη για τον υπολογισμό του αζώτου, υγρή οξείδωση με διχρωμικό κάλιο για τον υπολογισμό του εκχυλισμένου ολικού άνθρακα). Η άτμιση των εδαφικών δειγμάτων σε χλωροφόρμιο οδηγεί στη λύση των μικροβιακών κυττάρων και στην απελευθέρωση των χημικών συστατικών που τα αποτελούν, χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα η διαλυτότητα του άνθρακα της οργανικής ουσίας. Απαιτείται όμως η κατά το δυνατόν πληρέστερη απομάκρυνση ριζών και ριζικών τριγιδίων από το εδαφικό δείγμα.

Έτσι για τον προσδιορισμό του μικροβιακού άνθρακα για παράδειγμα υπολογίζεται ο άνθρακας που υπήρχε στο έδαφος σε μη ατμισμένα δείγματα και κατόπιν υπολογίζεται ο ολικός άνθρακας των ατμισμένων εδαφικών δειγμάτων. Η διαφορά των δύο μετρήσεων δείχνει τον άνθρακα που περιέχεται αποκλειστικά στους μικροοργανισμούς του εδάφους και που απελευθερώθηκε μετά τη λύση των κυττάρων.

1.8.2 Μικροβιακή δραστηριότητα

Ο ρυθμός της μικροβιακής δραστηριότητας αφορά στις διεργασίες που συμβαίνουν από τους μικροοργανισμούς του εδάφους στη μονάδα του χρόνου. Η μελέτη της μικροβιακής δραστηριότητας περιγράφει κυρίως τον καταβολισμό εδαφικού υποστρώματος από τους μικροοργανισμούς και μπορεί να υπολογιστεί από τη μικροβιακή αναπνοή (Joergensen and Emmerling 2006). Η μικροβιακή αναπνοή του εδάφους αντιπροσωπεύει τη βιολογική οξείδωση της οργανικής ύλης του εδάφους και την παραγωγή CO₂ από αερόβιους μικροοργανισμούς (Nielsen et al. 2002). Έτσι η μικροβιακή δραστηριότητα μπορεί να υπολογιστεί σαν ρυθμός παραγωγής CO₂ ή ρυθμός κατανάλωσης O₂.

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται συνήθως στο εργαστήριο όπου δείγματα εδάφους τοποθετούνται σε ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας όπου και υπολογίζεται η μικροβιακή αναπνοή από την ποσότητα CO₂ που απελευθερώνεται στη μονάδα του χρόνου. Η ίδια διαδικασία στο πεδίο εμφανίζει δυσκολίες διότι δεν μπορεί να γίνει διαφοροποίηση της μικροβιακής αναπνοής από αυτή των φυτικών οργανισμών και επιπλέον υπάρχει δυσκολία προσδιορισμού της αναπνοής ανά μονάδα επιφάνειας και κυρίως ανά μονάδα εδαφικού όγκου.

Υψηλός ρυθμός μικροβιακής αναπνοής καταδεικνύει υγιές έδαφος το οποίο δεν έχει διαταραχτεί, χωρίς το αντίστροφο να είναι απαραίτητα ένδειξη τοξικότητας ή διαταραχής (απολύτως ισορροπημένα και υγιή εδαφικά οικοσυστήματα αμμώδη και με χαμηλή οργανική ουσία παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό μικροβιακής αναπνοής). Οι Schloter et al (2003) αναφέρουν ότι η μικροβιακή αναπνοή είναι η καλύτερη ένδειξη της συνολικής μεταβολικής δραστηριότητας των μικροβιακών πληθυσμών του εδάφους. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ εδαφών αλλά και τη σύγκριση σε διαφορετικές διαχειριστικές πρακτικές στο ίδιο έδαφος (Van Antwerpen et al. 2005). Ωστόσο η μικροβιακή αναπνοή εμφανίζει γρήγορες διακυμάνσεις οι οποίες εξαρτώνται από το διαθέσιμο υπόστρωμα, την υγρασία και τη θερμοκρασία. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν πολύ γρήγορα να αντιδράσουν στις αλλαγές των εδαφικών συνθηκών, έστω και αν παραμείνουν ανενεργοί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Επίσης η ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση διάφορων εδαφικών παραμέτρων, κυρίως όμως για τον υπολογισμό της μικροβιακής δραστηριότητας (Smith and Pugh 1979). Τα ένζυμα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε διεργασίες του εδάφους όπως στον κύκλο του άνθρακα ή/και στον κύκλο του αζώτου και ο αριθμός τους ξεπερνά ίσως τα 500. Η δραστηριότητα πολλών από αυτά δεν μπορεί να προσδιοριστεί στο εργαστήριο, έτσι επιλέγονται κάποια ένζυμα κοινά σε όλους σχεδόν τους μικροοργανισμούς σαν σημείο αναφοράς, οι αλλαγές των οποίων αντικατοπτρίζουν αλλαγές στην ενζυμική δραστηριότητα του εδάφους, άρα και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Schloter 2003).

Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά σαν δείκτες είναι οι εστεράσες ή, ακόμα συχνότερα, οι αφυδρογονάσες. Οι αφυδρογονάσες συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής στον κύκλο του Krebs. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας των αφυδρογονασών αποτελεί δείκτη της δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εδάφους (Smith and Pugh 1979).

Η δραστηριότητα των αφυδρογονασών πιστεύεται ότι προκαλείται στην πραγματικότητα από μια ευρεία ομάδα ενδοκυτταρικών ενζύμων, με τη βοήθεια των οποίων μεταφέρονται υδρογόνα και ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα σε συγκεκριμένους αποδέκτες στα αρχικά στάδια της οξειδωσης των οργανικών υλικών. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσα από μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο, το οποίο είναι και ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων (Chander and Brookest 1991). Η αναγωγή του 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) σε triphenylformazan (TPF) είναι μία τυπική αντίδραση, η οποία χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της εδαφικής αφυδρογονάσης, όπου απουσία οξυγόνου η TTC δρα ως τελικός δέκτη ηλεκτρονίων.

Ωστόσο και σ' αυτή τη μέθοδο παρατηρούνται μειονεκτήματα κυρίως διότι η δράση των αφυδρογονασών αλλά και όλων των ενζύμων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η μικροβιακή ποικιλότητα των εδαφικών δειγμάτων και οι διάφορες χημικές ουσίες που περιορίζουν τη δράση των ενζύμων. Αυτά καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση εδαφών και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Beyer et al. 1993). Επιπλέον τα αποτελέσματα ενδέχεται να αφορούν δράση που οφείλεται σε ένζυμα προσροφημένα στην οργανική ουσία του εδάφους ή στα κολλοειδή της αργίλου και όχι σε ένζυμα ζωντανών μικροβιακών κυττάρων (Ομηρου 2009).

1.8.3 Μεταβολικός συντελεστής ή Μικροβιακό μεταβολικό πηλίκιο (microbial metabolic quotient, qCO_2)

Οι Anderson and Domsch (1985) πρότειναν το πηλίκιο της μικροβιακής αναπνοής προς την αντίστοιχη μικροβιακή βιομάζα (microbial metabolic quotient, qCO_2) σαν έναν διαφορετικό δείκτη των αλλαγών της μικροβιακής βιομάζας μετά από κάποια διαταραχή του εδάφους.

Το qCO_2 αντιπροσωπεύει το ρυθμό μικροβιακής αναπνοής ανά μονάδα μικροβιακής βιομάζας. Έτσι η μικροβιακή δραστηριότητα σχετίζεται με τη μικροβιακή βιομάζα. Το μικροβιακό πηλίκιο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη εδαφών στο χρόνο, όπου το πηλίκιο μειωνόταν σαφώς με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον το qCO_2 χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των περιβαλλοντικών παραμέτρων (pH, θερμοκρασία, ύπαρξη βαρέων μετάλλων κτλ) και την επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς. Γενικά φαίνεται ότι το qCO_2 είναι υψηλότερο όταν το επίπεδο καταπόνησης (stress) του οικοσυστήματος είναι υψηλό. Ωστόσο η ερμηνεία του δείκτη αυτού δεν είναι τόσο απλή καθώς υψηλό qCO_2 μπορεί να σημαίνει έκθεση των μικροοργανισμών σε περιβαλλοντική καταπόνηση, ανώριμο οικοσύστημα αλλά και υπόστρωμα που μεταβολίζεται εύκολα (Wardle and Ghani 1995) ή ιδιαίτερη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας.

1.8.4 Ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων

Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας είναι ένα δύσκολο εγχείρημα όχι μόνο από τις μεθοδολογικές ελλείψεις αλλά και από την έλλειψη γνώσεων για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών του εδάφους (Liu et al. 2006).

Ωστόσο μια λεπτομερής ταξινομική κατάταξη, ακόμα και αν μπορούσε να γίνει, δεν είναι κατ' ανάγκη σημαντική για την κατανόηση και την περιγραφή των διεργασιών που συμβαίνουν στο έδαφος. Η διαίρεση των μικροοργανισμών σε υποκοινωνίες με διαφορετικό λειτουργικό ρόλο μπορεί να συνδράμει τη μελέτη των εδαφικών διεργασιών πολύ περισσότερο, παρακάμπτοντας τα προβλήματα μιας εξονυχιστικής ταξινόμησης. Σε μια τέτοια προσέγγιση που αφορά τις αποδομητικές λειτουργίες οι μικροοργανισμοί προσδιορίζονται ως ομάδες με μέλη οργανισμούς με παρόμοιο λειτουργικό ρόλο. Εντούτοις ευρείες διακρίσεις ταξινομικής κατηγοριοποίησης συνδέονται συνήθως άμεσα με αυτόν το λειτουργικό ρόλο διαφορετικών οργανισμών αφού αντικατοπτρίζουν μεγάλες διαφορές στη φυσιολογία των οργανισμών (Οιχαλιώτης 2003).

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Χωρίζονται στις μεθόδους που

βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε διάφορα μέσα ανάπτυξης και στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους.

Ένα από τα βασικά προβλήματα στις παραδοσιακές μεθόδους ήταν η αδυναμία καλλιέργειας των οργανισμών στο εργαστήριο καθώς και η φαινοτυπική έκφρασή τους (μικροβιακή αναπνοή, ένζυμα, καταβολικές διεργασίες). Αυτό γιατί δεν είναι δυνατή η καλλιέργεια στο εργαστήριο όλων των μικροοργανισμών του εδάφους. Υπολογίζεται ότι μόνο το 0,1-3% των μικροοργανισμών του εδάφους αναπτύσσονται στο εργαστήριο, ιδιαίτερη δυσκολία εμφανίζουν πολλοί μύκητες. Επιπλέον κάτω από εργαστηριακές συνθήκες δεν εμφανίζεται έκφραση των γονιδίων όπως στα φυσικά οικοσυστήματα, επομένως πολλές από τις βιοχημικές/μοριακές τεχνικές δεν δίνουν ακριβή αποτελέσματα (Liu et al. 2006).

Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας στο έδαφος χρησιμοποιούνται βιοχημικές και μοριακές τεχνικές.

1.8.5 Βιοχημικές τεχνικές

Οι Garland και Mills (1991) παρουσίασαν μια διαφορετική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας που αφορά στο χαρακτηρισμό των εδαφικών κοινοτήτων με βάση τη λειτουργικότητα των ομάδων από τις οποίες αποτελούνται.

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι διάφορες ομάδες μικροοργανισμών χρησιμοποιούν διαφορετικό υπόστρωμα σαν πηγή άνθρακα (Sole Carbon Source Utilization-SCSU). Έτσι από την καλλιέργεια εδαφικού δείγματος σε ένα εύρος υποστρωμάτων άνθρακα προκύπτει το «μεταβολικό προφίλ» της μικροβιακής κοινότητας (Community Level Physiological Profiles-CLPP). Ο προσδιορισμός της μικροβιακής ποικιλότητας προκύπτει από τη διαφορά που εμφανίζεται στην κατανάλωση οργανικών υποστρωμάτων από κάθε λειτουργική ομάδα. Οι διαφορές στην κατανάλωση των οργανικών υποστρωμάτων μεταφράζονται σαν διαφορές στις κυρίαρχες ομάδες της μικροβιακής κοινότητας (Liu et al. 2006). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων «λειτουργικών» μικροβιακών ομάδων.

Το σύστημα BIOLOG λειτουργεί ακριβώς με αυτόν τον τρόπο και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ρυπασμένα εδάφη και σε εδάφη στα οποία έχει γίνει χρήση ζιζανιοκτόνων. Στο σύστημα BIOLOG χρησιμοποιούνται 95 διαφορετικά υποστρώματα. Αναπτύχθηκε κυρίως για άλλα, βιολογικά περιβάλλοντα, και έχουν προταθεί παραλλαγές του για τα εδαφικά οικοσυστήματα. Έχει ωστόσο επικρατήσει μέχρι σήμερα η χρήση του πρωτογενούς συστήματος και για τα εδάφη. Η τεχνική αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με αυτόματες συσκευές μετρήσεων όπου φαίνεται πολύ γρήγορα η κατανάλωση ή όχι του υποστρώματος (Garland and Mills 1991). Δείκτες που αλλάζουν χρώμα σε αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής δίνουν ένα οπτικό αποτέλεσμα από το οποίο μπορεί να εξαχθεί πληθώρα πληροφοριών, η επεξεργασία και ανάλυση των οποίων είναι συχνά δύσκολη και πολύπλοκη. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει μειονεκτήματα κυρίως από την αδυναμία καλλιέργειας των μικροοργανισμών στο εργαστήριο αλλά και λόγω της διαφοράς που παρουσιάζουν οι εργαστηριακές συνθήκες καλλιέργειας σε σχέση με τις συνθήκες που συναντώνται στα φυσικά εδαφικά οικοσυστήματα.

Η ανάπτυξη βιοχημικών και μοριακών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Πολλές από τις νέες μεθόδους στηρίζονται στην εκχύλιση συστατικών από τα μικροβιακά κύτταρα, περιορίζοντας τις δυσκολίες που εμφάνιζαν παλαιότερες μέθοδοι. Τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα λόγω της μεγάλης ποικιλίας που εμφανίζουν αλλά και λόγω της αφθονίας τους στα μικροβιακά κύτταρα αποτελούν πολλά υποσχόμενα συστατικά για την έρευνα και τον προσδιορισμό των μικροβιακών κοινοτήτων (Drenovsky et al. 2004).

Μέχρι σήμερα δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι η μελέτη των λιπιδίων (Signature Lipid Biomarkers-SLB) και μοριακές τεχνικές που αφορούν στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών (Liu et al. 2006).

Στις βιοχημικές τεχνικές ανήκουν η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (Phospholipid Fatty Acid Analysis-PLFA) η οποία αναπτύχθηκε από τους White και Findlay (1988) και η ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Ester-FAME). Και στις δύο τεχνικές αναλύονται τα λιπαρά οξέα των λιπιδίων που εκχυλίζονται από

εδαφικά δείγματα. Η διαφορά τους είναι ότι κατά την ανάλυση FAME σαπωνοποιούνται και μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες το σύνολο των λιπαρών οξέων τα οποία μπορούν να μεθυλιωθούν, περιλαμβανομένων των φωσφολιπιδίων. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται περισσότερο για την εκτίμηση της μικροβιακής βιομάζας παρά για την ποιοτική ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων και τον εντοπισμό των διάφορων λειτουργικών ομάδων σ' αυτές (Green and Scow 2000).

Η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (Phospholipid Fatty Acid Analysis-PLFA) είναι μια τεχνική που έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα στον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων του εδάφους. Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ζωντανών κυττάρων και αποσυντίθεται όταν το κύτταρο πεθάνει. Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα PLFA-δείκτες στις κυτταρικές τους μεμβράνες, παρουσιάζοντας διαφορές όσον αφορά στο μήκος της αλυσίδας τους και στην παρουσία ή απουσία ακόρεστων ομάδων, δακτυλίων διακλαδισμένων αλυσίδων ή υδροξυλομάδων. Κάθε λειτουργική ομάδα συνεισφέρει στο αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ανάλογα με τη βιομάζα της (Σπύρου 2008).

Ως εκ τούτου μεταβολές στη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων αντιπροσωπεύουν μεταβολές στη σύσταση της ενεργής μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος. Οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων δεν αποδίδονται σε πληθυσμιακές αλλαγές ενός συγκεκριμένου είδους αλλά σε ευρείες και σχετικά συγγενείς λειτουργικά ομάδες μικροοργανισμών. Αυτό ακριβώς είναι και το πλεονέκτημα της μεθόδου όσον αφορά μια οικολογική προσέγγιση των διαταραχών στο έδαφος μιας και αποδίδει εύκολα διαταραχές σε λειτουργικές ομάδες ταξινομικά συγγενών μικροοργανισμών.

Η ανάλυση PLFA έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για τη μελέτη των μεταβολών της μικροβιακής κοινότητας που προκαλείται εξαιτίας ρύπανσης με οργανικές και ανόργανες χημικές ουσίες .

1.8.6 Μοριακές τεχνικές

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έδωσε τη δυνατότητα διαφορετικής προσέγγισης στη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων και των λειτουργικών ομάδων από τις οποίες αποτελούνται.

Η λογική στις μοριακές τεχνικές είναι να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Παράδειγμα τέτοιας μεθόδου είναι η T-RFLP (ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού). Αφού το DNA εκχυλιστεί από το εδαφικό δείγμα ενισχύεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη του προϊόντος της PCR με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Από την πέψη παράγονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται με συσκευή πολυκάναλου τριχοειδή αναλυτή αλληλουχιών (multichannel capillary sequencer) όπου ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού και το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας και αναλύεται με ειδικά προγράμματα (Σπύρου 2008). Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές του ηλεκτροφοριογραφήματος) παρέχει πληροφορίες για την ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα. Η μέθοδος αυτή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων αλλά και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων.

Τη λογική αυτής της μεθόδου ακολουθούν αρκετές μοριακές μέθοδοι όπως η RISA και ARISA στις οποίες ενισχύεται με PCR συγκεκριμένη περιοχή (η διαγονιδιακή περιοχή ανάμεσα στη μικρή και στη μεγάλη υπομονάδα των rRNA γονιδίων). Αυτή η περιοχή είναι εξαιρετικά μεταβλητή σε μέγεθος και σε αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η μέθοδοι αυτές εκμεταλλεύονται την ετερογένεια μήκους, και σύνθεσης σε βάσεις, της περιοχής αυτής. Τα προϊόντα της PCR που προέρχονται από ενίσχυση περιοχών των rRNA γονιδίων στο DNA του περιβαλλοντικού δείγματος μπορεί να οδηγηθούν σε ανάλυση και ταυτοποίηση των οργανισμών από τους οποίους προέρχονται σε επίπεδο είδους ή και στελέχους. Αυτό πραγματοποιείται με κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και στη συνέχεια αλληλούχηση τους.

Η αποτύπωση των προϊόντων της PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE). Η τεχνική DGGE έχει την ικανότητα διαχωρισμού μικρών μορίων DNA (200-300 ζεύγη βάσεων) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αρκεί να διαφέρουν μόλις σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου σε σύγκριση με την κινητικότητα της πλήρους δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι αλυσίδες ενός τμήματος DNA αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία εξαρτάται από: α) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και β) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του μορίου του DNA έχει αποδιαταχτεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου του DNA αποτρέπεται από την προσθήκη στο ένα άκρο του μορίου ενός «δεσμευτή αποδιάταξης» (clump) που αποτελείται από αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC clamp). Αυτό επιτυγχάνεται κατά την PCR όπου ο ένας από τους δυο εκκινητές που χρησιμοποιούνται φέρει το 5' άκρο την αλληλουχία αυτού του ζεύγους βάσεων. Οι ζώνες DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση αντιστοιχούν άμεσα στη γενετική ποικιλότητα του δείγματος που εξετάζεται ενώ ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

1.9 Στόχος

Στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν η μελέτη της επίδρασης του παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD παρουσία και απουσία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) στη δραστηριότητα των μικροοργανισμών εδαφικού δείγματος. Επίσης στόχο αποτέλεσε η εξαγωγή των εδαφικών φωσφορολιπιδίων και η εφαρμογή της ανάλυσης PLFA για τον προσδιορισμό

των λειτουργικών ομάδων της μικροβιακής κοινότητας του εδαφικού δείγματος καθώς και την ποιοτική επίδραση του DCD και των ΥΑΕ σε αυτές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδαφικού δείγματος

Το έδαφος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προέρχεται από δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του ΤΕΙ Καλαμάτας και σε βάθος 20-40 εκατοστά από την επιφάνεια του εδάφους. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους προσδιορίστηκαν με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδαφολογίας του τμήματος Α.Φ.Π. και Γ.Μ. της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών.

Πιο αναλυτικά, με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν έγινε προσδιορισμός του pH, της αγωγιμότητας, μέτρηση ανθρακικού ασβεστίου και ενεργού ασβεστολίθου, υπολογισμός του ολικού αζώτου, της οργανικής ουσίας και του φωσφόρου. Επίσης προσδιορίστηκε η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (ΙΑΚ) και τα ανταλλάξιμα ιόντα Na-K-Ca-Mg. Τέλος πραγματοποιήθηκε κοκκομετρική ανάλυση. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σύμφωνα με τον Εργαστηριακό Οδηγό του Εργαστηρίου Εδαφολογίας του τμήματος Α.Φ.Π. και Γ.Μ. της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών.

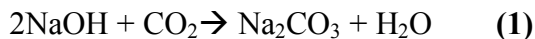
2.2 Προσδιορισμός της αναπνευστικής δραστηριότητας

Η μικροβιακή αναπνοή του εδάφους αντιπροσωπεύει τη βιολογική οξείδωση της οργανικής ύλης του εδάφους και την παραγωγή CO₂ από αερόβιους μικροοργανισμούς (Nielsen et al. 2002). Η αναπνευστική δραστηριότητα μπορεί να υπολογιστεί σαν ρυθμός παραγωγής CO₂. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην παγίδευση του CO₂ που παράγεται από την αναπνοή των μικροοργανισμών σε υγρό έδαφος σε διάλυμα NaOH. Στη συνέχεια το CO₂ που παγιδεύεται υπολογίζεται έμμεσα από την τιτλοδότηση του NaOH που δεν έχει ήδη αντιδράσει, με HCl γνωστής συγκέντρωσης.

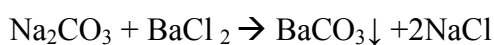
Αναλυτικά:

Το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου το οποίο βρίσκεται σε «παγίδα» δηλαδή σε απλό περιέκτη εντός φιάλης αναπνοής που περιέχει το έδαφος, αντιδρά με το CO₂ που παράγεται από την αναπνοή των εδαφικών

μικροοργανισμών, σχηματίζοντας ανθρακικό νάτριο στο διάλυμα της παγίδας σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το μικτό διάλυμα Na_2CO_3 και NaOH δεν μπορεί να τιτλοδοτηθεί άμεσα με HCl διότι συμμετέχουν και τα δύο στην αντίδραση με το οξύ. Το χλωριούχο βάριο προστίθεται για να κατακρημνίσει το ανθρακικό νάτριο:



Το ανθρακικό βάριο που προκύπτει δεν αντιδρά με το υδροχλωρικό οξύ, κατά συνέπεια το HCl αντιδρά μόνο με το υπόλοιπο NaOH :



Από την τιτλοδότηση κάθε παγίδας προκύπτει ένας όγκος HCl ο οποίος απαιτείται για την εξουδετέρωση του εναπομείναντος NaOH κάθε δείγματος. Στη συνέχεια απαιτούνται κάποιοι επιπλέον υπολογισμοί. Αρχικά μετατρέπονται τα ml του HCl σε moles:

moles HCl = συγκέντρωση HCl (moles lt^{-1}) X ml HCl που χρησιμοποιήθηκε κατά την τιτλοδότηση

Προσδιορίζοντας την ποσότητα (moles) του HCl που χρησιμοποιήθηκε κατά την τιτλοδότηση γίνεται αμέσως γνωστή η ποσότητα του NaOH που παρέμενε στο διάλυμα στο τέλος της επώασης του εδάφους (είναι ίδιες), επομένως μπορεί να υπολογιστεί το NaOH το οποίο αντέδρασε με το CO_2 κατά την διάρκεια της επώασης, σχηματίζοντας Na_2CO_3 . Για τον υπολογισμό του CO_2 από τη μικροβιακή αναπνοή πρέπει να αφαιρεθεί το CO_2 το οποίο υπήρχε ήδη στον αέρα της φιάλης και δεν προέρχεται από τη μικροβιακή αναπνοή. Αυτό προκύπτει από τις φιάλες-τυφλά οι οποίες δεν περιέχουν έδαφος.

Στην εξίσωση 1 φαίνεται ότι 2 mol NaOH αντιδρούν με 1 mol CO₂. Η μοριακή μάζα του CO₂ είναι 44 g mol⁻¹. Επομένως το ποσό του CO₂ που έχει αντιδράσει με το NaOH στις φιάλες είναι:

$$\text{Μάζα CO}_2 = [\text{NaOH που αντέδρασε με CO}_2 \text{ (moles)}/2] \times 44 \text{ g mol}^{-1}$$

Το αποτέλεσμα που προκύπτει αφορά το CO₂ το οποίο εκλύεται από τα γραμμάρια εδάφους (80g στην περίπτωση αυτού του πειράματος) που τοποθετήθηκαν στη φιάλη και σε χρόνο ίσο με το χρόνο αλλαγής κάθε παγίδας. Μπορούμε να εκφράσουμε την αναπνευστική δραστηριότητα ως g CO₂ g⁻¹ ξηρού εδάφους sec⁻¹.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

NaOH 0,5 και 1M

DCD

Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης 1%

HCl 0,25 M και 0,5 M

BaCl₂ 2M

ΓΥΑΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Ζυγαριά

Σωλήνες falcon 50 ml

Γυάλινα βάζα εμπορίου 1000 ml με καπάκι

Σιφόνια

Προχοΐδα 50 ml

Αυτόματη πιπέτα 10 ml

Κωνικές φιάλες 250 ml

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Εδαφικό δείγμα 80 g τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο με αεροστεγώς εφαρμοζόμενο καπάκι (φιάλη αναπνοής). Επιπλέον στο έδαφος προστίθενται 6 ml απιονισμένου νερού και 1,6 ml διαλύματος θειικής αμμωνίας ((NH₄)₂SO₄).

Συνολικά ετοιμάστηκαν 60 φιάλες αναπνοής με δείγμα εδάφους και 6 κενές φιάλες (τυφλά). Τα δείγματα χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με τις

μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν. Οι διάφορες μεταχειρίσεις φαίνονται παρακάτω:

A. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ): 120 ml/kg (0,8L)
9,6 ml ΥΑΕ + 3,2 ml H₂O σε 80 g εδάφους

B. DCD: 30 mg/kg (0,8L)
9,6 ml H₂O + 3,2 ml διαλύματος DCD σε 80 g εδάφους

C. ΥΑΕ + DCD: 120 ml/kg + 30 mg/kg
9,6 ml ΥΑΕ + 3,2 ml διαλύματος DCD σε 80 g εδάφους

D. ΥΑΕ + DCD: 120 ml/kg + 300 mg/kg
9,6 ml ΥΑΕ + 3,2 ml διαλύματος DCD σε 80 g εδάφους

E. DCD: 300 mg/kg
9,6 ml H₂O + 3,2 ml διαλύματος DCD σε 80 g εδάφους

F. Control soil
9,6 ml H₂O + 3,2 ml H₂O σε 80 g εδάφους

G. Τυφλά (Blank jars)
Κενές φιάλες αναπνοής

Κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκε σε 5 επαναλήψεις (A₁-A₅, B₁-B₅ κ.ο.κ.). Επιπλέον το πείραμα επαναλήφθηκε σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης στους 10 °C και 20 °C. Επομένως το σύνολο των δειγμάτων ήταν:

6 μεταχειρίσεις X 5 επαναλήψεις X 2 θερμοκρασίες + 3 X 2 κενές φιάλες = 66 φιάλες

Σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν «παγίδες υδροξειδίου του νατρίου». Οι παγίδες αυτές ήταν σωλήνες falcon των 50 ml οι οποίοι περιείχαν 15ml NaOH. Η συγκέντρωση του μεταβαλλόταν ανάλογα με το στάδιο της επώασης (από 29/9 ως 9/10 0,5 M και από 9/10 ως 17/12 1M). Η ελεύθερη επιφάνεια του

διαλύματος NaOH. στο σωλήνα falcon ερχόταν σε επαφή με τον αέρα εντός της φιάλης αναπνοής. Κάθε φιάλη επώασης σφραγίζονταν με καπάκι έτσι ώστε το CO₂ που εκλύεται από τη μικροβιακή αναπνοή να μη διαφεύγει και να αντιδρά με το NaOH της παγίδας. Στα τυφλά (φιάλες χωρίς έδαφος) το CO₂ που αντιδρά προέρχεται αποκλειστικά από τον αέρα της φιάλης. Στις φιάλες που περιέχουν έδαφος, το CO₂ που αντιδρά προέρχεται από την μικροβιακή αναπνοή και από τον αέρα της φιάλης.

Οι παγίδες ανανεώνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα όπως φαίνεται παρακάτω:

29/9/2009 Έναρξη πειράματος, τοποθέτηση παγίδων NaOH 0,5 M

30/9/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 0,5 M)

2/10/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 0,5 M)

4/10/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 0,5 M)

6/10/2009 αλλαγή παγίδων + λήψη εδαφικού δείγματος (NaOH 0,5)

9/10/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 1 M)

19/10/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 1 M)

2/11/2009 αλλαγή παγίδων + λήψη εδαφικού δείγματος (NaOH 1 M)

23/11/2009 αλλαγή παγίδων (NaOH 1 M)

17/12/2009 αφαίρεση παγίδων + λήψη εδαφικού δείγματος. Τέλος πειράματος.

Μετά από κάθε αλλαγή πραγματοποιείται τιτλοδότηση των παλιών παγίδων με HCl συγκέντρωσης 0,25 M και 0,5 M ανάλογα με την αντίστοιχη συγκέντρωση του NaOH.

Για την τιτλοδότηση το διάλυμα NaOH κάθε παγίδας που αφαιρείται μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250 ml, ξεπλένεται το φιαλίδιο με 15 ml απιονισμένο νερό το οποίο καταλήγει επίσης στην κωνική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθενται 15 ml νερό επιπλέον και 7 ml διάλυμα BaCl₂ 2M. Στην κωνική φιάλη προστίθενται 6 σταγόνες περίπου διαλύματος φαινολοφθαλείνης και πραγματοποιείται τιτλοδότηση με HCl. Καταγράφεται ο όγκος του HCl που απαιτείται μέχρι να αλλάξει το χρώμα στην κωνική φιάλη από ερυθροϊώδες σε άχρωμο.

Επιπλέον, σε διαφορετικά στάδια της επώασης πραγματοποιήθηκαν τρεις λήψεις εδαφικού δείγματος για περαιτέρω ανάλυση. Από κάθε πεντάδα με την ίδια μεταχείριση αφαιρέθηκαν 15 g εδάφους και αναμείχθηκαν οπότε προέκυψαν $5 \times 15 = 75$ g εδάφους. Από αυτά πάρθηκαν δείγματα για ανάλυση PLFA 3×15 g τα οποία τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (8 °C) και δείγματα για ανάλυση DNA 3×10 g τα οποία τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C).

2.3 Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η έμμεση μέθοδος της μικροβιακής βιομάζας ατμισμού-εκχύλισης των Vance et al 1987 τροποποιημένη από τους Joergensen και Brookes 1990, Ocio και Brookes 1990.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

CHCl₃ (χλωροφόρμιο)

K₂SO₄ 0,5M

66,7 mM K₂Cr₂O₇ (19,61 g/l)

H₃PO₄ (85%)

H₂SO₄ (98%)

Ferrous ammonium sulphate (FAS) 0,04 M

Δείκτης οργανικής ουσίας: Διφαινυλοαμινοσουλγονικό βάριο (0,15% w/v)

ΓΥΑΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Αντλία κενού

Γυάλινος ξηραντήρας

Αναδευτήρας οριζόντιας περιστροφικής κίνησης

Κωνικές φιάλες των 100 ml

Ύαλοι ωρολογίου

Σιφόνια 10 ml

Θερμαντική πλάκα

Προχοΐδα 50 ml

Ογκομετρικός κύλινδρος 100 ml

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Μετά το τέλος του προηγούμενου πειράματος της μικροβιακής αναπνοής το έδαφος το οποίο είχε απομείνει στις φιάλες αναμίχθηκε. Η ανάμιξη έγινε στα δείγματα με την ίδια μεταχείριση. Από την ανάμιξη προέκυψαν 8 δείγματα των 18 g από κάθε μεταχείριση. Τα μισά από αυτά τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα με ατμόσφαιρα ατμών χλωροφορμίου για 48 h. Τα υπόλοιπα εκχυλίστηκαν αμέσως.

Για την εκχύλιση το δείγμα εδάφους τοποθετείται σε κωνική φιάλη 250 ml όπου προστίθενται 100 ml K_2SO_4 0,5M. Οι φιάλες ανακινούνται για 30 min στον αναδευτήρα οριζόντιας περιστροφικής κίνησης. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 min στις 2000 rpm και διήθηση του υπερκείμενου σε σκληρό ηθμό.

$6 \times 8 = 48$ δείγματα. για κάθε θερμοκρασία επώασης

$48 + 48 = 106$ δείγματα συνολικά

Για τον προσδιορισμό της οργανικής ουσίας του εδάφους 8 ml εκχυλίσματος τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 100 ml μαζί με 2 ml $K_2Cr_2O_7$ και 15 ml ενός μίγματος οξέων H_2SO_4 και H_3PO_4 με αναλογία 2:1. Ακολούθως οι κωνικές φιάλες καλύπτονται με τις υάλους ωρολογίου και τοποθετούνται στη θερμομαντική πλάκα για βρασμό 30 min. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να κρυώσει και προστίθενται στην κωνική φιάλη 20-25 ml απιονισμένου νερού. Ακολουθεί τιτλοδότηση. Για την τιτλοδότηση προστίθεται στην κωνική φιάλη ο δείκτης οργανικής ουσίας και παράλληλα τοποθετείται FAS 0,04 M σε προχοΐδα 50 ml. Από την προχοΐδα καταγράφεται ο όγκος του FAS 0,04 M που απαιτείται για την αλλαγή χρώματος του δείκτη.

2.4 Προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με την ανάλυση PLFA

Η εκχύλιση και η παραλαβή των φωσφολιπιδίων από το έδαφος, πραγματοποιείται σύμφωνα με την μεθοδολογία του Bossio και συνεργατών (1998) με μικρές τροποποιήσεις.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φυσίγγια C 18 Supelco, SPE DSC-Si (Silica Tube 6ml, 500mg) *είτε προτιμότερο* GRACE pure SPE Silica (500 mg / 6 ml), Cat No. 5138781

Τολουενιο (Riedel, pestanal) 500ml

Μεθανόλη (Baker, BDH Analar) 1 L

Εξάνιο (Merck) 500 1 L

Οξικό οξύ (Riedel-de Haen, glacial) 500 ml

Χλωροφόρμιο (Merck, pro analysis) 1 L

Trisodium citrate buffer- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ή
[$\text{NaOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] 500 ml

Ακετόνη (pro analysis) 1 L

KOH (Merck, pa) 1 Kg

Μεθυλεστέρας του δεκαεννιαοϊκού οξέος (C19-Me). (Είναι το Methyl Stearate που βγαίνει από Sigma (Riedel) σε ποσότητα 250 mg και καθαρότητα 99% για GC)

Αλουμινόχαρτο

Επίσης για την ανάλυση χρησιμοποιούνται:

1. Δύο μείγματα μεθυλεστέρων: το Bacterial Acid Methyl Esters Mix (Supelco 47080-U) και το 37 Component FAME Mix (SupelcoTM 47885-U) σε αραιώση 1:10 σε διαλύτη εξάνιο.
2. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/ml του συγκεκριμένου μεθυλεστέρα σε εξάνιο.

ΓΥΑΛΙΚΑ

Κωνικές φιάλες των 50ml

Σωλήνες φυγοκέντρου των 35 ml (γυάλινοι ή τεφλόν)

Σκουρόχρωμα φιαλίδια των 50 ml

Σωλήνες φυγοκέντρου των 15 ml (γυάλινοι)

Σκουρόχρωμα φιαλίδια των 10 ml

Πιπέτες Pasteur

Σιφόνια των 0,5, 1, 2, 5 και 10 ml

Χοάνες διαχωρισμού (separatory funnels των 50 ή 100 ml)

ΟΡΓΑΝΑ

Ζυγαριά

Αναδευτήρας για κωνικές φιάλες, οριζόντιας περιστροφικής κίνησης

Φυγόκεντρος

Vortex

Φούρνος για προσδιορισμό υγρασίας

Υδατόλουτρο

Συσκευή συμπύκνωσης σε ρεύμα N₂ Pierce.

Αυτόματη Πιπέτα των 100 µl

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Εκχύλιση – Παραλαβή

Δείγμα εδάφους 5g εκχυλίζεται για 2 ώρες με 19ml μείγματος χλωροφόρμιου: μεθανόλης: ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου, pH 4 (1:2:0,8). Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου (0,15M) τοποθετείται σε γυάλινη φιάλη λίγο λιγότερο από 1 l απιονισμένο νερό όπου προστίθενται 44,115 g Na₃C₆H₅O₇·2H₂O. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα HCl μέχρι το pH του διαλύματος φτάσει το 4 και συμπληρώνεται η φιάλη με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος διορθώνεται για κάθε δείγμα ξεχωριστά ανάλογα με το ποσοστό υγρασίας του εδάφους (Bossio et al., 1998; Spyrou et al., 2009).

Το δείγμα τοποθετείται για 2 ώρες στον αναδευτήρα οριζόντιας περιστροφικής κίνησης καλυμμένο με αλουμινόχαρτο για την προστασία των φωσφολιπιδίων από το φως. Ακολούθως το δείγμα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 2500 στροφές ανά λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο των 50 ml. Πραγματοποιείται δεύτερη εκχύλιση στο εδαφικό δείγμα προσθέτοντας 9,5 ml του μείγματος χλωροφόρμιου: μεθανόλης: ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου, pH 4 (1:2:0,8). Επαναλαμβάνεται η διαδικασία, δηλαδή πραγματοποιείται ανάδευση για 2 ώρες και φυγοκέντριση για 20 λεπτά στις 2500 στροφές ανά λεπτό. Το νέο υπερκείμενο προστίθεται κι αυτό στο σκουρόχρωμο φιαλίδιο των 50 ml. Στη συνέχεια στο ίδιο φιαλίδιο

προστίθενται 7,5 ml χλωροφόρμιο και 7 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου. Το μείγμα ανακινείται στο vortex για 2 λεπτά και αφήνεται σε ηρεμία για 18 ώρες σε θερμοκρασία 5-8 °C ώστε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των φάσεων.

Μετά την πάροδο των 18 ωρών απομακρύνεται η επάνω φάση με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur. Η κάτω φάση που παραμένει στο σκουρόχρωμο φιαλίδιο και περιέχει τα λιπίδια συμπυκνώνεται σε αέριο άζωτο. Με την ολοκλήρωση της συμπύκνωσης είναι δυνατή η αποθήκευση των φιαλιδίων στους -20 °C.

Διαχωρισμός λιπιδίων

Τα φωσφολιπίδια διαχωρίζονται από τα γλυκολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια, σε στήλες GRACE pure SPE Silica (500 mg / 6 ml). Οι στήλες ενεργοποιούνται με την προσθήκη 3ml χλωροφόρμιου. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται με 250μl χλωροφόρμιου και μετά από ανάδευση στο vortex το δείγμα μεταφέρεται στη στήλη (4 φορές). Τα ουδέτερα λιπίδια και τα γλυκολιπίδια εκλύονται από τη στήλη με 5ml χλωροφόρμιου και 5ml ακετόνης αντίστοιχα, ενώ τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια) εκλύονται με την προσθήκη στη στήλη 5ml μεθανόλης, τα οποία συλλέγονται σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρισης και συμπυκνώνονται σε αέριο N μέχρι ξηρού.

Μεθυλίωση και σχηματισμός των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων

Έπειτα, ακολουθεί ήπια αλκαλική μεθανόλυση προσθέτοντας στο ξηρό δείγμα 100 μl μεθυλεστέρα του δεκαεννεοϊκού οξέος (1mg/ml σε διαλύτη εξάνιο), 500μl διαλύματος μεθανόλης:τολουενίου (1:1) και μεθανολικό διάλυμα KOH. (0,2M). Για την παρασκευή του μεθανολικού διαλύματος KOH προστίθενται 0,28 g KOH σε 25 ml μεθανόλης. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 λεπτά. Αμέσως μετά μεταφέρεται στο μείγμα 500μl διάλυμα οξικού οξέος (0,2 N) έτσι ώστε να εξουδετερωθεί η περίσσεια του KOH. Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού τοποθετείται σε φιάλη 1 l 11,44 ml οξικό οξύ και συμπληρώνεται η φιάλη με απιονισμένο νερό. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίζονται μετά από προσθήκη 2ml διαλύματος εξάνιο:χλωροφόρμιο (4:1) και 2ml νερού έτσι ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και

φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 3500 στροφές ανά λεπτό. Παραλαμβάνεται η οργανική φάση (επάνω φάση) όπου περιέχονται οι μεθυλεστέρες και τοποθετείται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια των 10 ml. Η πιο πάνω διαδικασία πραγματοποιείται εις διπλούν. Η οργανική φάση (εξάνιο), συλλέγεται ξανά και συμπυκνώνεται υπό αέριο N σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 200ml εξανίου και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίζονται σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή FID.

Διαχωρισμός και Ανίχνευση με Αέριο Χρωματογραφία

Τα φωσφολιπίδια διαχωρίζονται σε τριχοειδή στήλη HP-5 (26 m μήκος x 320 nm διάμετρο) σε αέριο χρωματογράφο, Hewlett Packard HP5890 Series II GC εφοδιασμένο με ανιχνευτή FID και αυτόματο δειγματολήπτη HP7673. Η έγχυση του δείγματος συνολικού όγκου 2μl πραγματοποιείται σε εγχυτή που λειτουργεί στη split-splitless θέση. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρείται στα αρχικά στάδια στους 150°C για 5 min και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τους 250°C με ρυθμό 5°C/min όπου και διατηρείται για 5 min, ενώ ο χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα είναι 34 min. Η θερμοκρασία του εγχυτή και του ανιχνευτή είναι 250 και 310°C, αντίστοιχα. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο με ροή 1ml/min. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων βασίζεται στο χρόνο έκλυσης αντίστοιχων πρότυπων διαλυμάτων από ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς (FAME και BAME, Supelco, UK).

Η ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων (nmol.g^{-1}) πραγματοποιείται με πρότυπη καμπύλη με πρότυπο διάλυμα δεκαεννιαοϊκού οξέος (19:0). Γνωστή συγκέντρωση δεκαεννιαοϊκού προστέθηκε πριν την μεθανόλυση ως εσωτερικό πρότυπο.

Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων επεξεργάστηκαν στατιστικά με το λογισμικό Genstat Version 11.0. Λόγω του μεγάλου αριθμού των μεταβλητών

εφαρμόστηκε μια από τις μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης, η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA).

Η ΑΚΣ είναι μια στατιστική μέθοδος η οποία μετασχηματίζει γραμμικά ένα σύνολο μεταβλητών σε ένα σύνολο νέων μη συσχετιζόμενων μεταβλητών. Από τις νέες μεταβλητές, που ονομάζονται κύριες συνιστώσες, μόνο ένα μέρος αυτών θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συμπεράσματος. Η μελέτη δύο ή τριών μη συσχετιζόμενων μεταβλητών είναι ευκολότερη από τη μελέτη του συνόλου των μεταβλητών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδαφικού δείγματος

Παρακάτω στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδαφικού δείγματος.

Πίνακας 3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφικού δείγματος.

	Άμμος %	Ίλύς %	Άργιλος %
Κοκκομετρική σύσταση	26,8	52,7	23,5
pH	7,72		
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	1700 $\mu\text{s}/\text{cm}$		
% CaCO₃	22		
% N	0,17		
P-Olsen	11,1 mg/kg		
% OM	1,03		
Ενεργός ασβεστόλιθος	3,4		
ΙΑΚ	14,08 $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$		
Ανταλλάξιμο Ca (*)	67,3 $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$		
Ανταλλάξιμο Mg	1,32 $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$		
Ανταλλάξιμο K	0,54 $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$		
Ανταλλάξιμο Na	0,50 $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$		

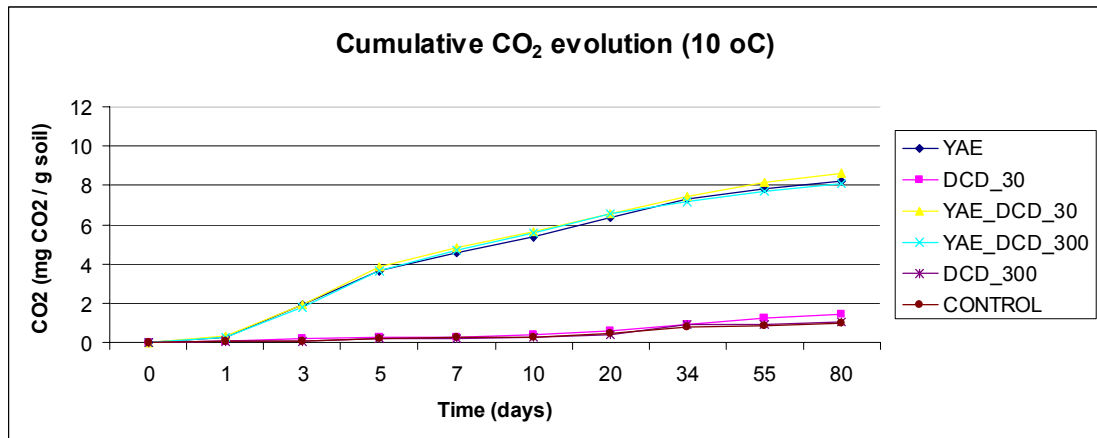
(*) Η μέθοδος του οξικού αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε προκαλεί συχνά υπερεκτίμηση του ανταλλάξιμου Ca που συμμετέχει στην ΙΑΚ και θεωρείται ότι εκφράζει το διαθέσιμο μάλλον παρά το αυστηρά ανταλλάξιμο Ca.

3.2 Προσδιορισμός αναπνευστικής δραστηριότητας

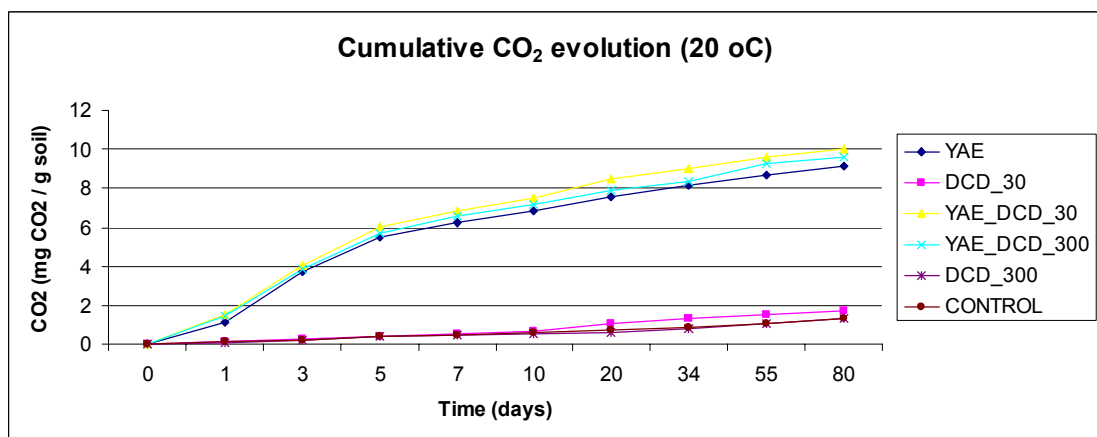
Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η αναπνευστική δραστηριότητα των εδαφικών μικροοργανισμών όπως καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Απεικονίζεται η αθροιστική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα στις δύο θερμοκρασίες επώασης 10 °C (Γράφημα 1) και 20 °C (Γράφημα 2).

Όπως φαίνεται, η συνολική μικροβιακή δραστηριότητα (παραγωγή CO₂) που παρατηρήθηκε ήταν ελαφρά μεγαλύτερη στις επωάσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C σε σύγκριση με τις επωάσεις που

πραγματοποιήθηκαν στους 10 °C για όλες τις μεταχειρίσεις. Ιδιαίτερα έντονες διαφορές στην αθροιστική μικροβιακή δραστηριότητα μεταξύ των δύο θερμοκρασιών επώασης παρατηρήθηκαν κατά τις πρώτες 5 ημέρες επώασης.



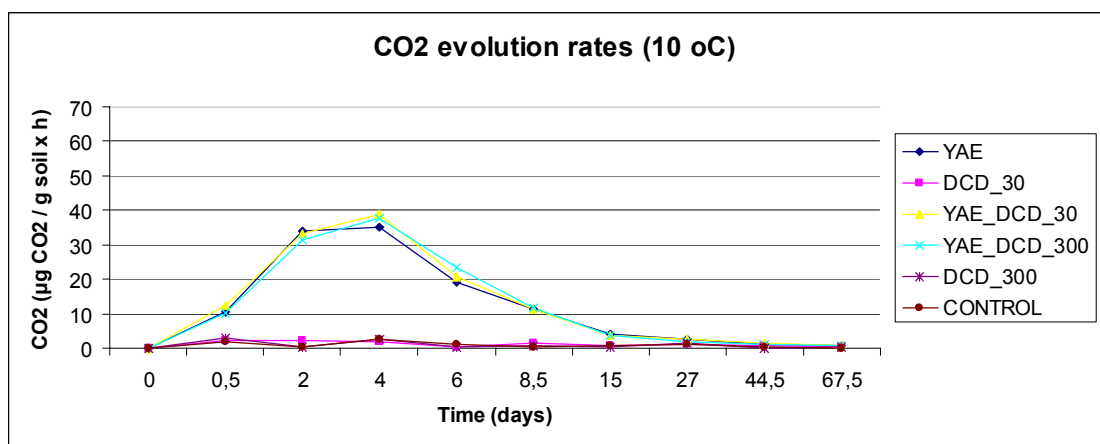
Γράφημα 1: Αθροιστική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα κατά την επώαση των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 10 °C.



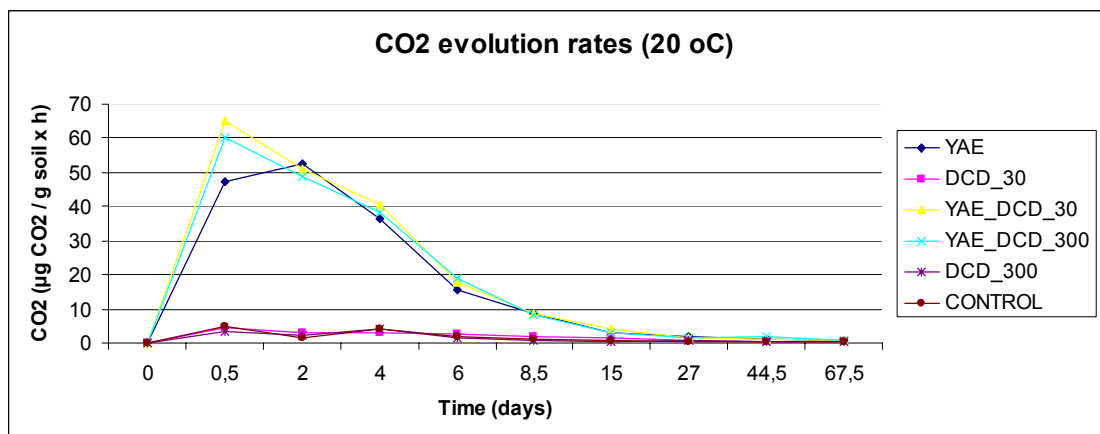
Γράφημα 2: Αθροιστική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα κατά την επώαση των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Οι μεταχειρίσεις διαχωρίζονται εμφανώς σε δύο ομάδες ανεξάρτητα από την θερμοκρασία επώασης: Αυτές στις οποίες πραγματοποιήθηκε εφαρμογή YAE (YAE, YAE_DCD_30, YAE_DCD_300) και αυτές που δεν πραγματοποιήθηκε (Μάρτυρας, DCD_30, DCD_300). Η μικροβιακή δραστηριότητα στις μεταχειρίσεις της πρώτης ομάδας είναι πολλαπλάσια της μικροβιακής δραστηριότητας στις μεταχειρίσεις της δεύτερη ομάδας. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται σε αποδόμηση ευαποδομήσιμων υποστρωμάτων άνθρακα που προέρχονται από τα YAE (Piotrowska et al., 2006, Saadi et al., 2007).

Η εφαρμογή DCD, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με ΥΑΕ δεν φαίνεται να επηρέασε αρνητικά την συνολική μικροβιακή δραστηριότητα σε οποιαδήποτε από τις δύο θερμοκρασίες (10 °C, 20 °C). Αντίθετα φαίνεται μία τάση αύξησης της εκπομπής CO₂ όταν προστίθεται DCD σε χαμηλή δόση (DCD_30, ΥΑΕ_DCD_30) σε σύγκριση με τις επεμβάσεις «Μάρτυρας» και ΥΑΕ αντίστοιχα. Πιθανά το DCD στη δόση αυτή να χρησιμοποιείται τελικά κι αυτό ως μικροβιακό υπόστρωμα. Όμως στη μεγάλη δόση DCD παρατηρείται συστηματικά μια τάση μείωσης της μικροβιακής δραστηριότητας σε σύγκριση με τις επεμβάσεις της μικρής δόσης DCD (άλλα όχι σε σύγκριση με τον «Μάρτυρα»). Η μείωση αυτή είναι μικρή και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία/προσθήκη ΥΑΕ.



Γράφημα 3: Ρυθμός παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα κατά την επώαση των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 10 °C.



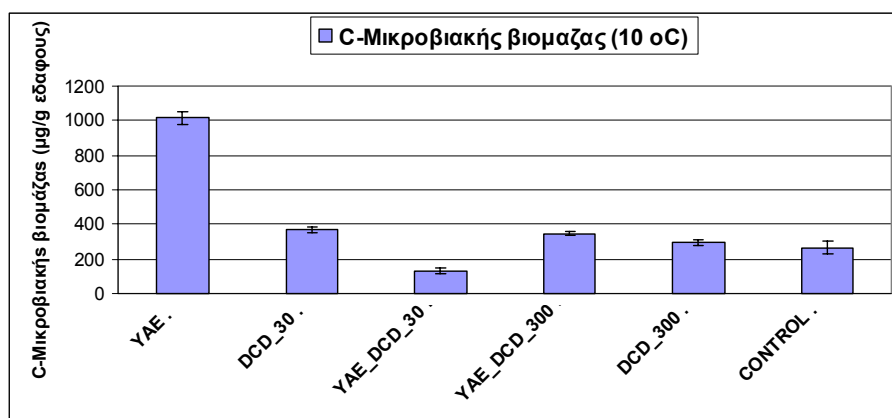
Γράφημα 4: Ρυθμός παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα κατά την επώαση των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Η ένταση της μικροβιακής δραστηριότητας (ρυθμός παραγωγής CO₂-Γραφήματα 3 και 4) που παρατηρήθηκε ήταν μεγαλύτερη στις επώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C σε σύγκριση με τις επώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 10 °C για όλες τις μεταχειρίσεις.

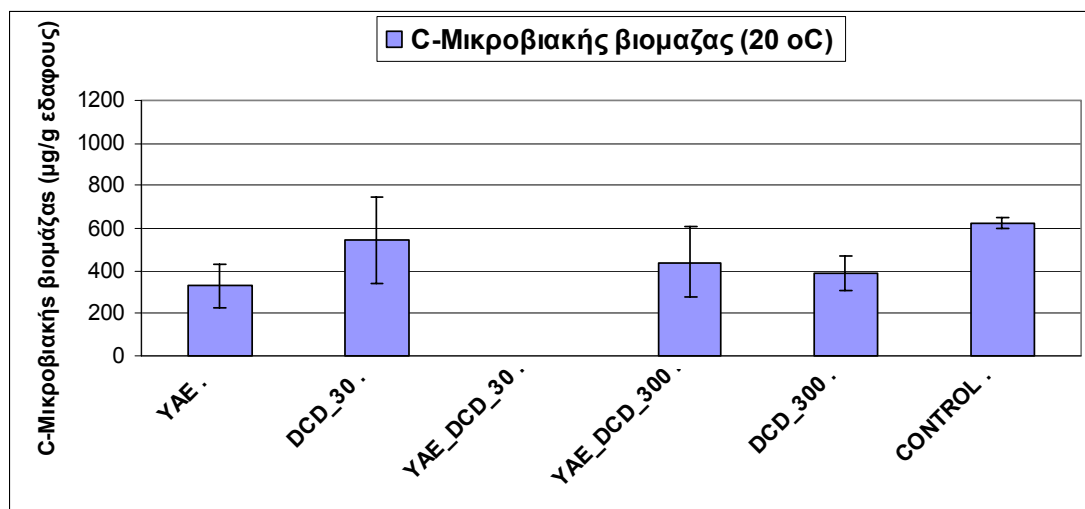
Η μικροβιακή δραστηριότητα κορυφώνεται γύρω στην 4^η ημέρα επώσης στις επώσεις με παρουσία ΥΑΕ που πραγματοποιήθηκαν στους 10 °C (ΥΑΕ, ΥΑΕ_DCD_30, ΥΑΕ_DCD_300) αλλά νωρίτερα (την 2^η ημέρα επώσης) στις επώσεις με παρουσία ΥΑΕ που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C. Η εντονότερη μικροβιακή δραστηριότητα και η ταχύτερη κορύφωσή της κατά την επώση στους 20 °C προφανώς οφείλεται στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μικροβιακή αποδομητική δραστηριότητα. Το αποτέλεσμα αυτό που παρατηρείται γενικότερα κατά την αποδόμηση οργανικών υποστρωμάτων (Ntougias et al., 2006) εξηγείται από την αποτελεσματικότερη μεταβολική δράση των μικροοργανισμών στους 20 °C, (Bunt and Rovira., 1955) που οφείλεται ταχύτερες ενζυμικές αντιδράσεις, ταχύτερη διάχυση εξωκυτταρικών μικροβιακών ενζύμων αλλά και αυξημένη υδατοδιαλυτότητα οργανικών υποστρωμάτων.

3.3 Προσδιορισμός μικροβιακής βιομάζας

Στα Γραφήματα 5 και 6 απεικονίζεται η μικροβιακή βιομάζα εκφρασμένη σε μg μικροβιακού-C ανά g εδάφους στις δύο θερμοκρασίες επώσης 10 και 20 °C.



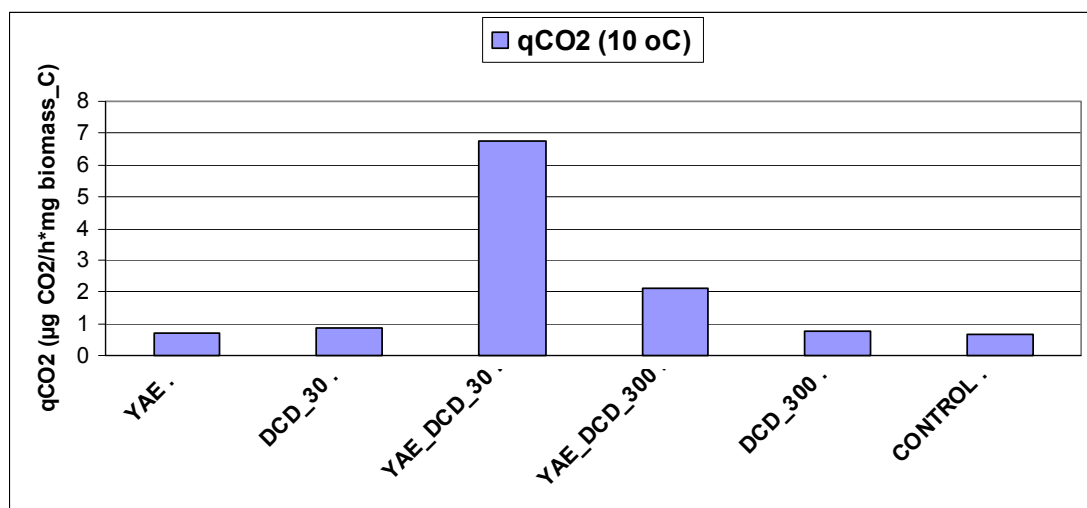
Γράφημα 5: Συνολικός άνθρακας με τη μορφή εδαφικής μικροβιακής βιομάζας στο τέλος της επώσης των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 10 °C.



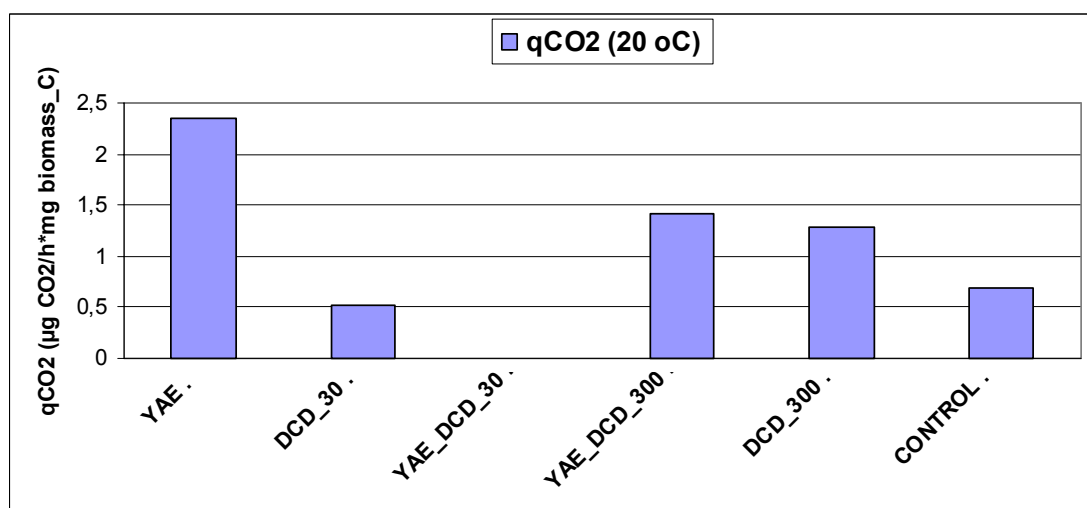
Γράφημα 6: Συνολικός άνθρακας με τη μορφή εδαφικής μικροβιακής βιομάζας στο τέλος της επώασης των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Η μικροβιακή βιομάζα ήταν περισσότερη (αν και παρουσίαζε μεγαλύτερες διακυμάνσεις) στο τέλος της επώασης των 20 °C σε σύγκριση με την επώαση των 10 °C γεγονός που αποδίδεται στην καλύτερη προσαρμογή της πλειονότητας των μικροοργανισμών στους 20 °C. Εξάιρεση αποτελεί η μικροβιακή βιομάζα για την μεταχείριση εφαρμογής YAE που παραμένει υψηλή στην επώαση των 10 °C αλλά όχι για την αντίστοιχη των 20 °C. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη βραδύτερη αποδόμηση άνθρακα προερχόμενου από τα YAE στους 10 °C, που οδηγεί στην συντήρηση μεγαλύτερης μικροβιακής βιομάζας μέχρι το τέλος της επώασης. Ανακύπτει όμως το ερώτημα, γιατί αυτό δεν συμβαίνει και για τις επεμβάσεις YAE_DCD_30 και YAE_DCD_300. Μια πιθανή απάντηση είναι ότι η προσθήκη DCD δημιουργεί οικολογικό περιβάλλον καταπόνησης για τους μικροοργανισμούς οι οποίοι αποδομούν υποστρώματα άνθρακα χωρίς να συνθέτουν αποτελεσματικά κυτταρικό ιστό.

Ο συντελεστής μεταβολισμού (λόγος μικροβιακής δραστηριότητας προς μικροβιακή βιομάζα) στο τέλος της επώασης για τις μεταχειρίσεις συνδυασμένης εφαρμογής YAE και DCD είναι όντως υψηλός (Γραφήματα 7 και 8) και ενδεικτικός πιθανής καταπόνησης.



Γράφημα 7: Συντελεστής μεταβολισμού (λόγος μικροβιακής δραστηριότητας προς μικροβιακή βιομάζα) στο τέλος της επώασης των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 10 °C.



Γράφημα 8: Συντελεστής μεταβολισμού (λόγος μικροβιακής δραστηριότητας προς μικροβιακή βιομάζα) στο τέλος της επώασης των εδαφικών μεταχειρίσεων σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

3.4 Ανάλυση λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA)

Από την απομόνωση και ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων προέκυψε ο Πίνακας 4 όπου φαίνονται ποσοτικά οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων κάθε δείγματος.

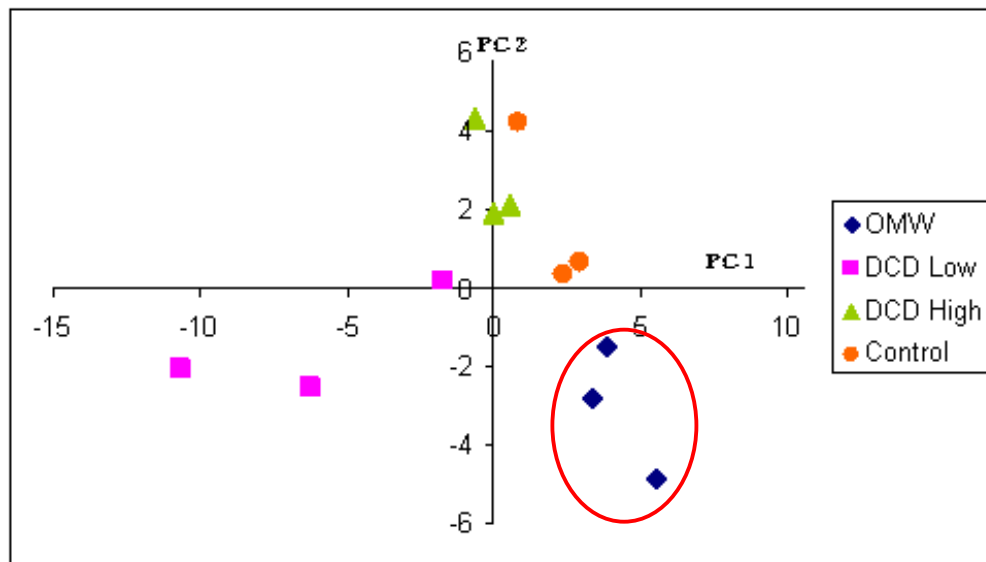
Πίνακας 4: Αποτελέσματα αέριας χρωματογραφίας.

AREA	BAME 7/ FAME 8	BAME 8	BAME 9	BAME 10/FAME 10	BAME 12	BAME 13	BAME 14/FAME 13	BAME 15/FAME 12	BAME 16	BAME 17
	%_14:0	%_i-15:0	%_a-15:0	%_15:0	%_3OH 14:0	%_i-16:0	%_16:1 ⁹ / 16:1ω7	%_16:0	%_i-17:0	%_CY 17:0
31A1 1	12344,5	41607,5	46460,5	8366,57	6421,79	19542	61573,7	120025	9779,48	22351
31A1 2	13747,8	45018,4	52770,7	6284,64	6359,46	21937,4	92550,5	138675	11209,8	29674,2
31A1 3	15267,9	46579	51747,3	8920,49	7745,96	22421,6	73583,9	149663	11398,3	26150,5
36B1 1	8510,61	33951,2	20920,8	7341,1	6391,47	12331,9	43388,8	85798	6435,05	8919,99
36B1 2	9656,93	44203,3	22121,1	19675,3	7464,76	10597,5	31168,3	105529	7490,71	8869,76
36B1 3	7937,73	31089	17121	9932,73	7399,49	11230,3	39099,1	79270,4	6046,18	6610,54
51E1 1	7322,13	34088,5	22421,5	4862,11	5225,58	13449,9	40440,3	82215,8	7750,56	8935,03
51E1 2	12364,9	50468,1	37673,1	6755,32	7264,14	18711,9	54616,3	116483	10073,6	12347,3
51E1 3	6828,53	28534,9	19566,2	5935,92	4572,5	10914,5	29500,6	77708,1	6163,4	7911,4
56F1 1	11300	47846,7	35373	9447,24	6600,96	18904,3	55406,6	132365	9089,58	12607,6
56F1 2	9736,15	33155,8	41189,2	6041,39	5196,67	15753	47272,3	102278	8509,85	10243,3
56F1 3	7718,65	27242,8	37576,8	6078,15	4430,12	13510	35255,7	91860,3	8162,13	9038,94

Πίνακας 4 (συνέχεια): Αποτελέσματα αέριας χρωματογραφίας.

AREA	BAME 18/FAME 14	BAME 20/FAME 20	BAME 21/FAME18	BAME 22/FAME 17	BAME 23/FAME16	BAME 24	BAME 26/FAME 21	FAME 27	FAME 32	FAME 34	%_10 Me 16:0	%_10 Me 17:0	%_10 Me 18:0	TOTAL
	%_17:0	%_18:2ω6,9cis	%_18:1ω9c	%18:1ω9t	%_18:0	%_cy19:0	%_20:0	%_22:0	%_23:0	%_24:0				
31A1 1	2965,91	11926,3	54224,9	79498,2	15725,3	19834,5	4164,64	11278,1	2260,64	5294,76	12641,9	3410	4957,04	576654,2
31A1 2	3684,59	22390,6	81703,6	116151	17548,4	25504,1	6256,83	10203,7	2157,58	5157,52	23881,6	4939,57	6320,6	744127,6
31A1 3	26150,5	19185,9	81623,8	94890,8	20670,7	25053,5	5462,01	13166,3	3894,13	3497,22	7058,09	3200,81	6537,61	723869,3
36B1 1	2990,15	14892,5	30970,9	40985,7	22077,7	13023,8	2514,1	12605,3	2438,85	2751,35	4135,68	5309,55	4470,19	393154,7
36B1 2	2836,9	33200,5	37943,8	35635,3	61840,7	13605,8	3511,59	11354,8	2084,23	3963,45	10627,5	3385,52	3519,33	490286,1
36B1 3	3056,81	23350,2	30258,1	35305,2	37250,8	11942,7	4967,75	13073,6	4323,14	3305,85	8486,66	3729,84	2479,7	397266,8
51E1 1	2138,74	7976,45	26530,9	37725,9	13966,1	14079,6	3136,29	10941,9	4071,14	4177,66	11503,5	5352,08	4746,16	373057,8
51E1 2	3487,28	13007,7	38663	55252,4	17819,4	18579,1	4679,11	10854,7	2337,46	3793,97	8067,45	7534,94	9152,08	519986,3
51E1 3	2372,22	8362,68	22369,6	28422,7	9836,72	11513,7	1892,43	9772,17	961,29	2171,94	4944,35	4458,73	3473,38	308188
56F1 1	3754,38	11425,4	36711,9	54554	14135	17851,3	5165,82	10824,2	2085,6	5410,34	9203,44	7029,54	5572,93	522664,8
56F1 2	3098,95	11294,1	30779,9	61938,7	13969,6	15535,3	3704,01	10519,9	1558,26	3721,93	15701,3	5440,59	4191,5	460829,7
56F1 3	2198,8	12558,6	28658	55353,3	13760,9	14152,4	3017,87	11283,9	1218,44	3645,4	14487,9	3174,57	3626,26	408009,9

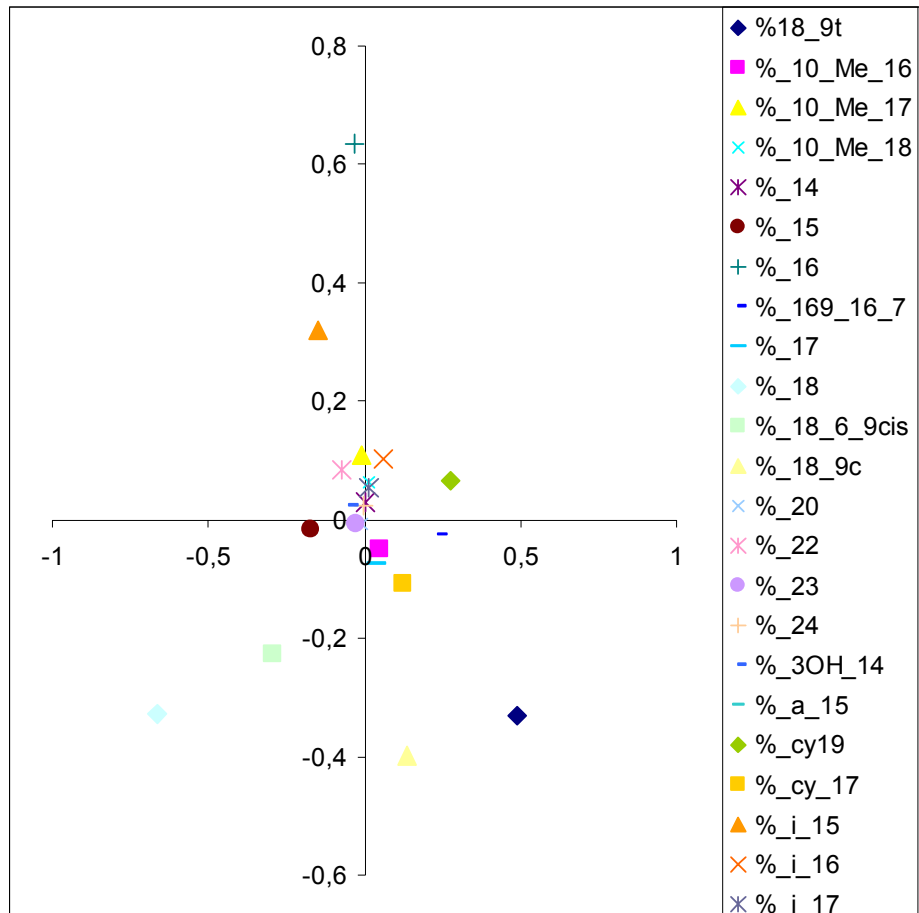
Έπειτα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών (η οποία παρατίθεται στο Παράρτημα της παρούσας εργασίας) και συγκεκριμένα την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA) προέκυψε το Γράφημα 9.



Γράφημα 9: Οι μεταχειρίσεις ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες.

Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται διαχωρίζεται μια ομάδα η οποία αφορά στις μεταχειρίσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ). Εκτός αυτής της ομαδοποίησης δεν παρατηρείται κάποια άλλη συστηματική διαφοροποίηση ανάμεσα στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.

Επιπλέον ένα διάγραμμα το οποίο μπορεί να εξαχθεί από αυτή την ανάλυση είναι η ομαδοποίηση των δειγμάτων σε σχέση με την περιεκτικότητα τους στα διάφορα λιπαρά οξέα, επίσης ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες (Γράφημα 10). Από ένα τέτοιο διάγραμμα μπορούν να ταυτοποιηθούν διαφοροποιήσεις που αφορούν στις λειτουργικές ομάδες των μικροοργανισμών του εδάφους με βάση την περιεκτικότητά τους στα διάφορα λιπαρά οξέα. Στην παρούσα εργασία ο αριθμός των δειγμάτων (μια ημερομηνία και θερμοκρασία μόνο) ήταν πολύ μικρός για να μπορέσει να γίνει διαφοροποίηση λειτουργικών ομάδων των εδαφικών δειγμάτων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο επόμενης εργασίας, με την ανάλυση δειγμάτων από τις δυο θερμοκρασίες σε και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.



Γράφημα 10: Η περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων των δειγμάτων ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μεταχειρίσεις διαχωρίζονται εμφανώς όσον αφορά την ένταση της μικροβιακής δραστηριότητας (όπως και η συνολική μικροβιακή δραστηριότητα) σε δύο ομάδες ανεξάρτητα από την θερμοκρασία επώασης: Αυτές που στις οποίες πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ΥΑΕ (ΥΑΕ, ΥΑΕ_DCD_30, ΥΑΕ_DCD_300) και αυτές που δεν πραγματοποιήθηκε (Μάρτυρας, DCD_30, DCD_300).

Ο ρυθμός μικροβιακής δραστηριότητας στις μεταχειρίσεις της πρώτης ομάδας είναι πολλαπλάσιος της μικροβιακής δραστηριότητας στις μεταχειρίσεις της δεύτερης ομάδας και αποδίδεται σε αποδόμηση ευαποδομήσιμων υποστρωμάτων άνθρακα που προέρχονται από τα ΥΑΕ.

Επίσης ο ρυθμός μικροβιακής δραστηριότητας της ομάδας μεταχειρίσεων που περιέχουν ΥΑΕ κορυφώνεται νωρίτερα και είναι υψηλότερος στις επώσεις των 20 °C σε σύγκριση με αυτές των 10 °C.

Η εφαρμογή DCD, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με ΥΑΕ δεν φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τον ρυθμό της μικροβιακής δραστηριότητας σε οποιαδήποτε από τις δύο θερμοκρασίες (10 °C, 20 °C).

Παρατηρήθηκαν ενδείξεις καταπόνησης του μικροβιακού πληθυσμού για τις μεταχειρίσεις συνδυασμένης εφαρμογής ΥΑΕ και DCD: Υψηλότεροι συντελεστές μεταβολισμού (λόγος μικροβιακής δραστηριότητας προς μικροβιακή βιομάζα).

Η εξαγωγή και ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας έδειξε διαφοροποίηση της σύνθεσης της κοινότητας στην επέμβαση με ΥΑΕ, αλλά απαιτείται η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Addiscott M. T., Whitmore P. A. and Powlson S. D. 1991 Farming. Fertilizers and the Nitrate Problem. C A B International.

Anderson H. T. 2003 Microbial Eco-physiological Indicators to Asses Soil Quality. Agriculture. *Ecosystems and Environment* 98: 285–293.

Anderson E. P. J. and Domsch H. K. 1977 A Physiological Method for the Quantitative Measurement of Microbial Biomass in Soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 215-221.

Anderson H. T.. and Domsch H. K. 1985 Determination of Eco-physiological Maintanance Requirements of Soil Microorganisms in a Dormant State. *Biology and Fertility of Soils* 1:81-89.

Azam F. and Farooq S. 2003 Nitrification Inhibition in Soil Ecosystem Functioning- An Overview. *Pakistan Journal of Biological Science* 6: 528-535.

Baath E. and Anderson H. T. 2003 Comparison of Soil Fungal/Bacterial Ratios in a pH Gradient Using Physiological and PLFA-based Techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35:955-963.

Barnard R. and Leadley W. P. 2005 Global Change, Nitrification and Denitrification: A Review. *Global Biogeochemical Cycles*. Vol. 19 American Geophysical Union.

Beyer L., Wachendorf C., Elsner C. D. and Knabe R. 1993 Suitability of Dehydrogenase Activity Assay as an Index of Soil Biological Activity. *Biology and Fertility of Soils* 16:52-56.

Bunt J.S., Rovira A.D. (1955) The effect of temperature and heat treatment on soil metabolism. *Journal of Soil Science* 6: 129-36.

Camberato J. J. 2001 Nitrogen in Soils and Fertilizers. *SC Turfgrass Foundation* 8: 6-10.

Chander K. and Brookest C. P. 1991 Is the Dehydrogenase Assay Invalid as a Method to Estimate Microbial Activity in Copper-Contaminated Soils? *Soil Biology and Biochemistry* 10:909-915.

Chen D., Suter H., Islam A., Edis R., Freney R. J. and Walker N. C. 2008 Prospects of Improving Efficiency of Fertiliser Nitrogen in Australian Agriculture: A Review of Enhanced Efficiency Fertilisers. *Australian Journal of Soil Research* 46:289-301.

Dalal C. R. 1998 Soil Microbial Biomass- What Do the Numbers Really Mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38: 649–65.

Drenovsky R., Elliot G., Graham K. and Scow K. 2004 Comparison of Phospholipid Fatty Acid (PLFA) and Total Soil Fatty Acid Methyl Esters (TSFAME) for Characterizing Soil Microbial Communities. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1793-1800.

Garland L. J. 1997 Analysis and Interpretation of Community-Level Physiological Profiles in Microbial Ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300.

Garland J. and Mills A. 1991 Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community Level Sole Carbon Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359.

Green C. and Scow K. 2000 Analysis of the Phospholipid Fatty Acids (PLFA) to Characterize Microbial Communities in Aquifers. *Hydrogeology Journal* 8:126-141.

Hodge A., Robinson D. and Fitter A. 2000 Are Microorganisms More Effective Than Plants at Competing for Nitrogen? *Trends in Plant Science* 5: 304-308.

Hubbel H. D. and Kidder G. 2003 Biological Nitrogen Fixation. *Fact Sheet of the Soil and Water Science Department, University of Florida*.

Irigoyen I., Muro J., Azpilikueta M., Aparicio-Tejo P. and Lumsfus C. 2003 Ammonium Oxidation Kinetics in the Presence of Nitrification Inhibitors DCD and DMPP at Various Temperatures. *Australian Journal of Soil Research* 41: 1177-1183.

Jenkinson S. D., Brookes C. P. and Powlson S. D. 2004 Measuring Soil Microbial Biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 36:5-7.

Joergensen G. R. and Emmerling C. 2006 Methods for Evaluating Human Impact on Soil Microorganisms Based on their Activity, Biomass and Diversity in Agricultural Soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169:295-309.

Kennedy R. I., Choudhury A.T.M.A. and Kecskés L. M. 2004. Non-symbiotic Bacterial Diazotrophs in Crop-Farming Systems: Can their Potential for Plant Growth Promotion Be Better Exploited? *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1229-1244.

Liu B. R., Jia G. M., Chen J. and Wang G. 2006 A Review of Methods Studying Microbial Diversity in Soils. *Pedosphere* 16:18-24.

McCarty W. G. 1999 Modes of Action of Nitrification Inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29:1-9.

Nielsen L. R. 2006 N Loss Mechanisms and Nitrogen Use Efficiency. *Purdue Nitrogen Management Workshops* pg 1-5.

Nielsen N. M. and Winding A. 2002 Microorganisms as Indicators of Soil Health. NERI Technical Report No 388. *National Environmental Research Institute*, Ministry of the Environment, Denmark.

Ntougias S, Ehaliotis C, Papadopoulou KK, and Zervakis G. (2006). Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and Fertility of Soils* 42 : 330-337.

Piotrowska A., Iamarino G., Rao M.A., Gianfreda L. (2006) Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical and biochemical properties of a semiarid Mediterranean soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 600-610.

Puttanna K., Nanje Gowda M. N. and Prakasa Rao E. 1999 Effect of Concentration, Temperature, Moisture, Limiting and Organic Matter on the Efficacy of the Nitrification Inhibitors Benzotriazole, o-nitrophenol, m-nitroaniline and Dicyandiamide. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 54:251-257.

Saadi I., Laor Y, Raviv M, Medina S. (2007) Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere* 66, 75-83.

Sánchez L., Díez A. J., Vallejo A. and Cartagena C. M. 2001 Denitrification Losses from Irrigated Crops in Central Spain. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 1201-1209.

Schlöter M., Dilly O. and Munch C. J. 2003 Indicators for Evaluating Soil Quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98: 255–262.

Schulten R. H. and Schnitzer M. 1998 The Chemistry of Soil Organic Nitrogen: A Review. *Biology and Fertility of Soils* 26: 1-15.

Šimek M and Cooper E. J. 2001. Nitrogen Use Efficiency in Temperate Zone Arable Lands. In: Shiyomi M, Koizumi H., ed. Structure and Function in Agroecosystem Design and Management. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 228-251.

Singh N. S. and Verna A. 2007 The Potential Role of Nitrification Inhibitors to Manage the Pollution Effect of Nitrogen Fertilizers in Agricultural and Other Soils: A Review. *Environmental Practice* 9:266-279.

Smith N.S. and Pugh F. J. G 1979 Evaluation of Dehydrogenase as a Suitable Indicator of Soil Microflora Activity. *Enzyme and Microbial Technology* 1: 279-281.

Sommer G. S., Schjoerring K. J. and Denmead T. O. 2004. Ammonia Emission from Mineral Fertilizers and Fertilized Crops. *Advances in Agronomy*, 82: 557-622.

Subbarao V. G., Ito O., Sahrawat L. K., Berry L. W., Nakahara K., Ishikawa T., Watanabe T., Suenaga K., Rondon M. and Rao I. 2006 Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems-Challenges and Opportunities. Critical Reviews in Plant Sciences. Publisher Taylor and Francis.

Subbarao V. G., Rondon M., Ito O., Ishikawa T., Rao M. I., Nakahara K., Lascano C. and Berry W. 2007 Biological Nitrification Inhibition (BNI)- Is it a Widespread Phenomenon? *Plant Soil* 294:5-18.

Tonitto C., David B. M. and Drinkwater E. L. 2005 Replacing Bare Fallows with Cover Crops in Fertilizer-intensive Cropping Systems: A Meta-analysis of Crop Yield and N Dynamics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Article in Press.

Van Antwerpen T., Van Antwerpen R. and Meyer J.H. 2005 Review of the Methods for Extraction and Identification of Soil Microflora and their Role as Indicators of Soil Health. *Proc S Afr Sug Technol. Ass.* 79: 137-148.

Wardle A. D. and Ghani 1995 A Critique of the Microbial Metabolic Quotient (qCO₂) as a Bioindicator of Disturbance and Ecosystem Development. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1601-1610.

Wen G., Voroney P. R., Curtin D., Schoenau J. J., Qian Y. P. and Inanaga S. 2005 Modification and Application of a Soil ATP Determination Method. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1999-2006.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γεωργίλα Β. 2006 Μεταβολές του Αζώτου σε Βιολογική Καλλιέργεια Γλυκού Σόργου (*Sorghum bicolor*) για Παραγωγή Βιομάζας. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Οιχαλιώτης Κ. 2003 Εφαρμοσμένη Βιολογία Εδαφικού Περιβάλλοντος. Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος σελ. 32-33.

Ομήρου Μ. 2009 Επίδραση Αζωτούχου και Θεϊκής Λίπανσης στην Παραγωγή Γλυκοσινολικών στους Ιστούς της Ρόκας (*Eruca sativa*) και του Μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*) και οι Επιπτώσεις της Ενσωμάτωσης των Υπολειμμάτων του Μπρόκολου και των Γλυκοσινολικών στις Μικροβιακές Κοινότητες του Εδάφους. Διδακτορική Διατριβή Γ.Π.Α.

Σιδηράς Ν. 2005 Βιολογική Γεωργία-Φυτική Παραγωγή. Εκδόσεις ΔΗΩ.

Σπύρου Ι. Μ. 2008 Αξιολόγηση της Επίδρασης Συνθετικών και Βοτανικής Προέλευσης Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων στη Μικροβιακή Κοινότητα του Εδάφους. Μεταπτυχιακή Διατριβή Α.Π.Θ.