Πολυτεχνείο Κρήτης
Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Επίδραση Συσσώρευσης Αλάτων στον Βιογεωχημικό Κύκλο του Αζώτου



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαρίνα Ρασούλη

Επιβλέπων : Νικόλαος Παρανυχιανάκης

ΧΑΝΙΑ 2012

Πολυτεχνείο Κρήτης

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική

Επίδραση Συσσώρευσης Αλάτων στον Βιογεωχημικό Κύκλο του Αζώτου

Επιβλέπων: **Νικόλαος Παρανυχιανάκης**, Λέκτορας

Μέλη Επιτροπής: **Νικόλαος Νικολαΐδης**, Καθηγητής

Δανάη Βενιέρη, Λέκτορας

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαρίνα Ρασούλη

Χανιά 2012

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικόλαο Παρανυχιανάκη, Λέκτορα του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της μελέτης, για την επιστημονική της καθοδήγηση και στήριξή της κατά τη διάρκεια του πειράματος και της συγγραφής. Τον ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, αλλά και για την μετάδοση γνώσεων πάνω στο αντικείμενο έρευνας και πέρα από αυτό κατά τη διάρκεια της διετής συνεργασίας μας.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου στους κ. Νικόλαο Νικολαΐδη και την κα. Δανάη Βενιέρη για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για την ανάγνωση και αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Από τις ευχαριστίες δεν θα έλειπαν οι πολύ καλοί μου φίλοι και απόφοιτοι πια του ΠΜΣ Τσικνιά Μυρτώ και Γιαννάκης Γιώργος, για τις ουσιαστικές υποδείξεις τους και την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο της Γεωργικής Μηχανικής και για την βοήθεια που μου έδωσαν απλόχερα σε οποιοδήποτε τομέα και αν χρειάστηκε.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου ξεχωριστά, για την ουσιαστική στήριξη τους και την κατανόηση που έδειξαν καθ’όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

Περίληψη **4**

Abstract **5**

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή **6**

1.1 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του Ν **6**

1.1.1 Νιτροποίηση από αυτότροφους μικροοργανισμούς *7*

1.1.2 Νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς *9*

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό της νιτροποίησης στο χερσαίο περιβάλλον **11**

1.2.1 Διαθεσιμότητα υποστρώματος *11*

1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες *12*

1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης **15**

1.3.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές *16*

1.3.2 Φυσικοί παρεμποδιστές *16*

1.4 Κινητική νιτροποίησης **17**

1.5 Ανοργανοποίηση / Ακινητοποίηση **19**

1.6 Αλατότητα **22**

1.6.1 Η επίδραση της αλατότητας στον κύκλο του Ν *24*

Αντικείμενα εργασίας **28**

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι **29**

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός **29**

2.2 Εφαρμογή των αλάτων **30**

2.3 Αναλύσεις εδάφους **30**

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα-Συζήτηση **37**

3.1 Ανοργανοποίηση (Net N Mineralization) **37**

3.2 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR) **38**

3.3 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτηρία (AOB) και αρχαία (AOA) **42**

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα **46**

Βιβλιογραφία **47**

Περίληψη

Η εργασία αυτή διερευνά την επίδραση της συσσώρευσης αλάτων στον βιογεωχημικό κύκλο του N στο έδαφος. Αναλυτικότερα, διερευνήθηκε η επίδραση των αλάτων στο δυναμικό ρυθμό νιτροποίησης, στο ρυθμό ανοργανοποίησης N, και η επίδραση τους στον πληθυσμό βακτηρίων και αρχαίων που εμπλέκονται στη οξείδωση της αμμωνίας που περιγράφεται ως το περιοριστικό βήμα στη διεργασία νιτροποίησης. Εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων των 0, 2, 4,5 και 9 g NaCl/Kg εδάφους, ενώ σε επόμενο βήμα διερευνήθηκε η αναστολή της αρνητικής επίδρασης των αλάτων στις παραπάνω διεργασίες με την εφαρμογή 100 Kg N /ha. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν μείωση της κινητικής της νιτροποίησης με την αύξηση των συγκεντρώσεων των αλάτων. Η προσθήκη του N φάνηκε να μην μπορεί να αναιρέσει από ένα σημείο και την επίδραση της αλατότητας, με εξαίρεση τον χειρισμό της χαμηλής αλατότητας (2 g NaCl/Kg). Η αύξηση της αλατότητας δεν επέδρασε σημαντικά στην ανοργανοποίηση, όπου ο ρυθμός της διατηρήθηκε σταθερός. Όσον αφορά στον πληθυσμό των οξειδωτών NH_3 η επαγωγή του πληθυσμού τους με την αύξηση της αλατότητας φάνηκε να αντισταθμίζει το οσμωτικό και/ή ιοντικό στρες. Παράλληλα επιβεβαιώθηκε και η συμβολή των αρχαίων στην διεργασία της νιτροποίησης αλλά και ο υψηλός πληθυσμός τους.

Abstract

The effect of the salt accumulation on the N cycle is investigated by this study. More specifically, the processes of potential nitrification rate and N net mineralization were examined together with the population of ammon ia-oxidizing bacteria and archaea and their tolerance to salinity. Four levels of salinity (0 2, 4,5, and 9 g NaCl/Kg soil) were imposed in the soil, while it was later amended with 100 Kg N /ha for the farther investigation of the possible inhibitory effect on salinity. The results demonstrated a reduction of the nitrification kinetics with the increased salinity. However, after the amendment, no clear inhibitory effect was observed with the exception of the treatment of the lower salinity (2 g NaCl/Kg). Mineralization was not affected by the increase of salinity since its net rate remained stable. As far as the nitrifying community is concerned, the increase of the microbial biomass compensated the osmotic and/or ionic stress by the increased salinity. Moreover, the contribution of the Archaea in the process of nitrification and their high population was confirmed.

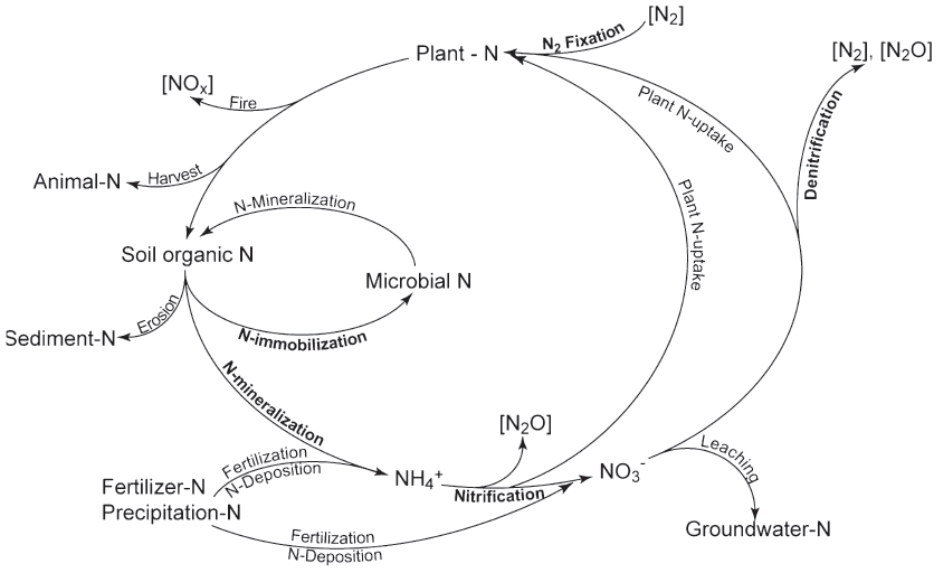
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του Ν

Το άζωτο (Ν) μετά το υδρογόνο, τον άνθρακα και το οξυγόνο είναι το θρεπτικό στοιχείο που απαιτείται στις μεγαλύτερες ποσότητες για τη θρέψη των καλλιεργειών. Ο εμπλουτισμός του εδάφους με Ν γίνεται κατά τους εξής τρόπους:

1. Με τη δράση συμβιωτικών μικροοργανισμών (*Azotobacter, Azospirillium, Rhizobium*).
2. Δέσμευση ατμοσφαιρικού Ν από βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης (*Nitrosomonas communis, Nitrosospira briensis*).
3. Με την εναπόθεση οξειδίων του Ν που σχηματίζονται από την δραστηριότητα ατμοσφαιρικών φαινομένων (ηλεκτρικές εκκενώσεις, φωτοχημικές αντιδράσεις).
4. Προσθήκη NH_4^+ και NO_3^- βιομηχανικής προέλευσης (προϊόντα βιομηχανιών παραγωγής συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων).
5. Με οργανικό άζωτο από κατάλοιπα φυτικών και ζωικών οργανισμών, βιοστερεών και άρδευσης από εκροές υγρών αποβλήτων.

Η νιτροποίηση αποτελεί κεντρική διεργασία στο βιογεωχημικό κύκλο του Ν σε χερσαία οικοσυστήματα (Σχήμα. 1.1). Το NO_3^--Ν αποτελεί τη κύρια μορφή με την οποία η βλάστηση προσλαμβάνει το Ν, ενώ ευθύνεται για σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις όπως, η ρύπανση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων και την ελευθέρωση NxO στην ατμόσφαιρα (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου του N (Robertson και Groffman, 2007)

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται κυρίως από αυτότροφους, αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες ετερότροφοι οργανισμοί μπορεί να έχουν συνεισφορά (Robertson and Groffman, 2007).

1.1.1 Νιτροποίηση από αυτότροφους μικροοργανισμούς

Οι αυτότροφοι νιτροποιητές είναι αυστηρώς αερόβιοι μικροοργανισμοί. Η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: την οξείδωση του NH_4^+-N σε NO_2^--N με ενδιάμεσο βήμα την παραγωγή και οξείδωση hydroxylamine και την παραπέρα οξείδωση του NO_2^-N σε NO_3^-.

Η οξείδωση της NH_3 χαρακτηρίζεται από την παρακάτω αντίδραση και καταλύεται από αμμωνι-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) των γεννών *Nitrosomonas, Nitrosococcus και Nitrosospira*.

$$NH_3 + 1\ 1/2\ O_2 \rightarrow\ NO_2^- + H +\ H_2O$$

Το πρώτο στάδιο αυτής καταλύεται από το ένζυμο μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (AMO) σύμφωνα με την αντίδραση

$$NH_3^+ + 2H^+ + O_2 + 2e^- \rightarrow NH_2OH +\ H_2O$$

Η δράση του παραπάνω ενζύμου μπορεί να παρεμποδιστεί πλήρως από μικρές ποσότητες ακετυλενίου. Βάση αυτού του χαρακτηριστικού, μπορεί να επιτευχθεί πειραματικά η διαφοροποίηση της διεξαγωγής της νιτροποίησης από αυτότροφους ή ετερότροφους μικροοργανισμούς. Έπειτα η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται περεταίρω σε νιτρώδη από το ένζυμο οξειδορεδουκτάση της υδροξυλαμίνης.

$$NH_2OH + H_2O \rightarrow NO_2^- + 4e^- + 5H^+$$

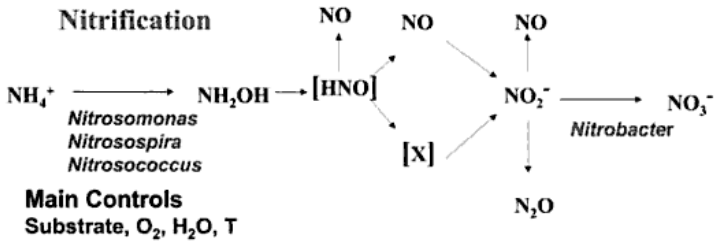
Τα δύο από τα τέσσερα e^-που απελευθερώνονται χρησιμοποιούνται στο πρώτο στάδιο της οξείδωσης της αμμωνίας, ενώ τα άλλα δύο με την μεταφορά τους παράγουν ενέργεια για την κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμό τους.

Τα NO_2^- λαμβάνουν χώρα σε μικρές ποσότητες λόγω της ταχύτατης οξείδωσης τους από τα νιτρο-οξειδωτικά βακτήρια (NOB) του γένους *Nitrobacter* και *Nitrospira*.

$$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$$

Η παρουσία των NO_2^- στο έδαφος υποδηλώνει επιβράδυνση της διεργασίας λόγω επικράτησης συνθηκών που την επιβάλλουν. Τα NO_3^- επομένως αποτελούν τα τελικά προϊόντα της νιτροποίησης τα οποία αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό N που αξιοποιείται από τα φυτά με τη μορφή αυτή. Πάνω από το 80% της ενέργειας που παράγεται κατά την νιτροποίηση χρησιμοποιείται από τον κύκλο του Calvin, καθώς οι νιτροποιητές έχουν χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια. Αυτό εξηγεί εν μέρει τη δυσκολία ανταγωνισμού τους με τους ετερότροφους μικροοργανισμούς και τα φυτά για NH_4^+-N (Robertson and Groffman, 2007).

Κατά την αντίδραση της υδροξυλαμίνης δημιουργούνται ενδιάμεσες ενώσεις του N, της γενικής μορφής NOx, οι οποίες ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και αποτελούν αέρια που συνεισφέρουν στο φαινομένο του θερμοκηπίου. Σε συνθήκες αναεροβίωσης τόσο τα NO_3^- όσο και ενδιάμεσά τους είναι δυνατόν να υποστούν απονιτροποίηση, τα τελικά προϊόντα της οποίας είναι τα αέρια N_2 και N_2O.



Εικόνα 1.2: Τα μονοπάτια της νιτροποίησης από τους αυτοτροφικούς μικροοργανισμούς.

Ωστόσο πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως τα βακτήρια δεν είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που συνεισφέρουν στην οξείδωση της NH_3 αλλά στη διεργασία αυτή εμπλέκονται και μικροοργανισμοί της τάξης των αρχαίων. Συγκεκριμένα πρόσφατες έρευνες παρουσίασαν ότι το φύλο *Thaumarchaeota* περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της οξείδωσης της αμμωνίας (AMO) και βρίσκεται στο εδαφικό περιβάλλον (Norton and Stark, 2011). Ωστόσο ο πλήρης μηχανισμός της οξείδωσης της NH_3 δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, καθώς σε όλα τα είδη που έχουν διαβαστεί οι αλληλουχίες τους ως σήμερα δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη ενζύμου ομόλογου της οξειδάσης της υδροξυλαμίνης που είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς NO_2 (Blainey et al., 2011).Οι Leininger et al. (2006) έδειξαν ότι τα αρχαία βρίσκονται σε μεγαλύτερους πληθυσμούς στο έδαφος από τα AOB. Ερευνήθηκε η αφθονία ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα κομμάτι του ενζύμου μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (*amoA*), σε 12 τύπους γεωργικών και αστικών εδαφών προερχόμενα από 3 κλιματικές ζώνες. Τα αντίγραφα του *amoA* γονιδίου του φύλου Crenarcheota (Αρχαία) βρέθηκαν να είναι 3000 φορές περισσότερα από το βακτηριακό *amoA.* Ο υψηλός πληθυσμός τους στα διάφορα οικοσυστήματα και βάθη, υποδεικνύουν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε ποικίλες συνθήκες.

1.1.2 Νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς

Μια μεγάλη ποικιλία ετερότροφων μικροοργανισμών όπως βακτηρίων, ακτινομυκήτων και μυκήτων έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την

αμμωνία μέσω διαφόρων μεταβολικών οδών. Σε αντίθεση με την αυτότροφη νιτροποίηση, η ετερότροφη δεν συνδέεται με την κυτταρική ανάπτυξη και την απόκτηση της ενέργειας. Οι De Boer and Kowalchuk (2001) έδειξαν ότι ως επί το πλείστον, δύο είναι τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται, ενώ οι ετερότροφοι νιτροποιητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε οργανικό είτε ανόργανο υπόστρωμα.

Το πρώτο μονοπάτι είναι αντίστοιχο με αυτό των αυτότροφων μικροοργανισμών, όπου οξειδώνουν την NH_3 ή μετατρέπουν το N οργανικών μορίων σε NH_2OH, NO_2^-και NO_3^-, καθώς χρησιμοποιούν τα οργανικά μόρια στον μεταβολισμό τους. Εικάζεται βέβαια ότι η αμμωνία είναι δευτερεύων στόχος ακολουθούμενη από άλλες οργανικές ενώσεις, όπως φαινόλες, προπένια κ.α (Robertson and Groffman, 2007). Κάποια ετερότροφα βακτήρια αυτής της ομάδας είναι τα *Paracoccus denitrifcans*, *Thiosphaera pantotropha*, *Pseudomonas putida* και *Alcaligenes faecalis*. Επιπλέον, ορισμένα από αυτά, όπως το *Thiosphaera pantotropha*, μπορούν να δρουν και ως απονιτροποίητες, με αποτέλεσμα τη μείωση των ρυθμών νιτροποίησης και την υποεκτίμηση της λόγω των μικρών ποσοτήτων των νιτρικών που εντοπίζονται (Islam et al., 2007). Αυτού του είδους η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε ορισμένα μικροπεριβάλλοντα όπου οι αυτότροφοι παρεμποδίζονται και αυτά συνήθως είναι τα όξινα δασικά εδάφη (Islam et al., 2007). Σε υποτροπικό όξινο έδαφος (pH<4,5) στην Κίνα, τα 27-42% της παραγωγής N_2O ήταν αποτέλεσμα ετερότροφων οργανισμών, εν αντιθέσει με την μικρή συνεισφορά των αυτότροφων (Zhang et al., 2011). Από την άλλη μεριά, οι Pennington and Ellis, (1993) αναφέρουν ότι σε πείραμα που διεξήχθη σε δάσος της Νέας Ζηλανδίας, ο μεγαλύτερος όγκος της νιτροποιητικής διεργασίας διεξαγόταν από οξεόφιλους αυτότροφους μικροοργανισμούς.

Το άλλο ετεροτροφικό μονοπάτι περιορίζεται στους μύκητες. Κατά τη λύση κυττάρων και την αποδόμηση της λιγνίνης, απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου οι οποίες αντιδρούν με τις ενώσεις N. (Robertson and Groffman, 2007, De Boer and Kowalchuk, 2001).

$$RNH_2 \rightarrow RNHOH \rightarrow RNO \rightarrow RNO_3 \rightarrow NO_3^-$$

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό της νιτροποίησης στο χερσαίο περιβάλλον

Η διεργασία της νιτροποίησης είναι πολύ σημαντική με άμεσες επιδράσεις στο περιβάλλον και στο γεωργικό τομέα. Η μικροβιακή κοινότητα είναι αυτή που παίζει τον κεντρικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους και στη διατήρηση της παραγωγικότητας των φυτών. Σε πολλά οικοσυστήματα, τα νιτροποιητικά βακτήρια επηρεάζονται από τη διαθεσιμότητα NH_4^+ αλλά και από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες (pH, θερμοκρασία, O_2, υγρασία). Η μικροβιακή δραστηριότητα και οι περιβαντολλογικές συνθήκες που δεν είναι σταθερές αλληλεπιδρούν με τα αποθέματα N. Αποτέλεσμα αυτών είναι να λαμβάνουν χώρα φαινόμενα όπως η απονιτροποίηση και η έκπλυση NO_3^--N. (Krave et al., 2002).

1.2.1 Διαθεσιμότητα υποστρώματος

Οι νιτροποιητές απαιτούν NH_4^+/NH_3, CO_2 και O_2 για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Καθώς τα CO_2 και O_2 είναι πάντα διαθέσιμα στο περιβάλλον του εδάφους υπό καλές συνθήκες αερισμού, η διαθεσιμότητα των NH_4^+/NH_3 καθορίζουν τον ρυθμό της νιτροποίησης αλλά και τον μικροβιακό πληθυσμό. Όταν σε ένα χερσαίο οικοσύστημα για κάποιο λόγω παρατηρείται αύξηση της διαθέσιμης NH_3 τότε συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης (Prosser, 2011). Πηγή αμμωνιακών έχουμε από την προσθήκη αμμωνιακών λιπασμάτων ή κοπριάς, μέσω της αμμωνιοποίησης και από την ατμοσφαιρική εναπόθεση NH_4^+ (Norton and Stark, 2011). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως τα NO_3^--N δεν αποτελούν για όλα τα φυτικά είδη την κύρια μορφή N αλλά σημαντικό ρόλο παίζουν και τα NH_4^+-N (Robson et al., 2009, Walley et al., 1995). Έτσι, οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για την αφομοίωση των NH_4^+-N με τα φυτά, ενώ απώλειες NH_4^+-N μπορεί να λάβουν χώρα και μέσω της εξαέρωσης σε συνθήκες υψηλού pH. Γι αυτό και οι ρυθμοί

νιτροποίησης σε ήδη ισορροπημένα οικοσυστήματα, όπου η φυτική βιομάζα δεν έχει μεγάλες απατήσεις σε N, είναι μεγαλύτεροι (Robertson and Groffman, 2007). Παρόλ'αυτά σε έρευνα των Zhang et al., (2010) για τον κύκλο του N σε αστικά εδάφη, η υψηλή ποσότητα των NH_4^+-N δε φάνηκε να επηρεάζει το ρυθμό νιτροποίησης τόσο, όσο το pH και το υδατικό δυναμικό. Τέλος φαίνεται να επηρεάζει και η ηλικία του υποστρώματος. Σε νεαρούς λειμώνες η προσθήκη φρέσκων φυτικών υπολειμμάτων αύξησε το ρυθμό της νιτροποίησης, ενώ αντίθετα οι παλαιότεροι δεν επηρεάστηκαν (Shi et al., 2006).

1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οξυγόνο: Το διαθέσιμο οξυγόνο αποτελεί εξίσου έναν σημαντικό παράγοντα καθώς η διαδικασία της νιτροποίησης είναι αυστηρά αερόβια, αφού το ένζυμο μονο-οξυγενάση της αμμωνίας ενεργοποιείται υπό την παρουσία O_2. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός νιτροποίησης και η συγκέντρωση O_2, έχουν μια αναλογική σχέση όπως έδειξαν οι Khalil et al., (2004) διερευνώντας το ρυθμό νιτροποίησης υπό συνθήκες διαφορετικής συγκέντρωσης O_2.

Υδατικό δυναμικό: Αντίστοιχη σχέση παρουσιάζεται και εδώ. Η δράση της έγκειται άμεσα στην φυσιολογία των κυττάρων και τις μεταβολικές δραστηριότητες τους και έμμεσα στην διαθεσιμότητα στοιχείων από το υπόστρωμα. Συγκεντρώσεις >0,6 MPa παρεμπόδισαν τη διάχυση στοιχείων, ενώ στις χαμηλότερες από <0,6 MPa τα κύτταρα εμφάνισαν σημάδια αφυδάτωσης (Stark and Firestone, 1995). Σε συγκεντρώσεις υγρασίας 50-60% ο ρυθμός της νιτροποίησης είναι σχετικά υψηλός (Hwang and Hanaki 2000). Η περιεκτικότητα σε υγρασία τροπικών εδαφών της Ινδονησίας, φάνηκε να παίζει κυρίαρχο ρόλο στην νιτροποίηση και στην πυκνότητα των νιτροποιητικών οργανισμών (Krave et al., 2002).

Θερμοκρασία: Οι optimum θερμοκρασίες των νιτροποιητικών μικροοργανισμών έχουν άμεση σχέση με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Συνήθως αυτές κυμαίνονται μεταξύ των 25-30 ^oC αλλά έχει

παρατηρηθεί νιτροποιητική δραστηριότητα ακόμα και στους 2-10 ^{o}C αλλά με χαμηλότερους ρυθμούς (Norton and Stark, 2011, Chen et al., 2010). Οι Singh et al., (1993) έδειξαν ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 8 στους 20 και στους 35 ^{o}C αυξάνονται και τα παραγόμενα NO_3^-.

pH: Το άριστο pH που ευνοεί την οξείδωση της αμμωνίας και των νιτρώδων κυμαίνεται από ουδέτερες σε ελαφρώς αλκαλικές τιμές (7.5-8) (Norton and Stark, 2011, Robertson and Groffman, 2007). Εντούτοις έρευνες επιβεβαιώνουν ότι ακόμα και σε ακραίες τιμές pH από 3 (De Boer and Kowalchuk, 2001) μέχρι 10 μπορεί να λάβει χώρα νιτροποίηση (Dendooven et al., 2010). Με τη μείωση του pH μειώνεται και η διαθεσιμότητα της NH_3 (pK_α NH_3/NH_4^+ = 9,25) (Norton and Stark, 2011) η οποία είναι το υπόστρωμα δράσης της μονο-οξυγενάσης της αμμωνίας των νιτροποιητών (Shen et al., 2003). Πολλοί νιτροποιητές (*Nitrosospira* sp.) μπορούν να υδρολύσουν την ουρία σε NH_3 που αυτή η διαδικασία δεν επηρεάζεται από το pH (Prosser, 2011). Μια παγκόσμια κλίμακας έρευνα πάνω στη σχέση pH και νιτροποίησης στα χερσαία οικοσυστήματα, έδειξε χαμηλή συσχέτιση μεταξύ τους. Πιθανότερη αιτία είναι η αλλαγή σύνθεσης του νιτροποιητικού πληθυσμού που να αντισταθμίζει τις αρνητικές συνέπειες του pH που παρατηρούνται στα εργαστηριακά πειράματα (Norton και Stark, 2011). Από την άλλη μεριά, υψηλές τιμές pH ευνοούν την διαλυτοποίηση της οργανικής ύλης που προμηθεύει ανθρακικό υπόστρωμα για την μικροβιακή ανάπτυξη. Αστικά εδάφη με pH πάνω από 8 εμφάνισαν αυξανόμενους ρυθμούς νιτροποίησης καθώς αποτελούνταν από ανθρακικά ιόντα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των αυτότροφων μικροοργανισμών που τους παρέχουν CO_2 (Zhang et al., 2010, Pathak and Rao, 1998).

Ποικιλότητα φυτικών ειδών: Η άμεση σχέση μεταξύ της ποικιλότητας και παραγωγικότητας των φυτικών ειδών με τους μικροοργανισμούς του εδάφους, έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές. Η ποιότητα και η ποσότητα των ριζικών εκκρίσεων, τα νεκρά φυτικά υπολείμματα αλλά και οι διάφορες στρατηγικές αναζήτησης θρεπτικών στοιχείων, μπορούν να επηρεάσουν είτε θετικά είτε αρνητικά (Malchair et al, 2010a). Οι Kowalchuk

et al. (2001) αναφέρουν ότι στο κομμάτι της ριζόσφαιρας, όπου ο ανταγωνισμός για πόρους είναι έντονος, η μεγάλη ποικιλία φυτών έχει θετικό αντίκτυπο στη βακτηριακή κοινότητα. Εντούτοις, εκκρίσεις από τις ρίζες του φυτού *Brachiara Humidicola* κατέστειλαν την νιτροποίηση, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι και ο βιολογικός κύκλος των φυτών παίζει ρόλο, καθώς με την ωρίμαση φυτών, όπως του *Sorghum bicolor,* μειώθηκαν και τα NO_3^-. Αυτή η καταστολή από τα φυτικά είδη μπορεί να θεωρηθεί ως μια μορφή προσαρμογής στη διατήρηση των επιπέδων N στις λιγότερες κινητές μορφές του, για την αποφυγή έκπλυσης του (Smits et al., 2010).

Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της μικροβιακής βιομάζας, αφθονία μυκήτων και ενδομυκόρριζων και υψηλά ποσοστά σελλουλόζης αναδεικνύοντας την επίδραση των φυτών στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας αλλά και στο ρυθμό αποδόμησης (Chung et al., 2006). Σε αντίστοιχη συγκριτική έρευνα ερευνήθηκε η επίδραση τριών οικογενειών (Graminaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae) στα νιτροποιητικά βακτήρια. Υπό την καλλιέργεια των ψυχανθών παρατηρήθηκε αυξημένο δυναμικό νιτροποίησης και μειωμένη ποικιλία βακτηρίων, όπου πιθανή αιτία είναι τα αυξημένα ποσά NH_4^+-N (Malchair et al., 2010b)

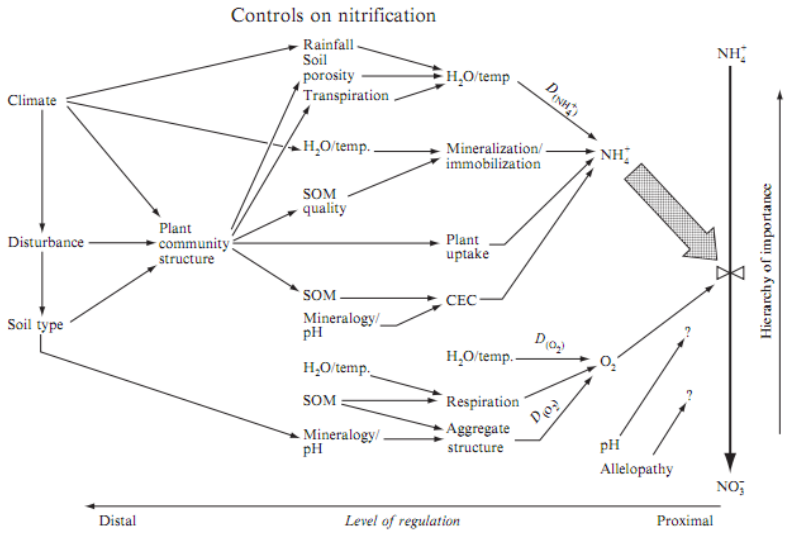
<u>*Μικροπανίδα*</u>: Η επίδραση των νηματωδών και των πρωτόζωων στις μικροβιολογικές διαδικασίες και στην παρουσία των θρεπτικών στοιχείων μπορεί να επηρεάσει τα εξής:

- Τροποποίηση της σύνθεσης και του μεγέθους της μικροβιακής κοινότητας.
- Επιτάχυνση της ανακύκλυσης (turnover) της μικροβιακής βιομάζας και της οργανικής ύλης.
- Την άμεση διάθεση θρεπτικών.
- Προώθηση του βακτηριακού αποικισμού σε νέα υποστρώματα (Griffiths, 1994, Xiao et al., 2010).

Υποστηρίζεται ότι το 30% του συνολικού N που ανοργανοποιείται, είναι αποτέλεσμα κυρίως της μικροβιακής κατανάλωσης από την μικροπανίδα

του εδάφους (Griffiths, 1994). Οι βακτηριοφάγοι νηματώδεις επειδή έχουν υψηλότερο κλάσμα C/N καταναλώνοντας βακτήρια λαμβάνουν περισσότερο N από αυτό που τους είναι απαραίτητο, με αποτέλεσμα να το διαθέτουν πίσω στο περιβάλλον με την μορφή NH_4^+-N (Ferris, 1998).

Η παρουσία νηματωδών έπειτα από εμβολιασμό αποστειρωμένου εδάφους με AOB - AOB και βακτηριοφάγους νηματώδεις οδήγησε σε αύξηση της ανοργανοποίσης και της νιτροποίησης. Παράλληλα παρατηρήθηκε αλλαγή της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας με το *Nitrosospira* sp. και τα *Nitrosomonas* sp. και *Nitrosospira* sp. αντίστοιχα, να είναι τα κυρίαρχα είδη (Xiao et al., 2010). Αποτελέσματα των Djigal et al. (2004) δίνουν επίσης στοιχεία για την επίδρασή τους στα βακτήρια μειώνοντας την μικροβιακή βιομάζα και την πυκνότητά τους κατά 28% και 55% αντίστοιχα, ενώ αντίθετα η δραστηριότητα τους αυξήθηκε κατά 18%.



Εικόνα1.3: Παράγονετς που επηρεάζουν την νιτροποίηση (Robertson, G. P. (1989)

1.3 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

Το ενδιαφέρον στην επιβράδυνση της ταχύτητας της νιτροποίησης επικεντρώνεται στους εξής λόγους: i) η χημική φύση των παρεμποδιστών και τα χαρακτηριστικά της δράσης τους μπορούν να μας δώσουν στοιχεία

ως προς τους βιοχημικούς μηχανισμούς οξείδωσης της NH_3 και των NO_2^-, ii) χρησιμοποιούνται για τη διάκριση διαδικασιών που επέρχονται από αλλαγές υποστρώματος και προϊόντων των νιτροποιητικών μικροοργανισμών και iii) κυριότερη δράση τους είναι η συγκράτηση της αμμωνίας στο έδαφος με οικονομικά και περιβαλλοντολογικά οφέλη (Prosser, 2011).

Οι Raun and Johnson (1999) εκτιμούν ότι μόνο το 33% του N που εφαρμόζεται παγκοσμίως στις καλλιέργειες σιτηρών αφομοιώνεται από τις καλλιέργειες, ενώ το κόστος του υπόλοιπου 67% που χάνεται ανέρχεται σε $20 δις. παγκοσμίως. Ομοίως, η εκπομπή ρύπων και η ρύπανση των υπογείων υδάτων μπορούν να περιορισθούν. Η καθυστέρηση και η μείωση της οξείδωσης των NH_4^+-N οδηγούν στην συντήρηση των πηγών N για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Abbasi et al., 2011).

1.3.1 Συνθετικοί παρεμποδιστές

Πάνω από 50 χημικές ουσίες έχουν ερευνηθεί και χαρακτηριστεί ως παρεμποδιστές της νιτροποίησης, με πιο γνωστές τη νιτροπυρίνη και το ακετυλένιο. Στόχος τους είναι η παρεμπόδιση δράσης της AMO εκτός από τα χλωριούχα άλατα που δρουν κατά την οξείδωση των NO_2^-. Στοιχεία από 158 περιοχές της των Η.Π.Α που εφαρμόστηκε νιτροπυρίνη μαζί με την εφαρμογή των λιπασμάτων, έδειξαν ότι μειώθηκε η έκπλυση του N και η εκπομπή του N_2O κατά 16% και 51% αντίστοιχα (Prosser, 2011). Εντούτοις, επειδή εξαερώνεται σχετικά εύκολα δεν ενδείκνυται η εφαρμογή της με λίπασμα στέρεας μορφής. Σε άλλη έρευνα έγινε σύγκριση δράσης της νιτροπυρίνης και του 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) με το ποσοστό μείωσης εκπομπών N_2O να ανέρχεται στα 65% και η διάρκεια δράσης τους στις 42 ημέρες (Chen et al., 2010).

1.3.2 Φυσικοί παρεμποδιστές

Η αλληλοπάθεια είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο ενώσεις (φαινόλες, τερπένια, φλαβονοειδή) προερχόμενες από εκκρίσεις ριζών ή από τη διαδικασία της αποσύνθεσης, δημιουργούν ένα τοξικό περιβάλλον για τους

νιτροποιητές (Prosser, 2011). Επίσης χημικές ενώσεις (KCl, $MgCl_2$, $Na_2S_2O_3$) και προϊόντα φυτών (*Azadirachta indica*, *Camellia sinensis*) κοστίζουν λιγότερο και είναι πιο εύκολα διαθέσιμα από τους συνθετικούς παρεμποδιστές. Σε μελέτη των Abbasi et al. (2011) ερευνήθηκε η παρεμποδιστική δράση των neem seedcake (*Azadirachta indica*) (NSC), sodium thiosulphate ($Na_2S_2O_3$) και χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) με τα ποσοστά παρεμπόδισης της νιτροποίησης να είναι 54%, 64% και 59% αντίστοιχα.

1.4 Κινητική νιτροποίησης

Αλλαγές στη διαθεσιμότητα του υποστρώματος από παράγοντες όπως λίπανση και κατάθεση ατμοσφαιρικού N, αλλαγές στην υγρασία και τη θερμοκρασία εξ' αιτίας της υπερθέρμανσης του πλανήτη, έχουν σημαντική επίδραση στους ρυθμούς νιτροποίησης. Για την πρόβλεψη των ακριβών επιπτώσεων χρησιμοποιώντας μοντέλα προσομοίωσης, χρειάζονται πληροφορίες πάνω στα χαρακτηριστικά της κινητικής των νιτροποιητών (Stark and Firestone, 1996).

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το φαινόμενο της νιτροποίησης επηρεάζει την διαθεσιμότητα και τις απώλειες N από το έδαφος, ενώ παράλληλα παράγονται αέριοι ρύποι (N_2Oκαι NO). Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης (PNR) αναφέρεται στο ρυθμό νιτροποίησης υπό ιδανικές συνθήκες (άφθονο υπόστρωμα και καλός αερισμός), και δίνει αποτελέσματα για την συγκέντρωση των προϊόντων σε σχέση με το χρόνο στο έδαφος ή σε μίγμα εδάφους. Έτσι, στα πλαίσια «αποκρυπτογράφησης» και βελτίωσης της διαδικασίας, εφαρμόζεται η ανάλυση των κινητικών μοντέλων με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των NH_4^+ στη νιτροποίηση και κατ' επέκταση το μέγεθος της βιομάζας και κινητικότητας των νιτροποιητών (Prosser, 2011, Norton and Stark, 2011, Koper et al., 2010). Εάν οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος είναι χαμηλές, χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis–Menten

$$V = V_{max}S/(K_m + S)$$

Όπου V= ρυθμός οξείδωσης NH_4^+

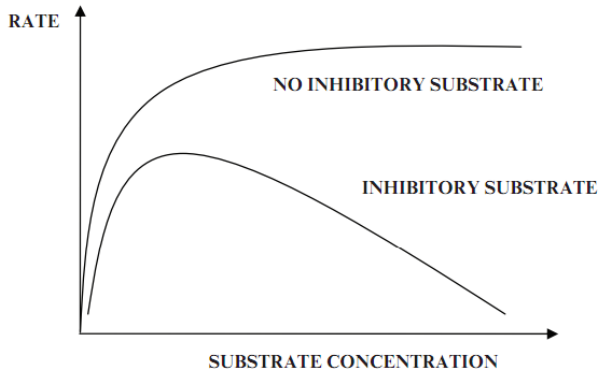
K_m=σταθερά Michaelis–Menten

S= συγκέντρωση υποστρώματος (NH_4^+)

Το V_{max} αναφέρεται στο μέγιστο ρυθμό νιτροποίησης υπό απεριόριστη διαθεσιμότητα υποστρώματος, όπου μπορεί να ερμηνευτεί και ως μέτρηση του μέγεθους του αμμωνι-οξειδωτικού πληθυσμού. Στην περίπτωση όμως που οι υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος δρουν παρεμποδιστικά, εφαρμόζεται η εξίσωση Haldane

$$V = V_{max}S/(K_m + S + \frac{S^2}{K_i})$$

Στην οποία το K_m ισοδυναμεί με την ελάχιστη συγκέντρωση υποστρώματος που καταναλώνεται για την παραγωγή του ½ V_{max} , ενώ το Ki, η παράμετρος παρεμπόδισης, είναι η μέγιστη συγκέντρωση υποστρώματος που καταναλώνεται για την παραγωγή του ½ V_{max}. Στην περίπτωση της νιτροποίησης, καθώς οι συγκεντρώσεις των NH_4^+ αυξάνονται αυξάνεται και ο ρυθμός έως ότου οι συγκεντρώσεις δράσουν ανασταλτικά στην αμμωνι-οξειδωτική δραστηριότητα. Στην Εικ. 1.4 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών υπό συνθήκες περιορισμένης και μη, διαθεσιμότητας υποστρώματος. Παρατηρείται μια απότομη μείωση όταν η διαθεσιμότητα αυτή υπερβεί μία συγκεκριμένη ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίπτωση (Shammas et al., 2009, Koper et al., 2010, Bergethon and Hallock., 2011).



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση επίδρασης της συγκέντρωσης υποστρώματος στον βακτηριακό πληθυσμό. (Shammas et al., 2009)

1.5 Ανοργανοποίηση / Ακινητοποίηση

Το μεγαλύτερο ποσοστό του εδαφικού N, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκεται σε οργανική μορφή και είναι μη διαθέσιμο για τα φυτά. Η ανοργανοποίηση (mineralization) ή αμμωνιοποίηση του N είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς διεργασιών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αποσύνθεσης ζωικών μικροβιακών και/ή φυτικών ιστών και βακτηριακού φορτίου, που οδηγούν στην μετατροπή των οργανικών μορφών του N σε ανόργανες, συνήθως σε NH_4^+.

Αυτή η διεργασία αποτελεί πηγή ενέργειας και C για τους μικροοργανισμούς, καθώς επίσης και πηγή θρεπτικών, κυρίως N, έτσι ώστε να μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα κυτταρικά συστατικά (Robertson and Groffman, 2007).

Όταν η νεκρή οργανική ύλη είναι πλούσια σε N τότε οι ανάγκες των μικροοργανισμών για N ικανοποιούνται και έτσι έχουμε περίσσεια NH_4^+-N. Όταν όμως η οργανική ύλη χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε N τότε οι μικροοργανισμοί το ενσωματώνουν σε οργανικά μόρια για δική τους κατανάλωση, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της ακινητοποίησης (Immobilization) (Robertson and Groffman, 2007).

Σαν γενικός κανόνας όταν ο λόγος C/N παίρνει τιμές >25:1 οι μικροοργανισμοί ακινητοποιούν το N και σαν αποτέλεσμα μειώνεται το

διαθέσιμο για τα φυτά N. Αντιθέτως, όταν ο λόγος παίρνει τιμές <25:1 τότε οι μικροοργανισμοί ανοργανοποιούν το N και η ποσότητα του διαθέσιμου για τα φυτά N αυξάνεται. Εντούτοις, παρατηρήθηκε πως ακόμα και με την προσθήκη οργανικής ύλης με λόγο C/N ίσο με 10 έλαβε μέρος το φαινόμενο της βραχυπρόθεσμης ακινητοποίησης (Shi et al., 2006). Εξαίρεση αποτελούν τα ιδιαίτερα αποσυντιθέμενα υποστρώματα, όπως ο χούμος ή η κομπόστα, όπου περιέχουν σύνθετα οργανικά μόρια τα οποία δύσκολα αποσυντίθεται με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ανοργανοποίηση του N (Robertson and Groffman, 2007). Η προσθήκη εύκολα αποσυντιθέμενων στοιχείων στο χώμα μπορεί να διεγείρει την αποσύνθεση της μικροβιακής βιομάζας και παραπροϊόντων αλλά όχι και αυτών των σταθερών οργανικών μορίων. Έρευνα των Shi et al. (2006), παρουσίασε ένα ποσοστό C 8% που έμεινε δεσμευμένο στη μικροβιακή βιομάζα ακόμα και μετά από 28 μέρες επώασης (incubation), γεγονός που στηρίζει τον παραπάνω ισχυρισμό.

Η θερμοκρασία και η υγρασία είναι από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την ανοργανοποίηση του N στο έδαφος και ιδιαίτερα σε συνθήκες αγρού οι επιπτώσεις είναι έμμεσες και άμεσες. Η εδαφική υγρασία σχετίζεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα νερού στη μικροβιακή δραστηριότητα, ενώ έμμεσα με τη διάχυση του O_2 στους πόρους του εδάφους. Αντίστοιχα και η θερμοκρασία έχει άμεση επίπτωση στις βιοχημικές διεργασίες και έμμεση στην κατανάλωση του O_2 από τους μικροοργανισμούς και τον αέριο όγκο στο έδαφος (Sierra, 1996). Σε εργαστηριακό πείραμα των Guntiñas et al. (2012) ερευνήθηκε η επίδραση και των 2 παραγόντων (10-35 ^{o}C και 40-100% της υδατοϊκανότητας) στον καθαρό ρυθμό αμμωνιοποίησης 3 διαφορετικοί τύποι εδαφών από δασικές, καλλιεργήσιμες και χορτολιβαδικές εκτάσεις. Παρατηρήθηκε πως και στα 3 η ανοργανοποίηση έφτασε τις μέγιστες τιμές της στους 25 ^{o}C, ενώ η optimum υγρασία ήταν στο 80% της υδατοϊκανότητας παρόλο που και στα μεγαλύτερα επίπεδα η διαφορά του ρυθμού ήταν ελάχιστα μικρότερη. Ακόμα και σε συνθήκες αγρού, ο καθαρός ρυθμός ανοργανοποίσης

αντανακλάει το μοτίβο των βροχοπτώσεων (Zhang et al., 2010). Αναφέρεται επίσης πως, υπό τις ίδιες περιεκτικότητες ποσότητας νερού, οι διεργασίες της ανοργανοποίησης και της νιτροποίησης σε μη διαταραγμένο έδαφος περιορίζονται εντονότερα από το διαταραγμένο (De Neve and Hofman, 2002). Εντούτοις έχει παρατηρηθεί πως η θερμοκρασία είναι αυτή που έχει την κυρίαρχη επίδραση (Laverman et al., 2010, Guntiñas et al., 2012, Low et al., 1997).

Ένας άλλος παράγοντας είναι η σύνθεση της εδαφικής κάλυψης. Στην Αμερική παρόμοια δασικά οικοσυστήματα που αποτελούνταν κυρίως από λευκό πεύκο (*Pinus strobes*) παρουσίασαν μέτριους ρυθμούς ανοργανοποίσης και χαμηλούς νιτροποίησης, ενώ άλλα με κόκκινο σφένδαμο (*Acer rubrum*) υψηλούς ρυθμούς και των 2 διεργασιών. Βέβαια η βλάστηση δεν είναι πάντα καλός δείκτης διαφορών στον κύκλο του αζώτου. Μικροοικοσυστήματα οξιάς, σφένδαμου και βελανιδιάς παρουσίασαν μη στατιστικά διαφορετικούς ρυθμούς νιτροποίησης (Verchot et al., 2001).

Σημαντικό ρόλο παίζει και η χρήση γης. Σε πείραμα διάρκειας 8 χρόνων που διεξήχθη από τους Uri et al., (2008) συγκρίθηκαν οι καθαροί ρυθμοί ανοργανοποίησης μεταξύ έκτασης που είχε αναδασωθεί με σημύδα και λιβαδιού. Ο ετήσιος ρυθμός ανοργανοποίησης ήταν 5 φορές υψηλότερος στο πρώτο ενώ και στα 2 οι ανάγκες των φυτών σε N καλύπτονταν. Εντούτοις σε μεγαλύτερα βάθη ο ρυθμός νιτροποίησης στο λιβάδι ήταν μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα η πιθανότητα έκπλυσης των NO_3^-να είναι πιθανότερη.

Τέλος, η παρουσία πανίδας και κυρίως των γαιοσκωλήκων μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στον κύκλο του N. Βραχυπρόθεσμα αυξάνονται τα ποσοστά ανόργανου N αλλά μακροπρόθεσμα επέρχεται μείωση της νιτροποίησης. Αποτελέσματα ερευνών που συνέκριναν καλλιεργήσιμα με δασικά εδάφη αναφέρουν την αύξηση του λόγου C/N παρουσία γαιοσκωλήκων που οδηγεί στην μείωση της ανοργανοποίησης (Verchot et al., 2001).

Η αύξηση της αστικοποίησης επιδρά με εκπληκτική ετερογένεια στα αστικά εδάφη με χαρακτηριστικά όπως τη μείωση του ύψους του υδροφορέα, την συμπίεση και την μίξη ανθρωπογενών υλικών (τοξικών και χονδρόκοκκων) με τα ήδη φυσικά υπάρχοντα. Αστικά εδάφη παρουσίασαν υψηλότερους ρυθμούς καθαρής νιτροποίησης από προαστιακά, σε συγκριτική έρευνα των Zhang et al. (2010), ενώ αντίστροφη σχέση παρουσίασε η δυνητική ανοργανοποίηση. Η διαφορές αποδίδονται στην ποιότητα και ποσότητα της οργανικής ύλης, την θερμοκρασία και υγρασία των εδαφών. Χαμηλός λόγος C/N, υψηλό pH και συγκέντρωση NO_3^- είναι από τα χαρακτηριστικά των αστικών εδαφών που παρουσιάζουν θετική καθαρή νιτροποίηση και έκπλυση NO_3^-. Οι διακυμάνσεις της καθαρής ανοργανοποίησης αντανακλούν το μοτίβο της θερμοκρασίας και των βροχοπτώσεων με την αύξηση της εδαφικής υγρασίας να την διεγείρουν.

1.6 Αλατότητα

Η αλάτωση των εδαφών είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζεται όλο και συχνότερα και πλήττει εκατομμύρια εκτάρια σε όλο τον κόσμο. Σύμφωνα με τον Tòth et al., (2008) αυτή η έκταση εκτιμάται σε 1 δις εκτάρια. Ο όρος αλάτωση χρησιμοποιείται για να περιγράψουμε τη συσσώρευση αλάτων στο έδαφος. Αυτό συμβαίνει συνήθως στις ξηρές και ημίξηρες περιοχές κυρίως της Ασίας, Αυστραλίας, Αφρικής, και της βόρειας Αμερικής, ενώ θεωρείται ως ο πιο σημαντικός ανασταλτικός αβιοτικός παράγοντας ανάπτυξης φυτών και μικροβιακής δραστηριότητας (Ghollarata and Raiesi, 2007, Sardinha et al., 2003). Σύμφωνα με εκτιμήσεις, στην Ευρώπη 1 εκατ. εκτάρια που εκτείνονται κυρίως στην περιοχή της λεκάνης της Μεσογείου, έχουν οδηγηθεί στην ερημοποίηση από τη συνεχή συσσώρευση αλάτων. Η αλάτωση συμβάλει στην υποβάθμιση και ερημοποίηση της γης στην Ελλάδα, ειδικά στις αρδευόμενες περιοχές με ατελή στράγγιση. Τα αρδευόμενα εδάφη στην Ελλάδα καλύπτουν έκταση περίπου 1.364.400 εκτάρια ή 32% των γεωργικών εδαφών. Στον παρακάτω πίνακα

παρουσιάζονται τα ποσοστά πιθανού κινδύνου αλάτωσης ανά τον κόσμο (Lakhdar et al ., 2009).

Πίνακας 1: Ποσοστά πιθανού κινδύνου αλάτωσης. (Lakhdar et al ., 2009)

Country	Sail-affected area
Australia	30% total area
Egypt	9.1% total area
Hungary	10% total area
Iran	28% irrigated land
Kenya	14.4% total area
Nigeria	20% irrigated land
Russia	21% agricultural land
Syrie	40% irrigated land
Thailand	30% total area
Tunisia	11.6% total area
USA	25-30% irrigated land

Οι βασικοί παράγοντες που ευνοούν την συγκέντρωση των αλάτων στο έδαφος είναι η άρδευση με χαμηλής ποιότητας νερό, οι κακές συνθήκες στράγγισης, και οι ξηρές κλιματικές συνθήκες που δεν ευνοούν την έκπλυση τους.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αργιλικών ορυκτών και αλάτων προκαλούν μεταβολές στις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους, καθώς και στις μικροβιακές διαδικασίες. Οι Tejada et al. (2006) έδειξαν ότι με την αύξηση της EC συνεπάγεται μείωση της σταθερότητας της δομής του εδάφους και της πυκνότητάς του. Οι κυριότερες συνέπειες της συσσώρευσης αλάτων στο έδαφος είναι η διασπορά των αργιλικών ορυκτών, η αναδιευθέτηση των αργιλικών ορυκτών και η μεταβολή του υδατικού δυναμικού και υγρασίας στο έδαφος (DIS4ME).

1.6.1 Η επίδραση της αλατότητας στον κύκλο του Ν

Η σύνθεση της μικροβιακής βιομάζας θεωρείται σημαντικός δείκτης ποιότητας των εδαφών καθώς επηρεάζουν την γονιμότητά του (Tripathi et al., 2006). Η αλατότητα επηρεάζει τις μικροβιακές λειτουργίες (ενζυματική δραστηριότητα, αναπνοή, σύνθεση κοινότητας) μέσω της επίδρασης της στην φυσιολογία των κυττάρων και των μεταβολικών τους μονοπατιών (Ghollarata and Raiesi, 2007). Εντούτοις, οι διαστάσεις της επίδρασης αυτής εξαρτώνται άμεσα από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες όπως το pH, σύνθεση και συγκέντρωση ανιόντων και δομή και επίπεδο οργανικής ύλης (Muhammad et al., 2008).

Η ενσωμάτωση της οργανικής ύλης στα συσσωματώματα του εδάφους, παρέχει φυσική προστασία από την γρήγορη αποσύνθεση της και είναι το κλειδί για τη σταθερότητά του. Έτσι, οποιαδήποτε διαδικασία που παρεμποδίζει τη δημιουργία των συσσωματωμάτων, οδηγεί στην αύξηση της ανοργανοποίησης του C και κατά συνέπεια, απώλειας του. Η αρχική μεγάλη διαθεσιμότητα υποστρώματος οργανικής ύλης, μετά από τη διαλυτοποίησή της μπορεί να εξισορροπήσει το στρες του μικροβιακού πληθυσμού από το NaCl. Είναι πιθανόν οι συγκεντρώσεις του διαλυμένου οργανικού C να αυξάνονται εξαιτίας της αύξησης της διαλυτότητας της οργανικής ύλης που παρέχει υπόστρωμα για το μικροβιακό πληθυσμό.

Οι Wong et al. (2008) παρατήρησαν ότι σε χειρισμό εδάφους με αυξημένη αλατότητα, η μικροβιακή βιομάζα αυξήθηκε. Παρόμοιο αποτέλεσμα διαπίστωσαν και οι Wong et al. (2009), όπου η προσθήκη οργανικής ύλης σε έδαφος με υψηλή αλατότητα οδήγησε στην αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας. Η επίδραση αυτή αποδίδεται στην αυξημένη διαθεσιμότητα υποστρώματος είτε από την διασπορά των συσσωματωμάτων εδάφους, είτε από τη διαλυτοποίηση ή υδρόλυση της οργανικής ύλης.

Σε πείραμα που διεξήχθη στην Κίνα από τους Yuan et al. (2007), ερευνήθηκαν οι επιδράσεις της αλατότητας και της αλκαλικότητας από Mg^{2+} στο μέγεθος και τη δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας. Η

αύξηση της αλατότητας οδηγεί στην αφυδάτωση των μικροοργανισμών, εξ' αιτίας της ανάπτυξης οσμωτικού και ιοντικού στρες (Ghollarata and Raiesi, 2007). Οι συγκεντρώσεις Na^+ και Cl^- ξεπερνούν αυτές των μικροστοιχείων και ιχνοστοιχείων του εδάφους, με αποτέλεσμα την επικράτηση ακραίων κλασμάτων Na^+/Ca^{2+}, Mg^{2+}/Ca^{2+} Na^+/K^+ και Cl^-/NO_3^- (Qadir and Shubert, 2002). Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση του διαθέσιμου ανοργανοποιήσιμου N και η αύξηση του qCO2 (respiratory quotient/ πηλίκο αναπνοής), που αποτελεί στην ουσία δείκτη στρες του μικροβιακού πληθυσμού. Έτσι λαμβάνουν χώρα απώλειες C εξ' αιτίας της έντονης αναπνοής της καταπονημένης μικροβιακής κοινότητας και δεν χρησιμοποιείται στην μικροβιακή σύνθεση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και μειωμένος λόγος C/N βιομάζας που αντανακλάει την κυριαρχία των βακτηρίων μέσα στην μικροβιακή βιομάζα. Σε έδαφος που πραγματοποιήθηκε προσθήκη αλάτων διαπιστώθηκαν σταθεροί ρυθμοί ανοργανοποίσης υποδηλώνοντας ότι το οσμωτικό δυναμικό είχε την ίδια επίδραση στην πρόληψη οργανικού N και στην μικροβιακή ανάπτυξη. Αρχικά παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού με την αύξηση της αλατότητας ο οποίος τελικά σταθεροποιήθηκε στο 50% του μέγιστου μεταξύ 300-1800 kPa. Έτσι ακόμα και στο πολύ χαμηλό οσμωτικό, αμμωνιακά συνεχίζουν και ελευθερώνονται στο έδαφος. Από την άλλη μεριά, μετρήσεις στη μεικτή νιτροποίηση έδειξε ότι η επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων NH_4^+-N ήταν καθοριστικότερη από την αυξανόμενη αλατότητα (Low et al., 1997).

Οι Visser et al (1983) αναφέρουν ότι τα βακτήρια μπορούν και αναπτύσσονται κάτω από συνεχείς συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων και επικράτησης συνθηκών στρες, εν αντιθέσει με τους μύκητες και ακτινομύκητες. Πιο πρόσφατες έρευνες επαληθεύουν αυτό το φαινόμενο με βάση τις μειούμενες συγκεντρώσεις εργοστερόλης στο έδαφος (Sardinha et al., 2003) και βιοποικιλότητας ειδών των μυκήτων (Van Bruggen and Semenov, 2000). Αντίστοιχα αποτελέσματα επίδρασης της αυξημένης αλατότητας από το νερό άρδευσης σε αγρούς

ζαχαροκάλαμου στην Ζιμπάμπουε αναφέρθηκαν από τους Rietz and Haynes (2003).

Οι αρνητικές επιδράσεις της αλατότητας μπορούν να επιφέρουν καταστροφικές συνέπειες στη δομή της μικροβιακής κοινότητας και των δραστηριοτήτων τους. Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι οι επιπλοκές στους βιογεωχημικούς κύκλους των στοιχείων και κατ' επέκταση στη γονιμότητα των εδαφών (Setia et al., 2011). Έτσι οι Wichern et al. (2006) ερεύνησαν την επίδραση της αλατότητας στην απόσυνθεση υπολειμμάτων καλαμποκιού. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι εδάφους (A, B), το δεύτερο με πρόβλημα αλατότητας, στα οποία προστέθηκαν 3 επίπεδα αλάτων (0, 15, 50 mg NaCl/g soil) και 2% υπόλειμμα καλαμποκιού. Οι μικροοργανισμοί επωφελήθηκαν από την διαθεσιμότητα οργανικής ύλης, αφού η αναπνοή και η μικροβιακή βιομάζα αυξήθηκαν σε σχέση με τους χειρισμούς χωρίς την προσθήκη υπολείμματος. Η αποσύνθεση της οργανικής ύλης στο έδαφος B σε σχέση με το A, χωρίς την προσθήκη αλάτων, ήταν μεγαλύτερη. Αυτό υποδεικνύει ότι είχε λάβει χώρα η προσαρμογή των μικροοργανισμών στην αλατότητα. Επίσης, παρατηρήθηκε αναστολή της νιτροποίησης, καθώς το ανόργανο N σε όλους τους χειρισμούς με άλατα, αυξανόταν αναλογικά και αποτελούταν κυρίως από NH_4^+-N. Σε αντίστοιχο πείραμα, μετά από προσθήκη χλωρής λίπανσης με φυτά του γένους *Sesbania,* παρατηρήθηκε μείωση της υδρολυτικής ενεργότητας και του ρυθμού αμμωνιοποίησης υπό συνθήκες υψηλού pH και αλατότητας (Pathak and Rao, 1998). Όμοια παρατήρηση αναφέρθηκε και από τους Tripathi et al., (2006).

Όπως προαναφέρθηκε, τα φυτικά υπολείμματα μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα εδάφους όντας καλή πηγή N. Σε άλλο αντίστοιχο πείραμα, εφαρμόστηκαν τρία επίπεδα αλατότητας (0.21, 0.51 και 0.85 dS/m) και 2% (w/w) υπολείμματα λούπινου για να ερευνηθούν οι επιδράσεις των NH_4^+-N ή των NO_3^--N στη μικροβιακή δραστηριότητα και βιομάζα και στην διαθεσιμότητα N. Και εδώ η ανοχή των μικροοργανισμών στην αλατότητα βελτιώθηκε με την προσθήκη οργανικής ύλης. Η προσθήκη ανόργανου N

ιδίως με τη μορφή των NO_3^--N αύξησε περαιτέρω τη διαθεσιμότητα N, και περισσότερο στο χειρισμό με την προσθήκη υπολειμμάτων λούπινου (Elgharably and Marschner, 2011).

Εντούτοις, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, οι επιδράσεις της αλατότητας εξαρτώνται και από άλλους αβιοτικούς παράγοντες. Οι Rousk et al. (2011), ερεύνησαν την ανεκτικότητα βακτηριακού πληθυσμού από εδάφη με αυξανόμενα επίπεδα αλατότητας με χαμηλά ποσοστά οργανικής ύλης. Αντίθετα με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, δεν παρουσιάστηκε στατιστική συσχέτιση μεταξύ ανεκτικότητας και συγκέντρωσης αλάτων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη και άλλων παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν την μικροβιακή κοινότητα. Την υπόθεση αυτή επιβεβαίωσαν ξανά, μετά από επανάληψη του πειράματος με την προσθήκη 0, 1, 2% οργανικής ύλης, όπου και εδώ η επίδραση ήταν οριακή. Έτσι, το υδατικό δυναμικό μπορεί να θεωρηθεί ως ο παράγοντας αυτός που έχει άμεσο αντίκτυπο στην δομή των βακτηριακών κοινοτήτων. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Chowdhury et al., 2011, που έδειξαν ότι σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα, διαφορές στη συγκέντρωση του υδατικού δυναμικού επηρέασαν την μικροβιακή κοινότητα, παρόλες τις μικρές διακυμάνσεις της αγωγιμότητας. Μείωση του WP (Water potential) -2MPa θανάτωσε κάποιο ποσοστό μικροοργανισμών, ενώ το εναπομείναν προσαρμόστηκε και κατέστη ενεργό. Περεταίρω μείωση επέφερε μειωμένους ρυθμούς δραστηριότητας. Βέβαια πάνω σε αυτή την κατεύθυνση χρειάζεται να γίνουν και άλλες έρευνες.

Αντικείμενα εργασίας

Η κατανόηση του γίγνεσθαι του N στα χερσαία οικοσυστήματα, καθώς και των παραγόντων που επιδρούν σε αυτό, καθορίζει ισχυρά την παραγωγικότητά τους αλλά και τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Εντούτοις, μόλις τις τελευταίες δεκαετίες έχει αρχίσει να ερευνάται η επίδραση της αλατότητας στη δραστηριότητα, τον πληθυσμό και σύνθεση της μικροβιακής βιομάζας που εμπλέκεται στον βιογεωχημικό κύκλο του N στο έδαφος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η διερεύνηση της συσσώρευσης αλάτων στον κύκλο του N και συγκεκριμένα στις διεργασίες της νιτροποίησης (Nitrification) και ανοργανοποίησης του N (N-Mineralization). Ειδικότερα, η εργασία επικεντρώνεται στην επίδραση της αλατότητας στην κινητική της νιτροποίησης, την κατανομή πληθυσμού των αρχαίων και βακτηρίων που πραγματοποιούν την οξείδωση της NH_3 και την ανθεκτικότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης εκτιμάται ότι θα συμβάλουν στην καλύτερη προσομοίωση του γίγνεσθαι του N και στη βελτιστοποίηση των προγραμμάτων λίπανσης σε ένα πλαίσιο ορθολογικής διαχείρισης των εδαφών μας, για τη μείωση των απωλειών N και τον περιορισμό των περιβαλλοντικών προβλημάτων

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν γλαστράκια των 500 g, στα οποία τοποθετήθηκε έδαφος που συλλέχτηκε από την περιοχή του Ηρακλείου με συντεταγμένες 35^{o}08’08.64’’ N και 25^{o}01’21.49’’ Ε.. Στο έδαφος αυτό καλλιεργούνταν για χρόνια κατά κύριο λόγο κηπευτικά προϊόντα. Κάθε χρόνο δεχόταν εφαρμογή ανόργανης λίπανσης, ενώ ανά 2 έτη εφαρμοζόταν και οργανική λίπανση (απόβλητα ελαιουργείου).

Η πειραματική διαδικασία άρχισε στις 12 Μαΐου 2011 όπου το έδαφος εκπλύθηκε με νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας NO_3^--N. Αφού αφέθηκε να στραγγίσει, κοσκινίστηκε στα 2 μm, αφαιρέθηκαν πέτρες και φυτικά υπολείμματα και χωρίστηκε σε 4 ίσες ποσότητες των 13,5 kg. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε και η εφαρμογή των αλάτων (NaCl) όπως περιγράφεται παρακάτω. Ένα μήνα μετά (15 Ιουλίου) αφότου μοιράστηκε στα δοχεία των 500 g άρχισε να εφαρμόζεται η PNR μέθοδος, η αναλυτική διαδικασία της οποίας περιγράφεται παρακάτω. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για τον κάθε χειρισμό, ενώ η μέτρηση επαναλήφθηκε πάλι δύο μήνες μετά.

Η αναστολή της δράσης της αλατότητας στις διεργασίες του κύκλου του αζώτου διερευνήθηκε περαιτέρω με την εφαρμογή 100 Kg N/ha υπό τη μορφή $(NH_4)SO_4$ την 5^{η} του Απρίλη. Αφέθηκε το σύστημα να ισορροπήσει για 2 εβδομάδες και έπειτα επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις της PNR μεθόδου. Για την διεξαγωγή του πειράματος προαπαιτήθηκε ο υπολογισμός της κοκκομετρικής σύστασης του εδάφους, του pH, της ηλεκτρικής αγωγιμότητα (EC), του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC), ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης (Potential Nitrification Rate, PNR) και ο καθαρός ρυθμός ανοργανοποίησης (Net N mineralization, NNM). Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση γενωμικού υλικού (DNA) από όλους τους χειρισμούς πριν και μετά την εφαρμογή του επιπλέον αζώτου, ώστε με την

μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, Polymerase Chain Reaction) να γίνει σύγκριση και ποσοτικοποίηση του μικροβιακού πληθυσμού. Καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος τα γλαστράκια ποτίζονταν με νερό βρύσης για την διατήρηση της υγρασίας τους κοντά στην υδατοϊκανότητα.

Το pH του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν 7,35, η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) 0,26 dS/m και το TOC 3%. Η κοκκομετρική σύσταση χώματος έδωσε ποσοστά αργίλου, ιλύος και άμμου 38, 34 και 28 % αντίστοιχα

2.2 Εφαρμογή των αλάτων

Εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων των 0, 2, 4,5 και 9 g NaCl/Kg εδάφους. Η μετατροπή των g άλατος που προστέθηκαν στις λεκάνες έγινε σύμφωνα με την εκάστοτε υγρασία. Η μία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, ενώ στις υπόλοιπες εφαρμόστηκαν 12,6, 25,7 και 40,8 g NaCl/ Kg χώματος αντιστοίχως. Έπειτα, ο κάθε χειρισμός χωρίστηκε σε 20 γλαστράκια των 500 g (Εικόνα 2.1). Στόχος ήταν η τελική αγωγιμότητα να φτάσει τις τιμές των 2,5, 5 και 10 dS/m.



Εικόνα 2.5: Γλαστράκια πειράματος.

2.3 Αναλύσεις εδάφους

Κοκκομετρική ανάλυση

Για την κοκκομετρική ανάλυση στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο πολυφωσφορικό νάτριο (Na_3PO_4) και η μέτρηση έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Βουγιούκος. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Ζύγισμα 50 g δείγματος
- Προσθήκη του ζυγισμένου δείγματος σε ποτήρι ζέσεως 500 ml
- Προσθήκη 100 ml διαλύματος πολυφωσφορικού νατρίου (Na_3PO_4) στο ποτήρι ζέσεως
- Τοποθέτηση του δείγματος σε επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες σε θερμοκρασία 20oC
- Προσθήκη του δείγματος σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1205 ml
- Προσθήκη απιονισμένου νερού στον ογκομετρικό κύλινδρο μέχρι την τιμή των 1140ml
- Ανάδευση του δείγματος 5 φορές με έμβολο
- Τοποθέτηση αερόμετρου στον ογκομετρικό κύλινδρο και σημείωση μετρήσεων

Ολικός Οργανικός Άνθρακας (TOC)

Ο οργανικός άνθρακας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο υγρής καύσης Waklley – Black (1946).

- Ξήρανση εδάφους στους 60 ^oC μέχρι να αποκτήσει σταθερό βά9ρος.
- Κοσκίνισμα στα 2mm και κοτιρτοποίηση σε γουδί πορσελάνης <250 μm)
- Ζύγισμα 0,5 g εδάφους και τοποθέτηση σε κωνική φυάλη των 500 ml
- Προσθήκη 10 ml K_2CrO_7 και 20 ml H_2SO_4. Αφήνεται να δράση για 20 λεπτά. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την επίδραση του K_2CrO_7 επί του άνθρακα της οργανικής ουσίας του εδάφους είναι:

$$2K_2CrO_7 + 6H_2 + 8H_2SO_4 \rightarrow 2Cr_2(SO_4)^3 + 3CO_2 + 8H_2 + 2K_2SO_4.$$

- Προσθήκη 200 ml απιονισμένου νερού και 2 ml δείκτη διφαινυλαμίνης.
- Τιτλοδότηση με θειικό σίδηρο (FeSO4). Θεωρείται ότι με τη μέθοδο αυτή οξειδώνεται περίπου το 70% του οργανικού άνθρακα, οπότε και

χρησιμοποιείται ένας συντελεστής διόρθωσης.(Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region, North Central Regional Research Publication No. 221)

pH και Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (EC)

Η διαδικασία για τον προσδιορισμό των pH και ηλεκτρικής αγωγιμότητας ήταν η εξής:

- Αποξήρανση του εδάφους και κοσκίνισμα στα 2mm
- Προσθήκη απιονισμένου νερού σε αναλογία εδάφους 1:2
- Ανάδευση για 30min στις 160rpm και αφού αφέθηκαν να ηρεμήσουν για άλλα 30min
- Προσδιορισμός των τιμών με χρήση ηλεκτροδίου (Hach multiparameter, HQ 40 d multi)

Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR)

Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης αναφέρεται στο ρυθμό νιτροποίησης υπό ιδανικές συνθήκες, όπως παρουσία άφθονου υποστρώματος η διάχυση του οποίου δεν περιορίζεται και υπό άριστες συνθήκες αερισμού. Η αναλυτική διαδικασία έγινε βάση τη μεθοδολογία των Hart et al., (1994) και είναι η εξής:

- Το περιεχόμενο από το γλαστράκι τοποθετούταν σε ταψί, όπου με το ταυτόχρονο σπάσιμο των συσσωματωμάτων γινόταν πολύ καλή μίξη του εδάφους (Εικόνα 2.2)



Εικόνα 2.6: Ανάδευση εδάφους σε ταψάκι.

- Προσθήκη 15 g εδάφους σε 11 κωνικές φιάλες των 250 ml και 100 ml από το PNR mix (1,8 ml KH_2PO_4, 4,2 ml K_2HPO_4 /1200 ml)
- Το pH του PNR mix ρυθμιζόταν στα 7,6-8,0
- Προσθήκη 11 διαφορετικών συγκεντρώσεων NH_4^+ -N 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mM από διάλυμα $(NH_4)SO_4$ 1M (Koper et al., 2010)
- Τοποθέτηση φλασκών σε τράπεζα συνεχούς ανάδευσης (200 r.p.m.) μέσα σε θάλαμο επώασης (20 ^oC- σκότος) (Εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.7: Φλάσκες στην τράπεζα ανάδευσης μέσα στον θάλαμο επώσης.

- Συλλογή δείγματος κάθε 2, 6, 20 και 24 ώρες με πιπέτα των 10 ml από κάθε φλάσκα, χωρίς την διακοπή της ανάδευσης
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές

- Προσδιορισμός του NO_3^- N με βάση της μεθόδου αναγωγής του καδμίου (NitraVer® 5, Powder Pillows, HACH) φωτομετρικά στα 540nm (UV/VIS spectrophotometer, Lambda 25, Perkin Elmer)
- Αποθήκευση εναπομείναντος εδάφους στους 4 ^oC για την δεύτερη επανάληψη.

Καθαρός ρυθμός ανοργανοποίησης (NNM)

Η αναλυτική διαδικασία έγινε πάλι σύμφωνα με τους Hart et al., (1994) και είναι η εξής:

- Τοποθέτηση 10 g ξηρού δείγματος σε 16 πλαστικά δοχεία των 100ml για τις μετρήσεις των 0 και 28 ημερών (4 χειρισμοί x 2 επαναλήψεις)
- Διόρθωση της υγρασίας στο 60-70% της υδατοϊκανότητας του χώματος
- Κάλυψη των δοχείων με παραφιλμ για αερισμό και αποτροπή της εξάτμισης και τοποθέτησή τους στον θάλαμο επώασης (21 ^oC-σκότος)
- Μετά από την παραμονή τους 4-5 ημέρες για να ισορροπήσει το σύστημα, έγιναν οι μετρήσεις της 0 ημέρας, ενώ μετά από 28 οι τελικές
- Εκχύλιση με 50 ml 2M KCl έπειτα από καλή ανάδευση του διαλύματος (1 h, 210 r.p.m.) με τη χρήση φίλτρων Whatman No. 42
- Προσδιορισμός των NO_3^- N (όπως περιγράφηκε παραπάνω) και των NH_4^+-N με το αντιδραστήριο Nessler, φωτομετρικά σε μήκος κύματος 425nm (Soil Sampling and Methods of Analysis, 2008)
- Ο καθαρός ρυθμός ανοργανοποίησης προσδιορίστηκε από τη διαφορά τελικού ανόργανου N (28 d) από τον αρχικό (1 d)

Απομόνωση DNA από το έδαφος

Για την διαδικασία της απομόνωσης ζυγίστηκαν 0,6g εδάφους και χρησιμοποιήθηκε το UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, USA) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε σε gel αγαρόζης.

Δημιουργία αντιγράφων του amoA γονιδίου των AOB και AOA

Με απλή αντίδραση PCR εντοπίστηκαν και δημιουργήθηκαν αντίγραφα του amoA από το απομονωμένο γενωμικό DNA. Στην αντίδραση της PCR για τα AOB και AOA χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ζευγάρια εκκινητών (primers):

amoA-1F/amoA-2R (5-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3/5- CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3) και amoA19F/amo643R (5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3/5-TCCCACTTWGACCARGCGGCCATCC A-3)

Το μέγεθος και η ποιότητα του προϊόντος της PCR ελέγχτηκε σε gel αγαρόζης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με 1 μl DNA, 1 U KAPA 2G Robust Hot Start Taq πολυμεράση (Kapa Biosystems), 250 nM εκκινητές, 10 nM κάθε dNTP, 1x PCR buffer (KAPA 2G Robust Hot Start; buffer A),και αποστειρωμένο νερό με τελικό όγκο αντίδρασης τα 25 μl. Το πρωτόκολλο των θερμοδυναμικών κύκλων το οποίο ακολουθήθηκε είναι: 3 min στους 95 ^{o}C, στην συνέχεια 35 κύκλοι : 30 s στους 95 ^{o}C, 35 s στους 57.5 ^{o}C (62 oC για τα AOA) and 5 s στους 72 oC, και τελικό στάδιο επιμήκυνσης για 10 min στους 72 ^{o}C. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή peqSTAR 96 Universal Gradient (PEQLAB Biotechnologie GmbH).

Κλωνοποίηση και αλληλούχηση

Αρχικά έγινε έκλουση των επιλεγμένων προϊόντων της αντίδραση PCR από το gel αγαρόζης. Έγινε εισαγωγή των amoA γονιδίων στον φορέα κλωνοποίησης pGEM-T Easy vector και χρησιμοποιήθηκαν τα E. coli JM109-competent cells (Promega).

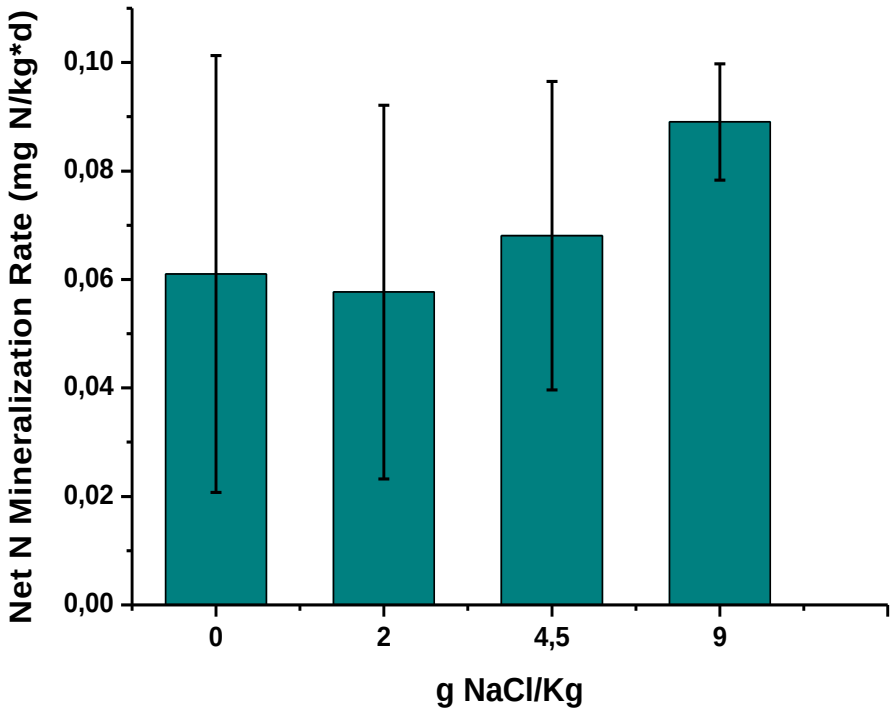
q PCR

Οι εκκινητές και το πρωτόκολλο της θερμικής αντίδρασης το οποίο περιγράφηκε προηγουμένως χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του amoA γονιδίου των αμμωνι-οξειδοτικών βακτηρίων (AOB) και αρχαίων (AOA). Η αντίδραση έγινε με φθορίζουσα SYBR Green και πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου

StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20 μl και χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) q-PCR Kit (KAPA Biosystems), 0.5 μM από κάθε εκκινητή, και 2 μl υποστρώματος (DNA εδάφους) που είχε αρχικά γίνει 1/10 αραίωση. Τα δεδομένα από κάθε κύκλο λήφθηκαν στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης (extension phase) το οποίο αντιστοιχούσε στους 81 ^{o}C για το βακτηριακό amoA και στους 76 ^{o}C για των αρχαίων. Όλες οι αντιδράσεις ακολουθήθηκαν από την κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve analysis) ώστε να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή Tm) των προϊόντων της αντίδρασης και στην προκειμένη, η θερμοκρασία ξεκίνησε από τους 60 ^{o}C και με αύξηση κατά 0.5 ^{o}C μέχρι τους 95 ^{o}C. Οι καμπύλες αναφοράς (Standard curves) για τα AOB και τα AOA κατασκευαστήκανε με διαδοχικές αραιώσεις 10^{3}-10^{8} του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου (pGEM-T, Promega) που είχε ενσωματώσει τα γονίδια amoA τα οποία είχαν ενισχυθεί από τα περιβαλλοντικά δείγματα. Στους αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς υπόστρωμα DNA) δεν ανιχνεύτηκε προϊόν και η μη επίδραση παρεμποδιστών κατά την αντίδραση εξασφαλίστηκε μέσω της αραίωσης 1/10 των εδαφικών δειγμάτων . Η efficiency ήταν 85% και 90% για τα AOB και AOA αντίστοιχα και οι τιμές του R^{2} κυμάνθηκαν μεταξύ 0.99 και 1.00.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Ανοργανοποίηση (Net N Mineralization)



Σχήμα 3.1: Η επίδραση της αυξημένης συσσώρευσης αλάτων στην διεργασία της ανοργανοποίησης του Ν πριν την προσθήκη 100 Kg N/ha

Η ανοργανοποίηση του Ν δεν φάνηκε να επηρεάστηκε από τις μεταχειρίσεις αλατότητας (*ANOVA* $P < 0.05$). Ανάλογα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση αλατότητας στο ρυθμό ανοργανοποίησης παρουσιάστηκαν από τους Elgharably et al. (2011). Όπως έχει αναφερθεί σε προγενέστερες έρευνες (Pathak and Rao, 1997), η ανοργανοποίηση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαλυτοποίησης της οργανικής ύλης και/ή της μεγαλύτερης αντοχής των μικροοοργανισμών που τη διεξάγουν στη συσσώρευση αλάτων από τους οξειδωτές NH_3. Κατά συνέπεια, ο ρυθμός ανοργανοποίησης του Ν δεν μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνος για τις

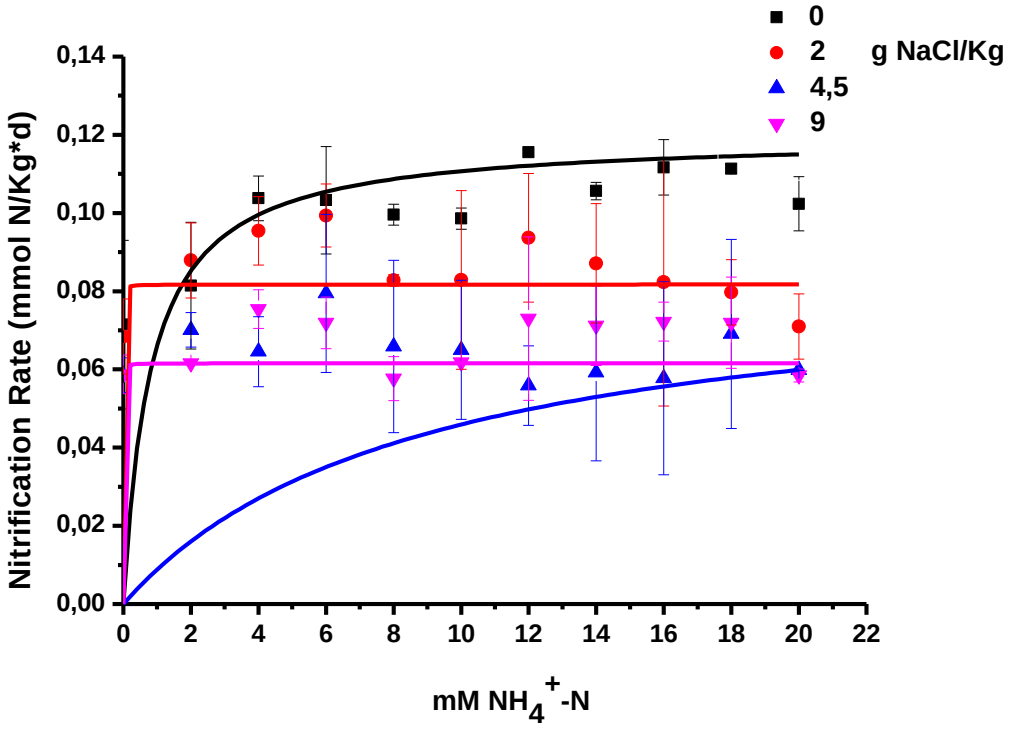
διαφορές στους πληθυσμούς των ΑΟ ή του ρυθμού νιτροποίησης που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεταχειρίσεων αλατότητας.

3.2 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR)

Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης μετρήθηκε 2 φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος, πριν και μετά την εφαρμογή των 100 kg N/ha. Ο PNR, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, αναφέρεται στο ρυθμό νιτροποίησης υπό ιδανικές συνθήκες (άφθονο υπόστρωμα και καλός αερισμός), και παρέχει πληροφορίες για την συγκέντρωση των προϊόντων σε σχέση με το χρόνο στο έδαφος ή σε μίγμα εδάφους.

Για την περιγραφή της κινητικής της νιτροποίησης επιλέχθηκε η εξίσωση των Michaelis–Menten ύστερα από αναδρομή στη σχετική βιβλιογραφία. Σε πείραμα των Stark και Firestone (1996), συγκρίθηκαν οι 2 εξισώσεις κινητικής των Michaelis–Menten και Haldane σε έδαφος αντίστοιχο με αυτό της εργασίας, προερχόμενο από μεσογειακού τύπου κλίμα. Ύστερα από την εφαρμογή των κινητικών μοντέλων στα αποτελέσματα της PNR μεθόδου, κατέληξαν στην πανομοιότυπη καταλληλότητά τους. Αυτό υποδεικνύει ότι η αναστολή του υποστρώματος δεν είναι σημαντική, με αποτέλεσμα η απλούστερη εξίσωση των Michaelis–Menten να μπορεί να περιγράψει την απόκριση των ρυθμών οξείδωσης των NH_4^+ σε σχέση με τις αλλαγές στο υπόστρωμα σε αυτά τα εδάφη. Άλλωστε η καταλληλότητα του μοντέλου επιβεβαιώθηκε από το υψηλό R^2 (Πίν. 3.1 και 3.2).

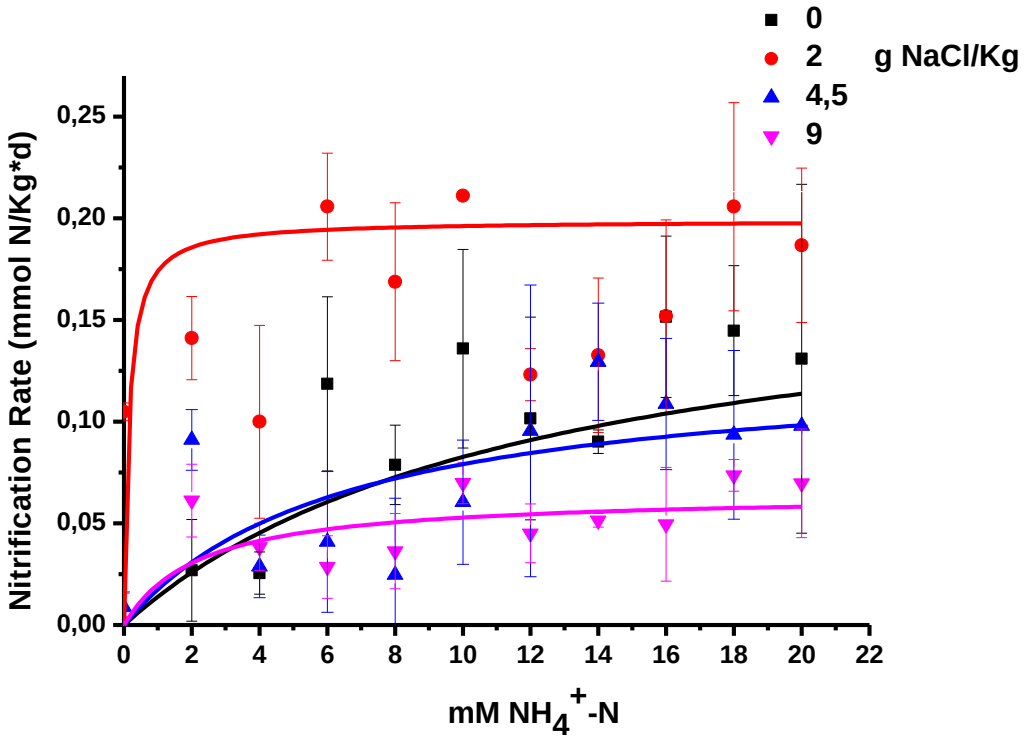
Το μοντέλο των Michaelis–Menten, μας παρέχει μια ενδεικτική εικόνα της επίδρασης της συγκέντρωσης NH_4^+ στο ρυθμό νιτροποίησης και κατ' επέκταση το μέγεθος της βιομάζας και ενεργότητας των οξειδωτών της NH_3. Στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν (Σχ. 3.2 και 3.3) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του μοντέλου στην προσομοίωση του PNR στους χειρισμούς αλατότητας (0, 2, 4.5, 9 g NaCl/kg) που διερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία, πριν και μετά την προσθήκη N. Επιπλέον, παρουσιάζονται και οι αντίστοιχοι πίνακες των κινητικών παραμέτρων (V_{max}, K_m) (Πίν. 3.1 και 3.2).



Σχήμα 3.2: Η προσαρμογή του κινητικού μοντέλου των Michaelis–Menten στα αποτελέσματα του δυναμικού ρυθμού νιτροποίησης (σημεία καμπυλών) πριν την εφαρμογή 100 Kg N/ha στους χειρισμούς αλατότητας (0, 2, 4.5, 9 g NaCl/kg)

Πίνακας 3.1: Κινητικές παράμετροι της οξείδωσης της NH_3 πριν την εφαρμογή 100 Kg N/ha στους χειρισμούς αλατότητας (0, 2, 4.5, 9 g NaCl/kg)

	A	B	C	D	E1	E2
1	Model	Hill				
2	Equation	y=Vmax*x^n/(k^n+x^n)				
3	Reduced Chi-Sqr					19,2314
4	Adj. R-Square					0,96723
5			Value	Standard Error		
6	0	Vmax	0,11965	0,00921		
7		k	0,80785	1,02411		
8		n	1	0		
9	2	Vmax	0,08171	0,01451		
10		k	0,00109	1,23093		
11		n	1	0		
12	4,5	Vmax	0,08605	0,0481		
13		k	8,74507	16,05817		
14		n	1	0		
15	9	Vmax	0,06156	3,58543E-4		
16		k	0,0012	0,01419		
17		n	1	0		



Σχήμα 3.3: Η προσαρμογή του κινητικού μοντέλου των Michaelis–Menten στα αποτελέσματα του δυναμικού ρυθμού νιτροποίησης (σημεία καμπυλών) μετά την εφαρμογή 100 Kg N/ha στους χειρισμούς αλατότητας (0, 2, 4.5, 9 g NaCl/kg)

Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι της οξείδωσης της NH_3 μετά την εφαρμογή 100 Kg N/ha στους χειρισμούς αλατότητας (0, 2, 4.5, 9 g NaCl/kg)

	A	B	C	D	E1	E2
1	Model	Hill				
2	Equation	y=Vmax*x^n/(k^n+x^n)				
3	Reduced Chi-Sqr					23,76846
4	Adj. R-Square					0,9688
5			Value	Standard Error		
6	0	Vmax	0,18263	0,30852		
7		k	12,11119	41,63069		
8		n	1	0		
9	2	Vmax	0,19897	0,02845		
10		k	0,14257	1,41306		
11		n	1	0		
12	4,5	Vmax	0,12966	0,08502		
13		k	6,39597	17,29969		
14		n	1	0		
15	9	Vmax	0,0647	0,04448		
16		k	2,24747	9,5486		
17		n	1	0		

Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων στο PNR με τον μάρτυρα (0 g NaCl/kg) να παρουσιάζει το υψηλότερο V_{max} , ενώ παρατηρήθηκε μία μείωση του ρυθμού με την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων. Στατιστική ανάλυση *ANOVA* μεταξύ των χειρισμών επιβεβαίωσε τη σημαντική διαφορά των μέσων τους, σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$, με μοναδική εξαίρεση το V_{max} μεταξύ των 4,5 και 9 g NaCl/kg.

Μετά από την προσθήκη των 100 Kg N/ha, σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στο PNR ιδιαίτερα στο χειρισμό των 2 g NaCl/kg (Σχ. 3.2). Οι λόγοι που οδήγησαν στην επίδραση αυτή δεν μπορούν στην πραγματικότητα να εξηγηθούν. Αν αγνοήσουμε την μεταχείριση αυτή διαπιστώνουμε ότι η προσθήκη NH_4^+-N είχε και στους χειρισμούς 0 και 4,5 g NaCl/kg ως κάποιο βαθμό κάποια επίδραση στο PNR. Το αποτέλεσμα δεν θεωρείται παράξενο, αν λάβουμε υπόψη ότι το έδαφος που διερευνήθηκε δέχεται υψηλά φορτία ανόργανης λίπανσης για πολλά έτη. Ανάλογα σε εδάφη που καλύπτονταν με χλοοτάπητα, η προσθήκη N δεν είχε σημαντική επίδραση στο PNR (Shi et al., 2006).

Όσον αφορά την επίδραση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων NH_4^+-N που εφαρμόστηκαν, δεν φάνηκαν να δρουν παρεμποδιστικά στο ρυθμό νιτροποίησης, καθώς οι καμπύλες δεν παρουσίασαν κάποια πτωτική τάση όπως έχει αναφερθεί σε προγενέστερες εργασίες (Shammas et al., 2009, Koper et al., 2010, Bergethon and Hallock., 2011). Αντιθέτως εξάγεται το συμπέρασμα, που συμφωνεί και με τον ισχυρισμό των Bhupinderpal-Singh et al. (1992), ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις NH_4^+-N, η νιτροποίηση διεξάγεται πιο γρήγορα και ολοκληρωμένα. Η σύσταση του εδάφους παίζει και αυτή το ρόλο της, αφού όπως αναφέρεται από τους Stark and Firestone (1996), εδάφη με υψηλά ποσοστά ιλύος εμφανίζουν χαμηλότερη παρεμπόδιση στην οξείδωση των NO_3^- από τις υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+.

3.3 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτηρία (AOB) και αρχαία (AOA)

Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από την q-PCR για το γονίδιο που κωδικοποιεί την μονοξυγενάση της αμμωνίας (*amoA)* των βακτηρίων και των αρχαίων αναδεικνύουν μια παρόμοια απόκριση κατά τη διάρκεια της μελέτης, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των πληθυσμών των amoA στις μεταχειρίσεις που δέχτηκαν επίδραση αλάτων (Σχ. 3.4 και 3.5). Η απόκριση αυτή πιθανόν αποτελεί μηχανισμό προσαρμογής των οξειδωτών NH_3 στην αύξηση της αλατότητας. Έτσι, συγκρίνοντας το μάρτυρα με τους υπόλοιπους χειρισμούς φαίνεται, πως η επαγωγή του πληθυσμού με την αύξηση της αλατότητας αντισταθμίζει το οσμωτικό στρες/ιοντικό στρες. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με τα ευρήματα των Wong et al. (2008) και Muhammad et al. (2008), οι οποίοι διαπίστωσαν αύξηση της μικροβιακής βιομάζας σε χειρισμό εδάφους με αυξημένη αλατότητα.

Η προσθήκη NH_4^+-N επηρέασε τους πληθυσμούς των αμμωνι-οξειδωτών κυρίως του μάρτυρα όπου και οδήγησε στην αύξηση του (Πιν. 3.3). Εντούτοις, οι υπόλοιποι χειρισμοί δεν έδειξαν ανάλογη απόκριση (Σχ. 3.4 και 3.5). Εν αντιθέσει με πλείστες έρευνες που υποστηρίζουν και αποδεικνύουν την αύξηση της μικροβιακής κοινότητας ύστερα από λίπανση N (Wichern et al., 2006, Rietz and Haynes, 2003, Sardinha et al., 2003), το παρών πείραμα δεν καταλήγει στα ίδια αποτελέσματα. Έχει εκφραστεί η άποψη για αλληλεπίδραση μεταξύ NH_4^+ και συγκεντρώσεων αλάτων, όπου υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+ αυξάνουν την ευαισθησία των οξειδωτών NH_3 στην υψηλή αλατότητα (Low et al., 1997). Επίσης, σε αντίστοιχο πείραμα των Koper et al. (2010) με αυτό της παρούσας μελέτης, ενώ ο πληθυσμός αυξήθηκε αριθμητικά, δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους οι σταθερές K_m των χειρισμών.

Από την άλλη πλευρά, ο μειωμένος ρυθμός νιτροποίησης δεν συμφωνεί με την διαφορά του μεγέθους του μικροβιακού πληθυσμού (Σχ.3.2, 3.3, 3.4, 3.5). Η κινητική παράμετρος K_m θα μπορούσε να αποτελέσει έναν δείκτη διαφοροποίησης πληθυσμών μεταξύ AOB και AOA σε ποικίλους τύπους υποστρωμάτων. Καθώς τα K_m των χειρισμών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ

τους, καταλήγουμε στο ότι, έπειτα από τους χειρισμούς αλατότητας και λίπανσης στο αρχικό έδαφος, είχαμε μια διαφοροποίηση των πληθυσμών.

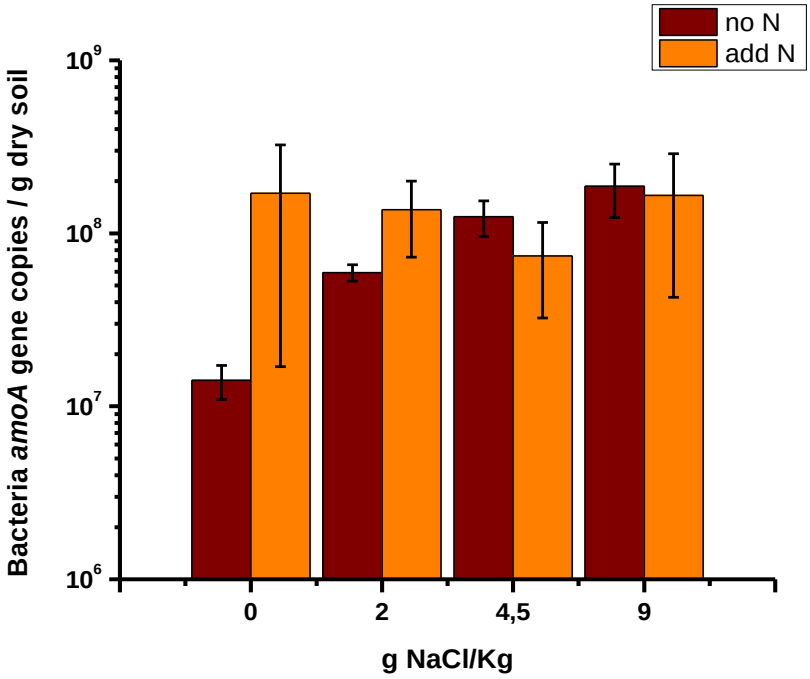
Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές K_m για τους χειρισμούς 2 και 9 g NaCl/kg είναι πολύ χαμηλότερες από οποιεσδήποτε άλλες στην σχετική βιβλιογραφία (Πιν. 3.1). Τέτοιες τιμές έχουν μόνο αναφερθεί για πληθυσμούς οξείδωσης των NH_4^+ σε ωκεανούς. Με το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα είχαν έρθει αντιμέτωποι και οι Stark and Firestone (1996), και κατέληξαν στο ότι είναι ένας από τους λόγους γιατί η κινητική σταθερά υποστρώματος (K_m) δεν αντιπροσωπεύει τον μικροβιακό πληθυσμό για το συγκεκριμένο έδαφος που ερευνούσαν. Βέβαια, έχουν βρεθεί επανειλημμένως, αλληλουχίες από AOB των υδρόβιων περιβαλλόντων να κυριαρχούν σε εδάφη (Fierer et al., 2009). Γεγονός είναι πάντως, ότι από πολλές έρευνες που έχουν εφαρμόσει γονιδιακές μεθόδους ταυτοποίησης πληθυσμών, τα K_m των AOB και AOA κυμαίνονται σε ευρεία όρια τιμών. Για παράδειγμα στελέχη του είδους *Nitrosomonas europaea* παρουσιάζουν K_m μεταξύ 420-750 μM NH_4^+, ενώ τα Nitrosospira strains 40K1, AF, B6, L115 208-380 μM NH_4^+(Koper et al., 2010). Με βάση τα παραπάνω, τα K_m του κινητικού μοντέλου (Πίν. 3.1, 3.2) κινούνται σε λογικά πλαίσια.

Σημαντικές στατιστικές διαφορές παρουσιάστηκαν πριν την εφαρμογή του N. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη σύγκριση βακτηρίων και αρχαίων ο μάρτυρας διέφερε από τη μέτρια και υψηλή αλατότητα (4,5 και 9 g NaCl/kg,), ενώ στα αρχαία, η σύγκριση των χειρισμών αλατότητας, έδωσε στατιστική διαφορά μόνο μεταξύ του 0 και του 9 g NaCl/kg. Όλοι οι υπόλοιποi συνδυασμοί δεν έδωσαν διαφορές παρόλο των αριθμητικών αποκλίσεων τους.

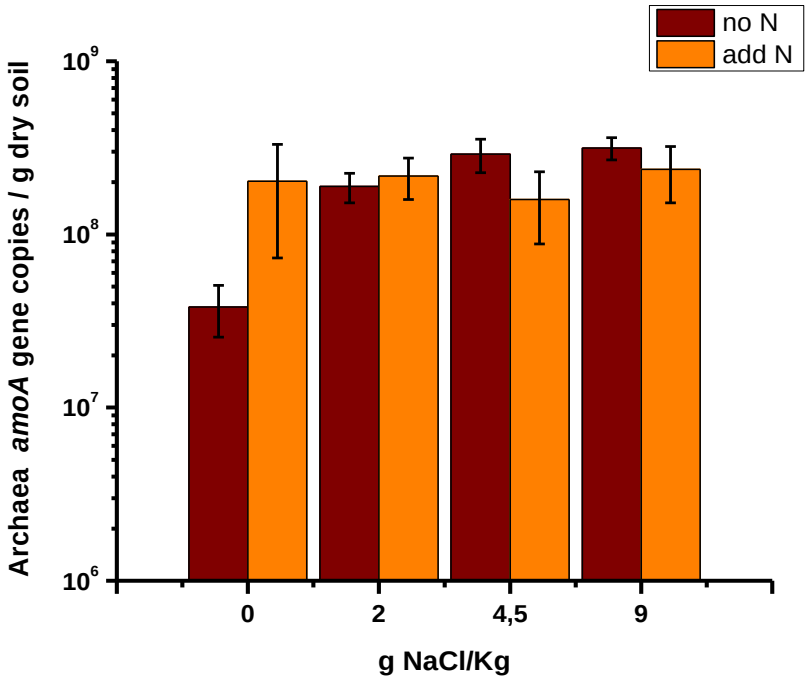
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η απόκριση αυτή του πληθυσμού των αρχαίων στα επιπλέοντα NH_4^+, αποτελεί ξεκάθαρη ένδειξη της συμμετοχής τους και της συμβολής τους στην οξείδωση της NH_3 (Norton and Stark, 2011). Παράλληλα παρατηρήθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός αρχαίων από τα βακτήρια πράγμα που συμφωνεί και με τους Leininger et al. (2006), οι οποίοι έδειξαν ότι τα AOA βρίσκονται σε μεγαλύτερους πληθυσμούς στο έδαφος από τα AOB.

Πίνακας 3.3: Ποσοτικοποίηση του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA εκφρασμένο σε copies/g soil.

Treatments (g NaCl/kg)	**No N**	**Add N**
	copies/g soil	
0	3,29E+08	3,61E+08
2	5,05E+08	4,55E+08
4,5	2,91E+08	1,59E+08
9	3,16E+08	2,37E+08



Σχήμα 3.4: Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των βακτηρίων ανά g ξηρού εδάφους στους χειρισμούς πριν και μετά την προσθήκη 100 Kg N/ha, εκφρασμένο σε λογαριθμική κλίμακα.



Σχήμα 3.5: Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των αρχαίων ανά g ξηρού εδάφους στους χειρισμούς πριν και μετά την προσθήκη 100 Kg N/ha, εκφρασμένο σε λογαριθμική κλίμακα.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Καταλήγοντας λοιπόν, η συσσώρευση αλάτων στον βιογεωχημικό κύκλο του N είχε αρνητικές επιπτώσεις στο PNR, ενώ η ανοργανοποίηση του N δεν επηρεάστηκε στα πλαίσια πάντα των χειρισμών της μελέτης. Η προσθήκη του N που εφαρμόστηκε κατά το δεύτερο σκέλος του πειράματος, φάνηκε να μην μπορεί να αναιρέσει από ένα σημείο και μετά την επίδραση της αλατότητας, με εξαίρεση τον χειρισμό της χαμηλής αλατότητας (2 g NaCl/Kg).

Όσον αφορά στον πληθυσμό των οξειδωτών NH_3, η επαγωγή του πληθυσμού τους με την αύξηση της αλατότητας φάνηκε να αντισταθμίζει το οσμωτικό και/ή ιοντικό στρες. Ο μηχανισμός αυτός προσαρμογής, πιθανών παίρνει τη μορφή της αλλαγής της δομής μικροβιακής κοινότητας. Οι μικροοργανισμοί κατανέμονται σε όλη την κλίμακα μεταξύ των ολιγοτροφικών κοινοτήτων που συναντώνται σε ωκεανούς και των άφθονων κοινοτήτων των λυμάτων. Επιπροσθέτως, επιβεβαιώθηκε και η συμβολή των αρχαίων στην οξείδωση των NH_4 αλλά και ο υψηλός πληθυσμός τους.

Η ακριβής επίδραση βέβαια της αλατότητας του εδάφους στο μικροβιακό πληθυσμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αφού μέχρι και σήμερα δεν είναι απολύτως κατανοητή. Είναι εμφανές λοιπόν, ότι το επόμενο βήμα για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης είναι να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί και οι μεταβολικές οδοί τους. Έτσι, θα διαφωτιστούν οι μεταβολές που μπορεί να λαμβάνουν χώρα στις παραπάνω διεργασίες στα πλαίσια των παρεμποδιστικών παραμέτρων που έχουν τεθεί.

.

Βιβλιογραφία

Abbasi, K.M., Hina, M., Tahir, M.M. (2011). Effect of *Azadirachta indica* (neem), sodium thiosulphate and calcium chloride on changes in nitrogen transformations and inhibition of nitrification in soil incubated under laboratory conditions. Chemosphere 82, 1629-1635.

Bergethon, P.R. and Hallock, K. (2011). The Physical Basis of Biochemistry. Springer Science. pp. 670-710.

Blainey P.C., Mosier A.C., Potanina A., Francis C.A., Quake S.R. (2011). "Genome of a Low-Salinity Ammonia-Oxidizing Archaeon Determined by Single-Cell and Metagenomic Analysis". PLoS ONE 6(2): e16626. doi:10.1371/journal.pone.0016626.

Bouyoucos, G.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle and size analysis of soils. Agron. J. 54, 464-465.

Brady, N.C., and Weil, R.R. (2008). The nature and properties of soils. Fourteenth Edition (revised), Pearson Education Inc., New Jersey, USA.

Chen, D., Suter, H.C., Islam, A., Edis, R. (2010). Influence of nitrification inhibitors on nitrification and nitrous oxide (N2O) emission from a clay loam soil fertilized with urea. Soil Biology & Biochemistry 42, 660-664.

Chowdhury, N., Marschner, P., Burns, R.G. (2011). Soil microbial activity and community composition: impact of changes in matric and osmotic potential. Soil Biology & Biochemistry 43, 1229-1236.

Chung, H., Zak, D.R., Reich, P.B., Ellsworth, D.S. (2007). Plant Species Richness, Elevated CO2, and Atmospheric N Deposition Alter Soil Microbial Community Composition and Function. Global Change Biology Vol 13, 980-989.

De Boer, W. and Kowalchuk, G.A. (2001). Nitrification in acid soils: microorganisms and mechanisms. Soil Biology & Biochemistry 33, 853–866.

Dendooven, L., Alcántara-Hernández, R.J., Valenzuela-Encinas, C., Luna-Guido, M., Perez-Guevara, F., Marsch, R. (2010). Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: A review. Soil Biology & Biochemistry 42, 865-877.

De Neve, S. and Hofman, G. (2002). Quantifying soil water effects on nitrogen mineralization from soil organic matter and from fresh crop residues. Biol Fertil Soils 35, 379–386.

DIS4ME, Σύστημα Δεικτών Ερημοποίησης για την Μεσογειακή Ευρώπη. Διαθέσιμο στον διαδικτυακό τόπο: http://www.unibas.it/desertnet/dis4me/indicators_list_gr.htm

Djigal, D., Brauman, A., Diop, T.A., Chotte, J. L., Villenave, C. (2004). Influence of bacterial-feeding nematodes (Cephalobidae) on soil microbial communities during maize growth. Soil Biology & Biochemistry 36, 323–331.

Ferris, H. (1998). The Role of Nematodes in Soil Fertility, University of California.

Gadir, M. and Shubert, S. (2002). Degradation Processes and Nutrient Constraints in Sodic Soils. Land Degradation & Development. Institute of Plant Nutrition, 13, 275–294.

Ghollarata, M. and Raiesi, F. (2007). The adverse effects of soil salinization on the growth of Trifolium alexandrinum L. and associated microbial and biochemical properties in a soil from Iran. Soil Biology & Biochemistry 39, 1699–1702.

Griffiths, B.C. (1994). Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: Their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizophere. Plant and Soil 164, 25-33.

Guntiñas, M.E., Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. (2012). Effects of moisture and temperature on net soil nitrogen mineralization: A laboratory study. European Journal of Soil Biology 48, 73-80.

Hart, S.C., Stark, J.M., Davidson, E.A., and Firestone, M.K. (1994). Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In “Methods of Soil Analysis. Part 2, Microbiological and Biochemical Properties,” (R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomly, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum, eds.), pp. 985–1018. Soil Science Society America, Madison, WI.

Hwang, S. and Hanaki, K. (2000). Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. Bioresource Technology 71, 159-165.

Islam, A., Chen, D., White, R.E. (2007). Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. Soil Biol. Biochem. 39, 972–975.

Khalil,K., Mary, B., Renault, P. (2004). Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O2 concentration. Soil Biology & Biochemistry 36, 687–699.

Koper, T.E., Stark, J.M., Habteselassie, M.Y., Norton, J.M. (2010). Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost. FEMS Microbiol Ecol 74, 316–322.

Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., De Boer, W., Peter G.L. Klinkhamer, P.G.L., Van Veen, J.A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 509–520.

Krave, A.S., Van Straalen, N.M., Van Verseveld, H.W. (2002). Potential nitrification and factors influencing nitrification in pine forest and agricultural soils in Central Java, Indonesia. Pedobiologia 46, 573–594.

Lakhdar, A., Rabhi, M., Ghnaya,T., Montemurro, F., Jedidi, N., Abdelly., C. (2009). Effectiveness of compost use in salt-affected soil, Journal of Hazardous Materials 171, 29–37.

Laverman, A.M., Zoomer, H.R., Van Verseveld, H.W., Verhoef, H.A. (2000).Temporal and spatial variation of nitrogen transformations in a coniferous forest soil. Soil Biology & Biochemistry 32, 1661-1670.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–809.

Low, P.A., Stark, J.M., Dudley, L.M. (1997). Effects of soil osmotic potential on nitrification, ammonification, N-assimilation and nitrous oxide production. Soil Science Vol 162.

Malchair, S., De Boeck, H.J., Lemmens, C.M.H.M., Merckx, R., Nijs, I., Ceulemans, R., Carnol, M. (2010a). Do climate warming and plant species richness affect potential nitrification, basal respiration and ammonia-oxidizing bacteria in experimental grasslands? Soil Biology & Biochemistry 42, 1944-1951.

Malchair, S., De Boeck, H.J., Lemmens, C.M.H.M., Merckx, R., Nijs, I., Ceulemans, R., Carnol, M. (2010b). Diversity–function relationship of ammonia-oxidizing bacteria in soils among functional groups of grassland species under climate warming. Applied Soil Ecology 44, 15–23.

Muhammad, S., Müller, T., Joergensen, R.G. (2008). Relationships between soil biological and other soil properties in saline and alkaline arable soils from the Pakistani Punjab. Journal of Arid Environments 72, 448–457.

Norton, J.M., and Stark, J.M. (2011), Regulation and measurement of nitrification in terrestrial systems. Methods in Enzymology. Vol. 486, pp. 343-368.

Pathak, H. and Rao, D.L.N. (1998). Carbon and Nitrogen Mineralization from Added Organic Matter in Saline and Alkali Soils. Soil Biol. Biochem. Vol. 30, No. 6, pp. 695-702.

Pennington, P.I. and Ellis, R.C. (1993). Autotrophic and heterotrophic nitrification in acidic forest and native grassland soils. Soil Biology & Biochemistry 25, 1399-1408.

Prosser, J.I. (2011). Soil nitrifiers and nitrification. Nitrification. Washington, DC: ASM press,. 347-383.

Raun, W.R. and Johnson, G.V., (1999). Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agron. J. 91, 357–363.

Rietz, D.N. and Haynes, R.J. (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biology & Biochemistry 35, 845–854.

Robertson, G.P. (1989). Nitrification and denitrification in humid tropical ecosystems. *In* "Mineral Nutrients in Tropical Forest and Savanna Ecosystems" (J. Proctor, ed.), pp. 55–70. Blackwell Sci., Cambridge, UK.

Robertson, G.P. and Groffman, P.M. (2007). Nitrogen Transformations. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry, 3rd edition. Oxford, UK: Elsevier Inc., 341-364.

Rousk, J., Elyaagubi, F.K., Jones, D.L., Douglas L. Godbold, D.L. (2011). Bacterial salt tolerance is unrelated to soil salinity across an arid agroecosystem salinity gradient. Soil Biology & Biochemistry 43, 1881-1887.

Shammas, N.K., Liu, Y., Wang, L.K. (2009). Handbook of Environmental Engineering. Humana Press, N.Y. pp. 1-6.

Sardinha, M., Müller, T., Schmeisky, H., Joergensen, R.G. (2003). Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. Appl. Soil Ecol. 23, 237–244.

Setia, R., Smith, P., Marschner, P., Baldock, J., Chittleborough, D., Smith, J. (2011). Introducing a Decomposition Rate Modifier in the Rothamsted Carbon Model to Predict Soil Organic Carbon Stocks in Saline Soils. Environ. Sci. Technol. 45, 6396–6403.

Shi, W., Muruganandama, S., Bowman, D. (2006). Soil microbial biomass and nitrogen dynamics in a turfgrass chronosequence: A short-term response to turfgrass clipping addition Soil Biology & Biochemistry 38, 2032–2042.

Sierra, J. (1997). Temperature and Soil Moisture Dependence of N Mineralization in Intact Soil Cores. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 29, No. 9/10, pp. 1557-1563.

Singh, B., Singh, B., Singh, Y. (1993). Potential and Kinetics of Nitrification in Soils from Semiarid Regions of Northwestern India. Arid Soil Research and Rehabilitation, Volume 7, pp. 39-50.

Smits, N.A.C,. Hefting, M.M., Kamst-van Agterveld , M.P., Laanbroek, H.J., Paalman, A.J., Bobbink, R. (2010). Nitrification along a grassland gradient: Inhibition found in matgrass swards. Soil Biology & Biochemistry 42, 635-641.

Stark, J.M. and Firestone, M.K. (1995). Mechanisms for soil-moisture effects on activity of nitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol.61, pp. 218–221.

Stark, J.M. and Firestone, M.K. (1996). Kinetic Characteristics of Ammonium-Oxidizer Communities in a California Oak Woodland-Annual Grassland. Soil BioL Biochem. Vol. 28, No. I0/lI, pp. 1307-1317.

Tòth, G., Montanarella, L., Rusco, E. (2008). Updated Map of Salt Affected Soils in the European Union Threats to Soil Quality in Europe, European Communities, pp. 61–74.

Tripathi, S., Kumari, S., Chakraborty, A., Gupta, A., Chakrabarti, K., Bandyapadhyay, B.K. (2006). Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. Biology and Fertility of Soils 42, 273–277.

Van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. Appl. Soil Ecol. 15, 13–24.

Verchot, L.V., Holmes, Z., Mulon, L., Groffman, P. M., Lovett, G. M. (2001). Gross vs net rates of N mineralization and nitrification as indicators of functional differences between forest types. . Soil Biology & Biochemistry 33, 1889-1901.

Visser, S., Griffiths, C.L., Parkinson, D. (1983). Effects of surface mining on the microbiology of a prairie site in Alberta, Canada. Canadian Journal of Soil Science 63, 177–189.

Wichern, J., Wichern, F., Joergensen, R.G. (2006). Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. Geoderma 137, 100–108.

Wong, V.N.L., Dalal, R.C., Greene, R.S.B. (2008). Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. Boil Fertil Soils, 44,943-953.

Wong, V.N. L., Dalal, R.C., Greene, R.S.B. (2009), Carbon dynamics of sodic and saline soils, following gypsum and organic material additions: A laboratory incubation. Applied Soil Ecology 41,29-40.

Xiao, H., Griffiths, B., Chen, X., Liu, M., Jiao, J., Hu, F., Li, H. (2010). Influence of bacterial-feeding nematodes on nitrification and the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community composition. Applied Soil Ecology 45, 131–137.

Yuan, B., Xu, X., Li, Z., Gao, T., Gao, M., Fan, X., Deng, J. (2007). Microbial biomass and activity in alkalized magnesic soils under arid conditions. Soil Biology & Biochemistry 33, 3004–3013.

Zhang, J., Cai, Z., Zhu, T. (2011). N_2O production pathways in the subtropical acid forest soils in China. Environmental Research 111, 643–649.

Zhang, K., Xu, X. N. and Wang, Q. (2010). Characteristics of N mineralization in urban soils of Hefei, East China. Pedosphere. 20(2), 236–244.

Καλλιανού, Χ. (2005). Σημειώσεις γενικής εδαφολογίας ΙΙ, Εκδ. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, Κ.Α. (2003). Μεταβολισμός του Αζώτου. Φυσιολογία Φυτών. Ηράκλειο, Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 259-308.