



Πολυτεχνείο Κρήτης
Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής

**Διερεύνηση της Σχέσης Καθαρού και Ολικού ρυθμού Νιτροποίησης σε Εδάφη με
Μεγάλη Περιεκτικότητα Αργίλου**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βαγιάκης Ιωάννης

Επιβλέπων: Παρανυχιανάκης Νικόλαος

Χανιά Απρίλιος 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο, για την παρακολούθηση, την άριστη συνεργασία και τον πολύτιμο χρόνο που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της εργασίας και κυρίως γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και επίκαιρο θέμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Καθ. κ. Βενιέρη Δ. και τον Καθ. κ. Καλογεράκη Ν. για τη συμμετοχή, την ανάγνωση, αλλά και την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στους Υποψήφιους Διδάκτορες κ. Τσικνιά Μ. και κ. Γιαννάκη Γ. για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και τους φίλους μου Τηλέμαχο, Σπύρο, Γιάννη και Τέο.

Τέλος, η παρούσα συγγραφική προσπάθεια αφιερώνεται στην οικογένειά μου, για την υπομονή και την αμέριστη συμπαράστασή τους σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία διερευνά τις διαφορές ανάμεσα στον καθαρό και τον ολικό ρυθμό νιτροποίησης σε έδαφος με υψηλή περιεκτικότητα αργίλου. Στο έδαφος εφαρμόστηκαν 4 μεταχειρίσεις 0, 25, 50, και 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, ενώ προς το τέλος του πειράματος στις ομάδες που δέχονταν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 25 mg/kg και 100 mg/kg προστέθηκε γλυκόζη συγκέντρωσης 0,1 M προκειμένου να δούμε την αντίδραση των μικροοργανισμών στο επιπλέον υπόστρωμα. Για την μέτρηση του καθαρού ρυθμού νιτροποίησης χρησιμοποιήθηκε ο παρεμποδιστής νιτροποίησης Δικυανοδιαμίδα (DCD). Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι η σωστή χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης οδηγεί σε μια αναστολή της νιτροποίησης με συνέπεια τη συσσώρευση ιόντων αμμωνίου στο έδαφος, καθιστώντας τους ένα σημαντικό εργαλείο ως προς τον έλεγχο της ρύπανσης από αζωτούχα λιπάσματα. Διαπιστώθηκε επίσης η ανταγωνιστική δράση που είχε το $\text{NH}_4^+\text{-N}$ όταν εφαρμόστηκε μαζί με τη γλυκόζη, ενώ η διαφορά ανάμεσα στον καθαρό και το συνολικό ρυθμό νιτροποίησης στις περισσότερες μετρήσεις κυμάνθηκε σε πολύ μικρά επίπεδα. Εμφανής ήταν η περαιτέρω ανάσχεση του ρυθμού νιτροποίησης στην αύξηση της εφαρμοζόμενης ποσότητας παρεμποδιστή, με αποτέλεσμα τις αυξημένες συγκεντρώσεις αμμωνίου και την μείωση των συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων σε σύγκριση με τα εδάφη χωρίς προσθήκη DCD. Βασικό ρόλο διαδραματίζουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν όταν γίνεται εφαρμογή παρεμποδιστή, καθώς η θερμοκρασία και η υγρασία υποβοηθούν ή ανακόπτουν την δράση του.

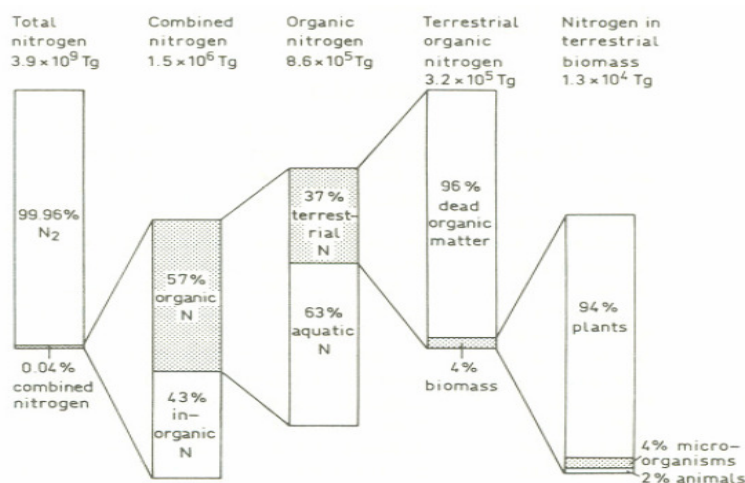
ΕΝΟΤΗΤΑ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του Αζώτου (N)	8
1.2 Διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι του N στο έδαφος	10
1.3 Ανοργανοποίηση/Ακίνητοποίηση.....	11
1.4 Νιτροποίηση	13
1.4.1 Νιτροποίηση από αυτότροφους μικροοργανισμούς.....	14
1.4.2 Νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς	15
1.4.3 Anammox	16
1.5 Περιβαλλοντικοί παράγοντες οι επηρεάζουν την νιτροποίηση.....	16
1.5.1 Υπόστρωμα.....	17
1.5.2 Επίδραση του αερισμού.....	17
1.5.3. Επίδραση της εδαφικής υγρασίας	18
1.5.4 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	18
1.5.5 Επίδραση του pH	19
1.6 Απονιτροποίηση.....	20
1.6.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση.....	20
1.7 Εξάτμιση NH_3	21
1.8 Παρεμπόδιση της νιτροποίησης.....	22
1.8.1 Γενικά	22
1.8.2. Ενώσεις με παρεμποδιστική δράση	23
1.8.3 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της νιτροποίησης	25
1.8.4 Κατάλληλη μέθοδος μέτρησης νιτροποίησης.....	27
1.8.5 Καθαρός και πραγματικός ρυθμός νιτροποίησης	27
1.9 Στόχος – Σκοπός της εργασίας	29
ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	30
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός	31
2.2 Πρωτόκολλα Μετρήσεων.....	32
ΕΝΟΤΗΤΑ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34

3.1 Συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ συναρτήσει του χρόνου.....	35
3.2 Συγκέντρωση $\text{NO}_3^-\text{-N}$ συναρτήσει του χρόνου	36
3.3 Καθαρός Ρυθμός Νιτροποίησης	37
3.4 Ολικός Ρυθμός Νιτροποίησης	38
3.5 Ολικός Ρυθμός Ανοργανοποίησης.....	39
3.6 Σύγκριση Καθαρής και Συνολικής Νιτροποίησης.....	40
ΕΝΟΤΗΤΑ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
4.1 Παρεμποδιστές νιτροποίησης.....	43
4.2 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ και $\text{NH}_4^+\text{-N}$ του εδάφους	44
ΕΝΟΤΗΤΑ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45
ΕΝΟΤΗΤΑ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του Αζώτου (N)

Το N είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία στην φύση, το οποίο ελέγχει τον κύκλο του οργανικού υλικού στην βιόσφαιρα. Η συγκέντρωση και η διαθεσιμότητα των οργανικών και ανόργανων ενώσεων του N συνδέεται άμεσα με την παρουσία, ανάπτυξη και παραγωγικότητα όλων των οργανισμών σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα (Knicker, 2011). Παρ' όλο που το N αποτελεί το 78% κατ' όγκο της ατμόσφαιρας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από του οργανισμούς για την ικανοποίηση των αναγκών τους σε N. Σημαντικό μέρος των διεργασιών μετασχηματισμού στις διάφορες μορφές του πραγματοποιείται στο έδαφος. Έτσι ξεκινάει το πρώτο στάδιο του κύκλου του N που περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό του αερίου N σε μία διαθέσιμη για τους μικροοργανισμούς μορφή με μία από τις παρακάτω διαδικασίες (Χατζημπίρος, 2001).



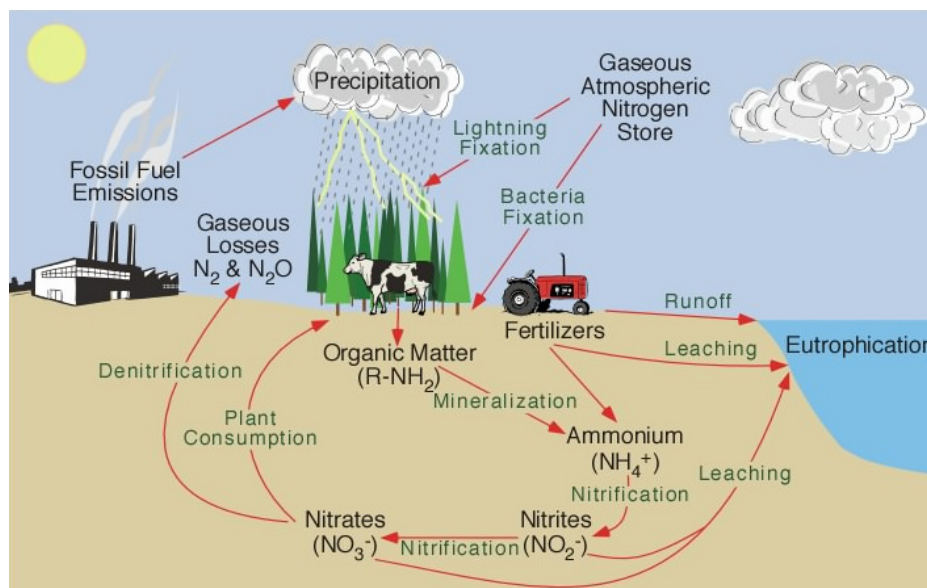
Εικόνα 1.1: Κατανομή του αζώτου στην βιόσφαιρα (Rosswall, 1979a)

Οι διαδικασίες που καθιστούν το N διαθέσιμο είναι:

- ❖ Η δέσμευση του N της ατμόσφαιρας (N fixation) από μικροοργανισμούς (ανήκουν στο γένος *Rhizobium* spp) που συμβιώνουν στις ρίζες των ψυχανθών (leguminosae) σχηματίζοντας τα φυμάτια.
- ❖ Η δέσμευση N από μη συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν ελεύθεροι στο έδαφος και τα νερά (αερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium* και μερικά κυανοφύκη, της οικογένειας *Nostocaceae*)
- ❖ Η μετατροπή του N σε οξείδια, από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις της ατμόσφαιρας και η μεταφορά αυτών στο έδαφος μέσω της βροχής κυρίως υπό την μορφή NO_3-N .

- ❖ Η βιομηχανική δέσμευση υπό μορφή NO_2 , CN , NH_3 , κατά την παρασκευή Ν-λιπασμάτων Haber Bosch.

Διαμορφώνεται λοιπόν ένας βιογεωχημικός κύκλος Ν στο οικοσύστημα (Εικ. 1.2) με αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ ατμόσφαιρας – εδάφους – οργανισμών (Ρουμπελάκη – Αγγελάκη, 2003).



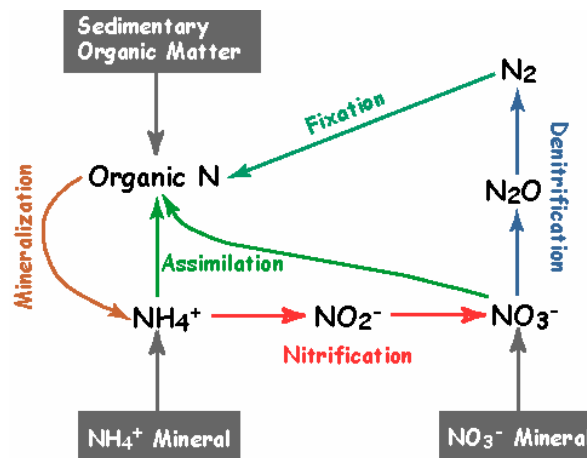
Εικόνα 1.2:Συνοπτική παρουσίαση του βιογεωχημικού κύκλου του Ν σε χερσαία οικοσυστήματα.
(<http://www.physicalgeography.net>)

Το 98% περίπου του εδαφικού Ν βρίσκεται ενσωματωμένο σε οργανικές ενώσεις, κυρίως υπό αμινική μορφή ($\text{NH}_2\text{-N}$). Σήμερα πολλές είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν τόσο την άμεση δέσμευση τέτοιων ενώσεων από το φυτό (Neff et al., 2003), ως πηγή Ν για την θρέψη του, όσο και την έμμεση δέσμευση μέσω των μυκόρριζων που αναπτύσσουν (Finlay et al., 1992; Turnbull et al., 1995). Το ανόργανο Ν αποτελεί περίπου το 2% του εδαφικού Ν. Οι κυριότερες ανόργανες μορφές είναι η αμμωνιακή ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), η νιτρική ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) και υπό ορισμένες συνθήκες η νιτρώδη ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) μορφή. Οι κυριότερες διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι και τη διαθεσιμότητα Ν στο έδαφος συνοψίζονται στις παρακάτω:

- ✚ Ανοργανοποίηση (Mineralization)
- ✚ Ακίνητοποίηση (Immobilization)
- ✚ Νιτροποίηση (Nitrification)
- ✚ Απονιτροποίηση (Denitrification)
- ✚ Εξαέρωση (Volatilization)
- ✚ Προσρόφηση (Sorption)

1.2 Διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι του N στο έδαφος

Η απεριόριστη προμήθεια ατμοσφαιρικού N βρίσκεται σε ισορροπία με τις διάφορες δεσμευμένες μορφές του εδάφους. Τα μόρια του N δεσμεύονται, με τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω ενώ επίσης τα λιπάσματα και η αποδήμηση οργανικού υλικού μέσω διεργασιών ελεγχόμενων κυρίως από μικροοργανισμούς απελευθερώνουν N στην ατμόσφαιρα. Ο κύκλος του N στο σύστημα έδαφος-φυτό-ατμόσφαιρα περιλαμβάνει πολλές μετατροπές αυτού μεταξύ ανόργανης και οργανικής μορφής. Εκτός της δέσμευσης από την βιομηχανία και την καύση, όλες οι μετατροπές του N συντελούνται φυσικά. Παρόλα αυτά ο ανθρώπινος παράγοντας μπορεί να επηρεάσει πολλές από αυτές τις διαδικασίες μέσω δραστηριοτήτων διαχείρισης εδαφών και καλλιεργειών. Η τύχη των θρεπτικών στοιχείων, και ειδικότερα του N, είναι ιδιαίτερης σημασίας λόγω των περιβαλλοντολογικών επιπτώσεων που έχουν οι διάφορες μορφές του στα επιφανειακά και υπόγεια νερά αλλά και της παραγωγής N_xO που συνδέονται με το φαινόμενο του θερμοκηπίου.



Εικόνα 1.3: Οι κυριότερες διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι και τη διαθεσιμότητα N στο έδαφος (<http://www.brr.cr.usgs.gov>)

1.3 Ανοργανοποίηση/Ακίνητοποίηση

Κεντρικό στοιχείο στις ροές και τη διαθεσιμότητα των ευκίνητων μορφών N στο έδαφος είναι η ισορροπία μεταξύ δύο βιοχημικής φύσεως διεργασιών, της ανοργανοποίησης και ακίνητοποίησης (Šimek et al., 2001). Οι διεργασίες αυτές συνδέονται με τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών που αποτελούν την ετεροτροφική βιομάζα του εδάφους (Αναλογίδης, 2000). Η ανοργανοποίηση αναφέρεται στην απελευθέρωση NH_4^+ -N ή NH_3 μέσω μιας σειράς ενζυματικών αντιδράσεων οξειδωτικής διάσπασης της οργανικής ουσίας του εδάφους (αμινοποίηση, αμμωνιοποίηση) από έναν μεγάλο αριθμό μη εξειδικευμένων μικροοργανισμών, ενώ η ακίνητοποίηση περιλαμβάνει την αφομοίωση και ενσωμάτωση των ανόργανων μορφών N σε οργανικά συστατικά της ετεροτροφικής βιομάζας (Πίνακας 1.1)

Πίνακας 1.1: Σχηματική παράσταση της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ ανοργανοποίησης και ακίνητοποίησης του εδαφικού N (Αναλογίδης, 2000).

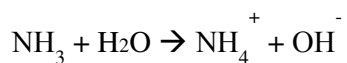
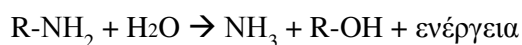
ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΑΖΩΤΟ		ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΑΖΩΤΟ
Μικροβιακή βιομάζα	(Ανοργανοποίηση) →	Αμμωνιακό (NH_4^+ -N)
Φυτικά & Ζωικά υπολείμματα		Νιτρώδες (NO_2^- -N)
Χουμος	← (Ακίνητοποίηση)	Νιτρικό (NO_3^- -N)

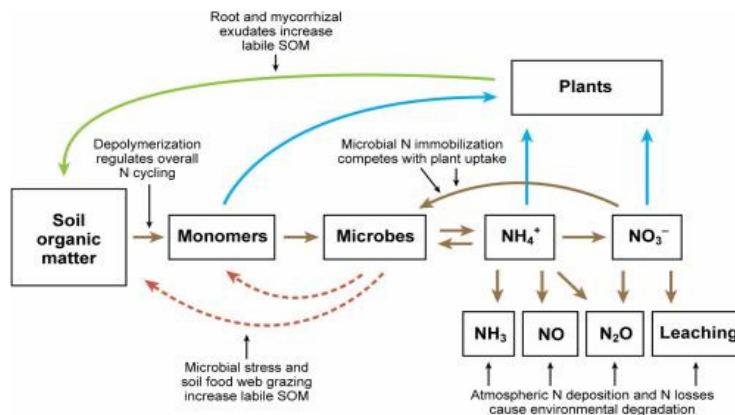
Είναι επόμενο λοιπόν ότι το ποσό του διαθέσιμου ανόργανου N (συνήθως ως NH_4^+ -N ή NO_3^- -N) για τα φυτά εξαρτάται από τη διαφορά μεταξύ των ρυθμών των δύο αυτών αντίθετων διεργασιών. Τι είναι όμως αυτό που ελέγχει την ισορροπία μεταξύ ανοργανοποίησης και ακίνητοποίησης; Η απάντηση βρίσκεται στην ποιότητα του οργανικού υλικού και ιδιαίτερα στον διαθέσιμο C σε σχέση με το διαθέσιμο N, δηλαδή στον λόγο C:N. (Hodge et al., 2000). Σαν γενικός κανόνας όταν αυτός ο λόγος παίρνει τιμές > 25:1 οι μικροοργανισμοί ακίνητοποιούν το N και σαν αποτέλεσμα μειώνεται το ποσό που είναι διαθέσιμο για την ανάπτυξη των καλλιεργειών. Αντίθετα, όταν ο λόγος παίρνει τιμές <25:1 τότε ανόργανες μορφές N ελευθερώνονται και μπορούν να συσσωρευτούν στο έδαφος.

Εξαιρέση σε αυτόν τον κανόνα αποτελούν 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 & Groffman, 2007). Στην πραγματικότητα η πρόβλεψη της συγκέντρωσης του ανόργανου N 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 O₂, η συγκέντρωση CO₂ (Šimek M and Cooper E. J. 2001). Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη του N που θα ελευθερωθεί και θα είναι τελικά διαθέσιμο για πρόσληψη από τα φυτά. Αν και η ακινητοποίηση του N θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια ανεπιθύμητη διαδικασία η οποία καθιστά το N προσωρινά μη διαθέσιμο για τα φυτά, η συμμετοχή της στη δυναμική του N στο έδαφος είναι σημαντική, καθώς συμβάλλει στη συγκράτηση του ευκίνητου αυτού θρεπτικού στοιχείου στο έδαφος, περιορίζοντας έτσι τη διαφυγή του προς την ατμόσφαιρα και τους υδάτινους αποδέκτες (Αναλογίδης, 2000)

Η ανοργανοποίηση του N στο έδαφος αποτελεί μια από τις βασικές διεργασίες με την οποία αυξάνεται το ποσό του N που είναι διαθέσιμο στα φυτά. Όταν η νεκρή οργανική ύλη είναι πλούσια σε N τότε οι ανάγκες των μικροοργανισμών για N καλύπτονται και πραγματοποιείται ανοργανοποίηση. Όταν όμως έχουμε νεκρή οργανική ύλη φτωχή σε N τότε οι μικροοργανισμοί το ενσωματώνουν σε οργανικά μόρια για την ικανοποίηση των αναγκών τους.

Αυτό το στάδιο της αμμωνιοποίησης σχηματικά έχει ως εξής:

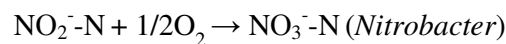
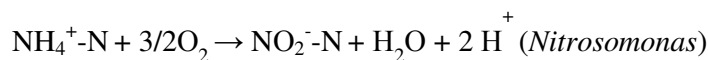




Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών Ανοργανοποίησης / Ακίνητοποίησης (Jackson et al., 2008)

1.4 Νιτροποίηση

Νιτροποίηση είναι η διαδικασία βιολογικής οξείδωσης κατά την οποία η αμμωνία (NH_3) και η ιονισμένη της μορφή, το αμμώνιο ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), μετατρέπονται με τη βοήθεια αυτότροφων αλλά και ετερότροφων αερόβιων μικροοργανισμών του εδάφους σε νιτρικά ανιόντα ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) [(Singh and Verna 2007), (Braker and Conrad, 2011)].



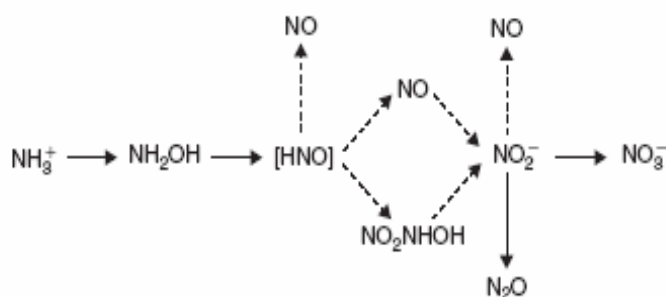
Η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε όλα τα εδάφη, όπου υπάρχει ως υπόστρωμα το $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και οι συνθήκες υγρασίας, αερισμού και pH είναι ευνοϊκές. Το άθροισμα των ιόντων $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και $\text{NO}_3^-\text{-N}$ αποτελεί την ολική ποσότητα του ανόργανου N στα γεωργικά εδάφη, με σημαντική υπεροχή του $\text{NO}_3^-\text{-N}$, εκτός αν επικρατούν συνθήκες που παρεμποδίζουν τη νιτροποίηση, η συνθηθέστερη των οποίων είναι το όξινο pH (Αναλογίδης, 2000). Αν και η νιτροποίηση είναι μία αβλαβής διεργασία για τα φυσικά οικοσυστήματα με μικρές εισροές N, η συμβολή της στις απώλειες N από τα γεωργικά εδάφη είναι σημαντική. Ο όγκος του N που χάνεται μέσω της διήθησης και της απονιτροποίησης των $\text{NO}_3^-\text{-N}$ είναι αποτέλεσμα της νιτροποίησης, η οποία πρέπει να αναγνωριστεί ως η κύρια αιτία ρύπανσης των αγροσυστημάτων και η κύρια αιτία μικρής ικανότητας αξιοποίησης N στις καλλιέργειες (Šimek et al., 2001). Στην πλειονότητα των γεωργικών εδαφών, η NH_3 μετατρέπεται ταχέως σε $\text{NO}_3^-\text{-N}$, το οποίο μπορεί να συσσωρεύεται στο εδαφικό διάλυμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Godde και Conrad, 2000). Επιπλέον, σε εδάφη που λιπαίνονται συστηματικά, η νιτροποίηση μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της γονιμότητας των εδαφών σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα με την πάροδο των ετών, μέσω της παραγωγής H^+ κατά την οξείδωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (μείωση του pH).

Μέρος του νιτρικού αζώτου που παράγεται από τη νιτροποίηση ή προστίθεται στο έδαφος με τα ανόργανα λιπάσματα χάνεται στην ατμόσφαιρα μέσω της απονιτροποίησης, δηλαδή της αναγωγής του NO_3^- -N μέσω χημικών ή βιολογικών μηχανισμών, υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας O_2 .

1.4.1 Νιτροποίηση από αυτότροφους μικροοργανισμούς

Η διεργασία της νιτροποίησης που πραγματοποιείται από αυτότροφους μικροοργανισμούς διεξάγεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έχουμε την οξείδωση της NH_4^+ -N σε NO_2^- -N, η οποία καταλύεται από αμμωνι-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) των γενών *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* και *Nitrosospira*. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η οξείδωση των NO_2^- -N σε NO_3^- -N που καταλύεται από νιτρο-οξειδωτικά βακτήρια (NOB) του γένους *Nitrobacter*. Το βασικό λειτουργικό ένζυμο για το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης είναι η μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (AMO). 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 το ένζυμο της AMO κατά τη νιτροποίηση ένα άτομο O_2 αντιδρά με την NH_4^+ -N σχηματίζοντας υδροξυλαμίνη (NH_2OH) (Irigoyen et al 2003). Το άλλο άτομο O_2 ανάγεται σχηματίζοντας H_2O . Έχει βρεθεί ότι πάνω από 60 ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία της AMO. Πρόσφατα, ωστόσο ανακαλύφθηκε πως τα βακτήρια δεν είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν οξείδωση της NH_3 σε NO_2^- -N αλλά σε αυτή εμπλέκονται και μικροοργανισμοί του φύλου των *Thaumarchaeota* της Τάξης των Αρχαίων που έχουν βρεθεί σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα (Konneke et al. 2005; Treusch et al. 2005). Τα είδη αυτά επίσης διαθέτουν το ένζυμο της AMO, ωστόσο ο πλήρης μηχανισμός της οξείδωσης της NH_3 δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί (Kim et al., 2011; Blainey et al, 2011). Όπως αναφέρει ο McCarty (1999) τα υποστρώματα ανάλογα με τη φύση τους μπορεί να έχουν ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική δράση με την NH_3 . Η σύνδεση και η οξείδωση των υποστρωμάτων με ανταγωνιστική δράση πραγματοποιείται στο ενεργό μέρος του ενζύμου, στο σημείο ακριβώς που πραγματοποιείται η οξείδωση της NH_3 . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της νιτροποίησης. Αντίθετα η σύνδεση των μη ανταγωνιστικών υποστρωμάτων πραγματοποιείται σε σημείο του ενζύμου της AMO διαφορετικό από το σημείο οξείδωσης της NH_3 . Σ' αυτή την περίπτωση η νιτροποίηση πραγματοποιείται με χαμηλούς ρυθμούς.

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα παρουσιάζουν μια εμφανή υπεροχή του πληθυσμού των AOA σε σχέση με τα AOB, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως στοιχείο ενός ίσως πιο αναβαθμισμένου ρόλου των AOA στην νιτροποίηση. Μια τέτοια υπόθεση όμως χρειάζεται ακόμα περισσότερη έρευνα, σε γονιδιακό και λειτουργικό επίπεδο ώστε να αποδειχθεί ότι η πληθυσμιακή υπεροχή συμβαδίζει με λειτουργική υπεροχή στην νιτροποίηση (Prosser et al., 2008). Ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται κατά το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης μπορεί να δώσουν αέριες ενώσεις του N της γενικής μορφής N_xO , οι οποίες ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και αποτελούν αέριες ενώσεις του φαινομένου του θερμοκηπίου (Martikainen, 1985; Lipschultz et al., 1981).



Εικόνα 1.5: Τα μονοπάτια της νιτροποίησης από τους αυτοτροφικούς μικροοργανισμούς. Οι διακεκομμένες γραμμές αναφέρονται σε μη επιβεβαιωμένα μονοπάτια (Firestone and Davidson, 1989)

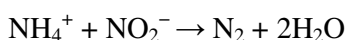
1.4.2 Νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς

Αρκετά γένη ετερότροφων βακτηρίων και μυκήτων έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την NH_3 είτε από οργανικά μόρια είτε από ανόργανα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί οξειδώνουν την NH_3 ή μετατρέπουν το N οργανικών μορίων σε NH_2OH με τη βοήθεια του AMO. Στη συνέχεια η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται σε νιτρώδη, αντίδραση η οποία ελέγχεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγάση της υδροξυλαμίνης (HAO). Από την οξείδωση αυτή απελευθερώνονται 4 ηλεκτρόνια, 2 από τα οποία επιστρέφουν στην AMO για τη συνέχιση της οξείδωσης της NH_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 NH_3 (Subbarao et al. 2006). Σε σύγκριση με την αυτοτροφική νιτροποίηση, στην ετεροτροφική νιτροποίηση η οξείδωση της NH_3 δεν πραγματοποιείται για την διατήρηση της ενέργειας καθώς επίσης σε αυτήν εμπλέκονται διαφορετικά ένζυμα από αυτά των αυτότροφων νιτροποιητών.

Οι ρυθμοί νιτροποίησης των ετερότροφων νιτροποιητών είναι σημαντικά χαμηλότεροι από των αυτότροφων (Braker and Conrad, 2011). Στα όξινα δασικά εδάφη η νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς αποτελεί το κυρίαρχο μονοπάτι νιτροποίησης (Cai et al., 2010).

1.4.3 Anammox

Τα τελευταία έτη οι μελέτες γύρω από την διεργασία της νιτροποίησης έχουν αναδείξει την παρουσία και συνεισφορά σε αυτήν μιας κατηγορίας αναερόβιων βακτηρίων. Οι Mulder et al. (2006) ανέφεραν απώλειες $\text{NH}_3\text{-N}$ υπό από αναερόβιες συνθήκες μέσα σε έναν αντιδραστήρα απονιτροποίησης. Η αναερόβια οξείδωση της NH_3 (ANaerobic AMMonium OXidation) αποτελεί την διεργασία κατά την οποία η NH_3 μετατρέπεται απευθείας σε N_2 απελευθερώνοντας ενέργεια, σύμφωνα με την χημική εξίσωση :



Η μικροβιολογία της ανοξικής οξείδωσης της NH_3 παρ' όλο που δεν ήταν μέχρι προσφάτως πλήρως κατανοητή αποσαφηνίστηκε από τους Kartal et al., (2011). Δέκτης ηλεκτρονίων στην αντίδραση είναι το νιτρώδες, ενώ πηγή $\text{NO}_2^-\text{-N}$ για την αντίδραση είναι η οξείδωση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ από αναερόβια βακτήρια. Η διεργασία θεωρείται ότι δεν οφείλεται στις ανοξικές μεταβολικές δραστηριότητες των γνωστών νιτροποιητικών βακτηρίων. Γι αυτό το λόγο είναι και ελάχιστες οι μελέτες που έχουν διερευνήσει την παρουσία αυτών των βακτηρίων στα χερσαία οικοσυστήματα (Humbert et al, 2010).

1.5 Περιβαλλοντικοί παράγοντες οι επηρεάζουν την νιτροποίηση

Η διεργασία της νιτροποίησης μπορεί να περιοριστεί από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος εκείνου που αποτελεί πηγή ενέργειας ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ και $\text{NO}_2^-\text{-N}$). Το υπόστρωμα, ο αερισμός, υγρασία, η θερμοκρασία, το pH ασκούν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και ενεργότητα των νιτροποιητών και το λόγο αυτό γίνεται μια μικρή ανάλυση σε καθ' ένα από τους παράγοντες αμέσως μετά.

1.5.1 Υπόστρωμα

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την νιτροποίηση στην πλειοψηφία των εδαφών είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος (NH_3). Πιο συγκεκριμένα οι De Boer et al, (1992) και Stark and Hart, (1997) ανέφεραν ότι οι ιδιότητες και η διαθεσιμότητα του υποστρώματος είναι πιο σημαντικές και από το εδαφικό pH κατά τη διαδικασία της νιτροποίησης. Ο ρυθμός νιτροποίησης στα γεωργικά εδάφη είναι ταχύς και υπερκαλύπτει τον ρυθμό πρόσληψης NO_3^- -N από τα φυτά υπό την προϋπόθεση επαρκούς αζωτούχου υποστρώματος. Τα αποθέματα NH_3 τα οποία χρειάζονται σαν υπόστρωμα για τη διαδικασία της νιτροποίησης μπορεί να υπάρχουν στο έδαφος είτε από προσθήκη αμμωνιακών λιπασμάτων, είτε από τη διαδικασία ορυκτοποίησης του οργανικού N (Αναλογίδης, 2000). Αύξηση λοιπόν της συγκέντρωσης της NH_3 -N συνοδεύεται με αντίστοιχη αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης. Ένα επιπλέον θέμα είναι ανταγωνιστικότητα ανάμεσα στα διαθέσιμα υποστρώματα κάτι το οποίο δίνει τη δυνατότητα στους μικροοργανισμούς να χρησιμοποιήσουν το υπόστρωμα το οποίο ανοργανοποιείται πιο εύκολα. Το χώμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε περιείχε υψηλά ποσοστά αργίλου και πρέπει να αναφερθεί ότι τα κατιόντα του NH_4^+ -N προσροφούνται από τα αργιλικά ορυκτά. Οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι σε ένα μεγάλο εύρος από οργανικές και ανόργανες ενώσεις και για συγκεντρώσεις αρκετά χαμηλότερες από αυτές που επιδρούν σε ετερότροφους οργανισμούς. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί και θάνατος των αυτότροφων νιτροποιητικών μικροοργανισμών, ενώ παρατηρούνται και διαφορές στην σύνθεση από τα Αρχαιοβακτήρια. Στις ενώσεις οι οποίες μπορεί να είναι τοξικές περιλαμβάνονται οργανικοί διαλύτες, αμίνες, πρωτεΐνες, φαινολικές ενώσεις, αλκοόλες, αιθέρες, κυανίδια (Prosser, 2011).

1.5.2 Επίδραση του αερισμού

Το διαθέσιμο οξυγόνο αποτελεί επίσης παράγοντα που καθορίζει την νιτροποίηση καθώς, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι νιτροποιητές είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί. Η παρουσία του O_2 είναι απολύτως απαραίτητη για την ανάπτυξη τόσο των *Nitrosomonas* όσο και των *Nitrobacter*. Η μικρότερη συγκέντρωση διαλυμένου O_2 πρέπει να είναι 0.3mg/l ώστε να συντηρείται η διεργασία ελάχιστη νιτροποίηση.

Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου 1.0 mg/lit και πάνω θεωρείται ικανοποιητική στο νερό για τα *Nitrosomonas* και από 2.0 mg/lit και πάνω για τα *Nitrobacter*. Επειδή δε, η διάλυση O₂ στο νερό, εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία, ο συνδυασμός ανόδου θερμοκρασίας και οξυγόνωσης πρέπει να είναι ανάλογος.

1.5.3. Επίδραση της εδαφικής υγρασίας

Επειδή η υγρασία επηρεάζει τον αερισμό του εδαφικού συστήματος, η διαθέσιμη εδαφική υγρασία επηρεάζει τον ρυθμό παραγωγής του NO₃⁻-N. Βέβαια η ύπαρξη και συνέχιση της ζωής των μικροοργανισμών του εδάφους δυσχεραίνεται από την έλλειψη νερού. Ο ρυθμός νιτροποίησης επιβραδύνεται όταν η υγρασία είναι υπερβολική, ή αντίθετα πολύ χαμηλή. Είναι ευρέως γνωστό ότι αναστολή της μικροβιακής δραστηριότητας συμβαίνει όταν οι τιμές της εδαφικής υγρασίας πέσουν κάτω από 30-35%. (Sentiford,1995). Αυτό το επιβεβαιώνουν και οι Breurer et al., (2002), δηλώνοντας ότι η υγρασία μπορεί να αναχαιτίσει τη διαδικασία της νιτροποίησης. Οι Zaman et al. (1999) βρήκαν ότι το βέλτιστο υδατικό δυναμικό του εδάφους προκρινόμενου να μετρηθούν ποσοστά νιτροποίησης ήταν 10 kPa.

1.5.4 Επίδραση της θερμοκρασίας

Ακολούθως και η θερμοκρασία επηρεάζει και συγκεκριμένα αύξηση της οδηγεί σε αύξηση της διαδικασίας της νιτροποίησης. Η βέλτιστη θερμοκρασία για νιτροποίηση βρίσκεται στο εύρος 25-35 °C τόσο για είδη του γένους *Nitrosomonas* (βακτήρια κυρίως για την οξείδωση NH₃) όσο και για τα *Nitrobacter* (βακτήρια κυρίως για την οξείδωση νιτρωδών), ενώ δεν παρατηρείται δραστηριότητα σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C ή υψηλότερη από 35 °C για τα *Nitrosomonas* και κάτω από 5 °C ή πάνω από 40 °C για τα *Nitrobacter*. Ο ρυθμός ανάπτυξης σχεδόν διπλασιάζεται για κάθε αύξηση θερμοκρασίας 10 °C, αλλά πέρα από τους 30 °C ξαφνικά μειώνεται. Στους 38 °C είναι ίδιος με τους 5 °C, ενώ στους 49 °C τα νιτροποιητικά βακτήρια πεθαίνουν. Η ανάπτυξη μειώνεται κατά 50% στους 18 °C, κατά 75% στους 8-10 °C, ενώ δεν υπάρχει καθόλου δραστηριότητα στους 4 °C, και τα νιτροποιητικά βακτηρία τελικά πεθαίνουν στους 0 °C. Οι μικροοργανισμοί αυτοί γενικότερα είναι ανθεκτικοί στις μικρές θερμοκρασίες, αλλά σε υψηλές θερμοκρασίες η ενεργητικότητά τους μειώνεται γιατί αποτελούνται από πρωτεΐνες.

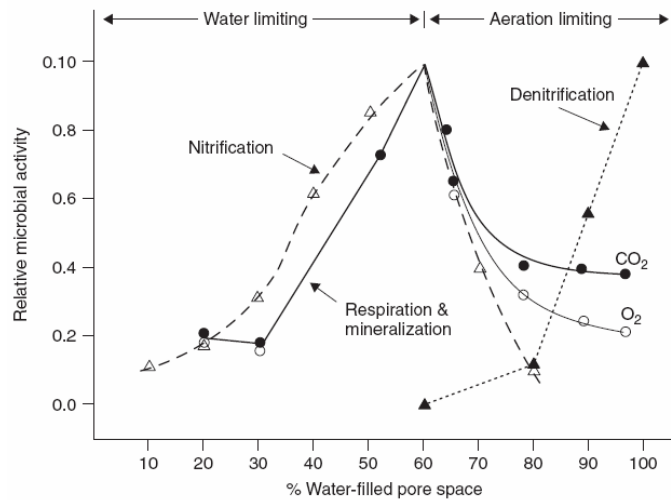
1.5.5 Επίδραση του pH

Το pH του εδάφους είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει τις διεργασίες που γίνονται στο έδαφος. Οι επιδράσεις του στην σύνθεση και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών έχουν μελετηθεί εντατικά (Kemmitt et al., 2006; Högberg et al., 2007a; Rousk et al., 2009). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αύξηση pH αυξάνει τον ρυθμό νιτροποίησης, ενώ τυχόν μείωση του pH καταστέλλει τη νιτροποίηση (Robertson, 1982; Tietema et al., 1992). Συνεπώς χαμηλά ποσοστά νιτροποίησης μπορούν να αποδοθούν και στο pH και όχι απαραίτητα στη διαθεσιμότητα υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε ένα ευρύ φάσμα pH (7 – 9,5), παρόλο που το βέλτιστο είναι το 8.5. Οι Wild et al. (1971) έδειξαν ότι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός νιτροποίησης σε pH 7.0 ήταν 50% του αντίστοιχου ρυθμού σε pH 8.0, με σχετικά γραμμική σχέση για τις ενδιάμεσες τιμές. Οι Engle και Alexander et al. (1958) παρατήρησαν μικρή μεταβολή του ρυθμού νιτροποίησης για τιμές του pH μεταξύ 7.2 και 8.0 και γραμμική μείωση του ρυθμού για τιμές κάτω από 7.2. Ενώ οι Hankinson and Schmidt (1988) έδειξαν ότι η ανάπτυξη και η ενεργότητα των νιτροποιητικών μικροοργανισμών μειώνεται δραματικά για τιμές του pH κάτω του ουδέτερου.

Είναι πολύ σημαντικό οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που προαναφέρθηκαν να μην διαταράσσονται, καθώς ο αριθμός των βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνοι για τη διεκπεραίωση των διεργασιών αυτών, είναι περιορισμένος και ο ρυθμός ανάπτυξης τους είναι σχετικά αργός (ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού κυμαίνεται από 7-8 ώρες σε ιδανικές συνθήκες, συγκριτικά με άλλα είδη βακτηρίων στα οποία συνήθως κυμαίνεται από 16-24 ώρες) (Sheldon Tarre and Michal Green, 2004).

1.6 Απονιτροποίηση

Ένα μεγάλο εύρος, κυρίως ετερότροφων βακτηρίων κατέχουν μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση η οποία πραγματοποιείται μόνο κάτω από συνθήκες έλλειψης O_2 . Στα εδάφη η απονιτροποίηση παρατηρείται συνήθως μετά από βροχοπτώσεις, όπου οι εδαφικοί πόροι έχουν κορεστεί από νερό και το διαθέσιμο O_2 μειώνεται. Τυπικά η απονιτροποίηση ξεκινά όταν το 60% και πάνω των εδαφικών πόρων έχει πληρωθεί με νερό (Εικ 1.6) και συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή και ελευθέρωση N_2O στην ατμόσφαιρα (Robertson & Groffman, 2007).



Εικόνα 1.6: Η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας των εδαφικών πόρων σε νερό και της σχετικής μικροβιακής δραστηριότητας (Linn and Doran, 1984).

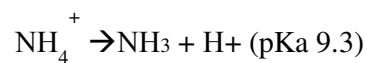
1.6.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση

Οι αποκλίσεις του ρυθμού απονιτροποίησης οφείλονται κυρίως σε διαφορές στην υφή του εδάφους, στις κλιματικές συνθήκες, στο pH, στην συγκέντρωση των NO_3^- -N στην διαθεσιμότητα σε οργανικό-C, στη θερμοκρασία και στο διαλυμένο οξυγόνο. Η υφή του εδάφους επηρεάζει τον ρυθμό απονιτροποίησης μέσω της επίδρασης που έχει στην εδαφική υγρασία και την διαθεσιμότητα O_2 . Ο ρυθμός απονιτροποίησης μπορεί να παρουσιάσει μεγάλες χρονικές και χωρικές μεταβολές, ακόμα και μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την ακριβή εκτίμηση των απωλειών του N.

Σημαντικές διαφορές στον ρυθμό απονιτροποίησης παρατηρήθηκαν στην κορυφή του λόφου, στην πλαγιά και στην παρόχθια ζώνη ενός εδαφικού συστήματος με δασική βλάστηση (Meding et al., 2001). Θετική είναι επίσης η επίδραση του οργανικού C στον ρυθμό της απονιτροποίησης. Όμως δεν υπάρχει κάποιο όριο τιμών για τον οργανικό C που να διατηρήσει ή να αυξήσει την διεργασία της απονιτροποίησης. Η έλλειψη μιας οριακής τιμής μπορεί να οφείλεται στον διπλό ρόλο του C στην απονιτροποίηση (είναι δότης ηλεκτρονίων και επιδρά στην διαθεσιμότητα O₂ του εδάφους) και στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του οργανικού-C του εδάφους (Barton et al., 1999). Η απονιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε ένα ευρύτερο φάσμα θερμοκρασιών από 5-50 °C. Γνωρίζουμε ότι η απονιτροποίηση είναι μια αυστηρά ανοξική διεργασία. Το O₂ αναχαιτίζει τη διαδικασία της απονιτροποίησης καθώς καταστέλλει τη σύνθεση των ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αναγωγή νιτρικών και παρεμποδίζει τη δράση των ενζύμων που ήδη υπάρχουν. Όσο μειώνεται η θερμοκρασία παρατηρείται μείωση στο ρυθμό απονιτροποίησης ενώ κοντά στους 10 °C η απόδοση πέφτει κοντά στο 5%. Όσον αφορά στην επίδραση του pH η διαδικασία της απονιτροποίησης παράγει αλκαλικότητα με αποτέλεσμα την αύξηση του. Δεν έχει παρατηρηθεί έντονη επίδραση του pH στην ταχύτητα της απονιτροποίησης. Ως βέλτιστη περιοχή pH θεωρείται το εύρος 7,5-8,5 ενώ τυχόν μείωση του προς το όξινο περιβάλλον, επιβραδύνει τον ρυθμό απονιτροποίησης ενώ θα ευνοήσει και την παραγωγή νιτρικών οξειδίων. Επίσης έχει αναφερθεί η θετική επίδραση του ριζικού συστήματος των φυτών (εκκρίσεις), των οργανικών βελτιωτικών και της κοπριάς (Τσαντήλας και Ευαγγέλου 2010; Meding et al., 2001).

1.7 Εξάτμιση NH₃

Η ελευθέρωση NH₃ συνεισφέρει απώλειες N από το έδαφος που πραγματοποιείται με φυσικό τρόπο. Η αεριοποίηση του NH₃ εξαρτάται άμεσα από την ποσότητα NH₃ και του NH₄⁺-N στο έδαφος. Ακόμα εξαρτάται από το pH του εδάφους.



Μεγάλες ποσότητες NH₃ εμφανίζονται σε pH > 8.5, συνεπώς οι απώλειες του NH₃ ευνοούνται από υψηλές τιμές pH ή από αντιδράσεις που περιστασιακά το αυξάνουν. Αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 45 °C και συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας υγρασίας στο έδαφος ευνοούν την αεριοποίηση (Tisdale et al, 1993).

1.8 Παρεμπόδιση της νιτροποίησης

1.8.1 Γενικά

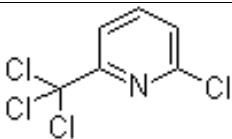
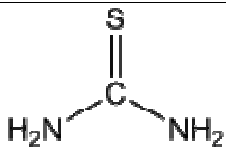
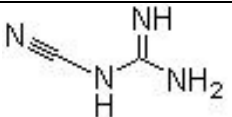
Σε πολλά φυσικά οικοσυστήματα το N αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, ενώ παράλληλα η νιτροποίηση επηρεάζει την παραγωγικότητα των συγκομιδών αλλά και την περιβαλλοντική ρύπανση. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μηχανισμοί έτσι ώστε να περιορίζονται οι απώλειες του N, μέσω του ελέγχου του ποσοστού νιτροποίησης και να χρησιμοποιείται το N πιο αποτελεσματικά την παραγωγικότητα και τη σταθερότητα των οικοσυστημάτων. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην έρευνα προκειμένου να βρεθούν ενώσεις που παρεμποδίζουν την νιτροποίηση. Αρχικά η έρευνα είχε επικεντρωθεί στο να βρεθούν κάποιες ουσίες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την διαδικασία της νιτροποίησης στις χερσαίες εκτάσεις. Είναι πολύ σημαντικό οι βιολογικές διεργασίες απομάκρυνσης N να μην διαταράσσονται. Η προσπάθεια αυτή έγινε πράξη μέσω της ανάπτυξης χημικών ανασταλτικών παραγόντων της νιτροποίησης όπως nitrapiryn και Dicyandiamide. Οι περιοριστικοί αυτοί παράγοντες περιορίζουν τη δραστηριότητα του βακτηρίου *Nitrosomonas* παρά του *Nitrobacter*, επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση αμμωνίου αντί για τα νιτρώδη ιόντα στο χώμα. Στην περίπτωση που η εδαφική έκταση δέχεται λίπανση θέλουμε να περιορίσουμε τις διαδικασίες νιτροποίησης ελέγχοντας το ποσοστό της ουρίας που υδρολύεται μιας και είναι από τα πιο συνηθισμένα αμμωνιακά λιπάσματα που χρησιμοποιούνται (Watson, 1971; Bock et al., 1970).

- Μπορεί να είναι παρεμποδιστική για τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, έτσι ώστε να συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να οξειδώνουν αμμωνιακό και νιτρώδες N, αλλά με σημαντικά μειωμένους ρυθμούς.
- Μπορεί να είναι αντιστρεπτή, έτσι ώστε η νιτροποίηση να σταματήσει προσωρινά και να ξαναρχίσει μετά την απομάκρυνση ή την αραίωση του τοξικού παράγοντα.
- Μπορεί τέλος, να είναι αρκετά τοξική έτσι ώστε να θανατώσει τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς και να σταματήσει τη νιτροποίηση, έως ότου απομακρυνθεί ο τοξικός παράγοντας και η ανάπτυξη ξεκινήσει εκ νέου.

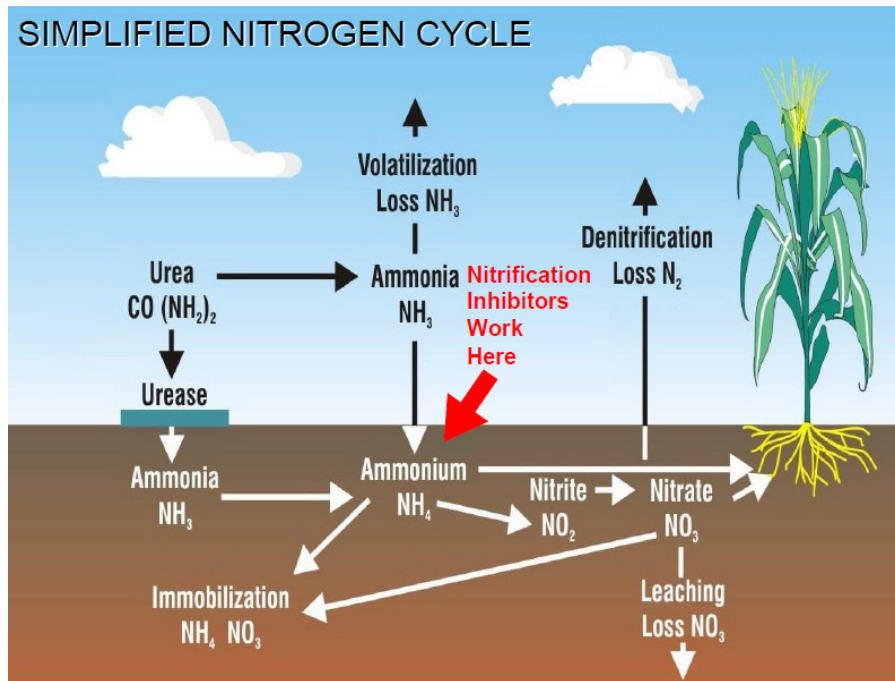
1.8.2. Ενώσεις με παρεμποδιστική δράση

Τα νιτρώδη αν και είναι προϊόν της οξείδωσης του NH_3 , εντούτοις μπορούν να δράσουν και ως μέσο παρεμπόδισης της νιτροποίησης. Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να μοντελοποιήσουν την παρεμπόδιση αυτή χρησιμοποιώντας είτε ανταγωνιστικά είτε μη ανταγωνιστικά μοντέλα (Anthonisen et al., 1976; Nyhuis, 1985). Ουσιαστικά όμως η παρεμπόδιση οφείλεται στο pH, αφού αυτό επηρεάζει την ιονική κατανομή των δύο αυτών ενώσεων. Οι Juliastuti et al. (2003) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος επηρεάζουν σημαντικά την νιτροποίηση, εξέτασαν ακόμη την παρεμπόδιση της νιτροποίησης από το αρσενικό, το χρώμιο και το φθόριο. Και αυτοί με τη σειρά τους έδειξαν ότι η νιτροποίηση παρεμποδίζεται από αυτά τα στοιχεία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Απο τους πλέον γνωστούς παρεμποδιστές είναι όπως προαναφέρθηκε και η dicyandiamide (DCD), η thiourea και η nitrapyrin. Πολλά συστατικά έχουν διερευνηθεί ως πιθανοί παρεμποδιστές νιτροποίησης ωστόσο λίγα έχουν αξιολογηθεί στο πεδίο ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Η νιτραπυρίνη και το DCD είναι ουσιαστικά τα ευρέως χρησιμοποιούμενα, ενώ πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται και το (3,4-dimethylpyrazole phosphate) (DMPP). Χαμηλός ρυθμός νιτροποίησης σημαίνει υψηλή συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο έδαφος και αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει αντιβακτηριακή και αντιμικροβιακή δράση. Οι υψηλές θερμοκρασίες και η υψηλή τιμή εδαφικού pH επιταχύνουν τη διαδικασία της νιτροποίησης. Το pH κατά τη διάρκεια της παρεμπόδισης επιδρά στην ενεργότητα των ενζύμων. Σε υψηλές τιμές του pH επηρεάζεται η συγγένεια δέσμευσης μεταξύ του υποστρώματος και του ενζύμου. Η μεταβολή του pH από 5.4-8.3 προκαλεί μείωση της απόδοσης του παρεμποδιστή νιτροποίησης. Όσο για την επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας, αυτή επιταχύνει τη διαδικασία της νιτροποίησης, δρώντας όμως παράλληλα ανασταλτικά για τη δράση των παρεμποδιστών καθώς μια αύξηση από 10-30 °C επιδρά αρνητικά και παρεμποδίζει τους παρεμποδιστές νιτροποίησης σε ποσοστά 6-62% (Puttanna et al., 1999).

Πίνακας 2.2: Τυπικά χαρακτηριστικά παρεμποδιστών νιτροποίησης (Zacherl B. & Ambergger A., 1990)

Ονομασία	Χημικός τύπος	Χημική ονομασία
Nitrapyrin		2-chloro-6-trichloromethyl-pyridine
Thiourea		thiocarbamide
Dicyandiamide		1-Cyanoguanidine

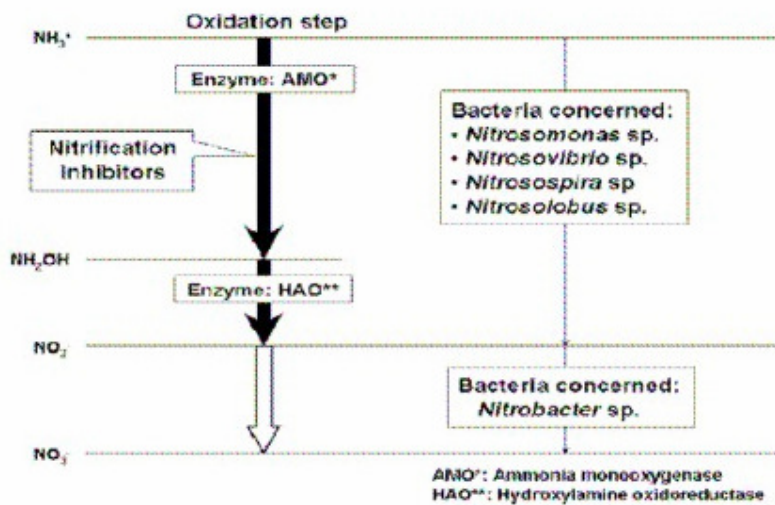
1.8.3 Μηχανισμοί παρεμπόδισης της νιτροποίησης



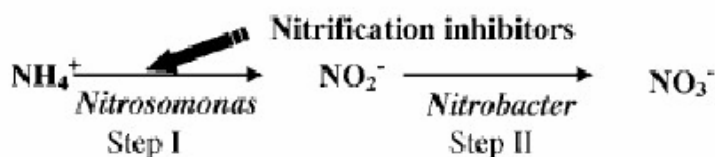
Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του αζώτου με την είσοδο παρεμποδιστή (Sutton A. 2005)

Οι παρεμποδιστές του μηχανισμού δράσης ενός ενζύμου μπορούν να χαρακτηριστούν ως συστατικά που η παρεμπόδισή τους βασίζεται στον κανονικό καταλυτικό κύκλο του ενζύμου, παράγοντας ένα παρεμποδιστικό προϊόν από το συστατικό. Η νιτραπυρίνη έχει βρεθεί, πως είναι ένα εναλλακτικό υπόστρωμα της αμμωνιακής μονοοξυγενάσης και προφανώς ένας αδύναμος παρεμποδιστής αυτού του ενζύμου, με μεγάλους και «πολύπλοκους» δεσμούς του προϊόντος με τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Έχει βρεθεί επίσης πως ισχυροί παρεμποδιστές της οξείδωσης της NH_3 είναι πολλές ετεροκυκλικές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την ετεροκυκλική δομή του δακτυλίου. Ο μηχανισμός της παρεμπόδισης αυτού του είδους των ουσιών δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως και λόγω της σημασίας των ενώσεων αυτών ως παρεμποδιστών στη νιτροποίηση, πρέπει να θεωρηθούν ως μία ιδιαίτερη ομάδα. Πολλές από τις ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν N και βρέθηκαν να παρεμποδίζουν την νιτροποίηση είναι δομικά παρόμοιες με αυτές που περιέχουν χλώριο ή /και τριχλωρομεθυλικές (CCl_3), ομάδες υποκαταστημένες σε άτομα C που είναι γειτονικά σε άτομο N του δακτυλίου (McCarty και Bremner, 1989).

Οι παρεμποδιστές νιτροποίησης συνήθως δρουν έναντι του ενζύμου (AMO) με αποτέλεσμα να επιβραδύνουν ή και να αναστέλλουν την οξείδωση της NH_3 σε νιτρώδη (NO_2^- -N), συνήθως χωρίς να επηρεάζουν την οξείδωση των νιτρώδων σε νιτρικά (NO_3^- -N) (McCarty 1999). Η δράση των παρεμποδιστών φαίνεται στις Εικόνες 1.8 και 1.9 που ακολουθούν.



Εικόνα 1.8: Δράση παρεμποδιστών νιτροποίησης (Singh and Verma 2007).



Εικόνα 1.9: Δράση παρεμποδιστών νιτροποίησης στην οξείδωση της αμμωνίας (Singh and Verma 2007).

Καθώς το DCD απευθύνεται στη δραστηριότητα μιας συγκεκριμένης λειτουργικής ομάδας βακτηρίων, των αμμωνο-οξειδωτικών, δεν έχει επιπτώσεις στο ρυθμό ανάπτυξης των γαιοσκώληκων, στην επιβίωση και γονιμότητα του πληθυσμού *Collembola*. Τόσο το *Collembola* όσο και οι γαιοσκώληκες θεωρούνται δείκτες γονιμότητας και υγείας του εδάφους (Maureen et al., 2010). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του DCD στους 22 ° C ήταν 39 ημέρες σύμφωνα με τους Williamson et al., (1996).

1.8.4 Κατάλληλη μέθοδος μέτρησης νιτροποίησης

Παρά τις δεκαετίες έρευνας για την νιτροποίηση, εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική σύγχυση σχετικά με την κατάλληλη μέθοδο για τη μέτρηση του ρυθμού της στο έδαφος. Όλες οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη μέτρηση των αλλαγών στην συγκέντρωση του NO_3^- -N με την πάροδο του χρόνου εν' τούτοις, η μέτρηση της αλλαγής στην NO_3^- -N και μόνο (δηλαδή, της καθαρής νιτροποίησης) δεν είναι επαρκής για να ποσοτικοποιηθεί ο πραγματικός ρυθμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα η νιτροποίηση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η καθαρή νιτροποίηση είναι η διαφορά μεταξύ του ακαθάριστου ποσοστού νιτροποίησης και του ακαθάριστου ποσοστού κατανάλωσης NO_3^- -N. Ως εκ τούτου, η καθαρή νιτροποίηση από μόνη της δεν πρέπει ποτέ να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των μεικτών ποσών νιτροποίησης. Αντ' αυτού, η μέτρηση του καθαρού ποσού νιτροποίησης πρέπει να συνδυαστεί με τη χρήση είτε ισοτόπων (^{15}N) είτε αναστολέων. Όταν οι τιμές της νιτροποίησης μετρούνται χρησιμοποιώντας αναστολείς νιτροποίησης, χρησιμοποιούνται δύο επιμέρους δείγματα εδάφους. Στο ένα δείγμα δίνεται μια δόση αναστολέα προκειμένου να σταματήσει εντελώς τη νιτροποίησης, ενώ στο δεύτερο δείγμα που δεν εφαρμόζεται αναστολέας, προσδιορίζεται ο ρυθμός νιτροποίησης. Στο χρόνο - 0 γίνονται οι αρχικές μετρήσεις της συγκέντρωσης NO_3^- -N, αμέσως μετά τα δύο επιμέρους δείγματα επωάζονται (3 ημέρες) και στη συνέχεια εκχειλίζονται για να ληφθεί το χρόνο-t (3 ημέρες) η συγκέντρωση των NO_3^- -N. Το δείγμα που λαμβάνει τον αναστολέα νιτροποίησης θα έχει μείωση των καθαρών συντελεστών νιτροποίησης (αρνητικούς ρυθμούς), διότι συνέβη μόνο κατανάλωση NO_3^- -N. Η καταλληλότητα της μεθόδου εξαρτάται από τους στόχους του ερευνητή. Αυτοί οι αναστολείς μπλοκάρουν τις διεργασίες κατανάλωσης NO_3^- -N δίνοντας καθαρές τιμές νιτροποίησης. Άμεσοι αναστολείς της νιτροποίησης περιλαμβάνουν ακετυλένιο (C_2H_2) και νιτραπυρίνη (2-χλωρο-6-(τριχλωρομεθυλο) πυριδίνη).

1.8.5 Καθαρός και πραγματικός ρυθμός νιτροποίησης

Οι κοινές χρήσεις του όρου ρυθμός νιτροποίησης περιλαμβάνουν τουλάχιστον τρεις διακριτές έννοιες: i) καθαρός ρυθμός νιτροποίησης, ii) πραγματικός ρυθμός νιτροποίησης και iii) δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης. Το καθαρό ποσοστό νιτροποίησης είναι το ποσοστό συσσώρευσης των NO_3^- -N και είναι ίσο με το συντελεστή μετατροπής του $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ σε NO_3^- -N μείον τυχόν κατανάλωση.

Το συνολικό ποσοστό νιτροποίησης είναι το πραγματικό ποσοστό μετατροπής του $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ σε NO_2/NO_3 ανεξάρτητα από την κατανάλωση. Ο καθορισμός του ακαθάριστου ποσοστού νιτροποίησης απαιτεί γενικά τη χρήση των ισοτόπων (^{15}N) για να δώσει διακριτές εκτιμήσεις της ταυτόχρονης παραγωγής και της κατανάλωσης των NO_3^- -N (Hart et al., 1994; Murphy et al., 2003; Schmidt and Belser, 1994; Stark, 2000). Με δεδομένο τον κυρίαρχο ρόλο της νιτροποίησης στην ανάπτυξη των καλλιεργειών, την πρωτογενή παραγωγή, αλλά και τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις που συνδέονται με αυτή (έκλυση N_2O , έκπλυση) θα αναπτύξουμε τις μεθοδολογίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του ρυθμού νιτροποίησης. Οι μεθοδολογίες είναι η χρήση ισοτόπων ^{15}N και η χρήση παρεμποδιστών νιτροποίησης. Στη χρήση ισοτόπων ^{15}N έχουν χρησιμοποιηθεί δύο κύριες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του πραγματικού ρυθμού νιτροποίησης. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την χρήση ιχνηθέτη και η δεύτερη την τεχνική της αραίωσης. Στην περίπτωση του ιχνηθέτη ^{15}N , προστίθεται υπόστρωμα προκειμένου να διευκολυνθεί η διαδικασία της νιτροποίησης και στη συνέχεια παρακολουθείται. Αυτή η προσέγγιση έχει μια σειρά από αδυναμίες που περιορίζουν σοβαρά τη χρήση του. Η προσθήκη της NH_4^+ -N μπορεί να συνεισφέρει στην αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης.

Δεύτερον, αν οι νιτροποιητές καταναλώνουν ουρία ή λαμβάνουν άμεσα NH_4^+ -N από την ανοργανοποίηση του N, επίσης, εάν συμβαίνει ακινητοποίηση ή κατανάλωση NO_3^- -N, θα υποτιμήσουμε τη ροή του ^{15}N εντός του NO_3^- -N. Μία εναλλακτική μεθοδολογία είναι η χρήση των αναστολέων νιτροποίησης NO_3^- -N. Κατά τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εφαρμογή των αναστολέων στο έδαφος και αφού επέλθει ηρεμία στο έδαφος για 3 ημέρες, γίνεται η μέτρηση στην οποία φαίνεται ξεκάθαρα πλέον ότι η διαδικασία της νιτροποίησης έχει σταματήσει. Για να πραγματοποιηθεί σωστά η χρήση παρεμποδιστή θα πρέπει να πληρούνται δύο σημαντικές παράμετροι. Πρώτον η χρήση του παρεμποδιστή να καταφέρει να μπλοκάρει εντελώς τη νιτροποίηση και δεύτερον να υπάρχει ταύτιση των ποσοστών κατανάλωσης.

1.9 Στόχος – Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη/βελτιστοποίηση μίας οικονομικής και αξιόπιστης μεθοδολογίας για το προσδιορισμό του πραγματικού ρυθμού νιτροποίησης στο έδαφος. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένα έδαφος με σχετικά μεγάλη περιεκτικότητα αργίλου, καθώς όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες εργασίες παρουσιάζει χαμηλή ανάσχεση νιτροποίησης σε μεταχείριση με παρεμποδιστές, ενώ ευνοεί την επικράτηση σχετικά υψηλών ρυθμών απονιτροποίησης (κατανάλωση NO_3^- -N). Ειδικότερα, διερευνήθηκε η χρήση του αναστολέα νιτροποίησης DCD, ενώ σε ορισμένες από τις μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκε εφαρμογή γλυκόζης (συνεισφέρει στην αύξηση του ρυθμού απονιτροποίησης) για την ασφαλέστερη αξιολόγηση της μεθοδολογίας.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Το έδαφος το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στο οποίο γίνονταν η εφαρμογή αμμωνίας προέρχονταν από το Ινστιτούτο Ελιάς και Υποτροπικών Φυτών Χανίων. Επίσης δέχονταν συνεχώς κατεργασία καθώς γινόταν καλλιέργεια εσπεριδοειδών σε αυτό. Η περιεκτικότητα του σε άργιλο προσδιορίστηκε σε 30%. Το χώμα αφού ομογενοποιήθηκε τοποθετήθηκε σε 100 μικρά δοχεία. Στο κάθε ένα από αυτά τοποθετήθηκαν 200 g εδάφους και χωρίστηκαν σε ομάδες των 25. Σε κάθε μια από τις τέσσερις ομάδες γινόταν εφαρμογή διαφορετικής συγκέντρωσης $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Πιο συγκεκριμένα η 1^η ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και δέχονταν νερό ώστε να αντισταθμίσει τις απώλειες εξάτμισης. Η 2^η ομάδα δέχθηκε μεταχείριση με 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, η 3^η ομάδα δέχθηκε μεταχείριση με 50 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και η 4^η ομάδα δέχθηκε μεταχείριση με 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Οι δειγματοληψίες εδάφους ξεκίνησαν αρχές Οκτωβρίου 2012 και ολοκληρώθηκαν τον Νοέμβριο του ίδιου έτους. Επαναλαμβάνονταν κάθε 10-15 περίπου ημέρες και η εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο έδαφος γινόταν όταν το έδαφος έφτανε σε επίπεδα υδατοϊκανότητας κάτω του κανονικού. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε παρεμποδιστής νιτροποίησης DCD ο οποίος γινόταν εφαρμογή 3 μέρες πριν την μέτρηση, ενώ στις τρεις τελευταίες δειγματοληψίες προστέθηκε σε δείγματα της δεύτερης και τέταρτης ομάδας μαζί με την εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα στις δύο πρώτες εφαρμογές η γλυκόζη ήταν συγκέντρωσης 0,1M, ενώ στην τελευταία 0,25M.



Εικόνα 2.10: Το έδαφος κατά τη διάρκεια του πειράματος



Εικόνα 2.2: Έδαφος στο οποίο έχει γίνει εφαρμογή 100 mg/lit $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και 0,25M γλυκόζης.

2.2 Πρωτόκολλα Μετρήσεων

Στην συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν.

Νιτρικό- και αμμωνιακό- N: Το $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο έδαφος βρίσκεται σε ανταλλάξιμη μορφή και μπορεί να εκχυλιστεί σε θερμοκρασία δωματίου με ένα ουδέτερο διάλυμα άλατος καλίου. Τα νιτρικά ιόντα είναι υδατοδιαλυτά και μπορούν να εκχυλιστούν με το ίδιο διάλυμα (Soil Sampling and Methods of Analysis, 2008). Η εκχύλιση έγινε με διάλυμα KCl 2,0 M σε θερμοκρασία δωματίου και αναλογία εδάφους: KCl 1/10. Η αναλυτική διαδικασία έγινε βάση της μεθοδολογίας που αναφέρεται στο βιβλίο Soil Sampling and Methods of Analysis (chapter 6.2). Ο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3\text{-N}$ χρησιμοποιήθηκε το NitraVer® 5, Powder Pillows της εταιρείας HACH με εύρος προσδιορισμού τα 0 - 30 mg/L. Η μέτρηση έγινε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 540nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ έγινε φωτομετρικά με το αντιδραστήριο Nessler σε μήκος κύματος 425nm. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4^+\text{-N}$ χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 25. Για τον προσδιορισμό του $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4^+\text{-N}$ από τα δείγματα των εδαφικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι.

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. Το έδαφος τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες παρουσία διαλύματος που περιείχε NH_4^+ σε θάλαμο επώασης (σε θερμοκρασία 20°C) για 24 h υπό συνεχή ανάδευση.

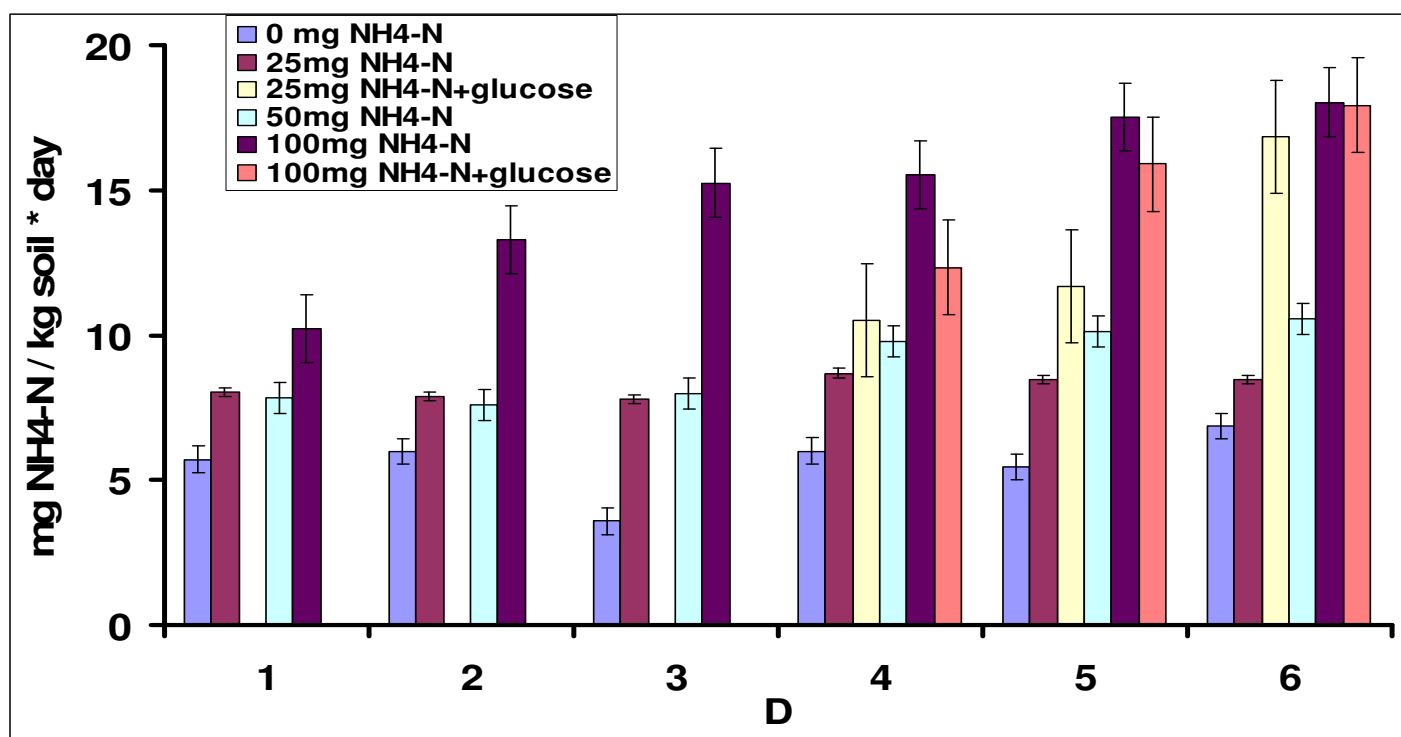
Προσθήκη DCD

Η προσθήκη DCD συνέβαλε στο να πραγματοποιηθεί του καθαρού ρυθμού νιτροποίησης. Ποσότητα εδάφους τοποθετούνταν σε πλαστικά tubes όπου και γινόταν η εφαρμογή 4mg/ml ποσότητας DCD τρεις μέρες πριν την μέτρηση. Βασικό ήταν η ομοιόμορφη εφαρμογή του παρεμποδιστή σε όλο το χώμα και στο χώμα να μην επικρατούν υψηλά ποσοστά υγρασίας. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C).

ΕΝΟΤΗΤΑ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συγκέντρωση NH_4^+ συναρτήσει του χρόνου

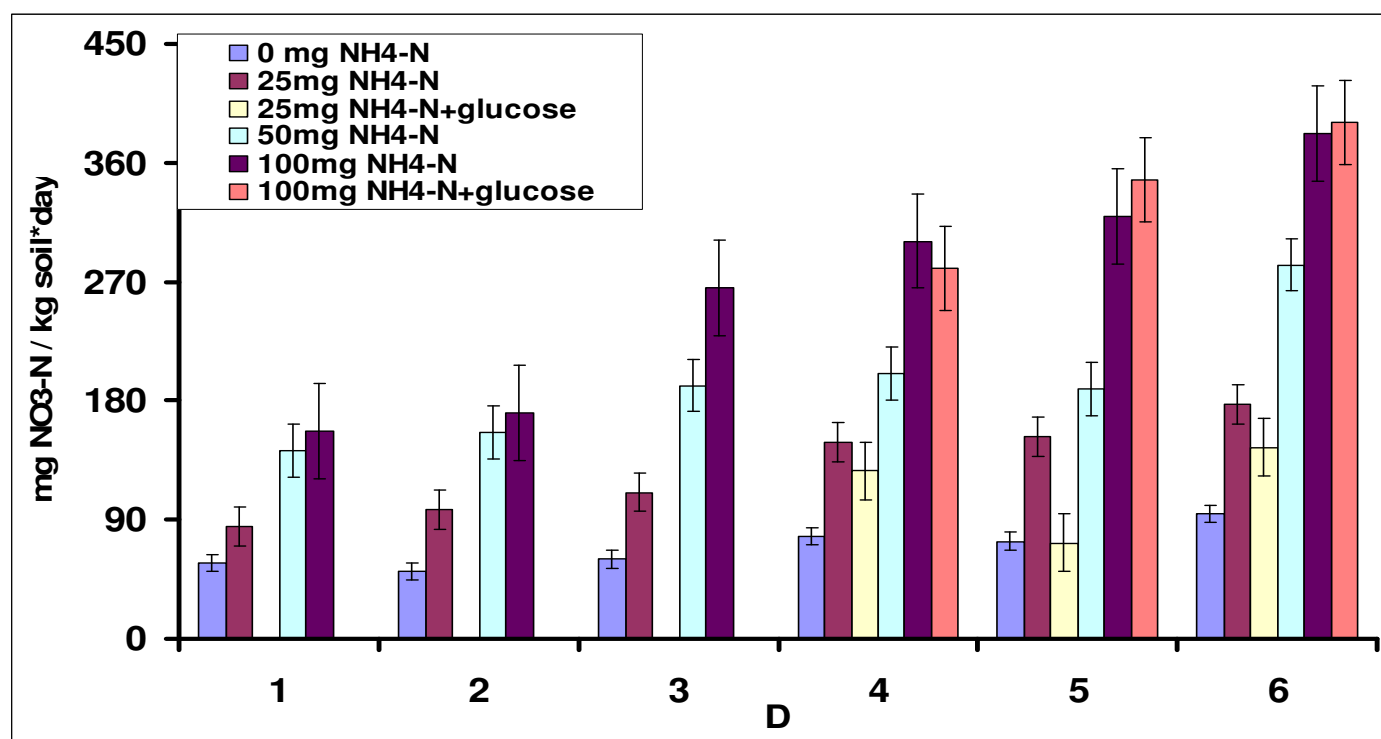
Στο Σχήμα 3.1 παρατηρείται αύξηση με σχετικά μικρούς ρυθμούς της συγκέντρωσης $\text{NH}_4^+\text{-N}$ καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην προσθήκη $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ως αποτέλεσμα της δυναμικής ισορροπίας του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με τα εδαφικά κολλοειδή και το εδαφικό διάλυμα. Η συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ παραμένει σταθερή στο έδαφος που δέχθηκε μόνο νερό. Εν συνεχεία φαίνεται ότι η κατανάλωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ συνέβη με μικρούς ρυθμούς στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 50 και 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Επίσης, δεν διαπιστώθηκε ισχυρή επίδραση της εφαρμογής γλυκόζης στην συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με εξαίρεση τα 25 mg/ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στην προτελευταία δειγματοληψία που πιθανότατα αποδίδεται σε πειραματικό λάθος. Τέλος στο έδαφος που δέχθηκε 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ υπάρχει αυξητική τάση με μικρό ρυθμό.



Σχήμα 3.1 : Συγκέντρωση $\text{NH}_4\text{-N}$ συναρτήσει του χρόνου

3.2 Συγκέντρωση NO_3^- συναρτήσει του χρόνου

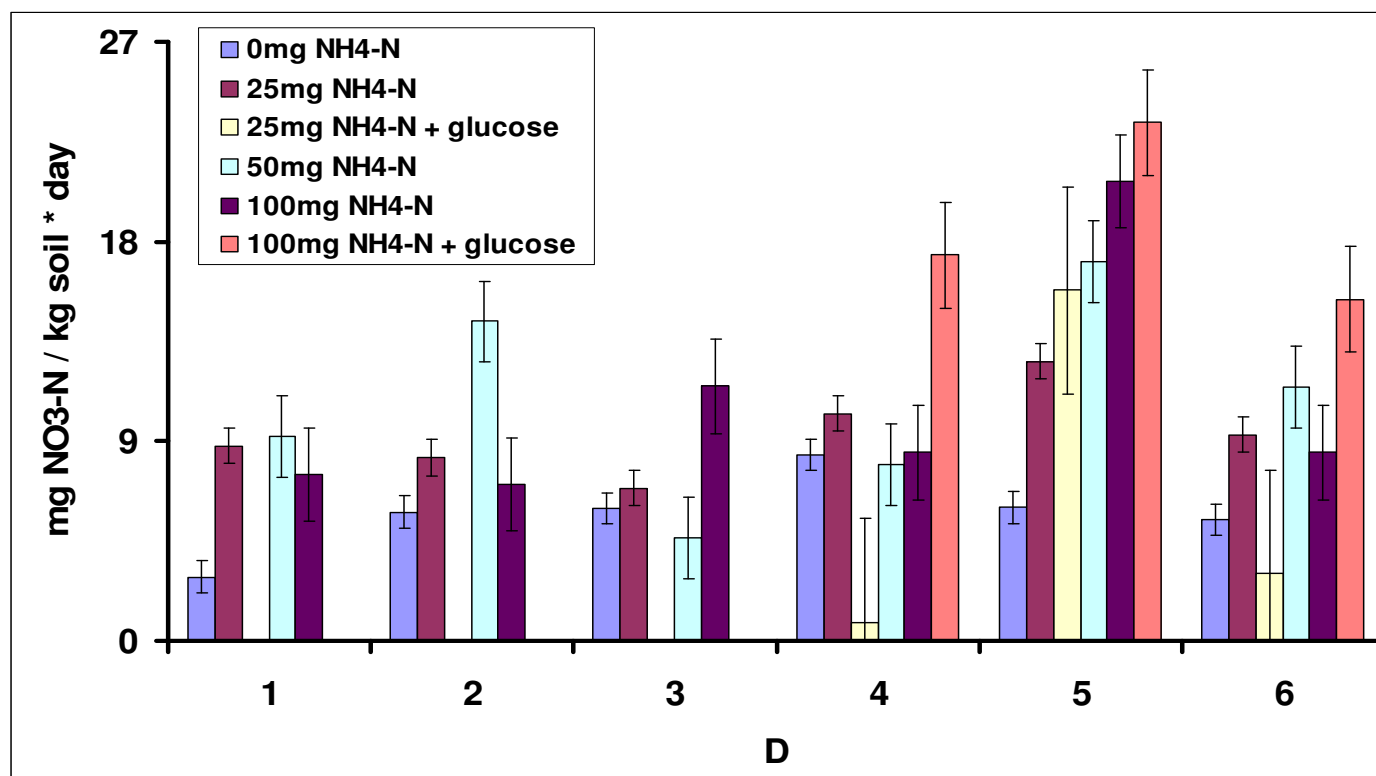
Η εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ είχε ως αποτέλεσμα τη βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης των $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ενώ στη μεταχείριση που δεν δέχθηκε εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή (Σχ. 3.2). Από ότι φαίνεται από το γράφημα η $\text{NH}_4^+\text{-N}$ μετατρέπεται με ταχείς ρυθμούς σε $\text{NO}_3^-\text{-N}$ αν και η αύξηση αυτή δεν είναι ανάλογη με την ποσότητα που εφαρμόζεται στο έδαφος. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι τα δείγματα που δεν δέχθηκαν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ διατήρησαν χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης $\text{NO}_3^-\text{-N}$, όπως ήταν αναμενόμενο. Τέλος δεν διαπιστώθηκε ισχυρή επίδραση της εφαρμογής γλυκόζης στην συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο έδαφος.



Σχήμα 3.2: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^-\text{-N}$ συναρτήσει του χρόνου

3.3 Καθαρός Ρυθμός Νιτροποίησης

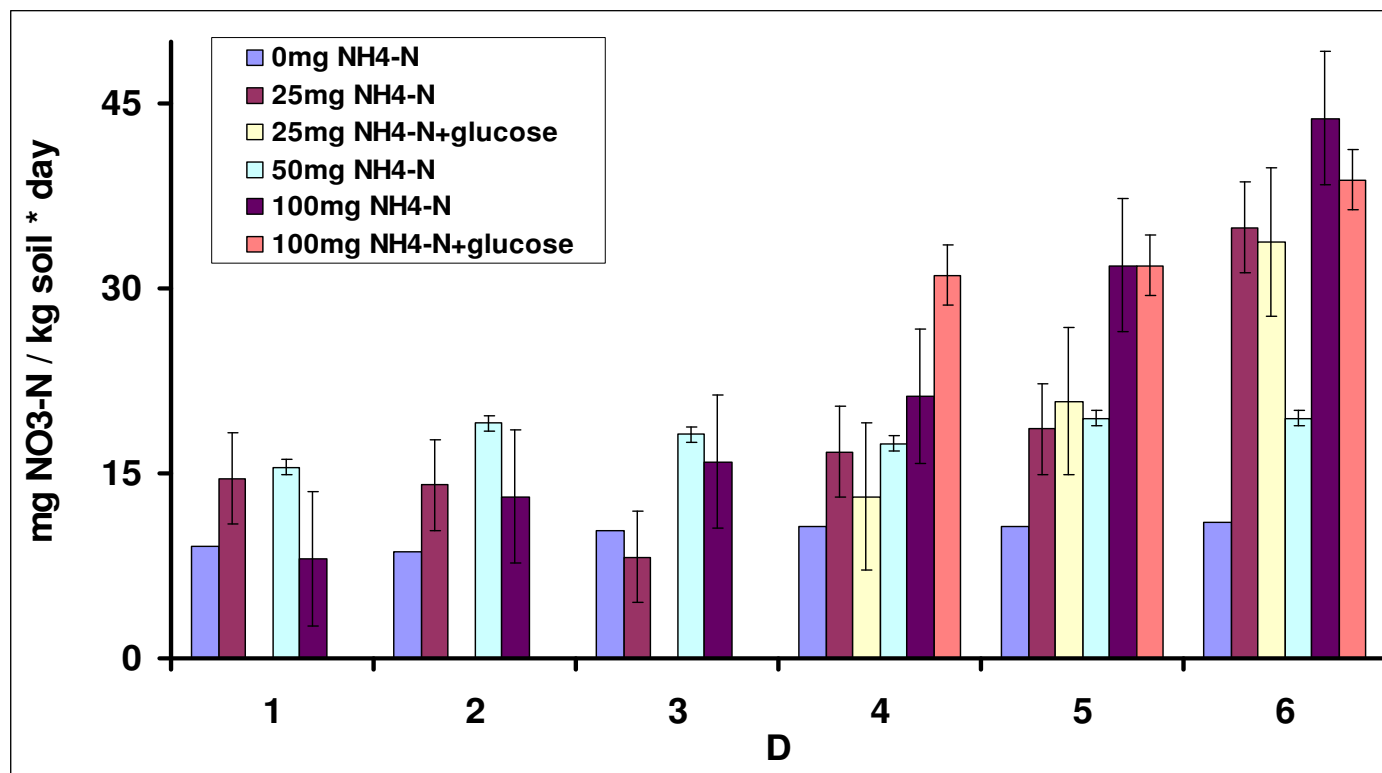
Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχ. 3.3) εμφανίζεται η μεταβολή του καθαρού ρυθμού νιτροποίησης συναρτήσει του χρόνου. Στα εδάφη που δεν δέχθηκαν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ δεν υπήρξαν αλλαγές στο ρυθμό νιτροποίησης, ενώ σε αυτά που δέχθηκαν τη μικρότερη ποσότητα, 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, παρατηρήθηκαν μικρές αυξομειώσεις. Στα εδάφη που εκτός από 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ δέχθηκαν και προσθήκη γλυκόζης βλέπουμε ότι ο ρυθμός στην 1^η και την 3^η κυμάνθηκε σε ίδια επίπεδα με αυτές που δέχθηκαν μόνο $\text{NH}_4^+\text{-N}$, ενώ στην 2^η είχαμε την μεγαλύτερη τιμή. Πιθανότατα η γλυκόζη σαν επιπλέον υπόστρωμα να ενεργοποίησε παραπάνω μ.ο. καταγράφοντας τον αυξημένο ρυθμό νιτροποίησης. Στα εδάφη που δέχθηκαν 50 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ παρατηρήθηκε μια απότομη πτώση στην 3^η και 4^η μέτρηση που ίσως οφείλεται σε σφάλμα της μέτρησης. Τέλος στα 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ αν και υπάρχει μια απότομη αύξηση στην 5^η διαχείριση, εν τέλει στην τελευταία μέτρηση έγινε επαναφορά στα αρχικά χαμηλά επίπεδα. Σε αντίθεση με αυτό τα εδάφη που δέχθηκαν εκτός από 100mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και γλυκόζη έδειξαν υψηλότερους ρυθμούς καθαρής νιτροποίησης.



Σχήμα 3.3: Καθαρός ρυθμός νιτροποίησης συναρτήσει του χρόνου

3.4 Ολικός Ρυθμός Νιτροποίησης

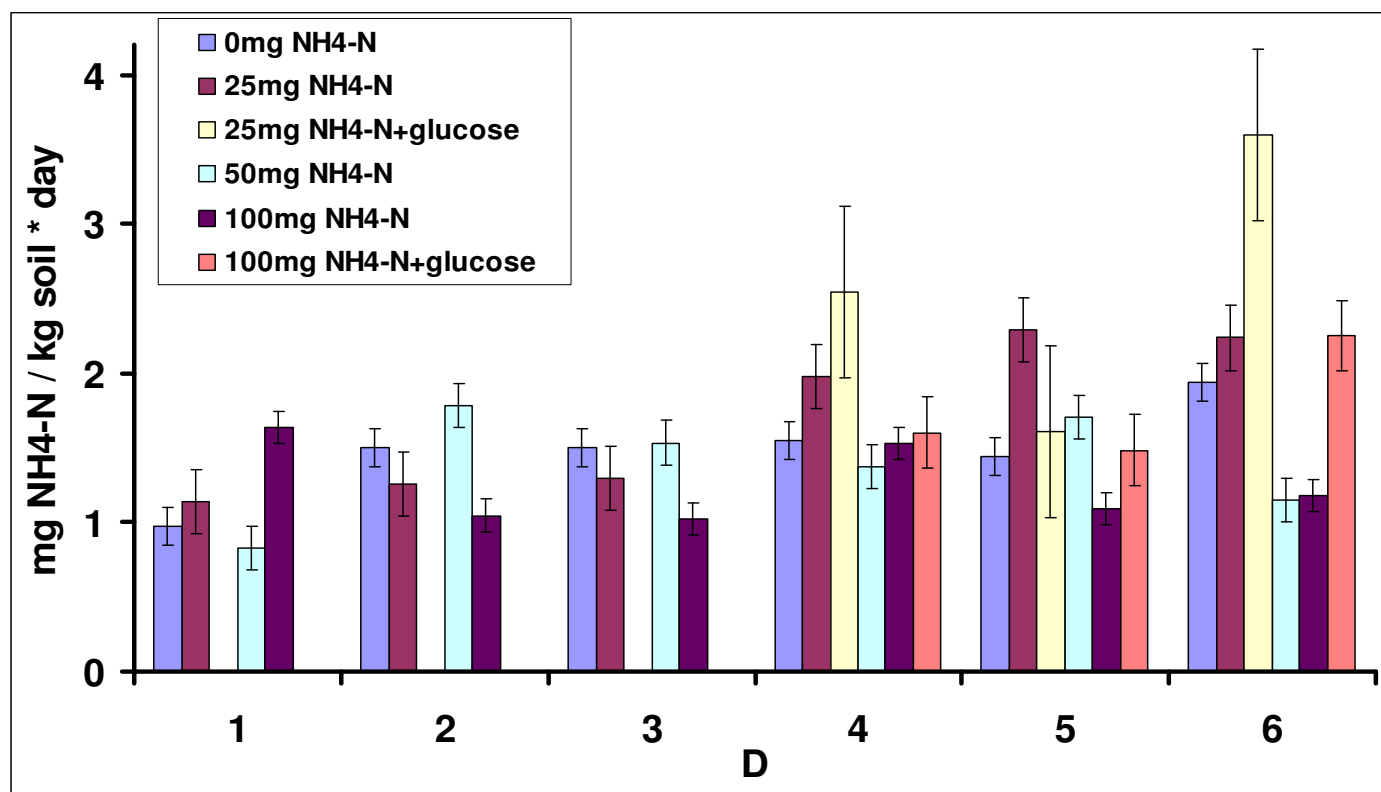
Στο παρακάτω Σχήμα παρατηρήθηκε ότι τα εδάφη που δέχθηκαν μόνο καθαρό νερό δεν είχαν μεταβολή στον ολικό ρυθμό νιτροποίησης, ενώ στο έδαφος που δέχθηκε μεταχείριση με 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ διαπιστώθηκε μια αύξηση του ρυθμού στις τελευταίες δειγματοληψίες. Στην μεταχείριση που δέχθηκε επίδραση 50 mg/ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ οι τιμές του ρυθμού νιτροποίησης δεν διαφοροποιήθηκαν συναρτήσει του χρόνου ενώ σε αυτές που δέχθηκαν 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ο καθαρός ρυθμός νιτροποίησης αυξήθηκε με χαμηλούς ρυθμούς με τον χρόνο. Οι τιμές του ολικού ρυθμού νιτροποίησης στις μεταχειρίσεις που δέχθηκαν και εφαρμογή γλυκόζης δεν διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες που δεν δέχθηκαν. (Σχ. 3.4)



Σχήμα 3.4: Ολικός ρυθμός νιτροποίησης συναρτήσει του χρόνου

3.5 Ολικός Ρυθμός Ανοργανοποίησης

Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζεται ο ολικός ρυθμός παραγωγής $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Γενικά, δεν διαπιστώθηκε σταθερή επίδραση στο ρυθμό νιτροποίησης από τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν. Στις μεταχειρίσεις που δεν έγινε εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ δεν υπήρξε μεταβολή, ενώ σε αυτές που προστέθηκαν 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ υπήρξε μια μικρή αύξηση του ρυθμού ανοργανοποίησης προς το τέλος του πειράματος. Η απότομη αύξηση κατά την τελευταία εφαρμογή γλυκόζης εξηγείται από το ότι προστέθηκε η διπλάσια ποσότητα που εφαρμόστηκε σε σχέση με τις δύο προηγούμενες φορές. Τέλος, στις μεταχειρίσεις που δέχθηκαν εφαρμογή 50 και 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ διαπιστώθηκε μικρότερος ρυθμός ανοργανοποίησης σε σχέση με τις μεταχειρίσεις που δεν δέχθηκαν $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ή δέχθηκαν μεταχείριση με 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Τέλος κατά την τελευταία δειγματοληψία στην μεταχείριση με 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και γλυκόζη παρατηρήθηκε αύξηση στον ρυθμό ανοργανοποίησης.

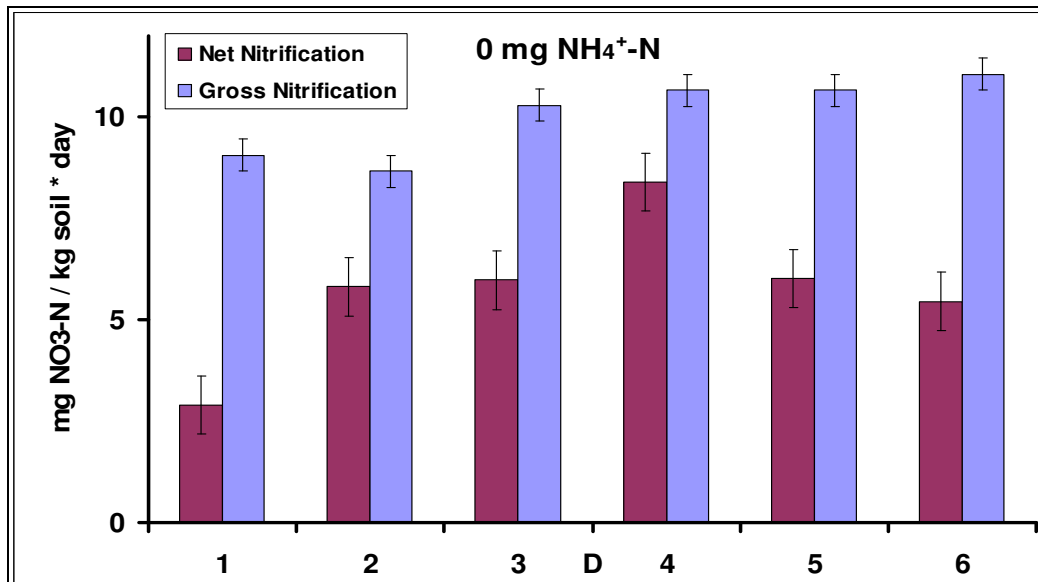


Σχήμα 3.5: Ολικός ρυθμός ανοργανοποίησης NH_4^+ συναρτήσει του χρόνου

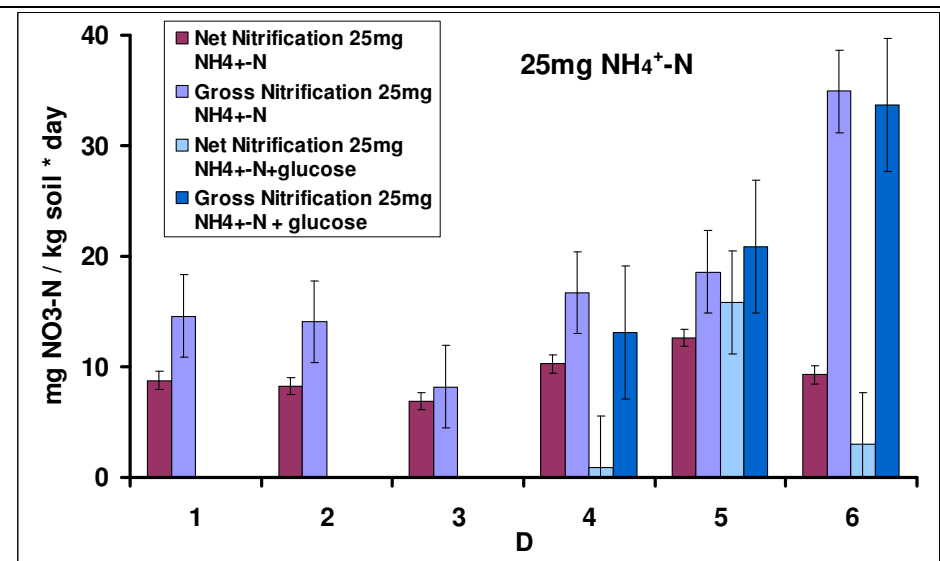
3.6 Σύγκριση Καθαρής και Συνολικής Νιτροποίησης

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων προκειμένου να γίνει σύγκριση του καθαρού και του ολικού ρυθμού νιτροποίησης. Για να γίνει πιο εύκολα κατανοητό αλλά και συγκρίσιμο αυτό τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω συγκεντρωμένα. Επίσης η ποσότητα του DCD που προστέθηκε, διπλασιάστηκε στην τελευταία μεταχείριση. Αυτό έγινε για να διαπιστωθεί αν η νιτροποίηση ανακόπτεται σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτό που είχε παρατηρηθεί ως εκείνη τη στιγμή.

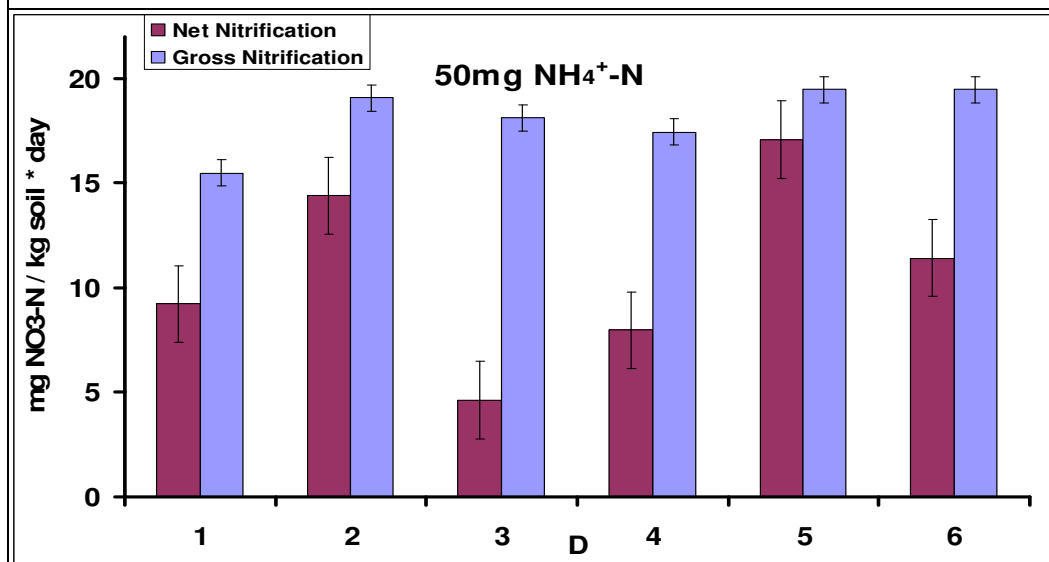
Στο Σχήμα 3.4.a παρουσιάζεται η διαφορά καθαρού και συνολικού ρυθμού νιτροποίησης σε εδάφη τα οποία δεν είχαν δεχθεί εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Όπως φαίνεται δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με την πάροδο του χρόνου και γενικά παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο μεταβολής. Στο Σχήμα 3.4.b παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις μεταχειρίσεις οι τιμές του καθαρού ρυθμού νιτροποίησης με αυτές του ολικού κυμάνθηκαν σε πολύ κοντινά επίπεδα. Εξαιρεση αποτελεί η τελευταία μέτρηση στην οποία πιθανολογείται ότι η διπλάσια ποσότητα παρεμποδιστή που προστέθηκε αναχαίτισε κατά πολύ τον ρυθμό της νιτροποίησης. Κάτι το οποίο φαίνεται και στην τελευταία μεταχείριση που δέχθηκε εκτός από 25 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και γλυκόζη. Στις δύο προηγούμενες δειγματοληψίες δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στις τιμές του ρυθμού, με εξαίρεση τον καθαρό ρυθμό νιτροποίησης της 1^{ης} μέτρησης στην οποία παρουσιάζεται σχετικά χαμηλός. Στο Σχήμα 3.4.c φαίνεται ότι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ο ολικός ρυθμός νιτροποίησης με ελάχιστες μεταβολές παρέμενε σε σταθερά επίπεδα. Αντίθετα με αυτό, ο καθαρός ρυθμός παρ' ότι αρχικά έδειξε αυξητικές τάσεις εν τούτοις στην 3^η αλλά και στην 4^η δειγματοληψία είχε απότομη πτώση. Τέλος, στο Σχήμα 3.4.d παρατηρείται ότι η μεταχειρίσεις οι οποίες δέχθηκαν εφαρμογή 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ παρουσίασαν αύξηση του συνολικού ρυθμού νιτροποίησης Στην τελευταία μεταχείριση η επιπλέον ποσότητα DCD ανέκοψε σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία της νιτροποίησης. Αυτό που διαπιστώνουμε στα εδάφη που δέχθηκαν και γλυκόζη είναι ότι δεν είχε τελικά κάποια ισχυρή επίδραση στον ολικό ή καθαρό ρυθμό νιτροποίησης.



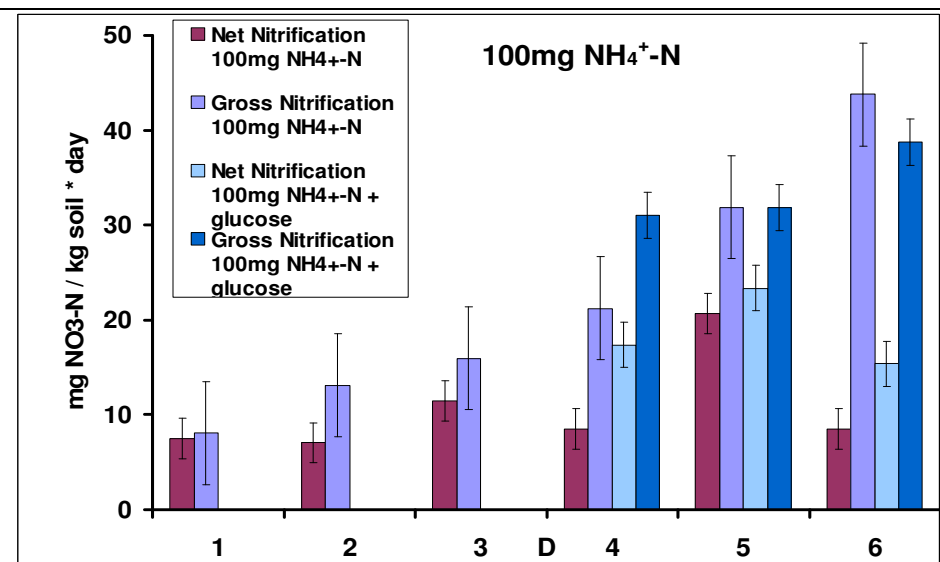
Σχήμα 3.4.a: Σχέση καθαρού και ολικού ρυθμού νιτροποίησης στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή νερού



Σχήμα 3.4.b: Σχέση καθαρού και ολικού ρυθμού νιτροποίησης στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 25 mg/kg NH₄⁺-N και 25mg/kg NH₄⁺-N και γλυκόζη



Σχήμα 3.4.c: Σχέση καθαρού και ολικού ρυθμού νιτροποίησης στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 50 mg/kg NH₄⁺-N



Σχήμα 3.4.d: Σχέση καθαρού και ολικού ρυθμού νιτροποίησης στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 100 mg/kg NH₄⁺-N και 100mg/kg NH₄⁺-N και γλυκόζη

ΕΝΟΤΗΤΑ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Παρεμποδιστές νιτροποίησης

Η νιτροποίηση είναι μια βασική διεργασία στα γεωργικά οικοσυστήματα επειδή η μετατροπή της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε $\text{NO}_3^-\text{-N}$ μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες του N. Ο έλεγχος του κύκλου του N εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση καθώς αποτελεί περιοριστικό παράγοντα και επηρεάζει άμεσα την παραγωγικότητα των εδαφών. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μηχανισμοί έτσι ώστε να περιορίζονται οι απώλειες του N, μέσω του ελέγχου του ποσοστού νιτροποίησης και να χρησιμοποιείται το N πιο αποτελεσματικά στην παραγωγικότητα και στη σταθερότητα των οικοσυστημάτων. Υπάρχουν πολλά συστατικά που έχουν προταθεί να χρησιμοποιηθούν ως παρεμποδιστές νιτροποίησης, ωστόσο λίγα έχουν αξιολογηθεί στο πεδίο ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Η επιλογή του DCD έγινε λόγω του είναι ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα συστατικά και το ότι θεωρείται ένας από τους φιλικότερους για το περιβάλλον αναστολείς νιτροποίησης (O'Callaghana et al., 2010, Chen et al., 2008). Η αποτελεσματικότητα της δράσης του DCD εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την υγρασία κάτι το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο χρόνο ημίσειας ζωής του (Williamson et al., 1996 Kelliher et al., 2008). Η παρουσία του DCD, οδηγεί σε μια αναστολή της νιτροποίησης με αποτέλεσμα την συσσώρευση του αμμωνίου (Kelliher et al., 2008). Τα ευρήματά της παρούσας εργασίας αποκαλύπτουν την ισχυρή επίδραση που έχει το DCD ως παρεμποδιστής νιτροποίησης ανακόπτοντας τη διαδικασία της νιτροποίησης και μειώνοντας τις απώλειες N από το έδαφος. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με πρόσφατες εργασίες, οι οποίες δείχνουν ότι η ορθή εφαρμογή αναστολέων νιτροποίησης επηρεάζει σημαντικά τον κύκλο του N στο έδαφος παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο διαθέσιμο N για ανάπτυξη μικροοργανισμών και φυτών [O'Connor et al (2012), O'Callaghana et al. (2010), Kelliher et al., (2008)].

4.2 NO₃-N και NH₄-N του εδάφους

Η εφαρμογή NH₄⁺-N στο έδαφος θεωρείται ότι επέδρασε θετικά καθώς αυξήθηκε ο πληθυσμός αλλά και η μικροβιακή δραστηριότητα. Παρά την εφαρμογή NH₄⁺-N στο έδαφος ανά τακτά χρονικά διαστήματα οι συγκεντρώσεις NH₄⁺-N και NO₃⁻-N (Σχήματα 3.1, 3.2) δεν αυξάνονται με τον αναμενόμενο ρυθμό. Όσον αφορά στην συγκέντρωση των NH₄⁺-N συναρτήσει του χρόνου (Σχήμα 3.1) αυτό που παρατηρούμε είναι ότι αν εξαιρεθούν οι μεταχειρίσεις που δέχθηκαν 100 mg/kg NH₄⁺-N, οι υπόλοιπες μετρήσεις κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα. Αυτό που παρατηρήθηκε σε όλα τα παραπάνω σχήματα είναι ότι δεν υπήρξε μεταβολή των συγκεντρώσεων NH₄⁺-N και NO₃⁻-N στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή νερού. Όσον αφορά στα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 25 mg/kg NH₄⁺-N παρ' όλο που αναμενόταν υψηλότερες τιμές στο ρυθμό νιτροποίησης εν τούτοις υπάρχει διαφορά και φαίνεται σε σχέση με τα εδάφη που δέχθηκαν μόνο νερό (Σχήματα 3.4.a, 3.4.b). Αυτό βέβαια που περιμέναμε ήταν μια περαιτέρω αύξηση στα εδάφη που δέχθηκαν μαζί με την NH₄⁺-N και εφαρμογή γλυκόζης κάτι το οποίο φάνηκε κυρίως στην τελευταία μεταχείριση όπου η ποσότητα γλυκόζης που εφαρμόστηκε αυξήθηκε (Σχήματα 3.4.b, 3.4.d). Η παραπάνω υπόθεση επαληθεύεται από τους υψηλούς ρυθμούς ανοργανοποίησης που μετρήθηκαν στο έδαφος που δέχθηκε σαν επιπλέον υπόστρωμα, τη γλυκόζη (Σχήμα 3.5). Κατά την τελευταία μεταχείριση στο έδαφος εφαρμόστηκε διπλάσια ποσότητα παρεμποδιστή, κάτι το οποίο ανέκοψε σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στις προηγούμενες μεταχειρίσεις τη διαδικασία της νιτροποίησης (Σχήματα 3.4.a, 3.4.b, 3.4.c, 3.4.d) Αυτό επιβεβαιώνεται και από έρευνες ότι δηλαδή η ποσότητα του παρεμποδιστή αλλά και οι συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον κατά την εφαρμογή του παίζουν καθοριστικό ρόλο (Kelliher et al., (2008), O'Callaghan et al. (2010)).

ΕΝΟΤΗΤΑ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η εφαρμογή παρεμποδιστών νιτροποίησης σε χερσαία εδάφη ενδείκνυται και προσφέρει πολλαπλά οφέλη. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι ο παρεμποδιστής καταστέλλει, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη ποσότητα, τον ρυθμό νιτροποίησης και ότι το επιπλέον υπόστρωμα βοηθά στην ανάπτυξη και την ενεργοποίηση των βακτηρίων του εδάφους, επιταχύνοντας τη διαδικασία της νιτροποίησης. Τα οφέλη από την χρήση του παρεμποδιστή DCD θα μετριάσουν τα προβλήματα έκλυσης NO_3^- -N και τις εκπομπές NO και N_2O στα χερσαία εδάφη. Ελαττωμένη νιτροποίηση σημαίνει υψηλή συγκέντρωση NH_4^+ -N στο έδαφος και αυτό με τη σειρά του αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Μείωση των απωλειών N_2 σημαίνει ακόμη μείωση της καταναλισκόμενης ενέργειας τόσο από την παραγωγή όσο και από τη μεταφορά αζωτούχων λιπασμάτων. Επίσης σημαντικό είναι το χρηματικό όφελος των παραγωγών (το κόστος για την εφαρμογή σε καλλιέργεια του παρεμποδιστή νιτροποίησης DCD κυμαίνεται από 19-27 €/ha, κόστος το οποίο αγγίζει το 30-40% του συνολικού κόστους λιπάσματος) τόσο από την μικρότερη απαιτούμενη ποσότητα λιπασμάτων αλλά και την μικρότερη συχνότητα εφαρμογής αζωτούχου λίπανσης στην καλλιέργεια. Τέλος τα αποτελέσματα της εργασίας αναδεικνύουν την ανάγκη για περεταίρω έρευνα και μελέτη πάνω στην ορθή χρήση των παρεμποδιστών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σαν διαχειριστικό εργαλείο του N_2 στις καλλιέργειες παρέχοντας οικολογικό και οικονομικό όφελος.

ΕΝΟΤΗΤΑ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 48:835-852.
- Barton, L., McLay, C.D.A., Schipper, L.A., Smith, C.T. (1999) "Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: A review." *Australian Journal of Soil Research.* 37 (6):1073-1093.
- Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR (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
- Bock E. (1970). Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Licht und Chemosynthese am Beispiel von *Nitrobacter winogradskyi* *Arch. Mikrobiol.* 70:217–239.
- Braker R., and G. Conrad. (2011) "Diversity, Structure, and Size of N₂O-Producing Microbial Communities in Soils—What Matters for Their Functioning?" *Advances in Applied Microbiology* vol75. London: Elsevier Inc., 33-70.
- Breuer, L., Kiese, R., and Butterbach-Bahl, K.: Temperature and moisture effects on nitrification rates in tropical rain-forest soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 66, 834–844, 2002.
- Cai, Y., Ding, W., Zhang, X., Yu, H., and Wang, L. (2010) "Contribution of heterotrophic nitrification to nitrous oxide production in a long-term N-fertilized arable black soil." *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41: 2264–2278.
- 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.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P.J.A., Troelstra, S.R., 1990. Nitrification in Dutch heathland soils. II. Characteristics of nitrate production. *Plant and Soil* 127, 193-200.
- De Boer, W., Tietema, A., Klein Gunnewick, P.J.A., 1992. The chemolithotrophic ammonium-oxidizing community in a nitrogen saturated acid forest in relation to pH-dependent nitrifying activity. *Soil Biology & Biochemistry* 24, 229–234.
- Engle M.S. και Akexander M. (1958). Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europae*. *J. Bact.* 76:217.
- Finlay, R.D., A. Frostegard, A.M. Sonnerfeldt. (1992) "Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *pinus contorta* Dougl. ex Loud." *New Phytologist.* 120:105-115.

- Firestone, M. K., and Davidson, E. A. (1989). "Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil". In "Trace Gas Exchange between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere" (M. D. Andreae and D. S. Schimel, eds.), pp. 7–22. Wiley, Berlin.
- Godde, M., and Conrad, R. (2000). Influence of soil properties on the turnover of nitric oxide and nitrous oxide by nitrification and denitrification at constant temperature and moisture. *Biol. Fertil. Soils* 32, 120–128.
- Hankinson T.R. και Schmidt E.L. (1988). An Acidophilic and a Neutrophilic Nitrobacter Strain Isolated from the Numerically Predominant Nitrite-Oxidizing Population of an Acid Forest Soil. *Appl Environ Microbiol.* 54(6):1536–1540.
- 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. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum, eds.), pp. 985–1018. Soil Science Society America, Madison, WI.
- Hodge A., Robinson D., Fitter A. 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science*, 5: 304-308.
- Högberg, M.N., Höberg, P., Myrold, D.D., 2007a. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia* 150, 590e601.
- Humbert, S., S. Tarnawski, N. Fromin, M.F. Mallet, M. Aragno and J. Zopfi. (2010) "Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity." *The ISME Journal*. 4:450-454.
- 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.
- Jackson, L. E., M. Burger, and T. R. Cavagnaro. (2008) "Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services." *Annual Review of Plant Biology*. 59: 341–363.
- Juliastuti S.R., Baeyens J., Creemers C., Bixio D. και Lodewyckx E. (2003). The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge. *Journal of Hazardous Materials B* 100:271–283.
- Kelliher, F.M., Clough, T.J., Clark, H., Rys, G., Sedcole, J.R., 2008. The temperature dependence of dicyandiamide (DCD) degradation in soils: a data synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1878e1882.
- Kemmitt, S.J., Wright, D., Goulding, K.W.T., Jones, D.L., 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 898e911.

- Kim, B.K., M.Y. Jung, D.S. Yu, S.J. Park, T.K. Oh, S.K. Rhee and J.F. Kim. (2011) "Genome Sequence of an Ammonia-Oxidizing Soil Archaeon, "Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis" MY1." *Journal of Bacteriology*. 5539–5540.
- Knicker Heike , 2011 Soil organic N - An under-rated player for C sequestration in soils
- Konneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury and D.A. Stahl (2005) "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon." *Nature*. 437:543-546.
- Linn, D. M., and Doran, J. W. (1984). "Effect of water-filled pore space on CO₂ and N₂O production in tilled and non-tilled soils". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1267–1272.
- Lipschultz, F., O.C. Zafiriou, F.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois and S.W. Watson. (1981) "Production of NO and N₂O by nitrifying bacteria ." *Nature*. 294:641-643.
- Maureen O' Callaghan^a, Tracey Nelson^a, Richard Lardner^b, Philip Carter^b, Emily Gerard^a and Mike Brownbridge 2010, Non-target impacts of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil biota
- McCarty W. G. 1999 Modes of Action of Nitrification Inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29:1-9.
- McCarty G.W. and Bremner J.M. (1989). Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds. *Biol. Fertil. Soils* 8:204–211.
- Meding, S.M., Morris, L.A., Hoover, C.M., Nutter, W.L., Cabrera, M.L. (2001) "Denitrification at a long-term forested land treatment system in the Piedmont of Georgia." *Journal of Environmental Quality*. 30 (4):1411-1420.
- Mulder, A., A.A. van de Graaf, L.A. Robertson and J.G. Kuenen. (2006) "Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor." *FEMS Microbiology Ecology*. (16)3: 177–184.
- Murphy, D. V., Recous, S., Stockdale, E. A., Fillery, I. R. P., Jensen, L. S., Hatch, D. J., and Goulding, K. W. T. (2003). Gross nitrogen fluxes in soil: Theory, measurement and application of N-15 pool dilution techniques. *Adv. Agron.* 79, 69–118.
- Neff JC, Chapin FS III, Vitousek PM. (2003). Breaks in the cycle: dissolved organic nitrogen in terrestrial ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 1: 205–211
- Nugroho, R.A., Rölting, W.F.M., Laverman, A.M., Verhoef, H.A., 2007. Low nitrification rates in acid Scots pine forest soils are due to pH-related factors. *Microbial Ecology* 53, 89e97
- Nyhuis G. (1985). Beitrag zu den Möglichkeiten der Abwasserbehandlung bei Abwässern mit erhöhten Stickstoffkonzentrationen. Veröffentlichungen des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover, Heft 61.
- O'Callaghan Maureen ^{a,*}, Emily M. Gerard ^a, Philip E. Carter ^b, Richard Lardner ^b, Upali Sarathchandra ^c, Gabriela Burch ^c, Anwar Ghani ^c, Nigel Bell. (2010) Effect of

the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine.

O'Connor, P.J., D. Hennessy, C. Brophy, M. O'Donovan, M.B. Lynch (2012) The effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on herbage production when applied at different times and rates in the autumn and winter

Prosser, J.I., W.N. Graeme. (2008) "relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment." *Environmental Microbiology*. 10(11):2931-2941.

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

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.

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

Robertson, G.P., 1982. Factors regulating nitrification in primary and secondary succession. *Ecology* 63, 1561-1573.

Rosswall, T. (1981) "The Biogeochemical Nitrogen Cycle." in *Some Perspectives of the Major Biogeochemical Cycles*. Stockholm, Sweden: John Wiley & Sons. 25-49.

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1589-1596.

Samuel L. Tisdale, Werner L. Nelson, James D. Beaton, John L. Havlin., 1993: *Soil Fertility and Fertilizers*, Fifth Edition, Macmillan Publishing Company.

Schmidt, E. L., and Belser, L. W. (1994). Autotrophic nitrifying bacteria. In "Methods of Soil Analysis. Part 2, Microbiological and Biochemical Properties," (R. Weaver, S. Angle, P. J. Bottomley, D. Bezdicsek, S. J. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum, eds.), pp. 159-177. Soil Science Society America, Madison, WI.

Sheldon Tarre and Michal Green* High-Rate Nitrification at Low pH in Suspended- and Attached-Biomass Reactors 2004

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.

Stark, J. M. (2000). Nutrient transformations. In "Methods in Ecosystem Science," (O. E. Sala, R. B. Jackson, H. A. Mooney, and R. W. Howarth, eds.), pp. 215–234. Springer-Verlag, New York.

Stark, J.M., Hart, S.C., 1997. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 385, 61–64.

Ste-Marie, C., Pare, D., 1999. Soil, pH and N availability effects on net nitrification in the forest floors of a range of boreal forest stands. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1579-1589.

Stentiford E. I. (1995). Composting control: principles and practice. In "The Science of Composting" (Eds: de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T.). Blackie Academic and Professional. Glasgow. Scotland. 1: 49 – 59.

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.

Sutton A., 2005 Urease and Nitrification Inhibitors

Tietema, A., Warmerdam, B., Lenting, E., Riemer, L., 1992. Abiotic factors regulating nitrogen transformations in the organic layer of acid forest soils: moisture and pH. *Plant and Soil* 147, 69e78.

Treusch, A.H., S. Leininger, A. Kletzin, S.C. Schuster, H.P. Klenk and C. Schleper. (2005) "Novel genes nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling." *Environmental Microbiology*. 7:1985-1995.

Turnbull, M.H., R. Goodball, G.R. Stewart. (1995) "The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook." *Plant, Cell and Environment*. 18:1386-1394.

Watson S.W. (1971). Taxonomic considerations of the family Nitrobacteriaceae Buchanan. Request for opinions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:254-270.

Wild H.E., Sawyer C.N. and McMahon, T.C. (1971). Factors Affecting Nitrification Kinetics. *J. Water Pollut. Control Fed.* 43:1845-1854.

Williamson Julie C., J.C.Menneer, R.S Torrens (1996), Impact of dicyandiamide on the internal nitrogen cycle of a volcanic, silt loam soil receiving effluent.

Zacherl B. & Amberger A., Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea* 1990

Zaman, M., Di, H. J., Cameron, K. C., and Frampton, C. M.: Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials, Biol. Fert. Soils, 29, 178–186, 1999

Αναλογίδης Α. Δ. 2000 Έδαφος, θρεπτικά στοιχεία και φυτική παραγωγή. Εκδόσεις ΑΓΡΟ-τύπος Α.Ε., Αθήνα.

Τσαντήλας Χ. και Ευαγγέλου Λ, 2010, Σχέσεις Χημικών χαρακτηριστικών του εδάφους και αερίων του θερμοκηπίου

Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, Κ.Α. (2003) "Μεταβολισμός του Αζώτου." σε Φυσιολογία Φυτών - απο το μόριο στο περιβάλλον. Ηράκλειο, Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 259-308.

Χατζημπίρος Κ. 2001 Οικολογία , Οικοσυστήματα και προστασία περιβάλλοντος, Εκδόσεις Συμμετρία Αθήνα