

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ**

**Αξιολόγηση της επίδρασης συνθετικών και βοτανικής
προέλευσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη
μικροβιακή κοινότητα του εδάφους**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Σπύρου Ιωάννα-Μαρία
Γεωπόνος**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Ουρανία Μενκίσογλου-Σπυρούδη**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Ο.Μενκίσογλου-Σπυρούδη
Ε.Παπαδοπούλου-Μουρκίδου
Δ.Καρπούζας**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2008

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια κα. Ο. Μενκίσογλου – Σπυρούδη για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής μου διατριβής, την καθοδήγηση της στην εκτέλεση των πειραμάτων, τη συγγραφή και τις διορθώσεις στο κείμενο της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ την καθηγήτρια κα. Ε. Παπαδοπούλου – Μουρκίδου για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον λέκτορα κ. Δ. Καρπούζα για την πολύ σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή, στη διόρθωση του κειμένου της μεταπτυχιακής μου διατριβής και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Τον ευχαριστώ και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες κα. Κ. Σουνά, για την καθοδήγηση μου μέσα στο εργαστήριο και την εκμάθηση του χειρισμού του χρωματογράφου, κα. Ντάλλη Ν. και κ. Μ. Καραζαφείρη για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και το προσωπικό των εργαστηρίων Γεωργικών φαρμάκων, Γεωργικής Χημείας και Εδαφολογίας, για τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία τους κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού κύκλου των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξη στην απόφαση μου αυτή να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές σπουδές μου και την ανεκτίμητη βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1. Φυτοπροστατευτικές ουσίες	3
1.1.1. Τύχη και συμπεριφορά των Φ.Ο. στο έδαφος.....	3
1.1.2. Διεργασίες διάσπασης / αποδόμησης.....	4
1.1.2.1. Αβιοτική διάσπαση.....	4
1.1.2.2. Μικροβιακή αποδόμηση.....	5
1.2. Οι μικροοργανισμοί	7
1.3. Μικροβιακά κύτταρα	7
1.3.1. Κυτταροπλασματική μεμβράνη και φωσφολιπίδια.....	8
1.3.2. Κυτταρικό τοίχωμα των προκαρυωτών.....	10
1.4. Αλληλεπίδραση μικροοργανισμών και εδάφους μετά από εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών	12
1.5. Τεχνικές για τη μέτρηση των επιδράσεων γεωργικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους	16
1.5.1. Τεχνική ανάλυσης και προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (PLFAs).....	19
1.5.1.1. PLFAs που χαρακτηρίζουν ομάδες μικροοργανισμών.....	21
1.5.1.2. Αξιολόγηση των PLFAs ως βιοδείκτες.....	24
1.5.1.3. Τα PLFAs, ως βιοδείκτες έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες.....	25

1.6. Επίδραση των συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη μικροβιακή κοινότητα.....	28
1.6.1. Fosthiazate.....	32
1.6.2. Επίδραση καπνιστικών Φ.Ο. στη μικροκοινότητα του εδάφους.....	33
1.6.2.1. Sodium Tetrathiocarbonate.....	35
1.6.2.2. Metham Sodium.....	35
1.7. Εφαρμογή βοτανικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	36
1.7.1. Azadirachtin/Neem.....	37
1.7.2. Quillajia.....	38
1.7.3. Melia azedarach.....	38
1.9. Ερευνητικοί σκοποί.....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1. Επιλογή πειραματικού αγρού-εδάφους.....	41
2.1.1. Θέσεις δειγματοληψίας και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους.....	41
2.2. Μετρήσεις και Πειράματα.....	42
2.2.1. Μετρήσεις εδαφολογικών χαρακτηριστικών.....	42
2.2.1.1. Προσδιορισμός του pH των εδαφών.....	42
2.2.1.2. Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών.....	43
2.2.2. Συνολική Βιομάζα των εδαφών.....	43
2.2.3. Πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες.....	45
2.2.3.1. Περιγραφή του πειράματος.....	45

2.2.4. Πείραμα αγρού.....	47
2.2.5. Φ.Π. που εφαρμόστηκαν και υπολογισμός των ποσοτήτων.....	50
2.2.6. Αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των PLFAs.....	52
2.2.6.1. Αντιδραστήρια.....	52
2.2.6.2. Υλικά και όργανα.....	52
2.2.6.3. Εστεροποίηση του δεκαεννεασικού οξέος (19:0).....	53
2.2.6.4. Περιγραφή μεθόδου για τον προσδιορισμό των PLFAs.....	54
2.2.6.5. Αέριος χρωματογραφία (GC).....	56
2.2.7. Καμπύλες αναφοράς.....	57
2.2.8. Πειράματα ανάκτησης.....	58
2.2.9. Αντικατάσταση χλωροφορμίου από διχλωρομεθάνιο.....	58
2.3. Στατιστική ανάλυση.....	59
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
3.1. Μετρήσεις μικροβιακής βιομάζας.....	61
3.1.1. Πρότυπη καμπύλη λευκίνης.....	61
3.1.2. Πείραμα σε ελεγχόμενες συνθήκες.....	62
3.1.3. Πείραμα αγρού.....	63
3.2. Μέθοδος προσδιορισμού των PLFAs.....	65
3.2.1. Καμπύλη αναφοράς του C ₁₉ -Me.....	65
3.2.2. Πειράματα ανάκτησης του C ₁₉ -Me.....	66
3.2.3. Ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου.....	66

3.2.4. Χρήση διχλωρομεθανίου σε αντικατάσταση του χλωροφορμίου στην μέθοδο PLFAs.....	68
3.2.5. Ανάλυση των PLFAs.....	68
3.2.2. Στατιστική ανάλυση.....	72
3.2.2.1. Πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες.....	72
3.2.2.2. Πείραμα αγρού.....	91
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	108
5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	111
SUMMARY.....	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

αφιερωμένο στον Κλεάνθη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) metham sodium (MS), sodium tetrathiocarbonate (SoTe), fosthiazate και των Φ.Π. βοτανικής προέλευσης azadirachtin, quillajia καθώς και του φυτού *Melia azedarach* στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους. Οι επιδράσεις των Φ.Π. στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους μελετήθηκαν με τη μέθοδο προσδιορισμού λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) σε πειράματα εργαστηρίου και αγρού όπου τα Φ.Π. εφαρμόστηκαν στις προτεινόμενες δόσεις. Η εκχύλιση των PLFAs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στηλών οξειδίου πυριτίου (Solid Phase Extraction, SPE-Si) και ακολούθησε χημική επεξεργασία, ώστε να προκύψουν οι αντίστοιχοι μεθυλεστέρες. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή Ιονισμού Φλογός (FID). Οι ανακτήσεις των PLFAs κυμάνθηκαν από 91 ως 95,25%. Τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν με την στατιστική μέθοδο ανάλυσης των Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis).

Τα Φ.Π βοτανικής προέλευσης (Quillajia, Azadirachtin) δεν προκάλεσαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ το οργανοφωσφορικό fosthiazate προκάλεσε μικρή μείωση των μικροβιακών PLFAs. Για το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή αλεσμένου-ξηρού καρπού από το φυτό *Melia azadirachta* προκάλεσε σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στη μικροβιακή κοινότητα που οφείλονται στην σημαντική αύξηση των μυκήτων και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που ευνοήθηκαν από την περίσσεια θρεπτικών στοιχείων που ελευθερώθηκαν στο έδαφος από την προσθήκη αλεσμένου-ξηρού καρπού *Melia*. Η εφαρμογή του καπνιστικού MS μείωσε σημαντικά την συγκέντρωση των μικροβιακών PLFAs στο έδαφος, καθώς και τον πληθυσμό των μυκήτων και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ αντίθετα ευνόησε την επικράτηση θετικών κατά Gram βακτηρίων. Οι επιδράσεις του metham sodium στην μικροβιακή κοινότητα δεν ήταν πλέον εμφανής 60 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Για το πείραμα αγρού τα Φ.Π. βοτανικής προέλευσης (Quillajia, Azadirachtin) δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους σε

σχέση με τον μάρτυρα. Τα καπνιστικά MS και SoTe προκάλεσαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που ήταν ανάλογες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο πείραμα εργαστηρίου αλλά διατηρήθηκαν εμφανής για τουλάχιστον 90 ημέρες, όση και η διάρκεια του πειράματος. Το οργανοφωσφορικό fosthiazate προκάλεσε μια μικρή ποσοτική και ποιοτική μεταβολή στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μετά από 30 ημέρες.

Συμπερασματικά τα βοτανικά Φ.Π. όταν χρησιμοποιηθούν στις προτεινόμενες δόσεις δεν φαίνεται να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους σε αντίθεση με τα καπνιστικά όπως το MS που προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φυτοπροστατευτικές ουσίες

Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες (Φ.Ο.) αποτελούν βασικό παράγοντα της σύγχρονης γεωργικής πρακτικής καθώς η ορθολογική χρήση τους είναι απαραίτητη για αυξημένη ποιοτικά και ποσοτικά παραγωγή γεωργικών προϊόντων. Από την άλλη πλευρά η μη ορθή εφαρμογή τους αυξάνει τον κίνδυνο ρύπανσης του περιβάλλοντος, και αυτό επιβεβαιώνεται από τη συχνή ανίχνευση τους στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα. Η τύχη των Φ.Ο. στο περιβάλλον και ειδικότερα στο έδαφος επηρεάζεται από ποικίλες διεργασίες και αποτελεί αντικείμενο μελέτης και έρευνας, διότι καθορίζει την υπολειμματικότητα τους σε αυτό, την κίνηση και μεταφορά τους σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα καθώς επίσης και τις επιδράσεις τους στο οικοσύστημα του εδάφους. Σημαντικός αριθμός Φ.Ο. αν και εφαρμόζονται στις προτεινόμενες δόσεις καταλήγουν στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα (Pimentel, 2005). Οι κύριες ανησυχίες είναι δύο. Αρχικά το 50% του πληθυσμού αντλεί πόσιμο νερό από το έδαφος προκειμένου να καλύψει τις ανάγκες του. Επιπλέον όμως και το έδαφος μπορεί να είναι επιβαρυνμένο με υπολείμματα Φ.Ο., ενώ παράλληλα έχει διαταραχθεί η ισορροπία και οι μικροοργανισμοί σε αυτό δεν είναι αρκετοί, ώστε να μειώσουν τις ποσότητες των υπολειμμάτων (Pimentel, 2005).

1.1.1. Τύχη και συμπεριφορά των Φ.Ο. στο έδαφος

Οι διεργασίες που επηρεάζουν την τύχη των Φ.Ο. ύστερα από την εφαρμογή τους στο έδαφος μπορούν να διαχωριστούν σε χημικές, μηχανικές ή μικροβιακές. Στις χημικές διεργασίες συμπεριλαμβάνονται η προσρόφηση/εκρόφηση (absorption), η εξάτμιση (evaporation), η φωτόλυση (photolysis) και άλλες αβιοτικές οδοί διάσπασης, ενώ στις μηχανικές η έκπλυση (leaching) (Walker 1994), η οριζόντια ενδορροή (lateral drainage), η επιφανειακή απορροή (surface run-off) και η πρόσληψη από τα φυτά (plant uptake). Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι ίσως η προσρόφηση και η αβιοτική αποδόμηση και καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την

τύχη των Φ.Ο. στο έδαφος. Η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί επίσης μια από τις πιο σημαντικές διεργασίες απομάκρυνσης των περισσοτέρων Φ.Ο. στο έδαφος.

Η μεταφορά των Φ.Ο. από το έδαφος στο νερό, στον αέρα, και στα φυτικά προϊόντα εξαρτάται και καθορίζεται από αυτές τις διεργασίες. Η σημασία αυτών των διεργασιών για την παραμονή ή απομάκρυνση των Φ.Ο. από το έδαφος επηρεάζεται άμεσα από τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, όπως είναι ο βαθμός ιονισμού, το είδος του φορτίου, η υδατοδιαλυτότητα και η πτητικότητα τους. Επιπλέον η συμπεριφορά Φ.Ο εξαρτάται άμεσα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, την κλίση και μορφολογία της επιφάνειας του εδάφους, τις γεωργικές πρακτικές και το μικροκλίμα κάθε γεωργικής περιοχής (Carter 2000).

1.1.2. Διεργασίες διάσπασης / αποδόμησης

Από τη συνολική ποσότητα των οργανικών ξενοβιοτικών ουσιών που εφαρμόζεται στο έδαφος, το μεγαλύτερο ποσοστό απομακρύνεται μέσω δύο κυρίως διεργασιών: 1) της αβιοτικής διάσπασης και 2) της μικροβιακής αποδόμησης. Και οι δύο οδηγούν σε μείωση της τελικής ποσότητας της Φ.Ο. που θα φτάσει στον οργανισμό-στόχο. Η ισχυρή προσρόφηση συνδέεται άμεσα με την αύξηση της υπολειμματικότητας μιας Φ.Ο. στο έδαφος (Wauchore et al., 2002), διότι τα μόρια των Φ.Ο. που προσροφώνται στα σωματίδια του εδάφους, δεν είναι άμεσα διαθέσιμα για βιοαποδόμηση. Το pH του εδάφους επηρεάζει σημαντικά τον ιονισμό των ασθενών οξέων και των ασθενών βάσεων, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει σημαντικά τη βιοτική και αβιοτική αποδόμηση των Φ.Ο. (Weber et al., 2000).

1.1.2.1. Αβιοτική διάσπαση

Οι αβιοτικές διεργασίες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση ορισμένων Φ.Ο. (Vega et al., 2000). Η αβιοτική αποδόμηση εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως είναι το pH και η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) αλλά και από εδαφοκλιματικούς παράγοντες όπως είναι η

θερμοκρασία και η υγρασία (Walker 1991, Zheng and Cooper, 1996). Ειδικότερα, στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα όπου η μικροβιακή δραστηριότητα είναι περιορισμένη, η διάσπαση των Φ.Ο. πραγματοποιείται κυρίως με αβιοτικές διεργασίες. Οι Φ.Ο. αποδομούνται αβιοτικά μέσω διεργασιών όπως η υδρόλυση, η οξειδοαναγωγή, η αφυδραλογόνωση, η απαλογόνωση και η φωτόλυση (Wolfe et al., 1990, Kookana et al., 1998).

Η **υδρόλυση** μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία H_2O , H_3O^+ , OH^- και ορίζεται ως ουδέτερη, όξινη και αλκαλική αντίστοιχα και είναι άμεσα εξαρτώμενη από το pH του υποστρώματος. Η **οξειδοαναγωγή** μπορεί να οφείλεται σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι οξειδώσεις είναι οι σημαντικότερες αντιδράσεις και πραγματοποιούνται κυρίως στα ανώτερα στρώματα του εδάφους, όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις O_2 και αεροβικές συνθήκες. Αντίθετα, οι αναγωγικές αντιδράσεις παρατηρούνται κυρίως στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα ή υπό αναερόβιες συνθήκες στο έδαφος (Kördel et al., 1995). **Φωτόλυση** είναι η διάσπαση των Φ.Ο. κατά την έκθεσή τους σε ακτινοβολία. Η υπεριώδης ακτινοβολία του ηλίου μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση πολλών ομάδων οργανικών Φ.Ο. (π.χ. διθειοκαρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα και δινιτροανιλίνες) στο έδαφος, όταν αυτές εφαρμοστούν χωρίς ενσωμάτωση, στην επιφάνεια του εδάφους και παραμένουν εκτεθειμένες στο ηλιακό φως για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ο οργανικός άνθρακας του εδάφους και τα κολλοειδή της αργίλου εκτός από το σημαντικό τους ρόλο στην προσρόφηση, αποτελούν συνήθεις επιφάνειες κατάλυσης αβιοτικών αντιδράσεων διάσπασης Φ.Ο. (Stevenson et al., 1982, Senesi and Chen, 1989, Kookana et al., 1998). Τα κολλοειδή της αργίλου στο έδαφος είναι συνήθως καλυμμένα από λεπτά στρώματα χουμικών ουσιών και μεταλλικών οξειδίων που συμμετέχουν σ' αυτές τις διεργασίες.

1.1.2.2. Μικροβιακή αποδόμηση

Η αποδόμηση των περισσότερων σύγχρονων Φ.Ο. στο έδαφος οφείλεται στη μικροβιακή διάσπαση (Alexander, 1985). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συμματαβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και

συσσώρευση, ή έμμεσα μέσα από δευτερεύουσες επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (Bollag and Liu 1990a, Kookana et al., 1998). Στο έδαφος η μικροβιακή διάσπαση των Φ.Ο. πραγματοποιείται από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, ακτινομύκητες και φύκη (Levanon, 1993). Η αποδόμηση στο έδαφος *in situ* συνήθως επιτυγχάνεται από ομάδες μικροοργανισμών (consortia) παρά από μεμονωμένα στελέχη (Aislabie and Liloyd-Jones, 1995). Η αποδομητική ικανότητα των διαφόρων μικροοργανισμών στο έδαφος εξαρτάται από τα διαφορετικά ενζυμικά συστήματα που διαθέτουν και τα οποία τους δίνουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν τις Φ.Ο. ως πηγές ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους.

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους αναπτύσσονται σε λεπτά στρώματα – φιλμ υγρασίας του εδάφους που περιβάλλουν τα κολλοειδή του εδάφους. Υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται ως επί τω πλείστων σε επιφανειακά εδαφικά στρώματα με συνέπεια την ταχύτερη αποδόμηση των Φ.Ο. στο επιφανειακό έδαφος, καθώς επίσης και σε περιοχές στις οποίες επικρατούν θερμά και υγρά κλίματα (Topp et al., 1997).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση μιας Φ.Ο., οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Aislabie and Liloyd-Jones, 1995). Η οργανική ουσία, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και το pH επιδρούν στη μικροβιακή διάσπαση των Φ.Ο. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι τα περισσότερα είδη μυκήτων και ακτινομυκήτων του εδάφους ευνοούνται σε ελαφρώς όξινα ως ουδέτερα εδάφη, ενώ τα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα και επικρατούν σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη (Burns, 1976). Τα επικρατέστερα είδη αποδομητικών μικροοργανισμών του εδάφους καθορίζουν συνήθως την ταχύτητα διάσπασης των Φ.Ο. Κατά συνέπεια η γνώση της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους διευκολύνει την εκτίμηση της ταχύτητας αποδόμησης και της τύχης ορισμένων χημικών ενώσεων.

1.2. Οι μικροοργανισμοί

Τα κύτταρα ζουν στη φύση σε στενή αλληλεξάρτηση με άλλα κύτταρα, σχηματίζοντας συναθροίσεις που λέγονται πληθυσμοί. Αυτοί οι πληθυσμοί συντίθενται από ομάδες συγγενικών κυττάρων, που κατά κανόνα έχουν προέλθει από τις διαδοχικές διαιρέσεις ενός μόνο γονικού κυττάρου. Η ακριβής περιβαλλοντική θέση στην οποία διαβιεί ένας μικροβιακός πληθυσμός καλείται ενδιαίτημα. Μικροβιακά ενδιαίτηματα συναντούμε όχι μόνο σε αναμενόμενα μέρη αλλά και σε άλλα πολύ πιο ασυνήθιστα, σε ορισμένα εκ των οποίων επικρατούν τόσο ακραίες συνθήκες, ώστε να είναι ακατάλληλα για ανώτερες μορφές ζωής (Madigan et al., 2005).

Στη φύση, οι διάφοροι πληθυσμοί των κυττάρων σπάνια ζουν μόνοι τους. Αντιθέτως συμβιώνουν και αλληλεπιδρούν με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, σχηματίζοντας συναθροίσεις που ονομάζονται μικροβιακές κοινότητες. Η μικροβιακή ποικιλότητα είναι προϊόν μικροβιακής εξέλιξης και οποιαδήποτε φυσική ουσία, καθώς και οι περισσότερες συνθετικές μπορούν να διασπαστούν από ένα ή περισσότερους μικροοργανισμούς.

Κατόπιν σύγκρισης των μικρομορίων των ριβοσωμάτων και ιδιαίτερα των ριβοσωμικών RNA έχουν αναγνωριστεί τρεις φυλογενετικά διακριτές γενεαλογίες: τα Βακτήρια και τα Αρχαία που περιέχουν μόνο προκαρυώτες και τα Ευκάρεια που περιέχουν ευκαρυώτες (Madigan et al., 2005). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι κατά κανόνα μεγαλύτερα και πολυπλοκότερα από τα προκαρυωτικά. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των Ευκαρυωτών είναι η παρουσία μεμβρανοπερίκλειστων δομών που ονομάζονται οργανίδια, όπως ο πυρήνας, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ανήκουν τα φύκη, οι μύκητες και τα πρωτόζωα.

1.3. Μικροβιακά κύτταρα

Τα μικροβιακά κύτταρα είναι κατά κανόνα αόρατα με γυμνό μάτι. Όλα τα μικροβιακά κύτταρα διαθέτουν τα ίδια χαρακτηριστικά στη δομή τους το κυριότερο εκ των οποίων είναι η κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία αποτελεί το φραγμό που διαχωρίζει το εσωτερικό τους από τον περιβάλλοντα χώρο. Τα θρεπτικά συστατικά

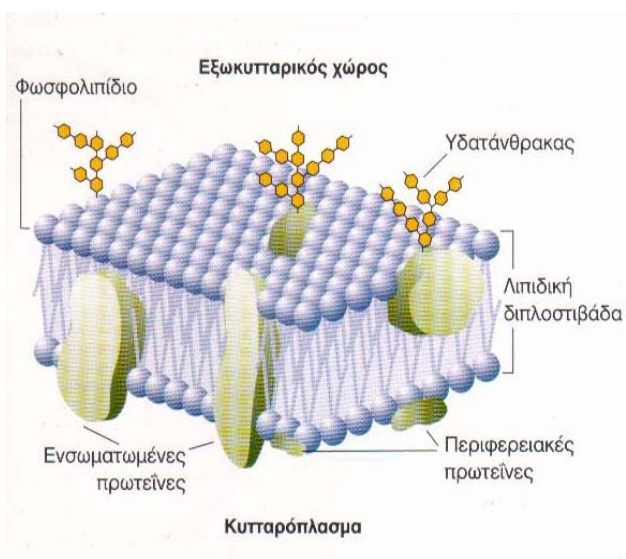
και οι υπόλοιπες ουσίες που χρειάζεται το κύτταρο εισέρχονται στο εσωτερικό του μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μέσω αυτής εξέρχονται προϊόντα του, άχρηστα ή μη. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα αδιαπέραστο στρώμα που βρίσκεται εξωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και προσδίδει δομική αντοχή στο κύτταρο. Κυτταρικό τοίχωμα διαθέτουν τα φυτικά κύτταρα και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί.

1.3.1. Κυτταροπλασματική μεμβράνη και φωσφολιπίδια

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι μια λεπτή δομή που περιβάλλει πλήρως το κύτταρο και αποτελεί το φραγμό ανάμεσα στο εσωτερικό του κυττάρου (κυτταρόπλασμα) και στο περιβάλλον του. Αν διαρραγεί η μεμβράνη, η συνοχή του κυττάρου καταστρέφεται, τα εσωτερικά συστατικά του διαρρέουν στο περιβάλλον και το κύτταρο πεθαίνει.

Η γενική δομή των βιολογικών μεμβρανών είναι μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια ή γλυκεροφωσφολιπίδια των μεμβρανών περιέχουν στο μόριό τους μια υδρόφιλη ουρά (γλυκερόλη) και μια υδρόφοβη κεφαλή (λιπαρό οξύ), γεγονός που τα καθιστά ιδανικές δομικές μονάδες για τις βιολογικές μεμβράνες. Τα φωσφολιπίδια είναι δυνατό να απαντούν σε πολλές διαφορετικές χημικές μορφές, λόγω της ποικιλομορφίας των λιπαρών οξέων ή των φωσφορικών ομάδων που μπορούν να συνδέονται στο δομικό σκελετό της γλυκερόλης. Κατά τη συσσώρευση τους τα φωσφολιπίδια σε ένα υδατικό διάλυμα, τα φωσφολιπίδια εκδηλώνουν την τάση να σχηματίσουν δομές διπλοστιβάδας, δηλαδή τα λιπαρά οξέα στρέφονται το ένα προς το άλλο δημιουργώντας ένα υδρόφοβο περιβάλλον, ενώ τα υδρόφιλα μέρη παραμένουν εκτεθειμένα στο εξωτερικό υδρόφιλο περιβάλλον, όπου επικοινωνούν με μόρια νερού. Στις υδρόφιλες επιφάνειες της κυτταρικής μεμβράνης μπορούν να προσαρτώνται υδρόφιλες πρωτεΐνες και άλλες πολικές ή και φορτισμένες ουσίες, όπως ιόντα μετάλλων (Εικόνα 1.1). Η διπλοστιβάδα είναι πιθανότατα η σταθερότερη διεύθυνση που μπορούν να υιοθετήσουν τα λιπιδικά μόρια σε ένα υδατικό περιβάλλον.

Τα λιπίδια αποτελούν τα ιδεώδη δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών κυρίως λόγω των χημικών τους ιδιοτήτων. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να συζητηθεί στη συνέχεια η χημική τους δομή. Τα λιπίδια αποτελούν σημαντικά μακρο-μόρια που έχουν ως βασικές χημικές ιδιότητες τη μικρή διαλυτότητά τους στο νερό, τη διαλυτότητά τους σε οργανικούς διαλύτες και κοινό χαρακτηριστικό τον υδρόφοβο (λιπόφιλο) χαρακτήρα του (Διαμαντίδης 1994). Τα λιπαρά οξέα αποτελούν τα κύρια

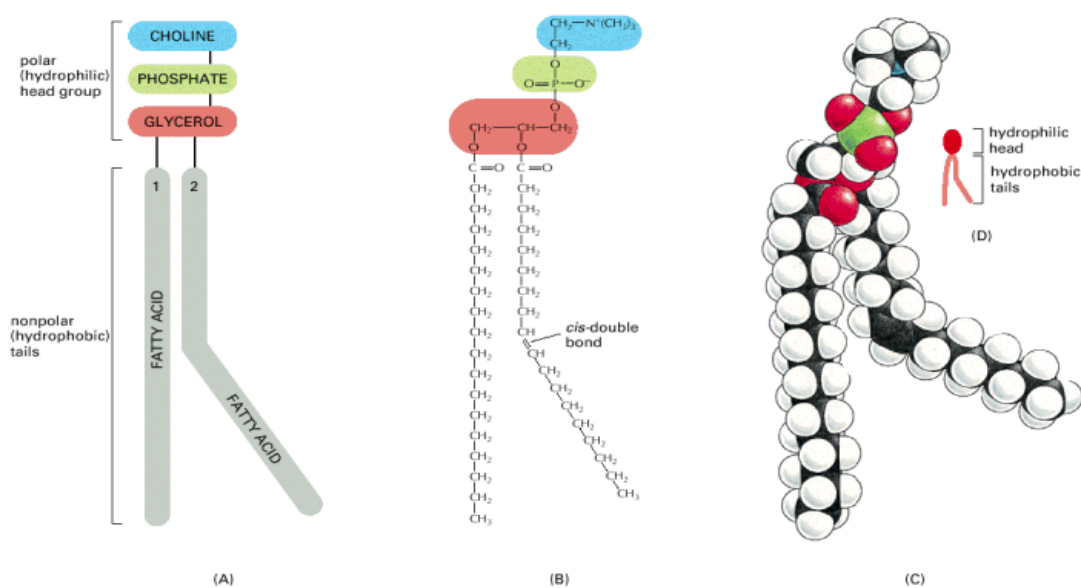


Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της μεμβράνης

συστατικά των λιπιδίων σε Βακτήρια και Ευκάρυα. Τα λιπαρά οξέα έχουν ενδιαφέρουσες χημικές ιδιότητες, διότι περιέχουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες περιοχές. Τα κοινά λιπαρά οξέα χωρίζονται σε κορεσμένα, ακόρεστα με τριμελή δακτύλιο, διακλαδισμένα και υδροξυοξέα. Ο βιολογικός ρόλος των λιπαρών οξέων είναι ποικίλος. Κυρίως συμμετέχουν με τη μορφή φωσφολιπιδίων στη δομή των μεμβρανών και επίσης με τη μορφή των γλυκεριδίων τους επιτρέπουν στο κύτταρο να αποθηκεύει την περίσσεια της παραγόμενης μεταβολικής τους ενέργειας και την περίσσεια των ατόμων άνθρακα (Διαμαντίδης 1994).

Στα λιπίδια συμπεριλαμβάνονται τα απλά λιπίδια και τα σύνθετα λιπίδια. Τα απλά λιπίδια είναι λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με την αλκοόλη γλυκερόλη μέσω εστερικού δεσμού. Τα απλά λιπίδια αναφέρονται και ως τριγλυκερίδια, διότι έχουν τρεις ομάδες λιπαρού οξέος συνδεδεμένες με το μόριο της γλυκερόλης. Τα σύνθετα λιπίδια είναι απλά λιπίδια που περιέχουν είτε πρόσθετα στοιχεία, όπως φωσφόρο, άζωτο ή θείο, είτε μικρές υδρόφιλες ενώσεις άνθρακα όπως σάκχαρα, αιθανολαμίνη, σερίνη, ή χολίνη. **Τα λιπίδια που περιέχουν τη φωσφορική ομάδα, δηλαδή τα φωσφολιπίδια (Εικόνα 1.2), αποτελούν σημαντική κατηγορία σύνθετων λιπιδίων, αφού όπως προαναφέρθηκε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη**

δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Madigan et al., 2005) και έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για την ταυτοποίηση βακτηρίων.



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση φωσφολιπιδίου

Τα λιπίδια των Αρχαίων χαρακτηρίζονται από χημική ιδιαιτερότητα. Σε αντίθεση με τα λιπίδια των Βακτηρίων και Ευκαρύων, όπου τα λιπαρά οξέα συνδέονται στο μόριο της γλυκερόλης με εστερικούς δεσμούς, τα λιπίδια των Αρχαίων έχουν αιθερικούς δεσμούς μεταξύ γλυκερόλης και των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων τους. Επιπλέον, τα λιπίδια των Αρχαίων στερούνται λιπαρών οξέων και αντί αυτών έχουν πλευρικές αλυσίδες από επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου. Ωστόσο η γενική δομή των μεμβρανών, με το υδρόφοβο εσωτερικό και τις εσωτερικές και εξωτερικές υδρόφιλες επιφάνειες, διακρίνεται και στα Αρχαία (Madigan et al., 2005).

1.3.2. Κυτταρικό τοίχωμα των προκαρυωτών

Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αποτελεί βασικό κριτήριο για το διαχωρισμό των βακτηρίων σε δύο κύριες ομάδες: τα θετικά κατά

Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η διαφορά στην εμφάνιση του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων είναι χαρακτηριστική. Τα κυτταρικά τοιχώματα στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παρουσιάζουν μια σύνθετη δομή σε αντίθεση με τα τοιχώματα των θετικών κατά Gram βακτηρίων όπου τα τοιχώματα είναι παχύτερα και αποτελούνται σε σημαντικότατο ποσοστό από ένα παχύ στρώμα ενός πολυσακχαρίτη, της πεπτιδογλυκάνης.

Τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων διαθέτουν μια άκαμπτη δομή που είναι υπεύθυνη για τη στερεότητα του τοιχώματος. Εξωτερικά της στοιβάδας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων υπάρχει μια σειρά επιπρόσθετων στοιβάδων. Η άκαμπτη στοιβάδα των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έχει παραπλήσια χημική σύσταση. Πρόκειται για μια στοιβάδα από πεπτιδογλυκάνη, δηλαδή για ένα λεπτό στρώμα που συντίθεται από δύο παράγωγα σακχάρων, την N-ακετυλογλυκοζαμίνη και το N-ακετυλομουραμικό οξύ και από μια μικρή ομάδα αμινοξέων, αποτελούμενη από L-αλανίνη, D-αλανίνη, D-γλουταμινικό οξύ και λυσίνη ή διαπιμελικό οξύ. Τα συστατικά αυτά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια επαναλαμβανόμενη δομή, το τετραπεπτιδίο της γλυκάνης.

Η βασική δομή της πεπτιδογλυκάνης είναι μια πτυχωτή επιφάνεια, όπου οι αλυσίδες γλυκάνης, τις οποίες σχηματίζουν τα σάκχαρα, συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς που σχηματίζουν τα αμινοξέα. Παρά τη μεγάλη ισχύ των γλυκοζιτικών δεσμών των αλυσίδων γλυκάνης, αυτές οι αλυσίδες δεν μπορούν από μόνες τους να παράσχουν σχετική ακαμψία προς όλες τις κατευθύνσεις. Ο σχηματισμός των πεπτιδικών διασυνδέσεων ισχυροποιεί πλήρως τη δομή αυτή. Η έκταση των διασυνδέσεων διαφέρει χαρακτηριστικά μεταξύ των ομάδων βακτηρίων. Όσο πληρέστερη είναι η έκταση των διασυνδέσεων αυτών τόσο μεγαλύτερη είναι και η στερεότητα του τοιχώματος. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, οι διασυνδέσεις γίνονται με τον απευθείας σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ αμινομάδας του διαμινοπιμελικού και καρβοξυλομάδας της τελικής D-αλανίνης του τετραπεπτιδίου γλυκάνης. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, οι διασυνδέσεις γίνονται συνήθως με πεπτιδικές γεφυρώσεις από πρόσθετα αμινοξέα, οι τύποι των οποίων ποικίλουν ανάλογα με το είδος του οργανισμού (Madigan et al., 2005).

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια ως και 90% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη, ενώ συστατικό του αποτελεί και το τειχικό οξύ σε μικρότερο ποσοστό. Τα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν πολλές

στοιβάδες πεπτιδογλυκάνης. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια μόνο το 10% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη. Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος αυτών των βακτηρίων αποτελείται από την εξωτερική μεμβράνη.

Η πεπτιδογλυκάνη απαντά μόνο στα Βακτήρια εφόσον τα δύο χαρακτηριστικά συστατικά, το σάκχαρο N-ακετυλομουραμικό οξύ και το αμινοξύ διαμινοπιμελικό οξύ απουσιάζουν εντελώς από τα κυτταρικά τοιχώματα των Αρχαίων και των Ευκαρύων. Βέβαια δεν έχουν οι πεπτιδογλυκάνες όλων των Βακτηρίων διαμινοπιμελικό οξύ (DAP). Συγκεκριμένα, DAP υπάρχει σε όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και σε ορισμένα είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων. Στους περισσότερους θετικούς κατά Gram κόκκους, το DAP αντικαθίσταται από λυσίνη, ενώ σε μερικά άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια απαντούν διαφορετικά αμινοξέα.

1.4. Αλληλεπίδραση μικροοργανισμών και εδάφους μετά από εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών.

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους συμμετέχουν σε πολλές και σημαντικές λειτουργίες του οικοσυστήματος καθώς και στους κύκλους διαφόρων θρεπτικών στοιχείων όπως C, N, P, S. Για παράδειγμα, οι μύκητες και οι ακτινομύκητες αποτελούν τις βασικές μικροβιακές ομάδες που συμμετέχουν στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης του εδάφους (McCarthy 1987). Τα νιτροποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση του κύκλου του N (Kowalchuk & Stephen, 2001). Θειο-οξειδωτικά και θειο-αναγωγικά βακτήρια συμμετέχουν στη λειτουργία του κύκλου του S στο έδαφος (Amann et al., 1992, Brinkhoff & Muyzer, 1997). Συνεπώς, μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας είναι πιθανό να οδηγήσουν σε μεταβολές στην ομαλή λειτουργία του εδαφικού μικρο-οικοσυστήματος. Η εφαρμογή αγροτικών πρακτικών όπως η εφαρμογή Φ.Ο., συνθετικών λιπασμάτων αλλά και η υπερβολική άρδευση ή επεξεργασία του εδάφους έχει βρεθεί ότι επιδρούν σημαντικά στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας (Torvsik et al., 1998, O'Donnell et al., 2001)

Η μικροβιακή κοινότητα είναι από τα πρώτα χαρακτηριστικά του εδάφους που υφίσταται τις άμεσες και έμμεσες επιδράσεις τοξικών ουσιών. Λόγω της άμεσης απόκρισης στη ρύπανση καθώς και σε στοιχεία του εδάφους που ανακυκλώνονται, η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους θεωρείται ως κατάλληλος βιοδείκτης και χρησιμοποιείται συχνά σε οικοτοξικολογικές μελέτες, για την εκτίμηση της επίδρασης των Φ.Ο. στο έδαφος (Doelman and Vonk 1994, Edwards et al. 1996, Doran and Zeiss 2000). Πολλές παράμετροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της επίδρασης των Φ.Ο. στο έδαφος. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους μεταβάλλονται με αργό ρυθμό και απαιτείται μεγάλο διάστημα για να παρατηρηθούν σημαντικές αλλαγές. Αντιθέτως οι βιολογικές παράμετροι μπορούν να αντανakλούν ακόμη και μικρές αλλαγές, παρέχοντας ακριβή δεδομένα (Smith και Papendick 1993, Pascual et al. 2000).

Η αλόγιστη χρήση Φ.Ο. και λιπασμάτων και η εκτεταμένη εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών που διαταράσσουν τη δομή και τη σύσταση του εδάφους είναι πιθανό να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Σύμφωνα με τους Powlson και Jenkinson (1981) και Saffigna et al., (1989) δε μπορεί να εκτιμηθεί πλήρως η επίδραση των καλλιεργητικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα χωρίς την ανάπτυξη μεθόδων για τη μέτρηση της μικροβιακής βιομάζας. Οι Potthoffa et al. (2006) μελέτησαν τις μεταβολές στη μικροβιακή κοινότητα μετά από εντατικοποίηση καλλιεργητικών πρακτικών, φρεζάρισμα και εφαρμογή Φ.Ο. Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι η αντικατάσταση συνεχών τοπικών καλλιεργειών από ετήσιες μη-εγχώριες καλλιέργειες, που αποτελεί πρακτική αποκατάστασης εδαφών από την εντατικοποίηση και τη χρήση Φ.Ο., έχουν σημαντική, αλλά προσωρινή επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα και κυρίως στα ανώτερα στρώματα του εδάφους. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή ικανότητα προσαρμογής της μικροβιακής κοινότητας μετά από εφαρμογή μεθόδων αποκατάστασης του εδάφους. Το βάθος επηρέασε σημαντικά την παρουσία των μικροοργανισμών, όπως αποδεικνύεται από το προφίλ των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (PLFAs), ενώ στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές. Επιπλέον, τέσσερα έτη παρουσίας ετησίων ζιζανίων προκάλεσαν μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στην επιφάνεια του εδάφους.

Οι Cavigelli και Robertson (2000) μελέτησαν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στη μικροβιακή κοινότητα, τις διεργασίες που επιτελεί στο έδαφος και την εφαρμογή

πρακτικών αποκατάστασης εδαφών και παρατήρησαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των παραγόντων. Οι Wardle et al., (1999) μελέτησαν την επίδραση της εντατικοποίησης των καλλιεργητικών πρακτικών στους μικροοργανισμούς και τη μικροβιακή δραστηριότητα για περισσότερα από 7 έτη και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επίδραση δεν είναι απαραίτητα αρνητική. Επιπλέον οι Kourtev et al., (2002, 2003) και Callaway et al., (2004) διαπίστωσαν ότι η μικροβιακή κοινότητα μεταβάλλεται με την εμφάνιση εξωτικών ειδών ζιζανίων σε έδαφος που δεν καλλιεργείται. Η διατήρηση μιας ενεργής μικροβιακής κοινότητας μπορεί να ρυθμίσει τις λειτουργίες του εδάφους.

Σύμφωνα με τους Girvan et al., (2003) και Hole et al., (2005) οι καλλιεργητικές πρακτικές που σχετίζονται με την οργανική γεωργία έχουν θετική επίδραση στην μικροβιακή ποικιλότητα του εδάφους. Σχετικά μικρός αριθμός αναφορών υπάρχουν για δυσμενή επίδραση ανόργανων λιπασμάτων και των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Fraser et al., 1988 και Fauci and Dick, 1994). Σύμφωνα με τους Bossio et al. (1998), η μικροβιακή κοινότητα δεν ωφελείται από συγκεκριμένα συστήματα διαχείρισης καλλιεργειών, αλλά από ειδικές καλλιεργητικές τεχνικές (εναλλαγή καλλιεργειών, διαχείριση υπολειμμάτων κ.α.). Οι Stark et al., (2006) διαπίστωσαν μετά από ανάλυση PCR-DGGE ότι παρά την εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών που σχετίζονται με την προσθήκη οργανικών και ανόργανων λιπασμάτων, η μικροβιακή κοινότητα προσαρμόζεται στην αυξημένη ποσότητα οργανικής ουσίας και ανόργανου N. Επιπλέον η παρουσία ή έλλειψη N είχε σημαντική επίδραση στα βακτήρια και τους ακτινομύκητες, όμως τελικά δεν υπήρξε συσχετισμός ανάμεσα στη δομή της μικροβιακής κοινότητας και την δραστηριότητα ή τις διεργασίες του εδάφους υπό εργαστηριακές συνθήκες.

Σύμφωνα με τους Clapperton et al., (2003) ένα οικοσύστημα πρέπει να διατηρεί τη δομική ακεραιότητα της μικροβιακής του κοινότητας, να αυξάνει την οργανική ουσία και να βελτιώνει την αναλογία C:N. Οι διαφορές στην ποσότητα και την ποιότητα της οργανικής ύλης έχουν σημαντική επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και στους κύκλους C και N (Janssen 1984). Σύμφωνα με τους Rosado et al., (2006) η μικροβιακή ποικιλότητα του εδάφους περιέχει τους πιο ευαίσθητους δείκτες ποιότητας του εδάφους, όμως η χρήση τους είναι δύσκολη λόγω των δυσκολιών ανάλυσης και εκτίμησης των δεδομένων, ειδικότερα όταν αυτά προκύπτουν από μοριακές βιολογικές τεχνικές. Η ανάλυση της μικροβιακής

κοινότητας του εδάφους παρέχει τα δεδομένα για την αποσαφήνιση της σχέσης που συνδέει τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του εδάφους. Ο βαθμός ποικιλότητας των μικροοργανισμών στο έδαφος είναι καθοριστικός για τη διατήρηση της ποιότητας του εδάφους και είναι ευρέως γνωστό ότι οι καλλιεργητικές μεταχειρίσεις και πρακτικές επηρεάζουν τη δομή της μικροβιακής κοινότητας (Peixoto *et al.*, 2006). Παρά το γεγονός ότι το οικοσύστημα ελέγχει τις λειτουργίες του με δυναμικά συστήματα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί και οι αντιδράσεις τους σε συνθήκες στρες έχουν μελετηθεί σε λειτουργικό κυρίως επίπεδο με συμβατικές μεθόδους που συμπεριλαμβάνουν τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών, βιομάζας και ενζυματικής λειτουργίας, ενώ λιγότερη έμφαση έχει δοθεί στις μεταβολές και επιδράσεις σε επίπεδο μικροβιακής κοινότητας (Kennedy and Smith, 1995). Οι Rosado *et al.*, (2006) μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών καλλιεργητικών συστημάτων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και η ανάλυση έδειξε ότι η κάθε πρακτική που εφαρμόστηκε συσχετίστηκε με την επικράτηση συγκεκριμένων πληθυσμών. Η μικροβιακή κοινότητα ήταν ο καλύτερος δείκτης των μεταβολών στο έδαφος σε σύγκριση με τη συνολική ποσότητα C και άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Peixoto *et al.*, 2006).

Οι Frey *et al.*, (2004) μελέτησαν την επίδραση προσθήκης N στη μικροβιακή κοινότητα και διαπίστωσαν ότι επηρεάζει την σύνθεση και λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας προκαλώντας μείωση της ενεργής βιομάζας των μυκήτων, μείωση της αναλογίας μυκήτων : βακτηρίων, μείωση στην ποικιλία ειδών εκτομυκορριζών, μείωση της λιγνίνης και ομαλοποίηση των καταβολικών διαδικασιών. Η κοινότητα των μυκορριζών μεταβλήθηκε, ενώ και οι σαπροτροφικοί μύκητες επηρεάστηκαν από την αποσύνθεση του N (Carreiro *et al.*, 2000, Saiya-Cork *et al.*, 2002, Sinsabaugh *et al.*, 2002). Οι περισσότερες έρευνες που μελετούν την αποσύνθεση του N στη μικροβιακή κοινότητα εστιάζουν το ενδιαφέρον τους σε μυκορριζες. (Arnolds, 1991, Dighton and Jansen, 1991, Egerton-Warburton and Allen, 2000, Treseder and Allen, 2000, Lilleskov *et al.*, 2002).

1.5. Τεχνικές για τη μέτρηση των επιδράσεων γεωργικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των επιδράσεων των γεωργικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κυρίως κατηγορίες (i) στις μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε διάφορα μέσα ανάπτυξης και (ii) στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους. Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση σε μικροβιολογικά μέσα ανάπτυξης (Van Elsas et al., 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Balestra and Misaghi, 1997; Sait et al., 2002; Janssen et al., 2002; Joseph et al., 2003). Μια άλλη μέθοδος που εξαρτάται από την καλλιέργεια αναπτύχθηκε από τους Garland και Mills (1991) και βασίζεται στο σύστημα BIOLOG. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μικροβιακής λειτουργικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ρυπασμένα εδάφη (Koparcka et al., 1988) στη ριζόσφαιρα των φυτών (Ellis et al., 1995) και σε εδάφη στα οποία έχει γίνει χρήση ζιζανιοκτόνων (EL Fantousi et al., 1999). Το κυριότερο μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν-αναπτυχθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 95-99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Borneman et al., 1996). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al., 2000).

Η ανάπτυξη βιοχημικών και μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Οι τεχνικές αυτές μπορεί να βασίζονται στη ανάλυση των λιπαρών οξέων (PLFA) ως δείκτες της μικροβιακής κοινότητας ή στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από έδαφος (π.χ TRFLP, RISA, ARISA, DGGE).

Οι White και Findlay (1988) ανέπτυξαν την τεχνική της ανάλυσης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (**PLFA**, Phospholipid Fatty Acid Analysis) από

περιβαλλοντικά δείγματα για το χαρακτηρισμό της δομής της μικροβιακής τους κοινότητας. Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ζωντανών κυττάρων και αποσυντίθενται όταν το κύτταρο πεθάνει. Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα PLFA-δείκτες στις κυτταρικές τους μεμβράνες και κάθε ομάδα συνεισφέρει στο αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ανάλογα με τη βιομάζα τους. Επομένως, μια μεταβολή στο αποτύπωμα των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μεταβολή στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η ανάλυση των PLFA έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη μεταβολών της μικροβιακής κοινότητας που προκαλείται είτε εξαιτίας ρύπανσης με οργανικές και ανόργανες χημικές ουσίες (Siciliano and Germida, 1998) είτε χρήσης γεωργικών πρακτικών (Bossio et al., 1998).

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (**T-RFLP**, Terminal Restriction Fragment Polymorphisms) είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αφού το DNA εκχυλιστεί από το περιβαλλοντικό δείγμα, το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με την τεχνική της PCR και με έναν εκκινητή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική (π.χ TET, 6-FAM). Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη του προϊόντος της PCR με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Από την πέψη παράγονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται σε συσκευή πολυκάναλου τριχοειδή αναλυτή αλληλουχιών (multichannel capillary sequencer) όπου ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού και το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας και αναλύεται με ειδικά προγράμματα (GeneMapper). Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο ηλεκτροφοριογράφημα) παρέχει πληροφορίες για την ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα. Η μέθοδος T-RFLP είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Clement et al., 1998; Liu et al., 1997)

Η μέθοδος **RISA** (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) αναπτύχθηκε από τους Borneman και Triplett (1997) και πρώτα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε εδάφη. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την PCR ενίσχυση της διαγονιδιακής περιοχής (IGS, intergenic spacer) ανάμεσα στη μικρή (16S για τα βακτήρια και 18S για τους μύκητες) και στη μεγάλη υπομονάδα (23S για

τα βακτήρια και 28S για τους μύκητες) των rRNA γονιδίων. Αυτή η περιοχή είναι εξαιρετικά μεταβλητή σε μέγεθος και σε νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η μέθοδος RISA εκμεταλλεύεται την ετερογένεια μήκους της περιοχής αυτής. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με βάση το μέγεθός τους και γίνονται ορατά με βαφή με AgNO₃. Το αποτέλεσμα είναι ένα πρότυπο ζωνών νουκλεϊκών οξέων στο οποίο κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει τουλάχιστον έναν οργανισμό.

Οι Fisher και Triplett (1999) ανέπτυξαν τη μέθοδο **ARISA** (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) για να γίνεται η εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας πιο γρήγορα και πιο αποδοτικά. Η PCR ενίσχυση της IGS περιοχής γίνεται με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με φθορίζουσα χρωστική, για να μπορεί να ανιχνευθεί το προϊόν στο αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ένα δείγμα εκτιμάται από το συνολικό αριθμό των ζωνών που εμφανίζονται για κάθε δείγμα στην πηκτή. Η μέθοδος ARISA έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη διάφορων μικροβιακών πληθυσμών (Robledo et al., 1998; Borneman, 1999; Fisher and Triplett, 1999; Ranjard et al., 2000).

Μια από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (**DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Liesac et al., 1991). Η μέθοδος DGGE έχει την ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με την κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός τμήματος DNA αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από (i) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) από το στοιβάγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπεται από την παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός PCR εκκινητή που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των

ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανακλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

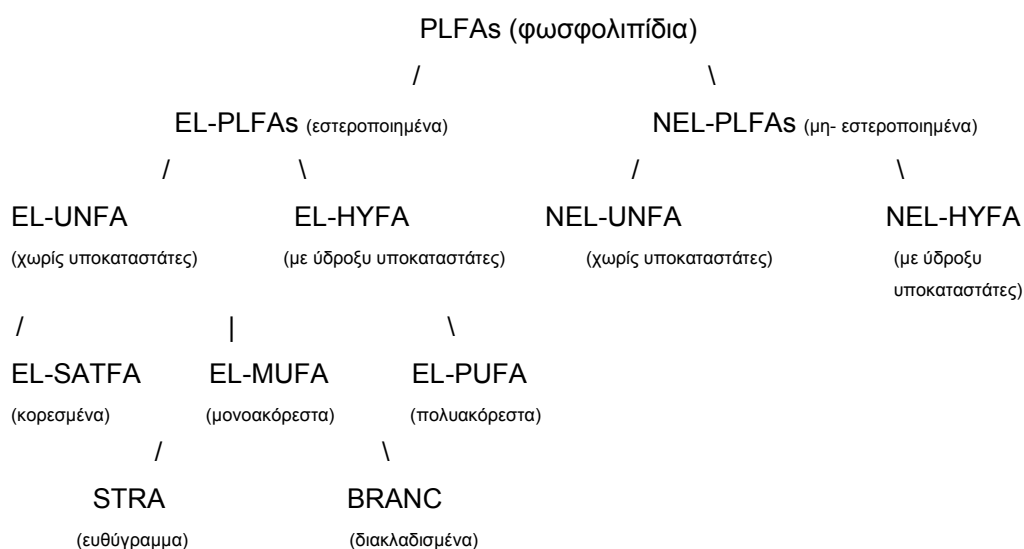
Αρχικά το DGGE χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της γενετικής ποικιλότητας βακτηριακών πληθυσμών (Muyzer et al., 1993). Ωστόσο, το DGGE χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς στη μικροβιακή οικολογία, όπως είναι η μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (Donner et al., 1996), και η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA (Kozdrój and van Elsas., 2000).

1.5.1. Τεχνική ανάλυσης και προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (PLFAs).

Οι μεμβράνες των μικροβιακών κυττάρων περιέχουν λιπίδια, τα οποία αποτελούνται από λιπαρά οξέα. Μια από τις σημαντικότερες μεθόδους ταυτοποίησης βακτηρίων στηρίζεται στον χαρακτηρισμό των τύπων και των αναλογιών των λιπαρών οξέων των λιπιδίων στις μεμβράνες των μικροβιακών κυττάρων. Το συνολικό πρότυπο των λιπαρών οξέων μπορεί να έχει διαγνωστική ικανότητα, διότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων στους προκαρυώτες μπορεί να ποικίλει σημαντικά, παρουσιάζοντας διαφορές όσον αφορά το μήκος της αλυσίδας τους και την παρουσία ή απουσία ακόρεστων ομάδων, δακτυλίων διακλαδισμένων αλυσίδων, ή υδροξυ-ομάδων (Madigan et al., 2005).

Από τα λιπαρά οξέα που απομονώνονται από κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε πρότυπες συνθήκες παραλαμβάνονται τα φωσφολιπίδια των λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το Σχήμα 1.1.(Zelles, 1999). Το 60-90% των μικροοργανισμών περιέχουν φωσφολιπίδια με εστερικούς δεσμούς (-C-O-C=O), ενώ το 10-40% των μικροοργανισμών, ποσοστό στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και τα Αρχαία, περιέχουν αιθερικούς δεσμούς (>C-O-C-R). Η απομόνωση των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές είναι οι εξής: α) παραλαβή των λιπαρών οξέων με σαπωνοποίηση και μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες (MIDI), β) εκχύλιση στερεής φάσης με τη χρήση στηλών πυριτικού

οξέος (Solid Phase Extraction, SPE-Si) και παραλαβή των λιπιδίων και γ) εκχύλιση στερεής φάσης με στήλη αμινοπρότυλο-παραγωγού (SPE-NH₂) και εκχύλιση φωσφολιπιδίων (FAME) (Kaur et al., 2005).



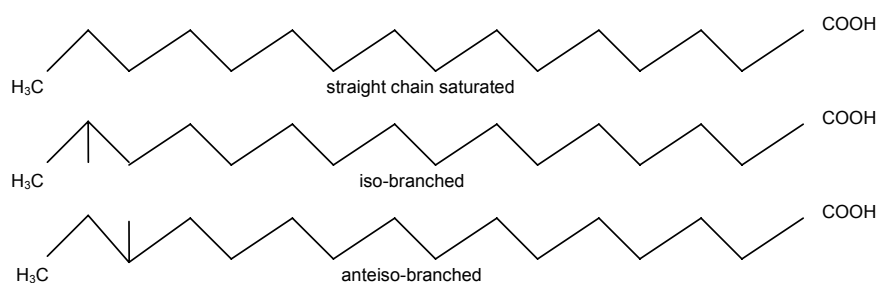
Σχήμα 1.1. Κατηγοριοποίηση φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων.

Οι μέθοδοι MIDI και FAME οδηγούν σε εκχύλιση και παραλαβή όλων των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε περιβαλλοντικά δείγματα που μπορεί να είναι και μη μικροβιακής προέλευσης. Μετά από την εκχύλιση των φωσφολιπιδίων ακολουθεί χημική επεξεργασία, ώστε να προκύψουν οι αντίστοιχοι μεθυλεστέρες. Στη συνέχεια, τα πτητικά αυτά παράγωγα ανιχνεύονται, ποσοτικοποιούνται και ταυτοποιούνται με αέρια χρωματογραφία. Ένα χρωματογράφημα που εμφανίζει τους τύπους και τις ποσότητες των λιπαρών οξέων από το άγνωστο βακτήριο συγκρίνεται με μια βάση δεδομένων που περιέχει τα πρότυπα των λιπαρών οξέων από χιλιάδες βακτήρια που έχουν καλλιεργηθεί στις ίδιες συνθήκες. Η τεχνική αυτή έχει ονομαστεί ανάλυση FAME (Fatty Acid Methyl Ester, μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων) και χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια κλινικών εφαρμογών, δημόσιας υγείας, και αναλύσεων τροφίμων, νερού και εδάφους, όπου η ταυτοποίηση παθογόνων ή άλλων επικίνδυνων βακτηρίων γίνεται σε καθημερινή βάση. Οι αναλύσεις αυτές μπορούν να αποτελέσουν έναν πολύ καθοριστικό παράγοντα για τον καθορισμό των μικροβιακών πληθυσμών που συναντώνται στο έδαφος (Kaur et

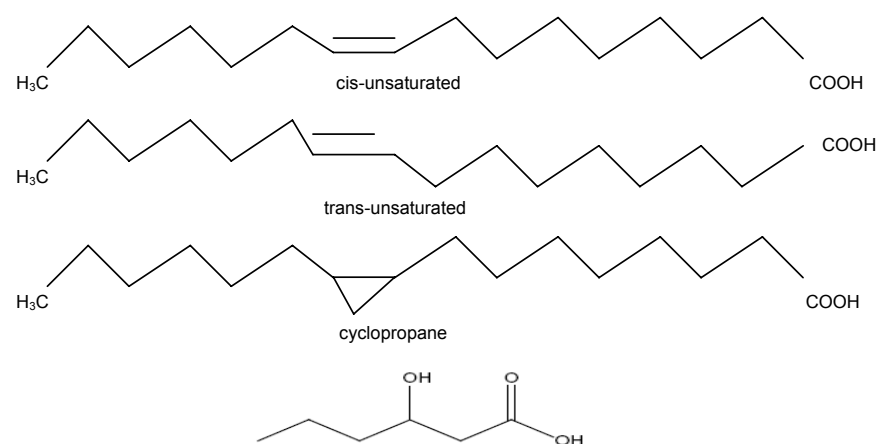
al., 2005). Οι αναλύσεις FAME απαιτούν αυστηρή προτυποποίηση, αφού η σύνθεση των λιπαρών οξέων ενός οργανισμού είναι δυνατόν να ποικίλλει σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, τη φάση ανάπτυξης και με άλλους παράγοντες.

1.5.1.1. PLFAs που χαρακτηρίζουν ομάδες μικροοργανισμών.

Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται συχνότερα ως βιοδείκτες των βακτηρίων είναι τα 15:0 και 17:0, διότι αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα ισομερή του 15:0 (iso- και anteiso-), που είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα, χαρακτηρίζουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια (Σχήμα 1.2), ενώ τα β-υδροξύ λιπαρά οξέα (10:0, 12:0), τα οποία έχουν την ομάδα υδροξυλίου στο 3^ο άτομο C καθώς επίσης και τα μονοακόρεστα συναντώνται στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Σχήμα 1.3).

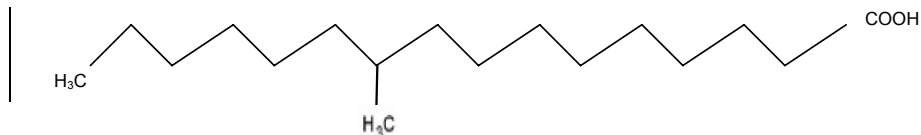


Σχήμα 1.2. PLFAs- δείκτες για θετικά κατά Gram βακτήρια



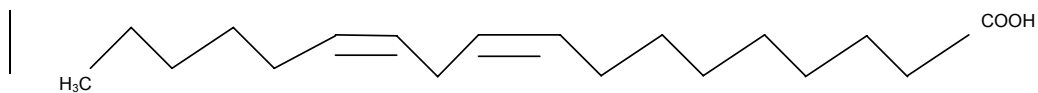
Σχήμα 1.3. PLFAs-δείκτες για αρνητικά κατά Gram βακτήρια μονοακόρεστα, κυκλοπρόπυλο και β-υδροξύ λιπαρά οξέα.

Ο μεθυλεστέρας του 10Me18:0 είναι ενδεικτικός για τους ακτινομύκητες καθώς και γενικότερα τα μεθυλιωμένα λιπαρά οξέα, ενώ το 18:2ω6,9 (πολυακόρεστα) για μύκητες (Kaur et al., 2005). Στο Σχήμα 1.4 απεικονίζεται PLFAs-δείκτης για τους ακτινομύκητες.



Σχήμα 1.4. PLFAs-δείκτης για ακτινομύκητες.

Παρά το γεγονός ότι τα PLFAs χαρακτηρίζονται από ποικιλία συνδυασμένη με ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά, υπάρχουν κάποια λιπαρά οξέα τα οποία συναντώνται σε περισσότερες από μια ομάδες μικροοργανισμών. Για παράδειγμα τα διακλαδισμένα λιπαρά οξέα (ισο- και αντισο- ισομερή) αποτελούν βιοδείκτες για τα θετικά συναντώνται και σε κάποια αναερόβια αρνητικά κατά Gram βακτήρια, καθώς και στα γένη *Cytophaga* και *Flavobacterium* (Kaur et al., 2005). Τα κυκλοπρότυλο λιπαρά οξέα χαρακτηρίζουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ενώ συναντώνται και σε κάποια αναερόβια στελέχη των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Το λινολεϊκό οξύ (18:2ω6,9) είναι ενδεικτικό των μυκήτων και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα στο φυτικό βασίλειο (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5. Λινολεϊκό οξύ (18:2ω6,9) ενδεικτικό για μύκητες.

Στον Πίνακα 1.1 αναφέρονται τα πιο ενδεικτικά για τους μικροοργανισμούς λιπαρά οξέα.

Πίνακας 1.1. Λιπαρά οξέα που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ομάδες και φύλα μικροοργανισμών.

Γένος, είδος, ομάδα μικροοργανισμών	Λιπίδιο βιοδείκτης	Συντακτικοί τύποι
<i>Desulfovibrio</i>	i17:1ω7c, i15:1ω7c, i19:1ω7c	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. i17:1ω7c)
<i>Desulfobacter</i>	10Me16:0, cy18:0(ω 7,8)	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH CH ₃ (π.χ. 10Me16:0)
<i>Vibrio cholerae</i>	11Me19:1, 18:2ω6,9	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 18:2ω6,9)
<i>Methanotrophs</i>	16:1ω8c, 16:1ω5c	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 16:1ω5c)
<i>Desulfononile tiedjei</i>	LPS-υδρόξυ λιπαρά οξέα	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -COOH OH (π.χ. 3OH 10:0)
<i>Thiobacillus</i>	i17:1ω5, 10Me18:1ω6, 11Me18:1ω6	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. i17:1ω5)
<i>Pseudomonas</i>	16:0, 16:1, 18:1ω7c/ω9t/ω12t	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 18:1ω7c)
<i>Arthrobacter</i>	a15:0, 17:0	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 17:0)
κατά Gram αρνητικά βακτήρια	με υδρόξυ υποκαταστάτες(π.χ. 3OH 16:1, 3OH 18:1), μονοακόρεστα (π.χ. 16:1ω7c, 18:1ω7t), κυκλοπροπανικά (π.χ. Cy17:0, cy19:0)	CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -COOH OH (π.χ. 3OH 16:1ω3) CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 16:1ω7c) CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH-CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH / CH ₂ (π.χ. Cy17:0)
κατά Gram θετικά βακτήρια	iso και anteiso λιπαρά οξέα (π.χ. i15:0, a15:0, i17:0, a17:0)	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. i15:0)
Ακτινομύκητες	10Me λιπαρά οξέα (π.χ. 10Me16:0, 10Me17:0)	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH CH ₃ (π.χ. 10Me16:0)
Μύκητες	18:2ω6,9, 18:3ω3, 18:3ω6, 24:0, 26:0, 16:1ω5c	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH (π.χ. 18:2ω6,9)
<i>Flavobacterium</i>	16:1ω5c	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH
Πρωτόζωα	19:3ω6, 18:3ω9,12,15, 20:4ω6	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -COOH (π.χ. 18:3ω9,12,15)

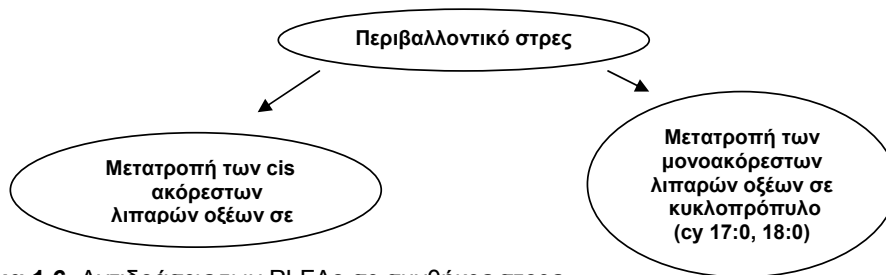
1.5.1.2. Αξιολόγηση των PLFAs ως βιοδείκτες.

Τα PLFAs αποτελούν χρήσιμους βιοδείκτες, καθώς συγκεντρώνουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά: 1) Τα PLFAs βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες όλων των ζωντανών οργανισμών (τα λιπίδια αποτελούν 5-10% ξ.β. βακτηρίων) και δεν συσσωρεύονται σε όργανα αποθήκευσης των μικροοργανισμών, άρα είναι ενδεικτικά της δραστηριότητας και λειτουργικότητας των μικροοργανισμών (Kaur et al., 2005), 2) διασπώνται άμεσα σε ουδέτερα λιπίδια μετά τον θάνατο του μικροοργανισμού και κατά συνέπεια παρέχουν εικόνα μόνο της ζωντανής μικροβιακής κοινότητας και 3) μπορούν να εκχυλιστούν και να αξιολογηθούν ποσοτικά και ποιοτικά με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους δίνοντας έτσι και ποσοτικά στοιχεία για τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Τα PLFAs αποτελούν χρήσιμους βιοδείκτες, διότι λόγω της ποικιλίας τους χαρακτηρίζουν διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών. Επίσης καλύπτουν μεγάλο φάσμα της μικροβιακής κοινότητας.

Βέβαια όπως προαναφέρθηκε, ορισμένα PLFAs που θεωρούνται δείκτες για συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών περιέχονται σε σημαντικές ποσότητες και σε μικροοργανισμούς άλλων ομάδων. Αυτό καθιστά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων δυσκολότερη (Piotrowska-Seget and Mrozik 2003). Επιπλέον ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των PLFAs που ανιχνεύονται σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι δύσκολος. Για τον προσδιορισμό γίνεται η υπόθεση ότι ο ανιχνευτής του αέριου χρωματογράφου παρουσιάζει όμοια ευαισθησία για όλα τα PLFAs, παραδοχή η οποία μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο ακριβή αποτελέσματα. Τέλος η μέθοδος παρέχει πληροφορίες για τη μικροβιακή κοινότητα σε επίπεδο ομάδας μικροοργανισμών και όχι σε επίπεδο είδους ή γένους (όπως οι μέθοδοι DNA, RNA-PCR).

1.5.1.3. Τα PLFAs, ως βιοδείκτες έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες.

Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται ως πρώιμοι δείκτες βιολογικών επιδράσεων που καταδεικνύουν πιθανές επιδράσεις από την έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες οι οποίες δεν μπορούν να διαφανούν σε πρώιμο στάδιο σε επίπεδο κοινότητας ή πληθυσμού. Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται κυρίως στην αξιολόγηση της οικολογικής ποιότητας του περιβάλλοντος (εδάφη, ιζήματα ποταμών και λιμνών, υδροφόρα συστήματα) και κατά δεύτερο λόγο στην εκτίμηση του κινδύνου για τη λειτουργία του περιβάλλοντος από την παρουσία ρυπογόνων ουσιών. Ουσιαστικά είναι ποσοτικές μετρήσεις μεταβολών σε βιολογικά συστήματα ως αποτέλεσμα έκθεσης σε ρυπογόνους ή άλλους στρεσογόνους παράγοντες και η οποία έκθεση οδηγεί σε βιολογικές επιδράσεις. Ο όρος βιοδείκτες συνήθως αναφέρεται σε κυτταρικές, βιοχημικές, μοριακές ή φυσιολογικές μεταβολές στον εκτιθέμενο οργανισμό οι οποίες προσδιορίζονται σε κύτταρα, σωματικά υγρά, ιστούς και όργανα του οργανισμού και είναι ενδεικτικές έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες. Τα PLFAs μπορούν να αποτελέσουν βιολογικούς δείκτες έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες σε επίπεδο πληθυσμού και κοινοτήτων. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες μεταβολών της σύστασης και δομής της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους που είναι αποτέλεσμα εξωγενών στρεσογόνων επεμβάσεων, γεωργικών πρακτικών ή κλιματολογικών συνθηκών (Kaur et al., 2005). Υψηλές ποσότητες συγκεκριμένων φωσφολιπιδίων έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν δείκτες όταν η μικροβιακή κοινότητα βρίσκεται υπό συνθήκες στρες. Οι μικροοργανισμοί μεταβάλουν τη σύσταση των φωσφολιπιδίων (Σχήμα 1.6) στις κυτταρικές τους μεμβράνες, ώστε να προσαρμόσουν τη λειτουργικότητα και ανθεκτικότητα των μεμβρανών στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες (Kaur et al., 2005).

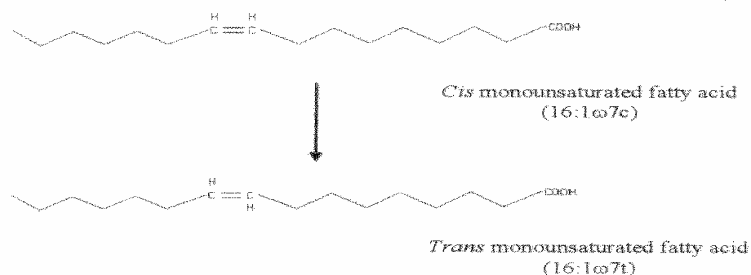


Σχήμα 1.6. Αντιδράσεις των PLFAs σε συνθήκες στρες.

Σε περιπτώσεις περιβαλλοντικού στρες οι συνέπειες είναι καταστροφικές για τους μικροοργανισμούς και συνήθως εκδηλώνονται με την αύξηση της ρευστότητας των μεμβρανών τους. Η αύξηση της ρευστότητας έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός στρώματος στο οποίο δεν παρατηρείται διαχωρισμός των φάσεων και άρα διαταράσσεται η διαπερατότητα της μεμβράνης (Kaur et al., 2005). Το γεγονός αυτό επηρεάζει τα συστήματα μεταφοράς, μέσω των οποίων διακινούνται οι διάφορες θρεπτικές ουσίες και δυσχεραίνει τη λειτουργία τους. Οι πιθανές μεταβολές στην αναλογία των PLFAs πραγματοποιούνται από τους μικροοργανισμούς προκειμένου να επανακάμψουν από τις δυσμενείς συνθήκες στρες.

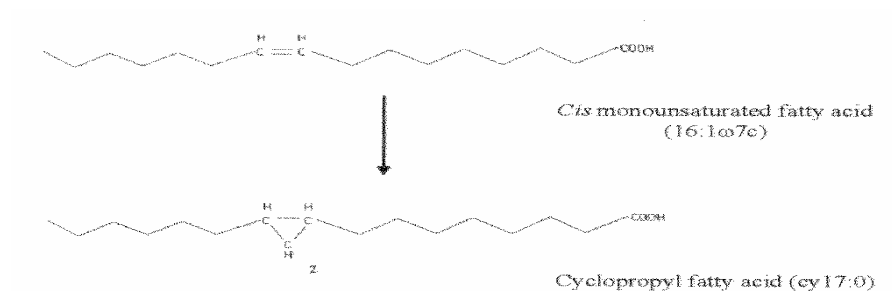
Σύμφωνα με τους Piotrowska-Seget & Mrozik (2003) όταν η αναλογία trans/cis μορφών συγκεκριμένων PLFAs είναι μεγαλύτερη από 0,1 σε βακτηριακές απομονώσεις, τότε τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση στρες. Η μετατροπή των cis ακόρεστων λιπαρών οξέων (16:1ω7c, 18:1ω7c) σε trans ακόρεστα λιπαρά οξέα (16:1ω7t, 18:1ω7t) είναι ένας μηχανισμός προσαρμογής των μικροοργανισμών που ενεργοποιείται σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (Σχήμα 1.7). Η μετατροπή αυτή δεν πραγματοποιείται κάτω από οποιοδήποτε συνθήκες στρες που μειώνουν την ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται, αλλά μόνο σε περιπτώσεις στρες που έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης (Kaur et al., 2005). Επιπλέον η αναλογία trans/cis των παραπάνω λιπαρών οξέων μεταβάλλεται και σε συνθήκες στρες που οφείλονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τους Pietikainen et al., (2000), Petersen & Klug (1994) και Peterson & Baath (2003) η άνοδος της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της αναλογίας trans/cis, όπως επίσης και η τοξικότητα από λιπάσματα και βαρέα

μέταλλα, η έλλειψη θρεπτικού υποστρώματος και το οσμωτικό στρες. Τέλος το χαμηλό pH προκαλεί μείωση της αναλογίας trans/cis (Kaur et al., 2005).



Σχήμα 1.7. Μετατροπή cis ακόρεστων λιπαρών οξέων σε trans.

Η έλλειψη θρεπτικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς οδηγεί σε μετατροπή των μονοακόρεστων PLFAs (16:1ω7c, 18:1ω7c) σε κυκλοπρόπανικά cy17:0 και cy19:0 (Σχήμα 1.8) (Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυκλοπρόπουλο PLFAs έχει συσχετισθεί με τον αυξημένο αναερόβιο μεταβολισμό ετερότροφων βακτηρίων (White 1983). Επιπλέον οι Kaur et al.,(2005) διαπίστωσαν αύξηση στη συγκέντρωση των κυκλοπρόπουλο λιπαρών οξέων σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών, χαμηλού pH και τοξικότητας από βαρέα μέταλλα, καθώς επίσης και κατά την εφαρμογή Φ.Ο. και διαφόρων καλλιεργητικών πρακτικών. Η μετατροπή αυτή των cis μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε κυκλοπρόπουλο, τα οποία είναι πιο σταθερά μόρια και δε μεταβολίζονται εύκολα από τα βακτήρια, έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της λειτουργικότητας της μεμβράνης. Σύμφωνα με τους Grogan & Cronan (1986) η μετατροπή αυτή προσδίδει σταθερότητα και προστατεύει τις μεμβράνες από διάφορες οξειδωτικές διεργασίες.



Σχήμα 1.8. Μετατροπή των ακόρεστων PLFAs σε κυκλοπρότυλο.

1.6. Επίδραση των συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη μικροβιακή κοινότητα.

Η επίδραση συνθετικών Φ.Π. στη μικροβιακή κοινότητα αποτέλεσε θέμα μελέτης διαφόρων ερευνητών. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Chinalia and Killhaux (1996), για τη μελέτη της επίδρασης του 2,4-D, με ανάλυση των PLFAs και με τη μέθοδο DGGE, παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις σε πληθυσμούς πρωτόζωων. Η βακτηριακή βιομάζα μειώθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος και η αναλογία των αρνητικών κατά Gram προς τα θετικά κατά Gram βακτήρια μεταβλήθηκε με την προσθήκη 2,4-D. Επίσης παρατηρήθηκαν μεταβολές και στη βιομάζα των μυκήτων, αλλά η αλλαγή αυτή δε σχετίστηκε με τις προσθήκες 2,4-D. Οι Button (1985) και Goulder (1987) έδειξαν ότι η αποδόμηση του 2,4-D σχετίζεται όχι με τις αρχικές πυκνότητες των βακτηριακών πληθυσμών αλλά με τους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων και με το είδος του υποστρώματος. Οι Kunik και Rybarova (1983) ανέφεραν ότι η αύξηση της πυκνότητας των βακτηριακών πληθυσμών και των πληθυσμών των βακτηρίων που αποδομούν το 2,4-D οφείλεται στη νέα πηγή άνθρακα. Η επίδραση του 2,4-D εξαρτάται από τη συγκέντρωση του (Raberg et al., 2003). Η βιοαποδόμηση του 2,4-D αποδίδεται κυρίως στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι Ratcliff et al., (2006) μελέτησαν την

επίδραση του ζιζανιοκτόνου glyphosate στη μικροβιακή κοινότητα και διαπίστωσαν ότι η μικροβιακή κοινότητα στα στρώματα εδάφους κάτω από τα επιφανειακά 10 cm δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή glyphosate. Αντίθετα στο επιφανειακό έδαφος παρατηρήθηκαν μεγάλες αυξήσεις στα λιπαρά οξέα-δείκτες για τα βακτήρια, ενώ οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων-δεικτών για μύκητες παρέμειναν σταθεροί.

Οι Roberto et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση του lindane στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους με τη χρήση της μεθόδου PCR-DGGE. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ύστερα από διάστημα 70 ημερών, το 70% της ποσότητας του lindane παρέμεινε στο έδαφος, διότι προσροφάται σε αυτό, χωρίς όμως να προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι μικροοργανισμοί ενδεχομένως δεν μπορούν να έρθουν σε επαφή με το lindane ή πιθανώς αναπτύσσουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας.

Οι Cycon & Piotrowska-Seget (2007) μελέτησαν την επίδραση των linuron, diazinon και mancozeb+dimethomorph στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η καλλιέργεια των βακτηρίων σε εκλεκτικά μέσα ανάπτυξης. Η εφαρμογή των Φ.Ο. προκάλεσε σημαντική αύξηση στους πληθυσμούς των ετερότροφων βακτηρίων ενώ αντίθετα μειώθηκαν τα νιτροποιητικά βακτήρια ιδιαίτερα στις υψηλές δόσεις εφαρμογείς (100 υψηλότερη της προτεινόμενης). Τα linuron, diazinon δεν επηρέασαν τον πληθυσμό των μυκήτων σημαντικά ενώ αντίθετα η εφαρμογή των μυκητοκτόνων mancozeb+dimethomorph προκάλεσε σημαντική μείωση στον πληθυσμό των μυκήτων.

Οι Das and Mukherjee (2000) διαπίστωσαν ότι η ανάπτυξη και αύξηση μικροοργανισμών ενισχυόταν από την προσθήκη εξαχλωροκυκλοεξανίου (HCH), phorate και fevalerate στο έδαφος. Κατά τη μικροβιακή διάσπαση χλωριωμένων υδρογονανθράκων, οργανοφωσφορικών και συνθετικών πυρεθροειδών εντομοκτόνων είχε παρατηρηθεί αύξηση των βακτηρίων του εδάφους (Das et al. 1994, Rache and Coats 1998). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην

απελευθέρωση C, ενέργειας και θρεπτικών στοιχείων κατά την αποδόμηση των Φ.Ο. από κάποιους μικροοργανισμούς.

Οι Busse et al. (2001) παρατήρησαν ότι η συνολική ποσότητα των ετερότροφων βακτηρίων μειώθηκε μετά από εφαρμογή glyphosate. Οι Silva et al. (2003) διαπίστωσαν μείωση 60% στα βακτήρια μετά από εφαρμογή raclobutrazol σε σύγκριση με το μάρτυρα μετά από διάστημα 5 μηνών. Η αρνητική επίδραση των captan, benomyl and glyphosate στους πληθυσμούς των μυκήτων μελετήθηκε από τους Martinez-Toledo et al. (1998), Smith et al. (2000) και Busse et al. (2001). Οι Das et al., (2005) διαπίστωσαν αξιόλογη αύξηση του αριθμού των μυκήτων μετά από εφαρμογή phorate. Οι Martinez-Toledo et al. (1998), Chen et al. (2001a), Kucharski et al. (2004) και Przybulewska and Nowak (2004) διαπίστωσαν ότι τα βακτήρια που συμμετέχουν στον κύκλο του N έχουν μεγάλη ευαισθησία σε Φ.Ο., γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτή η ομάδα μικροοργανισμών μπορεί να έχει σημαντικότατο ρόλο στην εκτίμηση της επίδρασης των Φ.Ο. στο οικοσύστημα του εδάφους (Taiwo and Oso, 1997, Martinez-Toledo et al. 1998, Monkiedje et al. 2002).

Η επίδραση των Φ.Ο. στη μικροβιακή κοινότητα δε σχετίζεται μόνο με την αντίδραση των μικροοργανισμών στην έκθεσή τους σε υψηλές ή χαμηλές συγκεντρώσεις Φ.Ο. (Nowak et al. 1999). Κάποια είδη μικροοργανισμών έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τις Φ.Ο. σαν πηγή ενέργειας (Johansen et al. 2001). Σύμφωνα με τους Jana et al. (1998) ορισμένες Φ.Ο. προκαλούν τον θάνατο σε ευαίσθητους πληθυσμούς βακτηρίων της μικροβιακής κοινότητας και τα οργανικά συστατικά που απελευθερώνονται από τα νεκρά βακτήρια, όπως N και P αξιοποιούνται από τα υπόλοιπα μέλη της μικροβιακής κοινότητας. Τα είδη που δεν είναι ευαίσθητα σε Φ.Ο. αξιοποιούν τα συστατικά που απελευθερώνονται και αυξάνουν έτσι τον πληθυσμό τους (Das and Mukherjee 2000). Επιπλέον η επίδραση των Φ.Ο. στη μικροβιακή κοινότητα δε σχετίζεται απαραίτητα με τις αλλαγές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που είναι υπεύθυνοι για τις διάφορες δραστηριότητες (Bollen 1979). Μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων λόγω των Φ.Ο. μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στη δραστηριότητα του οικοσυστήματος.

Οι Amirkhanov et al., (1994) διαπίστωσαν ότι τα εντομοκτόνα γ-HCH, cypermethrin και chlorfluazuron σε υψηλές δόσεις στον αγρό παρεμπόδισαν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι Ahmed και Ahmad (2006) πραγματοποίησαν πειράματα αγρού και εργαστηρίου για να μελετήσουν την επίδραση των chlorpyrifos, imidacloprid, cypermethrin, endosulfan, carbofuran, και bifenthrin σε συγκεντρώσεις 125, 250, 500, and 1000 mg/kg στη μικροβιακή κοινότητα. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων μετρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα και διαπιστώθηκε ότι το chlorpyrifos προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των βακτηρίων στο εργαστήριο, ενώ στον αγρό το αποτέλεσμα δεν έγινε αντιληπτό αμέσως. Το bifenthrin είχε θετική επίδραση στους βακτηριακούς πληθυσμούς σε συνθήκες εργαστηρίου. Το carbofuran προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού βακτηρίων. Η θετική επίδραση του carbofuran, που προκαλεί αύξηση των βακτηρίων είχε διαπιστωθεί και από τους Dordevic et al. (1998) και Das & Mukherjee et al. (1998) και ειδικότερα εκείνων που συμμετέχουν στον κύκλο του N. Σύμφωνα με τους Rangaswamy and Venkateswarlu (1992) και Ajaz et al., (2005) τα cypermethrin και monocrotophos είχαν αρνητική επίδραση στο συνολικό αριθμό των βακτηρίων του εδάφους, ενώ το fenvalerate δεν είχε σχεδόν καμία επίδραση στους μικροοργανισμούς. Επιπλέον διαπίστωσαν ότι τα dimethoate, fenitrothion, lindane, phorate και malathion είχαν αρνητική επίδραση σε κάποιους μικροοργανισμούς και θετική σε κάποιους άλλους, ενώ το imidacloprid προκάλεσε μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων σε υψηλές συγκεντρώσεις και το bifenthrin προκάλεσε αύξηση στη μικροβιακή κοινότητα. Στην περίπτωση του endosulfan παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ανάλογα με τη συγκέντρωση. Το endosulfan προκάλεσε σημαντική μείωση σε υψηλή συγκέντρωση (1000 ppm), γεγονός που είχε διαπιστωθεί και από τους Dygrak και Ozcelik (1998) και Nasim et al. (2005).

Οι Boucard et al., (2007) μελέτησαν την επίδραση των οργανοφωσφορικών και των συνθετικών πυρεθροειδών στους μικροοργανισμούς και ειδικότερα στη μικροβιακή δραστηριότητά. Επιπλέον οι Boucard et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση του πυρεθροειδούς flumethrin, του οποίου η δραστική ουσία είναι η φλουμεθρίνη και του οργανοφωσφορικού Ectomort, του οποίου η δραστική ουσία είναι το propetamphos, σε 15 είδη πρωτόζωων, 4 είδη αμοιβάδων και στην

ανάπτυξη των βακτηρίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το οργανοφωσφορικό είχε τοξικότερη δράση έναντι των πρωτόζωων σε σύγκριση με το πυρεθροειδές, ενώ τα βακτήρια δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή των Φ.Π. Οι Pander and Singh (2004) μελέτησαν την επίδραση των chlorpyrifos και quinalphos σε πληθυσμούς βακτηρίων και μυκήτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν οι βακτηριακοί πληθυσμοί μειώθηκαν βραχυπρόθεσμα, ενώ ανέκαμψαν σε διάστημα 45 και 60 ημερών. Για τους πληθυσμούς των μυκήτων αρχικά παρατηρήθηκε μείωση στην περίπτωση του quinalphos, ενώ μετά από διάστημα 60 ημερών οι μύκητες ανέκαμψαν.

1.6.1.Fosthiazate

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του fosthiazate στη μικροβιακή κοινότητα. Το fosthiazate αποτελεί μια σχετικά νέα οργανοφωσφορική φυτοπροστατευτική ουσία, που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη για την καταπολέμηση των ριζόκομβων νηματωδών (*Meloidogyne* spp.) σε καλλιέργειες τομάτας και των κυστωδών νηματωδών (*Globodera* spp.) σε καλλιέργειες πατάτας. Δεν έχει διασυστηματική δράση. Εφαρμόζεται στο έδαφος μόνο μια φορά ανά καλλιεργητική περίοδο, 2-3 ημέρες πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Η προτεινόμενη δόση είναι 300-400 g/ στρέμμα που αντιστοιχεί σε αναμενόμενη συγκέντρωση 3μg/g εδάφους αν θεωρηθεί ότι το ειδικό βάρος του εδάφους είναι 1,3 g/ml και την εφαρμογή ακολουθεί ενσωμάτωση στα 15 cm.

Η συμπεριφορά του στο περιβάλλον και η τύχη του στο έδαφος έχει μελετηθεί εκτενώς. Οι ως τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι η διάσπαση του fosthiazate στο έδαφος οφείλεται σε μικροβιακές αλλά και αβιοτικές διεργασίες. Σύμφωνα με τους Sturz και Kimpinski (1999) έχει σημαντική επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του fosthiazate στο έδαφος κυμαίνεται από 15 ως 60 ημέρες (Pantelalis et al., 2006). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η διάσπαση του είναι ταχύτερη σε εδάφη με ουδέτερο προς αλκαλικό pH, ενώ η προσροφήσή του είναι αυξημένη σε εδάφη με υψηλότερη περιεκτικότητα σε

οργανική ουσία (Pantelidis et al., 2006, Qin et al., 2004). Το fosthiazate παρουσιάζει σχετική σταθερότητα στη φωτόλυση και υδρολύεται ταχύτατα σε αλκαλικό περιβάλλον (pH=9). Επίσης για την έκπλυση του fosthiazate στο έδαφος υπάρχει περιορισμένος αριθμός δεδομένων στη διεθνή βιβλιογραφία. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα από τους Karpouzas et al., (2007) έδειξαν ότι υπάρχει κίνδυνος έκπλυσης του fosthiazate ιδιαίτερα σε όξινα αμμώδη εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία, όπου το συγκεκριμένο οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο παρουσιάζει αργή διάσπαση, χαμηλή προσρόφηση και υψηλή κινητικότητα. Επιπρόσθετα, πειράματα αγρού που πραγματοποιήθηκαν για τρία συνεχή έτη σε περιοχή της Ελβετίας έδειξαν ότι το fosthiazate εκπλύθηκε στα υπόγεια νερά σε μέγιστες συγκεντρώσεις που έφτασαν τα 0,03 μg/l, όταν η ανώτερη επιτρεπόμενη τιμή που έχει ορισθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα πόσιμα νερά είναι 0,1 μg/l (EU, 2003). Επιπλέον οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επιφανειακής απορροής του fosthiazate έδειξαν ότι είναι μάλλον πιθανή μετά από 90 ημέρες, αλλά ακόμη και τότε μόνο το 12,5% της αρχικής ποσότητας ανιχνεύεται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους και η συγκέντρωση του στο εκπλυνόμενο νερό βρίσκεται κάτω από τα όρια κινδύνου για το πόσιμο νερό (US EPA, 2004).

1.6.2. Επίδραση καπνιστικών Φ.Ο. στη μικροκοινότητα του εδάφους

Η επίδραση διαφόρων καπνιστικών Φ.Π. στη μικροβιακή κοινότητα αποτέλεσε θέμα μελέτης διαφόρων ερευνητών. Οι Klose et al., (2005) πραγματοποίησαν εφαρμογές διαφόρων καπνιστικών προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι δυνατό να αντικατασταθεί το πιο δημοφιλές καπνιστικό βρωμιούχο μεθύλιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους έδειξαν ότι οι εφαρμογές βρωμιούχου μεθυλίου με χλωροπικρίνη, propargyl bromide και του ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου δεν επηρέασαν σε μεγάλο βαθμό τη μικροβιακή

κοινότητα του εδάφους. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν αυξημένη ευαισθησία των μυκορριζών στα καπνιστικά και σημαντική μείωση τους.

Οι Corden και Young (1965) διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή metham sodium οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού των μυκήτων, όμως δεν επηρέασε τα βακτήρια και τους ακτινομύκητες, οι οποίοι αν και μειώθηκαν αρχικά, ξεπέρασαν τον αντίστοιχο πληθυσμό του μάρτυρα μετά την 45^η μέρα. Οι Taylor et al., (1996) διαπίστωσαν ότι η ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους να ανακάμπτουν μετά από έκθεση σε metham sodium και ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο διαφέρει. Η εφαρμογή metham sodium και ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου οδήγησε σε αρχική μείωση των PLFAs που αποτελούν δείκτες για τους ακτινομύκητες και τα θετικά κατά Gram βακτήρια τα οποία όμως επανέκαμψαν στις αρχικές τιμές με την πάροδο σύντομου χρονικού διαστήματος.

Οι Zelles et al., (1997), διαπίστωσαν ότι τα θετικά κατά Gram είναι ανθεκτικότερα από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια στην εφαρμογή πτητικών βιοκτόνων. Οι Zelles et al. (1996) είχαν διαπιστώσει ότι τα θετικά κατά Gram δεν επηρεάζονται από την απολύμανση με χλωροφόρμιο, λόγω της δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος, του σχηματισμού ενδοσπορίων και της πιο αυξημένης ικανότητας τους να προσαρμόζονται. Οι Ingham et al. (1991) και Ingham και Horton (1987) παρατήρησαν ότι οι μύκητες δεν επηρεάζονται από το χλωροφόρμιο, και απέδωσαν αυτό στην ταχύτερη προσαρμογή τους σε έδαφος που έχει απολυμανθεί.

Οι Ibekwe et al., (2001) μελέτησαν την επίδραση καπνιστικών σκευασμάτων στη μικροβιακή κοινότητα με την μέθοδο DGGE. Μετά από εφαρμογή των καπνιστικών βρωμιούχο μεθύλιο, ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο (MITC), 1,3-D και χλωροπικρίνης παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μικροβιακή κοινότητα. Η βιομάζα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και των μυκήτων μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του βρωμιούχου μεθυλίου. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στη βιομάζα των θετικών κατά Gram βακτηρίων, των μυκήτων και ακτινομυκήτων στο διάστημα από την 8^η ως τη 12^η εβδομάδα. Το ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο είχε την ίδια επίδραση με το βρωμιούχο μεθύλιο, εκτός από το ότι δεν παρατηρήθηκε ανάκαμψη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε

διάστημα 8 εβδομάδων. Τα 1,3-D και χλωροπικρίνη είχαν σημαντικότερη επίδραση στους ακτινομύκητες, δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση της βιομάζας τους, ενώ οι επιδράσεις τους γενικότερα ήταν ασθενέστερες.

1.6.2.1. Sodium Tetrathiocarbonate

Το Sodium Tetrathiocarbonate διατίθεται στην αγορά παγκοσμίως με τα εμπορικά ονόματα Enzone[®] και Etk-1101 και αποτέλεσε ένα από τα καπνιστικά ΦΠ, του οποίου η επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Χρησιμοποιείται ως καπνιστικό για την καταπολέμηση κυρίως νηματωδών αν και παρουσιάζει και καλή μυκητοκτόνο και εντομοκτόνο δράση. Εφαρμόζεται στο έδαφος σε θερμοκηπιακές και μη καλλιέργειες και είναι το μοναδικό καπνιστικό που μπορεί να εφαρμοστεί και μεταφυτρωτικά με το σύστημα της στάγδην άρδευσης. Στο έδαφος μεταβολίζεται προς διθειάνθρακα CS₂ που έχει ισχυρή και άμεση δράση εναντίον νηματωδών, εντόμων και μυκήτων εδάφους. Η επίδραση της εφαρμογής του στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους δεν έχει μελετηθεί ως σήμερα.

1.6.2.2. Metham Sodium

Το Metham Sodium ανήκει στα διθειοκαρβαμιδικά καπνιστικά ευρεώς φάσματος. Δρα δια μέσου της ταχύτατης απελευθέρωσης ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου (MITC) μόλις έρθει σε επαφή με υγρό έδαφος. Εφαρμόζεται σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην Ελλάδα καθώς και στον ανοιχτό αγρό στο εξωτερικό, είτε με το σύστημα της στάγδην άρδευσης όπου την εφαρμογή ακολουθεί επικάλυψη του εδάφους με πλαστικό, είτε με ειδικούς εφαρμογείς που εγχύουν στο έδαφος το καπνιστικό σε βάθος 15-20 cm και ακολουθεί υψηλή άρδευση του εδάφους. Η εφαρμογή υψηλών ποσοτήτων νερού στο έδαφος αμέσως μετά την εφαρμογή του έχει βρεθεί ότι μειώνει την πιθανότητα εξάτμισής του, ενώ ταυτόχρονα οδηγεί σε αυξημένη μετατροπή του metham sodium στην δραστική του μορφή, το ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο (El Hadiri et al., 2003). Το

metham sodium μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποστειρωτικό εδάφους, γιατί εξοντώνει εκτός από νηματώδεις και φυτοπαθογόνους μύκητες και έντομα εδάφους.

Το metham-sodium προτάθηκε ως εναλλακτικό καπνιστικό στη θέση του βρωμιούχου μεθυλίου στο Ισραήλ και σε άλλα κράτη (Di Primo et al., 2001). Αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή υψηλότερων και επαναλαμβανόμενων δόσεων του metham sodium στο ίδιο αγρό επι σειρά ετών είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των μικροβιακών πληθυσμών εξειδικευμένων αποδομητικών βακτηρίων και την ταχύτερη αποδόμηση του. Οι Smelt et al., (1989) και Warton και Matthiessen, (2000) μελέτησαν την ταχύτερη αποδόμηση του metham-sodium σε εδάφη της Ολλανδίας και της Αυστραλίας. Η ταχύτητα αποδόμησης του συσχετίστηκε άμεσα με τη δόση, αλλά και με το pH του εδάφους. Γενικά σε έδαφος με υψηλό pH η πιθανότητα ταχύτερης αποδόμησης του metham-sodium ήταν αυξημένη. Το metham-sodium είναι σταθερό και διαλυτό σε υδατικά διαλύματα, αλλά ασταθές σε διαλύτες. Επιπλέον διασπάται με διεργασίες όπως η φωτόλυση.

Σύμφωνα με τους Ou et al., (2006) η εξάτμιση του ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου σε αμμώδη εδάφη ολοκληρώθηκε σε διάστημα 20 ωρών ανεξάρτητα από τον τρόπο με τον οποίο εφαρμόστηκε το συγκεκριμένο καπνιστικό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δε χρησιμοποιήθηκε νερό και άρα το MITC παρέμεινε κυρίως σε στρώμα εδάφους βάθους 0-20 cm, ενώ με τη χρήση νερού ανιχνεύτηκε σε βάθος ως 60 cm.

1.7. Εφαρμογή βοτανικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Παρά το ότι η επίδραση συνθετικών ΦΠ και κυρίως των ευρέως φάσματος καπνιστικών εδάφους έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ως και σήμερα, η αντίστοιχη επίδραση βοτανικών ΦΠ που θεωρούνται περισσότερο ασφαλή και χρησιμοποιούνται στην βιολογική γεωργία δεν έχει μελετηθεί ως σήμερα. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές σε πιθανές επιδράσεις των Φ.Ο. βοτανικής προέλευσης στη σύσταση και δομή της μικροβιακής κοινότητας του

εδάφους. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η μοναδική μελέτη που αναφέρεται σε αυτό το θέμα προέρχεται από τους Gopal et al., (2007) στην οποία μελετήθηκε η επίδραση του azadirachtin σε πληθυσμούς βακτηρίων, ακτινομυκήτων, μυκήτων, αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Azotobacter* και νιτροποιητικών βακτηρίων. Η εκτίμηση της επίδρασης της Φ.Ο. πραγματοποιήθηκε με μεθόδους καλλιέργειας σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα. Ο πληθυσμός των βακτηρίων και των ακτινομυκήτων, αν και επηρεάστηκε αρνητικά μέχρι την 15^η μέρα μετά την εφαρμογή, μετά την 60^η μέρα ανέκαμψε και αυξήθηκε σημαντικά. Οι μύκητες και τα νιτροποιητικά βακτήρια ήταν οι πιο ευαίσθητες ομάδες μικροοργανισμών στην εφαρμογή του azadirachtin. Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε εφαρμογή των παρακάτω φυσικών Φ.Π. στο έδαφος προκειμένου να διαπιστωθεί αν προκαλούν μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

1.7.1. Azadirachtin/Neem

Πρόκειται για χημική ουσία με εντομοκτόνο δράση που παράγεται ως εκχύλισμα από τους σπόρους ή από άλλα τμήματα του δέντρου *Azadirachta indica* (Neem), καλλωπιστικού φυτού που φύεται στην Ινδία. Η δραστική ουσία είναι μίγμα 25 περίπου λιμονοειδών εκ των οποίων η ουσία με την υψηλότερη εντομοκτόνο δράση ονομάζεται azadirachtin. Το εμπορικό του όνομα είναι NeemAzal[®] EC και αναμένεται η εγκρισή για το Annex I 91/414. Το azadirachtin αναστέλλει την διατροφή του εντόμου με αποτέλεσμα το έντομο να σταματάει να τρέφεται επί του φυτού και κατά συνέπεια πεθαίνει μετά από διάστημα 5-7 ημερών. Επίσης αναστέλλει τη μεταμόρφωση των εντόμων παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των στεροειδών ή της ορμόνης μεταμόρφωσης που είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταμόρφωσης των ατελών εντόμων προς τέλεια. Εφαρμόζεται κυρίως στο έδαφος με ριζοπότισμα. Οι Tomson et al., (2004) μελέτησαν την τύχη του azadirachtin στο νερό και στα κατώτερα εδαφικά στρώματα και δεν παρατήρησαν έκπλυση του στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους.

1.7.2. Quillaja

Το υδατικό εκχύλισμα από το δέντρο *Quillaja saponaria* περιέχει σαπωνίνες, πολυφαινόλες, άλατα και σάκχαρα. Σύμφωνα με τους San Martin & Magunacelaya Juan Carlos (2005) τα υδατικά εκχυλίσματα του δέντρου *Quillaja saponaria*, που περιέχουν τριτερπενοειδείς σαπωνίνες, πολυφαινόλες, άλατα και σάκχαρα, εφαρμόστηκαν ενάντια σε είδη νηματωδών που θεωρούνται σοβαρότατοι εχθροί των φυτών όπως οι *Xiphinema index*, *Meloidogyne hapla*, *Xiphinema americanum* κ.α με ικανοποιητική αποτελεσματικότητα. Αρχικά η δραστηριότητα του *Quillaja saponaria* αποδόθηκε μόνο στις σαπωνίνες, όμως διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα οφείλεται σε συνδυασμένη δράση των σαπωνίνων και των πολυφαινολών. Πειράματα αγρού έδειξαν ότι η εφαρμογή του εκχυλίσματος *Quillaja saponaria* οδήγησε όχι μόνο σε έλεγχο των νηματωδών αλλά και σε αύξηση της παραγωγής. Η συγκεκριμένη έρευνα έδειξε ότι δόση 30L/ha είναι ικανή να ελέγξει τους πληθυσμούς των νηματωδών. Σύμφωνα με την EPA (Environmental Protection Agency 2003) το σκέυασμα είναι φιλικό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οργανική γεωργία και το εμπορικό του όνομα είναι QL AGRI®. Στην αγορά διατίθεται από το 2002 από την BASF-Chile και περιέχει 360g/l. Η περιεκτικότητά του σε σαπωνίνες είναι 19% και σε πολυφαινόλες 7,3%.

1.7.3. Melia azedarach

Η *Melia azedarach* είναι ένα δέντρο που ανήκει στην οικογένεια Meliaceae. Ο καρπός του έχει κίτρινο χρώμα και είναι δηλητηριώδης. Το εκχύλισμα, που παραλαμβάνεται από τον κορμό και τον καρπό χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση παρασιτικών γεωσκώληκων. Το είδος *Melia azedarach* (Meliaceae) συναντάται στη Νότια Αφρική και έχει εντομοκτόνο δράση (Ascher et al., 1995). Σύμφωνα με τους Huang et. al., (1996) τα λιμονοειδή του φυτού *Melia azedarach* έχουν ενδιαφέρουσες δομικές και βιολογικές ιδιότητες. Από το φυτό αυτό έχουν απομονωθεί 12 λιμονοειδή τα οποία πιθανόν αναστέλλουν τις τροφικές δραστηριότητες των εντόμων. Οι παραπάνω ερευνητές απομόνωσαν τα λιμονοειδή

σαλανάλη και μελιακαρπίνη E και μελέτησαν τις επιδράσεις αυτών και τεσσάρων ακόμη ήδη γνωστών λιμονοειδών στην προνύμφη του είδους *Spodoptera eridania*. Η μελικαρπίνη E αποδείχθηκε πως είχε μεγαλύτερη δραστικότητα εναντίον των προνυμφών 3^{ου} σταδίου.

Οι Abou-Fakhr Hammad et al., (2006) μελέτησαν την επίδραση εκχυλίσματος καρπού στον αλευρώδη *Bremisia argentifolii* υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Τα υδατικά διαλύματα του εκχυλίσματος του φυτού από τρεις διαφορετικές πηγές είχαν σημαντική αρνητική επίδραση στις νύμφες του *Bremisia argentifolii* σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι Banchio et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση του εκχυλίσματος καρπού από το φυτό *Melia azedarach* σε ενήλικα και προνύμφες του είδους *Liriomyza huidobrensis*. Η θνησιμότητα των νυμφών αυξήθηκε με την εφαρμογή εκχυλίσματος. Επιπρόσθετα σύμφωνα με τους Elbadri et al.,(2008) αξιολογήθηκε η ικανότητα εκχυλίσματος καρπού *Melia azedarach* στον έλεγχο του νηματώδη *Bursaphelenchus xylophilus* στο εργαστήριο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων το εκχύλισμα προκάλεσε θνησιμότητα 34% μετά από 72 ώρες.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του στη μικροβιακή κοινότητα εφαρμόστηκε αλεσμένος καρπός του φυτού.

1.9. Ερευνητικοί σκοποί

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των πιθανών επιδράσεων που μπορεί να έχουν ΦΠ βοτανικής προέλευσης στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους. Οι επιδράσεις αυτές θα μελετηθούν σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επιδράσεις που προκαλούν συνθετικά ΦΠ καθώς και καπνιστικά και μη-καπνιστικά που είναι γνωστό ότι προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η έλλειψη ερευνητικών δεδομένων στην διεθνή βιβλιογραφία για την επίδραση των ΦΠ βιολογικής προέλευσης στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αποτέλεσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Επιλογή πειραματικού αγρού-εδάφους

2.1.1. Θέσεις δειγματοληψίας και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκε πειραματικό τεμάχιο σε αγρό στην περιοχή του Αγροκτήματος Θέρμης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους προσδιορίστηκαν με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδαφολογίας της Γεωπονικής Σχολής του Α.Π.Θ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1 Το έδαφος είναι αλκαλικό, τυπικό ανόργανο έδαφος, αλκαλικής αντίδρασης και αμμοπηλώδες (SL) βάσει της κοκκομετρικής του σύστασης (Εργαστηριακές Ασκήσεις του Μαθήματος Εδαφολογίας, 2007).

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδάφους.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Τιμές
pH	8.65
Οργανικός Άνθρακας (%)	0.84
CaCO ₃ (%)	4.2
Ικανότητα Ιοντικής Ανταλλαγής (CEC, meq/100g)	11.7
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (ms/cm)	0.72
Άμμος (%)	56.2
Ίλος (%)	30.4
Άργιλος (%)	13.4
Τύπος εδάφους	Αμμοπηλώδες (Sandy Loam, SL)

Ο συγκεκριμένος πειραματικός αγρός χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος αγρού κατά τη χρονική περίοδο από τον Ιούνιο 2007 μέχρι το Σεπτέμβριο 2007. Από τον ίδιο πειραματικό αγρό συλλέχθηκε έδαφος για τη διεξαγωγή του πειράματος, το οποίο πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα την 1^η Δεκεμβρίου 2007. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τα πρώτα 10-15 cm και η συνολική ποσότητα του κάθε δείγματος ήταν 7 κιλά. Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακούλες με οπή και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό ψυχρό θάλαμο, σε θερμοκρασία 0 - 5°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία τους.

2.2. Μετρήσεις και Πειράματα

2.2.1. Μετρήσεις εδαφολογικών χαρακτηριστικών

Οι φυσικοχημικές παράμετροι που παίζουν συνήθως σημαντικό ρόλο στη διάσπαση και προσρόφηση των ΦΠ στο έδαφος όπως το pH, η οργανική ουσία του εδάφους, καθώς και η υγρασία των εδαφών επαναπροσδιορίστηκαν σε κάθε δείγμα στο εργαστήριο μας όπως περιγράφεται παρακάτω, ενώ η κοκκομετρική σύσταση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Βουγιούκου, το CaCO₃ με τη μέθοδο του ασβεστόμετρου, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) με τη μέθοδο οξικού νατρίου 1N, pH 8,2 – οξικού αμμωνίου 1N, pH 7, ο οργανικός C με τη μέθοδο υγρής οξείδωσης και η ηλεκτρική αγωγιμότητα με τη χρήση αγωγιμόμετρου (Εργαστηριακές Ασκήσεις του Μαθήματος Εδαφολογίας, 2007).

2.2.1.1. Προσδιορισμός του pH των εδαφών

Το pH προσδιορίστηκε σε πάστα αεροξηραμένου εδάφους/νερού σε αναλογία 1:2,5 (β/ο) σε ποτήρι ζέσεως. Προστέθηκαν 25ml νερού σε 10g αεροξηραμένου εδάφους. Η μέτρηση έγινε υπό συνεχή ανάδευση του μίγματος με

τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, σε πεχάμετρο υψηλής ευκρίνειας HANNA pH 211 με συνδισασμένο ηλεκτρόδιο METTLER TOLEDO 412.

2.2.1.2. Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών

Η υγρασία των εδαφών προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Karrouzas et al. (2004). Σύντομα, ορισμένη ποσότητα εδάφους $10 \pm 0,001g$, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο αλουμινένιο δοχείο και καταγράφηκε το συνολικό βάρος. Για κάθε δείγμα προετοιμάστηκαν δύο επαναλήψεις. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο Labline στους $105^{\circ}C$ για 12-14 h και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$MC = [(W_1 - W_2) * 100\%] / (W_1 - W_{cont})$$

MC: η υγρασία του εδάφους

W_1 : το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W_2 : το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W_{cont} : το βάρος του δοχείου

2.2.2. Συνολική Βιομάζα των εδαφών

Για τον υπολογισμό της συνολικής βιομάζας C των εδαφών ακολουθήθηκε η μέθοδος της N-βινυδρίνης των Joergesen and Brookes (1990), όπως τροποποιήθηκε από τους Mele and Carter (1996). Σύντομα, χρησιμοποιήθηκε το χλωροφόρμιο για τη λύση των κυττάρων της περιεχόμενης στο έδαφος βιομάζας και ακολούθησε εκχύλιση της με διάλυμα KCl. Η ποσότητα των ελευθέρων ομάδων, οι οποίες είναι ενεργές σε αντίδραση βινυδρίνης, όπως αμμωνία, αμινοξέα, πεπτιδία και πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών με τη χρήση του χλωροφορμίου έχει βρεθεί ότι σχετίζονται

άμεσα με την αρχικά περιεχόμενη βιομάζα C (% οργανικό άνθρακα-O.C.%) του εδάφους, σύμφωνα με τη σχέση:

$$C = 21 * \text{ninhydrin- N}$$

Ποσότητα 20g εδάφους μεταφέρθηκε μέσα σε κωνική φιάλη 100ml (με εσμίρισμα). Σε κάθε κωνική φιάλη προστέθηκαν 2 ml CHCl_3 και αμέσως μετά τοποθετήθηκε το πώμα και καλύφθηκε με parafilm ώστε να περιοριστούν τυχόν απώλειες χλωροφορμίου. Για κάθε δείγμα προετοιμάστηκαν 5 συνολικά υπό-δείγματα (20g). Στα τρία πρώτα υπό-δείγματα προστέθηκε χλωροφόρμιο, ενώ τα άλλα δύο χωρίς προσθήκη χλωροφορμίου χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο επώασης σταθερής θερμοκρασίας 30°C για 7 ημέρες. Με το πέρας αυτού του διαστήματος, τα δείγματα στα οποία προστέθηκε χλωροφόρμιο απομακρύνθηκαν από τον θάλαμο επώασης, αφαιρέθηκε το πώμα και τοποθετήθηκαν σε απαγωγό για τουλάχιστον 1 ώρα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια χλωροφορμίου.

Μετά την επώαση τα δείγματα αναμίχθηκαν με 50ml διαλύματος 2M KCl και ακολούθησε ανάδευση για μια ώρα περίπου ώστε να εκχυλιστούν οι διάφορες μορφές αζώτου (N) που ελευθερώθηκαν από τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών του εδάφους. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 5 min και ποσότητα 0,5 ml μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 0,5 ml διαλύματος νινυδρίνης (Sigma-Aldrich, UK). Κατόπιν οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία βρασμού, όπου παρέμειναν για 15 min, ώστε να σταθεροποιηθεί ο χρωματισμός των διαλυμάτων. Τα δείγματα στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε διάλυμα προστέθηκαν 5 ml διαλύματος αιθανόλης:νερού (50:50, o/o), αναδεύτηκαν προσεκτικά και ο όγκος του διαλύματος συμπληρώθηκε ως τα 10 ml με νέα προσθήκη διαλύματος αιθανόλης:νερού (50:50, o/o). Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Spectronic 20D σε μήκος κύματος 570nm με μάρτυρα διάλυμα αιθανόλης:νερού (50:50, o/o).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της Ν-βινυδρίνης, που εκχυλίστηκε, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε από τη συσχέτιση της απορρόφησης των διαλυμάτων στα 570nm με τη συγκέντρωση Ν. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα λευκίνης συγκέντρωσης 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 mg N/L σε διάλυμα 2M KCl. Δύο επαναλήψεις (1ml) από κάθε πρότυπο διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 0,5 ml βινυδρίνης όπως και προηγουμένως. Τα διαλύματα αυτά στην συνέχεια θερμάνθηκαν και αραιώθηκαν όπως έχει περιγραφεί στην παραπάνω παράγραφο και για τα εκχυλίσματα από τα δείγματα εδάφους. Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 570nm με μάρτυρα μείγμα αιθανόλης:νερού (50:50) και κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βάσει της απορρόφησης των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης Ν.

2.2.3. Πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες

2.2.3.1. Περιγραφή του πειράματος

Ο σκοπός του πειράματος υπό ελεγχόμενες συνθήκες ήταν η μελέτη της επίδρασης ΦΠ βιολογικής προέλευσης, συνθετικών και καπνιστικών στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους σε ελεγχόμενες συνθήκες. Για τη μελέτη των παραμέτρων αυτών πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου το έδαφος τοποθετήθηκε σε γλαστράκια με ή χωρίς την παρουσία φυτού τομάτας. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν τα εξής Φ.Π.: azadirachtin (Neemazal EW), φυτικό εκχύλισμα από το φυτό *quillajia saponaria* (QL Agri), αλεσμένος καρπός του φυτού *Melia*, fosthiazate (Nemathorin EC) και metham sodium (Vapam EC).

Αρχικά συλλέχθηκε η απαιτούμενη ποσότητα εδάφους από αγρό του Αγροκτήματος του ΑΠΘ στην περιοχή της Θέρμης, Θεσσαλονίκης. Το έδαφος αφέθηκε για 24 h σε πλαστικό νάιλον προκειμένου να αεροξηρανθεί μερικώς ώστε

να καταστεί πιο εύκολος ο χειρισμός του. Ακολούθησε κοσκίνισμα του εδάφους με κόσκινο οπών 5 mm, και το συνολικό αρχικό δείγμα εδάφους διαχωρίστηκε σε 6 δείγματα των 7 kg, στα οποία έγινε επέμβαση με την προτεινόμενη δόση του κάθε Φ.Π. Οι δόσεις που εφαρμόστηκαν υπολογίστηκαν για ποσότητα 7 kg όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5. Για όλα τα Φ.Π. η επέμβαση έγινε στον ίδιο χρόνο (t_0) και αφού ακολούθησε καλή ανάμιξη, τα δείγματα αφέθηκαν για 24h ώστε να επέλθει ισορροπία και ομοιόμορφη κατανομή του ΦΠ στο έδαφος. Έξι δείγματα εδάφους (30 g) διαχωρίστηκαν από το αρχικό δείγμα πριν από την εφαρμογή των ΦΠ και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των PLFAs σε χρόνο 0.

Το έδαφος από καθένα από τα έξι αρχικά δείγματα διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε σε 30 γλαστράκια των 200 g, τα μισά εκ των οποίων παρέμειναν μόνο με έδαφος ενώ στα υπόλοιπα έγινε μεταφύτευση φυτών τομάτας τα οποία βρισκόνταν στο στάδιο των 3-4 φύλλων. Πραγματοποιούνταν ποτίσματα ανά διαστήματα 3-4 ημερών. Ανά δέκα τα γλαστράκια αντιστοιχούσαν στους χρόνους δειγματοληψίας οι οποίοι ήταν t_{15} , t_{30} και t_{60} . Επομένως για κάθε μεταχείριση (Φ.Π.) υπήρχαν από πέντε επαναλήψεις με φυτό ή χωρίς φυτό για κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ως εξής: το περιεχόμενο που βρισκόταν στα πέντε γλαστράκια της ίδιας μεταχείρισης και αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένο χρόνο τοποθετούνταν σε πλαστική σακούλα. Ακολουθούσε ανάδευση και από το συνολικό δείγμα επιλέγονταν τρία υπο-δείγματα για παραπέρα ανάλυση τα οποία και αποθηκεύονταν σε ψυχρό θάλαμο στους 4°C μέχρι την επεξεργασία τους για τον προσδιορισμό των PLFAs (Phospholipid Fatty Acids).

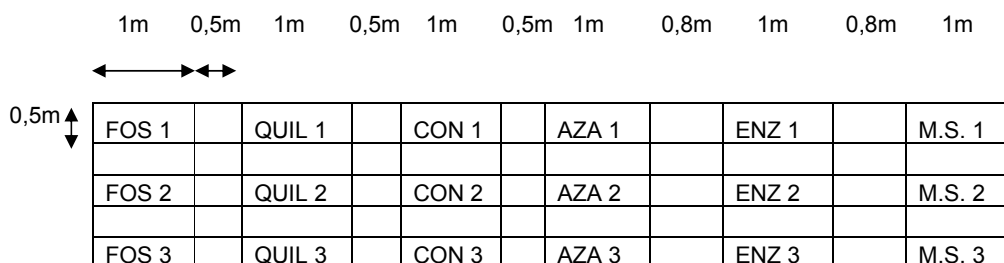
Ειδικά στην περίπτωση του metham sodium, μετά την εφαρμογή το έδαφος τοποθετήθηκε σε μεγάλη γλάστρα (20L) και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού ώστε να διευκολυνθεί η παραγωγή και ελευθέρωση του δραστικού ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου, η διαφυγή του οποίου αποφεύχθηκε με την κάλυψη της επιφάνειας της γλάστρας με διπλό στρώμα πλαστικού. Η στεγανοποίηση αυτή στην περίπτωση του metham sodium έγινε ώστε να μιμηθούμε όσο το δυνατό τον συνήθη τρόπο εφαρμογής του σε θερμοκηπιακές

καλλιέργειες, ενώ παράλληλα να μπορούμε να χειριστούμε με ασφάλεια το έδαφος στο οποίο εφαρμόστηκε το καπνιστικό σε συνθήκες εργαστηρίου. Η γλάστρα διατηρήθηκε καλυμμένη για 15 ημέρες σε θάλαμο επώασης σε σταθερή θερμοκρασία $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Μετά το πέρας των 15 ημερών ακολούθησε αναμόχλευση του εδάφους, ώστε να απελευθερωθούν οι ατμοί ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του σε γλαστράκια και η μεταφύτευση των φυτών τομάτας. Όλα τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο θάλαμο έτσι ώστε όλο το πείραμα πραγματοποιήθηκε υπό ελεγχόμενες συνθήκες και συγκεκριμένα σε θερμοκρασία $26 - 28^{\circ}\text{C}$ και φωτοπερίοδο διάρκειας 14 ωρών και σκοτεινή περίοδο διάρκειας 10 ωρών.

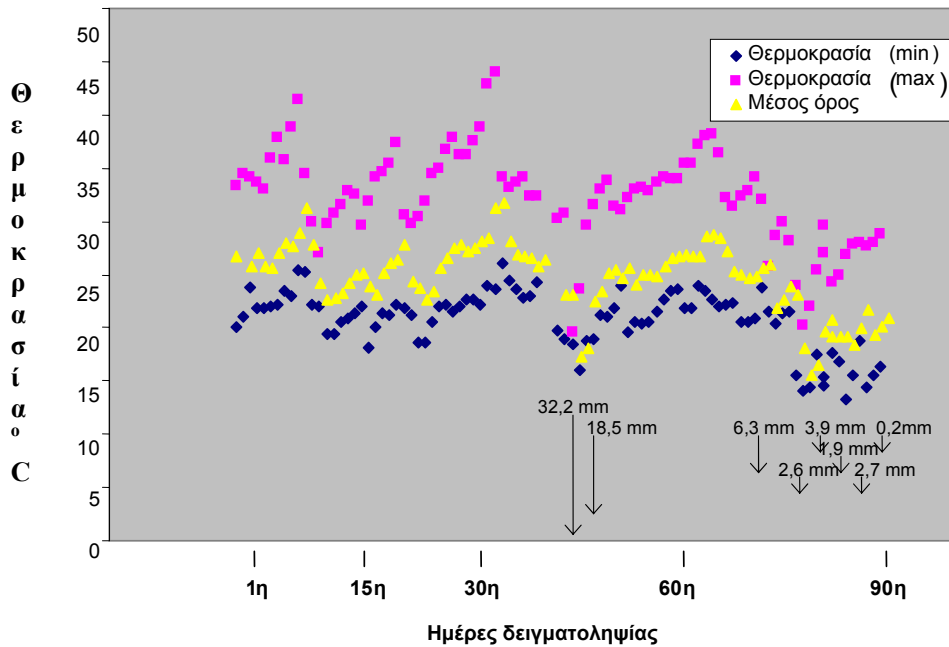
2.2.4. Πείραμα αγρού

Σκοπός του πειράματος αγρού ήταν η μελέτη της επίδρασης φυσικών ουσιών, συνθετικών ΦΠ και καπνιστικών στην σύσταση και δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους σε συνθήκες αγρού. Τα ΦΠ που εφαρμόστηκαν ήταν τα fosthiazate (Nemathorin EW), quillajia (Quillajia saponaria SL), azadirachtin (Neemazal EC), sodium tetrathiocarbonate (Enzone SL) και metham sodium (Varam EC).

Σε έκταση διαστάσεων $2,5 \times 10 \text{ m}$, η οποία επιλέχθηκε ως πειραματικό τεμάχιο, αφού προηγήθηκε φρεζάρισμα, οριοθετήθηκαν μικρά πειραματικά τεμάχια διαστάσεων $0,5 \times 1 \text{ m}$ το καθένα. Η εφαρμογή των Φ.Π. πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ποτιστηρίου. Τα διαστήματα μεταξύ των μικροτεμαχίων ήταν $0,5 \text{ m}$. Στην περίπτωση των μικροτεμαχίων που δέχτηκαν την επέμβαση των δύο καπνιστικών και του azadirachtin το μεταξύ τους διάστημα – περιθώριο διατηρήθηκε στα $0,8 \text{ m}$, ώστε να περιορίσουμε πιθανή οριζοντια διάχυση καπνιστικών προς τα παρακείμενα μικρο-τεμάχια. Η διάταξη των μικροτεμαχίων απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



Ο συνολικός αριθμός των πειραματικών τεμαχίων ήταν 18, δηλαδή τρία πειραματικά τεμάχια για κάθε μεταχείριση. Η πρώτη δειγματοληψία εδαφών πραγματοποιήθηκε στο χρόνο (t_0) λίγο πριν από την εφαρμογή των ΦΠ ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει σημαντική φυσική παραλλακτικότητα στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στα διάφορα πειραματικά τεμάχια και η οποία δεν οφείλεται στην εφαρμογή των Φ.Π. Μετά την εφαρμογή των ΦΠ δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια σε χρόνους 7, 30, 60 και 90 ημερών. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκαν δείγματα επιφανειακού εδάφους (0-15 cm) από πέντε διαφορετικά σημεία του κάθε τεμαχίου. Τα δείγματα από κάθε πειραματικό τεμάχιο τοποθετήθηκαν στην ίδια πλαστική σακούλα και αναμίχθηκαν έτσι ώστε τελικά να καταλήξουμε σε τρία δείγματα εδάφους ανά μεταχείριση και χρόνο δειγματοληψίας. Αμέσως μετά την ανάμιξη τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ψυχρό θάλαμο στους 4°C μέχρι την παραπέρα επεξεργασία τους. Η περίοδος που συνήθως μεσολαβούσε μεταξύ δειγματοληψίας και επεξεργασίας των δειγμάτων δεν ξεπερνούσε σε καμία περίπτωση τις 10 ημέρες. Τα πειραματικά τεμάχια αρδεύτηκαν με την ίδια ποσότητα νερού αμέσως μετά το πέρας κάθε δειγματοληψίας. Η άρδευση πραγματοποιήθηκε ώστε να προσομοιάσουμε όσο το δυνατό τις συνθήκες καλλιέργειας στον αγρό, αλλά και να αποφύγουμε την ισχυρή επίδραση άλλων παραγόντων, όπως η επίδραση ακραίων θερμοκρασιών στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας, καθώς το πείραμα αγρού πραγματοποιήθηκε κατά τη θερινή περίοδο ορισμένες ημέρες επικράτησαν θερμοκρασίες ξεπερνούσαν τους 40°C.



Σχεδιάγραμμα 2.1. Οι μέγιστες, ελάχιστες και μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες αέρα που επικράτησαν στην περιοχή όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα αγρού κατά την περίοδο του πειράματος. Με βέλη σημειώνονται οι βροχοπτώσεις

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, καθώς και οι βροχοπτώσεις που σημειώθηκαν, παρουσιάζονται στο σχεδιάγραμμα 2.1 σύμφωνα με την καταγραφή τους στο Μ.Σ.Μίκρας (ΕΜΥ). Ο υπολογισμός των δόσεων περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

2.2.5. Φ.Π. που εφαρμόστηκαν και υπολογισμός των ποσοτήτων

Ο υπολογισμός των δόσεων των Φ.Π. έγινε με βάση την προτεινόμενη δόση, θεωρώντας ότι την εφαρμογή της ανά στρέμμα ακολουθεί ενσωμάτωση στα πρώτα 10cm του επιφανειακού εδάφους και ότι το έδαφος έχει μέσο ειδικό βάρος $1,3 \text{ g/cm}^3$.

Η εφαρμογή του οργανοφωσφορικού νηματοδοκτόνου fosthiazate πραγματοποιήθηκε με την μορφή υδατικού διαλύματος του σκευάσματος Nemathorin 150 EW (15%). Η προτεινόμενη δόση του fosthiazate (6 L/στρ) εφαρμόστηκε με καθολική εφαρμογή σε όλη την επιφάνεια των πειραματικών τεμαχίων. Για το 1^ο πείραμα υπολογίστηκε η δόση ανά kg εδάφους και αναμίχθηκαν 0,525ml σκευάσματος σε 250ml H₂O. Για το 2^ο πείραμα προετοιμάστηκε ψεκαστικό διάλυμα με διάλυση 15 ml σκευάσματος NEMATHORIN σε 16 λίτρα νερό. Η εφαρμογή στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με σιφώνιο, ενώ στη δεύτερη ομοιόμορφα με ποτιστήρι. Με βάση την προτεινόμενη δόση του συγκεκριμένου σκευάσματος πρέπει η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο έδαφος να είναι περίπου 3μg/g εδάφους.

Η εφαρμογή του φυσικού νηματοδοκτόνου Quillajia πραγματοποιήθηκε με την μορφή υδατικού διαλύματος (25 ml σε 16 λίτρα νερού) του σκευάσματος Quillajia Saponaria SL (35%) λαμβάνοντας υπόψη ότι η προτεινόμενη δόση είναι 10L/στρέμμα. Για τα 7 Kg αραιώθηκαν 0,9ml σκευάσματος σε 250ml τελικό όγκο νερού στο πρώτο πείραμα, ενώ στο δεύτερο στα 2,5 m² (συνολικό εμβαδό πειραματικών τεμαχίων) απαιτήθηκαν 25 ml σκευάσματος τα οποία αραιώθηκαν σε 16 L H₂O.

Η εφαρμογή του εντομοκτόνου-νηματοδοκτόνου azadirachtin πραγματοποιήθηκε με την μορφή υδατικού διαλύματος του σκευάσματος Neemazal EC (1%). Ο προτεινόμενος τρόπος εφαρμογής του για την καταπολέμηση των νηματωδών είναι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του σε διαστήματα των 10 ημερών. Η προτεινόμενη δόση κάθε φορά είναι 1,8 L/στρέμμα. Στην περίπτωση του 1^{ου} πειράματος αραιώθηκαν 0,875ml σε τελικό όγκο νερού

250ml. Στο 2^ο πείραμα για πρακτικούς λόγους αλλά και με σκοπό να προσομοιάσουμε όσο το δυνατό τον πραγματικό τρόπο εφαρμογής του azadirachtin στο έδαφος, η συγκεκριμένη Φ.Ο. εφαρμόστηκε στο έδαφος σε τρεις σπαστές δόσεις (5.4 ml/στρέμμα κάθε φορά) σε χρόνους 0, 30 και 60 ημέρες. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν 4,5 ml από το σκεύασμα του azadirachtin σε κάθε εφαρμογή τα οποία αραιώθηκαν σε 16 L νερό και εφαρμόστηκαν με ποτιστήρι στα 2,5 m² που αποτελούν την συνολική έκταση των τριών πειραματικών τεμαχίων (συμπεριλαμβανομένων και των διαχωριστικών).

Στο 1^ο πείραμα έγινε εφαρμογή αλεσμένου καρπού *Melia*. Η δόση ήταν 30g ανά kg εδάφους και επιλέχθηκε διότι προηγούμενα προκαταρκτικά πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, έδειξαν ότι αυτή η δόση προκαλεί σημαντική ανάσχεση του πληθυσμού των ριζόκομβων νηματωδών στο έδαφος (Ντάλη Ν. προσωπική ενημέρωση)

.Η εφαρμογή του καπνιστικού sodium tetrathiocarbonate πραγματοποιήθηκε με τη μορφή υδατικού διαλύματος του σκευάσματος ENZONE SL (40%) Η προτεινόμενη δόση για καθολική εφαρμογή του ENZONE σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες είναι 300L/στρέμμα. Έτσι απαιτήθηκαν 750 ml σκευάσματος τα οποία αραιώθηκαν σε 16 L νερό και εφαρμόστηκαν με το ποτιστήρι σε όλη την έκταση των πειραματικών τεμαχίων (2.5 m²).

Η εφαρμογή του καπνιστικού Metham Sodium έγινε με τη μορφή υδατικού διαλύματος που παρασκευάστηκε από το σκεύασμα VAPAM EC (51%). Η προτεινόμενη δόση για καθολική εφαρμογή σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες είναι 150L/στρέμμα. Έτσι για την εφαρμογή του στα 7 Kg αραιώθηκαν 10,3ml σε τελικό όγκο H₂O 250ml, ενώ στην έκταση των 2.5 m² των πειραματικών τεμαχίων χρησιμοποιήθηκαν 375ml σκευάσματος τα οποία αραιώθηκαν σε 16L H₂O.

Όπως φαίνεται σε όλες τις περιπτώσεις τα ΦΠ εφαρμόστηκαν με την ίδια ποσότητα νερού (16 L) ώστε να έχουμε σχετικά ομοιόμορφη υγρασία σε όλα τα πειραματικά τεμάχια στο πείραμα αγρού. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα τεμάχια όπου εφαρμόστηκαν τα καπνιστικά metham sodium και sodium tetrathiocarbonate στα οποία την εφαρμογή των 16 L νερού ακολούθησε επιπρόσθετη άρδευση με

περίπου 6 L ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του και να επιτευχθεί η καλύτερη ενσωμάτωση του στα 10-20 cm.

2.2.6. Αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των PLFAs

2.2.6.1. Αντιδραστήρια

Πιο συγκεκριμένα για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο (Merck, pro analysis), μεθανόλη (Baker), ακετόνη (pro analysis), τολουόλιο Riedel (pestanal), εξάνιο (Merck), όλοι αναλυτικώς καθαροί, καθώς και οξικό οξύ (Riedel-de Haen, glacial).

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (Διαμαντίδης, 2006) χρησιμοποιήθηκαν K_2HPO_4 και KH_2PO_4 (Panreac, pa) και KOH (Merck, PA) για την παρασκευή μεθανολικού διαλύματος KOH 0,2M. Για το διαχωρισμό των λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν φουσίγγια Supelco SPE DSC-Si (Silica Tube 6ml, 500mg).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο μείγματα μεθυλεστέρων: το Bacterial Acid Methyl Esters Mix (Supelco 47080-U) και το 37 Component FAME Mix (Supelco™ 47885-U) σε αραίωση 1:10 σε διαλύτη εξάνιο. Ως εσωτερικό πρότυπο ο μεθυλεστέρας του δεκαεννιαοϊκού οξέος (C_{19} -Me), ο οποίος παρασκευάστηκε με εστεροποίηση του αντίστοιχου οξέος (Sigma) σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Τέλος παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 25, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ του συγκεκριμένου μεθυλεστέρα σε διαλύτη εξάνιο για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης.

2.2.6.2. Υλικά και όργανα

Για την εκχύλιση, παραλαβή των φωσφολιπιδίων, τη μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες και την τελική ποιοτική και ποσοτική τους εκτίμηση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω σκεύη:

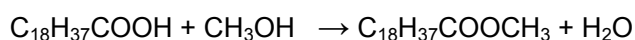
- Κωνικές φιάλες των 50ml
- Σωλήνες φυγοκέντρου των 35 ml (γυάλινοι ή τεφλόν)
- Σκουρόχρωμα φιαλίδια των 50 ml
- Σωλήνες φυγοκέντρου των 15 ml (γυάλινοι)
- Σιφώνια των 0,5, 1, 2, 5 και 10 ml
- Αυτόματη Πιπέτα των 100 μl
- Πιπέτες Pasteur
- Κατανεμητής όγκου
- Σκουρόχρωμα φιαλίδια των 10 ml
- Φιαλίδια των 2ml για αυτόματο δειγματολήπτη με inlets των 200μl και μεταλλικά καπάκια .

Επιπλέον απαιτήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Ζυγαριά OHAUS, Max: 50 gr
 - Αναδευτήρας για κωνικές φιάλες, οριζόντιας περιστροφικής κίνησης GFL (Typ 3006, No 10233406A)
 - Φυγόκεντρος SORVALL RC2-B
 - Vortex Yellowline TTS 2
 - Φούρνος Imperial II Radiant Heat Oven (Lab-Line)
 - Υδατόλουτρο Scientific (Typ SWB 35, No 375)
- Συσκευή συμπίκνωσης σε ρεύμα N₂ Pierce.

2.2.6.3.Εστεροποίηση του δεκαεννεαοϊκού οξέος (19:0).

Ο μεθυλεστέρας του δεκαεννεαοϊκού οξέος παρασκευάστηκε με μεθυλίωση του αντίστοιχου οξέος σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση εστεροποίησης :



Ζυγίστηκε 1 g οξέος (C19:0) και μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη με εσμύρισμα. Κατόπιν προστέθηκαν 10 ml μεθανόλης, 2-3 σταγόνες H₂SO₄ και πέτρα βρασμού. Ακολούθησε βρασμός σε υδατόλουτρο με κάθετο ψυκτήρα για 1h. Μετά το πέρας της 1h, το διάλυμα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή (Büchi), προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της μεθανόλης, σε θερμοκρασία 40-50°C. Το υπόλοιπο μεταφέρθηκε σε διαχωριστικό χωνί και ακολούθησαν τρεις εκχυλίσσεις. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10ml διαιθυλαιθέρα και 10ml H₂O. Απομακρύνουμε την κάτω υδατική φάση, η οποία περιέχει τα όξινα συστατικά. Η δεύτερη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10ml διαιθυλαιθέρα και 10ml NaHCO₃ (10%). Μετά την ανάδευση απομακρύνθηκε η κάτω υδατική φάση, με την οποία απομακρύνονται τα ουδέτερα συστατικά. Τέλος η τρίτη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με 10ml διαιθυλαιθέρα και 10ml H₂O. Απομακρύνθηκε η κάτω υδατική φάση και προστέθηκε στην αιθερική φάση λίγο ξηρό NaSO₄ για απομάκρυνση της περίσσειας υγρασίας. Ακολούθησε συμπύκνωση του διαιθυλαιθέρα και παραλαβή του μεθυλεστέρα σε στερεή μορφή. Η ταυτοποίηση του έγινε με φασματογραφία NMR.

Κατόπιν παρασκευάστηκε ένα πυκνό διάλυμα του μεθυλεστέρα συγκέντρωσης 1mg/ml σε διαλύτη εξάνιο από το οποίο με τις κατάλληλες αραιώσεις προέκυψαν διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων.

2.2.6.4. Περιγραφή μεθόδου για τον προσδιορισμό των PLFAs

Ο προσδιορισμός των PLFAs έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε από τους Bligh and Dyer (1956), Bossio et al., Graham (1998), Degens (1998), Dobbs and Findlay (1993), Eiland et al., (2001), Findlay and Dobbs (1993), Frostegard and Baath (1996), Kourtev et al., (2003), Olsson (1999), White, et al., (1979), Wilkinson et al., (2002), Zelles (1998) and Zelles and Bai (1993) κατάλληλα τροποποιημένα. Η μέθοδος περιλαμβάνει αναλυτικά 4 βασικά στάδια που περιγράφονται παρακάτω:

Εκχύλιση λιπιδίων από το έδαφος

Αρχικά ζυγίστηκε ποσότητα εδάφους 5 g και τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 50 ml στην οποία προστέθηκαν 5 ml χλωροφορμίου, 10 ml μεθανόλης και 4 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (pH=7,0). Για κάθε g εδάφους αντιστοιχεί 1 ml χλωροφορμίου και διατηρείται η αναλογία 1:2:0,8 (χλωροφόρμιο : μεθανόλη : ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών). Οι κωνικές φιάλες τυλίχτηκαν με αλουμινόχαρτο προκειμένου να προστατευτούν τα λιπίδια από το φως και ακολούθησε ανάδευση για 2 h. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 2500 rpm και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο των 50 ml στο οποίο προστέθηκαν 5 ml χλωροφορμίου και 5 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος. Ακολούθησε ανακίνηση (Vortex) για 2 min. Το εκχύλισμα παρέμεινε σε ηρεμία για 18 ώρες τουλάχιστον, ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Ακολούθησε απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης με τη βοήθεια σιφωνίου και συμπύκνωση της κάτω φάσης του χλωροφορμίου, που περιέχει τα λιπίδια, μέχρι ξηρού με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου. Με την ολοκλήρωση του σταδίου της συμπύκνωσης ήταν δυνατή η αποθήκευση των φιαλιδίων, στα οποία δημιουργείται ατμόσφαιρα N₂, στους - 20°C.

Διαχωρισμός λιπιδίων

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων έγινε σε στήλες Silica, που ενεργοποιήθηκαν με 3ml χλωροφορμίου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 250ml χλωροφορμίου, αναδεύτηκε καλά και μεταφέρθηκε στην ενεργοποιημένη στήλη. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Ακολούθησε εκλούση με 5ml χλωροφορμίου, κατά την οποία απομακρύνθηκαν τα ουδέτερα λιπίδια, στη συνέχεια με 5ml ακετόνης, κατά την οποία απομακρύνθηκαν τα γλυκολιπίδια και τέλος με 5ml μεθανόλης, στην οποία παρελήφθησαν τα φωσφολιπίδια. Το κλάσμα των φωσφολιπιδίων συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂, και αποθηκεύτηκε σε ατμόσφαιρα αζώτου στους - 20°C.

Μεθυλίωση και σχηματισμός μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων

Στο ίζημα, αφού απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα μεθυλεστέρα του δεκαεννεασίκου οξέος. και ακολούθησε

προσθήκη 0,5 ml μείγματος μεθανόλης : τουλουολίου (1:1), 0,5ml μεθανολικού διαλύματος KOH 0,2M., Το μείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 min ώστε να πραγματοποιηθεί μεθυλίωση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων που είχαν απομονωθεί. Με την ολοκλήρωση του χρόνου για τη μεθυλίωση προστέθηκαν 0,5 ml οξικού οξέος για την εξουδετέρωση της περίσσειας του KOH και το δείγμα απέκτησε μια γαλακτώδη μορφή.

Εκχύλιση των μεθυλεστέρων

Η εκχύλιση των μεθυλεστέρων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 2ml μείγματος εξανίου : χλωροφορμίου (4:1) και 2ml νερού για το διαχωρισμό των φάσεων. Ακολούθησε ανάδευση σε Vortex και φυγοκέντριση για 5 min στις 3500 rpm και παραλαβή της επάνω οργανικής φάσης (εξανίου-χλωροφορμίου), στην οποία περιέχονται οι μεθυλεστέρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για μια φορά ακόμη με την προσθήκη επιπλέον 2ml μείγματος εξανίου : χλωροφορμίου (4:1) και ακολουθώντας τα ίδια στάδια. Η οργανική φάση που παραλήφθηκε συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200μl εξανίου και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση.

2.2.6.5. Αέριος χρωματογραφία (GC)

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των PLFAs χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογραφίας Hewlett Packard HP5890 Series II GC System Plus με ανιχνευτή Ιονισμού Φλογός (Flame Ionization Detection), GC/FID συνδεδεμένο με αυτόματο δειγματολήπτη HP 7673 Agilent. Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη HP-5 μήκους 26 m και διαμέτρου 320 nm. Η στήλη συνδέθηκε με κατάλληλη προστήλη μήκους 50 cm χωρίς υλικό πληρώσεως. Η ροή των αερίων και το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2. Ο εγχυτής τοποθετήθηκε σε κατάσταση splitless και ο όγκος διαλύματος για κάθε έγχυση ήταν 2μl. Στις συνθήκες αυτές λειτουργίας του χρωματογράφου, ο χρόνος που απαιτήθηκε για κάθε δείγμα ήταν 34 min. Η ανάλυση των δύο προτύπων διαλυμάτων των

μειγμάτων μεθυλεστέρων (Bacterial Acid Methyl Esters Mix & 37 Component FAME Mix) καθώς και τριών αντιπροσωπευτικών επανελήφθηκε σε σύστημα αερίου χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματογραφο μάζας (GC/MS), Agilent 5973 προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των κορυφών των δειγμάτων. Το δυναμικό πεδίο ήταν 70eV, η θερμοκρασία της πηγής ήταν 230 °C, του τετραπόλου 150°C και η θερμοκρασία interface ήταν 280 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν όμοιο με εκείνο που αναφέρεται για το σύστημα του αερίου χρωματογράφου GC/FID. Για την ταυτοποίηση των κορυφών χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική βιβλιοθήκη NIST 98.

Πίνακας 2.2. Συνθήκες αερίου χρωματογράφου.

Θερμοκρασία					Ροή
Εισόδου: 250°C					Φέρον αέριο (He): 1ml/min
Ανιχνευτή: 310°C					Βοηθητικό (makeup)(N) : 30ml/min
Στήλης					
Αρχική θερμοκρασία	Ρυθμός (°C/min)	Τελική (°C)	Παραμονή (min)	Χρόνος ανάλυσης	H ₂ : 35ml/min
150(παραμονή 5min)	4	250	5	34	Αέρας: 360ml/min

← Μορφοποιήθηκε:
Στοιχισμένο στο κέντρο

2.2.7. Καμπύλες αναφοράς

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μεθυλεστέρα του δεκαεννεαοϊκού οξέος συγκεντρώσεων 25, 50, 75, 100, 150, 200 μg/ml. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις ενός αρχικού πυκνού διαλύματος με συγκέντρωση 1mg/ml σε διαλύτη εξάνιο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους (μετά από έγχυση ποσότητας 2μl καθενός από τα πρότυπα διαλύματα) με τη βοήθεια λογισμικού επεξεργασίας δεδομένων του χρωματογράφου (Chemstation).

2.2.8. Πειράματα ανάκτησης

Για τις δοκιμές ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα δεκαεννεασικού οξέος συγκέντρωσης 50 µg/ml. Πραγματοποιήθηκε φόρτιση τριών δειγμάτων με το πρότυπο διάλυμα δεκαεννεασικού οξέος (50 µg/ml). Η τελική συγκέντρωση δεκαεννεασικού οξέος στο έδαφος ήταν 2 µg/g. Επιπλέον σε τρία δείγματα έγινε φόρτιση με πρότυπο διάλυμα δεκαεννεασικού οξέος συγκέντρωσης 150 µg/ml ώστε η τελική συγκέντρωση δεκαεννεασικού οξέος στο έδαφος να είναι 6 µg/g εδάφους. Το εσωτερικό πρότυπο προστέθηκε πριν από το στάδιο της μεθυσίωσης προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν απώλειες κατά το στάδιο αυτό. Κατόπιν ανάλυσης των δειγμάτων με την ίδια διαδικασία προσδιορίστηκε η τελική συγκέντρωση σε C₁₉-Me. Από τις τιμές αυτές υπολογίστηκε η % ανάκτηση του εσωτερικού προτύπου.

2.2.9. Αντικατάσταση χλωροφορμίου από διχλωρομεθάνιο

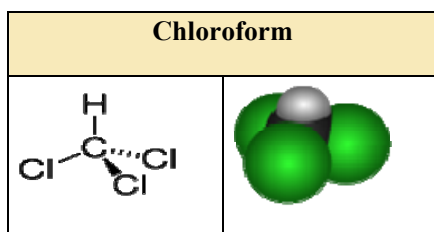
Το πρωτόκολλο, στο οποίο βασίστηκε η μέθοδος, προτείνει σαν κύριο διαλύτη το χλωροφόρμιο. Το χλωροφόρμιο έχει παραπλήσιες ιδιότητες με το διχλωρομεθάνιο, με τη διαφορά ότι το δεύτερο θεωρείται φιλικότερο για το περιβάλλον, γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις εναλλακτικά του πρώτου. Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται οι ιδιότητες των δύο διαλυτών.

Πίνακας 2.3. Ιδιότητες των δύο διαλυτών.

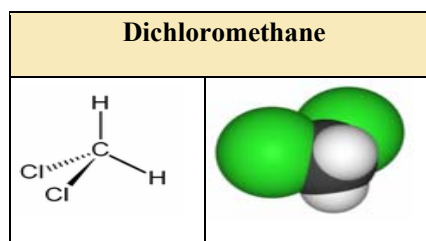
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ					
Διαλύτες	M.B.	Πυκνότητα (g/cm ³)	Σημείο πήξεως (σε °C)	Σημείο ζέσεως (σε °C)	Διαλυτότητα (g/L)
CH ₂ Cl ₂	84,93	1,3255	-96,7	39	13
CHCl ₃	119,38	1,48	-63,5	61,2	8

Το διχλωρομεθάνιο θεωρείται το φιλικότερο από τους χλωρό-υδρογονάνθρακες. Στα παρακάτω σχήματα απεικονίζεται η στερεοχημική διάταξη των δύο μορίων. Σε 3 δείγματα επαναλήφθηκε η όλη ανάλυση για τον προσδιορισμό των PLFAs με

αντικατάσταση του χλωροφορμίου από διχλωρομεθάνιο. Το χλωροφόρμιο αντικαταστάθηκε σε όσα στάδια της μεθόδου ήταν απαραίτητο.



Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.2.

2.3. Στατιστική ανάλυση

Οι συγκεντρώσεις των μεθυλεστέρων των φωσφολιπιδίων που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους προσαρμόστηκαν με βάση το μοριακό βάρος του κάθε PLFA σε μονάδες nmol/g εδάφους και στην συνέχεια μετατράπηκαν σε % ποσοστό (relative concentration data) της συνολικής ποσότητας PLFAs κάθε δείγματος. Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν με μεθόδους ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων και ειδικότερα με την μέθοδο Ανάλυσης σε Κύριες Συνιστώσες (Principal Component Analysis) που είναι ιδανική για τη μείωση του αριθμού των εξαρτημένων μεταβλητών σε ομάδες δεδομένων που περιέχουν μεγάλο αριθμό εξαρτημένων μεταβλητών και οι οποίες πιθανόν παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Κάθε ένα από τα PLFAs (σύνολο 19) που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν αποτελούσαν και μια εξαρτημένη μεταβλητή. Οι τιμές των δύο Κυριώτερων Συνιστωσών (principal components) που εμπεριέχουν και το μεγαλύτερο κομμάτι της παραλλακτικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή διαγραμμάτων ώστε να διαφανεί η ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές που ήταν οι: χρόνος δειγματοληψίας και Φ.Π. για το πείραμα αγρού και χρόνος δειγματοληψίας, ΦΠ και παρουσία ή όχι φυτού στο πείραμα εργαστηρίου. Στις τιμές των δύο

Κυριότερων Συνιστωσών για όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (Two-Way ANOVA) ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη σημαντικών διαφορών που προκύπτουν από την επίδραση των μεμονωμένων ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και από την αλληλεπίδραση τους. Σε περίπτωση στατιστικά σημαντικών διαφορών σε επίπεδο 5% χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Tukey HSD test για την εύρεση των μεταχειρίσεων που διέφεραν σημαντικά.

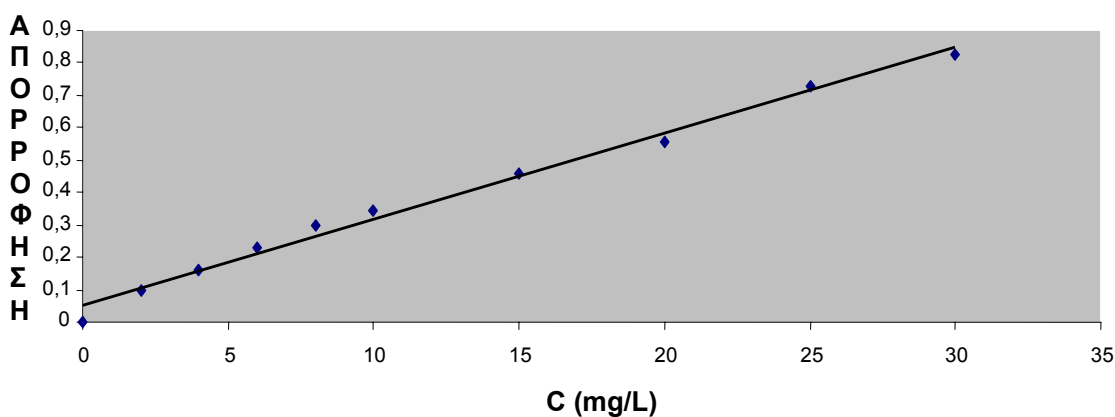
Επίσης οι ποσότητες των PLFAs που μετρήθηκαν συνολικά και αναλογικά για κάθε ομάδα μικροοργανισμών (βακτήρια θετικά κατά Gram, βακτήρια αρνητικά κατά Gram, μύκητες, πρωτόζωα) αναλύθηκαν με Two – way ANOVA. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο Genstat 11.1.0ν 2008.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Μετρήσεις μικροβιακής βιομάζας.

3.1.1. Πρότυπη καμπύλη λευκίνης

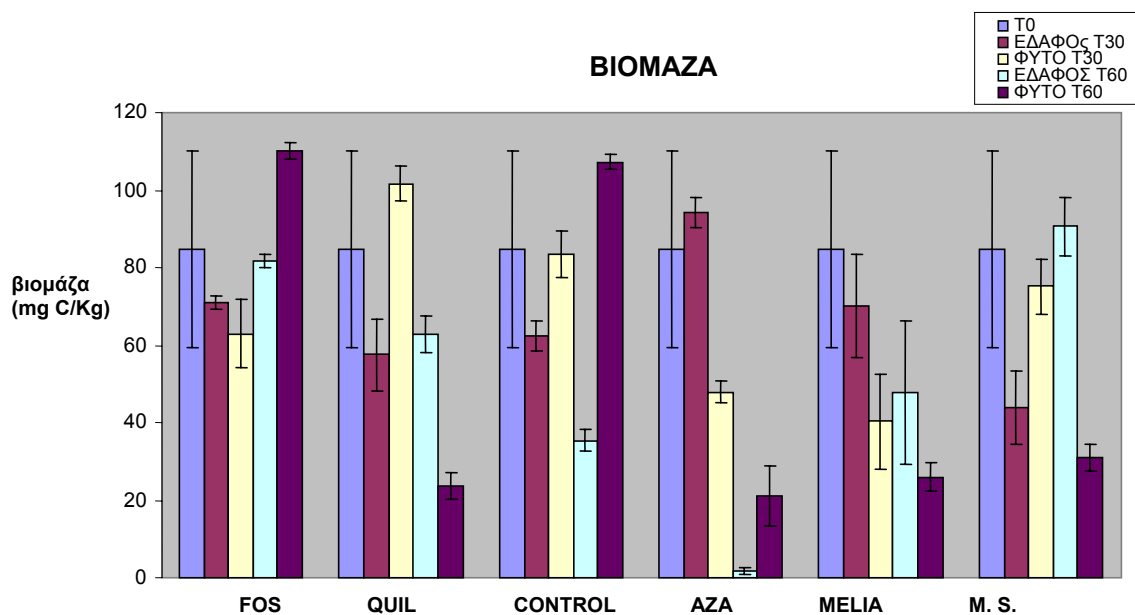
Στο διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της λευκίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την εκτίμηση της ποσότητας της μικροβιακής βιομάζας C. Η καμπύλη σχηματίστηκε με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων λευκίνης συγκέντρωσης 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 mg N/L σε διάλυμα 2M KCl. Η εξίσωση της μέσης καμπύλης που υπολογίστηκε ήταν $y = 0,0265x + 0,052$ με συντελεστή συσχετισμού $R^2 = 0,99$. Μεταξύ της συγκέντρωσης λευκίνης και της απορρόφησης σε μήκος κύματος 570nm υπάρχει ευθύγραμμη



Διάγραμμα 3.1. Η πρότυπη καμπύλη λευκίνης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας C του εδάφους.

3.1.2. Πείραμα σε ελεγχόμενες συνθήκες

Οι τιμές της συνολικής μικροβιακής βιομάζας C στο έδαφος που μελετήθηκε για τους χρόνους 0, 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



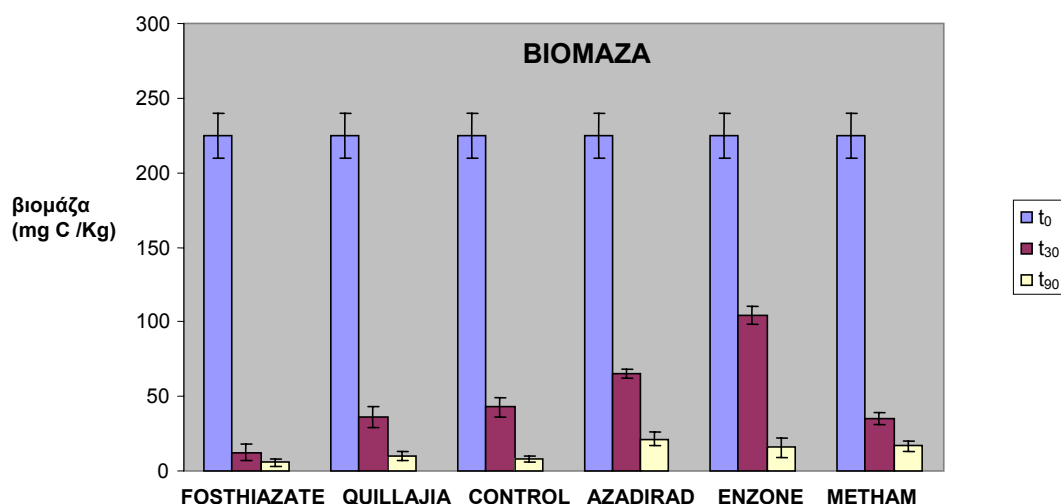
Διάγραμμα 3.2. Οι τιμές της συνολικής βιομάζας C του εδάφους στις διάφορες μεταχειρίσεις σε χρόνους 0, 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση

Οι τιμές της συνολικής βιομάζας C κυμάνθηκαν από 1,7 ως 110 mg C/ kg ξηρού βάρους εδάφους. Η υψηλότερη τιμή της τάξεως των 110 mg C/ kg και μετρήθηκε στα δείγματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε μεταχείριση με fosthiazate, με φυτό μετά από 60 ημέρες. Η ποσότητα της βιομάζας C ήταν ίση με εκείνη του μάρτυρα στον αντίστοιχο χρόνο. Μετά από 30 ημέρες η παρουσία φυτού οδήγησε στην αύξηση της βιομάζας σε σύγκριση με το μάρτυρα μόνο για το Azadirachtin. Μετά από 60 ημέρες στα δείγματα εδάφους με metham sodium χωρίς φυτό μετρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας, η οποία ξεπέρασε και εκείνη του μάρτυρα. Σχετικά υψηλή ήταν και η ποσότητα για το fosthiazate, ενώ στα

υπόλοιπα δείγματα παρατηρήθηκε πτώση. Τέλος σε ότι αφορά τα δείγματα με φυτό μετά από 60 ημέρες στις περιπτώσεις του fosthiazate και του μάρτυρα παρατηρήθηκε αύξηση, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα εδάφους με φυτό παρατηρήθηκε μείωση, γεγονός που σημαίνει ότι το φυτό δεν είχε σημαντική θετική επίδραση στις περιπτώσεις αυτές. Γενικότερα οι μετρήσεις της συνολικής βιομάζας C του εδάφους δεν έδειξαν κάποια τάση και επίδραση των Φ.Π. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη μέτρηση αποτελεί μια γενική ποσοτική αξιολόγηση της βιομάζας του εδάφους χαμηλής ευαισθησίας και δεν μπορεί να ανιχνεύσει μεταβολές που συμβαίνουν σε επίπεδο σύστασης της μικροβιακής κοινότητας αλλά και λειτουργίας της (Anderson, 1987).

3.1.3. Πείραμα αγρού

Οι τιμές της συνολικής μικροβιακής βιομάζας C στο έδαφος που μελετήθηκε για τους χρόνους t_0 , t_{30} και t_{90} παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.3.



Διάγραμμα 3.3. Οι τιμές της συνολικής βιομάζας C του εδάφους στις διάφορες μεταχειρίσεις σε χρόνους 0, 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση

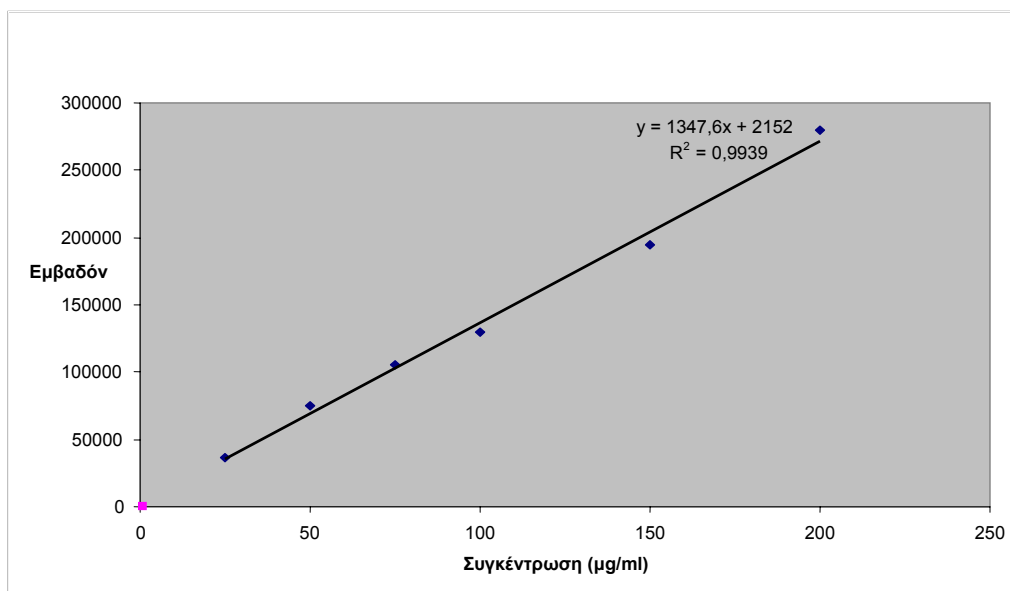
Η συνολική βιομάζα C είναι χρήσιμος δείκτης των αλλαγών των βιολογικών χαρακτηριστικών και της γονιμότητας του εδάφους καθώς και σημαντικό γνώρισμα της ποιότητας της οργανικής ύλης (Mele and Carter 1996). Οι τιμές της συνολικής βιομάζας C κυμάνθηκαν από 3 ως 224,8 mg C/ kg ξηρού βάρους εδάφους. Η υψηλότερη τιμή βιομάζας C 224,8 mg C/ kg μετρήθηκε στα δείγματα εδάφους πριν πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε μεταχείριση, ενώ οι αμέσως υψηλότερες τιμές μετρήθηκαν μετά από διάστημα 30 ημερών στα δείγματα, στα οποία έγιναν μεταχειρίσεις με Sodium tetrathiocarbonate και Azadirachtin. Οι τιμές ήταν 104 και 65 mg C/ kg αντίστοιχα και ξεπέρασαν αυτές του μάρτυρα (Control) στο χρόνο t₃₀ που ήταν 42,6 mg C/ kg. Μετά από διάστημα 90 ημερών οι μετρήσεις έδειξαν μείωση της συνολικής βιομάζας C σε όλα τα δείγματα, ενώ στο δείγμα, στο οποίο έγινε εφαρμογή Azadirachtin μετρήθηκε η υψηλότερη τιμή 21,52 mg C/kg. Γενικότερα οι μετρήσεις της συνολικής βιομάζας C δεν παρουσίασαν κάποια

ξεκάθαρη τάση και αποτελούν μια γενικότερη μέτρηση που δεν συνδέεται συνήθως με την λειτουργία και δομή της μικροβιακής κοινότητας.

3.2. Μέθοδος προσδιορισμού των PLFAs

3.2.1. Καμπύλη αναφοράς του C₁₉-Me

Στο διάγραμμα 3.4 παρουσιάζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης του εσωτερικού προτύπου (C₁₉-Me). Η εξίσωση της ευθείας προέκυψε από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων του μεθυλεστέρα του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος συγκεντρώσεων 25, 50, 75, 100, 150 και 200 µg/ml. Η εξίσωση της μέσης καμπύλης που υπολογίστηκε ήταν $y=1347,6x+2152$ με συντελεστή συµμεταβολής $R=0,9939$. Υπάρχει ευθύγραµμη συσχέτιση µεταξύ της συγκέντρωσης του εσωτερικού προτύπου και του εµβαδού της χρωµατογραφικής ανταπόκρισης για το εύρος αυτό των συγκεντρώσεων.



Διάγραμμα 3.4. Η πρότυπη καμπύλη για το μεθυλεστέρα του δεκαεννεοσίου οξέος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των PLFAs στο έδαφος

3.2.2. Πειράματα ανάκτησης του C₁₉-Me

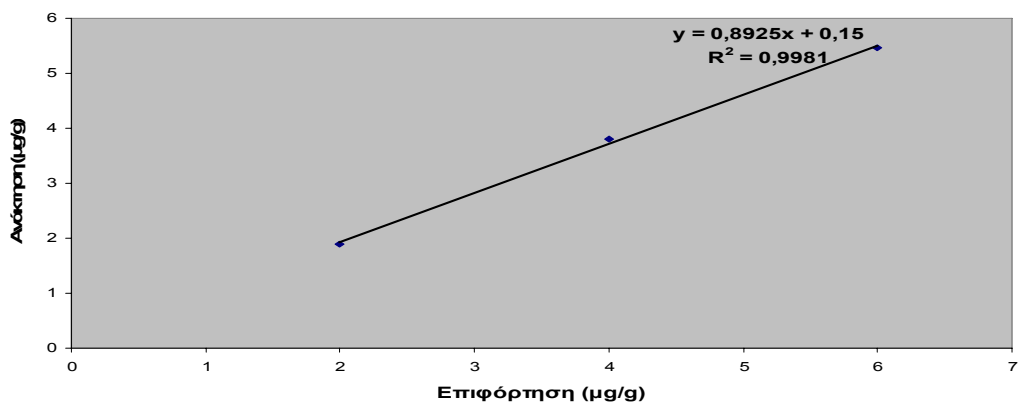
Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης του μεθυλεστέρα του οξέος C_{19:0} με φόρτιση δειγμάτων εδάφους με κατάλληλη ποσότητα εσωτερικού προτύπου ώστε να προκύψει συγκέντρωση στο έδαφος 20, 40 και 60 mg/g εδάφους. Για κάθε επίπεδο φόρτισης προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή ανάκτησης ήταν από το ίδιο πειραματικό τεμάχιο που πραγματοποιήθηκε το πείραμα αγρού. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. και διαπιστώνεται ότι η ανάκτηση είναι ικανοποιητική και κυμαίνεται μεταξύ 91 και 95,3% με μέση ανάκτηση 93,6% με συντελεστή παραλλακτικότητας >2,9%.

Πίνακας 3.1. Ανακτήσεις (συγκέντρωσεις σε mg/g) C₁₉-Me σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση (mg/g)	Δείγμα Α	Δείγμα Β	Δείγμα Γ	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	CV%	Ποσοστό ανάκτησης
20	18,9	18,5	19,3	1,9	0,04	2,1	94,5%
40	36,9	38,4	39,1	3,8	0,11	2,9	95,3%
60	55,2	54,8	53,9	5,5	0,06	1,1	91,0%

3.2.3. Ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου

Παρατηρήθηκε ευθύγραμμη συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων με τις οποίες φορτίστηκε το έδαφος και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων που ανακτήθηκαν με τη μέθοδο προσδιορισμού των PLFAs (Διάγραμμα 3.5). Η σχέση περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,8925x + 0,15$ και έχει συντελεστή συμμεταβολής $R^2=0,9981$. Σύμφωνα με την εξίσωση η μέση ανάκτηση είναι 89,3%, δηλαδή η ευαισθησία της μεθόδου είναι $S = 0,8925$.



Διάγραμμα 3.5. Σχέση μεταξύ φόρτισης και ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων του C₁₉-Me.

Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την επεξεργασία 3 επαναλήψεων του ίδιου δείγματος την ίδια μέρα και 6 επαναλήψεων σε διαφορετικές μέρες. Η συγκέντρωση φόρτισης του λιπαρού οξέος στο έδαφος ήταν 2 μg C₁₉-Me/g εδάφους. Από τις τυπικές αποκλίσεις και τους συντελεστές παραλλακτικότητας που βρέθηκαν προκύπτει ότι η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητική αφού οι αντίστοιχοι συντελεστές παραλλακτικότητας κυμάνθηκαν από 5-20%.

Πίνακας 3.2. Έλεγχος επαναληψιμότητας μεθόδου.

	Αριθμός επαναλήψεων	Συγκέντρωση (mg/g εδάφους)	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής παραλλακτικότητας CV%
Στην ίδια μέρα	3	139	13,1	9,42
Σε διαφορετικές μέρες	6	122,5	13,2	10,77

3.2.4. Χρήση διχλωρομεθανίου σε αντικατάσταση του χλωροφορμίου στην μέθοδο PLFAs.

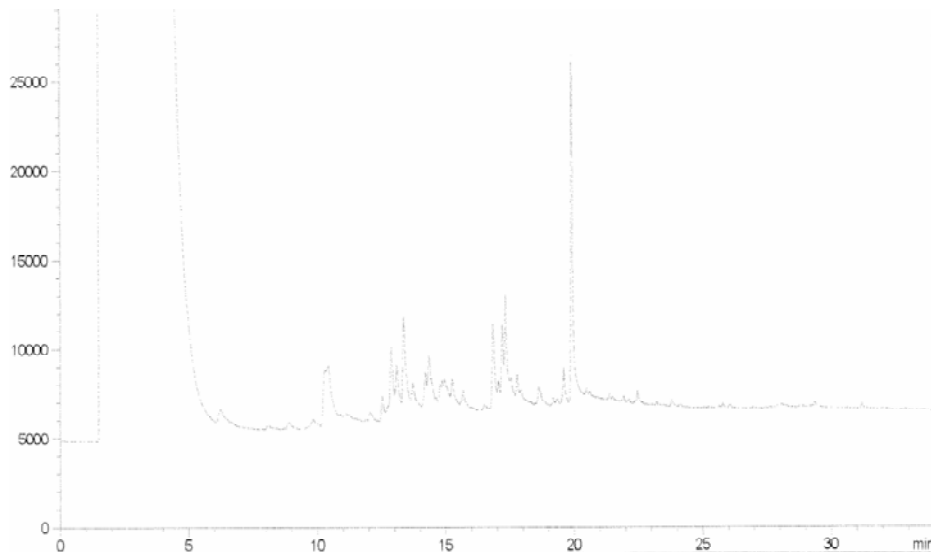
Μετά την αντικατάσταση του χλωροφορμίου από διχλωρομεθάνιο εκτιμήθηκε ότι το συνολικό εμβαδό των κορυφών στα χρωματογραφήματα ήταν παραπλήσιο με εκείνο των δειγμάτων όπου για την επεξεργασία τους είχε χρησιμοποιηθεί χλωροφόρμιο. Με σκοπό να διερευνηθεί η δυνατότητα της χρησιμοποίησης του CH₂Cl₂ σε αντικατάσταση του CHCl₃ κατά τη διαδικασία της εκχύλισης των PLFAs το ίδιο δείγμα εδάφους αναλύθηκε σε καθένα από τους δύο διαλύτες ως διαλύτες εκχύλισης σε 6 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι οι ανακτήσεις και ο συντελεστής παραλλακτικότητας CV% κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα γεγονός που καταδεικνύει ότι δεν υπάρχουν διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα που προέκυψαν με την αντικατάσταση χλωροφορμίου με διχλωρομεθάνιο. Κατά συνέπεια η αντικατάσταση αυτή δε μειώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και την καθιστά φιλικότερη προς τον αναλυτή.

Πίνακας 3.3. Εκτίμηση καταλληλότητας του CH₂Cl₂ ως διαλύτη εκχύλισης.

	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ	Μέσος όρος συγκεντρώσεων (mg/g εδάφους)	Τυπική απόκλιση	CV%
CH ₂ Cl ₂	6	120,7	1,2	0,98
CHCl ₃	6	123,3		

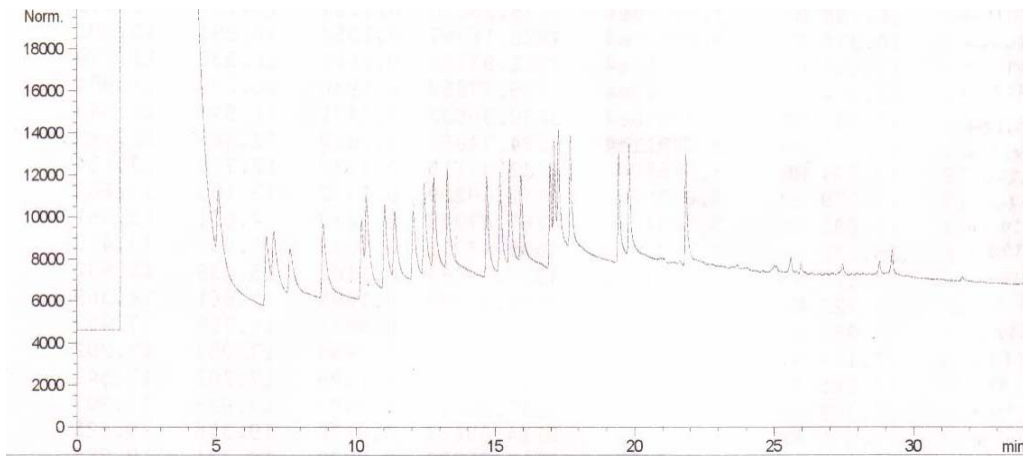
3.2.5. Ανάλυση των PLFAs.

Τα δείγματα του εδάφους αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (GC/FID). Η εικόνα ενός χρωματογραφήματος από την ανάλυση ενός δείγματος εδάφους με τη μέθοδο PLFAs παρατίθεται στο Διάγραμμα 3.6.

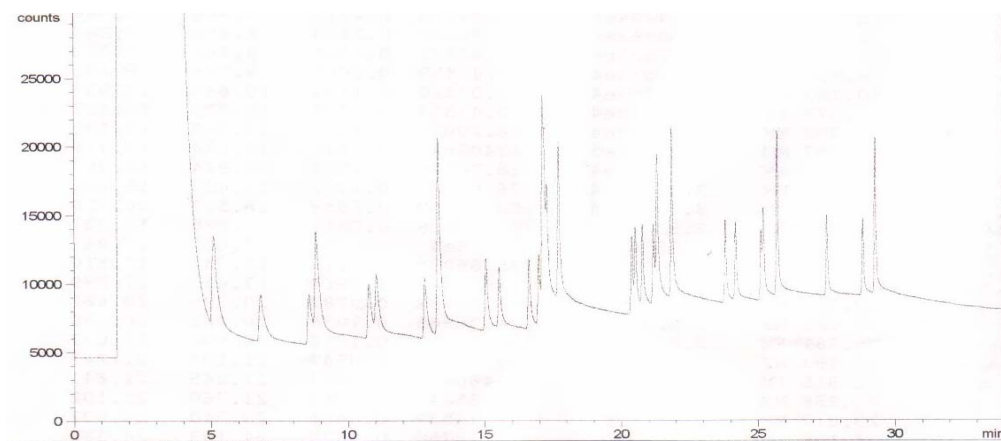


Διάγραμμα 3.6. Χρωματογράφημα ενός δείγματος εδάφους.

Η ταυτοποίηση των PLFAs πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια δύο προτύπων διαλυμάτων των μειγμάτων των μεθυλεστέρων (Supelco) : Bacterial Acid Methyl Esters Mix (47080-U) και Supelco™ 37 Component FAME Mix (47885-U), τα οποία μετά από αραιώση 1:10 σε διαλύτη εξάνιο εξετάστηκαν σε συνθήκες λειτουργίας του χρωματογράφου (GC/FID). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.7 και 3.8.



Διάγραμμα 3.7. Χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος μίγματος μεθυλεστέρων BAME (Bacterial Acid Methyl Esters Mix)



Διάγραμμα 3.8. Χρωματογράφημα του εμπορικού μίγματος μεθυλεστέρων FAME

Γενικότερα, από την ανάλυση των δειγμάτων εδάφους από όλες τις μεταχειρίσεις ανιχνεύθηκαν 40 PLFAs εκ των οποίων τα 19 ήταν μικροβιακής προέλευσης και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση GC-MS και των προτύπων μιγμάτων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη συντομογραφησή τους, καθώς και η ομάδα μικροοργανισμών στην οποία απαντώνται σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Στη συντομογράφηση ο αριθμός πριν από την άνω και κάτω τελεία

(:) αναφέρεται στο συνολικό αριθμό των ατόμων άνθρακα του μορίου και ο αριθμός που έπεται αναφέρεται στον αριθμό των διπλών δεσμών. Η θέση των διπλών δεσμών δηλώνεται με το γράμμα ω που ακολουθείται από έναν ή περισσότερους αριθμούς. Καθένας από αυτούς τους αριθμούς δηλώνει τη θέση του ατόμου άνθρακα (ξεκινώντας την αρίθμηση από το ω άκρο) από όπου ξεκινά ο διπλός δεσμός. Τα γράμματα *i* και *a* αναφέρονται στα iso- και anteiso- διακλαδισμένα λιπαρά οξέα.

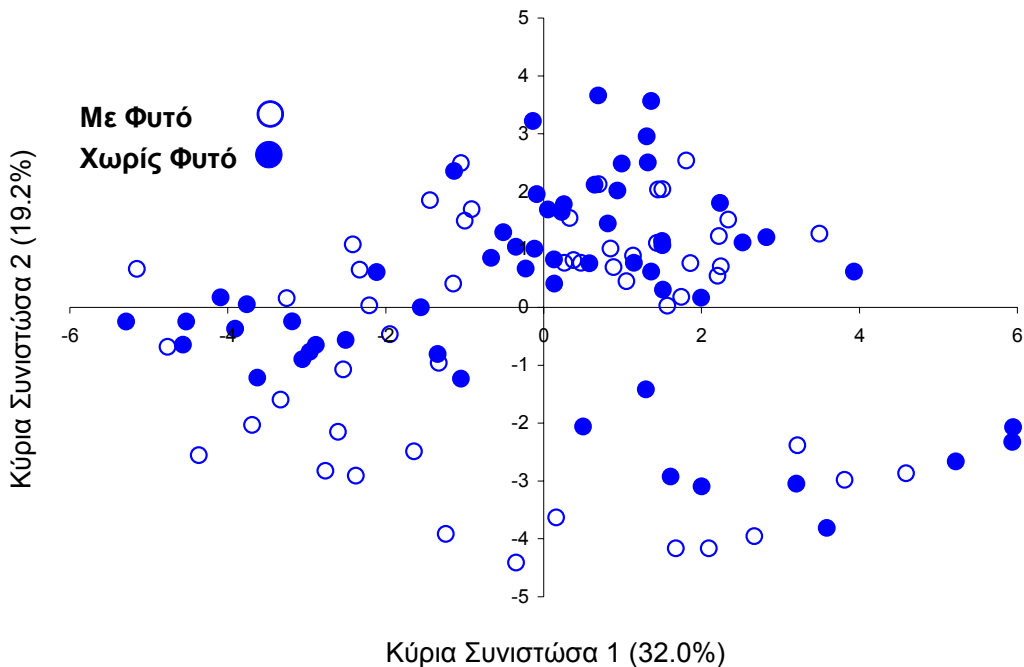
Πίνακας 3.4. Τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους και το είδος των μικροοργανισμών στους οποίους συχνά απαντώνται. Εκτός των παρακάτω λιπαρών οξέων ανιχνεύθηκαν τα 18:0 και 19:0 που δεν κατανεμήθηκαν σε κάποια μικροβιακή ομάδα.

Ομάδα Μικροοργανισμών	Λιπαρά Οξέα	Βιβλιογραφικές Αναφορές
Θετικά κατά Gram βακτήρια	i-15:0, a-15:0, 15:0, i-16:0, i-17:0, 17:0	Ratledge & Wilkinson, (1988) και O'Leary and Wilkinson (1988)
Αρνητικά κατά Gram βακτήρια	16:0, 18:1 ω 9cis, 18:1 ω 9trans, 16:1 ω 7, cy17:0, cy19:0, 3-OH14:0	Federle (1986) και Findlay (2004)
Μύκητες	18:2 ω 6,9	Baath and Anderson (2003)
Πρωτόζωα	20:4 ω 6, 18:3 ω 9, 20:0	Findlay (2004)

3.2.6. Στατιστική ανάλυση

3.2.6.1. Πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες

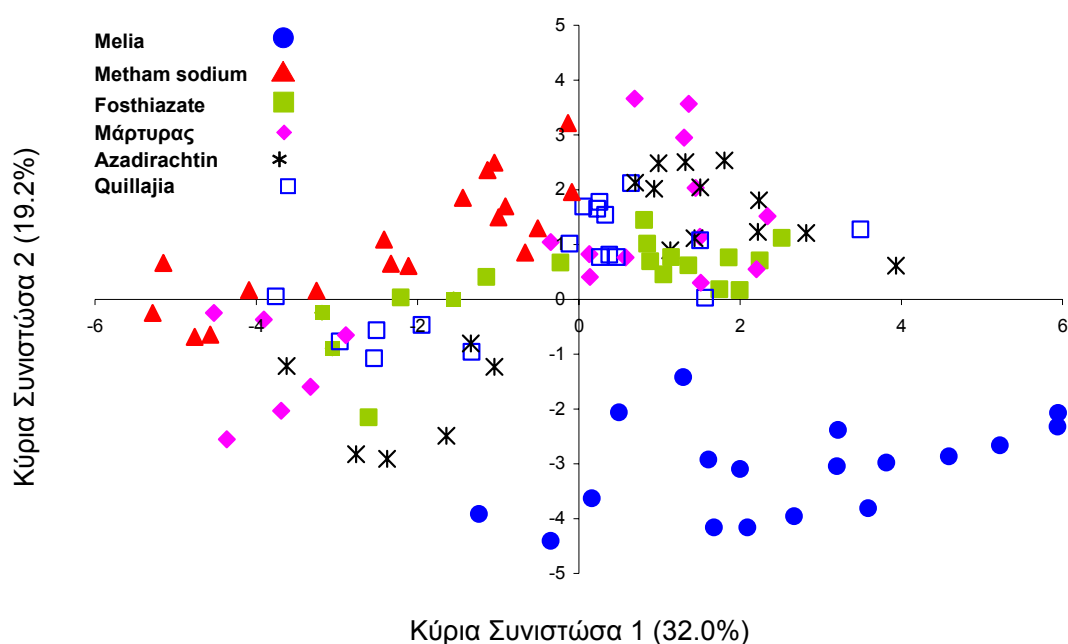
Στα δεδομένα που προέκυψαν από την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (Principal Components Analysis) σε δύο Κύριες Συνιστώσες. Στο Διάγραμμα 3.9 απεικονίζεται η κατανομή των διαφόρων δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε PLFAs. Για το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες μελετήθηκαν τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές: τα Φ.Π. που εφαρμόστηκαν, ο χρόνος δειγματοληψίας και η παρουσία ή όχι φυτού. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των δεδομένων που προέκυψαν έδειξε ότι η παρουσία ή όχι φυτού δεν είχε σημαντική επίδραση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα διπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης (Two-Way ANOVA) των τιμών των αδήλων φορέων των δύο πρώτων κυρίων συνιστωσών ($P>0.05$). Για τον λόγο αυτό το πείραμα αναλύθηκε ως διπαραγοντικό, λαμβάνοντας υπ' όψη ως κύριες μη εξαρτημένες μεταβλητές τα Φ.Π. και το χρόνο δειγματοληψίας. Το γεγονός ότι η παρουσία φυτού δεν είχε καμία επίδραση στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας σχετίζεται με το διάστημα που διήρκεσε το πείραμα (60 ημέρες) που πιθανότατα δεν ήταν αρκετό για την ολοκληρωμένη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών. Επίσης, τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν αποτελούσαν κομμάτι του συνολικού όγκου του εδάφους (bulk soil) και όχι της ριζόσφαιρας όπου και πιθανόν να υπήρχαν εστιακές μεταβολές. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταβολές που παρατηρούνται στην μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας λόγω έκθεσης του φυτού σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα δεν εμφανίζονται αντίστοιχα και στο συνολικό όγκο του εδάφους (bulk soil) (Gomes et al., 2001).



Διάγραμμα 3.9. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε η παρουσία ή όχι φυτού. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας.

Στο Διάγραμμα 3.10. παρουσιάζεται η κατανομή των δειγμάτων εδάφους ανάλογα με την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε το είδος του Φ.Π. που εφαρμόστηκε. Ο διαχωρισμός των δειγμάτων που δέχτηκαν την εφαρμογή αλεσμένου καρπού του φυτού *Melia* είναι εμφανής σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις σε όλους του χρόνους δειγματοληψίας. Όλα τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε αλεσμένος καρπός *Melia* ομαδοποιήθηκαν στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο του διαγράμματος και μακριά από τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή *metham sodium* φαίνεται ότι ομαδοποιούνται στο άνω αριστερά τεταρτημόριο του διαγράμματος κοντά όμως και στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αντίθετα, τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή των βιολογικών Φ.Π. *azadirachtin*, *quillajia* αλλά και του

οργανοφωσφορικού fosthiazate δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται σε ξεχωριστές ομάδες.

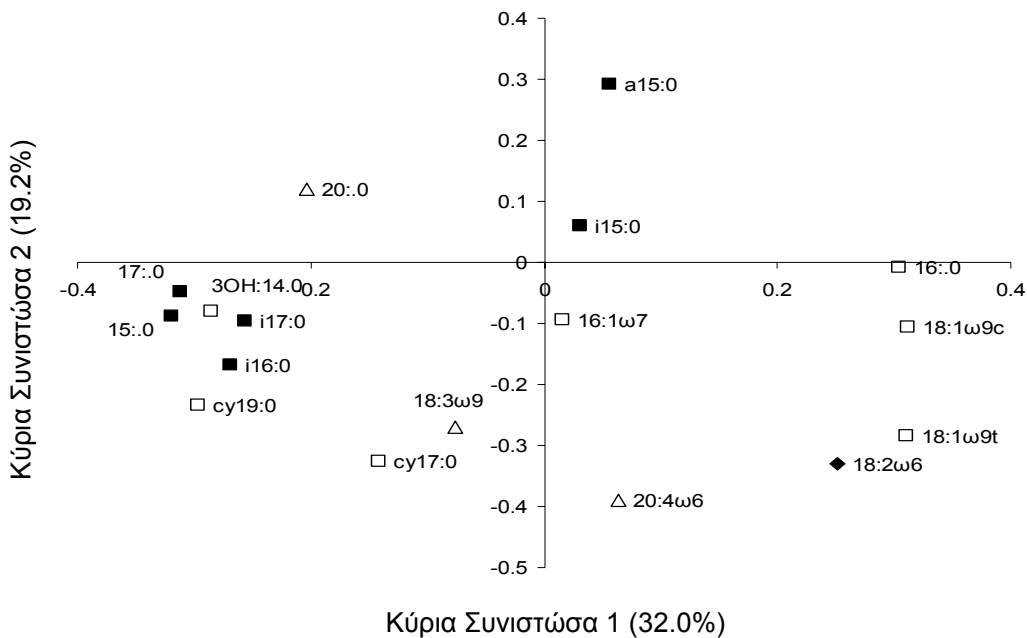


Διάγραμμα 3.10. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν ως παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε το είδος του Φ.Π. που εφαρμόστηκε. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Στο Διάγραμμα 3.11 παρουσιάζεται σχηματικά η συμμετοχή (loadings) των διαφόρων PLFAs που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα εδάφους από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες στην κατανομή των δειγμάτων ως προς την σύσταση τους σε PLFAs. Το λιπαρό οξύ 18:2ω6,9 που αποτελεί χαρακτηριστικό PLFA των μυκήτων, και τα 18:1ω9cis/trans που έχουν χαρακτηριστική ως δείκτες αρνητικών κατά Gram βακτήρια που ευνοούνται σε πλειοτροφικές συνθήκες όπως τα βακτηρίων *Pseudomonas*, τα οποία ομαδοποιούνται στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο όπως και τα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή *Melia* (Διάγραμμα 3.10) και ακριβώς αντίθετα από τα

δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή metham sodium (Διάγραμμα 3.10). Αυτό δείχνει ότι η εφαρμογή Melia προκάλεσε την άμεση ανάπτυξη των μυκήτων και των ταχέως αναπτυσσόμενων βακτηρίων όπως του γένους *Pseudomonas* και προκάλεσε σημαντική μεταβολή στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η αντίδραση αυτή είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της άμεσης διαθεσιμότητας περίσσειας οργανικής ύλης (αλεσμένος καρπός του φυτού Melia) στην μικροβιακή κοινότητα και όχι σε άμεση θετική επίδραση των Φ.Π. που περιέχονται στο καρπό και έχει βρεθεί ότι έχουν βιοκτόνο δράση (San Martin & Magunacelaya, 2005). Η υπόθεση αυτή θα αξιολογηθεί από τα αποτελέσματα πειραμάτων που βρίσκονται σε εξέλιξη και μελετάται η επίδραση εκχυλίσματος από καρπό Melia στην μικροβιακή κοινότητα.

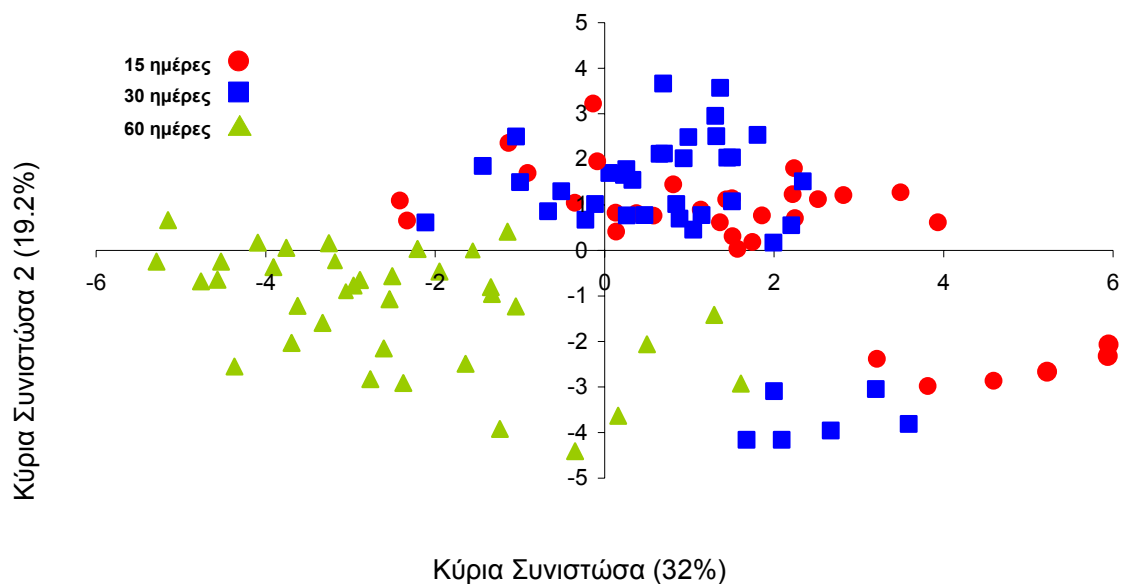
Η εφαρμογή του καπνιστικού metham sodium οδήγησε επίσης σε σημαντική μεταβολή της μικροβιακής κοινότητας που οφείλεται όμως στην αρνητική δράση του στους μύκητες του εδάφους και σε ταχέως αναπτυσσόμενα αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως *Pseudomonas* και συγγενών γενών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε άμεση συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι το metham sodium και άλλα καπνιστικά εδάφους παρουσιάζουν σημαντική ανασχετική δράση στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ιδιαίτερα στους μύκητες και στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Macalady et al., 1998, Ibekwe et al., 2001, Hosino & Matsumoto, 2007). Για παράδειγμα, οι Macalady et al., (1998) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή metham sodium σε συγκεντρώσεις ανάλογες με τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα οδήγησαν σε σημαντική μείωση των λιπαρών οξέων 18:1ω9cis, 16:0, 16:1ω7cis και 18:2ω6,9 που αποτελούν δείκτες για αρνητικά κατά Gram βακτήρια και μύκητες αντίστοιχα (Findley, 2004). Σε παρόμοιες μελέτες οι Ibekwe et al., (2001) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου, metham sodium και άλλων καπνιστικών προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που οφείλονται κυρίως στην σημαντική βιοκτόνο δράση τους στους μύκητες του εδάφους και στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.



Διάγραμμα 3.11. Απεικόνιση της συμμετοχής (loading) των εξαρτημένων μεταβλητών (μικροβιακών PLFAs που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους) στην κατανομή των δειγμάτων εδάφους ανάλογα με το είδος του Φ.Π. που εφαρμόστηκε στο έδαφος.

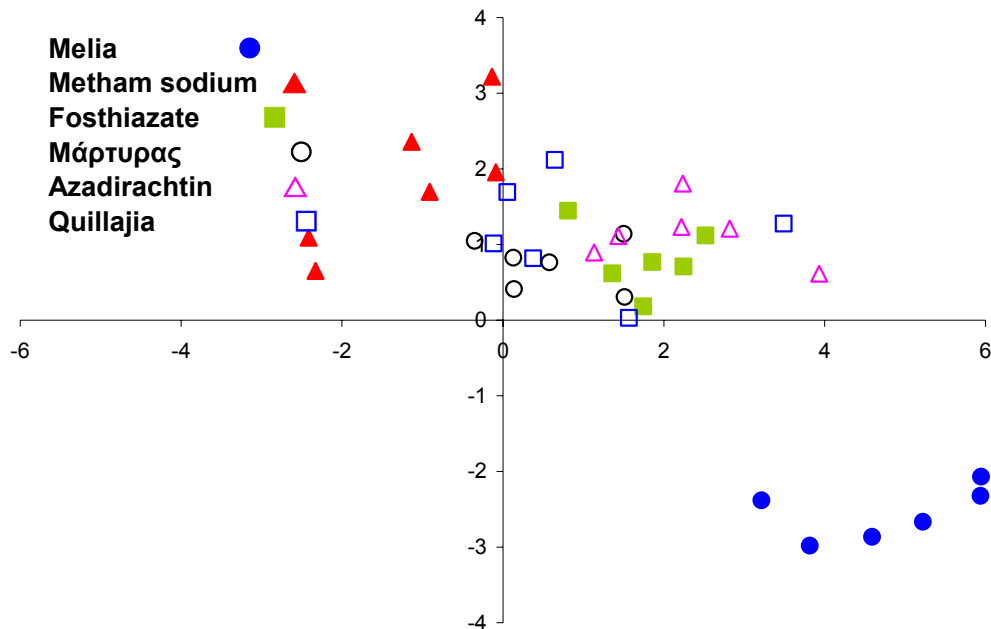
Στο Διάγραμμα 3.12. παρουσιάζεται η κατανομή των δειγμάτων εδάφους ανάλογα με την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων μετά την εφαρμογή των Φ.Π. Η πιο βασική παρατήρηση που προκύπτει είναι η ξεκάθαρη ομαδοποίηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στις 60 ημέρες στο αριστερό κάτω τεταρτημόριο του διαγράμματος ανεξάρτητα από το είδος του Φ.Π. προϊόντος που εφαρμόστηκε. Αντίθετα τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις 7 και στις 30 ημέρες δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική ομαδοποίηση. Η διαφοροποίηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στις 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των ΦΠ σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα συνδέεται άμεσα με την αύξηση των λιπαρών οξέων cy17:0, cy19:0, 18:3ω9, 15:0, 17:0, i-17:0, i-16:0 και 3-OH-14:0 όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3.11, όπου τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα ομαδοποιούνται στο ίδιο τεταρτημόριο με τα δείγματα των 60 ημερών. Τα λιπαρά οξέα cy17:0, cy19:0 έχει αποδειχθεί ότι αποτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων ως αντίδραση της

μικροβιακής κοινότητας σε συνθήκες στρες (Fostegaard et al., 1993). Σύμφωνα με τον Anderson (1987) η παρατεταμένη επώαση δειγμάτων εδάφους σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και αερισμού προκαλεί συνθήκες στρες και μείωση της μικροβιακής βιομάζας του εδάφους. Έτσι η αύξηση των κυκλοπρωπανικών λιπαρών οξέων cy17:0, cy19:0 είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της εμφάνισης στρες επώασης στην βακτηριακή κοινότητα προς το τέλος του πειράματος. Η αύξηση των λιπαρών οξέων 15:0, 17:0, i-17:0, i-16:0 αντικατοπτρίζει αύξηση των θετικών κατά Gram βακτηρίων στις 60 ημέρες (O'Leary and Wilkinson 1988). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια αναπτύσσονται με βραδύς ρυθμούς και παράγουν ενδοσπόρια με την μορφή των οποίων μπορούν να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες (Zelles et al., 1997). Τέλος, η αύξηση του λιπαρού οξέος 18:3ω9 που αποτελεί δείκτη πρωτοζώων πιθανότατα προέκυψε ως έμμεση επίδραση λόγω της αύξησης κάποιων βακτηριακών ομάδων που αποτελούν τροφή για τα πρωτόζωα. Μια άλλη πιθανή εξήγηση για την ομαδοποίηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στις 60 ημέρες είναι πιθανότατα η ολοκλήρωση της διάσπασης των περισσότερων Φ.Ο. που εφαρμόστηκαν με αποτέλεσμα η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος να επανέλθει σε επίπεδα ανάλογα του μάρτυρα.



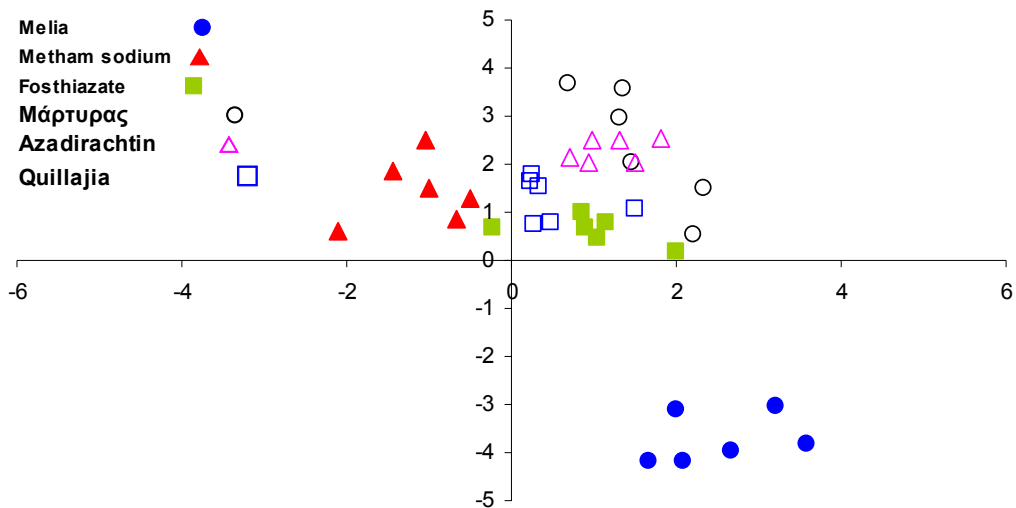
Διάγραμμα 3.12. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος δειγματοληψίας. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Για την καλύτερη απεικόνιση των επιδράσεων των Φ.Π. στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, η κατανομή των δειγμάτων ως προς την σύσταση τους σε PLFAs θα παρουσιαστεί για όλα τα Φ.Π. σε κάθε έναν από τους χρόνους δειγματοληψίας (Διαγράμματα 3.13 - 3.15)

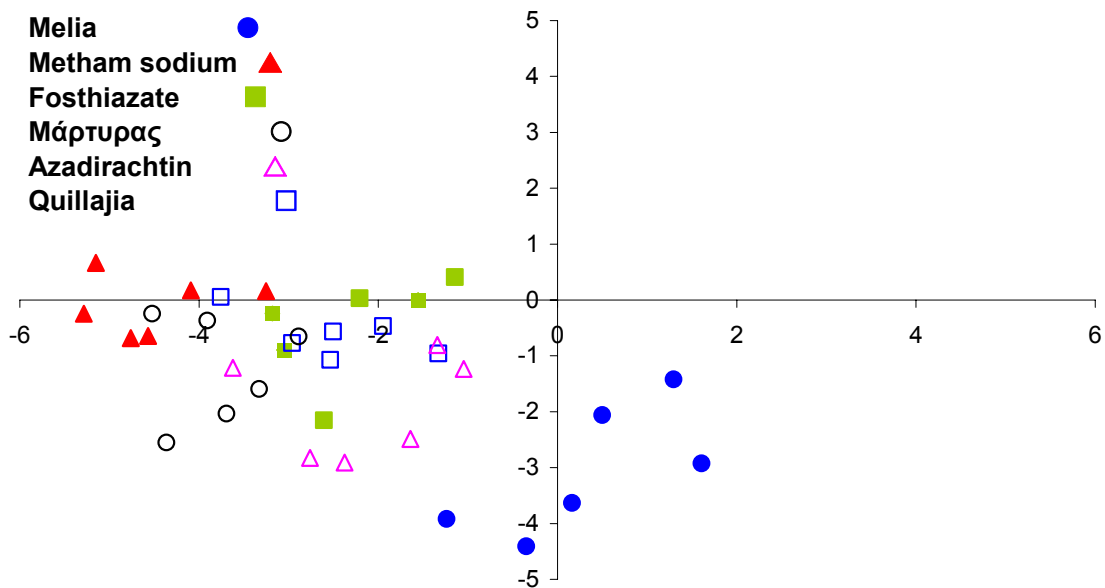


Διάγραμμα 3.13. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους που συλλέχθηκαν 10 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. ως προς την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή Melia και metham sodium διαχωρίζονται ξεκάθαρα από τα δείγματα των υπολοίπων Φ.Π. και του μάρτυρα 10 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 3.13). Παρόμοια ομαδοποίηση παρατηρείται και στα δεδομένα των 30 ημερών όπου τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή Melia διαχωρίζονται ξεκάθαρα ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα από τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή metham sodium διαχωρίζονται ελαφρώς από τα υπόλοιπα δείγματα ως προς την δεύτερη Κύρια Συνιστώσα (Διάγραμμα 3.14). Αντίθετα, με την ολοκλήρωση του πειράματος (60 ημέρες) τα δείγματα που δέχτηκαν την εφαρμογή Melia και metham sodium δεν διαχωρίζονται πλέον τόσο ξεκάθαρα σε σχέση με τα δείγματα των υπολοίπων μεταχειρίσεων και αυτό είναι περισσότερο αισθητό για τα δείγματα του metham sodium (Διάγραμμα 3.15).



Διάγραμμα 3.14. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους που συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. ως προς την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας



Διάγραμμα 3.15. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους που συλλέχθηκαν 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. ως προς την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 32 και 19.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Συμπερασματικά, η εφαρμογή αλεσμένου καρπού *Melia* προκάλεσε σημαντικές διαφοροποιήσεις στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όπως προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων ως προς την σύσταση τους σε PLFAs. Οι μεταβολές αυτές παραμένουν σημαντικές, αν και εξασθενούν σταδιακά, καθόλη την διάρκεια του πειράματος θερμοκηπίου (60 ημέρες). Παρομοίως, το metham sodium φαίνεται ότι προκαλεί αισθητές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας, οι οποίες είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες επιδράσεις της *Melia*, και που φαίνονται να μην είναι πλέον εμφανής με το πέρας του πειράματος (60 ημέρες). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το metham sodium στην προτεινόμενη δόση προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα που μπορεί να διατηρηθούν για τουλάχιστον 18 εβδομάδες (Macalady et al., 1998). Ανάλογες μελέτες σε μικρόκοσμους από τους Ibekwe et al., (2001) έδειξαν ότι η επίδραση του metham sodium ήταν άμεση αλλά η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους επανέκαμψε σε σύσταση ανάλογη του μάρτυρα ύστερα από 8-12 εβδομάδες. Στο πείραμα αυτής της μελέτης υπό ελεγχόμενες συνθήκες η επίδραση του metham sodium φαίνεται να εξαλείφεται 60 ημέρες (8-9 εβδομάδες) μετά την εφαρμογή. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δικών μας ευρημάτων και προηγούμενων μελετών μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική πειραματική προσέγγιση καθώς τα προηγούμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μικρόκοσμους όπου η έκθεση των μικροοργανισμών στο καπνιστικό μεγιστοποιείται, σε αντίθεση με το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες και την παρουσία φυτού που αποδίδουν περισσότερο ρεαλιστικά τις συνθήκες αγρού. Αντίθετα, το οργανοφωσφορικό fosthiazate καθώς και τα Φ.Π. βιολογικής προέλευσης azadirachtin και quillajia, στην προτεινόμενη δόση για καταπολέμηση φυτοπαρασιτικών νηματωδών δεν φαίνεται να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Προηγούμενα πειράματα με άλλα οργανοφωσφορικά έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Wang et al., (2008) σε πειράματα θερμοκηπίου έδειξαν ότι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή methamidophos στο έδαφος προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα προκαλώντας αύξηση του πληθυσμού και της καταβολικής δραστηριότητας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και αντίθετα μείωση των μυκήτων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα παραπάνω

πειράματα εφαρμόστηκαν 500 και 5000 µg/kg που είναι 100 και 1000 φορές υψηλότερη από την προτεινόμενη δόση για το methamidophos. Σε ανάλογα πειράματα βρέθηκε ότι άλλα οργανοφωσφορικά όπως το fenitrothion και το chlorfenvinphos δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα (Jones et al., 1991, Katayama et al., 2001).

Ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση των Φ.Π. βιολογικής προέλευσης στην μικροβιακή κοινότητα. Πρόσφατα οι Gorta et al., (2007) ανέφεραν ότι το azadirachtin σε δόση 10 φορές υψηλότερη από την δόση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στους πληθυσμούς των βακτηρίων και ακτινομυκήτων ενώ αντίθετα οδήγησε σε σημαντική μείωση του πληθυσμού των νιτροποιητικών βακτηρίων και των μυκήτων. Στην εργασία αυτή η αξιολόγηση των επιδράσεων του azadirachtin έγινε με μεθόδους καταμέτρησης σε εκλεκτικά υποστρώματα. Είναι γνωστό ότι μόνο το 5% των μικροοργανισμών στο έδαφος καλλιεργούνται σε γνωστά υποστρώματα (Kirk et al., 2004) και άρα δεν μπορούμε να έχουμε πλήρη εικόνα των επιδράσεων ιδιαίτερα από πειράματα σε μικρόκοσμους όπως ήταν τα πειράματα των Gorta et al., (2007). Αντίθετα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PLFAs που δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης επιδράσεων στο έδαφος σε επίπεδο μικροβιακής κοινότητας και όχι μόνο καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών. Παρόμοιες δοκιμές τοξικότητας σε επίπεδο εργαστηρίου έδειξαν ότι εμπορικά σκευάσματα του azadirachtin δεν αναμένεται να έχουν αρνητικές επιδράσεις σε μικροοργανισμούς του εδάφους που δεν αποτελούν φυτοπαθογόνα (Coventry & Allan, 2001). Αντίθετα, δεν υπάρχει καμία αναφορά ως σήμερα για την δράση του quillajia στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι στις προτεινόμενες δόσεις το azadirachtin αλλά και το quillajia δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους όπως αυτό μετρήθηκε με την μέθοδο των PLFAs.

Οι παρατηρήσεις που προέκυψαν ως προς την κατανομή των διαφόρων δειγμάτων με βάση την σύστασή τους σε PLFAs μικροβιακής προέλευσης επιβεβαιώνονται και από ποσοτικές μετρήσεις των PLFAs στα διάφορα δείγματα. Η ολική συγκέντρωση PLFAs στα δείγματα εδάφους υπολογίστηκε ως το άθροισμα

των συγκεντρώσεων όλων των λιπαρών οξέων μικροβιακής προέλευσης που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με βάση τα πρότυπα μίγματα λιπαρών οξέων. Η ολική ποσότητα PLFAs μικροβιακής προέλευσης στο έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες (χρόνος 0) ήταν 2.102 ± 0.37 nmol/g. Η προσθήκη metham sodium προκάλεσε σημαντική μείωση των PLFAs μικροβιακής προέλευσης για περίοδο τουλάχιστον 30 ημερών (Πίνακας 3.5). Αντίθετα, η εφαρμογή αλεσμένου καρπού Melia οδήγησε σε διπλασιασμό της ολικής συγκέντρωσης PLFAs που διατηρήθηκε για περίοδο τουλάχιστον 30 ημερών. Τα Φ.Π. fosthiazate, quillajia και azadirachtin έχουν παρόμοια επίδραση με το μάρτυρα και σε γενικές γραμμές δεν φαίνονται να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην ολική συγκέντρωση των PLFAs σε σχέση με τον μάρτυρα. Άρα η προσθήκη Melia και metham sodium προκάλεσε ποσοτική και ποιοτική μεταβολή στην σύσταση της μικροβιακή κοινότητας του εδάφους.

Πίνακας 3.5. Οι τιμές των ολικών μικροβιακών PLFAs (nmol/g) που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, $\alpha_0.05$)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	2.42Ba	2.27Ba	1.63Bb
Quillajia	1.74Cb	1.95Cb	2.33Aa
Μάρτυρας	2.02Ca	1.96Ca	1.35Bb
Azadirachtin	2.08Ca	1.71Cb	1.44Bc
Melia	4.90Aa	3.08Ab	2.43Ac
Metham Sodium	1.42Eb	1.20Db	1.65Ba

*A,B,C,D,E :μεταχειρίσεις Φ.Π. , **a,b,c :χρόνος

Η σχετική συγκέντρωση PLFAs που αποτελούν δείκτες θετικών κατά Gram βακτηρίων στο έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (χρόνος 0) υπό ελεγχόμενες συνθήκες ήταν $23.40 \pm 0.94\%$. Σε γενικές γραμμές η προσθήκη των διαφόρων Φ.Π. δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στις σχετικές συγκεντρώσεις

των λιπαρών οξέων-δεικτών των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Πίνακας 3.6). Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η εφαρμογή του αλεσμένου καρπού *Melia* που προκάλεσε μικρή αλλά σημαντική μείωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων καθόλη την διάρκεια του πειράματος. Αυτή η μείωση πιθανότατα οφείλεται στην επικράτηση μυκήτων και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων στο έδαφος (Διάγραμμα 3.10) σε βάρος των θετικών κατά Gram βακτηρίων που αναπτύσσονται με βραδύτερους ρυθμούς (Zelles et al., 1997). Μια άλλη σημαντική παρατήρηση είναι ότι μετά από 60 ημέρες, εκτός από την περίπτωση της *Melia*, οι σχετικές ποσότητες των PLFAs των θετικών κατά Gram βακτηρίων κυμάνθηκαν σε ελαφρώς υψηλότερα από τα αρχικά επίπεδα (15 ημέρες). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υποχώρηση των μυκήτων και των ταχέως αναπτυσσόμενων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου και την αποδόμηση της οργανικής ύλης από τη εφαρμογή του αλεσμένου-καρπού *Melia* και την επικράτηση θετικών κατά Gram βακτηρίων. Συνολικά, τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά και άμεσα από την εφαρμογή των Φ.Ο. που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του συνόλου των PLFAs (% των συνολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που αντιστοιχούν σε θετικά κατά Gram βακτήρια και ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	24.63Ab	25.55ABb	28.09Aa
Quillajia	24.48Ab	26.82Aa	26.69ABCa
Μάρτυρας	24.62Ab	26.44ABa	27.68ABa
Azadirachtin	21.96Bb	24.98BCa	25.11Ca
Melia	21.99Ba	21.39Da	23.12Da
Metham Sodium	24.46Aab	23.36Cb	25.89BCa

*A,B,C,D :μεταχειρίσεις Φ.Π. , **a,b :χρόνος

Η σχετική συγκέντρωση PLFAs που χαρακτηρίζουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια στο έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (χρόνος 0) υπό ελεγχόμενες συνθήκες ήταν $42.65 \pm 1.62\%$. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι 15, 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή αλεσμένου καρπού *Melia* παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της σχετικής συγκέντρωσης των PLFAs-δεικτών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Πίνακας 3.7). Αντίθετα, η εφαρμογή metham sodium προκάλεσε σημαντική μείωση των PLFAs-δεικτών για αρνητικά κατά Gram βακτήρια καθόλη την διάρκεια του πειράματος. Η εφαρμογή fosthiazate, quillajia και azadirachtin δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές ποσοτικές μεταβολές στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Γενικότερα, οι τιμές των PLFAs-δεικτών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων παρουσιάζουν μια σταδιακή μείωση με την πάροδο του χρόνου στις περισσότερες μεταχειρίσεις συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην σταδιακή διάσπαση της διαθέσιμης οργανικής ουσίας και σταδιακή επικράτηση και πάλι ολιγοτροφικών συνθηκών στο έδαφος που δεν ευνοούν πλέον τα πλειοτροφικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Πίνακας 3.7. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του συνόλου των PLFAs (% των συνολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που αντιστοιχούν σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	47.19Ba	45.02Ba	40.97Cb
Quillajia	43.50CDa	42.77BCa	43.35Ba
Μάρτυρας	42.74Da	39.07CDb	39.62Cb
Azadiracthin	45.93BCa	40.96Cb	41.85BCb
Melia	55.30Aa	53.55Aa	48.04Ab
Metham Sodium	36.71Ea	36.48Da	36.69Da

*A,B,C,D,E :μεταχειρίσεις , **a,b :χρόνος

Η σχετική συγκέντρωση του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9, που αποτελεί δείκτη μυκήτων, στο έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (χρόνος 0) υπό ελεγχόμενες συνθήκες ήταν $3.32 \pm 0.85\%$. Η σχετική συγκέντρωση του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9 ήταν σημαντικά υψηλότερη στα δείγματα όπου εφαρμόστηκε αλεσμένος καρπός *Melia* σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις σε όλη την διάρκεια του πειράματος (Πίνακας 3.8). Για παράδειγμα η προσθήκη *Melia* στο έδαφος προκάλεσε τριπλασιασμό της σχετικής συγκέντρωσης του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα και με την κατανομή της συμμετοχής (loading) των διαφόρων μεθυλεστέρων που ανιχνεύθηκαν στο έδαφος σε σχέση με τα Φ.Π. που εφαρμόστηκαν (Διάγραμμα 3.10), όπου και φαίνεται ότι η διαφοροποίηση των δειγμάτων που δέχτηκαν την εφαρμογή *Melia* οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αύξηση των λιπαρών οξέων 18:2ω6,9, 18:1ω9*cis* και *trans*. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή *metham sodium* προκάλεσε σημαντική μείωση στην συγκέντρωση του 18:2ω6 σε σχέση με τον μάρτυρα και τα βιολογικά Φ.Π. για τουλάχιστον 30 ημέρες αλλά επανήλθε στα επίπεδα των υπόλοιπων μεταχειρίσεων στις 60 ημέρες. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σύμφωνες με τα ευρήματα του Διαγράμματος 3.10 όπου φαίνεται ότι η εφαρμογή *metham sodium* προκάλεσε διαφοροποιήσεις στην μικροβιακή κοινότητα που οφείλονται κυρίως στην μείωση των συγκεντρώσεων του δείκτη 18:2ω6,9. Η μείωση της συγκέντρωσης του μεθυλεστέρα του λιπαρού οξέος 18:2ω6 μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι μύκητες είναι περισσότερο ευαίσθητοι στις διαταραχές της φυσιολογίας του εδάφους σε σύγκριση με τους μονοκύτταρους οργανισμούς, γεγονός που τους καθιστά και καταλληλότερους δείκτες περιβαλλοντικών διαταραχών (Kaur et al., 2005). Η εφαρμογή των υπολοίπων Φ.Ο. δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην σχετική συγκέντρωση του λιπαρού οξέος 18:2ω6 και δη στους μύκητες του εδάφους με μοναδικές εξαιρέσεις την εμφάνιση μιας σημαντικής μείωσης στο έδαφος που δέχτηκε την εφαρμογή *quillajia* 15 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Πίνακας 3.8. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9 (% των συνολικών PLFAs σε κάθε δείγμα), που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	2.40BCa	2.26BCa	2.37Ba
Quillaja	1.72Ca	2.05BCa	1.96Ba
Μάρτυρας	2.71Ba	2.59Ba	1.99Ba
Azadiracthin	2.82Ba	2.47Bb	2.33Ba
Melia	9.86Aa	6.53Ab	4.79Ac
Metham Sodium	1.76Ca	1.71Ca	1.65Ba

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b,c :χρόνος

Η σχετική συγκέντρωση των PLFAs που αποτελούν δείκτες πρωτόζωων στο έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (χρόνος 0) υπό ελεγχόμενες συνθήκες ήταν $2.0 \pm 0.28\%$. Μετά από 30 ημέρες οι σχετικές συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων-δεικτών για τα πρωτόζωα στα εδάφη που δέχτηκαν την εφαρμογή *Melia* και *metham sodium* παρουσιάζονται σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις 15 ημέρες (Πίνακας 3.9). Το γεγονός πιθανόν να οφείλεται στην αντίστοιχη αύξηση του πληθυσμού βακτηρίων που αποτελούν τροφή για τα πρωτόζωα. Επίσης, 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. εμφανίζεται μια αύξηση στις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων-δεικτών για τα πρωτόζωα σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Πίνακας 3.9. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων (% των συνολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που αντιστοιχούν σε πρωτόζωα και τα οποία ανιχνεύθηκαν στα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	1.92Ba	2.01Ca	2.12Ca
Quillajia	2.65Aab	2.03Cb	3.21Ba
Μάρτυρας	2.60Aa	2.10Ca	2.12Ca
Azadiracthin	1.89Bb	1.92Cb	3.78Aa
Melia	2.71Ab	3.73Aa	4.23Aa
Metham Sodium	2.56Ab	3.11Ba	2.44Cb

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b :χρόνος

Οι τιμές του λόγου PLFAs μυκήτων/ βακτήρια υπολογίστηκε για κάθε δείγμα εδάφους διαιρώντας τις σχετικές συγκεντρώσεις του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9 προς το άθροισμα των σχετικών συγκεντρώσεων όλων των λιπαρών οξέων που αποτελούν δείκτες βακτηρίων (15:0, ι-15:0, α-15:0, 16:0, 17:0, ι-17:0, α-17:0, 3-OH-14:0, 16:1ω7, 18:1ω9*cis/trans*, cy17:0, cy19:0). Ο λόγος μύκητες/βακτήρια έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης «υγείας» των λειτουργιών που επιτελούνται από μικροοργανισμούς του εδάφους όπως είναι η αποσύνθεση της οργανικής ουσίας που επιτελείται κυρίως από τους μύκητες και του ακτινομύκητες (Bardgett and McAlister, 1999). Ο λόγος μύκητες/βακτήρια παρουσίασε σχετικά χαμηλές τιμές (<0.1) για όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση τα εδάφη στα οποία εφαρμόστηκε *Melia* όπου και παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του λόγου σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και τον μάρτυρα (Πίνακας 3.10). Η αυξημένη τιμή του λόγου στα εδάφη που εφαρμόστηκε *Melia* διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος. Η τιμή του λόγου παρουσίασε σημαντικά χαμηλές τιμές, σε σχέση με τον μάρτυρα και στα δείγματα των 15 και 30 ημερών στα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με τα βιολογικά Φ.Π. *quillajia* και *azadiracthin*. Τέλος, ο λόγος παρουσίασε τιμές σταθερά χαμηλότερες από 0.03 στα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με *metham sodium*. Η μείωση του λόγου μυκήτων/βακτηρίων παρατηρείται σε εδάφη που έχουν καταπονηθεί και σε περιπτώσεις διαταραχής της μικροβιακής

κοινότητας (Kaur et al., 2005). Έτσι, οι σημαντικά χαμηλότερες τιμές του λόγου στα εδάφη που εφαρμόστηκε metham sodium είναι σύμφωνη με την αρνητική επίδραση του καπνιστικού στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους με σημαντικότερη αρνητική δράση στους μύκητες και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια του εδάφους.

Πίνακας 3.10. Οι τιμές του λόγου μύκητες/βακτήρια στα διάφορα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, $\alpha 0.05$)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	0.03BCa	0.03BCa	0.03Ba
Quillajia	0.02Ca	0.02BCa	0.02Ba
Control	0.04Ba	0.03Ba	0.03Ba
Azadiracthin	0.04Ba	0.02Cb	0.03Ba
Melia	0.12Aa	0.08Ab	0.06Ac
Metham Sodium	0.02Ca	0.02BCa	0.02Ba

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b,c :χρόνος

Η ικανότητα ενός μικροβιακού συστήματος να ανταπεξέρχεται των διαταραχών λόγω δυσμενών επιδράσεων (καλλιεργητικές πρακτικές, Φ.Π. κ.α.) σχετίζεται άμεσα με την βιοποικιλότητα του συστήματος (Lynch et al., 2004). Η βιοποικιλότητα μπορεί να εκτιμηθεί είτε ως προς την αφθονία των ειδών, είτε με βάση την ομαλή κατανομή των ειδών στην μικροβιακή κοινότητα. Ο συντελεστής ποικιλότητας Shannon-Weaver λαμβάνει υπόψη και τις δύο παραπάνω παραμέτρους και παρέχει ένα μέτρο της βιοποικιλότητας σε ένα περιβαλλοντικό μικροοικοσύστημα (Kaur et al., 2005). Ο συντελεστής ποικιλότητας Shannon υπολογίστηκε για όλες τις μεταχειρίσεις και διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των διαφόρων Φ.Ο. προκάλεσε μικρές αλλά σημαντικές μεταβολές (Πίνακας 3.11). Επί παραδείγματι, η εφαρμογή metham sodium προκάλεσε σημαντική μείωση της μικροβιακής βιοποικιλότητας όπως αντικατοπτρίζεται στις σημαντικά χαμηλότερες τιμές του συντελεστή Shannon σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και τις άλλες

μεταχειρίσεις στις 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή. Τα αποτελέσματα μας είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες όπου η εφαρμογή metham sodium οδήγησε σε σημαντική μείωση του συντελεστή Shannon σε σχέση με τον μάρτυρα και η μείωση αυτή διατηρήθηκε για τουλάχιστον 12 εβδομάδες (Ibekwe et al., 2001). Αντίθετα, η προσθήκη αλεσμένου καρπού *Melia* προκάλεσε αύξηση του συντελεστή βιοποικιλότητας Shannon η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για τα δείγματα που συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά την εφαρμογή. Η προσθήκη των βιολογικών Φ.Π. *quillajia* και *azadirachtin* δεν φαίνεται να επηρεάζει την βιοποικιλότητα του εδάφους όπως φαίνεται από την μη σημαντική μεταβολή των τιμών του συντελεστή Shannon σε σχέση με το μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες. Γενικότερα, με την πάροδο του χρόνου σε όλες τις μεταχειρίσεις οι τιμές του συντελεστή ποικιλότητας Shannon αυξάνεται σημαντικά με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται σε όλες τις μεταχειρίσεις με την ολοκλήρωση του πειράματος, 60 ημέρες μετά την εφαρμογή.

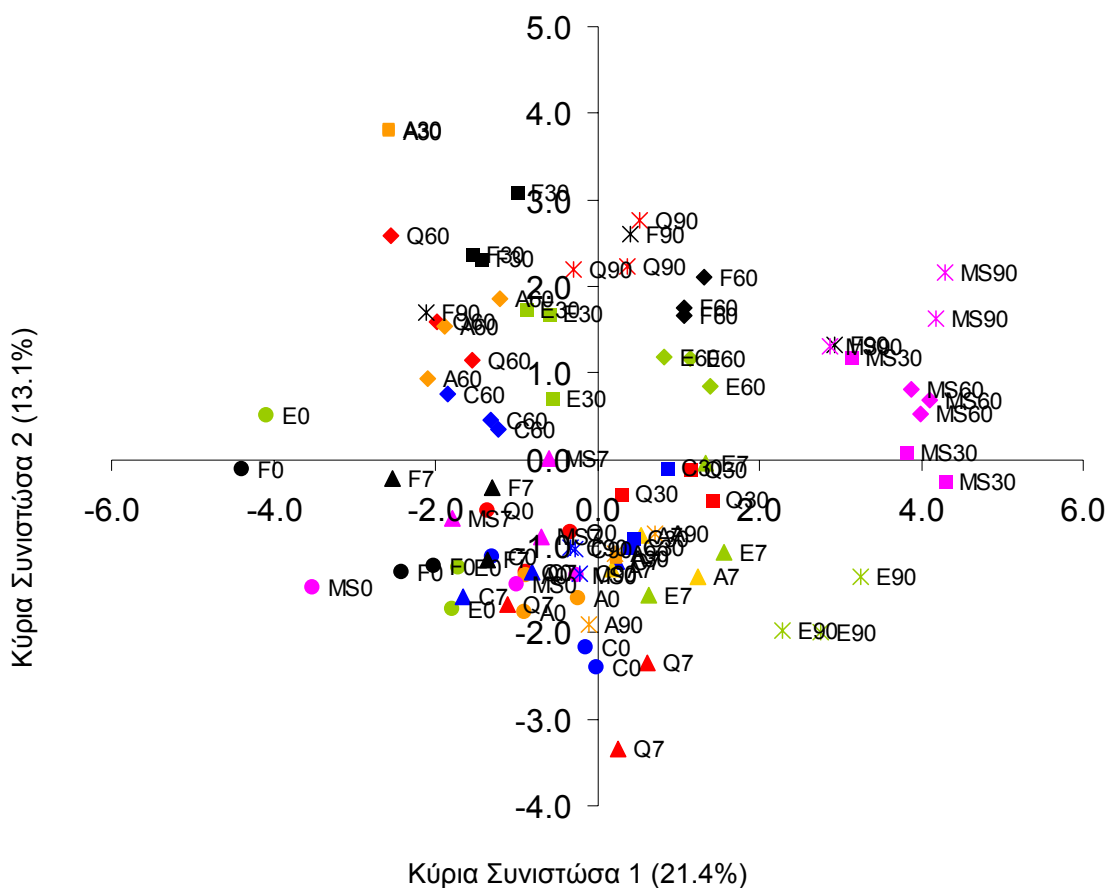
Πίνακας 3.11. Οι τιμές του συντελεστή βιοποικιλότητας Shannon-Weaver στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)		
	15	30	60
Fosthiazate	2.46Ab	2.48Bb	2.56Ba
Quillajia	2.43ABb	2.36Cb	2.58ABa
Control	2.47Ab	2.37Cc	2.56Ba
Azadiracthin	2.43ABb	2.38Cb	2.60ABa
Melia	2.46Ac	2.58Aa	2.61Aa
Metham Sodium	2.39Bb	2.39Cb	2.49Ca

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b,c :χρόνος

3.2.6.2. Πείραμα αγρού

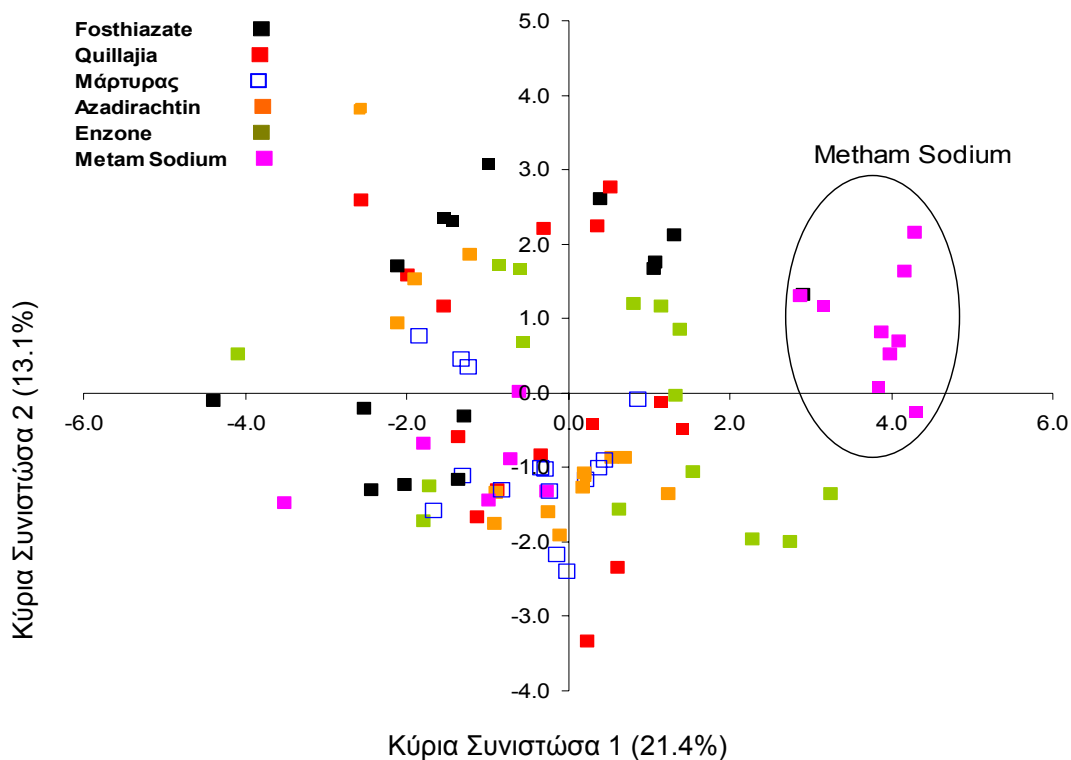
Στα δεδομένα που προέκυψαν από την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των PLFAs πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (Principal Components Analysis) και η κατανομή όλων των δειγμάτων στις δύο πρώτες Κύριες Συνιστώσες απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3.16. Ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων στο παρακάτω διάγραμμα καθιστά δύσκολη την ανάγνωση και διαχωρισμό των μεταχειρίσεων μεταξύ τους.



Διάγραμμα 3.16. Η κατανομή των δειγμάτων εδάφους από το πείραμα αγρού ανάλογα με την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs. Κάθε σύμβολο συνοδεύεται από την ταυτότητα του που αποτελείται από το είδος του Φ.Π. που εφαρμόστηκε (C: Μάρτυρας, E: Enzone,

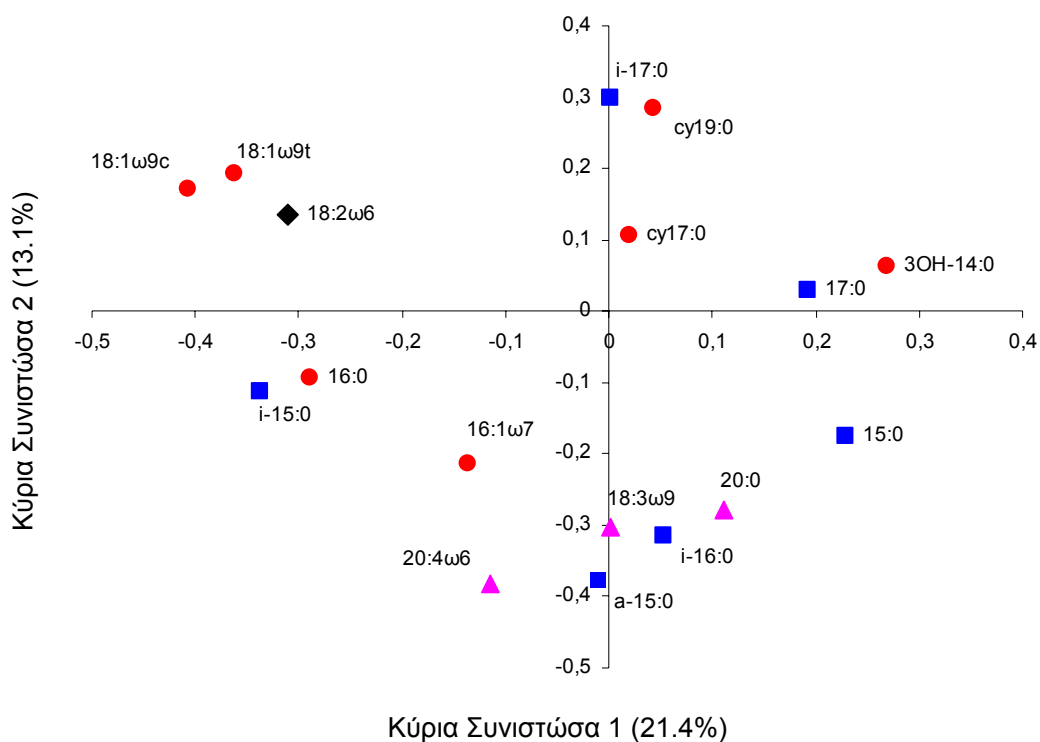
MS: Metham Sodium, F: Fosthiazate, Q: Quillajia saponaria, A: Azadirachtin) και την ημέρα δειγματοληψίας (0, 7, 30, 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή). Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας αντίστοιχα.

Για τον παραπάνω λόγο τα αποτελέσματα κατανομής θα παρουσιαστούν σε επιμέρους διαγράμματα ώστε να διαφανούν οι πιθανές επιδράσεις των διαφόρων μεταχειρίσεων στην μικροβιακή κοινότητα. Έτσι, στο Διάγραμμα 3.17 απεικονίζεται η κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύστασή τους σε PLFAs όταν ως παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιείται το είδος του Φ.Π που εφαρμόστηκε.



Διάγραμμα 3.17. Η κατανομή των δειγμάτων εδάφους από το πείραμα αγρού ανάλογα με την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε το Φ.Π. που εφαρμόστηκε. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Τα PLFAs που ταυτοποιήθηκαν στο πείραμα αγρού ήταν τα ίδια με εκείνα του πειράματος υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Πίνακας 3.4). Τα μόνα δείγματα που διαχωρίζονται και ομαδοποιούνται ξεκάθαρα στις θετικές τιμές της Κύριας Συνιστώσας 2 είναι τα περισσότερα από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του metham sodium. Επίσης υπάρχει στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο μια μικρή ομάδα δειγμάτων τα οποία έχουν δεχτεί την εφαρμογή sodium tetrathiocarbonate (Enzone). Αντίθετα, κανένα από τα υπόλοιπα Φ.Π. δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια άλλη σημαντική ομαδοποίηση.



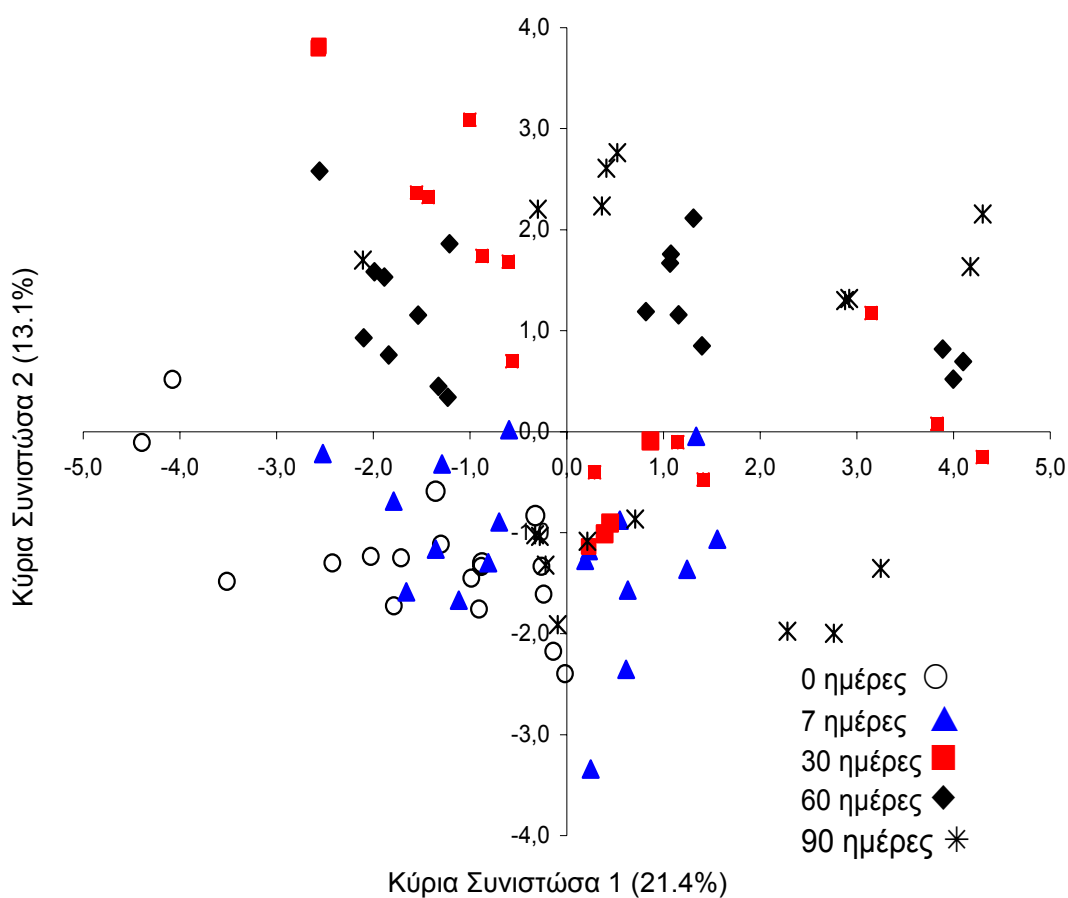
Διάγραμμα 3.18. Απεικόνιση της συμμετοχής (loading) των εξαρτημένων μεταβλητών (μικροβιακών PLFAs που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους) στην κατανομή των δειγμάτων εδάφους. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Στο Διάγραμμα 3.18 παρουσιάζεται σχηματικά η συμμετοχή (loadings) των διαφόρων PLFAs που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα εδάφους από το πείραμα αγρού στην κατανομή τους με βάση την σύσταση του σε PLFAs.

Τα λιπαρά οξέα 18:2ω6,9, 18:1ω9*cis* και *trans* που αποτελούν δείκτες μυκήτων και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αντίστοιχα, φαίνεται ότι ομαδοποιούνται στις αρνητικές τιμές της Κύριας Συνιστώσας 2 και ακριβώς αντίθετα από τα δείγματα τα οποία έλαβαν εφαρμογή metham sodium (Διάγραμμα 3.17). Αυτή η κατανομή των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι η εφαρμογή metham sodium παρουσιάζει σημαντική αρνητική επίδραση στους πληθυσμούς των μυκήτων και κάποιων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως *Pseudomonas* των οποίων οι μεμβράνες χαρακτηρίζονται από το λιπαρό οξύ 18:1ω9*cis/trans*. Αντίθετα τα λιπαρά οξέα 17:0, 15:0 που αποτελούν δείκτες θετικών κατά Gram βακτηρίων φαίνεται ότι ευνοούνται από την εφαρμογή του metham sodium. Η επικράτηση λιπαρών οξέων που αποτελούν δείκτες θετικών κατά Gram βακτηρίων συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες αλλά και με τα αποτελέσματα από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες. Οι Ibekwe et al., (2001) αναφέρουν ότι στα εδάφη όπου εφαρμόστηκε metham sodium και βρωμιούχο μεθύλιο επικράτησαν θετικά κατά Gram βακτήρια ενώ τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και οι μύκητες αποτέλεσαν τις περισσότερο ευαίσθητες ομάδες μικροοργανισμών.

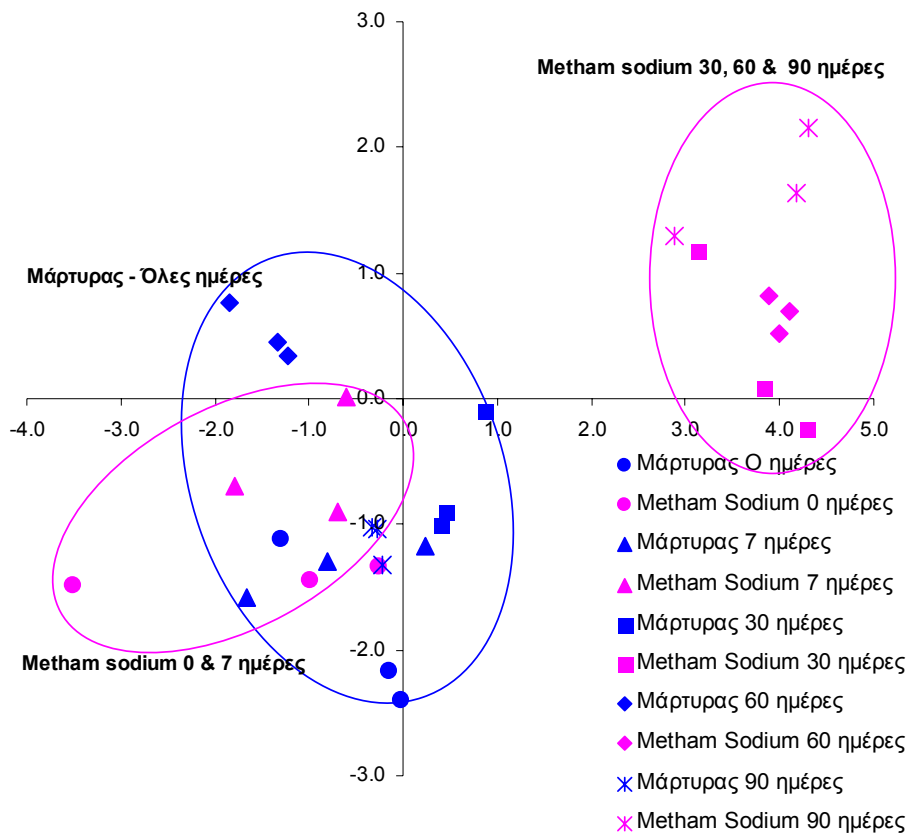
Τα δείγματα εδάφους φαίνεται να παρουσιάζουν μια γενικότερη ομαδοποίηση ως προς τον χρόνο δειγματοληψίας μετά την εφαρμογή των Φ.Π (Διάγραμμα 3.19). Έτσι, όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν πριν την εφαρμογή ή 7 ημέρες μετά ομαδοποιούνται στις αρνητικές τιμές της Κύριας Συνιστώσας 1. Αντίθετα, το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. παρουσιάζουν μια ασθενή ομαδοποίηση και κατανέμονται στις θετικές τιμές της Κύριας Συνιστώσας 1. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν 30 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή δεν παρουσιάζουν κάποια ομαδοποίηση ως προς τον χρόνο και φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από το Φ.Π. που εφαρμόστηκε παρά από τον χρόνο δειγματοληψίας. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει ότι εκτός του Φ.Π. και ο χρόνος δειγματοληψίας καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων επηρεάζει σημαντικά την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από διπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) στις τιμές των

άδηλων φορέων για όλα τα δείγματα στις δύο πρώτες Κύριες Συνιστώσες όπου φαίνεται ότι και τα Φ.Π. και ο χρόνος δειγματοληψίας αλλά και οι αλληλεπιδράσεις των δύο παραγόντων επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση των PLFAs και δη την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας ($P < 0.001$). Η ομαδοποίηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στις 60 ημέρες πιθανό να οφείλεται στις πολύ υψηλές και ξηρικές θερμοκρασίες που επικράτησαν λίγο πριν την δειγματοληψία των 60 ημερών στην περιοχή (max 43-44°C, Διάγραμμα 2.1)



Διάγραμμα 3.19. Η κατανομή των δειγμάτων εδάφους από το πείραμα αγρού ανάλογα με την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε το είδος της Φ.Ο που εφαρμόστηκε. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

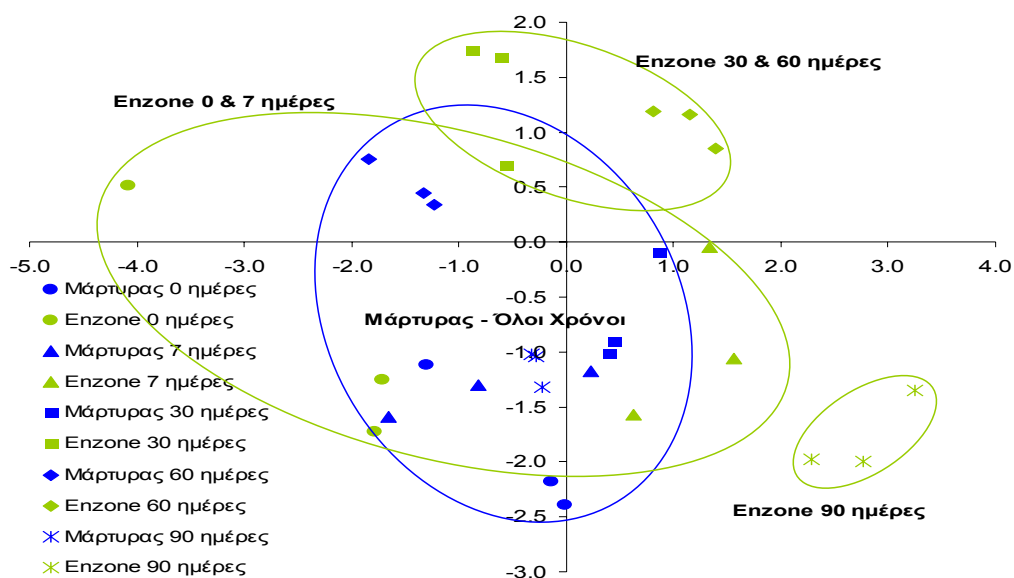
Για την καλύτερη απεικόνιση των επιδράσεων των Φ.Π. στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, η κατανομή των δειγμάτων ως προς την σύστασή τους σε PLFAs θα γίνει για κάθε Φ.Π. σε σύγκριση με τον μάρτυρα για κάθε έναν από τους χρόνους δειγματοληψίας. Τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια που εφαρμόστηκε metham sodium διαφοροποιούνται από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τον μάρτυρα σε όλους τους χρόνους με μοναδική εξαίρεση τα δείγματα που συλλέχθηκαν 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 3.20). Έτσι, η εφαρμογή metham sodium φαίνεται ότι προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους οι οποίες εμφανίζονται στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του και διατηρούνται για τουλάχιστον 90 ημέρες. Αντίθετα, στο πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες οι επιδράσεις του metham sodium στην μικροβιακή κοινότητα είχαν ήδη εξασθενήσει 60 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 3.15). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο εφαρμογής και στις συνθήκες που επικράτησαν μετά την εφαρμογή του καπνιστικού στον αγρό σε σχέση με το θάλαμο επώασης. Η εφαρμογή του καπνιστικού στο θάλαμο επώασης έγινε με κάλυψη με φύλλο πλαστικού σε γλάστρα όπου η υγρασία του εδάφους προσαρμόστηκε στο 45% της υδατοχωρητικότητας και η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους $25^{\circ}\text{C}\pm 2$. Αντίθετα στον αγρό το metham sodium εφαρμόστηκε χωρίς κάλυψη αλλά με κατάκλιση του εδάφους ώστε να περιορίσουμε την διαφυγή του στην ατμόσφαιρα για τις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή του. Την εφαρμογή του metham sodium στον αγρό ακολούθησαν υψηλότερες θερμοκρασίες ($>35^{\circ}\text{C}$) οι οποίες σε συνδυασμό με την υψηλή υγρασία του εδάφους μεγιστοποίησε την ελευθέρωση του δραστικού ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου στο αγρό σε σχέση με το θερμοκήπιο.



Διάγραμμα 3.20. Η κατανομή των δειγμάτων εδάφους που συλλεχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του metham sodium και του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες ανάλογα με την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

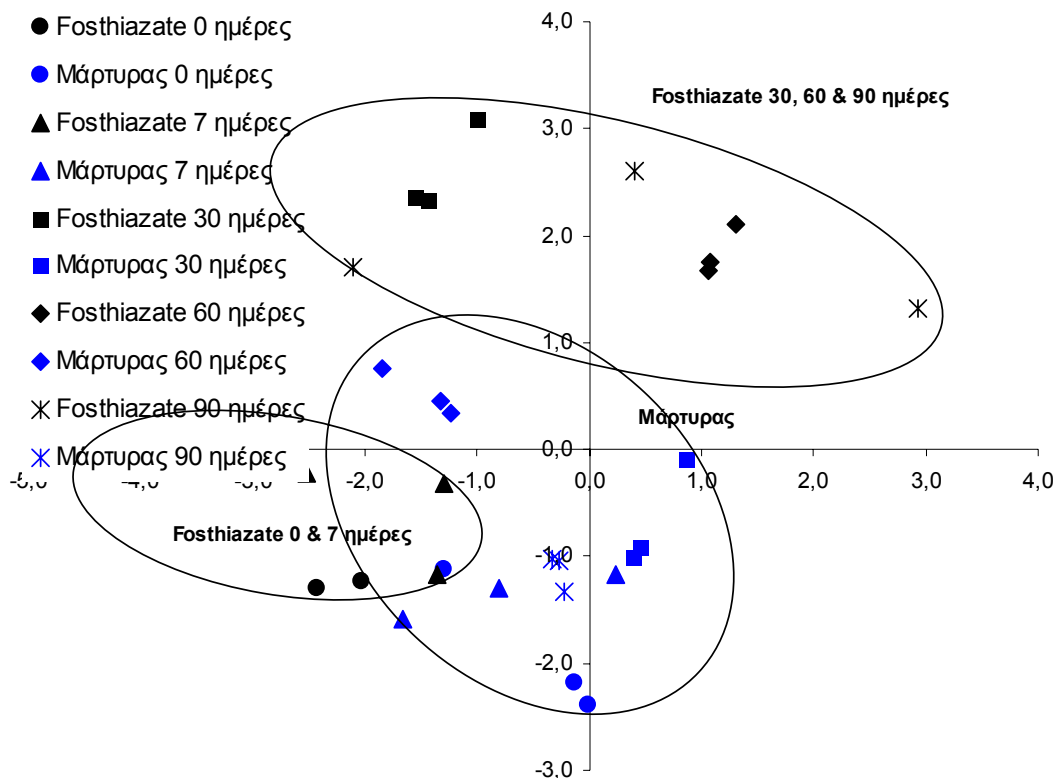
Τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν πριν την εφαρμογή και 7 ημέρες αργότερα από τα πειραματικά τεμάχια όπου εφαρμόστηκε το καπνιστικό sodium tetrathiocarbonate (Enzone) δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το μάρτυρα σε όλους τους χρόνους (Διάγραμμα 3.21). Αντίθετα τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του Enzone 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή φαίνεται να ομαδοποιούνται μαζί και να διαφοροποιούνται από τα αντίστοιχα δείγματα του μάρτυρα και του Enzone των 0

και 7 ημερών. Τέλος, τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν 90 ημέρες μετά την εφαρμογή Enzone ομαδοποιούνται μόνα τους και μακριά από όλα τα υπόλοιπα δείγματα εδάφους του μάρτυρα και του Enzone. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι το Enzone προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους οι οποίες είναι λιγότερο έντονες από αυτές που προκαλεί το metham sodium και αρχίζουν να εμφανίζονται 30 ημέρες μετά την εφαρμογή αλλά γίνονται ιδιαίτερα εμφανείς 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Έως και σήμερα η επίδραση του καπνιστικού SoTe στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους δεν είναι γνωστή και η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη που παρουσιάζει ανάλογα δεδομένα. Οι προκαλούμενες μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας από το συγκεκριμένο καπνιστικό δεν αποτελούν έκπληξη καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι και άλλα καπνιστικά όπως το 1,3-D, χλωροπικρίνη και το propargyl bromide προκαλούν ανάλογες μεταβολές (Klose et al., 2005; Dungan et al., 2007, Hoshino and Matsumoto, 2007).



Διάγραμμα 3.21. Η κατανομή των δειγμάτων που συλλεχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του Enzone και του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες ανάλογα με την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

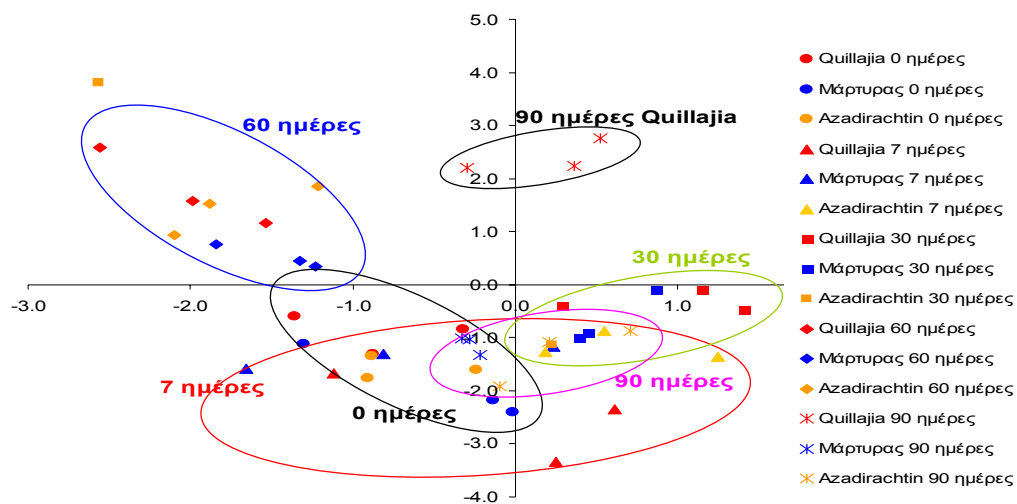
Τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν πριν την εφαρμογή των ΦΠ και 7 ημέρες αργότερα από τα πειραματικά τεμάχια του fosthiazate δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του μάρτυρα σε όλους τους χρόνους (Διάγραμμα 3.22). Αντίθετα, τα δείγματα που συλλέχθηκαν 30, 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή του οργανοφωσφορικού ομαδοποιούνται σχετικά κοντά μεταξύ τους και διαφοροποιούνται ελαφρώς από τα αντίστοιχα δείγματα του μάρτυρα ως προς την πρώτη Κύρια Συνιστώσα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι το fosthiazate προκαλεί κάποιες διαφοροποιήσεις στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους οι οποίες είναι λιγότερο έντονες από αυτές που προκαλούν τα καπνιστικά. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν μια μικρή αλλά σε ορισμένες ημέρες σημαντική μεταβολή στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους από την εφαρμογή του fosthiazate σε σχέση με το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες όπου το fosthiazate δεν φαίνεται να διαφοροποιεί σημαντικά την μικροβιακή κοινότητα του ίδιου εδάφους. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με την πλειοψηφία μελετών που εξέτασαν την επίδραση συνθετικών Φ.Π στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που δείχνουν ότι στην προτεινόμενη δόση τα συνθετικά Φ.Π. δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην σύσταση και λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Devare et al., 2004, Saeki and Toyota., 2004, Seghers et al., 2003 και 2005, Bending et al., 2007).



Διάγραμμα 3.22. Η κατανομή των δειγμάτων που συλλεχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του fosthiazate και του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες ανάλογα με την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Τα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια όπου εφαρμόστηκαν τα βοτανικής προέλευσης Φ.Π. azadirachtin και quillajia δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια του μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 3.23). Μοναδική εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα που συλλέχθηκαν 90 ημέρες μετά την εφαρμογή του quillajia στο έδαφος, τα οποία ομαδοποιούνται μαζί και διαχωρίζονται ως προς την πρώτη Κύρια Συνιστώσα από όλα τα υπόλοιπα δείγματα των βιολογικών Φ.Π. και του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι απολύτως σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το πείραμα υπό ελεγχόμενες

συνθήκες και επιβεβαιώνουν ότι η εφαρμογή των συγκεκριμένων βιολογικών Φ.Π. στις προτεινόμενες δόσεις (και όχι σε 10 ή 100 φορές υψηλότερες) δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Τα αποτελέσματά μας είναι επίσης σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες. Έτσι, ο Antonius (2003) πραγματοποιώντας πειράματα αγρού έδειξε ότι το azadirachtin δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην δραστικότητα βασικών μικροβιακών ενζύμων (ινβερτάσες και ουρεάσες) που συμμετέχουν στους κύκλους C και N. Παρομοίως, οι Wan και Rae (1998) σε πειράματα εργαστηρίου έδειξαν ότι το azadirachtin δεν παρουσίαζε σημαντική επίδραση στις δενδρόμορφες μυκόρριζες που αποτελούν από τους πιο ευαίσθητους μύκητες στα Φ.Π. Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις 60 ημέρες ανεξαρτήτου Φ.Π. που εφαρμόστηκε ομαδοποιήθηκαν μαζί δείχνοντας ότι στις 60 ημέρες άλλος παράγοντας εκτός των Φ.Π. προκαλεί σημαντική επίδραση στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.



Διάγραμμα 3.23. Η κατανομή των δειγμάτων που συλλεχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια των azadirachtin και quillajia και του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες ανάλογα με την σύστασή τους σε μικροβιακά PLFAs. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών και οι δύο άξονες περιγράφουν το 20.4 και 13.2% της συνολικής παραλλακτικότητας

Από τον Πίνακα 3.12 είναι εμφανές ότι τα καπνιστικά metham sodium και Enzone παρουσιάζουν τη σημαντικότερη επίδραση και προκαλούν μείωση της συνολικής ποσότητας των PLFAs. Στις περιπτώσεις των quillajia και azadirachtin η συνολική ποσότητα των PLFAs παρέμεινε σταθερή και στα ίδια επίπεδα με του μάρτυρα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, το fosthiazate προκάλεσε μείωση της συνολικής ποσότητας των PLFAs μετά από 60 και 90 ημέρες σε μικρότερο βαθμό από τα καπνιστικά.

Πίνακας 3.12. Οι τιμές των ολικών μικροβιακών PLFAs (nmol/g) που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα(HSD test, $\alpha=0.05$)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	3.92Aa	3.61Aab	3.34ABb	2.60Bc	2.56Ac
Quillajia	3.22CDa	2.81Ca	3.11Ba	3.19Aa	2.78Aa
Μάρτυρας	2.90Db	3.41ABa	3.21Bab	3.13ABab	2.91Ab
Azadirachtin	3.18CDa	2.67Cb	3.18Ba	3.06ABab	2.99Aab
Enzone	3.44BCa	2.38Dc	3.70Aa	2.96ABb	1.96Bc
Metham Sodium	3.78ABa	3.07BCb	2.10Cc	1.62Cd	1.63Bd

*A,B,C,D :μεταχειρίσεις , **a,b,c,d :χρόνος

Από τον Πίνακα 3.13 προκύπτει ότι η εφαρμογή των περισσότερων Φ.Π. προκάλεσαν μικρές αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικές ποσοτικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις των PLFAs-δεικτών για τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Έτσι, τα καπνιστικά metham sodium, enzone και το οργανοφωσφορικό fosthiazate προκάλεσαν μια μικρή αλλά σημαντική μείωση στα θετικά κατά Gram βακτήρια στο τέλος του πειράματος (90 ημέρες). Επίσης, σημαντική μείωση στις σχετικές συγκεντρώσεις των PLFAs-δεικτών για θετικά κατά Gram βακτήρια παρατηρήθηκαν στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή azadirachtin και συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε άμεση συμφωνία με τα ευρήματα από το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες και επιβεβαιώνουν την άποψη που

προκύπτει και από άλλες εργασίες ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την έκθεση σε Φ.Π.

Πίνακας 3.13. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των PLFAs (% των συνολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που αντιστοιχούν σε θετικά κατά Gram βακτήρια και ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, $\alpha=0.05$)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	27.23Aab	30.63Aa	26.81ABabc	25.77Abc	23.01Bc
Quillajia	27.31Aab	29.76Aa	24.65BCb	24.38Ab	26.55ABab
Μάρτυρας	27.18Aa	28.92Aa	28.36ABa	25.76Aa	27.76Aa
Azadiracthin	28.97Aa	30.11Aa	20.31Cb	26.01Aa	26.21ABa
Enzone	28.14Aa	30.29Aa	29.75Aa	26.79Aab	23.53Bb
Metham Sodium	30.58Aa	30.56Aa	27.77ABab	24.33Ab	23.61Bb

*A,B,C,D: μεταχειρίσεις, ** a,b,c,d: χρόνος

Τα PLFAs των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων δε μειώθηκαν παρά μόνο στις περιπτώσεις των καπνιστικών μετά από διάστημα 60 και 90 ημερών, τα οποία και φαίνεται να έχουν τη δυσμενέστερη επίδραση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Πίνακας 3.14). Για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις οι ποσότητες των PLFAs παρέμειναν σε παρόμοια με τα αρχικά επίπεδα. Τα καπνιστικά φαίνεται ότι έχουν αρνητικές επιδράσεις στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και κατ' επέκταση μείωση των PLFAs που τα χαρακτηρίζουν. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών από την οποία προέκυψε το metham sodium παρουσιάζε αρνητική επίδραση σε κάποια αρνητικά κατά Gram βακτήρια, γεγονός που το διαφοροποίησε από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και προκάλεσε μείωση των πληθυσμών τους (Διάγραμμα 3.17).

Πίνακας 3.14. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των PLFAs (% των ολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που αντιστοιχούν σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	46.69Aa	39.95Ab	38.66Bb	38.65Ab	40.39Ab
Quillajia	41.80BCab	37.38ABc	37.36BCc	42.34Aa	38.12Abc
Μάρτυρας	40.74Ca	38.89ABa	33.57CDb	39.82ABa	38.34Aa
Azadirachtin	42.25BCa	36.73ABb	43.01Aa	39.16ABab	37.03Ab
Enzone	44.20ABa	35.76Bb	36.01BCb	37.41Bb	31.13Bc
Metam Sodium	42.11BCa	38.43ABa	30.59Db	26.75Cb	29.80Bb

*A,B,C,D: μεταχειρίσεις, ** a,b,c: χρόνος

Η σχετική συγκέντρωση του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9 που χαρακτηρίζει τους μύκητες, μετά από 30 ημέρες μειώθηκε σημαντικά στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή metham sodium και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος (Πίνακας 3.15). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών από την οποία προέκυψε ότι το metham sodium παρουσίαζε αρνητική επίδραση στους μύκητες, γεγονός που το διαφοροποίησε από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 3.17).

Μετά από διάστημα 30 ημερών διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση του λιπαρού οξέος 18:2ω6,9 στο azadirachtin, γεγονός που σημαίνει ότι το βοτανικό αυτό Φ.Π. επέδρασε θετικά στους πληθυσμούς των μυκήτων, ενώ στο quillajia και το μάρτυρα η σχετική συγκέντρωση ήταν παρόμοια. Στις 90 ημέρες διαπιστώθηκε ότι η επίδραση των Φ.Π. βοτανικής προέλευσης (azadirachtin και quillajia) στους μύκητες ήταν θετική σε σύγκριση με τα αντίστοιχα συνθετικά Φ.Π. (Πίνακας 3.15).

Πίνακας 3.15. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του λιπαρού οξέος 18:2ω6 (% των ολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	3.99Aa	3.89Aa	4.10ABa	2.02Cb	3.45ABa
Quillajia	4.08Aa	3.05ABa	2.56Cb	3.78Ba	3.77ABa
Μάρτυρας	4.35Ab	3.65ABbc	3.29BCbc	5.56Aa	3.01ABc
Azadiracthin	3.40Ac	2.51Bc	4.74Ab	6.33Aa	3.56ABbc
Enzone	4.29Aab	3.00ABc	4.80Aa	3.82Bab	3.33ABbc
Metham Sodium	3.97Aa	4.08Aa	2.20Cb	2.68BCb	2.54Bb

*A,B,C: μεταχειρίσεις, ** a,b,c: χρόνος

Οι σχετικές συγκεντρώσεις των PLFAs που χαρακτηρίζουν τα πρωτόζωα παρουσίασαν μια σημαντική μείωση 30 ημέρες μετά την εφαρμογή των Φ.Π. και η ίδια τάση παρουσιάστηκε και στον μάρτυρα (Πίνακας 3.16). Η μείωση αυτή συνεχίστηκε μέχρι την ολοκλήρωση τους πειράματος (90 ημέρες) σε όλες τις μεταχειρίσεις εκτός των enzone και azadiracthin όπου τα πρωτόζωα παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση την ίδια περίοδο. Η σημαντική μείωση των τιμών των λιπαρών οξέων-δεικτών για τα πρωτόζωα μπορεί να έχει προκύψει ως αποτέλεσμα της μείωσης των βακτηρίων που αποτελούν την κύρια πηγή τροφή για πρωτόζωα στο έδαφος είτε λόγω της άμεσης επίδρασης κάποιων Φ.Π. στα πρωτόζωα του εδάφους. Για παράδειγμα η μείωση των πρωτοζώων που καταγράφεται στο έδαφος που εφαρμόστηκε metham sodium 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή φαίνεται ότι εμφανίζεται ταυτόχρονα με μια σημαντική μείωση των βακτηρίων στο έδαφος (Πίνακας 3.15 και 3.16). Ανάλογη μείωση εμφανίζεται και στα εδάφη που εφαρμόστηκε fosthiazate από τις 30 ημέρες και μετά που πιθανόν να οφείλεται σε άμεσες τοξικές επιδράσεις του fosthiazate στα πρωτόζωα.

Πίνακας 3.16. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων (% των ολικών PLFAs σε κάθε δείγμα) τα οποία ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους και αντιστοιχούν σε πρωτόζωα. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	2.53CDa	2.22BCa	2.10Cab	1.63Bbc	1.43Dc
Quillajia	3.11ABa	3.23Aa	3.06Aa	1.75ABb	1.74CDb
Μάρτυρας	3.49Aa	2.49Bb	2.26BCb	2.15Ab	2.25Cb
Azadiracthin	2.91BCb	2.48Bbc	2.25BCcd	1.78ABd	3.42Aa
Enzone	2.39Dab	2.48Bab	1.77Cc	2.06ABbc	2.85Ba
Metham Sodium	2.34Dab	1.94Cbc	2.61ABa	1.63Bcd	1.30Dd

*A,B,C,D: μεταχειρίσεις, ** a,b,c: χρόνος

Ο λόγος μυκήτων/βακτηρίων παρουσιάζει μεταπτώσεις σε όλες τις μεταχειρίσεις χωρίς όμως να εμφανίζεται μια ξεκάθαρη τάση σε καμία από τις μεταχειρίσεις (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.17. Οι τιμές του λόγου μύκητες/βακτήρια στα διάφορα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	0.055Ab	0.055ABa	0.063ABab	0.031Cd	0.054Aab
Quillajia	0.059Aab	0.045ABbc	0.041Cc	0.057Bc	0.058Aa
Μάρτυρας	0.064Aa	0.054ABab	0.054BCb	0.085Ab	0.046Ab
Azadiracthin	0.048Ab	0.038ABc	0.078Aa	0.097Aa	0.056Aa
Enzone	0.059Aab	0.046ABbc	0.073ABa	0.059Bc	0.061Aa
Metham Sodium	0.055Ab	0.059Aa	0.038Cc	0.053Bc	0.048Ab

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b,c :χρόνος

Ο συντελεστής βιοποικιλότητας Shannon-Weaver που είναι ενδεικτικός της ποικιλομορφίας και της κατανομής των μικροοργανισμών της μικροβιακής

κοινότητας υπολογίστηκε για όλες τις μεταχειρίσεις (Πίνακας 3.18). Η εφαρμογή metham sodium προκάλεσε μια μείωση του συντελεστή Shannon-Weaver που είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Αντίστοιχη μείωση του συντελεστή Shannon-Weaver παρατηρήθηκε για τα εδάφη που έλαβαν εφαρμογή enzone και συλλέχθηκαν 90 ημέρες μετά. Αντίθετα η εφαρμογή των υπολοίπων Φ.Π. ουσιών δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τον μάρτυρα και ιδιαίτερα το quillajia προκάλεσε σημαντική αύξηση στην τιμή του συντελεστή Shannon-Weaver στις 30 ημέρες χωρίς όμως να υπάρχει κάποια ξεκάθαρη τάση.

Πίνακας 3.18. Οι τιμές του συντελεστή βιοποικιλότητας Shannon-Weaver στα διάφορα δείγματα εδάφους. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους τριών επαναλήψεων. Τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα κεφαλαίο ή μικρό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ως προς το είδος του Φ.Π ή τον χρόνο δειγματοληψίας αντίστοιχα (HSD test, α 0.05)

Φ.Π.	Χρόνος (ημέρες)				
	0	7	30	60	90
Fosthiazate	2.46Cb	2.45Ab	2.50Aa	2.41Bc	2.41Bc
Quillajia	2.48BCa	2.48Aa	2.46Aa	2.45Ba	2.46Aa
Μάρτυρας	2.52Aa	2.47Ab	2.42BCb	2.49Aab	2.49Aab
Azadiracthin	2.50ABa	2.44Ab	2.42BCb	2.50Aa	2.49Aa
Enzone	2.49ABCa	2.45Ab	2.46Bb	2.50Aa	2.29Cb
Metham Sodium	2.46Ca	2.44Aa	2.39Cb	2.19Cd	2.29Cc

*A,B,C :μεταχειρίσεις , **a,b,c :χρόνος

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια αξιολόγησης της επίδρασης συνθετικών Φ.Π. και Φ.Π. βοτανικής προέλευσης στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους σε επίπεδο αγρού και εργαστηρίου. Ως σήμερα το σύνολο των μελετών έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των επιδράσεων κυρίως συνθετικών Φ.Π. στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους πραγματοποιώντας πειράματα μικροκόσμων (Macalady et al., 1998, Ibekwe et al., 2001, Dungan et al., 2003, Klose et al., 2005, Bending et al., 2007, Wang et al., 2008). Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει σε επίπεδο αγρού, όπου και τα αποτελέσματα πιθανότατα να είναι διαφορετικά (Hoshino & Matsumoto, 2007). Στους μικρόκοσμους η έκθεση της μικροβιακής κοινότητας στο υπό εξέταση Φ.Π. είναι μέγιστη και συνεχής, ενώ υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα για παρουσία φυτού ή για αναγέννηση της μικροβιακής κοινότητας (recovery) με την πάροδο του χρόνου λόγω εξωγενούς αποικισμού. Επιπροσθέτως, ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για την αξιολόγηση των επιδράσεων Φ.Π. βοτανικής προέλευσης στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Κατά συνέπεια η παρούσα εργασία κατέχει την πρωτοτυπία ότι μελέτησε 1) τις επιδράσεις των Φ.Π. σε συνθήκες εργαστηρίου και αγρού, ώστε να έχει σαφή και ρεαλιστική εικόνα των επιδράσεων σε επίπεδο μικροβιακής κοινότητας και 2) αξιολόγησε τις επιδράσεις Φ.Π. βοτανικής προέλευσης, που θεωρούνται γενικά χαμηλής τοξικότητας, στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

Έπειτα από ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δύο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

α) Για το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες

- Τα Φ.Π βοτανικής προέλευσης (Quillajia, Azadirachtin) δεν προκάλεσαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα σε σχέση με τον μάρτυρα.
- Το καπνιστικό metham sodium προκάλεσε σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η εφαρμογή του καπνιστικού μείωσε σημαντικά την συγκέντρωση των μικροβιακών PLFAs στο έδαφος. Από την άλλη μεριά η εφαρμογή του προκάλεσε

σημαντική μείωση των μυκήτων και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που χαρακτηρίζονται από τα λιπαρά οξέα 18:1ω9*cis/trans* (*Pseudomonas* sp.), ενώ αντίθετα ευνοήσε την επικράτηση θετικών κατά Gram βακτηρίων. Οι επιδράσεις του metham sodium στην μικροβιακή κοινότητα εξασθένησαν 60 ημέρες μετά την εφαρμογή.

- Η εφαρμογή αλεσμένου-ξηρού καρπού από το φυτό *Melia azadirachta*, που παρουσιάζει εντομοκτόνο-νηματωδοκτόνο δράση προκάλεσε σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η εφαρμογή του προκάλεσε σημαντική αύξηση των ολικών μικροβιακών PLFAs του εδάφους. Σε αντίθεση με το metham sodium η ποιοτική διαφοροποίηση της μικροβιακής κοινότητας που προκλήθηκε από την εφαρμογή της *Melia*, οφείλεται στην σημαντική αύξηση των μυκήτων και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που ευνοούνται σε συνθήκες περίσσειας οργανικής ουσίας και λοιπών θρεπτικών στοιχείων που παρέχονται από τον αλεσμένο καρπό του φυτού *Melia*.
- Το οργανοφωσφορικό fosphiazate προκάλεσε μικρή μείωση των μικροβιακών PLFAs στο έδαφος χωρίς όμως οι μεταβολές αυτές να αντικατοπτρίζονται σε ποιοτικές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.

B) Για το πείραμα αγρού:

- Τα Φ.Π. βιολογικής προέλευσης (*Quillajia*, *Azadirachtin*) δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους σε σχέση με τον μάρτυρα.
- Τα καπνιστικά metham sodium και enzone προκάλεσαν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που ήταν περισσότερο έντονες για το πρώτο παρά για το δεύτερο. Οι ποιοτικές μεταβολές που προκάλεσε το metham sodium στη μικροβιακή κοινότητα ήταν ανάλογες αυτών που καταγράφηκαν στο πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

- Οι μεταβολές που προκάλεσε το metham sodium στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους διατηρήθηκαν για τουλάχιστον 90 ημέρες σε αντίθεση με το πείραμα υπό ελεγχόμενες συνθήκες, όπου στις 60 ημέρες οι διαφοροποιήσεις δεν ήταν τόσο εμφανής
- Το οργανοφωσφορικό fosthiazate προκάλεσε μια μικρή ποσοτική και ποιοτική μεταβολή στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μετά τον πρώτο μήνα του πειράματος.

Συνολικά τα αποτελέσματα από τα δύο πειράματα βρίσκονται σε συμφωνία μεταξύ τους και δείχνουν ξεκάθαρα ότι τα Φ.Π. βοτανικής προέλευσης δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους σε αντίθεση με τα καπνιστικά όπως το metham sodium που προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα, ενώ το οργανοφωσφορικό .fosthiazate προκαλεί μικρές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους που δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επιδράσεις των καπνιστικών Φ.Π.

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Με βάσει τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μελλοντικά πειράματα θα πρέπει να επικεντρωθούν στη μελέτη:

- της επίδρασης κάποιων επιπλέον Φ.Π. βοτανικής προέλευσης (π.χ. *srinosad*) στη μικροβιακή κοινότητα σε επίπεδο αγρού και υπό ελεγχόμενες συνθήκες, καθώς επεκτείνεται η χρήση τους στη βιολογική γεωργία διότι θεωρούνται χαμηλής τοξικότητας και επιπλέον η επίδραση τους έχει μελετηθεί ελάχιστα
- της επίδρασης του εκχυλισμάτων από το φυτό *Melia azadirachta*, η εφαρμογή αλεσμένου-ξηραμένου σπόρου του οποίου που όπως αποδείχθηκε προκάλεσε σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η εφαρμογή εκχυλίσματος από το συγκεκριμένο φυτό μπορεί να μας παρέχει σαφέστερη εκτίμηση της επίδρασής του στη μικροβιακή κοινότητα, σε σύγκριση με τον αλεσμένο καρπό του
- επίδρασης των Φ.Π. σε συνδυασμό με την παρουσία φυτού, του οποίου η ανάπτυξη θα υπερβαίνει τις 60 ημέρες, ώστε να είναι επαρκέστερη η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.

SUMMARY

In this study the effects of the synthetic pesticides metham sodium (MS), sodium tetrathiocarbonate (SoTe) and the botanical pesticides azadirachtin, quillajia και *Melia azedarach* on the soil microbial community have been investigated. The application of pesticides took place in the field and in laboratory at the recommended doses. The same type of soil was used in both experiments. The phospholipids fatty acids were extracted through a solid phase (Solid Phase Extraction, SPE-Si) and Phospholipids fatty acid (PLFA) analysis has been used. The samples were elaborated and the volatile methyl esters have been identified and quantified with gas chromatography with a flame ion detector (FID). The recovery of PLFAs varied from 91 to 95,25%. Principal component analysis (PCA) of the results showed significant alterations.

As far as the laboratory, experiment was concerned the botanical pesticides (Quillajia, Azadirachtin) did not impose significant changes on the microbial community. The application of milled-dried fruits of *Melia azedarach* tree resulted in significant changes in the soil microbial community and specifically in the increase of fungi and Gram negative bacteria. This response was due to the release in the soil of large amounts of organic substrates and nutrients by the milled-dried fruits of *Melia*. The application of fumigant metham sodium caused a significant decrease in the microbial PLFAs concentration in the soil, as well as in the amount of fungi and Gram-negative bacteria. On the contrary, the Gram-positive bacteria were favored and dominated. The effect of metham sodium in microbial community weakened 60 days after the first day of application. The application of fosthiazate resulted in a minor decrease of microbial PLFAs.

In the field experiment botanical pesticides (Quillajia, Azadirachtin) caused no alteration in the microbial community compared to control samples, while metham sodium και Enzone caused significant changes in soil microbial community. The alterations remained for at least 90 days. The organophosphate fosthiazate resulted in a minor change of microbial community 30 days after application.

Overall, botanical pesticides, when applied at the recommended dose, did not show any effects on the structure of the soil microbial community, while fumigants showed significant effects at the recommended dose in the field.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abou-Fakhr Hammad E., McAuslane H. J., 2006. Effect of *Melia azedarach* L. extract on *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) and its biocontrol agent *eretmocerus rui* (Hymenoptera: Aphelinidae) *Environmental entomology*. 35, 740-745.

Ahmed Sohail, Muhammad Shakeel Ahmad, 2006. Effect of insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions. *Pak. Entomol.* 28, 63-68.

Aislabie J., and Lioyd-Jones G., 1995. A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research*. 33, 925-942.

Ajaz, M., N. Jabeen, S. Akhtar and S.A. Rasool, 2005. Chlorpyrifos resistant bacteria from pakistani soils: isolation, identification, resistance profile and growth kinetics. *Pak. J. Bot.* 37, 381-388.

Akol, A. M., Njagi, P. G. N., Sithanantham, S., and Mueke, J. M. 2003. Effects of two neem insecticide formulations on the attractiveness, acceptability and suitability of diamondback moth larvae to the parasitoid, *Diadegma mollipla* (Holmgren) (Hym., Ichneumonidae). *J. Appl. Entomol.* 127, 325–331.

Alexander M., 1985. Biodegradation of organic chemicals. *Environment Science and Technology*. 8, 106-111.

Amann RI., Stromley J., Deverereux R., Key R., Stahl D.A., 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducig bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 614-623.

Amirkhanov, D.V., A.G. Nikolenko, F.R. Bagautdinov and S.S. Kirillova, 1994. The effects of field doses of gamma-HCH, phoxim, cypermethrin and chlorfluazuron on soil microorganisms. *Agrokhimiya*, 2: 83-88.

Anderson JPE., 1987. Handling and storage of soils for pesticide experiments, in *Pesticides Effects on the Soil Microflora*, ed by Somerville L and Greaves MP, Taylor Francis, Philadelphia, USA, 45-60

Antonius G.F., 2003. Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity. *Journal of Environmental Science and Health B.*, 38, 479-488

Arnolds, E., 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agric. Ecosyst. Environ.* 35, 209–244.

Ascher, K. R. S., Schmutterer, H., Zebitz, C. P. W., and Naqvi, S. N. H. 1995. The Persian lilac or chinaberry tree: *Melia azedarach* L., 605–642, in H. Schmutterer (ed.). *The Neem Tree: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Baath E. and Anderson T.H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 955-963.

Balestra G.M and Misaghi I.J., 1997. Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 30, 111-117.

Banchio E., G. Valladares , M. Defago, S. Palacios, C. Carpinella, 2003. Effects of *Melia azedarach*, (Meliaceae) fruit extracts on the leafminer *Liriomyza huidobrensis*, (Diptera, Agromyzidae): Assessment in laboratory and field experiments. 143, 187 – 193.

Bardgett R.D., McAlister E., 1999. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils* , 29, 282-290

Bending G.D., Rodriguez-Cruz, M.S., Lincoln S.D., 2007. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69, 82-88.

Bhat Rana, Basanta and Yubak, Dhoj G.C., 2005. Effect of *Melia azedarach* on aphid (*Brevicorinae brassicae*) of organic cabbage farming. Paper presented at Researching Sustainable Systems - International Scientific Conference on Organic Agriculture, Adelaide, Australia. 21-23.

Binner, R., K.H. Berendes, D. Felgentreu, H. Friesland and M. Glitschka, 1999. Cypermethrin in bark and coniferous forest soil after pesticide treatment of single specimen of barked round wood in forests: persistence, distribution of diastereomers and effects on soil microorganisms. *Nachrichtenblatt-des Deutschen- Pflanzenschutzdienstes*. 51, 227-237.

Bollag J.M. and Liu S.Y., 1990a. Biodegradation of 2,4 D herbicide as affected by its adsorption-desorption behaviour and microbial activity of soils. *Australian Journal of Soil*

Bollag J.M. and Liu S.Y., 1990b. Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment : processes, impacts and modeling*. Soil Science Society of America. 169-261.

Bollen G.J., 1979 . Side effects of pesticides on microbial interactions (In: *Soil-Borne Plant Pathogens*, Eds: B. Schippers, W. Gams) . Academic Press, New York, 451.481.

Borneman J., 1999. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3398–3400.

Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N, Graham K.J., 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*. 36, 1-12

Boucard K. T., Parry J., Jones K., Semple T.K., 2003. Effects of organophosphate and synthetic pyrethroid sheep dip formulation on protozoan and bacterial survival. *Microbiological Ecology*. 47, 121-127

Boucard K. T., McNeil C., Bardgett D.R., Paynter D.C., Semple T. K., 2007. The impact of synthetic pyrethroid and organophosphate sheep dip formulations on microbial activity in soil. *Environmental Pollution*. 153, 207-214

Brinkhoff T., Muyzer G., 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3789-3796.

Burns R.G., 1976. Microbial control of pesticide persistence in soil. *The Persistence of Insecticides and Herbicides*. British Crop Protection Council Publications, 229-239.

Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J., Powers R.F. 2001 . Glyphosate toxicity and effects of long-term vegetation control on soil microbial communities . *Soil Biol. Biochem.* 33, 1777-1789.

Button, D.K.,1985. Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. *Microb.Rev.* 49, 270-297

Callaway R.M., Thelen G.C., Rodriguez A., Holben W.E., 2004. Soil biota and exotic plant invasion. *Nature*. 427, 731-733

Carreiro, M.M., Sinsabaugh, R.L., Repert, D.A., Parkhurst, D.F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81, 2359–2365.

Carter M.R., 2000. Herbicide movement in soil: particles, pathways and processes. *Weed research*. 40, 113-301.

Cavigelli, M.A., Robertson, G.P., 2000. The functional significance of denitrified community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81, 1402–1414.

Chen S.-K., Edwards C.A., Subler S. 2001. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth *Appl. Soil Ecol.* 18, 69-82.

Chinalia F.A., K.S. Killham, 1996. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid biodegradation in river sediments of Northeast-Scotland and its effect on microbial communities, *Chemosphere*

Clapperton M.J., Chan K.Y. & Larney F. J., 2003. Managing the soil habitat for enhanced biological fertility. *Soil Biological Fertility: a key to Sustainable Land Use in Agriculture*. 203-224

Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L. and Kitts, C.L., 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*. 31, 135-142

Corden M.E., and Young R.A., 1965. Changes in soil microflora following fungicide treatments. *Soil Science*. 99, 272-277

Coventry E. and Allan E.J., 2001. Microbiological and chemical analysis of Neem extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica* 29

Cycon. M., Kaczynska A. 2004. Effects of selected pesticides on soil microbial activity in nitrogen and carbon transformation . *Pesticides*, 113-120.

Cycon. M. 2006 . Ocena ekotoksykologiczna pestycydow na podstawie analizy mikrobiologicznej [Ecotoxicological evaluation of pesticides on the basis of microbial analysis] Praca doktorska [PhD thesis], .I.ska Akademia Medyczna [Medical University of Silesia], Katowice. (in Polish)

Cycon Mariusz and Piotrowska-Seget Zofia, 2007. Effect of selected pesticides on soil microflora involved in organic matter and nitrogen transformations: pot experiment. *Journal of Ecology*. 552, 207-220

Das A.C., Mukherjee D. 1994 . Effect of insecticides on the availability of nutrients, nitrogen fixation, and phosphate solubility in the rhizosphere soil of rice . *Biol. Fertil. Soils*, 18, 37-41.

Das, A.C. and D. Mukherjee, 1998. Insecticidal effects on soil microorganisms and their biochemical processes related to soil fertility. *World J. Microbio.*, 14, 903-906.

Das A.C., Mukherjee D. 2000 . Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients . *Appl. Soil Ecol.* 14, 55-62.

Das A.C., Chakravarty A., Sen G., Sukul P., Mukherjee D. 2005 . A comparative study on the dissipation and microbial metabolism of organophosphate and

carbamate insecticides in orchaqualf and fluvaquent soils of West Bengal .
Chemosphere, 58, 579-584.

Devare M.H., Jones CM., Thies J.E., 2004. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community : biomass, activity and diversity. Journal of Environmental Quality 33, 837-843.

Di Primo, P., Gamliel, A., Austerweil, M., Peretz-Alon, I., Beniches, M., Steiner, B., Katan, J., 2001. Evidence for accelerated degradation of metham-sodium and dazomet in Israel *Proceedings of the Annual International Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*, November 5-9, San Diego, CA, USA:88.

Dighton, J., Jansen, A., 1991. Atmospheric pollutants and ectomycorrhizas: more questions than answers. Environ. Poll. 73, 179–204.

Doelman P., Vonk J.W. 1994. Soil microorganisms of global importance to consider ecotoxicology in an economical and ecological way (In: Ecotoxicology of Soil Organisms, Eds: T. La Pint, P.W. Greigh-Smith) . CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 91-104.

Donner G, Schwarz K, Hoppe H-G and Muyzer G., 1996. Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. Archives of Hydrobiology. Special Issues Advanced Limnology .48, 7-14

Doran J.W., Zeiss M. R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Appl. Soil Ecol. 15, 3-11.

Dordevic, S., M. Sestovic, V. Raicevic and A. Dordevic, 1998. Fluctuation of the abundance of microorganisms in the carbofuran treated soil. Pest. 13, 281-288.

Dungan R.S., Ibekwe A.M., Yates S.R., 2003. Effect of propargyl bromide and 1,3-dichloropropene on microbial communities in an organically amended soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 75-87.

Dýgrak, M. and S. Ozcelik, 1998. Effect of some pesticides on soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 916-922.

Edwards C.A., Bater J.E. 1990. An evaluation of laboratory and field studies for assessment of the environmental effects of pesticides. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases*, 963-968.

Edwards C.A., Subler S., Chen S.-K., Bogomolov D.M. 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems (In: *New Approaches to the Development of Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Eds: N.M. van Straalen, D.A. Krivolutskii) . Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-18.

Egerton-Warburton, L.M., Allen, E.B., 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol. Monogr.* 10, 484–496.

El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* .65, 982– 988.

El Hadiri N., Ammati M., Ghgoura M., Mounir K., 2003. Behavior of 1,3-dichloropropene and methyl isothiocyanate in undisturbed soil columns. *Chemosphere* 52, 893–899

Elbani A.A. Gamal, Dong Woon Lee, Jung Chan Park, Hwang Yu, Ho Yul Choo, Sang Myeong Lee & Tae Heon Lim, 2008. Nematocidal Screening of

Essential Oils and Herbal Extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathology*. 24, 178-182

Ellis, R.J., Thompson, I.P., Bailey, M.J., 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 16, 9 –18

Environmental Protection Agency 2003. Pesticides, Minimal risk tolerance exemptions.40 CFR Part 180. *Federal Register* 68, 73, 18550-18553

EU, 2002. Review report for active substance fothiazate; Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission Document Reference. SCP/Fosthiaz/002- Final scientific Committee on Plants.

EU, 2003. Review report for active substance fothiazate; Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission Document Reference Sanco/10199/2003, Brussels, Belgium

Fauci, M.F., Dick, R.P., 1994. Soil microbial dynamics: short- and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. *Soil Science. Soc. Am. J.* 58, 801-806.

Federle T.W., 1986. Microbial distribution in soil-new techniques. In F. Megusar and M. Gantar (ed)., *Perspectives in microbial ecology*. Slovene Society for Microbiology., International Symposium on Microbial Ecology IV. . 493-498

Findlay R.H., 2004. Determination of microbial community structure using phospholipids fatty acid profiles. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition, 983-1004.

Fisher, M.M., and Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* .65, 4630–4636.

Fostegaard A., Tunlid A., Baath E., 2005. The use of phospholipids fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 723-730

Fraser, D.G., Doran, J.W., Sahs, W.W., Lesoing, G.W., 1988. Soil microbial populations and activities under conventional and organic management. *J. Env. Qual.* 17, 585-590.

Frey S.D., Melissa Knorr, Jeri L. Parrent, Rodney T. Simpson, 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management.* 196, 159–171

Garland, J.L, Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology.* 57, 2351– 2359.

Geoffrey L. Zubay, William W. Parson and Dennis E. Vance. 1999. Αρχές Βιοχημείας.

Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., Ball, A.S., 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1800-1809.

Gomes NCM, Heuer H, Schonfeld J, Costa R., Mendonca-Hagler R., and Smalla K. ,2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232, 167-180

Gopal M., Alka Gupta, V. Arunachalam, S.P. Magu, 2007. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil micro.ora, enzyme and respiratory activities *Bioresource Technology* 98, 3154–3158

Goulder R., 1987. Evaluation of saturation approach to measurement of V_{max} for glucose mineralization by epilithic freshwater bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 4, 29-32

Grogan D. W., Cronan J. E., 1986. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *J. Bacteriol.* 166, 872-877.

Hole, D.G., Perkins, A.J., Wilson, J.D., Alexander, I.H., Grice, P.V., Evans, A.D., 2005. Does organic farming benefit biodiversity? *Biol. Conserv.* 122, 113-130.

Hoshino Y.T., Matsumoto N., 2007. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. *Soil Science and Plant Nutrition* 53, 40-55.

Huang Ruo Chun, Kenjiro Tadera, Fumio Yagi, Yuji Minami, Hiroaki Okamura, Tetsuo Iwagawa and Munehiro Nakatani, 1996. Limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry.* 43, 581-583

Ibekwe A. Mark, Sharon K. Papiernik, Jianying Gan Scott R. Yates, Ching-Hong Yang and David E. Crowley, 2001. Impact of Fumigants on Soil Microbial Communities. 67, 3245-3257

Ingham E.R., Horton K.A., 1987. Bacterial, fungal, and protozoan responses to chloroform fumigation in stored soil. *Soil Biol Biochem* 19, 545–550

Ingham, E.R., R. Griffiths, K. Cromack and J.A. Entry. 1991. Comparison of direct versus fumigation incubation microbial biomass estimates in ectomycorrhizal mat and non-mat soils. *Soil Biol. Biochem.* 23, 465-472.

Jana T.K., Debnath N.C., Basak R.K. 1998. Effect of insecticides on the composition of organic matter, ammonification and nitrification in a Fluventic Ustochrept . J. Int. Soc. Soil Sci. 46, 133-134.

Janssen B.H. 1984. A simple method for calculating decomposition and accumulation of 'young' soil organic matter. Plant and soil. 76, 297-304

Janssen B.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M. and Sait M., 2002. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology. 68, 2391-2396

Joergesen R.G., and Brookes P.C., 1990. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0,5 M K₂SO₄ soil extracts. Soil Biology and Biochemistry. 22, 1023-1027.

Johansen K., Jacobsen C.S., Torsvik V., 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils . a review . Biol. Fertil. Soils, 33, 443-453.

Jones A.L., Johnson D.B., Suett D.L. 1991. Effects of soil treatments with aldicarb, carbofuran and chlorfevinphos on the size and composition of microbial biomass. British Crop Protection Council Monograph No. 47, Pesticides in soils and Water. 75-82

Joseph S.J, Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A. & Janssen P.H., 2003. Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 69, 7210-7215.

Karpouzias D.G., Karanasios E., Menkisoglou-Spiroudi U., 2004. Evidence for the enhanced biodegradation of cadusafos in soils from potato monoculture areas of Greece, Chemosphere. 56, 549-559.

Karpouzas D.G., Pantelelis I., Menkissoglu-Spiroudi U., Golia E., Tsiropoulos N.G., 2007. Leaching of the organophosphorus nematicide fosthiazate. *Chemosphere*. 68, 1359-1364.

Katayama A., Funasaka K., Fujie K., 2001. Changes in the respiratory quinone profile of a soil treated with pesticides. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 454-459

Kaur A., Chaudhary A., Kaur A., Choudhary and Kaushik R., 2005. Phospholipid fatty acid- A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*. 89, 1103-1112.

Kennedy, A.C., Smith, K.L., 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170, 75-86.

Khan M., Sculion J. 2000. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environ. Pollut.* 110, 115-125.

Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H et al. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* 58, 169-188.

Klose Susanne, Veronica Acosta-Martinez, Husein A. Ajwa, 2005. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides . *Soil Biology & Biochemistry*

Kozdrój J., van Elsas J.D., 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extractions methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils* .31, 372–378

Konopka, A., Oliver Jr., L., Turco, R.F., 1998. The use of carbon source utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103–115.

Kookana R. S., Baskaran S., and Naidu R., 1998. Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review, *Australian Journal of Soil Research*. 36, 715-764.

Kördel W., Wahle U., Knoche H., and Hund K., 1995. Degradation capacities of chlorotoluron and simazine in subsoil horizons. *The Science of Total Environment*. 171, 43-50.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., 2001. Ammonia - Oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review in Microbiology* 55, 485-529

Kucharski J., Wyszowska J., 2004. Inter-relationship between number of microorganisms or spring barley yield and degree of soil contamination with copper. *Plant Soil and Environment*; 50, 243-249.

Kunk F., Rybarova J., 1983. Mineralization of carbon atoms of ¹⁴C-2,4-D side chain and degradation ability of bacteria in soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 141-144

Levanon D., 1993. Roles of Fungi and Bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 25, 1097-1105.

Liesac W., Weyland H., Stackebrandt E., 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*. 21, 191-198

Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R., Lovett, G.M., 2002a. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83, 104–115.

Lilleskov, E.A., Hobbie, E.A., Fahey, T.J., 2002b. Ectomycorrhizal fungal taxa differing in response to nitrogen deposition also differ in pure culture organic nitrogen use and natural abundance of nitrogen isotopes. *New Phytol.* 154, 219–231.

Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* .63, 4516-4522

Lynch J.M., Benedetti, A., Insam H., Nutti M.P., Smalla K., Torsvik V., et al., 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 40, 363-385.

Mabury S.A., 1998. Chemical Properties: Hydrolysis of Organophosphorus Pesticides, University of Toronto, Department of Chemistry, CHM 410F/IES 1410F.

Madigan M., Martinko J., Parker J., 2005. Brock. Μικροβιολογία των μικροοργανισμών.

Macalady J.L., M.E. Fuller, K.M. Scow, 1998. Effects of Metham Sodium Fumigation on Soil Microbial Activity and Community Structure.27, 54-63

Margni M., Rossier D., Crettaz P., Jolliet O. 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 379-392.

Martinez-Toledo M.Y., Salmeron Y., Rodelas B., Pozo C., Gonzalez-Lopez J. 1998. Effects of the fungicide Captan on some functional groups of soil microflora. *Appl. Soil Ecol.* 7, 245-255.

McCarthy, A.J., 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 145-163.

Mele P.M., and Carter M.R., 1996. Estimation of microbial biomass by ninhydrin-reactive N using liquid chloroform. *Canadian Journal of Soil Science* .76, 37-40

Monkiedje A., Ilori M.O., Spitteller M. 2002 . Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil . *Soil Biol. Biochem.* 34, 1939-1948.

Muller A.K., Rasmussen L.D., Sorensen S.J., 2001. Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiol Lett* .204, 49–53

Muyzer G., de Waal C., Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* 59, 695-700

Nasim, G., N. Ilyas and A. Shabbir, 2005. Study of effect of organic pesticides: Endosulfan and Bifenthrin on growth of some soil fungi *Mycopath.*, 3 (1&2): 27-31.

Nowak A., Zbie. I., Gawi.ska H., Hrebie. T. 1999 . The influence of some pyridine herbicides on microorganisms count and amount of microbial biomass in soil.. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. w Szczecinie*, 78, 243-252.

O'Donnell AG., Seasman M., Macrae A., Waite I., Davies J.T., 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil* 232, 135-145

O'Leary WM., Wilkinson S.G., 1988. Gram positive bacteria. In *Microbial Lipids* eds Ratledge C and Wilkinson SG., Academic Press, London, 1, 117-201

Ou Li-Tse, Thomas J.E., L.Hartwell Allen Jr., Joseph C. Vu, Donald W. Dickson, 2006. Effects of Application Methods of Metham Sodium and Plastic Covers on Horizon and Vertical Distridutions of Methyl Isothiocyanate in Bedded Field Plots. *Archivas of Environmental Contamination and Toxicology*. 51, 164-173.

Pantelelis, I. Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., and Tsiropoulos, N.G. 2006. Influence of soil physicochemical and biological properties on the degradation and adsorption of the nematicide fosthiazate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 228-237

Pander and Singh 2004. Total bacterial and fungal population after chlorpyriphos and quinalphos treatments in groundnut soil. 2, 197-205

Pascual J.A., Garcia C., Hernandez T., Moreno J.L., Ros M. 2000. Soil microbial activity as biomarker of degradation and remediation processes . *Soil Biol. Biochem.* 32, 1877-1883.

Peixoto, R. S., Coutinho, H. L., Madari, B., Machado, P., Rumjanek, N., Seldin, L., Elsas, J. D. V., Rosado, A. S. 2006. Bacterial community structure and soil aggregation as indicators of quality changes in a Brazilian Cerrado soil. *Soil & tillage research*. (*in press* -Available online).

Petersen S.O., Klug M., 1994. Effects of sieving, storage and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied Environment Microbiology*. 7, 2421

Peterson M., Baath E., 2003. Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 13-21.

Pietikainen J., Hiukka R., Fritze H., 2000. Does short term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes? *Soil Biol. Biochem.*, 32, 277-288.

Pimentel David, 2005. Environmental and economic costs of application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*. 7, 229-252

Piotrowska-Seget Z., Mroziak A., 2003. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. 12: 669-675.

Potthoffa Martin, Kerri L. Steenwerthb, Louise E. Jacksona, Rebecca E. Drenovsky, Kate M. Scowa, Rainer G. Joergensend, 2006. Soil microbial community composition as affected by restoration practices in California grassland, *Soil Biology & Biochemistry*. 38, 1851–1860

Powlson D.S., & Jenkinson D.S., 1981. A comparison of organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. *Journal of Agriculture Science, Cambridge* 97, 713-721.

Qin S., Gan J., Liu W., and Becker J.O., 2004. Degradation and adsorption of fosthiazate in soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 6239-6242

Raberg S., Nystrom M., Eros M., Plantman P., 2003. Impact of the herbicides 2,4-D and diuron on metabolism of coral *Porites cylindrical*. *Mar. Environ. Res.* 56, 503-514

Rache K.D., Coats J., 1998. Comparative biodegradation of organophosphorus insecticides in soil. Specificity of enhanced microbial biodegradation . J. Agric. Food Chem. 36, 193-199.

Rangaswamy, V. and K. Venkateswarlu, 1992. Degradation of selected insecticides, monochrotophos, quinalphos, cypermethrin and fenvalerate, by bacteria isolated from soil. Bull. Env. Contam. Toxic., 49, 797-804.

Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., and Richaume, A. 2000. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. FEMS Microbiology Ecology .31, 107–115.

Rasmussen L.D., Sorensen S.J., 2001. Effects of mercury contamination on the cultivable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. FEMS. Microb Ecol . 36, 1–9

Ratcliff Alice W., Matt D. Busse, Carol J. Shestak, 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. Applied Soil Ecology, 1-11

Ratledge C, Wilkinson SG., 1998. Microbial lipids, Academic press, Inc. New York, N.Y. vol 1.

Roberto A. Rodriguez Z Gary A. Toranzos, 2003. Stability of bacterial populations in tropical soil upon exposure to Lindane. Int Microbiol. 6, 253–258

Robleto, E.A., Borneman, J., and Triplett, E.W., 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. Applied and Environmental Microbiology .64, 5020–5022.

Rosado A.S., Countinho H.L.C., Aboim M.C.R., Franco N., Peixoto R.S., 2006. Bacterial community structure as indicator of quality changes in Brazilian soil: Integrating molecular based soil microbial diversity data into a soil quality analytical framework

Saeki M., Toyota K., 2004. Effect of bensulfuron methyl (a sulfonylurea herbicide) on the soil bacterial community of a paddy soil microcosm. *Biology and Fertility of soils*,40, 110-118.

Saffina P.G., Powlson D. S., Brookes P.C. & Thomas G.A., 1989. Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter and soil microbial biomass in an Australian vertisol. *Soil Biology and Biochemistry*. 21, 759-765.

Sait M., Hugenholtz P. & Janssen H.P., 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivationindependent surveys. *Environmental Microbiology*. 4, 654-666

Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R., 2002. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1309–1315.

San Martin Ricardo and Magunacelaya Juan Carlos, 2005. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology*. 7, 577-585

Seghers D., Verthe K., Reheul D., Bulce R., Siciliano S.D., Verstraete W., Top E.M. 2003. Effect of long term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil.

Seghers D., Siciliano S.D., Top E.M., Verstraete W., 2005. Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and

performance of the soil methanotrophic community. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 187-193

Senesi N., and Chem Y., 1989. Interaction of Toxic Organic Chemicals with Humic Substances in Toxic organic chemicals in Porous Media, *Ecologica Studies* 73.

Siciliano S., Germida J., 1998. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 410-415

Silva C.M.M.S., Vieira R.F., Nicolella G. 2003. Paclobutrazol effects on soil microorganisms . *Appl. Soil Ecol.* 22, 79.86.

Sinsabaugh, R.L., Carreiro, M.M., Repert, D.A., 2002. Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry*. 60, 1–24.

Smelt, J. H., S. J. H. Crum and W. Teunissen, 1989. Accelerated transformation of the fumigant methyl isothiocyanate in soil after repeated application of methamsodium.
J. Environ. Sci. Health, B24, 437-455.

Smith L.J., Papendick R.I. 1993. Soil organic matter dynamics and crop residue management (In: *Soil Microbial Ecology*, Ed. B. Metling) . Marcel Dekker, New York.

Smith M.D., Hartnett D.C., Rice C.W. 2000. Effects of long-term applications on microbial properties in tallgrass prairie soil. *Soil Biol. Biochem.* 32: 935-946.

Stark C., L.M. Condrón, A. Stewart, H.J. Di, M. O'Callaghan, 2006. Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes.

Stevenson F.J., 1982. Nitrogen-Organic forms. In methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 10. America Society of Agronomy Madison. Wisconsin USA. 625-641.

Stockdale E. A. And Brookes P. C. 2006. Detection and quantification of the soil microbial biomass-impacts on the management of agricultural soils. Journal of Agricultural Science. 144, 285-302

Taiwo L.B., Oso B.A. 1997. The influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P release under laboratory conditions . Agric. Ecosyst. Environ. 65, 59-68

Taylor G., Jr., K.B. Schaller, Geddes J.D., Gustin M.S., Lorson G.B. and Miller G.C., 1996. Microbial ecology, toxicology and chemical fate of methyl isothiocyanate in riparian soils from the upper Sacramento River. Environ. Toxicol. Chem. 15, 1694-1701

Tomson D.G., Chartraud D.T., Kreutzweiser D.P., 2004. Fate and effects of azadirachtin in aquatic mesocosms- 1: fate in water and bottom sediments. Ecotoxicology and Environmental Safety. 59, 186-193.

Topp E., Vallaeyts T., Soulas G., 1997. Pesticides: Microbial Degradation and effects on Microorganisms, Modern Soil Microbiology, Marcel Dekker Inc., Chapter 19

Torsvik V., Daae, F.L., Sandaa R.-A., Ovreas L., 1998. Review article: novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology 64, 53-62

Treseder, K.K., Allen, M.F., 2000. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. New Phytol. 147, 189–200.

Van Elsas J.D., Duarte G.E., Rosado A.S., Smalla K. 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods*. 32,133–54

Van Elsas, J.D., Frois-Duarte, G., Keijzer-Wolters, A., Smit, E., 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 43, 133–151.

Van Zweiten L., 2006. Impact of agricultural Inputs on soil organisms. *Australian Journal of Soil Research*

Vega D., Cambon J.P., and Bastide J., 2000. Triflurosulfuron-methyl in water and soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 3733-3737.

Vyas S.C. 1988. Soil microorganisms and their activities. *Nontarget Effects of Agricultural Fungicides* . CRC Press, FL, Boca Raton, 258-275.

Walker A., 1991. Influence of soil and weather factors on the persistence of soil-applied herbicides. *Applied Plant Science*. 5, 94-98.

Walker A., 1994. Herbicide behavior in Mediterranean climates. *Proceedings 5th EWRS Mediterranean Symposium “Weed control in sustainable agriculture in the Mediterranean area”*, Perugia, Italy. 211-221.

Wan M.T. & Rae J.E., 1998. Impact of azadirachtin on *Glomus intraradices* and vesicular-arbuscular mycorrhiza in root inducing transferred DNA transformed roots of *Daucus carota*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2041-2050.

Wang, MC., Ye-Hao Liu YH, Wang, Q Gongga M, Hua XM, Panga YJ, Huc S, Yanga YH, 2008. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 778-788.

Wardle D.A., Yeates G.W., Nicholson K.S., Bonner K.I. & Watson R.N., 1999. Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural infestation over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*. 31, 1707-1720

Warton B. & Matthiessen J.N., Shackleton M.A., 2003. Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. 35, 1123-1127

Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B.H.J., Kloskowski R., Tanaka K., Rubin B., Katayama A., Kordel W., Gerstl Z., Lane M., and Unsworth J.B., 2002. Review Pesticide soil sorption parameters : theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*. 58, 419-445.

Weber J.B., Wilkerson G.G., Linker H.M., Wilcut J.W., Leidy R.B., Seneman S., Witt W.W., Barrett M., Vencill W.K., Shaw D.R., Mueller T.C., Miller D.K., Breeke B.J., Talbert R.E., and Peeper T., 2000. A proposal to standardize soil/solution herbicide distribution coefficients. *Weed science*. 48, 75-88.

White, D. C., and R. H. Findlay. 1988. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms. *Hydrobiologia* .159, 119–132

Wolfe N.L., Mingelgrin U. and Miller G.C., 1990. Abiotic transformations in water, sediments and soil. *Pesticides in the Soil Environment*, Soil Science Society of America, 103-168.

Yayasinghe B.A.T.D and Parkinson D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology* 38, 109-118

Zelles, L. 1996. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides. *In* F. Schinner et al. (ed.) *Methods of soil biology*. Springer, Berlin. 80-92

Zelles L., A. Palojarvi, E. Kandeler, M. Von Lutzow, K. Winter, Q. Y. Bai, 1997. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. 29, 1325-1336

Zelles L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of soils* .29, 111-129

Zheng S.Q., and Copper J.F., 1996. Absorption, desorption and degradation of three pesticides in different soils. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*. 30, 15-20.

Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Tiedje J.M., 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 326–334

Βασιλειάδου Δ., 1996. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις στη Γενική Μικροβιολογία.

Διαμαντίδης Γ., 1994. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. University Studio Press.

Διαμαντίδης Γ., 2006. Βιοχημική Ανάλυση: Θεωρία & Τεχνικές