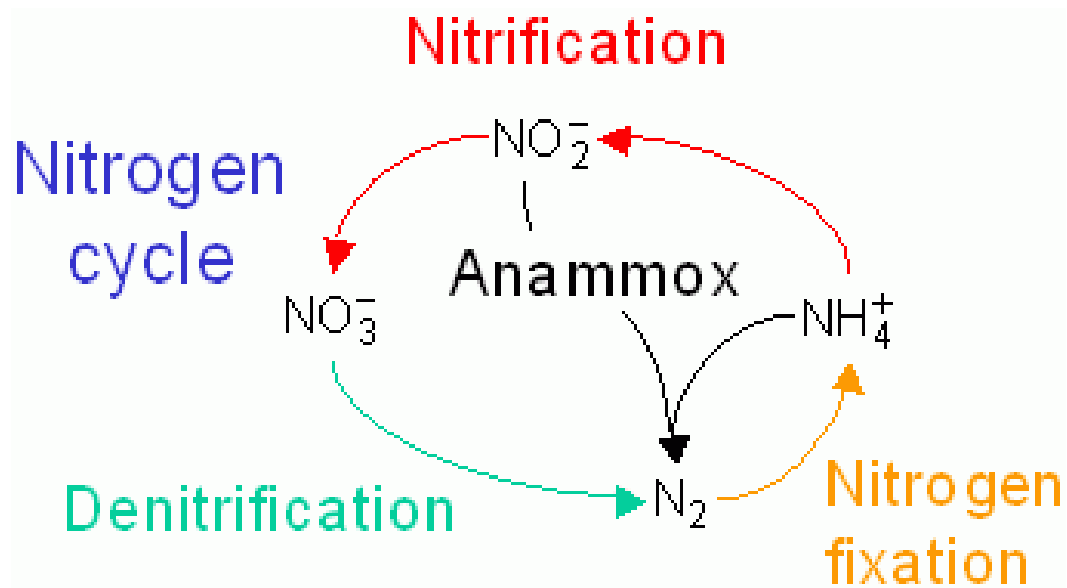


# Εργαστηριακές Ασκήσεις

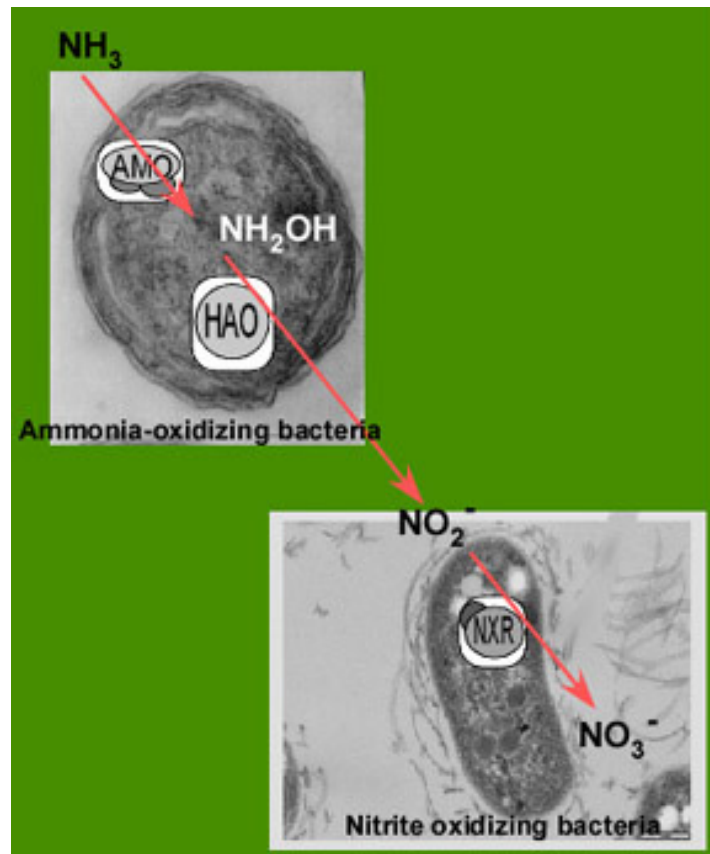
## Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας



Δημήτριος Καρούζας  
Λάρισα 2013

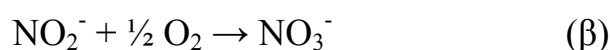
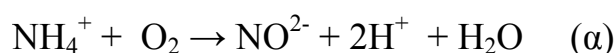
## Εργαστηριακή Άσκηση 5

Προσδιορισμός του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης στο έδαφος



## Εισαγωγικά στοιχεία

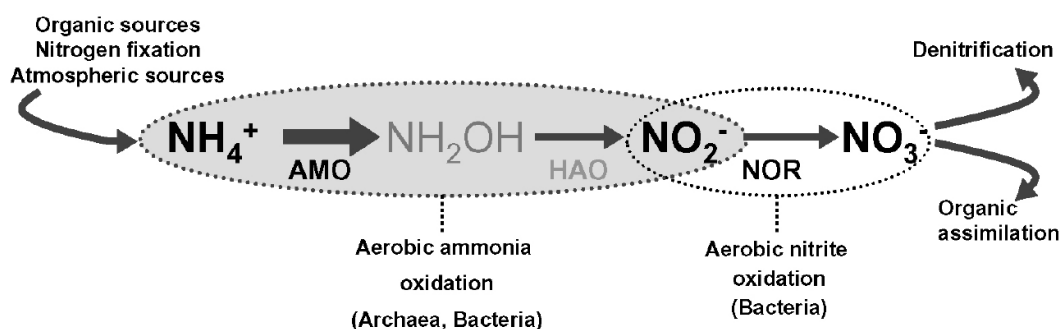
Η **νιτροποίηση** αποτελεί την διαδικασία μετατροπής της  $\text{NH}_3$  ( $\text{NH}_4^+$ ) προς νιτρικά ιόντα. Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο βήματα: α) **Νιτρωδοποίηση** που περιλαμβάνει την μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα και β) **Νιτρικοποίηση** που περιλαμβάνει την μετατροπή των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα. Μεταξύ των δύο αυτών βημάτων η νιτρωδοποίηση αποτελεί το πιο σημαντικό και ρυθμο-καθοριστικό βήμα για την ολοκλήρωση της νιτροποίησης αλλά ακόμη και για τον κύκλο του N συνολικά.



**Εικόνα 1.** Τα δύο επιμέρους βήματα της νιτροποίησης (α) Νιτρωδοποίηση και (β) Νιτρικοποίηση που πραγματοποιούνται από διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών του εδάφους

Η νιτρωδοποίηση πραγματοποιείται και αυτή σε δύο βήματα: α<sub>1</sub>) Η μετατροπή της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη που ελέγχεται από το ένζυμο μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) και α<sub>2</sub>) η μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη που ελέγχεται από το ένζυμο οξειδοοδουκτάσης της υδροξυλαμίνης (HAO) (Εικόνα 2). Μέχρι το 2004 υπήρχε η θεώρηση ότι η νιτρωδοποίηση στο έδαφος πραγματοποιείται αποκλειστικά από χημειωτότροφα βακτήρια και ειδικότερα β-πρωτεοβακτήρια του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrospira* (Kowalchuk and Stephen, 2001). Το 2006 με μια πρωτοποριακή εργασία ο Leininger και οι συνεργάτες του παρουσίασαν ότι μεσόφιλα αρχαία κατέχουν τον ενζυμικό οπλισμό για να οξειδώνουν την αμμωνία και μάλιστα κυριαρχούσαν σε πληθυσμό των αντίστοιχων νιτρωδοποιητικών (Leininger et al. 2006) βακτηρίων στα περισσότερα εδάφη. Ακόλουθες μελέτες επιβεβαίωσαν την σημαντική συμμετοχή των αρχαίων στην νιτρωδοποίηση στο έδαφος (Prosser and Nicol 2008, Gubry-Rangin et al., 2010, Zhang et al. 2010) και ειδικότερα την κυριαρχία τους έναντι των βακτηρίων στα όξινα εδάφη (Nicol et al. 2008, Prosser and Nicol 2012). Τα μεσόφιλα νιτρωδοποιητικά αρχαία τοποθετήθηκαν σε ένα νέο φύλλο που ονομάστηκε *Thaumarcheota* και φαίνεται ότι κατέχουν το ένζυμο AMO αλλά όχι το HAO κάτι που δείχνει ότι έχουν κάποιον άλλο μηχανισμό για την περαιτέρω

οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδη (Schleper and Nicol, 2010). Επιπλέον φαίνεται ότι δεν είναι αποκλειστικά αυτότροφα αλλά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μικτότροφων μικροοργανισμών (Tourna et al. 2011), σε αντίθεση με τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια που αποτελούν χημειοαυτότροφους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιούν την νιτρωδοποίηση ως πηγή ενέργειας για την αύξησή τους.



**Εικόνα 2.** Η διαδικασία της νιτρωδοποίησης (γκρι πλαίσιο) που πραγματοποιείται σε δύο βήματα από βακτήρια και αρχαία και την οποία ελέγχουν δύο ένζυμα, τα AMO και HAO. Ακολούθως τα νιτρώδη ιόντα που παράγονται οξειδώνονται ταχύτατα προς νιτρικά από τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια.

Η δυνητική νιτροποίηση αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού του ρυθμού νιτροποίησης στο έδαφος. Ειδικότερα ως ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης (potential nitrification rate) αναφέρεται ο μέγιστος ρυθμός μετατροπής των κατιόντων αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ) ή της αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) σε νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) ιόντα που συμβαίνει υπό συνθήκες κορεσμού όσον αφορά την παροχή υποστρώματος ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) (Hart et al., 1994). Ο υπολογισμός του ρυθμού της δυνητικής νιτροποίησης βασίζεται στη ρυθμό-καθοριστική (rate-limiting) αντίδραση της οξείδωσης της αμμωνίας. Συγκεκριμένα, δείγμα εδάφους επωάζεται με περίσσεια αμμωνιακού υποστρώματος και υποχλωριούχων αλάτων που χρησιμεύουν για την παρεμπόδιση της περαιτέρω οξείδωσης των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα. Έπειτα από επώαση μερικών ωρών ο ρυθμός οξείδωσης της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα υπολογίζεται φωτομετρικά ή με αέρια χρωματογραφία.

Τα νιτρώδη ιόντα χρησιμοποιούνται ως τελικό σημείο αναφοράς αν και αποτελούν ουσιαστικά ενδιάμεσο προϊόν της νιτροποίησης και απαντώνται μόνο σε τεχνικές που εμπεριέχουν αιώρηση και σε ασβεστολιθικά εδάφη. Η δυνητική νιτροποίηση αντανάκλα το μέγεθος του πληθυσμού των αυτότροφων νιτρωδοποιητικών οργανισμών για τους οποίους η αμμωνία είναι απαραίτητο

υπόστρωμα και χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη των τοξικών επιδράσεων βαρέων μετάλλων, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και γ.φ στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους (Smolders et al. 2001, Maliszewska-Kordybach et al., 2007, Wessen and Hallin 2011). Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της Kandeler (1995).

### **Αντιδραστήρια**

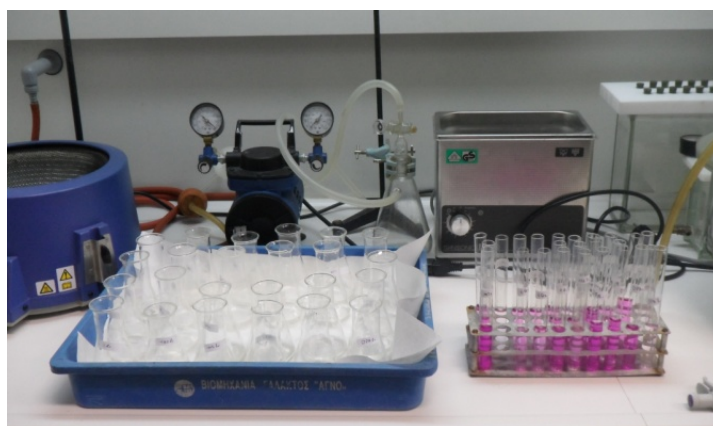
- Διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10mM.
- Διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM.
- Διάλυμα  $\text{NaClO}_3$  1.5M.
- Διάλυμα  $\text{KCl}$  2M.
- Ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.19M, pH 8.5.
- Χρωματικός δείκτης αποτελούμενος από σουλφανιλαμίδα και N-(1- ναφθυλ)-αιθυλενο-διάμινο υδροχλώριο.
- Πυκνό διάλυμα  $\text{NaNO}_2$  ( $1000\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ ).
- Διάλυμα εργασίας  $\text{NaNO}_2$  ( $10\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ ).

### **Πειραματική διαδικασία**

Για επιτάχυνση της διαδικασίας τα βήματα 1 και 2 έχουν ήδη πραγματοποιηθεί από το εργαστηριακό προσωπικό και η εργαστηριακή άσκηση θα ξεκινήσει από το βήμα 3 ως και την ολοκλήρωση της.

1. 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε  $\text{NO}_2^-$  από τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και 0.1ml  $\text{NaClO}_3$  1.5M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξείδωσης των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτροδών ( $\text{NO}_2^-$ ) αντί νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντων και ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος.
2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους  $20^\circ\text{C}$  για 6 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα-μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους  $-20^\circ\text{C}$ , με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτροδοποίησης.

3. Μετά το πέρας των 6 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά προστίθενται 5 ml διαλύματος KCl 2M για τη δέσμευση των ιόντων  $NH_4^+$  και  $NO_3^-$ , και ακολουθεί σύντομη ανάδευση και διήθηση (Εικόνα 3).
4. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $NH_4Cl$  0.19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα  $NO_2^-$  που έχουν παραχθεί και με τη φωτομέτρηση καταδεικνύει την συγκέντρωσή τους στα διαλύματα.
5. Ακολούθησε ανάδευση και ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος.
6. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 5 ml αποσταγμένο νερό με 3 ml  $NH_4Cl$  0.19M και 2 ml χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520nm.



**Εικόνα 3.** Φωτογραφία από την διαδικασία προσδιορισμού του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης όπου φαίνονται τα διηθήματα που είναι έτοιμα προς φωτομέτρηση.

### **Ποσοτικός προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα εδαφικά δείγματα νιτωδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα  $\text{NaNO}_2$  διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 ml διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  ( $10\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ ), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος  $\text{KCl}$  2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml, με αποσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και 1.0  $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ . Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και 0.5  $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\text{-N ml}^{-1}$ ) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520nm (Kandeler, 1995).

## **Υπολογισμοί**



## Βιβλιογραφία

1. Gubry Rangin C, Nicol GW, Prosser JI 2010. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microb. Ecol.* 74:566-574.
2. Hart, S.C., Stark, J.M., Davidson, E.A., Firestone, M.K. (1994) Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties. Part 2.* SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI, pp. 985-1016
3. Kandeler, E. (1995) Potential nitrification. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology.* Springer-Verlag, Heidelberg, p. 426
4. Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 485–529.
5. Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C. and Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–809.
6. Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Smreczak, B. (2007) Ecotoxic effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *J Environ Qual* 36: 1635-1645
7. Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2008) Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* 10, 2931-2941
8. Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2012) Archaeal and bacterial ammonia-oxidizers in soil: the quest for niche specialization and differentiation. *Trends in Microbiology* 20: 523-531.
9. Nicol, G.W. et al. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10, 2966–2978
10. Smolders, E., Brans, K., Coppens, F., Merckx, R. (2001) Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2469-2474
11. Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Konneke, M., Schintlmeister A., et al. (2011) *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108, 8420-8425
12. Wessen E., Hallin, S., 2011. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers – Possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological Indicators* 11, 1696-1698
13. Zhang, L-M., Offre, P.R., He J-Z., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2010, Autotrophic ammonia oxidation by soil Thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17240-17245