

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΑΕΡΙΩΝ ΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ
ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ**

ΦΩΤΕΙΝΗ ΦΛΟΥΡΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υπόβληθηκε στην Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 1984

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΑΕΡΙΩΝ ΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ
ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ**

ΦΩΤΕΙΝΗ ΦΛΟΥΡΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στην Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 1984

**στη μνημη
του Θεοφιλου Φραγκοπουλου**

1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1.1 Εδάφη	27
2.1.2 Μέθοδοι αναλύσεων	28
α. Υγρασία.....	28
β. pH	28
γ. Ολικό άζωτο	28
δ. Οργανικός άνθρακας	29
2.1.3 Εκτίμηση του πληθυσμού των αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων	30
2.1.4 Καταμέτρηση αποικιών	31
2.1.5 Συνθήκες εμπλουτισμού εδαφικών δειγμάτων με τους αντίστοιχους υδρογονάνθρακες	31
2.1.6 Μέθοδος Rossi-Cholodny	31
2.1.7 Συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα <i>A. arthrobotryoides</i> ..	32
2.1.8. Τεχνική για την εκτίμηση της μυκόστασης	32
2.1.9 Εκτίμηση της παρεμποδιστικής δράσης διαφόρων παραγόντων στη βλάστηση των σπορίων του <i>A. arthrobotryoides</i>	33
2.1.10 Εκτίμηση του ποσοστού βλάστησης των σπορίων	34
2.1.11 Ποσοτική μέθοδος για τη δοκιμή της μυκόστασης του εδάφους	34
2.1.12 Έλεγχος για την παραγωγή ή κατανάλωση αναγωγικών ζαχάρων	34

2 1 13	Επίδραση pH και συγκέντρωση αμμωνιακών και νιτρωδών ιόντων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα <i>A. arthrobotryoides</i>	36
2 1 14	Στατιστική επεξεργασία και παρουσίαση των δεδομένων παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων του <i>A. arthrobotryoides</i>	36
2 2	Αποτελέσματα	39
2 2.1.	Χημικά χαρακτηριστικά των εδαφών	39
2.2.2.	Κατανομή των ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στη φύση	40
2 2.3	Σχέση πληθυσμού αιθυλενοτρόφων βακτηρίων με οργανική ουσία	41
2 2 4.	Επίδραση του χρόνου επώασης στον πληθυσμό των μεθανοτρόφων αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων	43
2.2 5.	Επίδραση των υδρογονανθράκων στην ανάπτυξη μυκήτων στο έδαφος όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Rossi-Cholodny	45
2.2.6.	Επίδραση των αερίων ακετυλενίου και αιθυλενίου στη βλάστηση των σπορίων του <i>A. arthrobotryoides</i>	46
2.2 7.	Επίδραση του χρόνου προεπώασης του εδάφους, υπό διάφορες συνθήκες, στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκώσεως	49
2 2 8	Επίδραση του αζώτου στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκώσεως σε εδαφικές συνθήκες	53
2 2.9	Ποσοτική εκτίμηση της μυκώσεως με τη μέθοδο των αραιώσεων	54
2 2 10	Δυνατότητα κατανάλωσης γλυκόζης από ένα ακετυλενότροφο βακτήριο παρουσία – απουσία ακετυλενίου	57
2 2 11.	Επίδραση της ακεταλδεϋδης στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα <i>A. arthrobotryoides</i>	58
2.2 12	Επίδραση αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα <i>A. arthrobotryoides</i> in vitro	59
2 2 13.	Μαθηματική ανάλυση της επιδράσεως αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα <i>A. arthrobotryoides</i>	67

3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	89
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	93
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	97
SUMMARY	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τον Ομότιμο Καθηγητή και δάσκαλό μου κ Β Κουγέα ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη προσφορά του

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας κ Κ Μπαλή εκφράζω τις πιο εγκάρδιες ευχαριστίες μου. Η συμμετοχή του σ' όλα τα στάδια αυτής μου της προσπάθειας υπήρξε καθοριστική

Ευχαριστώ πολύ τους λέκτορες κ Ν Μπεόπουλο και Κα Δ Δημοπούλου Λέκκα, καθώς επίσης και τους βοηθούς κ κ Λ Λουλούδη και Δ Δήμου για τη βοήθεια που μου παρείχαν. Επίσης τον παρασκευαστή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας κ Π Στέλιο για τη βοήθεια που προσέφερε σ' αυτό το διάστημα

Τους φίλους και συναδέλφους που με οποιοδήποτε τρόπο μου συμπαραστάθηκαν ευχαριστώ θερμά

Τέλος ευχαριστώ το Κοινωνοφελές Ίδρυμα «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΩΝΑΣΗΣ» για την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχε

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το έδαφος αποτελεί το φυσικό βιότοπο ενός τεράστιου και ετερόκλητου πλήθους μικρο- και μακρο-οργανισμών στη δράση των οποίων άλλωστε οφείλεται κατά μεγάλο μέρος η γένεση του εδάφους σαν φυσικού σχηματισμού

Μεταξύ των ανοργάνων συστατικών, τους φυτικούς και ζωικούς ιστούς και τα εκκρίματα της εδαφικής πανίδας, σε όλα τα στάδια της αποδόμησής τους, οι μικρο- και μακρο-οργανισμοί που ζουν στο έδαφος αποτελούν το «δρων» μέρος των συστατικών του εδάφους, και η αλληλουχία διαδοχής τους συνθέτει το «βιολογικό ιμάντα» της ανακύκλωσης της ύλης στον πλανήτη μας

Όπως και σ' οποιοδήποτε άλλο φυσικό οικοσύστημα, έτσι και στο έδαφος, τα έμβια όντα δεν ζουν μεμονωμένα, ανεξάρτητα το ένα από τ' άλλο. Απεναντίας, οι διάφοροι πληθυσμοί, όπως και τα άτομα μέσα στους πληθυσμούς αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον μέσω πολύπλοκων μηχανισμών, για πολλούς από τους οποίους μας διαφεύγουν ακόμα οι λεπτομέρειές τους. Η λειτουργία τους όμως οδηγεί στην επιλεκτική εγκατάσταση και επικράτηση στο έδαφος μιας αρκετά χαρακτηριστικής βιοκοινωνίας που προσδίδει στην ολότητα του εδάφους ιδιότητες φυσιολογικές λειτουργίες. Η εκδήλωσή τους μάλιστα διαγράφεται τόσο καλά ώστε έδωσε σε πολλούς μελετητές την ιδέα να παρομοιάζουν το έδαφος με «ζωντανό οργανισμό»

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του εδαφικού οικοσυστήματος, που μπορεί να θεωρηθεί καθοριστικό για τη μικροβιακή δραστηριότητα, είναι η ποικιλομορφία του εδαφικού περιβάλλοντος. Οι συνθήκες του οποίου μπορεί να παραλλάσσουν από σημείο σε σημείο. Η συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων, το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, το pH, η οσμωτική πίεση και το δυναμικό οξειδοαναγωγής, μεταβάλλονται σε επίπεδο μικροσκοπικών διαστάσεων και δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι σημαντικές διαφορές στο μέγεθος και στη σύνθεση του πληθυσμού παρατηρήθηκαν σε μικροθέσεις στο έδαφος

Διαπίστωση που πρέπει να υπάρχει κατά νου στην προσέγγιση, εφαρμογή μεθόδων, ανάλυση και εκτίμηση αποτελεσμάτων, όλων όσων ασχολούνται με τη μικροβιολογία του εδάφους

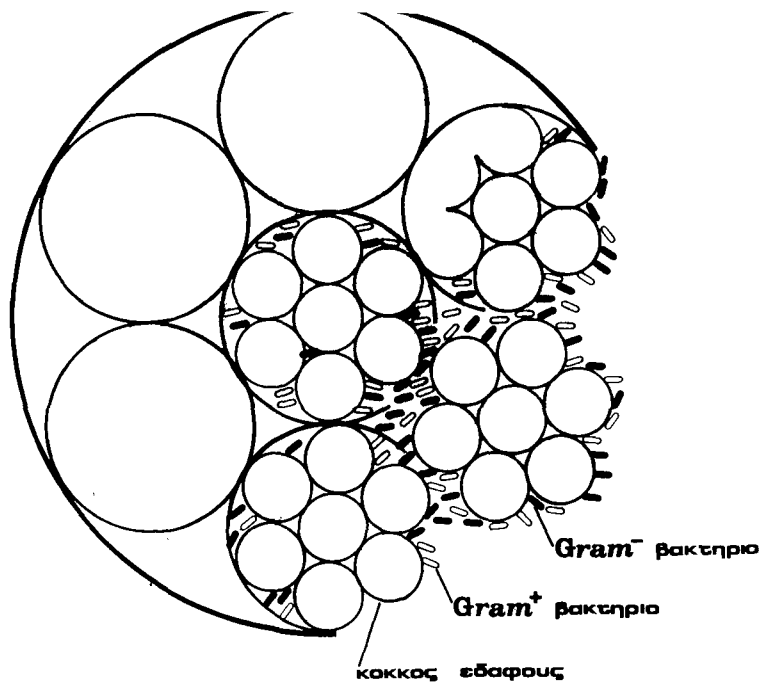
Λαμβάνοντας υπόψη τις διαφοροποιήσεις αυτές στο εδαφικό οικοσύστημα και το μέγεθος των υπό συζήτηση οργανισμών μπορούμε, χωρίς να είναι υπερβολή, να θεωρήσουμε ότι στο μικροπεριβάλλον μεταξύ των επιφανειών ενός κόκκου εδάφους και των κυττάρων των μικροοργανισμών, όπου οι συγκεντρώσεις των ιόντων είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες του περιβάλλοντος διαλύματος, υφίσταται ένα «μοριακό περιβάλλον» (McLaren A.D and J. Scujins 1968) στη δράση του οποίου οφείλεται η ύπαρξη του πλήθους των οικολογικών φωλεών των μικροοργανισμών του εδάφους. Οι εικόνες 1.1 και 1.2 θα μπορούσαμε να πούμε ότι απεικονίζουν σχηματικά τις έννοιες του μικροπεριβάλλοντος (εικ. 1.1) και του μοριακού περιβάλλοντος (εικ. 1.2).

Παρ' όλες αυτές τις ποικίλες επιδράσεις, όχι μόνο στο χώρο αλλά και στο χρόνο, στις οποίες εκτίθενται οι μικροοργανισμοί, το εδαφικό οικοσύστημα χαρακτηρίζεται από μια σταθερότητα αποτέλεσμα της δυναμικής του ισορροπίας. Μια ισορροπία στην οποία τα άτομα του συστήματος εναλλάσσονται σταθερά αναιρώντας τις μεταβολές των επιμέρους στοιχείων.

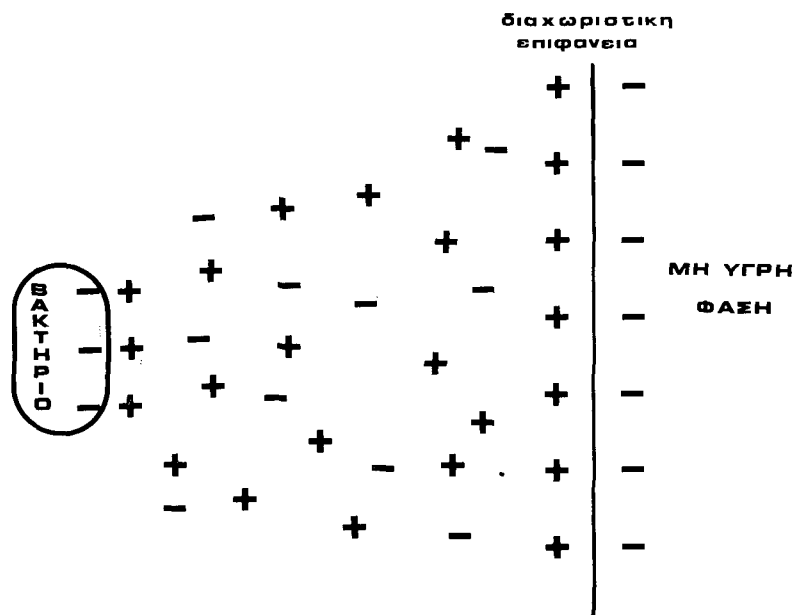
Το πλέον οικείο παράδειγμα είναι αυτό του κύκλου του αζώτου, όπου μετατροπές μεταξύ ελευθέρου ατμοσφαιρικού N_2 , νιτρικών, νιτρικών, πρωτεϊνών, αμμωνίας κλπ. λαμβάνουν χώρα ενώ συγχρόνως άζωτο χάνεται με έκπλυση, χρησιμοποίηση από τα φυτά, απομάκρυνση υπό αέρια μορφή ή προστίθεται με βιολογική ή μη βιολογική δέσμευση και παρά τις όλες αυτές αλλαγές το συνολικό ποσό του αζώτου σ' ένα φυσικό εδαφικό οικοσύστημα παραμένει σχετικά σταθερό, ανεξάρτητα από τις ποσότητες των επιμέρους ενώσεων.

Επιπλέον, οι μεγάλες αυτές διαφορές στις συνθήκες ζωής των μικροοργανισμών του εδάφους βοηθούν στη διατήρηση και ανάπτυξη πλήθους ειδών μικροοργανισμών και συντείνουν στη δημιουργία ποικίλων μεταβολικών δραστηριοτήτων, γεγονός που αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη σταθερότητα ενός οικοσυστήματος.

Κατά τον Wilhelm (Wilhelm S 1965), η ισορροπία μεταξύ των οργανισμών του εδάφους υποδηλεί μερικούς περιορισμούς στο βιοτικό δυναμικό όλων των οργανισμών της μικροβιακής κοινότητας έτσι ώστε καμιά ομάδα ή είδος μικροοργανισμού να μην είναι σε θέση να αυξηθεί με τους μέγιστους δυνατούς ρυθμούς ούτε να μπορεί να παρεμποδίζει τελείως την ανάπτυξη των άλλων οργανισμών. Είναι δυνατό όμως κάτω



Εικ. 1.1. Σχηματική αναπαράσταση του εδαφικού μικροπεριβάλλοντος (Από Hattori T 1973)



Εικ. 1.2. Σχηματική αναπαράσταση του μοριακού περιβάλλοντος (Από Marshall K C 1980)

από ορισμένες συνθήκες να συμβούν ανατροπές στο φυσικό εδαφικό οικοσύστημα, όταν ένα είδος αυξάνει πάρα πολύ σε σχέση προς τα άλλα και γίνεται συχνά απειλητικό για την εξαφάνισή τους. Στην περίπτωση αυτή μιλάμε για επιδημία

Συνοψίζοντας, η σταθερότητα του εδαφικού μικροβιακού οικοσυστήματος οφείλεται εν μέρει στο μεγάλο μέγεθος του πληθυσμού τους και ίσως στο μικρό χρόνο αναπαραγωγής τους και βασικά στο πολυπληθές των ειδών που το απαρτίζει, γεγονός που εξασφαλίζει συνεργιστικές, ανταγωνιστικές και αμενσαλικές σχέσεις οι οποίες θέτουν περιορισμούς σε πιθανές πληθυσμιακές εκρήξεις

Η περιγραφή και η οριοθέτηση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι ίσως ένα από τα δυσκολότερα θέματα που απασχολούν τους μικροβιολόγους εδάφους, αποτέλεσμα της μεταγενέστερης εξέλιξης αυτού του τομέα της Οικολογίας και της αρχικής τάσης να εντάξουν τις οποιοσδήποτε παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις σε κάποιες ήδη περιγραφείσες από οικολόγους φυτών ή ζώων.

Η συνηθέστερη μορφή αλληλεπίδρασης που απαντιέται στη φύση είναι η εκδήλωση του ανταγωνισμού με την ευρύτερη έννοια του όρου που χρησιμοποίησε ο Δαρβίνος ταυτίζοντάς τον με τον «αγώνα υπάρξεως» (struggle for existence) θεωρώντας τον σαν παράγοντα της φυσικής επιλογής των ειδών και εκφράζοντας με αυτόν, τον ανταγωνισμό για τροφή, πάλι εναντίον εχθρών και δυσμενών συνθηκών και όποιες άλλες αμοιβαίες σχέσεις δρουν καθοριστικά για την ανάπτυξη και επιβίωση ενός είδους

Η περιγραφή, ανάλυση και μελέτη των σχέσεων αυτών δημιούργησε την ανάγκη της σημασιολόγησής τους και του χαρακτηρισμού τους με κάποιον όρο που θα απέδιδε εννοιολογικά πιστότερα το φαινόμενο

Ο ανταγωνισμός με τη γενικευμένη έννοια που χρησιμοποιήθηκε από το Δαρβίνο θα μπορούσε να σημαίνει την αντίσταση ή ίσως την ομοιόσταση (Odum E D 1975) που εμφανίζουν τα άτομα και οι πληθυσμοί στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν σ' ένα δεδομένο περιβάλλον

Σ' αυτή λοιπόν την αντίσταση που εκφράζει ένας πληθυσμός εντάσσονται

α Ο ανταγωνισμός (competition) Εκφράζει το σύγχρονο αγώνα που διεξάγεται, μεταξύ δυο ατόμων ή ομάδων ή πληθυσμών, στον ίδιο χώρο, για ένα κοινό αγαθό

β Ο αμενσαλισμός (ammensalism) (Alexander M 1977, Hattori T. 1973 Wimpenny J.W T 1981) Εμφανίζεται με την παραγωγή ου-

σιών, προϊόντων μεταβολισμού ενός μικροοργανισμού, που είναι τοξικές για κάποιον άλλο

γ Ο παρασιτισμός και η θήρευση Η περίπτωση όπου ο ένας απ' τους δυο οργανισμούς χρησιμοποιεί σαν τροφή τον άλλο

Οι παραπάνω σχέσεις για τους μικροοργανισμούς του εδάφους απαιτούν μια άλλη προσέγγιση διαφορετική απ' αυτή των οικολόγων φυτών και ζώων (Clark F.E. 1965)

Αναφέρεται ότι οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για τροφή, νερό, αέρα ή οξυγόνο και χώρο Οι οικολόγοι φυτών φυσικά δίνουν έμφαση στο φως και το νερό σαν πρωταρχικούς παράγοντες για τους οποίους τα φυτά ανταγωνίζονται.

Οι μικροοργανισμοί όμως του εδάφους ανταγωνίζονται για νερό, Είναι γεγονός ότι η υγρασία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη τους, αλλά σ' ένα εδαφικό οικοσύστημα δεν παρουσιάζεται έλλειψη νερού από μικροβιακή δραστηριότητα ενώ αντιθέτως μπορεί να παράγεται και σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατό να εμφανισθούν σχέσεις παραβίωσης ή κομμενσιαλισμού (commensialism). Ο χώρος, δυνητικά ίσως αποτελούσε αγαθό υποκείμενο σε ανταγωνισμό αν κανένα από τους άλλους παράγοντες δε δρούσε περιοριστικά

Το οξυγόνο ή ο αέρας και γενικότερα οποιαδήποτε ανόργανη ή οργανική ουσία που θα μπορούσε να θεωρηθεί υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας και άνθρακα, στοιχείων απαραίτητων για την επιβίωση, ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό ενός μικροοργανισμού, αποτελούν παράγοντες για τους οποίους ανταγωνίζονται οι μικροοργανισμοί.

Ο Garrett (Garrett S.D. 1956, 1970, 1981), πιθανά για να αποφύγει κάποιον ορισμό για τον ανταγωνισμό, χρησιμοποιεί την έκφραση ανταγωνιστική σαπροφυτική ικανότητα και την ορίζει σαν το σύνολο των φυσιολογικών χαρακτήρων που συμβάλλουν στον αποικισμό νεκρών οργανικών υλικών στο έδαφος, από μύκητες Σαν τέτοιους χαρακτήρες ο Garrett θεωρεί

- α τη μεγάλη ταχύτητα αυξήσεως των υφών και βλαστήσεως των σπορίων,
- β την ύπαρξη του απαραίτητου ενζυματικού μηχανισμού,
- γ την παραγωγή αντιβιοτικών και άλλων τοξικών ουσιών,
- δ. την αντοχή σε αντιβιοτικές ουσίες που παράγονται από άλλους οργανισμούς

Φαίνεται, δηλαδή, ότι για τον Garrett ο αμενσαλισμός είναι φαινόμενο που συνεπικουρεί στην έκφραση της ανταγωνιστικής ικανότητας ενός μύκητα που χρησιμοποιεί τον όρο ανταγωνισμό (competition) με τη γενικευμένη έννοια που του αποδόθηκε αρχικά.

Στις ανταγωνιστικές σχέσεις που εμφανίζονται στο έδαφος μεταξύ των μικροοργανισμών θα πρέπει ίσως να υπαχθεί και το φαινόμενο της παρεμποδιστικής δράσης που ασκούν όλα σχεδόν τα φυσικά εδάφη στην αύξηση όλων σχεδόν των μυκήτων

Παρατηρήσεις της συμπεριφοράς των μυκήτων στο έδαφος, είτε in situ είτε σε τρυβλία ή με μέτρηση της αναπνοής έδειξαν ότι οι περισσότεροι απ' αυτούς είναι ανενεργοί, βρισκόμενοι πολλές φορές υπό μορφή σπορίων αλλά και σαν υφές σε λήθαργική κατάσταση. Αυτός ο εξωγενής λήθαργος ορίσθηκε για πρώτη φορά σαν «διαδεδομένη μυκόσταση» από τους Dobbs και Hinson (Dobbs, C.G. and Hinson, W.H. 1953) και εκφράζει το φαινόμενο όπου, ζωντανές αναπαραγωγικές μονάδες μυκήτων, μη υποκειμένες σε ενδογενή λήθαργο (Sussman A.S. 1966), δε βλαστάνουν στο έδαφος και η αύξηση των υφών των μυκήτων καθυστερεί ή σταματά

Μολονότι από τότε έχουν γίνει πολυάριθμες εργασίες, καμιά απόλυτα ικανοποιητική απάντηση δεν έχει δοθεί μέχρι σήμερα

Έχει διαπιστωθεί όμως ότι

- α Η μυκόσταση του εδάφους είναι μικροβιακής προελεύσεως γεγονός που προκύπτει από την παροδική αναίρεσή της μετά από θέρμανση ή παρατεταμένη ξήρανση, τη μόνιμη μετά από αποστείρωση και την ανάκτησή της μετά από επαναμόλυνση του αποστειρωμένου εδάφους
- β Στην εκδήλωση του φαινομένου συμμετέχουν και πτητικές παρεμποδιστικές ουσίες
- γ Η μυκόσταση αναιρείται συνήθως με την πρόσθεση θρεπτικών συστατικών στο έδαφος.

Οι διαπιστώσεις αυτές έχουν συμβάλει στη διατύπωση δύο κυρίως υποθέσεων για την εξήγηση του μηχανισμού της μυκόστασης του εδάφους

- Η υπόθεση του ανταγωνισμού για τροφή, σύμφωνα με την οποία η μυκόσταση οφείλεται στη χρησιμοποίηση θρεπτικών ουσιών, απαραίτητων για τη βλάστηση των σπορίων και την αύξηση των υφών των μυκήτων, από άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους

- Η υπόθεση των παρεμποδιστικών ουσιών κατά την οποία η μυκόσταση οφείλεται σε παρεμποδιστικές ουσίες που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς.

Φυσικά, υπάρχει και η άποψη ότι η μυκόσταση είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης αυτών των δυο μηχανισμών.

Οι Watson και Ford, οι πρώτοι ίσως υποστηρικτές αυτής της θεώρησης σε μια, πραγματικά, κριτική ανασκόπηση του φαινομένου της μυκόστασης (Watson A.G. and Ford E.J. 1972) καταλήγουν σ' αυτή την άποψη κάνοντας χρήση της εξελικτικής και οικολογικής θεωρίας.

Δεχόμενοι ότι σ' όλα τα περιβάλλοντα όλων των οργανισμών υπάρχουν υποκινητές και παρεμποδιστές των μεταβολικών διαδικασιών ενός οργανισμού που οριοθετούν τη ζωή του και ότι η εξελικτική διαδικασία κάθε οργανισμού εξαρτάται από την ικανότητά του να πετυχαίνει μια ισορροπία μεταξύ των υποκινητικών και παρεμποδιστικών παραγόντων του περιβάλλοντός του, θεωρούν ότι η μυκόσταση είναι ένα δυναμικό φαινόμενο, μια ζωντανή διαδικασία του κύκλου ζωής κάθε μύκητα του εδάφους. Χαρακτηρίζεται δε από τρία στάδια, την εγκατάσταση, τη διατήρηση και την αναιρέση η έκφραση των οποίων ελέγχεται από μια περιβαλλοντική ισορροπία των υποκινητικών και παρεμποδιστικών περιβαλλοντολογικών παραγόντων. Η «παγκοσμιότητα» του φαινομένου της μυκόστασης είναι πλέον πέρα πάσης αμφιβολίας λαμβάνοντας υπόψη τις εργασίες που έχουν γίνει σε πλήθος τύπους εδαφών σε πολλά σημεία της γης και τις κριτικές ανασκοπήσεις που ασχολούνται με το θέμα (Lockwood J.L. 1964, Jackson R.M. 1965, Garrett S.D. 1970, Griffin D.M. 1972, Watson A.G. and Ford E.J. 1972, Lockwood J.L. 1977) Επίσης, πλήθος εργασιών έχουν γίνει με θέμα τη συμβολή των εδαφικών παραγόντων, υγρασίας, θερμοκρασίας, pH, βάθους εδάφους (Griffiths D.A. 1966, Emmatty D.A. and Green Jr. R.J. 1967, Kouyeas V. and Balis C. 1968, Schüepp H. and Frei E. 1969, Mishra R.R. and Kanaujia R.S. 1973, Mishra R.R. and Pandey K.K. 1974) και της εποχιακής διακύμανσης (Dobbs C.G. *et al* 1960) στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης, τα αποτελέσματα των οποίων εδραίωσαν την άποψη ότι η μυκόσταση συνδέεται με τη μικροχλωρίδα του εδάφους και συνέβαλαν στη διαπίστωση (Dobbs C.G. and Gash M.J. 1965) μιας άλλης μορφής παρεμπόδισης μη μικροβιακής προελεύσεως (*residual mycostasis*) Το είδος του μύκητα, η ηλικία, το μέγεθος και η πυκνότητα των σπορίων είναι παράγοντες που μελετήθηκαν (Dix N.J. and Christie P. 1974, Griffin G.J. and Ford R.H. 1974,

Steiner G.W and Lockwood J.L. 1969) και δείχνουν να επηρεάζουν την ευαισθησία του μύκητα στη μυκόσταση

Αν θελήσουμε να δούμε ποιές παρατηρήσεις και η χρησιμοποίηση ποιών μεθόδων οδήγησαν στη διατύπωση των θεωριών που αφορούν τη μυκόσταση, θα διαπιστώσουμε ότι οι υποθέσεις που εκφράστηκαν κατά καιρούς στηρίχτηκαν κατά το πλείστον σε αποτελέσματα «αρνητικών» προσεγγίσεων. Ποιές δηλαδή συνθήκες ήταν εκείνες που αναιρούσαν την εκδήλωση του φαινομένου

Η αναίρεση της μυκόστασης μετά από πρόσθεση θρεπτικών ουσιών οδήγησε κυρίως το Lockwood (Lockwood J.L. 1964) να διατυπώσει τη θεωρία ότι η μυκόσταση οφείλεται σε πενία θρεπτικών υποστρωμάτων. Στη συνέχεια πολλές εργασίες με αντικείμενο τις εξωγενείς απαιτήσεις των σπορίων για άνθρακα και άζωτο (Griffin G.J. 1970a, 1970b, 1973, Pass T. and Griffin G.J. 1972) ενίσχυσαν την υπόθεση αυτή χωρίς όμως να μπορεί να εξηγήσει την αναίρεση της μυκόστασης που προκαλούσε ο ήπιος αερισμός (Kouyeas V. and Balis C. 1968, Smith A.M. 1973) ή την αναίρεση που προκαλούσε η παρουσία στον ίδιο χώρο με το έδαφος, αλλά όχι σε επαφή μ' αυτό, διαλυμάτων αλάτων αργύρου ή υδραργύρου (Balis C. and Kouyeas V. 1968).

Η χρήση του ενεργού άνθρακα με στόχο την αναίρεση της μυκόστασης εφαρμόστηκε αρχικά (Dobbs C.G. and Hinson W.H. 1953, Romine M. and Baker R. 1972) και θεωρήθηκε σαν ένα από τα χαρακτηριστικά της μυκόστασης (Brian P.W. 1960) που όμως στη συνέχεια εγκαταλήφθηκε εξαιτίας των αντιμαχόμενων αποτελεσμάτων των πειραματισμών (Ko W.H. and Hora F.K. 1975)

Αργότερα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα καυστικού καλίου KOH (Roth A. Don and Griffin G.J. 1980) που φαίνεται να δεσμεύει πτητικούς παρεμποδιστές

Οι εγγενείς δυσκολίες του προβλήματος και τα αντικρουόμενα αποτελέσματα παρά τις όποιες βελτιώσεις των μεθόδων και των θεωριών (Griffin G.J. and Ford R.H. 1974, Bristow P.R. and Lockwood J.L. 1975a, 1975b) οδήγησαν αφενός μεν στη μείωση των εργασιών που σχετίζονται με τη μυκόσταση και αφετέρου στη μετριοπαθέστερη πια στάση των υποστηρικτών των δυο βασικών θεωριών και στην ενίσχυση εκείνης της συνδυασμένης δράσης

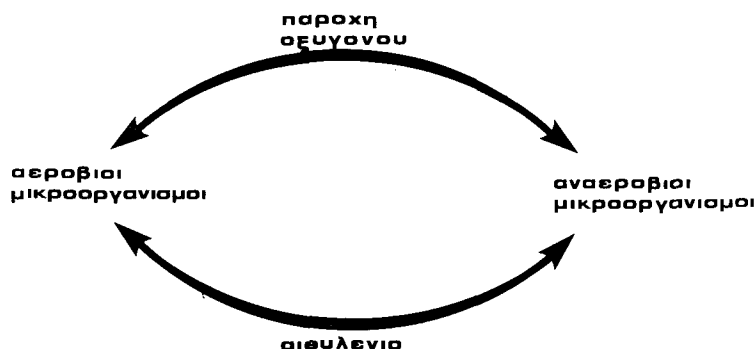
Από τους πτητικούς παράγοντες, που πιθανόν να συμβάλλουν στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης εκείνοι που μελετήθηκαν

περισσότερο, και υποστηρίχθηκε η συμμετοχή τους, ήταν το αιθυλένιο και η αμμωνία

Από πολύ νωρίς (Balis C. and Kouyeas V 1968) εκφράστηκε η υπόθεση ότι ο πτητικός παρεμποδιστής πιθανόν να είναι κάποιος ακόρεστος υδρογονάνθρακας και μάλιστα αιθυλένιο

Αν και υπήρχαν πληροφορίες ότι οι μύκητες παράγουν αιθυλένιο (Ilag L. and Curtis R W 1968), η παρουσία του στην ατμόσφαιρα του εδάφους αρχικά διαπιστώθηκε από τους Smith και Russel (Smith K A and Russel R.S. 1969) και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και αποδείχθηκε η συμμετοχή των μικροοργανισμών, βακτηρίων και μυκήτων στην παραγωγή του (Lynch J.M. 1972, 1974, Lynch J.M and Harper S H.T. 1974a, 1974b, 1980, Primrose S.B and Dilworth M.J. 1976, Bird C.W. and Lynch J M 1974, Considine P J and Patching J.W. 1975, Considine P J et al 1977, Primrose S.B 1976a, 1976b, Goodlass G and Smith K.A. 1978a, 1978b, Thomas K.C and Srenger M 1978, Sutherland J.B and Cook R J. 1980) Η αποδεδειγμένη πλέον παρουσία του αιθυλενίου στα φυσικά εδάφη και οι προγενέστερες υποθέσεις των Balis και Kouyeas οδήγησαν τον Smith (Smith A.M. 1973) στον ισχυρισμό ότι το αιθυλένιο είναι ο πτητικός παράγοντας που προκαλεί τη μυκόσταση και στην ιδέα ενός κύκλου οξυγόνου-αιθυλενίου (Smith A.M. and Cook R.J 1974, Smith A.M 1976) που θα συμβάλλει στη βιολογική ισορροπία του εδάφους.

Στην εικόνα 1.3 φαίνεται σχηματικά ο κύκλος οξυγόνου-αιθυλενίου που προτείνει ο Smith



Εικ. 1.3. Κατά τον Smith η χρησιμοποίηση του οξυγόνου από τους αερόβιους μικροοργανισμούς δημιουργεί αναερόβιες μικροθέσεις. Σ' αυτές τις αναερόβιες μικροθέσεις παράγεται αιθυλένιο που διαχέεται και αναστέλλει την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροοργανισμών (Από Smith A.M and Cook R.J 1974)

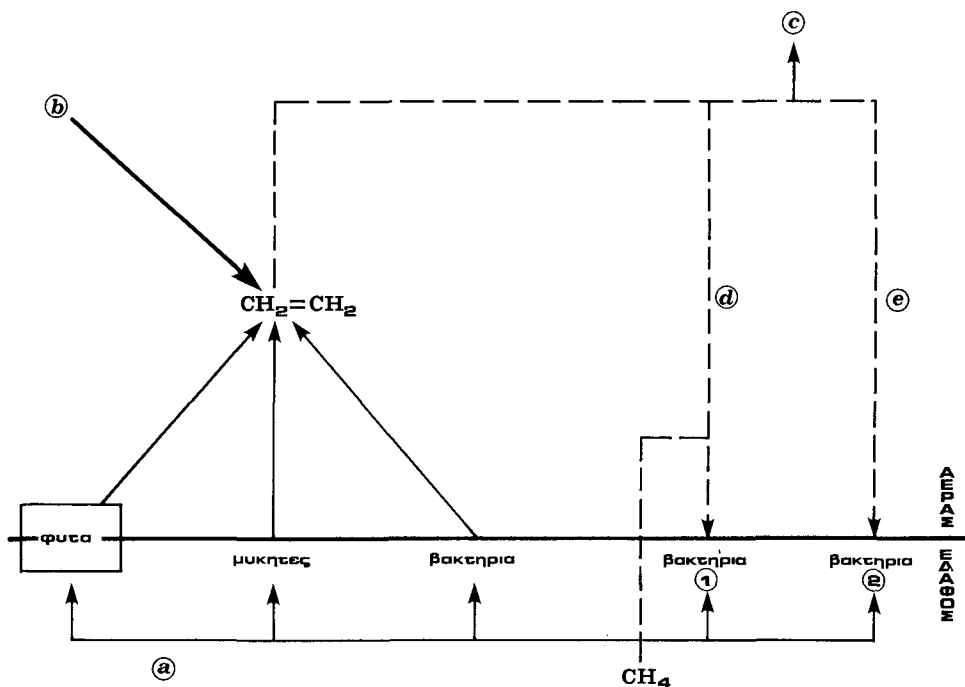
Ο Smith (Smith A.M. 1976) θεώρησε το αιθυλένιο σαν παράγοντα που προκαλεί τη μυκόσταση στηριζόμενος σε παρατηρήσεις που έκανε σε εδάφη που δέχονταν ρεύμα αέρα ο οποίος περιείχε 0, 0,5, 0,7 και 1,0 p.p.m. (μέρη στο εκατομμύριο) αιθυλένιο. Οι αναπαραγωγικές μονάδες τόσο των υπό εξέταση μυκήτων, Sclerotium rolfsii και Helminthosporium sativum, όσο και των αυτόχθονων ειδών, κατόρθωσαν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν μόνο στην περίπτωση που ρεύμα αέρα ελεύθερο αιθυλενίου διαβιβαζόταν πάνω από τα εδάφη. Παρεμποδιστική δράση του αιθυλενίου διαπιστώθηκε ακόμη στην ανάπτυξη των υφών των μυκήτων και στα βακτήρια, περιλαμβανομένων και των ακτινομυκήτων. Η αδυναμία προσδιορισμού μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης αιθυλενίου που να προκαλεί το φαινόμενο της μυκόστασης αποδόθηκε στη διαφορετική συμπεριφορά των εδαφών και στην εξάρτηση του φαινομένου από το status quo του εδάφους σε θρεπτικά στοιχεία.

Στην αρχική διατύπωση της άποψης για τον κύκλο οξυγόνου-αιθυλενίου που λειτουργεί στο εδαφικό οικοσύστημα (Smith A.M. and Cook R.J. 1974) δε λήφθηκε υπόψη η μικροβιακή αποδόμηση του αιθυλενίου σε αερόβιες συνθήκες (Abeles F.B. 1973, Abeles F.B. et al 1971, Smith K.A. et al 1973, Cornforth I.S. 1975). Ο Cornforth (Cornforth I.S. 1975) συγκεκριμένα, ισχυρίζεται ότι οι αερόβιοι οργανισμοί οι υπεύθυνοι για την αποδόμηση του αιθυλενίου είναι ικανοί να επιτελούν τη λειτουργία αυτή, πέντε φορές, περίπου, ταχύτερα από το ρυθμό που αυτό παράγεται αναεροβίως.

Οι παρατηρήσεις αυτές κατά τη γνώμη του Smith σε μεταγενέστερο άρθρο του (Smith A.M. 1976) δεν αντιμάχονται την αρχικά διατυπωμένη υπόθεση αν θεωρήσουμε ότι η μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος περιορίζεται σε απομονωμένες «νησίδες» που περιέχουν θρεπτικά στοιχεία και ότι γι' αυτές μόνο τις μικροθέσεις απαιτείται ένας ρυθμιστής της μικροβιακής δραστηριότητας.

Επιπλέον δείχνει να αμφισβητεί την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης μικροχλωρίδας, υπεύθυνης για την αποδόμηση του αιθυλενίου ο αριθμός της οποίας να είναι εξαρτώμενος της ικανότητας ενός εδάφους να παράγει αιθυλένιο και δέχεται ότι η αποδόμηση του αιθυλενίου γίνεται μόνο από μεθανότροφα βακτήρια δια μέσου του φαινομένου της συνοξειδωσης (Bont de J.A.M. and Mulder E.G. 1974, Flett R.J. et al 1975). Η απομόνωση βακτηρίων που διέθεταν την ικανότητα της αποδόμησης του αιθυλενίου όχι πλέον με συνοξειδωση (Bont De J.A.M. 1975, Bont De

J.A M and Albers R.A.J.M. 1976, Heyer J. 1976), το γεγονός ότι η παραγωγή αιθυλενίου στους μικροοργανισμούς ευνοείται στο αερόβιο περιβάλλον (Lynch J.M. and Harper S.H.T 1974a, Primrose S.B 1976a, Pázout J. et al 1981, Thomas K.C. and Spencer M. 1975, Primrose S.B. and Dilworth M.J 1976), και οι ενδείξεις ότι το αιθυλένιο, ακόμη και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες απ' αυτές που απαντώνται συνήθως στο έδαφος, δεν επηρεάζει την αερόβια αναπνευστική δραστηριότητα (Smith K.A 1978), οδήγησαν τον Primrose (Primrose S.B. 1979) στην πρόταση ενός άλλου κύκλου για το αιθυλένιο πολύ πιο περιεκτικού και περισσότερο πειστικού (Εικ. 1 4.).



Εικ. 1.4. Κύκλος του αιθυλενίου στη φύση (Από Primrose S B 1979) 1 βακτήρια που οξειδώνουν το μεθάνιο, 2 βακτήρια που οξειδώνουν το αιθυλένιο, a: νεκρά κύτταρα και ανακύκλωση θρεπτικών στοιχείων, b καύση φυσικών καυσίμων, c: φωτοχημική αποδόμηση, d συνοξείδωση, e οξείδωση

Η συμμετοχή του αιθυλενίου σαν πτητικού παράγοντα υπεύθυνου για τη μυκόσταση πολύ γρήγορα αμφισβητήθηκε (Lynch J.M. 1975, Balis C. 1976, Archer S.A. 1976, Ιωάννου Ν. et al 1977, Schippers B. et al 1978, Pavlica D.A. et al 1978) οδήγησε όμως στην εναλλακτική υπόθεση ότι μπορεί το αιθυλένιο να μην είναι αυτό καθ' εαυτό παρεμποδιστικός παράγοντας της βλάστησης των σπορίων αλλά, κάποιο προϊόν, την ύπαρξη του οποίου προκαλεί η παρουσία του αιθυλενίου, πιθανόν αλλυλική αλκοόλη (Balis C. 1976). Παρόμοια εναλλακτική υπόθεση προτάθηκε και από τον Κουγέα για τη δράση του οξειδίου του αιθυλενίου (Κουγέας V 1977) λαμβάνοντας υπόψη τις εργασίες του De Bont (Bont De J.A.M. 1976a, Bont De J.A.M. and Albers R.A.J.M 1976), στις οποίες αναφερόταν ότι το αιθυλένιο μπορεί να εποξειδώνεται από βακτήρια και πιθανολογούσαν ότι το οξύδιο του αιθυλενίου είναι προϊόν μεταβολισμού του αιθυλενίου από τα βακτήρια του εδάφους

Ο πιθανός ρόλος της αμμωνίας σαν πτητικού μυκοστατικού παράγοντα στο έδαφος προτάθηκε αρχικά από τον Κο και άλλους (Κο W H. et al 1974), οι οποίοι έλαβαν κρυστάλλους από εκχύλισμα αλκαλικού εδάφους και τους προσδιόρισαν με φασματοσκοπία υπερύθρου φωτός και ακτίνες Χ. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι η ένωση που απομονώθηκε ήταν το χλωριούχο αμμώνιο του οποίου η δράση βρέθηκε να είναι παρόμοια με εκείνη του πτητικού παρεμποδιστή του εδάφους και του εδαφικού εκχυλίσματος.

Η τοξική δράση όμως της αμμωνίας είχε αναφερθεί πολύ πριν τη διαπίστωση του φαινομένου της διαδεδομένης μυκόστασης (Neal D.C. 1933, Leach L.D and Davey A.E 1935, Neal D.C. and Collins E.R. 1936, McCallan S.E.A and Weedon F.R. 1940, Warren K.S. 1962) αλλά δεν είχε συνδεθεί φυσικά με την καθολικότητα της εκδήλωσης του φαινομένου της μυκόστασης.

Μετά τις πρώτες παρατηρήσεις του Κο και των συνεργατών του η συμμετοχή της αμμωνίας στη μυκόσταση επιβεβαιώθηκε βασικά για τα αλκαλικά εδάφη (Pavlica D.A. et al 1978, Schippers B. et al 1978, Schippers B. et al 1982)

Όπως φαίνεται στις πιο πρόσφατες ιστορικές ανασκοπήσεις (Balis C and Kougeas V 1979, Lockwood J.L 1979) έχει εγκαταληφθεί η ιδέα ενός και μοναδικού μηχανισμού που να διέπει το φαινόμενο. Τόσο η θεωρία που αποδίδει το φαινόμενο στην πείνα θρεπτικών στοιχείων, που εμφανίζεται στο έδαφος και επομένως στον ανταγωνισμό για τροφή που

οπωσδήποτε θα εκδηλώνεται όσο και η άποψη της δράσης παρεμποδιστικών ουσιών ενισχύονται από τα μέχρι σήμερα γνωστά αποτελέσματα, χωρίς όμως η κάθε μια απ' αυτές να μπορεί να αποκλίσει την άλλη.

Παρά τη μείωση των ερευνητικών εργασιών, η μικόσταση παραμένει κεντρικό ζήτημα για την οικολογία των μυκήτων και πέρα από το κατ'εξοχήν επιστημονικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει, η κατανόησή του θα συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη μεθόδων βιολογικού ελέγχου των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Baker K.F. and Cook R.J. 1974).

Η ύπαρξη κάποιου αντίστοιχου φαινομένου που να περιορίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων του εδάφους προτάθηκε αρχικά από τον Brown (Brown M.E. 1973), χαρακτηρίστηκε σαν βακτηριόσταση η μελέτη του οποίου (Davis R.D. 1975a, 1975b, Ko W.H. and Chow F.K. 1976, 1977) οδήγησε στη διαπίστωση παρεμφερών χαρακτηριστικών με εκείνα της μικόστασης και στην αποδοχή πλέον ενός ευρύτερου μηχανισμού εξωγενούς ληθάργου, της μικροβιόστασης, που εμφανίζεται στα εδάφη και δρα τόσο στους μύκητες, όσο και στα βακτήρια, περιλαμβανομένων και των ακτινομυκήτων (Ho W.C. and Ko W.H. 1982, Lynch J.M. 1982).

Με βάση όσα αναφέρθηκαν, σαν στόχος αυτής της εργασίας τέθηκε η μελέτη της επίδρασης των υδρογονανθράκων αιθυλενίου και ακετυλενίου στη μικροχλωρίδα του εδάφους και ιδιαίτερα στη μικόσταση

Η παρουσία του αιθυλενίου στην εδαφική ατμόσφαιρα είναι πλέον γεγονός μη επιδεχόμενο αμφισβήτηση, ενώ για το ακετυλένιο δεν γνωρίζουμε αν παράγεται βιολογικά στη φύση, γεγονός όμως που δεν θα πρέπει να μας οδηγήσει σε μια κατηγορηματική άποψη διότι η μη ανίχνευσή του δεν σημαίνει απαραίτητα και ανυπαρξία του

Επιπλέον, πολλές ενώσεις γνωστές σαν πολυακετυλενικές, που διαθέτουν μια ευθεία αλυσίδα με 8-14 άτομα άνθρακα και περιέχουν διπλούς και τριπλούς δεσμούς, έχει βρεθεί ότι παράγονται από μικροοργανισμούς και κυρίως από μύκητες [παράρτημα 1] (Bu'Lock J.D. 1966, Bohlman F. *et al* 1973, Müller K. 1975, Turner W.B. 1971). Τόσο όμως το αιθυλένιο όσο και το ακετυλένιο είναι προϊόντα που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα σαν αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας (Abeles F.B. 1973) και που η μη αποδόμησή τους θα οδηγούσε σε υπερβολική αύξηση των συγκεντρώσεών τους.

Η συμμετοχή της μικροχλωρίδας του εδάφους στην αποδόμηση ρυπαντών της ατμόσφαιρας έχει επισημανθεί (Abeles F.B. *et al* 1971, Abeles

F.B. 1973, Smith K.A. et al 1973) και έχουν απομονωθεί βακτήρια που χρησιμοποιούν σαν πηγή ενέργειας και άνθρακα το αιθυλένιο ή το ακετυλένιο (Bont De J.A.M 1975, 1976a, Bont De J.A.M. and Albers R.A J M. 1976, Bont De J.A.M and Peck W M 1980, Bont De J A M et al 1980, Kanner D and Bartha R. 1979, 1982)

Ενδιαφέρον λοιπόν παρουσιάζει να εξετασθεί η κατανομή των βακτηρίων αυτών στη φύση κι αν υπάρχει σχέση μεταξύ του μεγέθους του πληθυσμού τους και της συγκέντρωσης αυτών των ρυπαντών, και φυσικά να διερευνηθεί περισσότερο η συμμετοχή του αιθυλενίου αλλά και του ακετυλενίου, στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1. Εδάφη

Για την εκτίμηση του πληθυσμού των ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στη φύση, χρησιμοποιήθηκαν εδαφικά δείγματα από διάφορες περιοχές της Αττικής, εκτός από ένα, το οποίο προερχόταν από το Κουβέιτ. Η επιλογή των περιοχών έγινε λαμβάνοντας σαν κριτήρια την επικρατούσα βλάστηση καθώς επίσης και το φορτίο της ατμοσφαιρικής ρύπανσης της περιοχής

Στον πίνακα 2.1.1 παρουσιάζονται τα στοιχεία που αφορούν την περιοχή, τη βλάστηση και τις εστίες ατμοσφαιρικής ρύπανσης των σημείων δειγματοληψίας

Πίν. 2.1.1. Φυτική κάλυψη, τοποθεσία και εστίες ατμοσφαιρικής ρύπανσης των σημείων δειγματοληψίας

Εδαφικό δείγμα	Περιοχή	Βλάστηση	Εστίες ατμοσφαιρικής ρύπανσης
A	Διόνυσος	<i>Pinus halepensis</i>	Μακριά από αυτοκινη- αυτοκινητόδρομο
B	Ορια Διονυσου - Ν Μάκρης	<i>Pistacia Lentiscus</i>	Δίπλα σε αυτοκινητόδρομο
C	Πικέρμι	<i>Vitis vinifera</i>	Κοντά σε αυτοκινητόδρομο
D*	Κουβέιτ	---	---
E	Βοτανικός	<i>Morus sp</i>	Κοντά σε εργοστάσιο

* Το εδαφικό δείγμα που προερχόταν από το Κουβέιτ ήταν άμμος ποτισμένη με υδρογόνο νάνθρακες και χρησιμοποιείται για την επιστροφή δρόμων

2.1.2. Μέθοδοι αναλύσεων

α. Υγρασία

Η υγρασία προσδιορίστηκε από την απώλεια βάρους των εδαφικών δειγμάτων μετά από θέρμανση στους 105°C μέχρι σταθερού βάρους. Όλα τα αποτελέσματα που αφορούν χημική σύσταση και την εκτίμηση πληθυσμού μικροοργανισμών εκφράζονται με βάση το ξηρό βάρος του εδάφους.

β. pH

Το pH στα εδάφη προσδιορίστηκε σε υδατικά αιωρήματα (20 gr εδάφους: 20 gr απεσταγμένο νερό).

Μετά ισχυρή ανατάραξη τα εδαφικά αιωρήματα αφέθηκαν σε ηρεμία επί μια ώρα (Reech M 1965).

Για τις pH - μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε pH - μέτρο του τύπου CORNING EEL M-12.

γ. Ολικό άζωτο

Για τον προσδιορισμό του ολικού αζώτου ακολουθήθηκε η μέθοδος semimicro-Kjeldahl όπως περιγράφεται από τον Bremner (Bremner J.M. 1965)

Αντιδραστήρια:

1. Πυκνό H_2SO_4 (ειδ. βάρος· 1,84) ελεύθερο αζώτου.
2. Καταλύτης πέψεως.
 K_2SO_4 (100 gr)
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (10 gr)
Se (1 gr)
- 3 Διάλυμα NaOH περίπου 10N
- 4 Διάλυμα H_3BO_3 με δείκτη*
- 5 Διάλυμα H_2SO_4 0,01 N.

* Ο δείκτης περιέχει 0,099 gr πράσινο της βρωμοκρεζόλης και 0,066 gr κόκκινο του μεθυλίου σε 100 ml αλκοόλης

Διαδικασία: Δείγματα γνωστού βάρους της τάξεως των 200 mg αφού κονιοποιήθηκαν μεταφέρθηκαν στις φιάλες πέψεως. Ακολούθησε η προσθήκη 2 ml νερού και αφήθηκαν σε ηρεμία για 30'. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1,1 g περίπου καταλύτη πέψεως και 3 ml πυκνού θειικού οξέος σε κάθε φιάλη και υποβλήθηκαν σε πέψη επί 4-5 ώρες μέχρι διαυγάζσεως του περιεχομένου της φιάλης. Η απόσταξη στη συσκευή αποστάξεως έγινε μετά την προσθήκη 10 ml NaOH 10N. Η ελευθερούμενη αμμωνία δεσμευόταν σε 5 ml του διαλύματος H_3BO_3 . Για την τιτλοδότηση χρησιμοποιήθηκε H_2SO_4 0,01 N.

δ. Οργανικός άνθρακας

Για τον προσδιορισμό του οργανικού άνθρακα του εδάφους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των WALKLEY-BLACK (Allison L.E. 1965)

Αντιδραστήρια

- 1 Διάλυμα $K_2Cr_2O_7$ 1,0 N
- 2 Πυκνό H_2SO_4 (ειδ. βάρος 1,84)
3. Πυκνό H_3PO_4 (ειδ. βάρος. 1,71)
- 4 Διάλυμα διφαινυλάμινο-σουλφονικού βαρίου 0,16%
- 5 Διάλυμα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 N

Διαδικασία: Γνωστή ποσότητα εδάφους της τάξεως του 1,0 g, το οποίο προηγουμένως είχε ξηρανθεί και κοσκινισθεί από κόσκινο με άνοιγμα οπών 0,5 mm, μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 500 ml. Προστέθηκαν 10 ml διαλύματος $K_2Cr_2O_7$ και στη συνέχεια 20 ml πυκνού H_2SO_4 . Το περιεχόμενο της φιάλης αφήθηκε σε ηρεμία για 30' και στη συνέχεια δέχτηκε 200 ml απεσταγμένου νερού και 10 ml H_3PO_4 . Μετά την ψύξη προστέθηκαν 0,5 ml διαλύματος δείκτη διφαινυλάμινο-σουλφονικού βαρίου και τιτλοδοτήθηκε η περίσσεια του $K_2Cr_2O_7$ με το διάλυμα του δισθενούς θειικού σιδήρου.

Το σημείο εξουδετέρωσης εκδηλώνεται με την απότομη μεταβολή του χρώματος προς το πράσινο.

Για τον έλεγχο του $Cr_2O_7^{2-}$ ακολουθήθηκε η ίδια πορεία χωρίς έδαφος.

Ο υπολογισμός της επί τοις εκατό περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα έγινε με βάση τον ακόλουθο τύπο όπου $f = 1,33$

$$\text{Οργανικός C\%} = \frac{(\text{χιλιοστοίσοδυναμα } K_2Cr_2O_7 - \text{χιλιοστοίσοδυναμα } FeSO_4) \times 0,003 \times 100}{\text{g ξηρου βάρους εδάφους}} \times f$$

2.1.3. Εκτίμηση του πληθυσμού των ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στο έδαφος

Η εκτίμηση του πληθυσμού των ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στα μελετώμενα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε τρυβλία Petri (dilution plates). Λόγω των αναπόφευκτων εγγενών μειονεκτημάτων αυτής της μεθόδου θεωρείται απαραίτητο να περιγραφούν λεπτομερώς όλοι οι κρίσιμοι χειρισμοί, έτσι ώστε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου αυτής να είναι επαναλήψιμα και συγκρίσιμα (Jensen V. 1968, Parkinson et al 1971)

Για την παρασκευή του εδαφικού αιωρήματος χρησιμοποιήθηκε 1,0 g εδάφους σε 10 ml θρεπτικού διαλύματος της ακόλουθης σύστασης: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 gr, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,015 gr, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 gr, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5 μgr, H_3BO_3 10 μgr, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 70 μgr, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 μgr, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 100 μgr, $NaNO_3$ 2,0 gr, K_2HPO_4 0,5 gr, KH_2PO_4 0,5 gr, απεσταγμένο νερό 1,0 λίτρο (Bont de J.A.M. and Mulder E.G. 1974)

Προκειμένου να εξασφαλισθεί η ομοιόμορφη κατανομή του εδαφικού δείγματος στο αιώρημα, χρησιμοποιήθηκε μηχανικός αναταράκτης του τύπου VORTEX - GENIE στηγ ένδειξη 5 επί ένα λεπτό. Για να αποφευχθεί η μεταφορά εδαφικών τεμαχιδίων, το αιώρημα αφέθηκε σε ηρεμία επί μισή ώρα. Με τη βοήθεια σιφωνίου του ενός ml παραλήφθηκε ποσότητα 1,0 ml από το υπερκείμενο υγρό και υποβλήθηκε σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Το υγρό που χρησιμοποιήθηκε για τις αραιώσεις ήταν της ίδιας σύστασης μ' αυτό του αρχικού αιωρήματος.

Ποσότητα αιωρήματος 0,5 ml από κάθε αραιώση ενσωματώθηκε ομοιόμορφα σε ρευστοποιημένο θρεπτικό υλικό με άγαρ (Difco special agar - noble), θερμοκρασίας 43°C και μεταφέρθηκε σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 8,5 cm.

Όλοι οι χειρισμοί διεξήχθησαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επώασθησαν σε αεροστεγώς κλεισμένα ξηραντήρια (dessicators) σε ατμόσφαιρα 10% αιθυλενίου ή ακετυλενίου και σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 21°C ± 1°C. Τρυβλία μάρτυρες, που είχαν δεχθεί τους ίδιους ακριβώς χειρισμούς τοποθετήθηκαν σε αεροστεγώς κλεισμένα ξηραντήρια, αλλά σε ατμόσφαιρα καθαρού αέρα.

Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

2.1.4. Καταμέτρηση αποικιών

Στην καταμέτρηση των αποικιών λήφθηκαν υπόψη εκείνα τα τρυβλία στα οποία είχαν αναπτυχθεί 20-200 αποικίες. Οι αποικίες που εμφανίσθηκαν στους μάρτυρες, η ύπαρξη των οποίων πιθανόν να οφείλεται είτε σε προσμίξεις στο άγαρ είτε σε μεταφορά θρεπτικών στοιχείων με το εμβόλιο, αφαιρέθηκαν από τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία που επώασθησαν στους υδρογονάνθρακες ή δεν καταμετρήθηκαν καθόλου παρόμοιες αποικίες. Η παρακολούθηση των τρυβλίων γινόταν ανά εβδομάδα και έτσι ήταν δυνατός ο έλεγχος της αύξησης ή μη των αποικιών.

2.1.5. Συνθήκες εμπλουτισμού εδαφικών δειγμάτων με τους αντίστοιχους υδρογονάνθρακες

Επιφανειακά (0-5 cm) εδαφικά δείγματα από την περιοχή Βοτανικού, αφού κοσκινίσθηκαν από κόσκινο με άνοιγμα οπών 2 mm, τοποθετήθηκαν προς επώαση σε δοχεία αεροστεγή. Στις περιπτώσεις που η φυσική τους υγρασία ήταν κατώτερη από την επιθυμητή προστίθετο αποιονισμένο νερό. Τα στοιχεία της εδαφικής υγρασίας δίδονται μαζί με τα αποτελέσματα του κάθε πειράματος.

Μετά το κλείσιμο των δοχείων αφαιρείτο ένα κλάσμα 10% της αερίου φάσεως, εκτιμώντας το μανομετρικά, που αντικαθίστατο με τον αντίστοιχο υδρογονάνθρακα. Έτσι εξασφαλιζόταν η εξισορρόπηση της πίεσης του δοχείου με την ατμοσφαιρική. Ανά διήμερο εκπλυνόταν η υπάρχουσα αέριος φάση διοχετεύοντας κορεσμένο με υδρατμούς αέρα επί τόσο χρόνο όσο απαιτούσε η διέλευση τριπλασίου τουλάχιστο όγκου από εκείνου του δοχείου και στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη του αντίστοιχου υδρογονάνθρακα.

Η επώαση των εδαφικών δειγμάτων γινόταν σε χώρο θερμοκρασίας $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

2.1.6. Μέθοδος Rossi-Cholodny

Η μέθοδος Rossi-Cholodny, παρά τα μειονεκτήματά της, εφαρμόζεται ευρέως διότι προσφέρει τη δυνατότητα της in situ παρατήρησης και

την παρακολούθηση της εξέλιξης της μικροχλωρίδας του εδάφους. Στην εργασία αυτή η μέθοδος Rossi-Cholodny εφαρμόστηκε για να εκτιμηθεί η μεταβολή της συχνότητας των υφών που αναπτύσσονται στο έδαφος σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης. Για την ποσοτική εκτίμηση αυτής της παραμέτρου γινόταν καταγραφή της παρουσίας-απουσίας υφών σε εκατό τυχαία οπτικά πεδία στη μεγέθυνση 40x10. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε δεκαπενθήμερα χρονικά διαστήματα πέντε απόλυτα καθαρές αντικειμενοφόροι πλάκες ετοποθετούντο στη μάζα του εδάφους όπου παρέμεναν αδιατάρακτες επί μια εβδομάδα. Η μικροσκοπική παρατήρηση γινόταν σε πλάκες που είχαν υποβληθεί σε χρώση με φαινολικό διάλυμα ερυθρού της Βεγγάλης (Phenolic Rose Bengal) μετά από τους απαραίτητους χειρισμούς έκπλυσης και προσήλωσης.

2.1.7. Συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα Arthrobotrys arthrobotryoides

Για τις δοκιμές της μυκόστασης χρησιμοποιήθηκαν σπόρια από καλλιέργειες ηλικίας 15 ημερών του μύκητα Arthrobotrys arthrobotryoides σε εκχύλισμα αραβοσίτου στερεοποιημένου με άγαρ (DIFCO Bacto-Corn Meal Agar, 17 g/L). Η θερμοκρασία επώασης ήταν $27^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.1.8. Τεχνική για την εκτίμηση της μυκόστασης

Τρεις δακτύλιοι από υλικό plexi-glass, ύψους 1,40 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2,40 cm τοποθετούνται σε τρυβλίο η επιφάνεια του οποίου είναι καλυμμένη με δίσκο από διηθητικό χαρτί. Οι δακτύλιοι αυτοί γεμίζονται με έδαφος και στο τυβλίο προστίθεται αποιονισμένο νερό μέχρι κορεσμού του εδάφους. Κάθε τρυβλίο με τους τρεις δακτύλιους δέχεται τους ίδιους χειρισμούς. Για τη μεταφορά σπορίων από την καλλιέργεια του Arthrobotrys arthrobotryoides χρησιμοποιείται γυάλινο ραβδάκι, κατάλληλα διαμορφωμένο στο άκρο, το οποίο φέρεται σε επαφή με την καλλιέργεια κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνειά του μόνο σπόρια και όχι υφές. Στη συνέχεια τα σπόρια αυτά απλώνονται στην επιφάνεια του κορεσμένου με νερό εδάφους. Οι κύλινδροι με το έδαφος και τα σπόρια επωάζονται επί 18-20 ώρες στις συνθήκες που απαιτεί το πείραμα. Στο τέλος της επώασης η παραλαβή των σπορίων από

την εδαφική επιφάνεια γινόταν με κομμάτια κολλώδους διαφανούς ταινίας (cellophane) διαστάσεων 1,88 cm + 2,40 cm (Kouyeas V and Balis C. 1968, Cooke R.C. and Satchuthananthavale V 1968) Τα κομμάτια της κολλώδους διαφανούς ταινίας με τα προσκολλημένα σπόρια μεταφέροντο σε αντικειμενοφόρες πλάκες μαζί με δίσκους πλυμένου άγαρ και χρωματισμένου με φαινολικό διάλυμα ερυθρού της Βεγγάλης. Μετά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας οι αντικειμενοφόρες πλάκες θερμαίνοντο μέχρι τήξεως του άγαρ. Με τον τρόπο αυτόν οι διαφανείς ταινίες με τα σπόρια ενσωματώνοντο στο φιλμ του άγαρ και τα παρασκευάσματα μπορούσαν να διατηρηθούν επί αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα αναλλοίωτα.

Η μέθοδος αυτή προσφέρει καλύτερα οπτικά αποτελέσματα απ' ό,τι η χρησιμοποίηση πήγματος γλυκερίνης (glycerine jelly).

2.1.9. Εκτίμηση της παρεμποδιστικής δράσης διαφόρων παραγόντων στη βλάστηση των σπορίων του Arthrobotrys arthrobotryoides

Επειδή κατά τις δοκιμές αυτές η παρουσία θρεπτικών στοιχείων είναι δυνατό να επηρεάσει τη βλάστηση των σπορίων καταβλήθηκε ιδιαίτερη προσπάθεια έτσι ώστε τα παραλαμβανόμενα σπόρια για τις βιοδοκιμές να είναι ελεύθερα από οποιαδήποτε ίχνη θρεπτικών ουσιών που υπήρχε κίνδυνος να συμπαραληφθούν από το θρεπτικό υπόστρωμα των καλλιεργειών. Για το λόγο αυτόν τρυβλία με καλλιέργεια του μύκητα Arthrobotrys arthrobotryoides τοποθετούνται ανεστραμμένα πάνω σε άδεια αποστειρωμένα τρυβλία και με ελαφρά χτυπήματα τα σπόρια αποσπώνται από τους κονιδιοφόρους τους και συλλέγονται στα τρυβλία. Στη συνέχεια τα τρυβλία με τα σπόρια δέχονται 10 ml άγαρ (BBL 17 gr σε 1000 ml απεσταγμένο νερό) θερμοκρασίας $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ λαμβάνοντας πρόνοια για την ομοιόμορφη κατανομή των σπορίων στη μάζα του άγαρ. Μετά τη στερεοποίηση του υλικού κόβονται, με τη βοήθεια αποστειρωμένου φελ-λοτρυπητήρα, δίσκοι άγαρ διαμέτρου 8,5 mm.

Στις περιπτώσεις όπου κρίθηκε αναγκαίο τα σπόρια να βρίσκονται στην επιφάνεια του άγαρ, η μεταφορά τους έγινε κατά τον ίδιο τρόπο αλλά σε τρυβλία που περιείχαν στερεοποιημένο άγαρ. Τρεις τέτοιοι δίσκοι με ενσωματωμένα ή μη σπόρια μεταφέρονται στα εξεταζόμενα διαλύματα, επωάζονται επί 18-20 ώρες και τέλος τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες χρωματίζονται με φαινολικό διάλυμα ερυθρού της Βεγγάλης, καλύπτονται με καλυπτρίδες και θερμαίνονται.

2.1.10. Εκτίμηση του ποσοστού βλάστησης των σπορίων

Για τον υπολογισμό του ποσοστού βλάστησης των σπορίων, σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα γινόταν καταμέτρηση εκατό σπορίων και σαν βλαστημένα θεωρούντο εκείνα των οποίων οι υφές ήταν μήκους τουλάχιστο όσο και το μήκος του σπορίου (Manners J.G. 1966) Τα σπόρια των οποίων οι υφές δεν έφθαναν αυτό το μήκος αγνοήθηκαν

2.1.11. Ποσοτική μέθοδος για τη δοκιμή της μυκόστασης του εδάφους

Περιοριστικό παράγοντα για τα πειράματα που αφορούν τη μυκόσταση του εδάφους αποτελούσε η έλλειψη μιας ποσοτικής μεθόδου η οποία θα παρείχε δυνατότητες για την ασφαλή σύγκριση του βαθμού παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων στα διάφορα εδάφη. Για το ξεπέρασμα αυτού του προβλήματος προτάθηκε μια μέθοδος στηριζόμενη στην ανάμιξη αποστειρωμένου-φυσικού εδάφους (μη μυκοστατικού-μυκοστατικού) σε διάφορες αναλογίες (Chacko C.I. and Lockwood J.L. 1966)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σ' αυτή την εργασία για τη σύγκριση του βαθμού μυκόστασης εδαφών που είχαν δεχθεί διάφορους χειρισμούς με τους υδρογονάνθρακες ακετυλένιο, αιθυλένιο, μεθάνιο. Οι αναλογίες μη μυκοστατικού προς μυκοστατικό που εφαρμόστηκαν ήταν: 95.5, 75 25, 50 50, 25 75, 5.95. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα που δεν είχαν υποστεί ανάμιξη.

Το μη μυκοστατικό έδαφος συνίστατο από έδαφος που είχε δεχθεί αντίστοιχους χειρισμούς με το μυκοστατικό αλλά είχε αποστειρωθεί στους 121°C επί 10 λεπτά.

2.1.12. Έλεγχος για την παραγωγή ή κατανάλωση αναγωγικών ζαχάρων

Για τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε καθαρή υγρή καλλιέργεια ακετυλενότροφου βακτηρίου (S_4A_3)₁₅, που είχε απομονωθεί από έδαφος επωασμένο σε ατμόσφαιρα 10% ακετυλενίου για διάστημα 15 ημερών. Η υγρή καλλιέργεια ήταν ηλικίας τριών εβδομάδων. Από την καλλιέργεια αυτή

παραλήφθηκαν 5 ml για κάθε χειρισμό και προστέθηκαν 5 ml διαλύματος ανοργάνων αλάτων με τις ανάλογες ποσότητες γλυκόζης έτσι ώστε τελικά να έχουμε

0,00 mg γλυκόζης/ml	επώαση σε	ακετυλένιο (10%)
0,00 mg	»	» αέρα
0,05 mg	»	ακετυλένιο (10%)
0,05 mg	»	» αέρα
0,10 mg	»	ακετυλένιο (10%)
0,10 mg	»	» αέρα
0,20 mg	»	ακετυλένιο (10%)
0,20 mg	»	» αέρα

Οι μετρήσεις για την πιθανή κατανάλωση γλυκόζης έγιναν μετά από 5 ώρες επώαση σε θερμοκρασία $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ υπό ανατάραξη (100 rev/min) Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Somogyi (Herbert D et al 1971)

Αντιδραστήρια

1 Αντιδραστήριο Somogyi

Σε 250 ml περίπου νερό, που έχει βρασθεί προηγουμένως, διαλύονται 12,0 gr Rochelle salt και 24,0 gr ανύδρου Na_2CO_3 4,0 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 50 ml περίπου νερό και προστίθενται ανακατεύοντας, ενώ στη συνέχεια προστίθενται 16,0 gr NaHCO_3 Διάλυμα άνυδρου Na_2SO_4 , 180 gr στα 500 ml νερού, βράζεται για να απομακρυνθεί ο αέρας, ψύχεται και προστίθεται στο αλκαλικό διάλυμα του χαλκού. Στη συνέχεια προστίθεται βρασμένο απεσταγμένο νερό για να συμπληρωθεί ο όγκος στο λίτρο. Το αντιδραστήριο φυλάγεται σε χώρο θερμοκρασίας 37°C για μια εβδομάδα και στη συνέχεια μεταγγίζεται για να απομακρυνθεί το παραγόμενο ίζημα.

2 Αντιδραστήριο Nelson

25,0 gr μολυβδαινικού αμμωνίου διαλύονται σε 450 ml απεσταγμένου νερού και προστίθενται 21 ml H_2SO_4 96%. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 gr στα 25 ml νερού. Το τελικό διάλυμα φυλάγεται επί 24 ώρες στους 37°C και διατηρείται σε γυάλινη φιάλη σκούρου χρώματος.

Διαδικασία Σε 1-5 ml δείγματος που περιέχει όχι περισσότερο από 0,6 mg γλυκόζης ή ισοδύναμό της, προστίθεται ίσος όγκος του αντιδραστηρίου Somogyi. Τα δείγματα, οι μάρτυρες και τα γνωστά διαλύματα

της γλυκόζης θερμαίνονται επί 10 λεπτά σε νερό που βράζει και στη συνέχεια ψύχονται 1,0 ml του αντιδραστήριου Nelson προστίθεται για να προσδιορισθεί λιγότερο από 0,1 mgr γλυκόζης. (2,0 ml προστίθενται για ποσότητα 0,1–0,6 mg γλυκόζης) Όταν μετά από ανάμιξη, όλο το αντιδραστήριο Somogyi έχει πλέον διαλυθεί, τα διαλύματα αραιώνονται στα 25 ml ή σε μικρότερο όγκο και αφήνονται σε ηρεμία τουλάχιστο για 15 λεπτά αλλά όχι περισσότερο από 40 λεπτά. Η ανάγνωση και μέτρηση γίνεται στο φασματοφωτόμετρο στα 500 nm. Τα αναγωγικά ζάχαρα, σε ισοδύναμη ποσότητα γλυκόζης προσδιορίζονται από καμπύλη αναφοράς που έχει χαραχτεί με γνωστές συγκεντρώσεις γλυκόζης

Για το συγκεκριμένο πείραμα τα γνωστά διαλύματα γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν στη χάραξη της καμπύλης αναφοράς ήταν: 0,00 mgr/ml, 0,05 mgr/ml, 0,10 mgr/ml και 0,20 mgr/ml.

2.1.13. Επίδραση pH και συγκέντρωσης αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα Arthrobotrys arthrobotryoides

Για τη μελέτη της επίδρασης των αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων σε διάφορες τιμές pH παρασκευάστηκαν σειρές διαλυμάτων ακολουθώντας το σχήμα ενός παραγοντικού σχεδιασμού όπως περιγράφεται στον πίνακα 2 1 2

Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν 10 ml από το κάθε διάλυμα σε φιαλίδια McCartney χωρητικότητας περίπου 30 ml. Για τους υπολογισμούς των συγκεντρώσεων του νιτρώδους οξέος και της αμμωνίας λήφθηκε υπόψη η τιμή του pH που μετρήθηκε αμέσως μετά το πέρας της βιοδοκιμής

2.1.14. Στατιστική επεξεργασία και παρουσίαση των δεδομένων παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων του Arthrobotrys arthrobotryoides

Τα αποτελέσματα που αφορούν τις δοκιμές βλαστήσεως των σπορίων υπό την επίδραση τοξικών παραγόντων παρουσιάζονται εκφράζοντας την επί τοις εκατό βλάστηση σε μονάδες πιθανότητας (probits) και τη συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα σε λογάριθμο της δόσεως. Η

Πιν. 2.1.2. Σχεδιασμός παρασκευής διαλυμάτων για τη μελέτη της βλάστησης των σπορίων σε διάφορες συγκεντρώσεις αμμωνιακών και νιτρικών αλάτων και σε συνάρτηση του pH

(NO ₂) ppm	pH	5	6	7	8
0		a ₀	b ₀	c ₀	d ₀
500		a ₁	b ₁	c ₁	d ₁
1000		a ₂	b ₂	c ₂	d ₂
1500		a ₃	b ₃	c ₃	d ₃
2000		a ₄	b ₄	c ₄	d ₄

(NH ₄) ppm	pH	5	6	7	8
0		a ₀	b ₀	c ₀	d ₀
50		a ₁	b ₁	c ₁	d ₁
100		a ₂	b ₂	c ₂	d ₂
150		a ₃	b ₃	c ₃	d ₃
200		a ₄	b ₄	c ₄	d ₄

(NO ₂)+(NH ₄) ppm	pH	5	6	7	8
0		a ₀	b ₀	c ₀	d ₀
500+ 50		a ₁	b ₁	c ₁	d ₁
1000+100		a ₂	b ₂	c ₂	d ₂
1500+150		a ₃	b ₃	c ₃	d ₃
2000+200		a ₄	b ₄	c ₄	d ₄

Επεξήγηση a₀, a₁, a₂ , b₀, b₁, b₂ , c₀, c₁, c₂ , d₀, d₁, d₂ κωδικά συμβολα των αντίστοιχων διαλυμάτων

επεξεργασία αυτή έγινε διότι για πειράματα που αφορούν την εκτίμηση της παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων μυκήτων υπό την επίδραση κάποιου τοξικού παράγοντα, η απλή γραφική παράσταση της επί τοις εκατό βλαστήσεως σε σχέση με τη συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα ή του λογαρίθμου της συγκεντρώσεως δίδει σιγμοειδή καμπύλη. Για το μετασχηματισμό της σε ευθεία χρησιμοποιούμε ένα σύστημα συντεταγμένων όπου η δόση του τοξικού παράγοντα στην τετμημένη εκφράζεται λογαριθμικά ή δε επί τοις εκατό βλάστηση στην τεταγμένη σε μονάδες probits (Bliss C I 1935, Horsfall J G 1956, Roberts M and Boyce C B.C. 1972).

Στην καμπύλη που προκύπτει τρία χαρακτηριστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον η θέση, το σχήμα και η κλίση (Cohrane V.W 1963).

Η θέση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η παρουσία θρεπτικών στοιχείων, η ηλικία των σπορίων και η συγκέντρωσή τους, οι ακραίες θερμοκρασίες, ο χρόνος βλάστησης και η φυσική ή χημική μορφή με την οποία παρέχεται η τοξική ουσία

Παρά το μετασχηματισμό της σιγμοειδούς καμπύλης σε ευθεία είναι δυνατό να προκύψουν ατυπικές καμπύλες τοξικότητας ή εμφάνιση των οποίων μπορεί να αποδοθεί στο σύμπλοκο μηχανισμό του τοξικού παράγοντα

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, από τα χαρακτηριστικά της καμπύλης log-probit, παρουσιάζει η κλίση της ευθείας που προκύπτει Έχοντας σαν δεδομένο ότι στην τεταγμένη απεικονίζεται η κατανομή της ευαισθησίας στον πληθυσμό των σπορίων, μια απότομη κλίση σημαίνει ότι υπάρχει σχετικά μικρή διαφορά ανάμεσα στη συγκέντρωση που παρεμποδίζει τα πλέον ευαίσθητα σπόρια και σε εκείνη που απαιτείται για να εμποδίσει τη βλάστηση των πιο ανθεκτικών Αντίθετα, μια καμπύλη με μικρή κλίση δείχνει ότι η διαφορά στη δόση που απαιτείται, για την παρεμπόδιση ανάμεσα στα δυο άκρα της ανθεκτικότητας, είναι μεγάλη

Αν και η κλίση της καμπύλης είναι δυνατό να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, η τοξική ουσία αυτή καθ' εαυτή αποτελεί τον πλέον σημαντικό και για το λόγο αυτόν, η κλίση θεωρείται ότι είναι ένας δείκτης του βασικού τρόπου δράσης της Επομένως, τοξικές ουσίες με τον ίδιο τρόπο δράσης αναμένεται να αναπαράγουν καμπύλες τοξικότητας με την ίδια κλίση Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι η μεν θέση μετρά την ικανότητα μιας τοξικής ουσίας να φθάσει στον τόπο δράσης της, ενώ η κλίση αποτελεί ένα δείκτη του τρόπου δράσης απ τη στιγμή που θα φθάσει στο σημείο δράσης

2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1. Χημικά χαρακτηριστικά των εδαφών

Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων, των εδαφικών δειγμάτων που εξετάστηκαν, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.1 σαν μέσοι όροι τριών τουλάχιστο επαναλήψεων για κάθε περίπτωση.

Πίν. 2.2.1. Χημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που εξετάστηκαν

Εδαφικό δείγμα	pH	Όλικό άζωτο %	Οργανικός άνθρακας %	C:N
A	7,14	0,188	3,43	18 1
B	7,58	0,085	1,86	22 1
C	7,75	0,036	1,74	48 1
D	7,70	0,000	1,57	-
E	7,31	0,110	2,01	18 1

Από τα στοιχεία που αναφέρονται στον πίν 2 2 1 προκύπτει ότι

1 Μεταξύ των εδαφικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις τιμές του pH

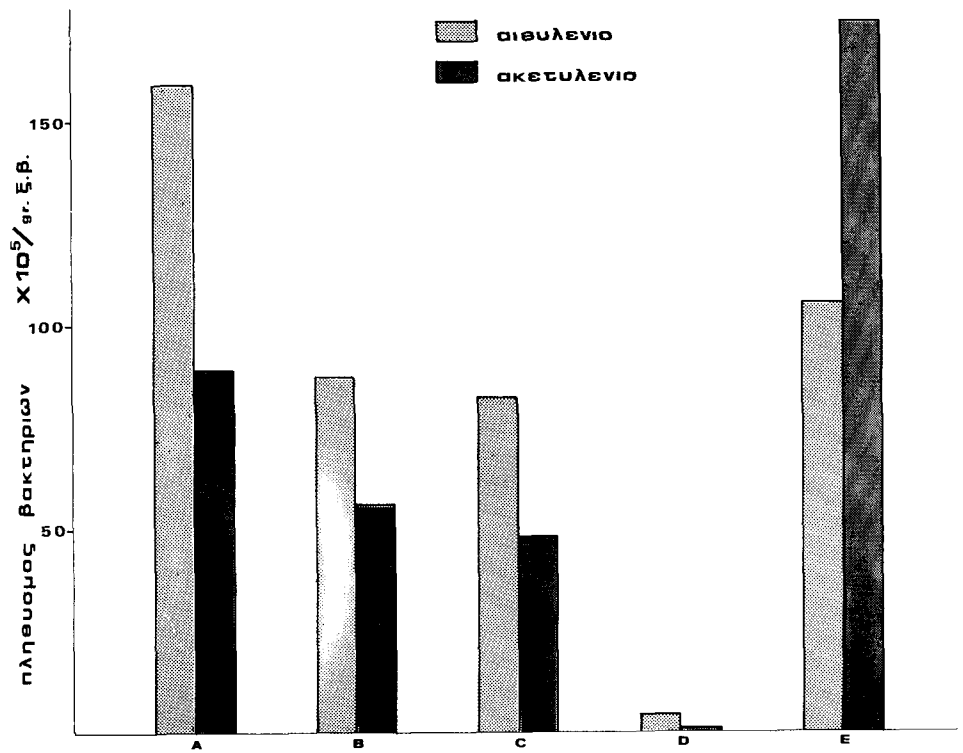
2 Υπάρχει μια κλιμάκωση τιμών μεταξύ των εδαφών ως προς την περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο. Το έδαφος που προερχόταν από το Κουβέιτ (Δείγμα D) δείχνει να μην περιέχει καθόλου άζωτο. Το γεγονός αυτό δεν είναι καθόλου παράδοξο, αν λάβουμε υπόψη μας ότι πρόκειται περί άμμου ποτισμένης με υδρογονάνθρακες. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε άζωτο εμφανίζει το δασικό έδαφος πεύκου

3 Η περιεκτικότητα των εδαφικών δειγμάτων σε οργανικό άνθρακα, με εξαίρεση το δείγμα D, εμφανίζεται ανάλογη της περιεκτικότητας σε ολικό άζωτο, όπως είναι φυσικό να συμβαίνει αφού το επίπεδο της οργανικής ύλης που μπορεί να διατηρήσει ένα έδαφος εξαρτάται από την

ποσότητα του περιεχομένου αζώτου. Ο οργανικός άνθρακας που μετρήθηκε στο δείγμα από το Κουβέιτ προφανώς προέρχεται από τους υδρογονάνθρακες με τους οποίους ποτίζεται και επομένως δεν αναμένεται να υπάρχει σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε άζωτο και άνθρακα.

2.2.2. Κατανομή των ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στη φύση

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2.1. αιθυλενοτρόφα και ακετυλενοτρόφα βακτήρια βρέθηκαν σ' όλα τα εδαφικά δείγματα.



Εικ. 2.2.1. Πληθυσμός ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων βακτηρίων στο έδαφος

Από μια πρώτη ματιά διαπιστώνουμε ότι ο πληθυσμός των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων υπερτερεί του πληθυσμού των ακετυλενοτρόφων σε όλα τα δείγματα εκτός του εδάφους Ε (περιοχή Βοτανικού), όπου εμφανίζεται μια υπεροχή των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το αιθυλένιο αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της εδαφικής μικροχλωρίδας και κατά συνέπεια συστατικό της αέριας φάσης του εδάφους, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι και τα βακτήρια που το αποδομούν θα πρέπει να έχουν μια θέση στην τροφική αλυσίδα του οικοσυστήματος «έδαφος» και σε πληθυσμιακά επίπεδα ανάλογα του ρυθμού παραγωγής του αιθυλενίου και φυσικά της συγκέντρωσής του. Για την ύπαρξη όμως ακετυλενίου στο έδαφος, σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα ότι το άεριο αυτό παράγεται βιολογικά εκτός από τις διάφορες πολυακετυλενικές ενώσεις που είναι προϊόντα μεταβολισμού τόσο μυκήτων όσο και βακτηρίων

Είναι άγνωστο όμως κατά πόσο οι ενώσεις αυτές μπορεί να αποτελέσουν υποστρώματα για την ανάπτυξη των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων που απομονώθηκαν

2.2.3. Σχέση πληθυσμού αιθυλενοτρόφων βακτηρίων με οργανική ουσία

Στην εικόνα 2 2 2 δίδεται γραφικά η σχέση μεταξύ του πληθυσμού των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων και της οργανικής ουσίας στα τέσσερα εδαφικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Το εδαφικό δείγμα D εξαιρέθηκε, διότι όπως ήδη έχει αναφερθεί, λόγω προελεύσεως δύσκολα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σαν φυσικό έδαφος

Εφαρμόζοντας στα δεδομένα αυτά τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων διαπιστώθηκε η ύπαρξη ευθύγραμμης συσχέτισης μεταξύ των δυο αυτών παραμέτρων, της μορφής

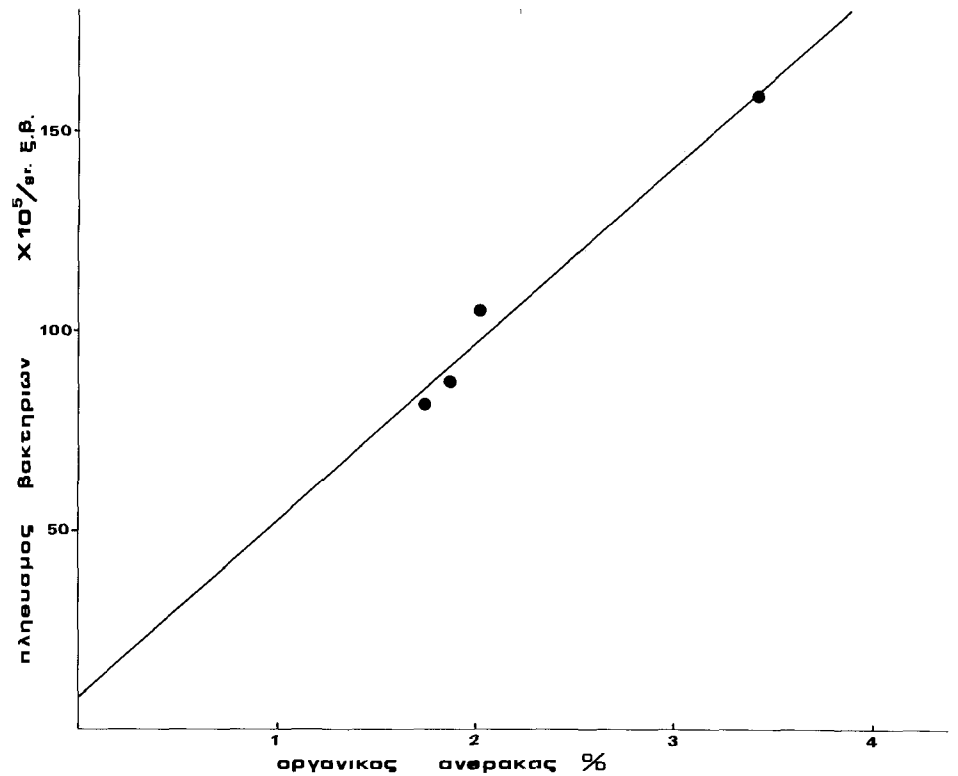
$$y = 8,3 \cdot 10^5 + 44,23 \cdot 10^5 x$$

με συντελεστή συσχετισμού $r^2 = 0,977$,

όπου y = πληθυσμός αιθυλενοτρόφων βακτηρίων και

x = περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα

Οι Goodlas G. και Smith K A (1978a, 1978b) σε πειράματα που έκαναν για να εξετάσουν τη σχέση που συνδέει την ποσότητα του

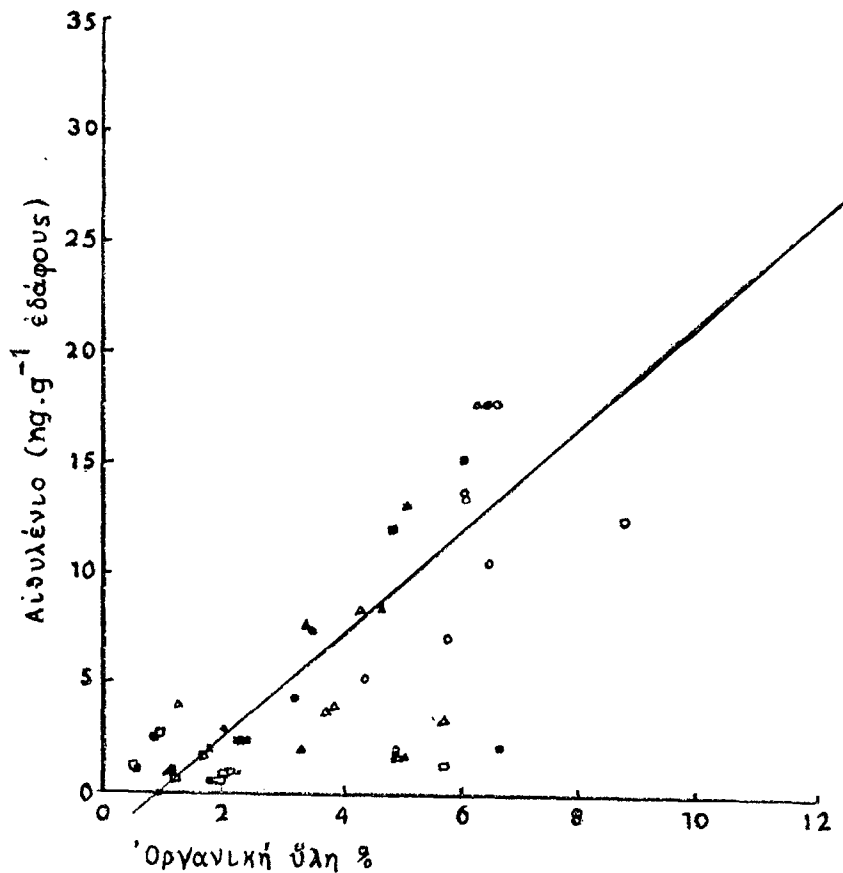


Εικ. 2.2.2. Σχέση μεταξύ πληθυσμού αιθυλενοτρόφων βακτηριών και περιεκτικότητας των εδαφών σε οργανικό άνθρακα

αιθυλενίου που εκλύεται από ένα έδαφος και την περιεκτικότητά του σε οργανική ύλη έδειξαν ότι η οργανική ύλη είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει την ικανότητα ενός εδάφους να εκλύει αιθυλένιο

Στην εικόνα 2.2.3. δίδεται η σχέση που συνδέει την παραγωγή αιθυλενίου και την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη όπως βρέθηκε από τους Goodlas G και Smith K.A (1978)

Συγκρίνοντας τη μορφή της καμπύλης της εικόνας 2.2.2 και αυτή της εικόνας 2.2.3 οδηγείται κανείς στο συμπέρασμα ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ οργανικής ουσίας στο έδαφος, παραγωγής αιθυλενίου και επιπέδου πληθυσμού των αιθυλενοτρόφων βακτηριών

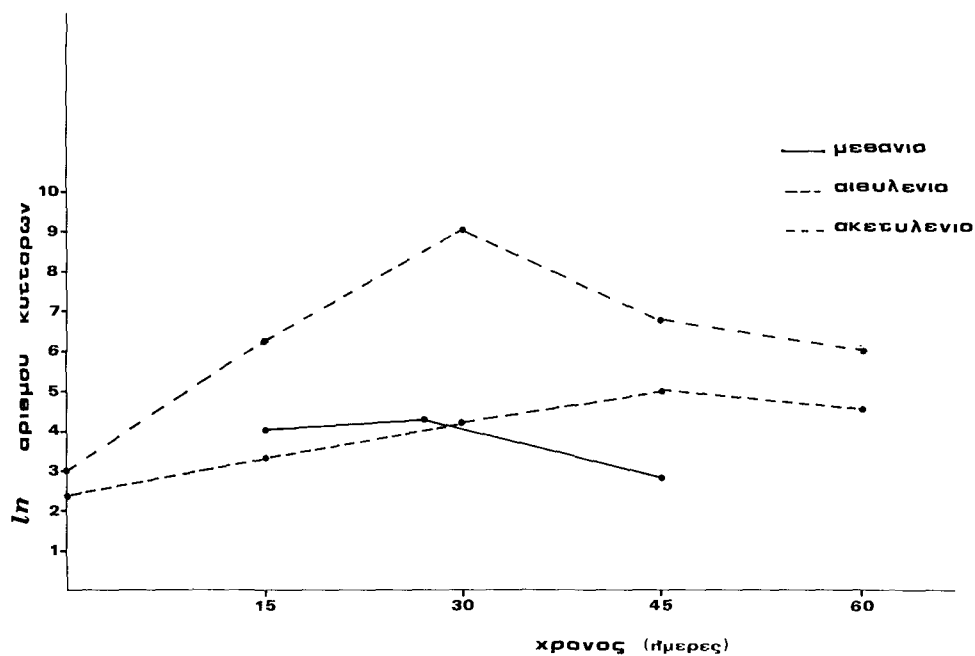


Εικ 2.23. Σχέση μεταξύ αιθυλενίου εκλυομένου από αεροξηραμένα εδάφη, μετά από επώαση 10 ημερών σε αναερόβιες συνθήκες και περιεκτικότητας σε οργανική ουσία (Από Goodlas G και Smith K A 1978a)

2.2.4. Επίδραση του χρόνου επώασης στον πληθυσμό των μεθανοτρόφων, αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων

Στην εικόνα 2.24 δίδονται τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση του χρόνου επώασης του εδάφους Ε στην ατμόσφαιρα διαφόρων υδρογονανθράκων.

Ο πληθυσμός των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων εμφανίζει μια προοδευτική αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια των 60 ημερών που διήρκεσε το πείραμα. Αντίθετα, τα ακετυλενότροφα βακτήρια μετά από μια φάση



Εικ. 2.2.4. Επίδραση του χρόνου επώσεως στον πληθυσμό των μεθανοτρόφων, αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων στο εδαφικό δείγμα Ε

ταχύτατης αύξησης στη διάρκεια των 30 πρώτων ημερών άρχισε ο πληθυσμός τους προοδευτικά να μειώνεται.

Όσον αφορά τα μεθανότροφα βακτήρια, η πρώτη εκτίμηση του πληθυσμού έδωσε ασαφή αποτελέσματα. Είναι όμως χαρακτηριστική η πτώση του πληθυσμού τους στις 45 ημέρες.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η επώαση του εδάφους σε ατμόσφαιρα μεθανίου συνεπάγεται την παράλληλη ανάπτυξη κομμενσιακών πληθυσμών των μεθανοτρόφων βακτηρίων που αναπτύσσονται δαπάναις της μεθανόλης η οποία αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του μεθανίου.

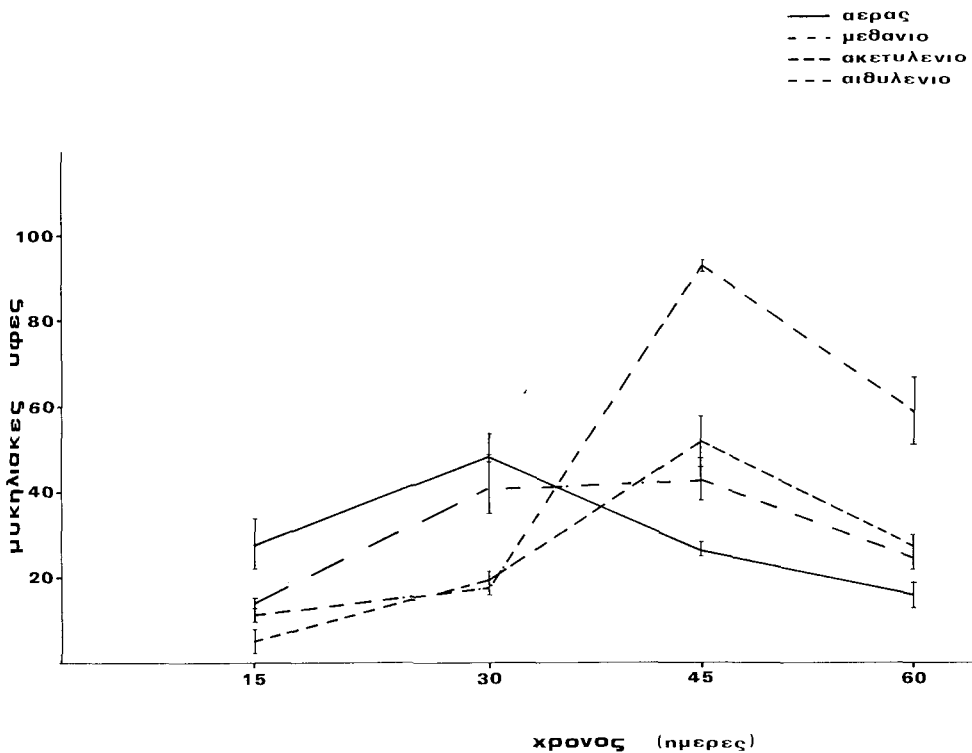
Ανάλογο φαινόμενο τέτοιων σχέσεων διαπιστώθηκε και στα τρυβλία που εμβολιάστηκαν με αιώρημα εδάφους προεπωασμένου σε ατμόσφαιρα μεθανίου και επώασθηκαν επίσης στην ίδια ατμόσφαιρα όπου αναπτύχθηκαν οι χαρακτηριστικές αποικίες βακτηρίων του γένους Hypomicrobium.

2.2.5. Επίδραση των υδρογονανθράκων στην ανάπτυξη μυκήτων στο έδαφος όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Rossi-Cholodny

Στην εικόνα 2.2.5. δίδονται οι γραφικές παραστάσεις της μεταβολής του πληθυσμού των μυκηλιακών υφών σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στις διάφορες ατμόσφαιρες υδρογονανθράκων.

Στο μάρτυρα (επώαση σε ατμοσφαιρικό αέρα χωρίς υδρογονάνθρακες) εμφανίζεται μια αύξηση της συχνότητας εμφάνισης μυκηλιακών υφών μέχρι τις 30 μέρες. Μετά τις 30 μέρες ο πληθυσμός των υφών ακολουθεί μια φθίνουσα πορεία.

Ανάλογη εικόνα εμφανίσθηκε και στην περίπτωση του εδάφους που επωαζόταν σε ατμόσφαιρα μεθανίου με τη διαφορά ότι η μείωση της συχνότητας των υφών εκδηλώθηκε μετά τις 45 μέρες επώασης.



Εικ. 2.2.5. Μεταβολή του πληθυσμού των μυκηλιακών υφών σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στις διάφορες ατμόσφαιρες υδρογονανθράκων

Αντίθετα, στην περίπτωση των εδαφών που επώασθησαν στις ατμόσφαιρες αιθυλενίου και ακετυλενίου υπάρχει μια χαρακτηριστική φάση ανάσχεσης του πληθυσμού των υφών σε σχέση με το μάρτυρα. Στη συνέχεια όμως παρατηρείται μια ταχύτατη αύξηση του πληθυσμού που φθάνει σε επίπεδα υψηλότερα απ' ό,τι του μάρτυρα στις 45 μέρες και στη συνέχεια εμφανίζεται μια πτωτική τάση. Από τα αποτελέσματα γίνεται εμφανές ότι στη διάρκεια των 30 πρώτων ημερών επώασεως η παρουσία του αιθυλενίου και ακετυλενίου έδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών. Το φαινόμενο όμως αυτό αναιρείται με την παράταση του χρόνου επώασεως, με αποτέλεσμα στις 45 και 60 ημέρες τα εδάφη που είχαν δεχθεί αιθυλένιο και ακετυλένιο να εμφανίζονται λιγότερο μυκοστατικά από το μάρτυρα και το έδαφος που είχε δεχθεί μεθάνιο.

Η εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης συνήθως διαπιστώνεται και εκτιμάται χρησιμοποιώντας σπόρια ή κονίδια μυκήτων τα οποία προστίθενται εξωγενώς στο έδαφος.

Είναι γεγονός ότι τα σπόρια είναι πιο ευαίσθητα στη δράση της μυκόστασης και γι' αυτό άλλωστε έχει υιοθετηθεί η μέθοδος αυτή. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος μπορούν να δώσουν πληροφορίες, πλην των ποιοτικών και ποσοτικών, και μάλιστα σε αυτόχθονες πληθυσμούς μυκήτων του εδάφους.

2.2.6. Επίδραση των αερίων ακετυλενίου και αιθυλενίου στη βλάστηση των σπορίων του A. arthrobotryoides

Το ερώτημα που αναδύεται από τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος είναι κατά πόσο τα αέρια αιθυλένιο και ακετυλένιο δρουν άμεσα ή έμμεσα στη βλάστηση των σπορίων και στην περαιτέρω ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών

Για τη διαλεύκανση του προβλήματος αυτού κατορθώθηκε το ακόλουθο πείραμα

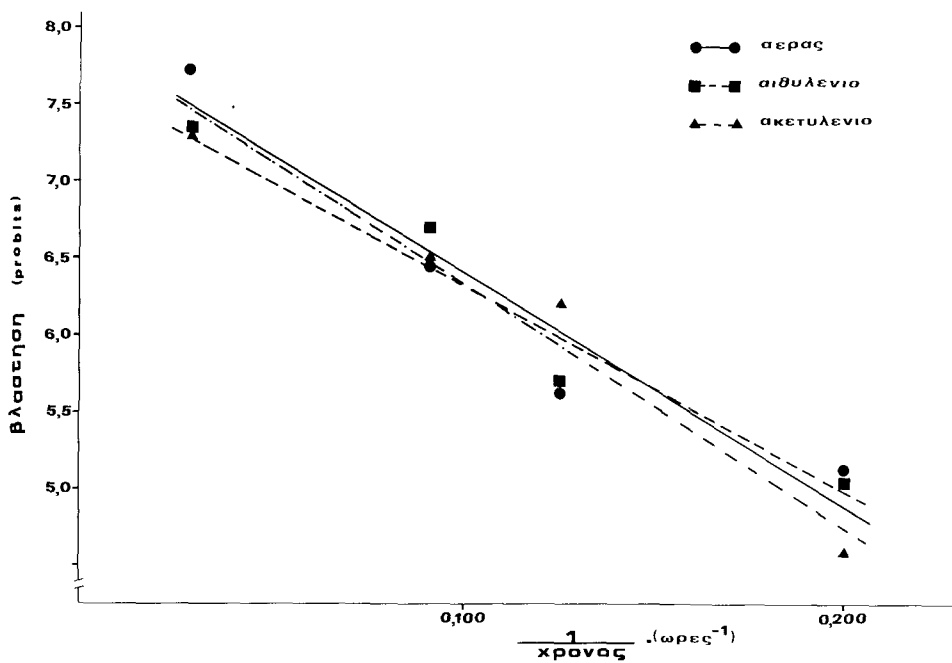
Όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, σπόρια του μύκητα A. arthrobotryoides επώασθησαν σε ατμόσφαιρες αέρα, αιθυλενίου και ακετυλενίου και εκτιμήθηκε το ποσοστό της βλάστησής τους σε διάφορους χρόνους επώασεως.

Πριν αναφερθούμε στα αποτελέσματα του πειράματος αυτού θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε δεδομένος πληθυσμός σπορίων ολοκληρώ-

νει τη βλάστησή του σε κάποια χρονική περίοδο η οποία μπορεί να ποικίλλει από πληθυσμό σε πληθυσμό ή μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού όταν έχουν διαφορετική ηλικία.

Εάν ο πληθυσμός των спорίων του μύκητα που εξετάζεται είναι της ίδιας ηλικίας τότε οι διαφορές στο χρόνο βλάστησης μεταξύ των ατόμων οφείλονται στην παραλλακτικότητα των ατόμων του πληθυσμού και επομένως η σχέση που θα συνδέει την επί τοις εκατό βλάστηση, εκφρασμένη σε probits και το αντίστροφο του χρόνου, αναμένεται να είναι γραμμική (Cohrane V.W. 1963).

Η υπόθεση αυτή ελέγχεται στην εικόνα 2.2.6. όπου πράγματι τα ποσοστά βλαστήσεως, εκφρασμένα σε probits, σε συνάρτηση με το αντίστροφο του χρόνου (h^{-1}), ακολουθούν ευθύγραμμη σχέση και στις τρεις περιπτώσεις με συντελεστές συσχετίσεως που πλησιάζουν τη μονάδα



Εικ. 2.2.6. Σχέση που συνδέει τη βλάστηση των спорίων του *A. arthrobotryoides* εκφρασμένη σε μονάδες πιθανότητας (probits), με το αντίστροφο του χρόνου (ώρες⁻¹)

Στην εικόνα 2.2.7. δίδονται οι γραφικές παραστάσεις της πορείας βλαστήσεως και για τους τρεις χειρισμούς (αέρας, αιθυλένιο, ακετυλένιο)

Από τη μορφή των καμπυλών που προκύπτουν θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το φαινόμενο ακολουθεί την εξίσωση των μονομοριακών αντιδράσεων της μορφής. $dy/dt = K (A-y)$ (1)

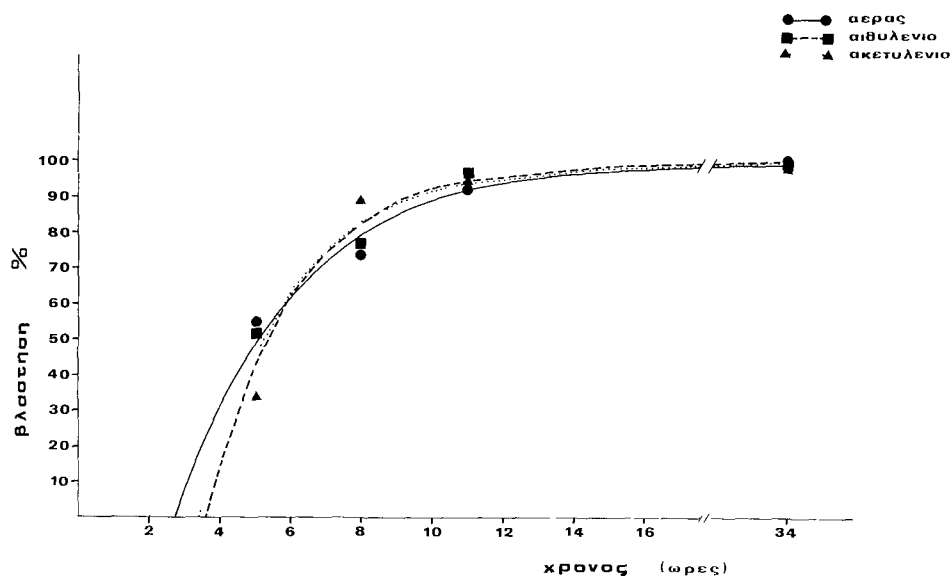
όπου: y = ποσοστό βλάστησης επί τοις εκατό

t = χρόνος

A = μέγιστο ποσοστού βλαστήσεως (= 100)

K = σταθερά που εξαρτάται από τις συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος και το είδος του πληθυσμού σπορίων.

Ολοκληρώνοντας την εξίσωση (1) και ορίζοντας σαν t_0 τη λανθάνου-



Εικ. 2.2.7. Γραφική παράσταση της πορείας βλαστήσεως στο χρόνο των σπορίων του A. arthrobotryoides

* latent period είναι ο χρόνος που απαιτείται για να αρχίσει η βλάστηση των σπορίων ενός μύκητα ή για να φθάσει σε κάποια ειδική χαμηλή τιμή (Cohrane V W 1963)

σα περίοδο βλαστήσεως (latent period*) στη διάρκεια της οποίας η βλάστηση εξακολουθεί να είναι μηδέν λαμβάνουμε την εξίσωση

$$\ln \frac{100}{100-y} = K (t-t_a) \quad (2)$$

ή αντιλογαριθμίζοντας

$$y = 100 [1 - e^{-K(t-t_a)}] \quad (3)$$

Εφαρμόζοντας τα πειραματικά δεδομένα στις εξισώσεις (2) και (3) προέκυψαν οι ακόλουθες σχέσεις.

Αέρας: $y = 100 [1 - e^{-0,304 (t-2,783)}] \quad r^2 = 0,952$

Αιθυλένιο: $y = 100 [1 - e^{-0,401 (t-3,606)}] \quad r^2 = 0,941$

Ακετυλένιο. $y = 100 [1 - e^{-0,383 (t-3,413)}] \quad r^2 = 0,920$

οι γραφικές παραστάσεις των οποίων δίδονται στην εικόνα 2.2.7.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι.

- τα αέρια αιθυλένιο και ακετυλένιο δεν επηρεάζουν καθόλου την ολική βλάστηση των σποριών του μύκητα A. arthrobotryoides. Συγκεκριμένα, στο χρόνο που επιλέχτηκε να γίνονται οι μετρήσεις βλάστησης (20 ώρες) οι θεωρητικές τιμές που προκύπτουν από τις εξισώσεις είναι για μεν την περίπτωση επώασης στον αέρα 99,47% για δε τις περιπτώσεις του αιθυλενίου και ακετυλενίου 99,86% και 99,83% αντίστοιχα
- υπάρχει μια διαφορά στο χρόνο έναρξης της βλάστησης (latent period) των σποριών, που όμως δεν επηρεάζει την ολική βλάστηση. Λαμβάνοντας υπόψη τις παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν, επιλέχτηκε σαν χρόνος μέτρησης της βλάστησης οι 20 ώρες, χρόνος στον οποίο η καμπύλη βλαστήσεως των σποριών και για τις τρεις περιπτώσεις, έχει φθάσει πλέον στον επίπεδο κλάδο της καμπύλης βλαστήσεως

2.2.7. Επίδραση του χρόνου προεπώασης του εδάφους υπό διάφορες συνθήκες, στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων, ότι δηλαδή, ενώ το αιθυλένιο και το ακετυλένιο δεν δρουν

παρεμποδιστικά στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides όμως εξασκούν ανασχετική δράση τουλάχιστο αρχικά στην ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών υπό εδαφικές συνθήκες, εξετάσθηκε η υπόθεση κατά πόσο η δράση των αερίων αυτών ασκείται έμμεσα δια του μηχανισμού της μυκοστάσεως του εδάφους

Από αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών που αφορούσαν την επίδραση του αιθυλενίου στη μυκόσταση, υπό εδαφικές συνθήκες, έχει εκφρασθεί η υπόθεση για τη συμμετοχή κάποιων άλλων ενώσεων, προϊόντων μεταβολισμού του αιθυλενίου (Balis C. 1976, Kouyeas V. 1977).

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε ο ρόλος της προεπάσης και της διάρκειάς της, στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκοστάσεως.

Η προεπάση έγινε σε τρία διαφορετικά αέρια, μεθάνιο, αιθυλένιο, ακετυλένιο, σε αναλογία αυτών των αερίων 10% και σε αέρα (μάρτυρας).

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται χωριστά για κάθε περίπτωση προεπάσης

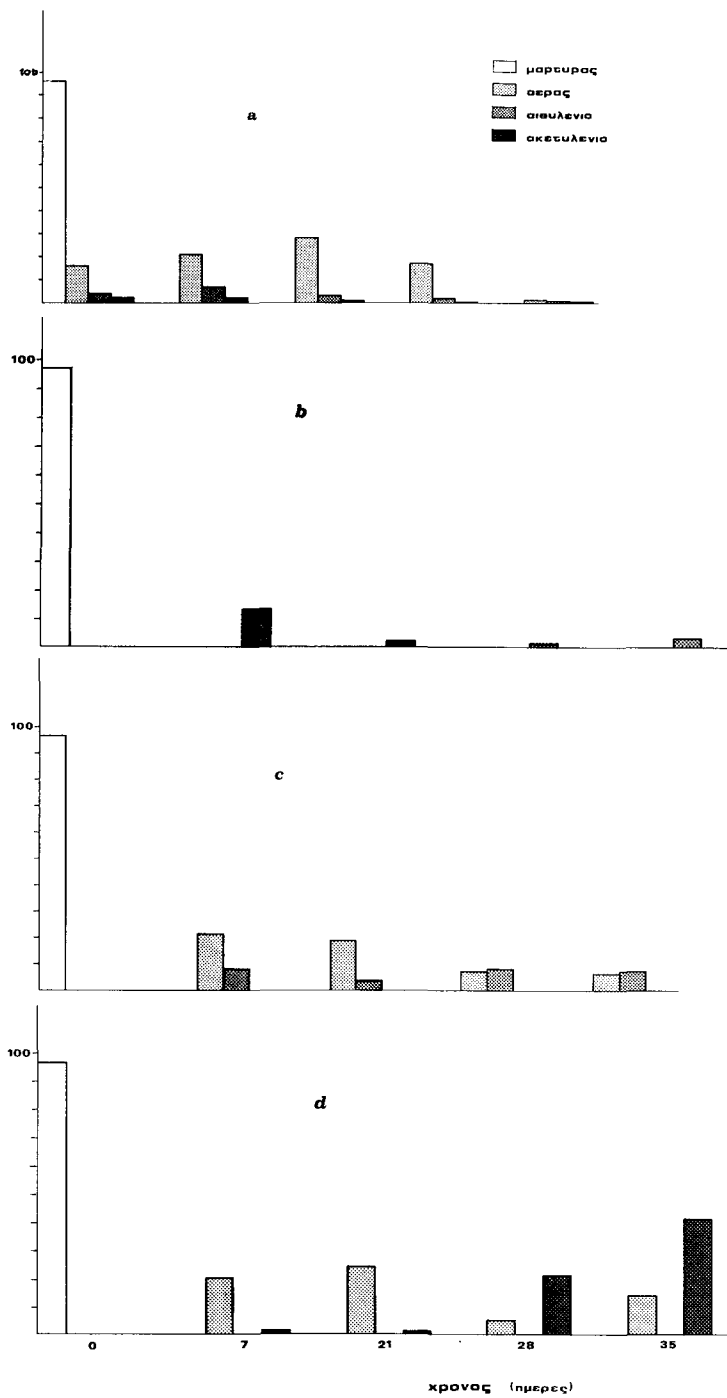
Αέρας

Η υγρασία του εδαφικού δείγματος που προεπαζόταν σε ατμόσφαιρα αέρα ήταν $25,41\% \pm 0,61$ και τα αποτελέσματα των δοκιμών βλαστήσεως στους διάφορους χρόνους προεπάσης και χειρισμούς επάσης δίδονται στο ιστόγραμμα της εικόνας 2 2.8 (α).

Όπως φαίνεται από την απεικόνιση των αποτελεσμάτων, το ποσοστό βλαστήσεως των σπορίων του μύκητα αυξάνει με την πάροδο του χρόνου προεπάσης μέχρι τις 20 μέρες και στη συνέχεια μειώνεται καταλήγοντας στις 35 μέρες η βλάστηση να είναι σχεδόν μηδενική. Την πορεία αυτή ακολουθούν όλοι οι χειρισμοί επάσης με τη διαφορά ότι η μυκόσταση που εμφανίζουν τα εδαφικά δείγματα που επάζονται στο αιθυλένιο και στο ακετυλένιο είναι πολύ εντονότερη.

Μεθάνιο

Τα εδαφικά δείγματα που προεπάσθησαν στο μεθάνιο δοκιμάσθηκαν σαν υπόστρωμα για τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides, μόνο σε ατμόσφαιρα αιθυλενίου η δε υγρασία τους ήταν $24,24\% \pm 0,52$. Τα αποτελέσματα των δοκιμών βλάστησης, στο ιστόγραμμα



Εικ. 2.2.8. Επίδραση του χρόνου προεπάσης του εδάφους υπό διάφορες ατμόσφαιρες υδρογονανθράκων στην εκδήλωση του φαινομένου της μικροστάσεως a: αέρας, b: μεθάνιο, c: αιθυλένιο, d: ακετυλένιο

της εικόνας 2.2.8. (b) δείχνουν ότι τα ποσοστά βλαστήσεως των σποριών του μύκητα μειώνονται με την πάροδο του χρόνου.

Αιθυλένιο

Μετά από την προεπάση των εδαφικών δειγμάτων σε ατμόσφαιρα αιθυλενίου οι δοκιμές για τον έλεγχο της μυκοστάσεως γινόταν στον αέρα και σε ατμόσφαιρα που περιείχε 10% αιθυλένιο. Η υγρασία του εδάφους ήταν $23,97\% \pm 0,52$.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, εικόνα 2.2.8. (c), διαπιστώνουμε ότι κατά τα πρώτα στάδια της προεπάσης και μέχρι τις 21 μέρες η μυκόσταση ήταν μεγαλύτερη στις δοκιμές βλαστήσεως υπό ατμόσφαιρα αιθυλενίου. Στη συνέχεια το φαινόμενο δείχνει να διαφοροποιείται και να εμφανίζεται αύξηση της παρεμπόδισης στις συνθήκες του αέρα ενώ στο αιθυλένιο παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση στο ποσοστό βλάστησης των σποριών.

Ακετυλένιο

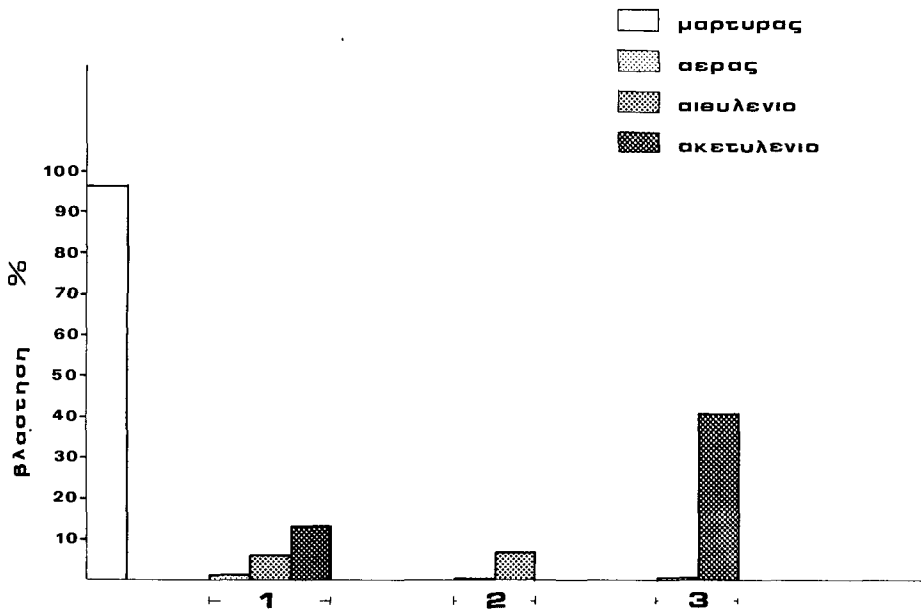
Το έδαφος, με υγρασία $23,52\% \pm 1,45$, που προεπάσθηκε σε συνθήκες ακετυλενίου όπως φαίνεται και από το ιστόγραμμα της εικόνας 2.2.8. (d) παρουσιάζει μια εντονότατη διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της προεπάσης.

Αρχικά, μέχρι τις 21 μέρες, οι δοκιμές βλαστήσεως σε ατμόσφαιρα ακετυλενίου εμφανίζουν μια σημαντική παρεμπόδιση στη βλάστηση των σποριών συγκρινόμενη με τις αντίστοιχες δοκιμές που έγιναν σε ατμόσφαιρα αέρα (μάρτυρας). Στη συνέχεια όμως παρατηρείται εντυπωσιακή αναίρεση της μυκοστάσεως φθάνοντας στις 35 μέρες το ποσοστό βλάστησης των σποριών του μύκητα να είναι της τάξης του 42%

Ακόμη και για τις δοκιμές που έγιναν σε ατμόσφαιρα αέρα δεν φαίνεται η μυκόσταση να ακολουθεί το γενικό πρότυπο της σταδιακής επίτασης της μυκοστάσεως με την πάροδο του χρόνου προεπάσης. Όπως διακρίνουμε από την παράθεση των αποτελεσμάτων, η εκδήλωση του φαινομένου της μυκοστάσεως επηρεάζεται αφενός μεν από τη σύνθεση της αερίου φάσεως κατά τη διάρκεια των δοκιμών βλαστήσεως αφετέρου δε από το χρόνο προεπάσης.

Συγκρίνοντας όμως τα αποτελέσματα των δοκιμών βλάστησης που έγιναν στις ίδιες συνθήκες, από άποψη συνθέσεως της αερίου φάσεως,

και για διάρκεια προεπάσης 35 ημέρες (εικόνα 2.2.9.) διαπιστώνουμε ότι η παρουσία του αιθυλενίου, πολύ περισσότερο όμως η παρουσία του ακετυλενίου κατά τη φάση προεπάσης, είχαν σαν αποτέλεσμα τη μερική αναιρέση της μυκοστάσεως.



Εικ. 2.2.9. Επίδραση της αερίου φάσεως κατά τη διάρκεια προεπάσης στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκοστάσεως 1: Αέρας, 2: Αιθυλένιο, 3: Ακετυλένιο

2.2.8. Επίδραση του αζώτου στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκοστάσεως σε εδαφικές συνθήκες

Για να διερευνηθεί η επίδραση της προσθήκης πηγής αζώτου στη βλάστηση των σποριών στο έδαφος, καταστρώθηκε πείραμα στο οποίο δείγματα προερχόμενα από φυσικό έδαφος και από έδαφος του οποίου η μυκοστάση είχε αναιρεθεί μερικώς μετά από προεπάση 40 ημερών σε ακετυλένιο δέχθηκαν διαφορετικούς χειρισμούς επάσης και πρόσθεσης πηγής αζώτου.

Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων ρυθμίσθηκε περίπου στο 37% ($36,55 \pm 0,98$) και η πηγή αζώτου που προστέθηκε ήταν νιτρικό αμμώνιο NH_4NO_3 .

Οι χειρισμοί και τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον πίνακα 2.2.2.

Πιν. 2.2.2. Επίδραση της προέλευσης, των συνθηκών επώασης και της προσθήκης αζώτου στη μυκόσταση

Προέλευση	Επώαση	Προσθήκη N (NH ₄ NO ₃)	Βλάστηση σπορίων του A. arthrotryoides
Φυσικό έδαφος	Αέρας	1%	1,33 ± 1,53
	Ακετυλένιο	-	0,00
	Αέρας	-	6,33 ± 4,04
	Ακετυλένιο	1%	0,00
Έδαφος προε- πασμένο σε ακετυλένιο	Αέρας	1%	0,00
	Ακετυλένιο	-	45,33 ± 1,53
	Αέρας	-	1,67 ± 2,08
	Ακετυλένιο	1%	0,00

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα του πίνακα 2.2.2 η βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrotryoides στο φυσικό έδαφος ήταν πολύ χαμηλή για όλους τους χειρισμούς επώασης και προσθήκης αζώτου. Υπάρχει βέβαια μια διαφοροποίηση των ποσοστών βλαστήσεως που ίσως θα μπορούσε να οδηγήσει στην υπόθεση ότι η προσθήκη νιτρικού αμμωνίου είχε σαν αποτέλεσμα μια σχετική επίταση της μυκοστάσεως

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα που αφορούν το έδαφος που είχε προεπασθεί σε ακετυλένιο

Στην περίπτωση αυτή διακρίνουμε ότι ενώ η πολυήμερη προεπώαση του φυσικού εδάφους σε ατμόσφαιρα ακετυλενίου είχε προκαλέσει μια μερική αναίρεση της εντάσεως του φαινομένου της μυκοστάσεως, επιτρέποντας μια βλάστηση σπορίων της τάξεως του 45% στη συνέχεια η προσθήκη νιτρικού αμμωνίου επέφερε μια εντυπωσιακή παρεμπόδιση της βλαστήσεως

2.2.9. Ποσοτική εκτίμηση της μυκοστάσεως με τη μέθοδο των αραιώσεων

Οι χειρισμοί και τα αποτελέσματα του πειράματος που αφορούν την ποσοτική εκτίμηση της εντάσεως του φαινομένου της μυκοστάσεως

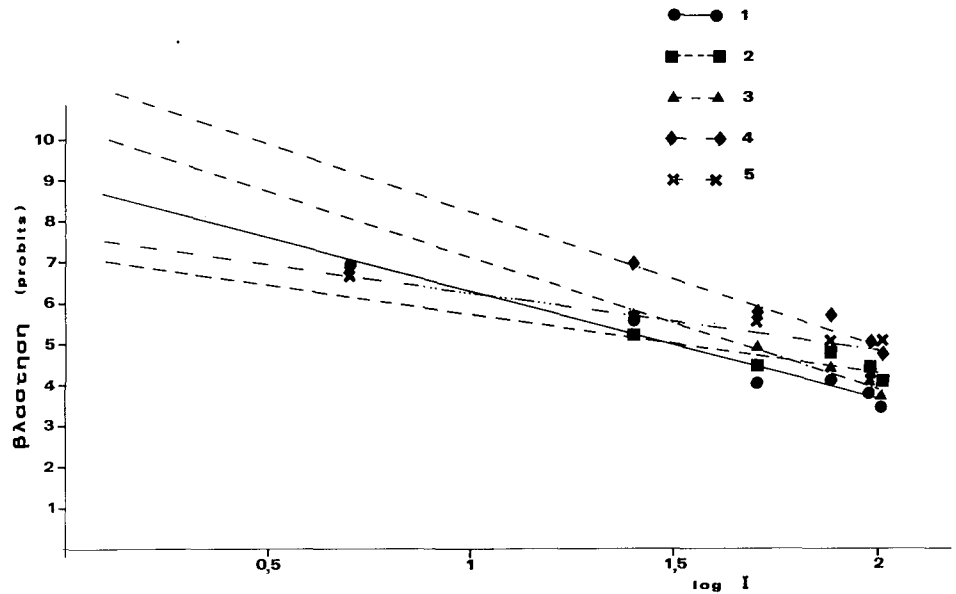
αναφέρονται στον πίνακα 2.2.3. Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 18% η δε προεπάσσή τους διαρκείας δυο μηνών.

Πιν. 2.2.3. Βλάστηση σπορίων του μύκητα *A. arthrotryoides* σε μίγματα φυσικού (I) αποστειρωμένου (S) εδάφους για διαφορετικές συνθήκες προεπάσσης και δοκιμής

Προεπάσση	Επάσση	I (gr)	S (gr)	Βλάστηση %
Αέρας	Αέρας	0	100	95,00 ± 3,60
		5	95	92,66 ± 5,77
		25	75	72,00 ± 5,00
		50	50	15,66 ± 8,14
		75	25	18,00 ± 8,66
		95	5	11,66 ± 10,59
		100	0	5,66 ± 5,50
Μεθάνιο	Μεθάνιο	0	100	87,33 ± 12,01
		5	95	93,00 ± 2,64
		25	75	54,66 ± 8,73
		50	50	26,33 ± 5,50
		75	25	40,00 ± 8,54
		95	5	25,66 ± 10,69
		100	0	17,66 ± 7,23
Μεθάνιο	Αιθυλένιο	0	100	95,33 ± 4,04
		5	95	95,33 ± 3,05
		25	75	73,66 ± 3,21
		50	50	46,33 ± 15,14
		75	25	25,66 ± 8,96
		95	5	15,66 ± 10,01
		100	0	9,66 ± 8,08
Αιθυλένιο	Αιθυλένιο	0	100	95,00 ± 3,60
		5	95	97,66 ± 2,31
		25	75	95,33 ± 1,52
		50	50	74,66 ± 5,77
		75	25	72,66 ± 6,11
		95	5	50,66 ± 9,01
		100	0	41,00 ± 9,53
Αιθυλένιο	Ακετυλένιο	0	100	98,66 ± 1,52
		5	95	93,00 ± 2,64
		25	75	75,33 ± 19,00
		50	50	71,00 ± 7,00
		75	25	52,33 ± 20,00
		95	5	26,00 ± 7,54
		100	0	53,33 ± 4,04

Μετασχηματίζοντας την επί τοις εκατό βλάστηση σε μονάδες πιθανότητας (probits) και λαμβάνοντας σαν συγκέντρωση τοξικού παράγοντα τη συγκέντρωση του φυσικού εδάφους (I) προκύπτουν σχέσεις μεταξύ των μονάδων πιθανότητας (probits) και του λογαρίθμου των δόσεων οι οποίες είναι ευθύγραμμες

Από τις γραφικές παραστάσεις που παρουσιάζονται στην εικόνα 2.2.10 και τις σχέσεις που τις διέπουν φαίνεται ότι υπάρχουν ποιοτικές διαφορές στο μηχανισμό της μυκοτάσεως του εδάφους όταν αυτό δέχεται διαφορετικούς χειρισμούς κατά τη φάση προεπάσης.



Εικ. 2.2.10. Ποσοτική εκτίμηση της μυκοστάσεως με τη μέθοδο των αραιώσεων

- 1 Προεπάση σε αέρα, δοκιμή στον αέρα
 $y = 8,9468 - 2,6522x, r^2 = 0,9475$
- 2 Προεπάση σε μεθάνιο, δοκιμή στο μεθάνιο
 $y = 7,0780 - 1,3828x, r^2 = 0,6525$
- 3 Προεπάση σε μεθάνιο, δοκιμή στο αιθυλένιο
 $y = 10,3020 - 3,2009x, r^2 = 0,9771$
- 4 Προεπάση σε αιθυλένιο, δοκιμή στο αιθυλένιο
 $y = 11,5306 - 3,2861x, r^2 = 0,9394$
- 5 Προεπάση σε ακετυλένιο, δοκιμή στο ακετυλένιο
 $y = 7,6204 - 1,3760x, r^2 = 0,8460$

Το αρνητικό σημείο της κλίσης, σε όλες τις περιπτώσεις, δείχνει ότι η αύξηση της συγκεντρώσεως του φυσικού εδάφους έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού βλαστήσεως των σποριών

Στη συνέχεια, αν θελήσουμε να συγκρίνουμε τις τιμές κλίσης των ευθυγράμμων σχέσεων θα διαπιστώσουμε μια κλιμάκωση η οποία μας επιτρέπει να ομαδοποιήσουμε τα αποτελέσματα

Έτσι έχουμε την περίπτωση του μεθανίου και ακετυλενίου όπου οι τιμές κλίσης είναι μικρότερες από αυτή του αέρα. Επιπλέον μπορούμε να υποθέσουμε ότι το μεθάνιο και το ακετυλένιο με βάση τις τιμές κλίσης $-1,3828$ και $-1,3760$ αντίστοιχα, εμφανίζουν τον ίδιο τρόπο δράσης στο μηχανισμό της μυκοστάσεως.

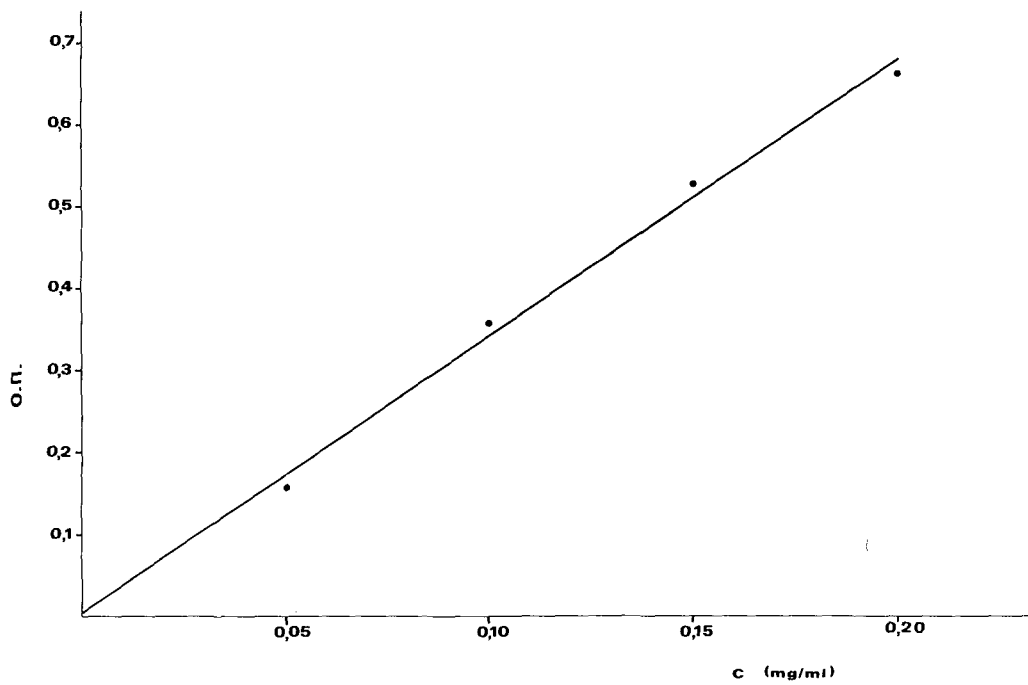
Το αιθυλένιο είτε αυτό εφαρμόζεται σε έδαφος προεπωασμένο σε μεθάνιο, $-3,2009$, είτε σε έδαφος που προέρχεται από προεπάση σε αιθυλένιο, $-3,2861$, συνεπάγεται μια εντονότερη μυκοστατική δράση

2.2.10. Δυνατότητα κατανάλωσης γλυκόζης από ένα ακετυλενότροφο βακτήριο παρουσία-απουσία ακετυλενίου

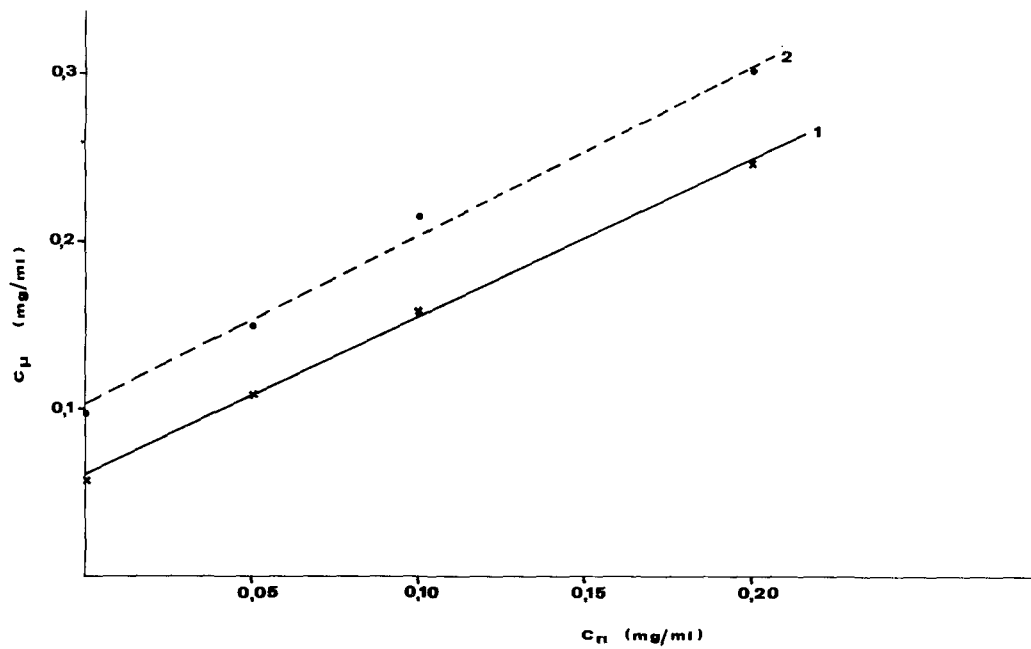
Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας του ακετυλενοτρόφου βακτηρίου έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς της εικόνας 2.2.11 και τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στην εικόνα 2.2.12

Απλή επισκόπηση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι.

- Η προσθήκη των 5 ml υγρής καλλιέργειας ακετυλενοτρόφου βακτηρίου είχε σαν αποτέλεσμα να μετρηθεί μια ποσότητα αναγωγικών ζαχάρων που αντιστοιχεί με 0,057 mg γλυκόζης/ml. Με δεδομένο όμως ότι αυτή η ποσότητα των 5 ml αραιώθηκε στα 10 ml με στείρο θρεπτικό υλικό απαλλαγμένο από οποιαδήποτε πηγή άνθρακα, η αρχική συγκέντρωση της υγρής καλλιέργειας σε αναγωγικά ζάχαρα πρέπει να ήταν της τάξης των 0,114 mg/ml.
- Οι ποσότητες αναγωγικών ζαχάρων που μετρήθηκαν στα διάφορα επίπεδα προστιθέμενης γλυκόζης, στα δείγματα που επώασθηκαν στον αέρα, δείχνουν μια σταθερή διαφορά 0,057 mg γλυκόζης/ml σε σχέση με την καμπύλη αναφοράς. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι το ακετυλενότροφο αυτό βακτήριο δεν χρησιμο-



Εικ. 2.2.11. Καμπύλη για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αναγωγικών ζαχάρων
 $C = -0,0003 + 0,2956 \text{ O.P.}$, $r^2 = 0,9916$



Εικ. 2.2.12. Γραφική παράσταση της σχέσεως που συνδέει τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης με τις συγκεντρώσεις αναγωγικών ζαχάρων που μετρήθηκαν
 1 Επώαση στον αέρα: $C_{\mu} = 0,0600 + 0,9371 C_n$ $r^2 = 0,9982$
 2 Επώαση στο ακετυλένιο: $C_{\mu} = 0,1004 + 1,0269 C_n$ $r^2 = 0,9931$

ποίησε τη γλυκόζη που του δόθηκε ούτε όμως και παράγαγε, υπ' αυτές τις συνθήκες επώασης, αναγωγικά ζάχαρα

- Τα δείγματα που επώασθηκαν σε ατμόσφαιρα με 10% ακετυλένιο παρουσίασαν μια ανάπτυξη που εκφράσθηκε σαν αύξηση, ίση περίπου με 0,040 mg αναγωγικών ζαχάρων/ml. Η αύξηση αυτή εμφανίζεται είτε απουσία γλυκόζης είτε παρουσία αυτής

2.2.11. Επίδραση της ακεταλδεϋδης στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides

Η μελέτη της επίδρασης της ακεταλδεϋδης στη βλάστηση των σπορίων κρίθηκε σκόπιμη επειδή έχει αναφερθεί (Bonté De J.A.M. and Peck M.W. 1980) σαν πιθανό προϊόν μεταβολισμού των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων.

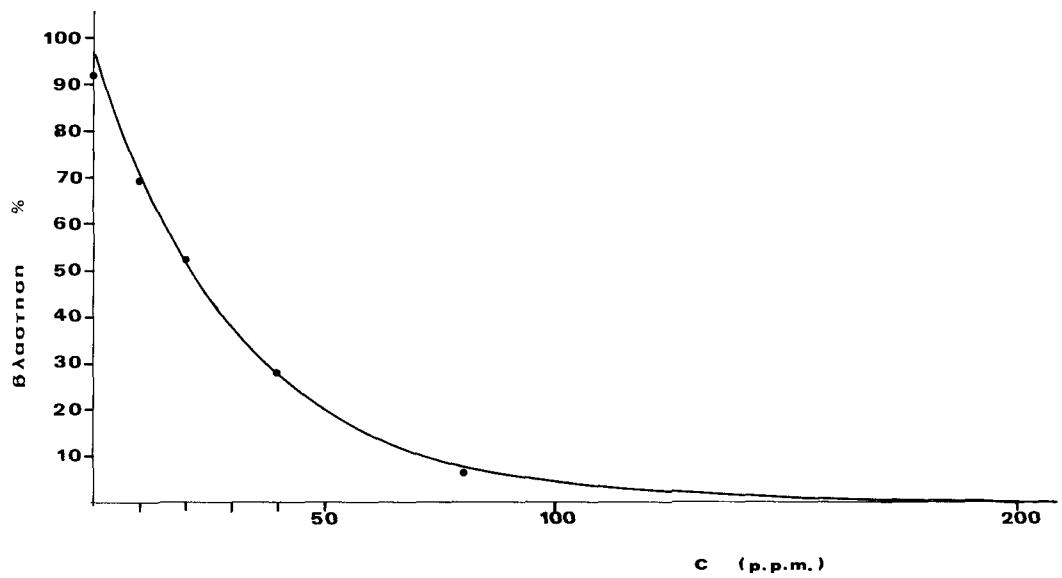
Όπως προκύπτει από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων ακολουθεί εκθετική σχέση όταν τα δεδομένα τεθούν στους άξονες συντεταγμένων όπως έχουν δηλαδή η μεν συγκέντρωση σε p.p.m. η δε βλάστηση σε ποσοστά επί τοις εκατό (εικ. 2.2 13).

Το ίδιο ικανοποιητικά εκπληρείται και η ευθύγραμμη σχέση όταν τα δεδομένα μετασχηματισθούν σε μονάδες πιθανότητας (probits) και σε log της δόσεως (εικ 2.2 14).

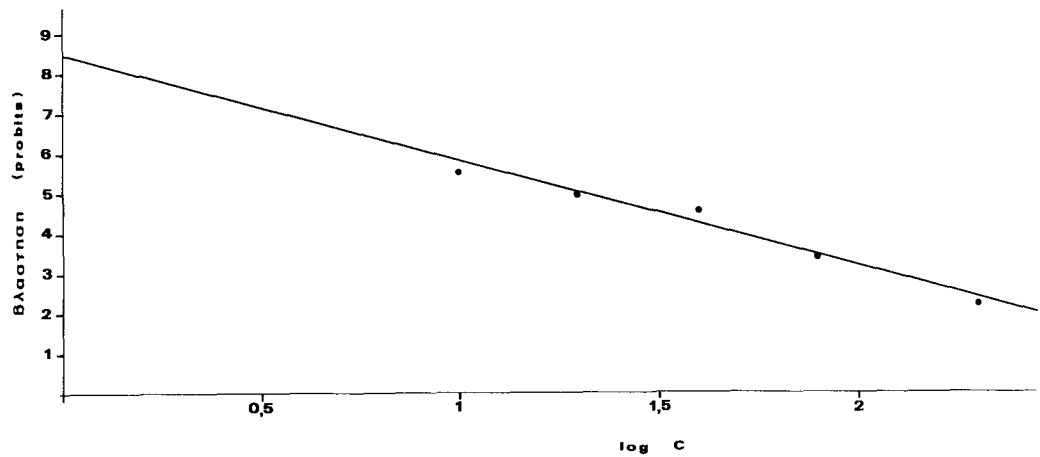
Οι τιμές του LD₅₀ που υπολογίσθηκαν τόσο με την εκθετική εξίσωση όσο και με την εξίσωση ευθείας μετά από μετασχηματισμό, 19,44 p.p m. και 19,75 ppm αντίστοιχα, όπως διαπιστώνουμε είναι περίπου ίδιες

2.2.12. Επίδραση αμμωνιακών και νιτρικών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides in vitro

Τα αποτελέσματα των δοκιμών βλάστησης υπό την επίδραση του θειικού αμμωνίου (NH₄)₂SO₄ και νιτρώδους νατρίου NaNO₂, δείχνουν την άμεση συνάρτηση της παρεμπόδισης της βλαστήσεως από τις συγκεντρώσεις αμμωνίου NH₄⁺ και αμμωνίας NH₃, νιτρικών NO₂⁻ και νιτρώδους οξέος HNO₂ καθώς επίσης και από το pH.



Εικ. 2.2.13. Επίδραση της ακεταλδεϋδης στη βλάστηση των σπορίων του A. arthrobotryoides
 $y = 96,265 \cdot e^{-0,032C}$, $r^2 = 0,995$, $LD_{50} = 19,44$ ppm



Εικ. 2.2.14. Γραφική παράσταση της σχέσεως που συνδέει τη βλάστηση των σπορίων του A. arthrobotryoides, εκπεφρασμένη σε μονάδες πιθανότητας (probits) με το λογάριθμο της συγκεντρώσεως της ακεταλδεϋδης $P = 8,441 - 2,656 \log C$, $r^2 = 0,964$, $LD_{50} = 19,750$ ppm

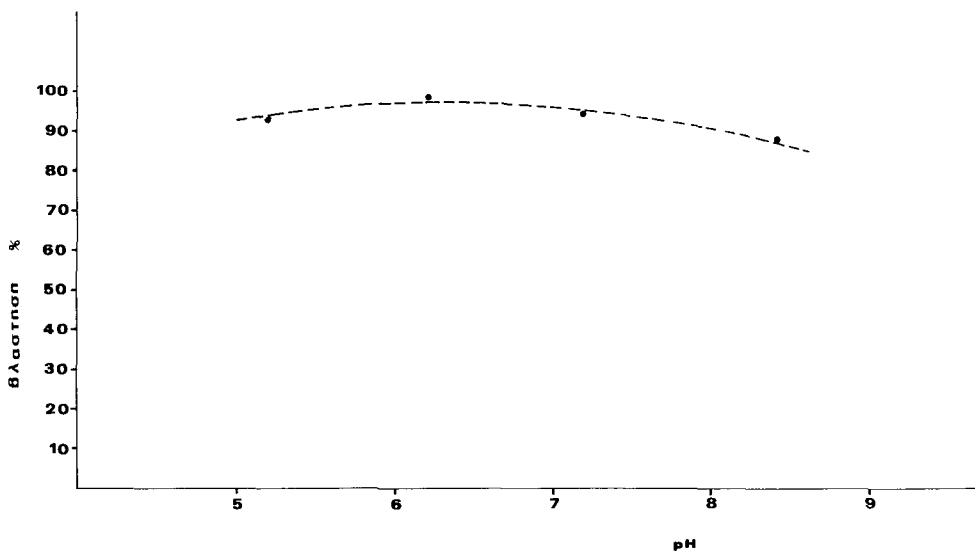
Για μια περισσότερο σαφή παρουσίαση των αποτελεσμάτων κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι παράγοντες αυτοί χωριστά

Επίδραση του pH

Είναι γνωστό ότι η βλάστηση των σπορίων ενός μύκητα επηρεάζεται από το pH περισσότερο απ' ό τι η αύξησή του. Επιπλέον αναλύσεις αποτελεσμάτων σχετικών με την επίδραση του pH στη βλάστηση των σπορίων δείχνουν ότι το είδος του μύκητα, ακόμα και το στέλεχος, ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος, η περιεκτικότητα σε θρεπτικούς παράγοντες και η προηγούμενη καλλιεργητική ιστορία του μύκητα αποτελούν στοιχεία που ρυθμίζουν την ανταπόκριση των σπορίων στη δράση του pH (Cohrane V.W. 1963)

Για τις συνθήκες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.1 η βλάστηση των σπορίων του μύκητα *A. arthrobotryoides* σε συνάρτηση με το pH ακολουθεί τη σχέση που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.2.15

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η επίδραση του pH στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα είναι σχεδόν αμελητέα, τουλάχιστο για την κλίμακα pH που έγινε το πείραμα.



Εικ. 2.2.15. Επίδραση του pH στη βλάστηση των σπορίων του *A. arthrobotryoides* $y = 0,991 + 30,226x - 2,377x^2$, $r^2 = 0,910$

Επίδραση των νιτρωδών NO_2^-

Για να μελετηθεί η επίδραση των νιτρωδών NO_2^- στη βλάστηση των σπορίων δοκιμάστηκαν, αρχικά πέντε συγκεντρώσεις NaNO_2 σε τέσσερις διαφορετικές τιμές pH

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 (μάρτυρας), 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm και 2000 ppm σε τιμές pH από 5 έως 8

Τα αποτελέσματα των δοκιμών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.4

Πιν. 2.2.4. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλαστήσεως σε διάφορες συγκεντρώσεις νιτρωδών και τιμών pH

NO_2^- ppm	pH	Βλάστηση %	NO_2^- ppm	pH	Βλάστηση %
0	5,20	93,33 ± 0,58	0	7,17	94,00 ± 2,00
500	5,20	0,33 ± 0,58	500	7,17	75,33 ± 2,52
1000	5,30	0,00	1000	7,16	42,33 ± 10,97
1500	5,30	0,00	1500	7,17	27,00 ± 14,73
2000	5,35	0,00	2000	7,17	5,67 ± 6,43
0	6,20	98,67 ± 0,58	0	8,39	87,67 ± 8,74
500	6,18	21,67 ± 4,04	500	8,38	85,00 ± 2,65
1000	6,18	0,00	1000	8,32	62,00 ± 7,55
1500	6,18	0,00	1500	8,39	27,67 ± 12,06
2000	6,18	0,00	2000	8,37	11,67 ± 4,04

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 2.2.4 συνάγεται ότι

- για όλες τις τιμές pH, το ποσοστό βλαστήσεως μειώνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων,
- για την ίδια συγκέντρωση νιτρωδών έχουμε διαφορετικό ποσοστό βλάστησης στις διάφορες τιμές pH που δοκιμάστηκαν. Ενώ σε $\text{pH} \approx 5$ η συγκέντρωση νιτρωδών της τάξης των 500 ppm έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη παρεμπόδιση της βλάστησης, σε $\text{pH} \approx 8$ το ποσοστό βλαστήσεως φθάνει το 85%. Δηλαδή, για την ίδια συγκέντρωση νιτρωδών το ποσοστό βλάστησης των σπορίων αυξάνει με την αύξηση του pH
- η πτώση του ποσοστού βλαστήσεως σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση νιτρωδών είναι περισσότερο απότομη στην όξινη περιοχή

pH ≈ 5 και pH ≈ 6, απ' ό τι στην ουδέτερη pH ≈ 7 και αλκαλική pH ≈ 8

Συμπερασματικά, λοιπόν, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα νιτρώδη NO₂⁻ παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides και ότι η παρεμπόδιση αυτή επηρεάζεται ποσοτικά και ποιοτικά από το pH.

Επίδραση του νιτρώδους οξέος

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του νιτρώδους οξέος στις διάφορες τιμές pH χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$pH = pK_a + \log \frac{[NO_2^-] - [HNO_2]}{[HNO_2]} \quad (1)$$

από την οποία έχουμε.

$$[HNO_2] = \frac{[NO_2^-]}{10^{pH-pK_a} + 1} \quad (2)$$

Όπως φαίνεται από την εξίσωση (2) η συγκέντρωση του νιτρώδους οξέος επηρεάζεται από τις τιμές του pH

Έτσι λοιπόν για κάθε συγκέντρωση νιτρώδων NO₂⁻ υπολογίσθηκαν οι τιμές των συγκεντρώσεων νιτρώδους οξέος για τα pH που δοκιμάσθηκαν

Στον πίνακα 2.2.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών και τα αντίστοιχα ποσοστά βλαστήσεως

Πιν. 2.2.5. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλαστήσεως στις διάφορες συγκεντρώσεις νιτρώδους οξέος

NO ₂ ⁻ ppm	pH	HNO ₂ ppm	Βλάστηση %	NO ₂ ⁻ ppm	pH	HNO ₂ ppm	Βλάστηση %
500	8,38	0,0049	85,00 ± 2,65	1500	8,39	0,0143	27,67 ± 12,06
	7,17	0,0792	75,33 ± 2,52		7,17	0,2377	27,00 ± 14,73
	6,18	0,7732	21,67 ± 4,04		6,18	2,3196	0,00
	5,20	7,2877	0,33 ± 0,58		5,30	17,4188	0,00
1000	8,32	0,0112	62,00 ± 7,55	2000	8,37	0,0200	11,67 ± 4,04
	7,16	0,1622	42,34 ± 10,97		7,17	0,3169	5,67 ± 6,43
	6,18	1,5464	0,00		6,18	3,0928	0,00
	5,30	11,6125	0,00		5,35	20,7255	0,00

Μια απλή επισκόπηση των αποτελεσμάτων του πίνακα 2.2.5 οδηγεί στις ακόλουθες διαπιστώσεις:

- Το ποσοστό βλαστήσεως των σπορίων μειώνεται με την αύξηση της συγκεντρώσεως του νιτρώδους οξέος. Η επίδραση αυτή του νιτρώδους οξέος εμφανίζεται σε όλες τις συγκεντρώσεις νιτρωδών. Παρατηρώντας τα ποσοστά βλαστήσεως που αναφέρονται σε συγκέντρωση νιτρωδών $[\text{NO}_2^-] = 500 \text{ ppm}$ διαπιστώνουμε ότι ενώ σε συγκέντρωση νιτρώδους οξέος $[\text{HNO}_2] = 0,0049 \text{ ppm}$ το ποσοστό βλαστήσεως είναι 85%, όταν το νιτρώδες οξύ φτάσει τα 7,3 ppm το ποσοστό βλαστήσεως μειώνεται στο 0,33%.
- Η παρεμπόδιση της βλάστησης επηρεάζεται όχι μόνο από τη συγκέντρωση του νιτρώδους οξέος αλλά και από τη συγκέντρωση του νιτρώδους ιόντος. Έτσι εμφανίζεται το φαινόμενο όπου σε συγκέντρωση νιτρώδους οξέος $[\text{HNO}_2] = 0,02 \text{ ppm}$ να έχουμε ποσοστό βλάστησης 11,67%, ενώ σε $[\text{HNO}_2] = 0,08 \text{ ppm}$, σε τετραπλάσια δηλαδή συγκέντρωση, η βλάστηση είναι της τάξης του 75,33%. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στη συμμετοχή του εν διαστάσει ιόντος που στη μεν πρώτη περίπτωση η συγκέντρωση του φθάνει τα 2000 ppm ενώ στη δεύτερη τα 500 ppm.

Επίδραση του αμμωνίου NH_4^+

Για να μελετηθεί η επίδραση του αμμωνίου στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides, χρησιμοποιήθηκε θειικό αμμώνιο σε συγκεντρώσεις 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm και σε τιμές pH από 5 έως 8.

Τα αποτελέσματα του πειράματος όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.6. δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την υπόθεση ότι το αμμώνιο NH_4^+ ασκεί παρεμποδιστική δράση στη βλάστηση των σπορίων τουλάχιστο για τις συγκεντρώσεις αμμωνίου που δοκιμάστηκαν και για τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Πιν. 2.2.6. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλάστησως των σποριών στις διάφορες συγκεντρώσεις αμμωνίου [NH₄⁺]

NH ₄ ⁺	pH	Βλάστηση %	NH ₄ ⁺	pH	Βλάστηση %
0	5,20	93,33 ± 0,58	0	7,17	94,00 ± 2,00
50	5,18	93,67 ± 1,15	50	7,18	90,33 ± 1,53
100	5,17	90,00 ± 1,00	100	7,18	84,33 ± 5,69
150	5,18	85,33 ± 3,51	150	7,19	84,67 ± 5,03
200	5,19	86,33 ± 4,04	200	7,19	76,33 ± 5,69
0	6,20	98,67 ± 0,58	0	8,39	87,67 ± 8,74
50	6,18	97,00 ± 2,65	50	8,33	77,67 ± 8,08
100	6,17	96,00 ± 1,00	100	8,28	77,00 ± 7,07
150	6,18	95,00 ± 2,00	150	8,25	71,00 ± 2,83
200	6,20	92,00 ± 3,00	200	8,22	64,33 ± 11,50

Επίδραση της αμμωνίας NH₃

Οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας, για τις διάφορες συγκεντρώσεις (NH₄)₂SO₄ στα pH που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν με βάση τη σχέση

$$pH = pka + \log \frac{[NH_3]}{[NH_4^+] - [NH_3]} \quad (1)$$

από την οποία

$$[NH_3] = \frac{[NH_4^+]}{1 + 10^{pH-pka}}$$

Και εδώ παρατηρούμε, όπως και στην περίπτωση του νιτρώδους οξέος ότι η συγκέντρωση της αμμωνίας εξαρτάται από το pH

Βέβαια, εδώ η αύξηση της συγκεντρώσεως είναι ανάλογη της αύξησης του pH

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.7. διαπιστώνουμε ότι η αμμωνία μπορεί να θεωρηθεί παρεμποδιστής της βλαστήσεως των σπορίων μόνο στις περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις της είναι πάνω από 10 ppm.

Πίν. 2.2.7. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλαστήσεως στις διάφορες συγκεντρώσεις αμμωνίας

NH ₄ ⁺	NH ₃	pH	Βλάστηση %	NH ₄ ⁺	NH ₃	pH	Βλάστηση %
50	0,0043	5,18	93,67 ± 1,15	150	0,0128	5,18	85,33 ± 3,51
	0,0425	6,18	97,00 ± 2,65		0,1276	6,18	95,00 ± 2,00
	0,4220	7,18	90,33 ± 1,53		1,2952	7,19	84,67 ± 5,03
	5,3662	8,33	77,67 ± 8,08		13,6364	8,25	71,00 ± 2,83
100	0,0083	5,17	90,00 ± 1,00	200	0,0174	5,19	86,33 ± 4,04
	0,0831	6,17	96,00 ± 1,00		0,1781	6,20	92,00 ± 3,00
	0,8440	7,18	84,33 ± 5,69		1,7269	7,19	76,33 ± 5,69
	9,6782	8,28	77,00 ± 7,07		17,0718	8,22	64,33 ± 11,50

Ταυτόχρονη επίδραση θειικού αμμωνίου και νιτρώδους νατρίου (NH₄)₂SO₄ + NaNO₂

Εκτός από τη μελέτη της ξεχωριστής επιδράσεως των αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα *A. arthrobotryoides* κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ταυτόχρονη επίδρασή τους. Για να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δοκιμών βλαστήσεως χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις νιτρωδών και αμμωνιακών ιόντων και στην αυτή κλίμακα pH. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι το πείραμα αυτό όπως και τα δυο προηγούμενα που αφορούν την επίδραση των αμμωνιακών και νιτρωδών διεξήχθησαν παράλληλα, με όμοιους πληθυσμούς σπορίων του μύκητα *A. arthrobotryoides* και με σταθερές τις λοιπές πειραματικές συνθήκες

Πίν. 2.2.8. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλάστησης των σπορίων στις διάφορες συγκεντρώσεις μίγματος αμμωνίου και νιτρώδους ιόντος

NO ₂	NH ₄ ⁺	pH	Βλάστηση %	NO ₂	NH ₄ ⁺	pH	Βλάστηση %
0	0	5,20	93,33 ± 0,58	0	0	7,17	94,00 ± 2,00
500	50	5,25	0	500	50	7,18	32,33 ± 10,41
1000	100	5,27	0	1000	100	7,19	19,33 ± 9,02
1500	150	5,33	0	1500	150	7,18	7,33 ± 7,77
2000	200	5,35	0	2000	200	7,18	1,00 ± 1,00
0	0	6,20	98,67 ± 0,58	0	0	8,39	87,67 ± 8,74
500	50	6,18	6,33 ± 3,51	500	50	8,28	46,00 ± 8,89
1000	100	6,19	0	1000	100	8,27	37,67 ± 8,14
1500	150	6,18	0	1500	150	8,26	23,33 ± 8,33
2000	200	6,19	0	2000	200	8,24	9,00 ± 5,20

Διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 2 2 8 και αυτά των πινάκων 2 2.4. και 2 2 6. προκύπτει αβίαστα ότι η ταυτόχρονη παρουσία αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων ασκεί εντονότερη παρεμπόδιστική δράση απ' ότι το κάθε ένα χωριστά.

2.2.13. Μαθηματική ανάλυση της επιδράσεως αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides

Η μαθηματική διαπίστωση της επιδράσεως αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides βασίσθηκε στην εξίσωση

$$(1) y = 100 (1 + h)e^{-n \cdot x}$$

και

$$(2) n = a C^b$$

όπου, a, b = σταθερές

C = συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα

Οι τιμές του n έχουν υπολογισθεί από την εξίσωση (1), αφού όμως προηγηθεί αναγωγή για $y_0 = 100$ και παρουσιάζονται στο παράρτημα 2

* Κ. Μπαλής: Προσωπική ανακοίνωση από αδημοσίευτη εργασία.

Επειδή τα πειραματικά δεδομένα για την κλίμακα συγκεντρώσεων νιτρωδών που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2 4, είναι περιορισμένα για τις τιμές pH = 5 και pH = 6 θεωρήθηκε απαραίτητο να εξετασθεί η επίδραση των νιτρωδών εφαρμόζοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού εμφανίζονται στον πίνακα 2 2 9

Πίν. 2.2.9. Ποσοστά της επί τοις εκατό βλάστησης των σποριών σε διάφορες συγκεντρώσεις νιτρώδους ιόντος NO_2^-

NO_2^-	pH	HNO_2	Βλάστηση %	NO_2^-	pH	HNO_2	Βλάστηση %
0	5,14	0	93,33 ± 0,58	0	6,14	0	98,67 ± 0,58
5	5,13	0,085	71,74 ± 3,21	50	6,13	0,087	89,48 ± 7,09
10	5,14	0,167	52,58 ± 3,46	100	6,14	0,169	80,30 ± 0,58
15	5,14	0,250	39,95 ± 2,89	150	6,14	0,254	60,56 ± 6,03
20	5,14	0,334	27,72 ± 10,02	200	6,14	0,339	54,10 ± 7,55

Με βάση λοιπόν τα πειραματικά δεδομένα των πινάκων 2 2 4 και 2.2 9 υπολογίσθηκαν τα αντίστοιχα n και οι τιμές του ED_{50} για τις συγκεντρώσεις του νιτρώδους ιόντος και του νιτρώδους οξέος στα διάφορα pH (πίνακας 2 2 10)

Πίν. 2.2.10. Τιμές n και ED_{50} για το νιτρώδες ιόν και νιτρώδες οξύ

NO_2			
pH	n	r^2	ED_{50}
5	$0,292 C^{0,705}$	0,998	11,95
6	$0,019 C^{0,831}$	0,973	219,69
7	$5,7 \times 10^{-4} C^{1,167}$	0,977	938,66
8	$2,193 \times 10^{-6} C^{1,890}$	0,966	1297,47
HNO_2			
5	$5,294 C^{0,715}$	0,998	0,200
6	$3,912 C^{0,848}$	0,976	0,369
7	$15,478 C^{1,169}$	0,977	0,149
8	$5895,931 C^{1,884}$	0,985	0,013

Στις εικόνες 2.2.16 και 2.2.17 παρουσιάζονται οι καμπύλες που εκφράζουν τα επί τοις εκατό ποσοστά βλαστήσεως σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρικών οξέος.

Παρατηρώντας προσεκτικά τα αποτελέσματα του πίνακα 2.2.10. διαπιστώνουμε ότι υπάρχει μια σημαντική μεταβολή των τιμών $E D_{50}$ σε συνάρτηση με τις τιμές του pH. Έτσι, για το νιτρικό ιόν εμφανίζεται ότι για pH = 5 η τιμή $E D_{50}$ είναι 11,95 ppm ενώ σε pH = 8 η τιμή αυτή φτάνει τα 1297,47 ppm. Οι διαφορές αυτές των τιμών $E D_{50}$ που συνεπάγονται και διαφορές στη δραστηριότητα του νιτρικού ιόντος δεν μπορούν να ερμηνευθούν παρά μόνο αν λάβουμε υπόψη μας και τη συνύπαρξη του νιτρικού οξέος η συγκέντρωση του οποίου εξαρτάται από το pH.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα και τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μαθηματική διατύπωσή τους θα προσπαθήσουμε να εκτιμήσουμε ποσοτικά τη δράση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά

Στον πίνακα 2 2.10. παρατηρούμε ότι για συγκεντρώσεις νιτρικού ιόντος από 50 ppm – 200 ppm εμφανίζεται μια ευνοϊκή επίδραση του νιτρικού ιόντος στη βλάστηση των σπορίων. Επομένως, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι για pH = 5, όπου η συγκέντρωση του νιτρικού ιόντος κυμαίνεται από 5 ppm έως 20 ppm η οποιαδήποτε παρεμπόδιση στη βλάστηση οφείλεται στο νιτρικό οξύ Έτσι μπορούμε να αποδεχθούμε ότι οι εξισώσεις που εκφράζουν ποσοτικά τη δράση του νιτρικού οξέος είναι

$$(3) n = 5,294 \cdot C^{0,715} \quad \hat{r}^2 = 0,998$$

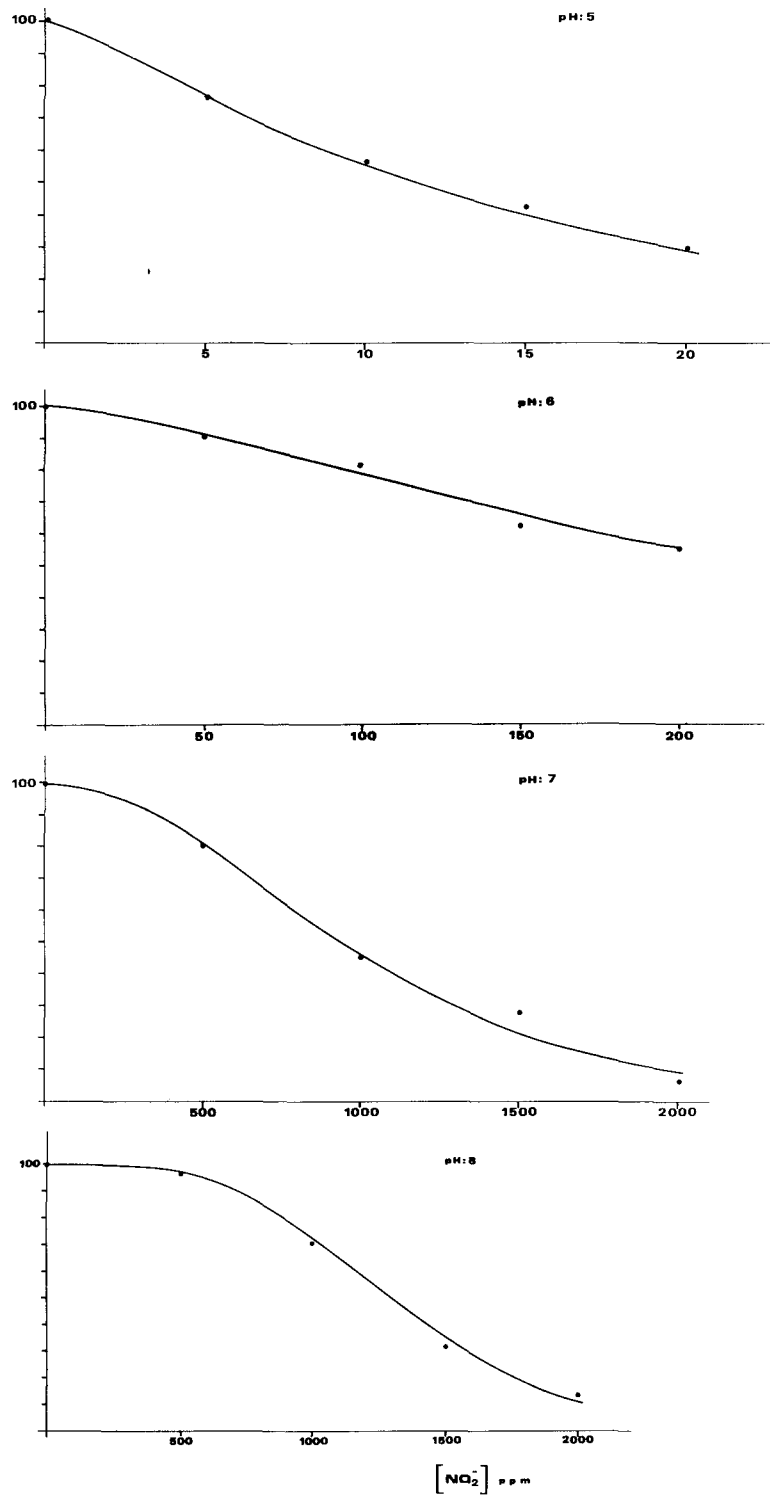
από την οποία υπολογίζουμε $E D_{50} = 0,200$ ppm, και

$$(4) y = 100 (1 + n) e^{-n}$$

Οι τιμές y θεωρ. % του πίνακα 2 2.11 υπολογίσθηκαν εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 3 και 4 για τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές συγκεντρώσεως C .

Πίν. 2.2.11. Πειραματικές και θεωρητικές τιμές βλάστησης που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις νιτρικού οξέος για pH = 8

C (ppm)	y θεωρ (%)	y πειρ (%)
0,0049	99,36	96,95
0,0112	98,02	70,72
0,0143	97,27	31,56
0,0200	95,78	13,31



Εικ. 2.2.16. Επίδραση των νιτρωδών ιόντων στη βλάστηση των σπορίων του A. arthrotyroides

Όπως διαπιστώνουμε από τη σύγκριση των πειραματικών και θεωρητικών τιμών βλάστησης του πίνακα 2 2 11. οι συγκεντρώσεις του νιτρώδους οξέος μόνο θα προκαλούσαν μια αμελητέα παρεμπόδιση στη βλάστηση και οπωσδήποτε πολύ χαμηλότερη από αυτήν που παρατηρήθηκε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η παρεμπόδιση που παρατηρείται οφείλεται κατά κύριο λόγο στις συγκεντρώσεις του νιτρώδους ιόντος και κατά συνέπεια οι εξισώσεις που θα εκφράζουν ποσοτικά τη δράση του νιτρώδους ιόντος θα είναι:

$$(5) \quad n = 2,193 \times 10^{-6} \cdot C^{1,890} \quad r^2 = 0,966$$

από την οποία υπολογίζουμε $E D_{50} = 1297,47$

Με βάση την εξίσωση (5) μπορούμε να ελέγξουμε την αρχική μας υπόθεση ότι το νιτρώδες ιόν, για τις συγκεντρώσεις 0-20 ppm δεν ασκεί παρεμποδιστική δράση

Πράγματι, οι τιμές βλάστησης που προκύπτουν από την εξίσωση $y = 100 (1 + n)e^{-n}$, όπου $n = 2,193 \times 10^{-6} \cdot C^{1,890}$ είναι της τάξης του 100%

Εφαρμόζοντας αντίστοιχη ανάλυση για το αμμωνιακό ιόν και την αμμωνία καταλήγουμε ότι οι επιδράσεις τους στη βλάστηση των σπορίων εκφράζονται ποσοτικά από τις ακόλουθες εξισώσεις:

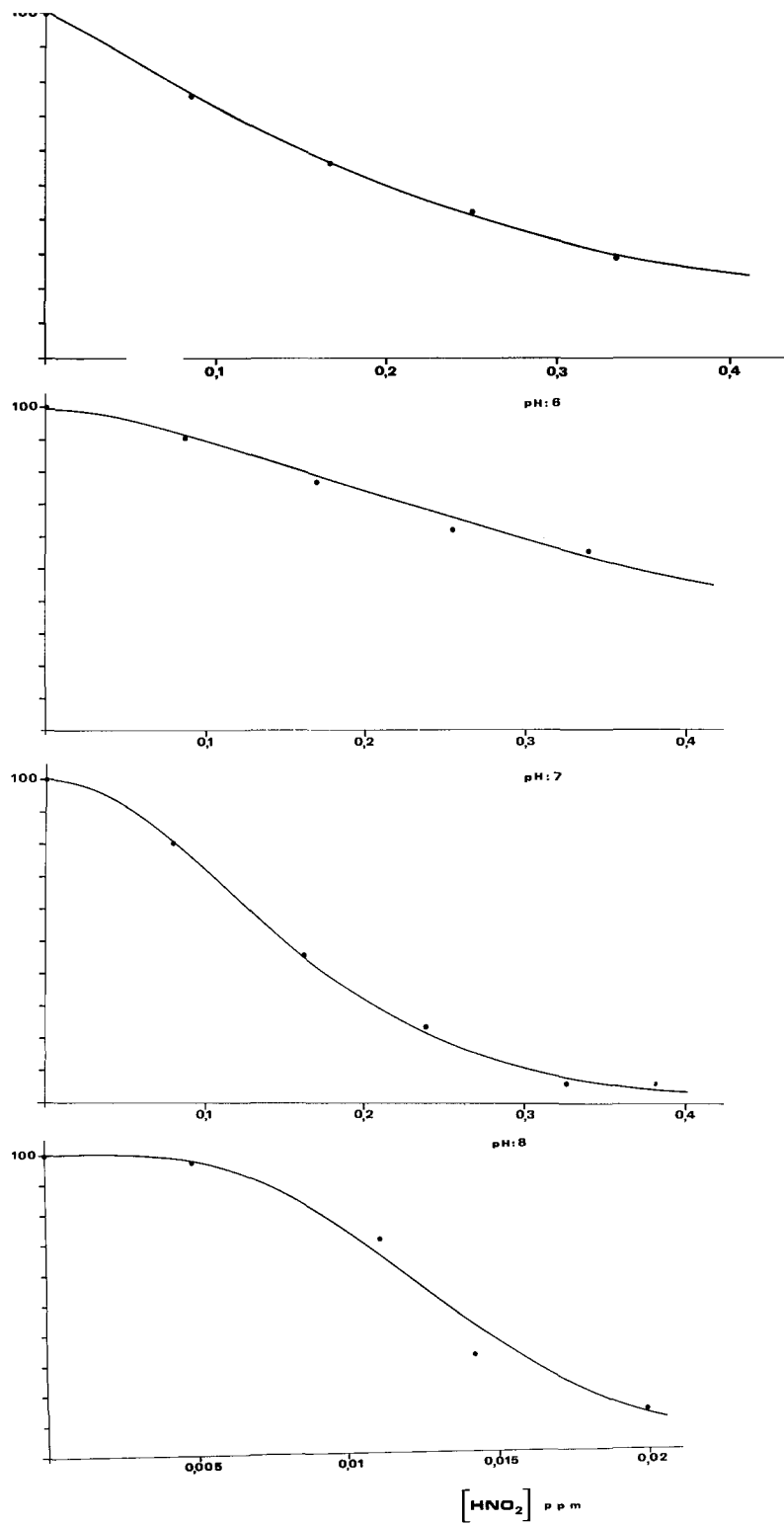
$$(6) \quad n = 0,017 \quad C^{0,639} \quad r^2 = 0,700 \quad \text{και} \quad E D_{50} = 1321,4$$

$$(7) \quad n = 0,244 \quad C^{0,464} \quad r^2 = 0,802 \quad \text{και} \quad E D_{50} = 63,79$$

Αν χρησιμοποιήσουμε αυτή τη μαθηματική διατύπωση και στην περίπτωση του μίγματος θειικού αμμωνίου και νιτρώδους νατρίου, δεχόμενοι ότι η ύπαρξη του ενός δεν επηρεάζει τη δράση του άλλου αλλά απλώς ότι δρουν αθροιστικά, καταλήγουμε στην εξίσωση:

$$(8) \quad y = 100 (1 + n_1) (1 + n_2) e^{-(n_1+n_2)}$$

Η εφαρμογή της εξισώσεως (8) με $n_1 = 2,193 \times 10^{-6} \cdot C^{1,890}$ και $n_2 = 0,244 \cdot C^{0,464}$ μας δίνει τις θεωρητικές τιμές βλάστησης για pH = 8.



Εικ. 2.2.17. Επίδραση του νιτρώδους οξέος στη βλάστηση των σποριών του A. arthrotruncidus

Πίν. 2.2.12. Πειραματικές και θεωρητικές τιμές βλάστησης που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις νιτρώδους ιόντος και αμμωνίας για pH = 8

C ₁ (ppm)	C ₂ (ppm)	γ θεωρ (%)	γ πειρ (%)
500	5,3662	83,95	52,47
1000	9,6782	55,51	42,97
1500	13,6364	24,16	26,61
2000	17,0718	6,64	10,27

Από τα δεδομένα του πίνακα 2 2 12 προκύπτει ότι, στις χαμηλές συγκεντρώσεις, οι πειραματικές τιμές είναι κατά πολύ κατώτερες από εκείνες που προβλέπονται από την εφαρμογή της εξίσωσης 8 Έτσι, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι οι υπό μελέτη παράγοντες όταν συνυπάρχουν δρουν μάλλον συνεργιστικά παρά απλώς αθροιστικά.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια και μελέτη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν αέριους υδρογονάνθρακες σαν μοναδική πηγή ενέργειας και άνθρακα είναι ένας τομέας που έλκει το αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών.

Η πρώτη διαπίστωση που αφορούσε τη μικροβιολογική οξειδωση αερίου υδρογονάνθρακα έγινε από τον Kaserer το 1905 και αναφέρεται στην οξειδωση μεθανίου από οργανισμό του εδάφους. Σχεδόν αμέσως επιτυγχάνεται και η απομόνωση βακτηρίου, από τον Söhngen το 1906, ικανού να αυξάνει δαπάναις μεθανίου.

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πολλά μεθανότροφα βακτήρια, κυρίως μετά την κλασική εργασία του Whittenbury και των συνεργατών του (Whittenbury R. et al 1970).

Εκτός όμως από το μεθάνιο και άλλοι αέριοι υδρογονάνθρακες έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υποστρώματα για την αύξηση βακτηρίων που ανήκουν συνήθως στα γένη Mycobacterium, Pseudomonas, Nocardia, Streptomyces, Flavobacter, Alcaligenes, Brevibacter, Corynebacterium, Bacillus.

Το ενδιαφέρον των περισσότερων ερευνητών έχει εντοπισθεί κυρίως στην κατανόηση της βιολογίας και βιοχημείας των μικροοργανισμών αυτών ενώ αντίθετα ελάχιστες εργασίες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την οικολογία και το ρόλο τόσο των αερίων υδρογονανθράκων όσο και των βακτηρίων που τους αποδομούν στα διάφορα οικοσυστήματα.

Ενδείξεις για την παρουσία ακετυλενοτρόφων και αιθυλενοτρόφων μικροβιακών πληθυσμών στο έδαφος υπήρχαν από το γεγονός ότι τα βιολογικώς ενεργά εδάφη, όχι όμως τα αποστειρωμένα, διέθεταν την ικανότητα να καταναλίσκουν αιθυλένιο και ακετυλένιο (Abeles F.B. et al. 1971, Abeles F.B. 1973, Smith K.A. et al 1973).

Βακτήρια ικανά να αναπτύσσονται με μόνη πηγή άνθρακα τα αέρια αυτά απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο από τους Kanner και Bartha (Kanner D. and Bartha R. 1979, 1982) και σχεδόν ταυτόχρονα από τον De Bont και συνεργάτες του (Bont De J.A.M. and W.M. Peck 1980, Bont De J.A.M. et al 1980).

Η ύπαρξη τέτοιων βακτηρίων που να διαθέτουν την ικανότητα να αναπτύσσονται δαπάναις αιθυλενίου ή ακετυλενίου αντίστοιχα επιβεβαιώθηκε και σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με αντίστοιχες προηγούμενες παρατηρήσεις (Abeles F.B. *et al* 1971, Abeles F.B. 1973, Smith K.A. *et al* 1973, Kanner D. and Bartha R. 1979, 1982, Bont De J.A.M. and Peck W.M. 1980, Bont De J.A.M. *et al* 1980) επιτρέπει να διατυπωθεί η άποψη ότι αιθυλενότροφοι και ακετυλενότροφοι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι ευρύτατα διαδεδομένοι στα φυσικά εδάφη

Μια πρώτη διαπίστωση που προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι ότι ο πληθυσμός των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων δείχνει να είναι ανάλογος της ικανότητας του οικοσυστήματος για βιολογική παραγωγή αιθυλενίου. Αντίθετα, ο πληθυσμός των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων, μιας και το ακετυλένιο μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί ότι παράγεται βιολογικά φαίνεται ότι σχετίζεται με την παρουσία αυτού του αερίου σαν αποτέλεσμα ανθρωπογενών δραστηριοτήτων

Το αιθυλένιο και το ακετυλένιο συμπεριλαμβάνονται στους αέριους ατμοσφαιρικούς ρυπαντές (Urone P. 1976) που προέρχονται κυρίως από τις μηχανές των αυτοκινήτων (Abeles F.B. 1973, Abeles F.B. and Heggestad H.E. 1973, Whitby R.A. and Altwicker E.R. 1978) Το ακετυλένιο, συγκεκριμένα, μολονότι δεν αποτελεί το σημαντικότερο κλάσμα των αερίων υδρογονανθράκων στην ατμόσφαιρα παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί μπορεί και έχει χρησιμοποιηθεί (Whitby R.A. and Altwicker E.R. 1978) σαν δείκτης εκτίμησης της συμμετοχής των αυτοκινήτων στη ρύπανση της ατμόσφαιρας.

Για το αιθυλένιο είναι γνωστό ότι παράγεται και βιολογικά ενώ για το ακετυλένιο άλλες πηγές, πλην του αυτοκινήτου, που μπορεί να θεωρηθούν υπεύθυνες για την παραγωγή του έχουν αναφερθεί τα *διυλιστήρια πετρελαίου*, οι *καύσεις απορριμάτων*, οι *πυρκαγιές*, οι *εξατμίσεις των μηχανών εσωτερικής καύσεως* και οι *εξατμίσεις των μηχανών αεροπλάνων* Χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι το 17% της συνολικής ποσότητας υδρογονανθράκων που εκπέμπονται από πυρκαγιές δασών πεύκης (*Pinus ponderosa*) είναι ακετυλένιο (Whitby R.A. and Altwicker E.R. 1978)

Οι συγκεντρώσεις του ακετυλενίου στην ατμόσφαιρα των περιοχών δειγματοληψίας δεν είναι γνωστές αλλά οι τιμές τους, σύμφωνα με όσα

αναφέρονται στη βιβλιογραφία, μπορεί να κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες rrb στις αστικές περιοχές μέχρι μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις σε αγροτικές περιοχές με περιορισμένες ρυπογόνες δραστηριότητες.

Η διακύμανση στις τιμές των συγκεντρώσεων του ακετυλενίου στην ατμόσφαιρα είναι πολύ μεγάλη και μερικές φορές ανιχνεύεται ακετυλένιο σε περιοχές που η ύπαρξή του δεν δικαιολογείται παρά μόνο αν θεωρηθεί ότι είναι αποτέλεσμα είτε μακροχρόνιας ρυπαντικής επιβάρυνσης της τροπόσφαιρας είτε φυσικών εκπομπών ή και των δυο. Η συμμετοχή της βλάστησης σ' αυτές τις περιοχές θεωρείται μάλλον αμφίβολη.

Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν οι τιμές των συγκεντρώσεων ακετυλενίου στις περιοχές που εξετάστηκαν (και να υπήρχαν θα ήταν περιορισμένης αξίας δεδομένης της μεγάλης διακυμάνσεώς τους), μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η περιοχή του Βοτανικού από την οποία προέρχεται το εδαφικό δείγμα Ε δέχεται τη μεγαλύτερη ρύπανση τόσο από το αυξημένο κυκλοφοριακό της φορτίο, όσο και λόγω γειτνίασης με βιομηχανίες και με τη Δημοτική Επιχείρηση Φωταερίου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι δειγματοληψίες στις περιοχές Α, Β και C έγιναν το καλοκαίρι το 1982 λίγες μέρες πριν την εκδήλωση των πυρκαγιών.

Για την εκτίμηση του πληθυσμού αυτών των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων χωρίς να έχει προηγηθεί η τεχνική του εμπλουτισμού (enrichment technique) στο εργαστήριο.

Η μέθοδος αυτή ίσως να μην είναι η ιδανική για την απομόνωση μικροβιακών ομάδων που βρίσκονται στο έδαφος σε μικρούς αριθμούς για τις οποίες ως γνωστόν ενδείκνυται η τεχνική του εμπλουτισμού. Η μέθοδος των αραιώσεων όπως εφαρμόστηκε εδώ όμως απεικονίζει, μέσα στα πειραματικά όρια, τα πραγματικά πληθυσμιακά επίπεδα αυτών των βακτηρίων στα φυσικά δείγματα.

Λαμβάνοντας υπόψη λοιπόν τα βιβλιογραφικά δεδομένα και τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση ακετυλενοτρόφων βακτηρίων στα δείγματα που εξετάστηκαν οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι ο πληθυσμός των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων στο εδαφικό οικοσύστημα μιας περιοχής εξαρτάται από το ρυπαντικό φορτίο σε υδρογονάνθρακες, που δέχεται και ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης για την εκτίμηση αυτού του φορτίου με μεγαλύτερη ασφάλεια απ' ό,τι οι αναλυτικές μέθοδοι που εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες εργασίες στο εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ανωτάτης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών (Balis C. et al 1984) εφαρμόζοντας τη μέθοδο της μέτρησης της ικανότητας καταναλώσεως ακετυλενίου από εδαφικά δείγματα περιοχών με διαφορετικό ρυπαντικό φορτίο

Εκτός όμως από τη χρήση αυτών των μετρήσεων σαν δεικτών ατμοσφαιρικής ρύπανσης θα μπορούσαν να βοηθήσουν και στην εκτίμηση της μικροβιακής δυνατότητας ενός εδάφους να αποδομεί αέριους ρυπαντές

Είναι γνωστό ότι το έδαφος αποτελεί ένα από τους σημαντικούς αποδέκτες ρυπαντών και με τη βιολογική του δράση συμβάλλει, εντός των ορίων ανοχής του, στη διαδικασία απορύπανσης του περιβάλλοντος (Schlesinger R B. 1979, Bartholomew C W and Alexander M 1981)

Η χρήση του εδάφους σαν σύστημα βιολογικού καθαρισμού έχει γίνει ευρέως αποδεκτή για τα υγρά απόβλητα (Catroux G. et al 1974), ενώ για τους αέριους ρυπαντές δεν έχει εκτιμηθεί ανάλογα, παρά το γεγονός ότι οι ανταλλαγές αερίων μεταξύ της εδαφικής ατμόσφαιρας και της υπερκείμενης είναι σχετικά ταχείες.

Οι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες όπως είναι το αιθυλένιο και το ακετυλένιο προσροφώνται από το έδαφος σε μεγαλύτερα ποσά από ότι οι κεκορεσμένοι (Witt W W and Weber J B 1974) και η ύπαρξή τους στην εδαφική ατμόσφαιρα δεν θα πρέπει να είναι μόνο αποτέλεσμα διάχυσης, αλλά και μεταφοράς τους με το νερό της βροχής κυρίως για το ακετυλένιο που είναι πολύ διαλυτό στο νερό

Η επίδραση του τεχνητού εμπλουτισμού του εδάφους στο εργαστήριο με τους αέριους υδρογονάνθρακες μεθάνιο, αιθυλένιο και ακετυλένιο είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων των υπεύθυνων για την αποδόμησή τους

Διαπιστώνουμε δηλαδή μια «προσαρμογή» της μικροχλωρίδας του εδάφους στις συνθήκες που της επιβλήθηκαν σε κάποια χρονική στιγμή (Stanier R Y 1953)

Χρησιμοποιούμε αυτό τον όρο για να περιγράψουμε την αλλαγή στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μετατροπής των υπό δοκιμή ενώσεων. Αυτός είναι ένας λειτουργικός ορισμός και δεν επιχειρείται η διάκριση των μηχανισμών του που μπορεί να είναι

- επαγωγή ενζύμων,
- επιλογή νέων μεταβολικών ικανοτήτων που προέρχονται από γενετικές αλλαγές (μεταφορά γόνων, μεταλλαγή),
- αύξηση του αριθμού των οργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση των υπό μελέτη ουσιών

Είναι φανερό ότι ο τρίτος μηχανισμός είναι συχνά συνέπεια των δυο προηγούμενων

Επιπλέον, η προσαρμογή αυτή δεν θα πρέπει να θεωρηθεί σαν φαινόμενο που υφίσταται ή δεν υφίσταται αλλά μάλλον σαν ποσοτική έκφραση που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αερίου και από τη διάρκεια έκθεσης του εδαφικού δείγματος σ' αυτό (Spain J.C. et al 1980, Spain J C and Van Veld P A 1983)

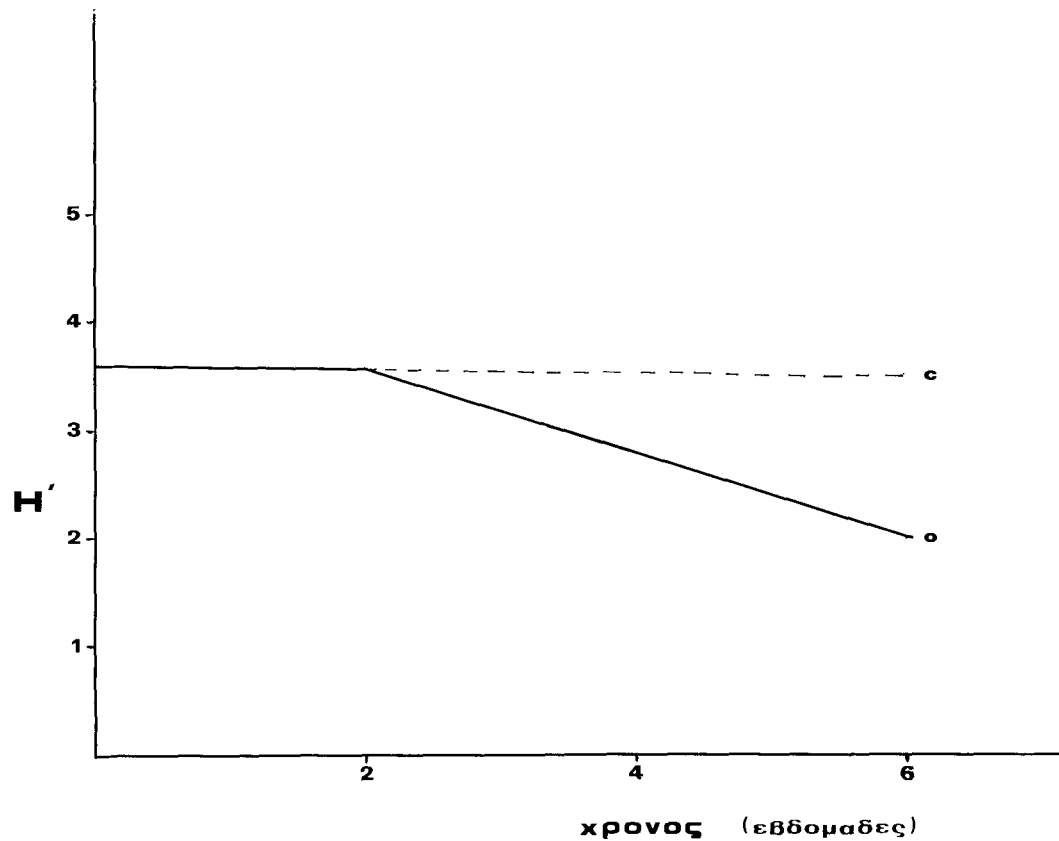
Με την αποδοχή ότι η προσαρμογή της μικροβιακής κοινότητας να αποδομεί τους αέριους υδρογονάνθρακες εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους και τη διάρκεια της επίδρασής τους μπορούμε να δεχθούμε ότι και η ικανότητα κατανάλωσης αυτών των αερίων από τα εδαφικά δείγματα αντικατοπτρίζει την ιστορία της περιοχής όσον αφορά την ένταση και διάρκεια του ρυπαντικού φορτίου που δέχεται.

Εκτός όμως από την αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων μετά από μακράς διάρκειας εμπλουτισμό διαπιστώθηκε ότι η διαδικασία αυτή είχε και σαν αποτέλεσμα αφενός μεν τη μείωση της ποικιλομορφίας στη μικροβιακή κοινότητα, αφετέρου δε την επικράτηση στελεχών με μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησεως απ' αυτή που διέθεταν τα βακτήρια που είχαν απομονωθεί από τα δείγματα που δεν είχαν δεχθεί προεπώαση.

Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες που εξετάστηκαν από τους Horowitz και Atlas (Atlas R.M. 1984) στις οποίες η μόλυνση με υδρογονάνθρακες επέβαλε μια μείωση της ποικιλομορφίας όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των καλλιεργειών των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων παρουσίασε προβλήματα κυρίως από μολύνσεις με μύκητες οι οποίες αντιμετωπίστηκαν, εν μέρει, με την προσθήκη 100 µg/ml κυκλοεξαμίδης στα υλικά καλλιέργειάς τους.

Από ταξινομική άποψη η ταυτοποίηση των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες.



Εικ. 3.1. Επίδραση του πετρελαίου στην ποικιλομορφία μιας κοινότητας βακτηρίων στην αρκτική θάλασσα. Η ποικιλομορφία της κοινότητας που εκτέθηκε στην επίδραση του πετρελαίου (o) μειώνεται αναφορικά με το μάρτυρα (c) ακολουθώντας μια αρχική φάση υστερήσεως (Από Atlas R M 1984)

Η πρώτη αναφορά που έχει γίνει για βακτήριο που αναπτύσσεται σε ακετυλένιο από τον Birch-Hirschfel το 1932 το κατατάσσει σαν Mycobacterium lacticola.

Πολύ αργότερα, το 1979, οι Kanner και Bartha απομόνωσαν κι αυτοί ένα βακτήριο με την ίδια ικανότητα που όμως το χαρακτήρισαν σαν Nocardia rhodochrous (Kanner D. and Bartha R. 1979). Επειδή η αρχική καλλιέργεια του Birch-Hirschfel δεν υπάρχει και οι περιγραφές του παρουσιάζουν ελλείψεις δεν μπορεί να αποφανθεί κανείς αν πρόκειται για το ίδιο βακτήριο. Άλλη μια απομόνωση από τους De Bont και Peck (Bont De J.A.M. and M.W. Peck 1980) αναφέρεται ότι ανήκει στο γένος Rhodococcus.

Οι εργασίες που έχουν γίνει γι' αυτά τα βακτήρια είναι ελάχιστες και οι πληροφορίες που διαθέτουμε για τις μεταβολικές οδούς τους σχεδόν ανύπαρκτες.

Εκτός απ' αυτό όμως το πρόβλημα της ταξινόμησης αυτών των γενών δεν φαίνεται να έχει λυθεί ούτε και από τους ειδικούς (Goodfellow M. and Alberson G. 1977, Goodfellow M. and Minnikin D.E. 1977, Lechevalier M.P. et al 1971, Tsukamura M. 1974).

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα που αφορούσαν την επίδραση του αιθυλενίου και ακετυλενίου στη βλάστηση των спорίων του Arthrobotrys arthrobotryoides τα αέρια αυτά δεν φαίνεται να ασκούν παρεμποδιστική δράση στις δοκιμές in vitro.

Τα εδαφικά δείγματα όμως που επώζονται υπό συνθήκες εμπλουτισμού με αέριους υδρογονάνθρακες ασκούν επιδράσεις στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης που εξαρτώνται και από το είδος του υδρογονάνθρακα και από τη διάρκεια επώασής του σ' αυτόν. Οι δοκιμές βλαστήσεως των спорίων στο έδαφος παρουσία αιθυλενίου ή ακετυλενίου δείχνουν μια επίταση του φαινομένου της μυκοστάσεως για τα δείγματα που έχουν προεπωασθεί στον αέρα.

Τα αποτελέσματα αυτά συνεπικουρούν την άποψη που είχε εκφραστεί για την αύξηση στη μυκόσταση που επιφέρει το αιθυλένιο όταν οι δοκιμές γίνονταν σε εδαφικές συνθήκες (Smith A.M. 1973, 1976, Balis C. 1976).

Όταν όμως η προεπάση γίνει επί μακρό χρονικό διάστημα στους υπό μελέτη υδρογονάνθρακες, το φαινόμενο της μυκοστάσεως δείχνει να επηρεάζεται από την αλλαγή που επιφέρουν τα αέρια αυτά στη μικροχλωρίδα του εδάφους.

Πιο συγκεκριμένα, με την πάροδο του χρόνου επώασης και της αύξησης του πληθυσμού των αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων εμφανίζεται μια ανείρεση στη μυκόσταση και στο αιθυλένιο αλλά πολύ περισσότερο στο ακετυλένιο.

Με δεδομένο ότι η μυκόσταση είναι φαινόμενο η προέλευση του οποίου αποδίδεται και δεν έχει αμφισβητηθεί, στη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους θα πρέπει να εξετάσουμε τις πιθανές αλλαγές που έχουν επιφέρει αυτοί οι υδρογονάνθρακες στη μικροβιακή κοινότητα.

Από τα αποτελέσματα των προηγουμένων πειραμάτων διαπιστώνουμε μια έντονη αύξηση του πληθυσμού των αιθυλενοτρόφων και ακετυλε-

νοτρόφων βακτηρίων στα εδαφικά δείγματα που επωάζονται σ' αυτούς τους αέριους υδρογονάνθρακες.

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή οι θεωρίες που έχουν διατυπωθεί για την εξήγηση του φαινομένου της μυκοστάσεως, εκφράζουν ότι η μυκόσταση είναι αποτέλεσμα:

- πενίας θρεπτικών ουσιών που προέρχεται από τον ανταγωνισμό για τροφή των μικροοργανισμών του εδάφους, '
- παρεμπόδισης της βλάστησης των σπορίων από προϊόντα μεταβολισμού της μικροβιακής κοινότητας.

Με δεδομένη την επικράτηση μιας εξειδικευμένης μικροχλωρίδας υπεύθυνης για την αποδόμηση των υδρογονανθράκων αιθυλενίου και ακετυλενίου μπορούμε αρχικά να δεχτούμε ότι η μερική αναίρεση της μυκοστάσεως οφείλεται στη μείωση της έντασης του ανταγωνισμού για τροφής μιας και η κυρίαρχη μικροχλωρίδα χρησιμοποιεί σαν πηγή ενέργειας και άνθρακα αυτά τα αέρια τα οποία τους παρέχονται σε αφθονία.

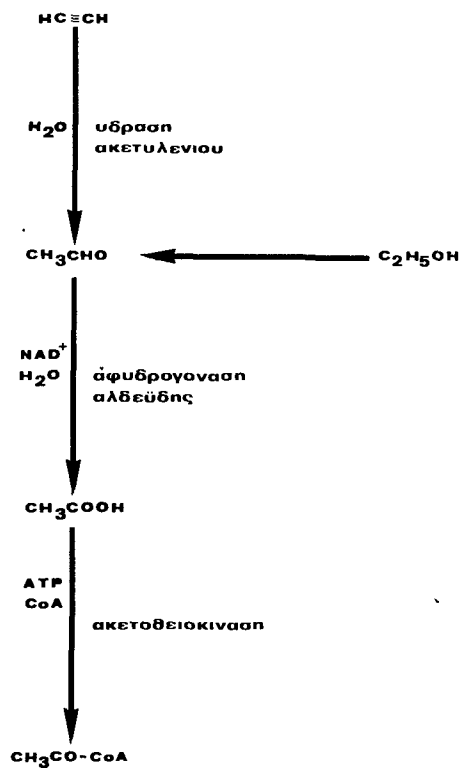
Επιπλέον το πείραμα που εξετάζει τη δυνατότητα κατανάλωσης γλυκόζης από ένα βακτήριο αυτής της ομάδας δείχνει ότι όχι μόνο δεν καταναλώνεται γλυκόζη, αλλά παράγεται και σαν προϊόν μεταβολισμού τους ουσία αντίστοιχη των αναγωγικών ζαχάρων

Είναι γνωστό ότι η μικροβιακή βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριδίων είναι δυνατή ακόμα και όταν σαν υπόστρωμα ανάπτυξης βακτηρίων είναι υδρογονάνθρακες (Abbot B.J. and Gledhill W.E. 1971, Sutherland I.W. 1982).

Η επάρκεια σε πηγή άνθρακα και ενέργειας για την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και ίσως για τα σπόρια των μυκήτων από τα παραγόμενα εξωπολυσακχαρίδια θα έπρεπε να έχει σαν αποτέλεσμα την υποκίνηση στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrobotryoides.

Η υποκίνηση όμως αυτή είναι μερική όπως δείχνουν τα αποτελέσματα και θα πρέπει να μας οδηγήσουν στην υπόθεση ότι ίσως παράγεται κάποιο προϊόν μεταβολισμού η δράση του οποίου στα σπόρια των μυκήτων να εκδηλώνεται με την παρεμπόδιση για βλάστησή τους.

Από τις εργασίες που έχουν γίνει για την κατανόηση των μεταβολικών οδών των υπεύθυνων για την αποδόμηση του ακετυλενίου έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ενδιάμεσο προϊόν μεταβολισμού μπορεί να είναι η ακεταλδεΐδη όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.



Εικ. 3.2. Προτεινόμενη οδός για το μεταβολισμό του ακετυλενίου (Από Kanner D and Bartha R 1982)

Ελέγχοντας την επίδραση της ακεταλδεύδης *in vitro* διαπιστώνουμε ότι πράγματι ασκεί παρεμποδιστική δράση στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrotryoides.

Η παρεμποδιστική δράση της ακεταλδεύδης έχει διαπιστωθεί και στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα Aspergillus niger (Glen A.T. and Hutchinson S.A. 1969)

Στη συνέχεια, όμως, μελετώντας την επίδραση της πηγής αζώτου στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκόστασης στα εδαφικά δείγματα που είχαν υποστεί μερική άρση της παρεμπόδισης της βλάστησης μετά

από μακράς διάρκειας επώαση σε ακετυλένιο διαπιστώνουμε ότι η προσθήκη νιτρικού αμμωνίου NH_4NO_3 είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία απαγορευτικών συνθηκών για τη βλάστηση των σπορίων του υπό εξέταση μύκητα

Αν θεωρήσουμε ότι ο συλλογισμός που αναπτύσσεται παραπάνω δίνει μια εξήγηση για τους μηχανισμούς που ελέγχουν το φαινόμενο της μυκοστάσεως στο έδαφος, η προσθήκη του νιτρικού αμμωνίου NH_4NO_3 δεν θα έπρεπε να προκαλέσει αυτή την παρεμπόδιση ενώ αντίθετα αναμένετο να ασκήσει μια εντονότερη υποκινητική της βλάστησης δράση για το λόγο ότι σαν πηγή αζώτου θα ευνοούσε και τον πολλαπλασιασμό των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων και τη βλάστηση των σπορίων

Το ακετυλένιο παρεμβαίνει δραστικά στον κύκλο του αζώτου στη φύση (Knowles R. 1982, Rosswall T 1982)

Είναι γνωστή η τεχνική της αναγωγής του ακετυλενίου σε αιθυλένιο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μικροβιακής δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης δεν ανάγει μόνο το μοριακό άζωτο σε αμμωνία αλλά και το ακετυλένιο σε αιθυλένιο. Η παρουσία δηλαδή του ακετυλενίου παρεμποδίζει τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου από τους μικροοργανισμούς (Brouzes R and Knowles R. 1971)

Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι το ακετυλένιο παρεμποδίζει την αναγωγή του N_2O και σε καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων (Balderston W.L. et al 1976) και στο έδαφος (Yoshinari T et al 1977, Yeomans J.C. and Beauchamp E.G. 1978), γεγονός που οδήγησε στη χρήση του σαν τεχνική μέτρησης των ρυθμών απονίτρωσης στο έδαφος (Sorensen J. 1978).

Η διαδικασία της νιτροποίησης φαίνεται να είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητη στην παρουσία του ακετυλενίου απ' ό,τι είναι η απονίτρωση και η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου (Walter H.M. et al 1979, Mosier A.R. 1980, Berg P. et al 1982). Η παρεμπόδιση της νιτροποίησης από το ακετυλένιο δείχνει να γίνεται στο στάδιο της μετατροπής της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη (Hynes R.K. and Knowles R. 1982).

Όπως φαίνεται όμως στον πίνακα 3.1 η επίδραση του ακετυλενίου δεν περιορίζεται στον κύκλο του αζώτου

Πίν. 3.1. Βιολογικές επιδράσεις του ακετυλενίου

Επίδραση

A. Κύκλος αζώτου

- Παρεμπόδιση δέσμευσης ατμοσφαιρικού αζώτου
νιτροποίησης
 - απονίτρωση
- Hardy R.W.F. 1979
Walter H.M. et al 1979,
Mosier A R 1980,
Berg P. et al 1982,
Hynes R.K and Knowless R. 1982
Balderston W L et al 1976,
Yoshinori T. et al 1977,
Yeomans J.C and Beaucamp E.G. 1978

B. Κύκλος άνθρακα

- Χρησιμοποίηση από:
 - αερόβιους μικροοργανισμούς
 - αερόβια εδάφη
 - αναερόβια οικοσυστήματα
 - Παρεμπόδιση
 - μεθανογένεσης
 - οξειδωσης μεθανίου
 - συνοξειδωσης αιθυλενίου
- Bont De J A M and Peck W M 1980,
Bont De J A M et al 1980,
Kanner D and Bartha R 1979, 1982
Smith K A et al 1973,
Germon J C 1980a, 1980b
Watanabe I and Guzmande M R 1980,
Culbertson C W et al 1981

Oremland R.S and Taylor B F 1975
Bont De J A M and Mulder E G 1976
Bont De J A M 1976b

Λαμβάνοντας υπόψη μας την επίδραση του ακετυλενίου στον κύκλο του αζώτου και την αναίρεση της μυκοστάσεως που προκαλεί στο έδαφος που επωάζεται επί μακρον στην ατμόσφαιρά του καθώς επίσης και την παρεμπόδιση στη βλάστηση που εμφανίσθηκε μετά την προσθήκη νιτρικού αμμωνίου, κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί η επίδραση προϊόντων μεταβολισμού από τον κύκλο του αζώτου στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A. arthrotryoides.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διεξαγωγή του πειράματος επιβεβαίωσαν την υπόθεση της συμμετοχής προϊόντων του κύκλου του αζώτου στην εκδήλωση του φαινομένου της μυκοστάσεως.

Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, από πολύ νωρίς, πριν ακόμα εισαχθεί η θεωρία της «διαδεδομένης μυκόστασης», είχε διατυπωθεί η άποψη για την τοξική επίδραση της αμμωνίας στους μύκητες.

Κατά τη διάρκεια των έντονων προβληματισμών πάνω στο φαινόμενο της μυκοστάσεως είχε υποτιμηθεί ο ρόλος της αμμωνίας ή δεν είχε συνδεθεί άμεσα με την εκδήλωση του φαινομένου (Gilpatrick J.D. 1969, Smiley R.W. et al 1970).

Σήμερα όμως φαίνεται να είναι η πλέον παραδεκτή υπόθεση για τη μυκόσταση που εκδηλώνουν τα αλκαλικά εδάφη (Setua G.C. and K.R. Samaddar 1980, Schippers B. et al 1982).

Εκτός όμως από την αμμωνία έχει διαπιστωθεί ότι και τα νιτρώδη ιόντα ασκούν έντονη παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων του εδάφους (Zentmyer G.A. and F.T. Bingham 1956, Oster J.J. and P.H. Tsao 1978, Tsao P.H. and G.A. Zentmyer 1979, Tsao P.H. and J.J. Oster 1981).

Κατά κανόνα, το νιτρώδες ιόν δεν συσσωρεύεται στο έδαφος διότι ο ρυθμός της παραπέρα μετατροπής του είναι ταχύτερος των ρυθμών παραγωγής του.

Υπό ορισμένες συνθήκες όμως είναι δυνατό να υπάρξει συσσώρευση νιτρώδων ιόντων.

Η κυρίαρχη άποψη είναι ότι στα αλκαλικά εδάφη συνήθως παρουσιάζεται αυτή η συσσώρευση (Alexander M. 1977), ενώ διατυπώνονται και άλλες σύμφωνα με τις οποίες η οξειδωση του νιτρώδους οξέος παρεμποδίζεται περισσότερο στα χαμηλά pH απ' ό τι η οξειδωση του αμμωνίου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση νιτρώδων στις όξινες εδαφικές συνθήκες και επιπλέον η έλλειψη φωσφόρου έχει παρόμοια αποτελέσματα (Rosswall T. 1982).

Επομένως, ένας παρεμποδιστικός παράγοντας για τη βλάστηση των σπορίων στα εδάφη με χαμηλό pH μπορεί να είναι και το νιτρώδες ιόν.

Όπως προκύπτει από τη μαθηματική επεξεργασία, που έγινε στα αποτελέσματα ώστε να έχουμε μια ποσοτική εκτίμηση της παρεμπόδισης, η παρεμποδιστική δράση του νιτρώδους νατρίου οφείλεται κατά κύριο λόγο στο νιτρώδες οξύ και πολύ λιγότερο στο ιόν.

Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του θειικού αμμωνίου. Διαπιστώνουμε δηλαδή ότι η αδιάστατη μορφή είναι πολύ περισσότερο δραστική

από την εν διαστάσει, γεγονός που οφείλεται στο ότι το αδιάστατο μόριο εισέρχεται ευκολότερα στο κύτταρο (Warren K.S. 1962, Nickolas D.J.D. 1965).

Εκτός όμως από την παρουσία νιτρώδων ιόντων, η συγκέντρωση των οποίων μαζί με την τιμή του pH επηρεάζουν την ποσότητα της αδιάστατης μορφής, στο έδαφος υπάρχουν και οξειδία του αζώτου NOx σαν προϊόντα ενδιάμεσα του κύκλου του αζώτου (Alexander M. 1974). Είναι ενδιαφέρον επίσης να σημειωθεί ότι η έκλυση μονοξειδίου του αζώτου NO είναι πιο έντονη όταν το pH είναι περίπου 6,5 παρά στην αλκαλική περιοχή (Steen W.C. and B.J. Stojanovic 1971). Η τοξικότητα της αδιάστατης μορφής των νιτρώδων δεν περιορίζεται στα σπόρια των μυκήτων, αλλά επηρεάζει και τα βακτήρια και γενικότερα τη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους (Wodzinski R.S. et al 1978, Bancroft K. et al 1979, Grant I.F. et al 1979, Mancinelli R.L. and C.P. McKay 1983).

Μπορούμε λοιπόν να εκφράσουμε, σε μια γενικότερη θεώρηση, την άποψη ότι η μικροβιόσταση που εμφανίζεται στα εδάφη έλκει την προέλευσή της από ενώσεις που παρεμβαίνουν στον κύκλο του αζώτου, η αναφορά της παγκοσμιοτήτας του οποίου είναι πλέον κοινοτοπία

Το μεγάλο πρόβλημα όμως της ποσοτικής εκτίμησης στη βλάστηση των σπορίων παραμένει αδιευκρίνιστο.

Μια πρώτη προσέγγιση που έγινε σ' αυτή την εργασία, σύμφωνα με το μαθηματικό μοντέλο που ακολουθήθηκε, μας έδωσε τιμές ED₅₀ για μεν το νιτρώδες οξύ 0,200 ppm και για την αμμωνία 63,79 ppm. Το τί ισχύει όμως στις εδαφικές συνθήκες είναι πολύ δύσκολο να αποφανθούμε αν λάβουμε υπόψη, ότι η ταυτόχρονη επίδραση των δυο αυτών παραγόντων σε διαλύματα επέφερε μια σημαντική μείωση στα ποσοστά βλάστησης των σπορίων σε σύγκριση με την αναμενόμενη που προέβλεπε το μοντέλο της αθροιστικής δράσης.

Επιπλέον, ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων του νιτρώδους οξέος και της αμμωνίας έγινε βάσει των συγκεντρώσεων του αμμωνίου και νιτρώδους ιόντος

Στις εδαφικές συνθήκες η ποσοτική εκτίμηση απαιτεί να γίνονται οι υπολογισμοί με βάση τις ενεργότητες και όχι τις συγκεντρώσεις. Ενδεικτικά για την αμμωνία μπορούμε να αναφέρουμε (Bennett A.C. and F Adams 1970) ότι η βασική ισορροπία που διέπει την τοξικότητα της αμμωνίας στο έδαφος μπορεί να παρασταθεί από τη σχέση:

NH_4^+ προσρ \rightleftharpoons NH_4^+ \rightleftharpoons H^+ + $\text{NH}_3(\text{g})$ \rightleftharpoons $\text{NH}_3(\text{g})$ της εδαφικής ατμόσφαιρας \rightleftharpoons $\text{NH}_3(\text{g})$ του ατμοσφαιρικού αέρα,

στην οποία όμως οι συγκεντρώσεις των ιόντων είναι διορθωμένες σε ενεργότητες χρησιμοποιώντας το συντελεστή ενεργότητας από την εξίσωση του Debye-Hückel:

$$-\log f_i = \frac{AZ_1^2 \mu^{1/2}}{1 + Ba(\mu)^{1/2}}$$

Εξάλλου δεν θα πρέπει να λησμονούμε τις έννοιες του μικροπεριβάλλοντος και μοριακού περιβάλλοντος που στην ουσία λειτουργούν για τους μικροοργανισμούς του εδάφους

Εντοπισμένες θέσεις με υψηλό ή χαμηλό pH μπορεί να υπάρχουν γύρω από κόκκους εδάφους προκαλώντας μια διαφοροποίηση του pH απ' αυτό που ισχύει στο κύριο εδαφικό δείγμα και που είναι της τάξεως των 0,5 μονάδων ή και παραπάνω.

Αρνητικά φορτισμένοι ανόργανοι κόκκοι είναι δυνατό να προσελκύσουν ιόντα υδρογόνου με αποτέλεσμα μια πτώση του pH, ενώ η οργανική ύλη μπορεί να συγκεντρώνει την αμμωνία που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αποδόμησής της οδηγώντας έτσι σε μια αύξηση των τιμών του pH

Η εικόνα γίνεται ακόμα πιο σύνθετη εξαιτίας της συσσώρευσης ιόντων υδρογόνου στις επιφάνειες αυτών καθ' εαυτών των μικροβίων

Η επίλυση όμως τέτοιων προβλημάτων ποσοτικών εκτιμήσεων αποτελούν αντικείμενο παραπέρα έρευνας και μελέτης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Κατανομή πολυακετυλενικών ενώσεων σε μικροοργανισμούς. (Από Bohlman F, Burkhardt T and Zdero C. 1973).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Βακτήρια

Nocardia acidophilus

Streptomyces griseus

S. chibaensis

S. reticuli aquamiceticus

Ζύμες

Rhodotorula glutinus var lusitanica

Μύκητες

Clitocybe candida

C. cerussata (Fr) Quel

C. cyathiformis

C. dealbata

C. diatreta (Fr) Quel

C. fragrans (Fr) Quel

C. gallinacea (Fr) Gillet

C. inversa (Fr) Quel

C. nebularis (Fr) Quel

C. obbata

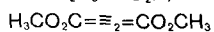
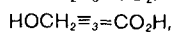
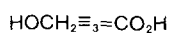
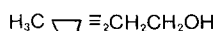
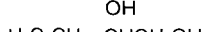
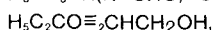
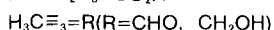
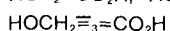
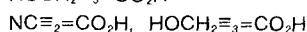
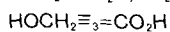
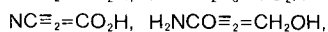
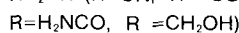
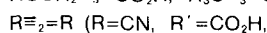
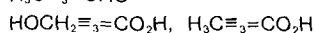
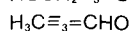
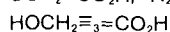
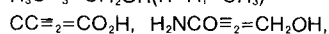
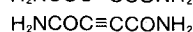
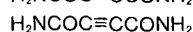
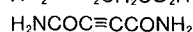
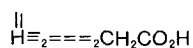
C. rhizophora Velen

Clitocybe rhizophora Velen

C. rivulosa (Fr) Quel

C. robusta Peck

ΕΝΩΣΕΙΣ



C. truncicola (Fr) Quel

Coprinus quadrifidus

Daedalea juniperina (Murr)

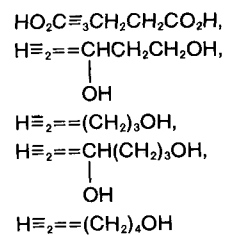
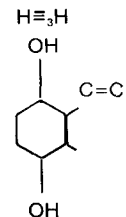
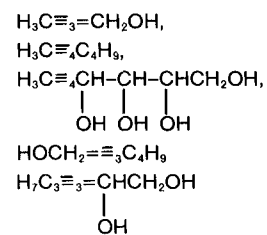
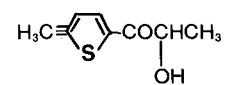
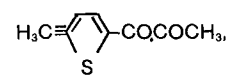
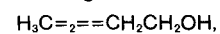
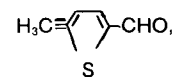
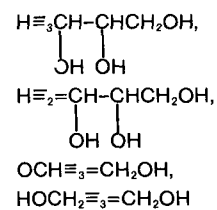
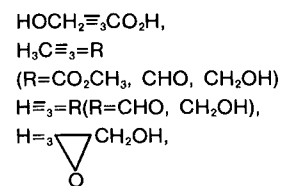
Fistulina hepatica (Huds) Fr

F. pallida (Berk et Rav)

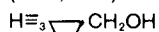
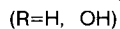
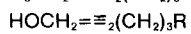
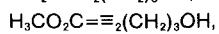
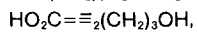
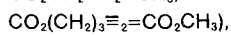
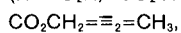
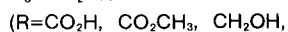
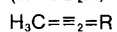
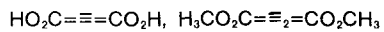
Fomes annosus

Helminthosporium siccans g-207

Merulius lacrymans



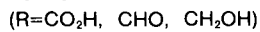
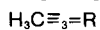
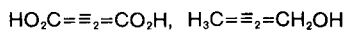
Polyporus anthracophilus



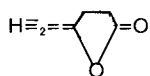
P. biformis

P. guttulatus

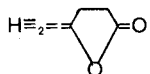
Pleurotus ulmarius (Fr.) Quel



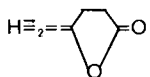
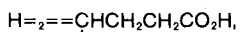
Poria colorea Overh et Englerth



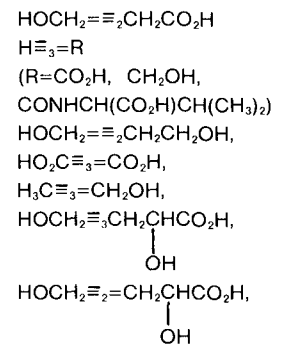
P. corticola



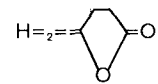
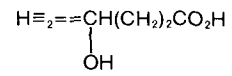
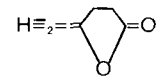
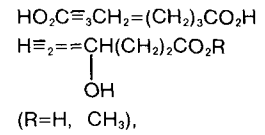
Poria mutans PK



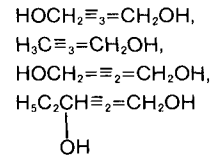
P. selecta Karst ex Rom
P. sinuosa Fr



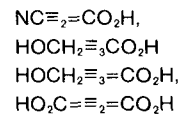
P. subacida PK



T. Richololoma grammopodium (Bull) Fr



T. nubum (Bull) Fr



T. panaeolum (Fr) Quel

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

%	Τιμές του n									
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0		9,233	8,462	8,007	7,683	7,430	7,223	7,047	6,894	6,759
1	6,638	6,529	6,428	6,336	6,250	6,170	6,094	6,024	5,957	5,894
2	5,834	5,777	5,722	5,670	5,620	5,572	5,525	5,481	5,438	5,396
3	5,356	5,317	5,279	5,243	5,207	5,173	5,139	5,106	5,074	5,043
4	5,013	4,983	4,954	4,926	4,898	4,871	4,845	4,819	4,793	4,768
5	4,744	4,720	4,696	4,673	4,651	4,628	4,606	4,585	4,564	4,543
6	4,522	4,502	4,482	4,463	4,443	4,424	4,406	4,387	4,369	4,351
7	4,333	4,316	4,299	4,282	4,265	4,248	4,232	4,216	4,200	4,184
8	4,168	4,153	4,138	4,123	4,108	4,093	4,078	4,064	4,050	4,036
9	4,022	4,008	3,994	3,981	3,967	3,954	3,941	3,928	3,915	3,902
10	3,890	3,877	3,865	3,853	3,840	3,828	3,816	3,804	3,793	3,781
11	3,770	3,758	3,747	3,735	3,724	3,713	3,702	3,691	3,680	3,670
12	3,659	3,649	3,638	3,628	3,617	3,605	3,597	3,587	3,577	3,567
13	3,557	3,547	3,537	3,528	3,518	3,508	3,499	3,490	3,480	3,471
14	3,462	3,452	3,443	3,434	3,425	3,416	3,407	3,399	3,390	3,381
15	3,372	3,364	3,355	3,347	3,338	3,330	3,322	3,313	3,305	3,297
16	3,289	3,280	3,272	3,264	3,256	3,248	3,240	3,233	3,225	3,217
17	3,209	3,202	3,194	3,186	3,179	3,171	3,164	3,156	3,149	3,141
18	3,134	3,127	3,119	3,112	3,105	3,098	3,091	3,084	3,077	3,070
19	3,063	3,056	3,049	3,042	3,035	3,028	3,021	3,014	3,008	3,001
20	2,994	2,988	2,988	2,974	2,968	2,961	2,955	2,948	2,942	2,935
21	2,929	2,923	2,916	2,910	2,904	2,897	2,891	2,885	2,879	2,873
22	2,866	2,860	2,854	2,848	2,842	2,836	2,830	2,824	2,818	2,812
23	2,806	2,800	2,795	2,789	2,783	2,777	2,771	2,766	2,760	2,754
24	2,748	2,743	2,737	2,732	2,726	2,720	2,715	2,709	2,704	2,698
25	2,693	2,687	2,682	2,676	2,671	2,665	2,660	2,655	2,649	2,644
26	2,639	2,633	2,628	2,623	2,618	2,612	2,607	2,602	2,597	2,592
27	2,587	2,581	2,576	2,571	2,566	2,561	2,556	2,551	2,546	2,541
28	2,536	2,531	2,526	2,521	2,516	2,511	2,506	2,501	2,497	2,492
29	2,487	2,482	2,477	2,472	2,468	2,463	2,458	2,453	2,449	2,444
30	2,439	2,435	2,430	2,425	2,421	2,416	2,411	2,407	2,402	2,397
31	2,393	2,388	2,384	2,379	2,375	2,370	2,366	2,361	2,357	2,352
32	2,348	2,343	2,339	2,334	2,330	2,326	2,321	2,317	2,312	2,308
33	2,304	2,299	2,295	2,291	2,286	2,282	2,278	2,274	2,269	2,265
34	2,261	2,257	2,252	2,248	2,244	2,240	2,235	2,231	2,227	2,223

35	2,219	2,215	2,211	2,206	2,202	2,198	2,194	2,190	2,186	2,182
36	2,178	2,174	2,170	2,166	2,162	2,158	2,154	2,150	2,146	2,142
37	2,138	2,134	2,130	2,126	2,122	2,118	2,114	2,110	2,106	2,102
38	2,099	2,095	2,091	2,087	2,083	2,079	2,075	2,071	2,068	2,064
39	2,060	2,056	2,052	2,049	2,045	2,041	2,037	2,034	2,030	2,026
40	2,022	2,019	2,015	2,011	2,007	2,004	2,000	1,996	1,993	1,989
41	1,985	1,982	1,978	1,974	1,971	1,967	1,963	1,960	1,956	1,953
42	1,949	1,945	1,942	1,938	1,935	1,931	1,927	1,924	1,920	1,917
43	1,913	1,910	1,906	1,903	1,899	1,896	1,892	1,889	1,885	1,882
44	1,878	1,875	1,871	1,868	1,864	1,861	1,857	1,854	1,850	1,847
45	1,844	1,840	1,837	1,833	1,830	1,826	1,823	1,820	1,816	1,813
46	1,810	1,806	1,803	1,799	1,796	1,793	1,789	1,786	1,783	1,779
47	1,776	1,773	1,769	1,766	1,763	1,759	1,756	1,753	1,750	1,746
48	1,743	1,740	1,736	1,733	1,730	1,727	1,723	1,720	1,717	1,714
49	1,710	1,707	1,704	1,701	1,698	1,694	1,691	1,688	1,685	1,682
50	1,678	1,675	1,672	1,669	1,666	1,662	1,659	1,656	1,653	1,650
51	1,647	1,643	1,640	1,637	1,634	1,631	1,628	1,625	1,622	1,618
52	1,615	1,612	1,609	1,606	1,603	1,600	1,597	1,594	1,591	1,587
53	1,584	1,581	1,578	1,575	1,572	1,569	1,566	1,563	1,560	1,557
54	1,554	1,551	1,548	1,545	1,542	1,539	1,536	1,533	1,530	1,526
55	1,523	1,520	1,517	1,514	1,511	1,508	1,505	1,502	1,499	1,496
56	1,493	1,491	1,488	1,485	1,482	1,479	1,476	1,473	1,470	1,467
57	1,464	1,461	1,458	1,455	1,452	1,449	1,446	1,443	1,440	1,437
58	1,434	1,432	1,429	1,426	1,423	1,420	1,417	1,414	1,411	1,408
59	1,405	1,402	1,440	1,397	1,394	1,391	1,388	1,385	1,382	1,379
60	1,376	1,374	1,371	1,368	1,365	1,362	1,359	1,356	1,353	1,351
61	1,348	1,345	1,342	1,339	1,336	1,334	1,331	1,328	1,325	1,322
62	1,319	1,316	1,314	1,311	1,308	1,305	1,302	1,300	1,297	1,294
63	1,291	1,288	1,285	1,283	1,280	1,277	1,274	1,271	1,269	1,266
64	1,263	1,260	1,257	1,255	1,252	1,249	1,246	1,243	1,241	1,238
65	1,235	1,232	1,229	1,227	1,224	1,221	1,218	1,216	1,213	1,210
66	1,207	1,205	1,202	1,199	1,196	1,193	1,191	1,188	1,185	1,182
67	1,180	1,177	1,174	1,171	1,169	1,166	1,163	1,160	1,158	1,155
68	1,151	1,149	1,147	1,144	1,141	1,138	1,136	1,133	1,130	1,127
69	1,125	1,122	1,119	1,116	1,114	1,111	1,108	1,106	1,103	1,100
70	1,097	1,095	1,092	1,089	1,086	1,084	1,081	1,078	1,076	1,073
71	1,070	1,067	1,065	1,062	1,059	1,056	1,054	1,051	1,048	1,046
72	1,043	1,040	1,037	1,035	1,032	1,029	1,027	1,024	1,021	1,018
73	1,016	1,013	1,010	1,007	1,005	1,002	0,999	0,997	0,994	0,991
74	0,989	0,986	0,983	0,980	0,978	0,975	0,972	0,969	0,967	0,964
75	0,961	0,959	0,956	0,953	0,950	0,948	0,945	0,942	0,940	0,937
76	0,934	0,931	0,929	0,926	0,923	0,920	0,918	0,915	0,912	0,910
77	0,907	0,904	0,901	0,899	0,896	0,893	0,890	0,888	0,885	0,882
78	0,879	0,877	0,874	0,871	0,868	0,866	0,863	0,860	0,857	0,855
79	0,852	0,849	0,846	0,844	0,841	0,838	0,835	0,833	0,830	0,827

80	0,824	0,822	0,819	0,816	0,813	0,811	0,808	0,805	0,802	0,799
81	0,797	0,794	0,791	0,788	0,785	0,783	0,780	0,777	0,774	0,771
82	0,769	0,766	0,763	0,760	0,757	0,755	0,752	0,749	0,746	0,743
83	0,741	0,738	0,735	0,732	0,729	0,726	0,723	0,721	0,718	0,715
82	0,712	0,709	0,706	0,703	0,701	0,698	0,695	0,692	0,689	0,686
85	0,683	0,680	0,677	0,675	0,672	0,669	0,666	0,663	0,660	0,657
86	0,654	0,651	0,648	0,645	0,642	0,639	0,636	0,633	0,630	0,627
87	0,624	0,621	0,618	0,615	0,612	0,609	0,606	0,603	0,600	0,597
88	0,594	0,591	0,588	0,585	0,582	0,579	0,576	0,573	0,570	0,567
89	0,563	0,560	0,557	0,554	0,551	0,548	0,545	0,541	0,538	0,535
90	0,532	0,529	0,525	0,522	0,519	0,516	0,512	0,509	0,506	0,503
91	0,495	0,496	0,493	0,489	0,486	0,483	0,479	0,476	0,473	0,469
92	0,465	0,462	0,459	0,455	0,452	0,448	0,445	0,441	0,438	0,434
93	0,431	0,427	0,424	0,420	0,416	0,413	0,409	0,405	0,402	0,398
94	0,394	0,390	0,387	0,383	0,379	0,375	0,371	0,367	0,363	0,359
95	0,355	0,351	0,347	0,343	0,339	0,335	0,331	0,326	0,322	0,318
96	0,314	0,309	0,305	0,300	0,296	0,291	0,287	0,282	0,277	0,272
97	0,267	0,263	0,258	0,253	0,247	0,242	0,237	0,232	0,226	0,220
98	0,214	0,209	0,203	0,197	0,191	0,184	0,177	0,171	0,164	0,156
99	0,149	0,141	0,132	0,123	0,114	0,103	0,092	0,080	0,065	0,045

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εκτιμήσεις πληθυσμών αιθυλενοτρόφων και ακετυλενοτρόφων βακτηρίων σε εδαφικά δείγματα περιοχών που διαφέρουν ως προς την φυτική κάλυψη και το φορτίο αερίων ρυπαντών έδειξαν ότι ο πληθυσμός των αιθυλενοτρόφων βακτηρίων σχετίζεται με το επίπεδο της οργανικής ουσίας του εδάφους. Αντίθετα, ο πληθυσμός των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων εξαρτάται από το φορτίο των αερίων ρυπαντών και όχι από την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία.

Η επώαση επί μακρό χρονικό διάστημα εδάφους σε ατμόσφαιρα που περιείχε 10% αιθυλένιο ή ακετυλένιο οδήγησε στην επικράτηση μιας εξειδικευμένης μικροχλωρίδας ικανής να αυξάνει χρησιμοποιώντας σαν πηγή ενέργειας και άνθρακα αυτούς τους υδρογονάνθρακες.

Οι απομονώσεις των ακετυλενοτρόφων βακτηρίων που προέρχονται από το έδαφος το οποίο είχε δεχθεί εμπλουτισμό με ακετυλένιο (10%) διακρίνονται για τη μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησής τους σε σύγκριση με εκείνες που προέκυψαν από μη εμπλουτισθέντα εδάφη.

Πειραματικά δεδομένα που αφορούν τη μελέτη της επιδράσεως των υδρογονανθράκων μεθανίου, αιθυλενίου και ακετυλενίου στη μυκόσταση του εδάφους δείχνουν ότι:

- Και οι τρεις υδρογονάνθρακες επιτείνουν το φαινόμενο της μυκοστάσεως του φυσικού εδάφους και των δειγμάτων που επωάζονται στο εργαστήριο σε φυσική ατμόσφαιρα.
- Εδάφη που προεπαζονται σε ατμόσφαιρα μεθανίου και στη συνέχεια εκτίθενται σε ατμόσφαιρα αιθυλενίου εμφανίζουν έντονες μυκοστατικές ιδιότητες.
- Η επί μακρό χρονικό διάστημα προεπάωση του εδάφους σε ακετυλένιο οδηγεί στη μερική αναίρεση της μυκοστάσεως.
- Η προσθήκη νιτρικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ στα εδαφικά δείγματα των οποίων η μυκόσταση είχε μειωθεί από την προεπάωσή τους σε ακετυλένιο προκαλεί επανεμφάνιση της μυκοστάσεως.

Η βλάστηση των σπορίων του μύκητα Arthrobotrys arthrobotryoides που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μυκοστάσεως του εδάφους δεν επηρεάζεται από τους υδρογονάνθρακες αιθυλένιο και ακετυλένιο στις in vitro δοκιμές.

Στην εργασία αυτή εξετάζεται επίσης η επίδραση που ασκούν το νιτρώδες νάτριο NaNO_2 και θειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ στη βλάστηση των σπορίων του μύκητα A arthrotryoides. Από τα πειραματικά δεδομένα συνάγεται ότι τα νιτρώδη ιόντα παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων και ότι ο βαθμός παρεμπόδισης εξαρτάται από το pH του μέσου δοκιμής.

Η πορεία βλαστήσεως συναρτήσεται αυτών των παραμέτρων αποδίδεται ικανοποιητικά από τις εξισώσεις:

$$y = 100 (1+n)e^{-n} \text{ και } n = a C^b$$

όπου, y η επί τοις εκατό βλάστηση, C η συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα και a , b σταθερές η αριθμητική τιμή των οποίων εξαρτάται από τις συνθήκες της βιοδοκιμής

Από τη μαθηματική αυτή ανάλυση προκύπτει ότι.

- Η παρεμποδιστική δράση των αμμωνιακών και νιτρωδών αλάτων οφείλεται κυρίως στις αδιάστατες μορφές τους
- Οι δυο αυτές μορφές, όταν συνυπάρχουν δρουν συνεργιστικά, και όχι απλά αθροιστικά, στην παρεμπόδιση της βλάστησης

Στη συζήτηση επισημαίνεται ο ρόλος των αερίων υδρογονανθράκων αιθυλενίου και ακετυλενίου στη φύση καθώς και των βακτηρίων που τα αποδομούν

Επίσης, δίδεται έμφαση στις ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν στο έδαφος και τις δυσχέρειες που πρέπει να αντιμετωπισθούν για την ποσοτική έκφραση του φαινομένου της μυκοστάσεως.

SUMMARY

Estimations of ethylenotrophic and acetylenotrophic populations in soil samples taken from regions with different vegetation coverage and gaseous pollutants load, have shown that the population of ethylenotrophic bacteria is related to the level of soil organic matter.

On the contrary, the population of the acetylenotrophic bacteria depends on the load of gaseous pollutants and not on the levels of soil organic matter.

Prolonged incubation of soil in an atmosphere containing 10% ethylene or acetylene resulted in the predominance respectively of a specialized microflora capable of glowing by utilizing these hydrocarbons as energy and carbon sources.

All acetylenotrophic isolations derived from a soil sample enriched with acetylene were superior in growth rate in comparison with those obtained from non enriched soils.

Experimental data concerning the study of the influence of methane, ethylene and acetylene on soil mycostasis show that:

- all three hydrocarbons intensify the phenomenon of mycostasis both in natural soils and in soil samples as well incubated in the laboratory under natural atmospheric conditions.
- Soil samples preincubated in methane atmosphere and subsequently exposed to ethylene atmosphere show intense mycostatic properties.
- Prolonged preincubation of soil in acetylene results in partial annulment of mycostasis.
- Addition of ammonium nitrate $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ in soil samples the mycostasis of which had been reduced by means of their preincubation in acetylene, causes the reappearance of mycostasis

The spores of the fungus Arthrobotrys arthrobotryoides used in the estimation of soil mycostasis, are not affected in their germination by the hydrocarbons ethylene and acetylene in vitro

The effect of sodium nitrite (NaNO_2) and ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ on the germination of spores of A. arthrobotryoides is also exa-

mined. On the basis of the experimental data it is concluded that nitrite ions inhibit the spore germination and the level of this inhibition depends on the pH of the test medium. The germination process is sufficiently described by the following equations:

$$y = 100(1+n)e^{-n} \quad \text{and} \quad n = a.C^b$$

where: y = the percentage of germination,

C = the concentration of toxic factor, and

a, b = constants, the numerical value of which depends on the bioassay conditions.

Following this mathematical analysis it is concluded that:

- The depressive action of ammonium and nitrate salts is principally due to their undissociated forms.
- When these two salts coexist in their undissociated forms they act synergistically rather than simply additively in the inhibition of germination.

The function of gaseous hydrocarbons ethylene and acetylene in nature and the role of the bacteria which degrade them are discussed along with the specific conditions that dominate in soil and the difficulties one faces in the quantitative expression of mycostasis as well.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 ABBOTT B.J. and GLEDHILL W.E. (1971) The extracellular Accumulation of Metabolic Products by Hydrocarbo-Degrading Microorganisms. Advances in Applied Microbiology **14**: 249-388
2. ABELES F.B. (1973) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York and London.
- 3 ABELES F.B., CRAKER L E, FORRENCE L.E. and LEATHER G.R. (1971) Fate of air pollutants: removal of ethylene, sulfur dioxide and nitrogen dioxide by soil. Science **173**: 914-919
4. ABELES B F and HEGGESTAD H.E. (1973) Ethylene: an urban air pollutant. Journal of the Air Pollution Control Association **23**: 517-521
- 5 ALEXANDER M (1974) Microbial Formation of Environmental Pollutants. Advances in Applied Microbiology **18**: 1-73
6. ALEXANDER M. (1977) Introduction to Soil Microbiology, 2nd Edition. John Wiley and Sons, New York
- 7 ALLISON L.E. (1965) Organic Carbon In Methods of Soil analysis Part 2, pp. 1367-1378 American Society of Agronomy, Inc. Publisher Madison, Wisconsin, USA
- 8 ARCHER S.A. (1976) Ethylene and fungal growth Transactions of the British Mycological Society **67**: 325-326
- 9 ATLAS R.M. (1984) Diversity of Microbial Communities Advances in Microbial Ecology **7**: 1-47
- 10 BAKER K F and COOK R J (1974) Biological Control of Plant Pathogens. W H Freeman and Company, San Francisco.
- 11 BALDERSTON W L, SHERR B and PAYNE W J. (1976) Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus* Applied and Environmental Microbiology **31**: 504-508
- 12 BALIS C (1976) Ethylene-induced volatile inhibitors causing soil fungistasis. Nature **259**: 112-114
- 13 BALIS C and KOUYEAS V (1968) Volatile inhibitors involved in soil mycostasis Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki N S **8**: 149-149

- 14 BALIS C and KOUYEAS V (1979) Contribution of chemical inhibitors to soil mycostasis In Soil-borne Plant Pathogens (Eds B Schippers and W Gams), pp 97–106 Academic Press, London, New York, San Francisco
- 15 BALIS C., FLOURI F and FLOROS J (1984) Effect of Air Pollution on the Soil Microbial Flora in the Attica (Part C of Project 17. On the Ecological Impact of the Air Pollution in the Attica Region and Study of Possible Solution for rehabilitation)
- 16 BANČROFT K., GRANT I.F and ALEXANDER M (1979) Toxicity of NO₂. Effect of Nitrite on Microbial Activity in an Acid Soil. Applied and Environmental Microbiology **38**: 940–944.
- 17 BARTHOLOMEW G W and ALEXANDER M (1981) Soil as a Sink for Atmospheric Carbon Monoxide Science **212**: 1389–1391
- 18 BENNET A C and ADAMS F (1970) Concentration of NH₃(aq) required for incipient NH₃ toxicity to seedlings. Soil Science Society of America Proceedings **34**: 259–263.
- 19 BERG P , KLEMEDTSSON L and ROSWALL (1982) Inhibitory effect of low partial pressures of acetylene on nitrification. Soil Biology and Biochemistry **14**: 301–303
- 20 BIRD C W and LYNCH J.M (1974) Formation of hydrocarbons by microorganisms. Chemical Society Reviews. **3**: 309–328
- 21 BLISS C I (1935) The calculation of the dosage-mortality curve Annals of Applied Biology **22**: 134–167
- 22 BOHLMAN F , BURKHARDT T and ZDERO C. (1973) Naturally occurring Acetylenes Academic Press
- 23 BONT DE J A M. (1975) Oxidation of ethylene by bacteria Annals of Applied Biology **81**: 119–121
- 24 BONT DE J A M (1976a) Oxidation of ethylene by soil bacteria Antonie Van Leeuwenhoek **42**: 59–71
- 25 BONT DE J.A.M. (1976b). Bacterial degradation of ethylene and acetylene reduction test Canadian Journal of Microbiology **22**: 1060–1062
- 26 BONT DE J A M and ALBERS R A J M (1976) Microbial metabolism of ethylene Antonie Van Leeuwenhoek **42**: 73–80

- 27 BONT DE J.A.M. and MULDER E G (1974) Nitrogen Fixation and Co-oxidation of Ethylene by a Methane-utilizing Bacterium Journal of General Microbiology **83**: 113-121
- 28 BONT DE J.A.M and MULDER E G. (1976) Invalidity of the acetylene reduction assay in alkane-utilizing, nitrogen-fixing bacteria Applied and Environmental Microbiology **31**: 640-647.
- 29 BONT DE J.A.M. and PECK W.M. (1980) Metabolism of Acetylene by Rhodococcus A, Archives of Microbiology **127**: 99-104
30. BONT DE J.A.M , PRIMROSE S.B., COLLINS M D. and JONES D (1980) Chemical Studies on some Bacteria which Utilize Gaseous Unsaturated Hydrocarbons Journal of General Microbiology **117**: 97-102
- 31 BREMNER J.M. (1965) Total nitrogen In Methods of soil analysis. Part 2, pp 1149-1178 American Society of Agronomy, Inc Publisher Madison, Wisconsin, USA.
32. BRIAN P.W (1960) Antagonistic and competitive mechanisms limiting survival and activity of fungi in soil In The Ecology of Soil Fungi (Eds D Parkinson and JS Waid), pp 115-129 Liverpool University Press
- 33 BRISTOW P R and LOCKWOOD J L (1975a) Soil Fungistasis role of spore exudates in the inhibition of nutrient-independent propagules. Journal of General Microbiology **90**: 140-146
- 34 BRISTOW P.R and LOCKWOOD J.L. (1975b) Soil fungistasis. role of the microbial nutrient sink and of fungistatic substances in two soils Journal of General Microbiology **90**: 147-156
- 35 BROUZES R and KNOWLES R (1971) Inhibition of growth of Clostridium pasteurianum by acetylene implication for nitrogen fixation assay Canadian Journal of Microbiology **17**: 1483-1489
- 36 BROWN ME ' (1973) Soil bacteriostasis limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria Canadian Journal of Microbiology **19**: 195-199
- 37 BU'LOCK J D (1966) Biosynthesis of Polyacetylenes in Fungi In Biosynthesis of Antibiotics Vol 1. pp 141-157 Academic Press
- 38 CATROUX G., GERMON J.C. and GRAFFIN P H (1974) L'utilisation du sol comme système épurateur Annales Agronomiques **25**: 179-193

39. CHACKO C.I. and LOCKWOOD J.L. (1966) A quantitative method for assaying soil fungistasis. Phytopathology **56**: 576–577.
40. CLARK F.E. (1965) The concept of Competition in Microbial Ecology. In Ecology of Soil-borne plant pathogens (Eds K.F. Baker and W.C. Snyder), pp. 339–345. University California Press, Berkeley.
41. COHRANE V.W. (1963) Physiology of Fungi. John Wiley and Son, Inc. New York, London.
42. CONSIDINE P.J. and PATCHING J.W. (1975) Ethylene production by microorganisms grown on phenolic acids. Annals of Applied Biology **81**: 115–119.
43. CONSIDINE P.J., FLYNN N. and PATCHING J.W. (1977) Ethylene production by soil micro-organisms. Applied and Environmental Microbiology **33**: 977–979.
44. COOKE R.C. and SATCHUTHANANTHAVALA V. (1968) Sensitivity to mycostasis of nematode-trapping hyphomycetes. Transactions of the British Mycological Society **51**: 555–561.
45. CORNFORTH I.S. (1975) The persistence of ethylene in aerobic soils. Plant and Soil **42**: 85–96.
46. CULBERTSON C.W., ZEHNDER A.J.B. and OREMLAND R.S. (1981) Anaerobic Oxidation of Acetylene by Estuarine Sediments and enrichment cultures. Applied and Environmental Microbiology **41**: 396–403.
47. DAVIS R.D. (1975a) Bacteriostasis in soils sterilized by gamma irradiation and in reinoculated sterilized soils. Canadian Journal of Microbiology **21**: 481–484.
48. DAVIS R.D. (1975b) Soils bacteriostasis: inhibition of spore germination and microcolony development in agar incubated on nonsterile soils. Canadian Journal of Microbiology **21**: 1270–1272
49. DIX N.J. and CHRISTIE P. (1974) Changing sensitivity to soil fungistasis with age in Drechslera rostrata spores and associated permeability changes. Transactions of the British Mycological Society **62**: 527–535.
50. DOBBS C.G. and HINSON W H. (1953) A widespread fungistasis in soils. Nature **172**: 197–199

51. DOBBS C.G., HINSON W.H. and BUWATER J. (1960) Inhibition of fungal growth in soils. In The Ecology of Soil Fungi (Eds D. Parkinson and J.S. Waid), pp. 130–147 Liverpool University Press.
52. DOBBS C.G. and GASH M J (1965) Microbial and residual myco-stasis in soils. Nature **207**: 1354–1356.
53. EMMATTY D A. and GREEN JR.R.J. (1967) The role of nutrients and pH in reversing fungistasis of conidia of *Trichoderma viride*. Canadian Journal of Microbiology **13**: 635–642
54. FLETT R J., RUDD J.W.M. and HAMILTON R.D. (1975) Acetylene reduction assays for nitrogen fixation in fresh-waters: a note of caution. Applied Microbiology **29**: 580–583
55. GARRETT S D. (1956) Biology of Root-infecting Fungi. University Press, Cambridge
56. GARRETT S D. (1970) Pathogenic Root-infecting Fungi. University Press, Cambridge
57. GARRETT S D. (1981) Soil fungi and soil fertility, 2nd edition. Pergamon Press, Oxford
58. GERMON J.C (1980a) Etude quantitative de la dénitrification biologique dans le sol à l'aide de l'acétylène I Application à différents sols. Annales de Microbiologie (Inst. Pasteur) **131 B**: 69–80.
59. GERMON J.C. (1980b) Etude quantitative de la dénitrification biologique dans le sol à l'aide de l'acétylène. II Evolution de l'effet inhibiteur de l'acétylène sur la vitesse de dénitrification et sur la réorganisation de l'azote nitrique. Annales de Microbiologie (Inst. Pasteur) **131B**: 81–90
60. GILPATRICK J D (1969) Role of ammonia in the Control of Avocado Root Rot with Alfalfa Meal Soil Amendment. Phytopathology **59**: 973–978
61. GLEN A.T. and HUTCHINSON S A (1969) Some Biological Effects of Volatile Metabolites from Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen Journal of General Microbiology **55**: 19–27
62. GOODFELLOW M and ANDERSON G (1977) The Actinomycete-genus *Rhodococcus* A Home for the "rhodochrous" Complex Journal of General Microbiology **100**: 99–122

- 63 GOODFELLOW M and MINNIKIN D E (1977) Nocardioform Bacteria Annual Review of Microbiology **31**: 159–180
- 64 GOODLAS G and SMITH K A (1978a) Effect of pH, organic matter content and nitrate on the evolution of ethylene from soils Soil Biology and Biochemistry **10**: 193–199
- 65 GOODLAS G and SMITH K A (1978b) Effects of organic amendments on evolution of ethylene and other hydrocarbons from soil Soil Biology and Biochemistry **10**: 201–205
- 66 GRANT I F., BANCROFT K and ALEXANDER M (1979) SO₂ and NO₂ Effects on Microbial Activity in an Acid Forest Soil Microbial Ecology **5**: 85–89
- 67 GRIFFIN D M (1972) Ecology of Soil Fungi Chapman and Hall, London
- 68 GRIFFIN G J (1970a) Carbon and nitrogen requirements for macroconidial germination of Fusarium solani, dependence on conidial density Canadian Journal of Microbiology **16**: 733–740
- 69 GRIFFIN G J (1970b) Exogenous carbon and nitrogen requirements for chlamydospore germination by Fusarium solani, dependence on spore density Canadian Journal of Microbiology **16**: 1366–1368
- 70 GRIFFIN G J (1973) Modification of the exogenous carbon and nitrogen requirements for chlamydospore germination of Fusarium solani by contact with the soil Canadian Journal of Microbiology **19**: 999–1005.
- 71 GRIFFIN G J and FORD R H (1974) Soil fungistasis: fungus spore germination in soil at spore densities corresponding to natural population levels Canadian Journal of Microbiology **20**: 751–754
- 72 GRIFFITHS D A (1966) Vertical distribution of mycostasis in Malayan soils Canadian Journal of Microbiology **12**: 149–163
- 73 HARDY R W F (1979) Reducible substrates of Nitrogenase In A Treatise on Dinitrogen Fixation Section I and II, Inorganic and Physical Chemistry and Biochemistry (Eds R W.F Hardy, F. Bottomley, R C. Burnes), pp. 515–568. John Willey and Sons.
- 74 HATTORI T (1973) Microbial life in the soil. Marcel Dekker Inc., New York

- 75 HERBERT D., PHIPPS P J and STRANGE R E (1971) Chemical Analysis of Microbial Cells In Methods in Microbiology Vol 5B (Eds J.R. Norris and D W Ribbons), pp 209–344 Academic Press, London and New York
- 76 HEYER J (1976) Microbielle verwertung von äthylen Zeitschrift für Allgemeine Microbiologie **16**: 633–637
- 77 HO W.C. and KO W H (1982) Characteristics of soil microbiostasis Soil Biology and Biochemistry **14**: 589–593
78. HORSFALL J.G. (1956) Fungicidal action and its measurement In Principles of Fungicidal Action, pp 15–29 Waltham Mass, USA Published by the Chronica Botanica Company
- 79 HYNES R.K. and KNOWLES R (1982) Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification Canadian Journal of Microbiology **28**: 334–340
- 80 ILAG L. and CURTIS R W (1968) Production of ethylene by fungi Science **159**: 1357–1358
81. IOANNOY N, SCHNEIDER R W and GROGAN R G (1977) Effect of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth, sporulation and production of microsclerotia by Verticillium dahliae Phytopathology **67**: 645–650
- 82 JACKSON R M (1965) Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms In Ecology of Soil-borne Plant Pathogens (Eds K F Baker and W C. Snyder), pp 363–369 University California Press, Berkeley
- 83 JENSEN V. (1968) The plate count technique In The ecology of soil bacteria (Eds T R G. Gray and D. Parkinson), pp 158–170 Liverpool University Press, Liverpool
- 84 KANNER D. and BARTHA R (1979) Growth of *Nocardia rhodochrous* on acetylene gas. Journal of Bacteriology **139**: 225–230
- 85 KANNER D and BARTHA R (1982) Metabolism of Acetylene by *Nocardia rhodochrous* Journal of Bacteriology **150**: 989–992
- 86 KNOWLES R (1982) Denitrification Microbiological Reviews **46**: 43–70

- 87 KO W.H. and CHOW F.K. (1976) Characteristics of soil bacteriostasis (Abstr.) Proceedings of the American Phytopathological Society **3**: 239
- 88 KO W.H. and CHOW F.K. (1977) Characteristics of Bacteriostasis in Natural Soils Journal of General Microbiology **102**: 295-298
- 89 KO W.H. and HORA F.K. (1975) Evaluation of the use of charcoal in the study of soil fungistasis Phytopathology **65**: 1031-1032
- 90 KO W.H., HORA F.K. and HERLICKSKA E. (1974) Isolation and identification of a volatile fungistatic factor from alkaline soil. Phytopathology **64**: 1398-1400.
- 91 KOUYEAS V. (1977) The fungistatic volatiles of the soil. Scient. Ann. School Agric. Forestry Aristotelian University vol. IH' Roussopoulos pp 235-241
- 92 KOUYEAS V. and BALIS C. (1968) Influence of moisture on the restoration of mycostasis in air dried soils Annales de l'Institute Phytopathologique Benaki NS **8**: 123-144.
- 93 LEACH L.D. and DAVEY A.E. (1935) Toxicity of Low Concentrations of Ammonia to Mycelium and Sclerotia of Sclerotium rolfsii. Phytopathology **25**: 957-959
- 94 LECHEVALIER M.P., HORAN A.C. and LECHEVALIER H.A. (1971) Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. Journal of Bacteriology **105**: 313-318
- 95 LOCKWOOD J.L. (1964) Soil Fungistasis. Annual Review of Phytopathology **2**: 341-362
96. LOCKWOOD J.L. (1977) Fungistasis in soils Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society **52**: 1-43
- 97 LOCKWOOD J.L. (1979) Soil mycostasis. Concluding remarks In Soil-borne Plant Pathogens (Eds B. Schippers and W. Gams), pp 121-129 Academic Press.
- 98 LYNCH J.M. (1972) Identification of substrates and isolation of micro-organisms responsible for ethylene production in the soil Nature **240**: 45-46.
- 99 LYNCH J.M. (1974) Mode of ethylene formation by Mucor hiemalis Journal of General Microbiology **83**: 407-411.

- 100 LYNCH J M (1975) Ethylene in soil. Nature **256**: 576-577
- 101 LYNCH J M (1982) Limits to Microbial Growth in Soil Journal of General Microbiology **128**: 405-410
- 102 LYNCH J.M. and HARPER S H T. (1974a) Formation of Ethylene by a Soil Fungus Journal of General Microbiology **80**: 187-195
- 103 LYNCH J.M. and HARPER S H T (1974b) Fungal growth rate and the Formation of Ethylene in Soil. Journal of General Microbiology **85**: 91-96
- 104 LYNCH J.M and HARPER S H T. (1980) Role of substrates and anoxia in the accumulation of soil ethylene Soil Biology and Biochemistry **12**: 363-367
- 105 MANCINELLI R L and McKAY C P (1983) Effects of Nitric Oxide and Nitrogen Dioxide on Bacterial Growth Applied and Environmental Microbiology **46**: 198-202
- 106 MANNERS J G (1966) Assessment of germination In The Fungus Spore (Ed M F Madelin), pp 165-173 Butterworths, London
- 107 McCALLAN S.E A and WEEDON F R (1940) Toxicity of ammonia, chlorine, hydrogen cyanide, hydrogen sulfide and sulfur dioxide gases II Fungi and Bacteria Contribution from Boyce Thomsón Institute **11**: 331-342
- 108 McLAREN A.D and SKUJINS J (1968) The physical environment of microorganisms in soil The Ecology of Soil Bacteria (Eds T R G Gray and D Parkinson), pp 3-24, Liverpool University Press
- 109 MARSHALL K.C. (1980) Reactions of microorganisms, ions and macromolecules at interfaces In Contemporary Microbial Ecology (Eds D C Ellwood, J N Hedger, M J Latham, J M Lynch and J H Slater), pp 93-106 Academic Press, London
- 110 MISHRA R R and KANAUIA R.S (1973) Observations of soil fungistasis III Fungistasis in relation to soil depths, seasonal changes, soil amendments and physico-chemical characteristics of the soils Plant and Soil **38**: 321-330
- 111 MISHRA R R and PANDE K K (1974) Studies on soil fungistasis V Effect of temperature, moisture content and incubation period Indian Phytopathology **27**: 475-479

- 112 MOSIER A.R (1980) Acetylene inhibition of ammonium oxidation in soil. Soil Biology and Biochemistry **12**: 443–444
- 113 MÜLLER K. (1975) Funcional Group Determination of Olefinic and Acetylenic Unsaturation. Academic Press
- 114 NEAL D.C. (1938) Growth of the cotton root-rot fungus in synthetic media, and the toxic effect of ammonia on the fungus. Journal of Agricultural Research **47**: 107–118
- 115 NEAL D.C. and COLLINS E.R. (1936) Concentration of ammonia necessary in a low-line phase of Houston clay soil to kill the cotton root-rot fungus, *Rhizoglyphus omnivorus* Phytopathology **26**: 1030–1032
116. NICHOLAS D.J.D. (1965) Utilization of Inorganic Nitrogen Compounds and Amino Acids by Fungi In The Fungi: An Advanced Treatise, Vol. 1, (Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman), pp 349–376 Academic Press.
- 117 ODUM E.P. (1975) Ecology. The Link Between the Natural and Social Sciences. 2nd edition Holt, Rinehart and Winston
- 118 OREMLAND R.S. and TAYLOR B.F. (1975) Inhibition of methanogenesis in marine sediments by acetylene and ethylene: validity of the acetylene reduction assay for anaerobic microcosms Applied Microbiology **30**: 707–709.
- 119 OSTER J.T. and TSAO P.H. (1978) Toxicity of NH_3 and HNO_2 as related to *Phytophthora* inhibition in soils amended with nitrogenous organic substances. (Abstr.). Phytopathological News **12**: 146
120. PARKINSON D., GRAY T.R.G., HOLDING J. and NAGEL-DE-BOOIS H.M. (1971) Heterotrophic Microflora In Methods of Study in Quantitative Soil Ecology: Population, production and energy flow (Ed J Philipson), pp 34–50, IBP, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.
- 121 PASS T. and GRIFFIN G.J. (1972) Exogenous carbon and nitrogen requirements for conidial germination by *Aspergillus flavus*. Canadian Journal of Microbiology **18**: 1453–1461.
- 122 PAVLICA D.A., HORA T.S., BRADSWAW J.J., SKOGERGÖE R.K. and BAKER R. (1978) Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. Phytopathology **68**: 758–765

- 123 PAZOUT J , WURST M. and VANCURA V. (1981) Effect of aeration on ethylene production by soil bacteria and soil samples cultivated in a closed system. Plant and Soil **62**: 431-437
- 124 PEECH M (1965) Hydrogen-Ion Activity. In Methods of Soil Analysis Part 2, pp. 914-926 American Society of Agronomy Inc. Publisher Madison, Wisconsin, U.S.A.
125. PRIMROSE S B (1976a) Formation of Ethylene by *Escherichia coli*. Journal of General Microbiology **95**: 159-165
- 126 PRIMROSE S.B. (1976b) Ethylene-forming Bacteria from Soil and Water. Journal of General Microbiology **97**: 343-346.
127. PRIMROSE S.B. (1979) Ethylene and Agriculture: the Role of the Microbe. Journal of Applied Bacteriology **46**: 1-25
128. PRIMROSE S.B. and DILWORTH M J. (1976) Ethylene production by Bacteria. Journal of General Microbiology **93**: 177-181.
- 129 ROBERTS M and BOYCE C.B.C (1972) Principles of Biological Assay. In Methods in Microbiology, Vol. 7A (Eds. J.R. Norris and D.W. Ribbons), pp 153-190 Academic Press, London and New York.
- 130 ROMINE M and BAKER R. (1972) Properties of a volatile fungistatic factor in soil Phytopathology **62**: 602-605.
- 131 ROSSWALL T. (1982) Microbial regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. Plant and Soil **67**: 15-34.
- 132 ROTH DON A. and GRIFFIN C.J. (1980) The response of *Cylindrocladium conidia* to soil fungistasis. Soil Biology and Biochemistry **12**: 531-536
133. SCHIPPERS B., BOERWINCEL D.J. and KONINGS H. (1978) Ethylene not responsible for inhibition of conidium germination by soil volatiles Netherlands Journal of Plant Pathology **84**: 101-107.
- 134 SCHIPPERS B., MEIZER J.W. and LIEM J.I. (1982) Effect of ammonia and other soil volatiles on germination and growth of soil fungi. Transactions of the British Mycological Society **79**: 253-259.
- 135 SCHUEPP H and FREI E. (1969) Soil fungistasis with respect to pH and profile Canadian Journal of Microbiology **15**: 1273-1279.
- 136 SCHLESINGER R B. (1979) Natural Removal Mechanisms for Chemical Pollutants in the Environment. Bioscience **29**: 95-101.

- 137 SETUA G C and SAMADDAR K.R (1980) Evaluation of role of volatile ammonia in fungistasis of soils. Phytopathologische Zeitschrift **98**: 310-319
- 138 SMILEY R W , COOK R J and PAPENDICK R J (1970) Anhydrous ammonia as a soil fungicide against Fusarium and fungicidal activity in the ammonia retention zone. Phytopathology **60**: 1227-1232
- 139 SMITH A.M (1973) Ethylene as a cause of soil fungistasis Nature **246**: 311-313
- 140 SMITH A M (1976) Ethylene in soil biology. Annual Review of Phytopathology **14**: 53-73
- 141 SMITH A.M and COOK R J (1974) Implications of ethylene production by bacteria for biological balance of soil. Nature **252**: 703-705
- 142 SMITH K A (1978) Ineffectiveness of ethylene as a regulator of soil microbial activity Soil Biology and Biochemistry **10**: 269-272
- 143 SMITH K A and RUSSEL R S (1969) Occurrence of ethylene, and its significance, in anaerobic soil Nature **222**: 769-771
- 144 SMITH K A , BREMNER J.M. and TABATABAI M A (1973) Sorption of Gaseous Atmospheric Pollutants by Soils Soil Science **116**: 313-319
- 145 SØRENSEN J. (1978) Denitrification rates in a marina sediments as measured by the acetylene inhibition technique Applied and Environmental Microbiology **36**: 139-143
- 146 SPAIN J.C., PRITCHARD P H and BOURQUIN A W. (1980) Effects of Adaptation and Biodegradation Rates in Sediment/Water Cores from Estuarine and Freshwater Environments. Applied and Environmental Microbiology **40**: 726-734
- 147 SPAIN J C and VAN VELD P.A (1983) Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compounds: Effects of Concentration, Exposure Time, Inoculum and Chemical Structure. Applied and Environmental Microbiology **45**: 428-435
- 148 STANIER R Y (1953) Adaptation, evolutionary and physiological. or Darwinism among the microorganisms. In Adaptation in Micro-organisms. Symposia of Society for General Microbiology (Eds. E.F. Gale and R. Davies), pp 1-14 Cambridge University Press, London.

- 149 STEEN W.C and STOJANOVIC B J (1971) Nitric Oxide Volatilization from a Calcareous Soil and Model Aqueous Solutions Soil Science Society of America Proceedings **35**: 277-286
- 150 STEINER G W. and LOCKWOOD J L (1969) Soil Fungistasis Sensitivity of Spores in Relation to Germination Time and Size Phytopathology **59**: 1084-1092
151. SUSSMAN A.S. (1966) Dormancy and Spore Germination In The Fungi: An Advanced Treatise Vol. II (Eds G C Ainsworth and A S Sussman), pp 733-764 Academic Press, New York and London
- 152 SUTHERLAND I.W (1982) Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides Advances in Microbial Physiology **23**: 79-150
- 153 SUTHERLAND J B and COOK R.J (1980) Effects of chemical and heat treatments on ethylene production in soil Soil Biology and Biochemistry **12**: 357-362
- 154 THOMAS K C and SPENCER M. (1978) Evolution of ethylene by Saccharomyces cerevisiae as influenced by the carbon source for growth and the presence of air. Canadian Journal of Microbiology **24**: 637-642
- 155 TSAO P H and ZENTMYER G.A (1979) Suppression of Phytophthora cinnamomi and Ph. parasitica in urea-amended soils In Soil-borne Plant Pathogens (Eds B Schippers and W Gams), pp 191-199 Academic Press, London.
- 156 TSAO P H and OSTER J J (1981) Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of Phytophthora in soils amended with nitrogenous organic substances. Phytopathology **71**: 53-59
- 157 TSUKAMURA M (1974) Differentiation of the "Mycobacterium" rhodochrous-group from Nocardiae by b-Galactosidase Activity Journal of General Microbiology **30**: 553-555
- 158 TURNER W B (1971) Fungal Metabolites Academic Press, London, New York.
- 159 URONE P (1976) The Primary Air Pollutants-Gaseous Their Occurrence, Sources and Effects In Air Pollution (Ed. A C. Stern), pp 23-75 Academic Press.
- 160 WALTER H.M , KEENEY D R. and FILLERY I R (1979) Inhibition of nitrification by acetylene Soil Science Society of America Journal **43**: 195-196

161. WARREN K.S. (1962) Ammonia toxicity and pH. Nature **195**: 47-49.
162. WATANABE I. and GUZMAN DE M.R. (1980) Effect of nitrate on acetylene disappearance from anaerobic soil. Soil Biology and Biochemistry **12**: 193-194.
163. WATSON A.G. and FORD E.J. (1972) Soil Fungistasis - A Reappraisal. Annual Review of Phytopathology **10**: 327-348.
164. WHITBY R.A. and ALTWOCKER E.R. (1978) Acetylene in the atmosphere: sources, representative ambient concentrations, and ratios to other hydrocarbons. Atmospheric Environment **12**: 1289-1296.
165. WHITTENBURY R., PHILLIPS K.C. and WILKINSON J.F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. Journal of General Microbiology **61**: 205-218.
166. WILHELM S. (1965) Analysis of Biological Balance in Natural Soil. In Ecology of Soil-borne Plant Pathogens (Eds K.F. Baker and W.C. Snyder) pp. 509-517. University California Press, Berkeley.
167. WIMPENNY J.W.T. (1981) Spatial order in Microbial ecosystems. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society **56**: 295-342.
168. WITT W.W. and WEBER J.B. (1974) Ethylene Adsorption and Movement in Soils and Adsorption by Soil Constituents. Weed Science **23**: 302-307.
169. WODZINSKI R.S., LABEDA D.P. and ALEXANDER M. (1978) Effects of Low Concentration of Bisulfite-Sulfite and Nitrite on Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology **35**: 718-723.
170. YEOMANS J.C. and BEAUCHAMP E.G. (1978) Limited inhibition of nitrous oxide reduction in soil in the presence of acetylene. Soil Biology and Biochemistry **10**: 517-519.
171. YOSHINARI T., HYNES R. and KNOWLES R. (1977) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. Soil Biology and Biochemistry **9**: 177-183.
172. ZENTMYER G.A. and BINGHAM F.T. (1956) The influence of nitrite on the development of Phytophthora root rot of avocado. Phytopathology **46**: 121-124.