



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΒΙΟΜΑΖΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Μαρία Φραντζέσκου

Τριμελής επιτροπή

- Νικόλαος Παρανυχιανακής
- Νικολαΐδης Νίκος
- Καρατζάς Γεώργιος

Αναπληρωματικός: Στεφανάκης Αλέξανδρος

ΧΑΝΙΑ, 2022

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου, κύριο Παρανυχιανάκη Νικόλαο για την κατανόηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Μουρνελά Ραφαήλα του εργαστηρίου Γεωργικής Μηχανικής για την βοήθεια κάθε επιπέδου που μου προσέφερε. Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω την στήριξη και κινητήρια δύναμη που μου έδωσαν οι φίλοι και οικογένεια μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Το έδαφος	7
1.1.1 Υγεία του εδάφους.....	10
1.1.2 Οργανική ύλη στο έδαφος.....	11
1.2 Εδαφική βιοποικιλότητα	12
1.2.1 Ποικιλότητα ειδών	13
1.2.2 Κατηγορίες μικροοργανισμών.....	13
1.3 Κλίμακα εξέτασης βιοποικιλότητας.....	15
1.4 Αξιολόγηση εδαφικής βιοποικιλότητας	16
1.4.1 Πλούτος γένους (Species richness).....	16
1.4.2 Δείκτης Chao1	16
1.4.3 Φυλογενετική ποικιλότητα	17
1.4.4 Δείκτης Shannon – Weaver.....	17
1.5 Μικροβιακή Βιομάζα	18
1.6 Αποδοτικότητα Χρήσης Οργανικών Υποστρωμάτων (CUE)	18
1.6.1 Μικροβιακή Αποδοτικότητα Χρήσης Οργανικών Υποστρωμάτων.....	18
1.6.2 Εξωγενείς επιρροές CUE	19
1.7 Μεταβολισμός μικροοργανισμών.....	20
1.7.1 Βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους έμβιους οργανισμούς	21
1.7.2 Βήματα μεταβολισμού των μικροοργανισμών	21
1.8 Γεωργία.....	22
Αντίκτυπο αλλαγής χρήσης γης.....	22
1.8.1 Βιολογικές καλλιέργειες.....	22
1.8.2 Θερμοκήπια	23
1.8.3 Συμβατικά και βιολογικά θερμοκήπια	25
1.9 Επώαση εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου(CHCl_3)	26
1.9.1 Ιστορικά:	26
1.9.2 Σκοπός της μεθόδου	27
1.9.3 Σύγκριση παραλλαγών της μεθόδου	27
1.9.4 Υπολογισμός τυπικού σφάλματος	28
1.10 Προσδιορισμός βιομάζας μέσω εξαγωγής DNA	28
1.10.1 Φθορισμός.....	29
1.10.2 Διαδικασία φθορισμού	29

2. Πειραματικό Μέρος.....	30
2.1 Chloroform Fumigation Direct Extraction	30
2.1.1 Πειραματική διάταξη.....	30
2.1.2 Προ επεξεργασία	32
2.1.3 Πειραματική διαδικασία.....	33
Επώαση εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου.....	33
Απευθείας εκχύλιση.....	34
2.2 Απομόνωση DNA.....	34
2.2.1 Ποσοτικοποίηση.....	34
3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση	35
3.1 Πειραματικά αποτελέσματα συμβατικών θερμοκηπίων	35
3.1.1 Σύγκριση παραμέτρων	35
Αντίκτυπο Θερμοκρασίας στον εδαφικό ολικό οργανικό άνθρακα	39
Ανάλυση ξηρών δειγμάτων.....	42
3.2 Πειραματικά αποτελέσματα βιολογικών θερμοκηπίων.....	43
3.2.1 Σύγκριση παραμέτρων	43
3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων συμβατικών και βιολογικών θερμοκηπίων	49
3.4 Προβλήματα και πιθανά σφάλματα	50
4. Συμπεράσματα.....	51
Βιβλιογραφία	52
Παραρτήματα.....	56
Παράρτημα εικόνων	56
Παράρτημα πινάκων	61
Παράρτημα διαγραμμάτων	64

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Τρίγωνο εδαφικής υφής του καθηγητή Milton Whitney, 1911 (Πηγή: Jelinski Nic)	7
Εικόνα 2: Εικόνα 2: Το ισόπλευρο υφικό τρίγωνο που χρησιμοποιείται σήμερα για τον υπολογισμό της υφής του εδάφους., USDA, 1951 (Πηγή εικόνας: https://www.soils4teachers.org/physical-properties/)	8
Εικόνα 3: Εικόνα 3: Παρουσίαση της διαφοράς μεταξύ συμπιεσμένου (αριστερά) και δομημένου χώματος (δεξιά). Όπως παρουσιάζει η εικόνα, στο δομημένο έδαφος το νερό και ο αέρας κυκλοφορούν κανονικά σε αντίθεση με το συμπιεσμένο. (Πηγή: urthagriculture.com)	9
Εικόνα 4: Χρωματικές διαφορές εδαφικών δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές. (Πηγή: Geologyin.com)	9

Εικόνα 5: Ταξινόμηση μεγέθους των εδαφικών οργανισμών (Πηγή: PeerJ [13])	13
Εικόνα 6: Εδαφικά βακτήρια (Πηγή: Michael T. Holmes, Oregon State University, Corvallis)	14
Εικόνα 7: Θερμοκήπιο μεσογειακού τύπου (Πηγή: Castilla N., "Greenhouse technology and management")	24
Εικόνα 8: Διάταξη για τον υποκαπνισμό των δειγμάτων	30
Εικόνα 9 : Πειραματική διάταξη κατά την διάρκεια υποκάπνισης δειγμάτων	31
Εικόνα 10: Πειραματική διάταξη για απευθείας εκχύλιση δειγμάτων	32
Εικόνα 11: Ζύγισμα θειικού καλίου για τη παρασκευή του αντιδρώντος που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των δειγμάτων	33

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Χρονολογία δημιουργίας θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του κατά την επεξεργασία και πειραματική διαδικασία των δειγμάτων	35
Πίνακας 2: Μέσες τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης στους 30 °C	36
Πίνακας 3: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 40°C	38
Πίνακας 4: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανίχνευσης βιομάζας μέσω απομόνωσης DNA	40
Πίνακας 5: Αποτελέσματα TOC και TN ξηρής ανάλυσης	42
Πίνακας 6: Χρονολογία κατασκευής θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του	43
Πίνακας 7: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 20 °C	44
Πίνακας 8: Μέσες τιμές δεικτών αξιολόγησης της εδαφικής βιοποικιλότητας των βιολογικών θερμοκηπίων και η τυπική τους απόκλιση	45
Πίνακας 9: Παρουσία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των εδαφικών δειγμάτων	48

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια η ανησυχία πολλών ερευνητών και γεωργών στρέφεται προς την ποιότητα και γονιμότητα του εδάφους. Οι μη βιώσιμες γεωργικές πρακτικές αρχίζουν να αντικαταστούνται από αειφόρες, φιλικές προς το περιβάλλον πρακτικές μέσω της αλλαγής από συμβατικές καλλιέργειες σε βιολογικές. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση του αντικτύπου που έχει η συνεχής καλλιέργεια γεωργικής γης με το πέρασμα των ετών σε συνδυασμό με την επιρροή που ασκεί η θερμοκρασία (4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C) στο οργανικό υλικό και τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από πέντε διαφορετικά συμβατικά θερμοκήπια και πέντε βιολογικά θερμοκήπια με δραστικά διαφορετικές χρονικές διάρκειες χρήσης τους για καλλιέργειες. Για τον υπολογισμό του εδαφικού οργανικού C χρησιμοποιήθηκαν οι μεθοδολογίες επώασης εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου (CFDE), απομόνωσης DNA και ξηρή ανάλυση εδαφικών δειγμάτων. Η βιοποικιλότητα υπολογίστηκε για τα βιολογικά θερμοκήπια χρησιμοποιώντας δείκτες άλφα-ποικιλότητας Chao1, Shannon και φοιλογενετική ποικιλότητα. Τέλος, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται πιθανά σφάλματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Με βάση τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως τα θερμοκήπια με το πιο γόνιμο χώμα είναι βιολογικά, καθώς η οργανική ύλη των συμβατικών θερμοκηπίων βρέθηκε να είναι πολύ χαμηλής συγκέντρωσης.

Abstract

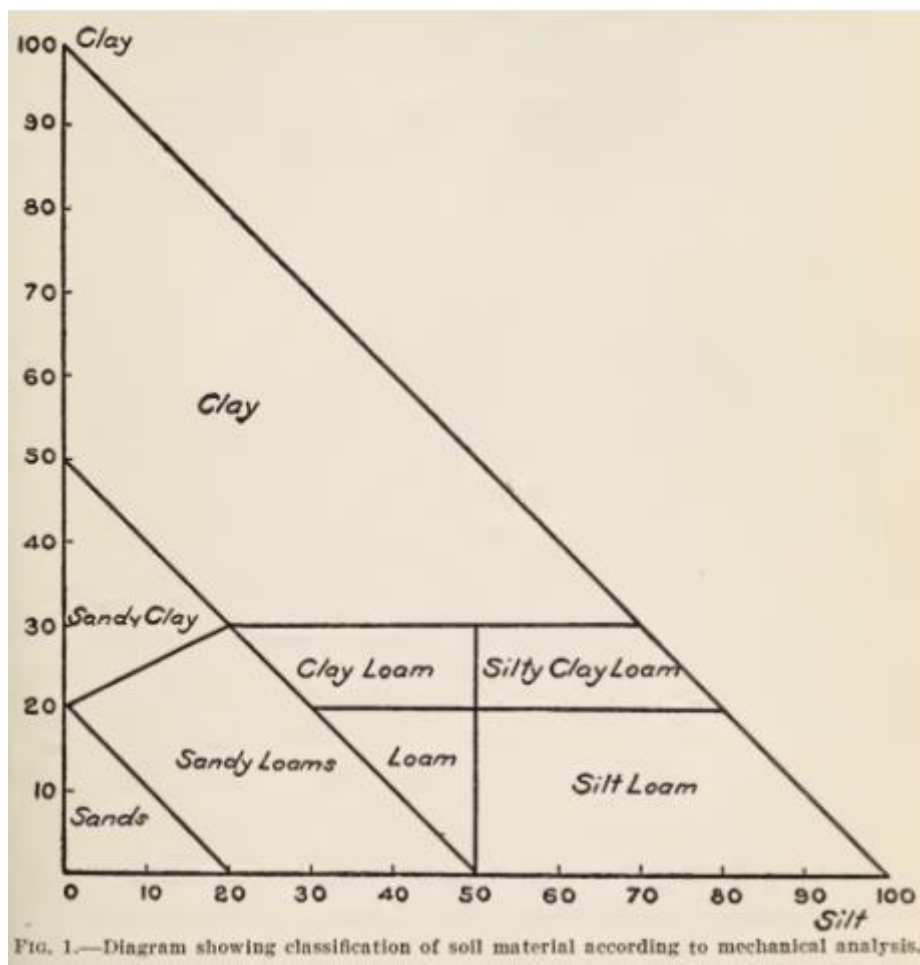
In the recent years, the concern of many scientists and farmers has shifted to soil quality and fertility. Non- sustainable agriculture practises are being replaced by sustainable, environmentally friendly practices by shifting from conventional to organic farming. The purpose of this thesis is to find the impact of continuous cultivation on agricultural land has over the years in combination with the influence of temperature (4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C) on organic matter and soil microbial communities. Samples from five different conventional and five organic greenhouses were used, with drastically different time span of usage. For the calculation of soil organic C were used chloroform fumigation and direct extraction (CFDE), DNA isolation and dry analysis of soil samples. Biodiversity was calculated for biological greenhouses using alpha-diversity indices: Chao1, Shannon and phylogenetic diversity. Lastly, the results were compared and presented with possible errors that occurred during the processing of the samples. Based on the results, it was observed that the greenhouses with the most fertile soil are organic, as the organic matter of conventional greenhouses was found to have low concentration of organic matter.

1. Εισαγωγή

1.1 Το έδαφος

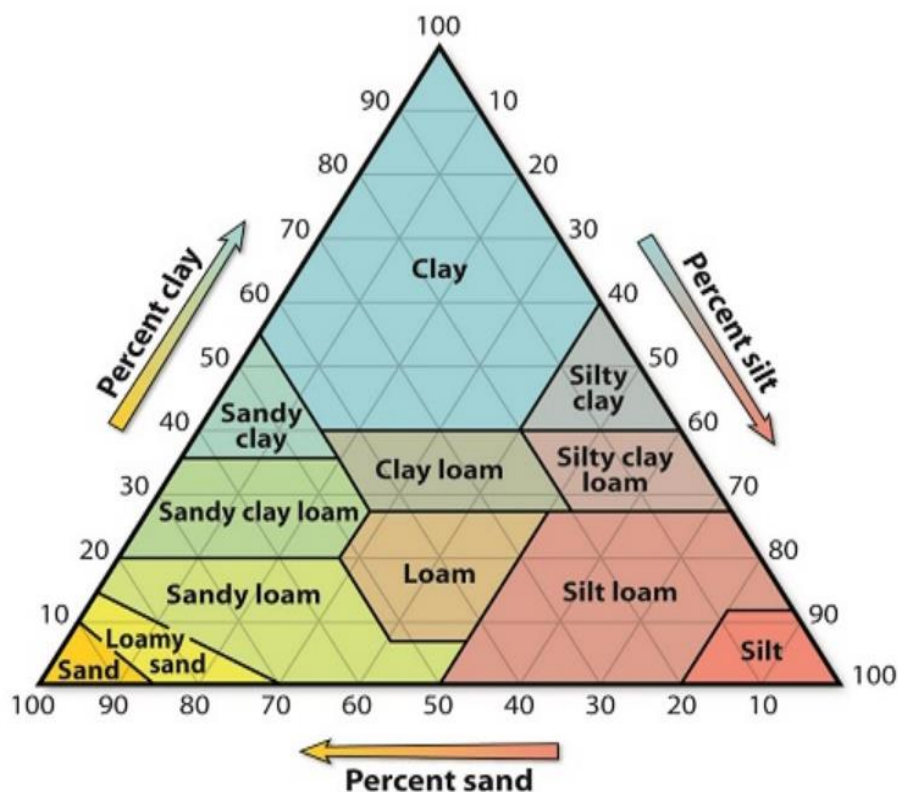
Το έδαφος ορίζεται ως το ανώτατο τμήμα του γήινου φλοιού. Αποτελείται από οργανική και ανόργανη ύλη και προσφέρει δομική υποστήριξη καθώς και θρεπτικά συστατικά στις γεωργικές καλλιέργειες. Οι φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες εντός του εδάφους όπως η διάβρωση, η μικροβιακή δραστηριότητα κ.ο.κ., καθιστούν το έδαφος ετερογενές και πολύ ποικιλόμορφο και ο συνδυασμός των ιδιοτήτων του δημιουργεί ευρύ φάσμα εδαφικών τύπων. Τα κύρια φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους αποτελούνται από την εδαφική υφή, την εδαφική δομή και το χρώμα του.

Οι τρεις βασικές εδαφικές κατηγορίες υφής (soil texture) είναι άμμος (διάμετρος 2,0 – 0,05 mm), ιλύς (διάμετρος 0,05 – 0,002 mm) και άργιλος (διάμετρος μικρότερη από 0,002 mm). Ωστόσο, τα περισσότερα εδάφη αποτελούνται από ένα συνδυασμό των τριών αυτών κατηγοριών με αποτέλεσμα το έδαφος να έχει διαφορετική υφή. Λόγο μεγάλης ανάγκης για κατανόηση της εδαφικής σύνθεσης, ο καθηγητής Milton Whitney δημιούργησε το «τρίγωνο εδαφικής υφής» το 1911 όπου στον χ-άξονα τοποθέτησε το κλάσμα ιλύς (ποσοστό επί τις εκατό) ενώ στον ψ-άξονα τοποθέτησε το κλάσμα αργίλου, όπως φαίνεται και πιο κάτω στην Εικόνα 1 [40].



Εικόνα 1: Τρίγωνο εδαφικής υφής του καθηγητή Milton Whitney, 1911 (Πηγή: Jelinski Nic)

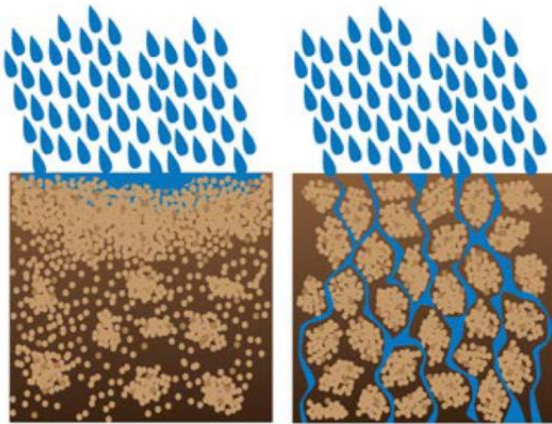
Ωστόσο, το 1927 δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά από τους Davis & Bennet το «ισόπλευρο υφικό τρίγωνο» όπου στους τρεις άξονες τοποθετήθηκαν τα κλάσματα άμμου, λάσπης και αργίλου. Το τρίγωνο αυτό χωρίστηκε σε 10 υφικές τάξεις, σε αντίθεση με τις 8 τάξεις που είναι χωρισμένο το τρίγωνο της Εικόνας 1. Με βάση τον Jelinski N. (2014) [40], μερικοί επιστήμονες διαφώνησαν με το ισόπλευρο τρίγωνο, αφού το ποσοστό άμμου μπορούσε να υπολογιστεί με την αφαίρεση των κλασμάτων λάσπης και αργίλου από το 100%. Αξίζει να σημειωθεί πως το ισόπλευρο τρίγωνο που χρησιμοποιείται σήμερα δημοσιεύθηκε πρώτη φορά το 1951 από Τμήμα Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (USDA) και είναι χωρισμένο συνολικά σε 12 τάξεις εδαφικής υφής. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Το ισόπλευρο υφικό τρίγωνο που χρησιμοποιείται σήμερα για τον υπολογισμό της υφής του εδάφους., USDA, 1951 (Πηγή εικόνας: <https://www.soils4teachers.org/physical-properties/>)

COMPACTED SOIL

STRUCTURED SOIL



Εικόνα 3: Παρουσίαση της διαφοράς μεταξύ συμπιεσμένου (αριστερά) και δομημένου χώματος (δεξιά). Όπως παρουσιάζει η εικόνα, στο δομημένο έδαφος το νερό και ο αέρας κυκλοφορούν κανονικά σε αντίθεση με το συμπιεσμένο. (Πηγή: urthagriculture.com)

Δομή του εδάφους ορίζεται ως η διάταξη των εδαφικών σωματιδίων σε συμπλέγματα (ή αλλιώς συσσωματώματα) λόγω σύνδεσης άμμου, λάσπης, αργίλου και οργανικής ύλης. Η εδαφική δομή έχει άμεση σχέση με το πορώδες το οποίο επηρεάζει τους κύκλους αέρα και νερού εντός του εδάφους, καθώς και την ανάπτυξη ριζών. Το σχήμα που παίρνουν τα συσσωματώματα εξαρτάται από την σύνθεση και τις συνθήκες που επικρατούσαν κατά τη σύνθεσή τους (καιρικές συνθήκες, καταπόνηση λόγω πατήματος, καλλιέργειες κ.ο.κ).

Οι διαφορές στο χρώμα που παίρνει το έδαφος οφείλονται στην ορυκτολογία του, την οργανική ύλη που περιέχεται σε αυτό και την περιεκτικότητά του σε υγρασία (ικανότητα αποστράγγισης). Ανάλογα με το τι ορυκτά υπάρχουν

στο έδαφος μπορεί να πάρει και ανάλογο χρώμα από κιτρινωπό-καφέ (εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο), μέχρι σκούρο καφέ ή μαύρο (εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία). Το χρώμα του εδάφους μπορεί να είναι ένδειξη συμπεριφοράς καθώς ένα έδαφος με καλή στράγγιση θα έχει εντονότερο χρώμα σε σχέση με ένα έδαφος το οποίο είναι συχνά μουσκεμένο. Αξίζει να σημειωθεί πως η μέτρηση του χρώματος χωρίζεται σε τρεις μεταβλητές, την απόχρωση του (πραγματικό χρώμα), την αξία (πόσο ανοιχτό/σκούρο είναι) και τέλος το χρώμα του (ένταση).



Εικόνα 4: Χρωματικές διαφορές εδαφικών δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές. (Πηγή: Geologyin.com)

1.1.1 Υγεία του εδάφους

Η υγεία του εδάφους έχει λάβει πολλούς ορισμούς, με γενικό «την *ικανότητα του εδάφους να δρα ως ζωτικό σύστημα που ανταποκρίνεται στις διαχειριστικές παρεμβάσεις όπως ένας οργανισμός*» [38],[39] και θεωρείται ως αναπόσπαστο στοιχείο της αειφόρου γεωργίας. Όσον αφορά τη γεωργική χρήση γης, η «*υγεία του εδάφους αναφέρεται στην ικανότητα του να διατηρεί και να υποστηρίζει την ανάπτυξη των καλλιεργειών και των ζώων ενώ παράλληλα να διατηρεί και να βελτιώνει το περιβάλλον*» [39]. Η επιστημονική κοινότητα βέβαια, χρησιμοποιεί τον όρο «*ποιότητα εδάφους*» αντί για «υγεία του εδάφους». Η διαφορά μεταξύ των δύο όρων αφορά τον τρόπο χρήσης τους. Όπως αναφέρεται και στο βιβλίο “Soil Health and Climate Change” [39], ο όρος ποιότητα εδάφους χρησιμοποιείται σε φυσικά και σε διαχειριζόμενα οικοσυστήματα ενώ γίνεται χρήση του όρου «υγεία του εδάφους» για εδάφη τα οποία είναι καλλιεργημένα ή για βοσκότοπους. Παρά την διαφορετική χρήση των δύο αυτών όρων, αρκετοί από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό και αξιολόγηση του εδάφους είναι παρόμοιοι. Οι κύριες φυσικές παραμέτρους της υγείας του εδάφους είναι η δομή και σταθερότητα αδρανών, το πορώδες, η θερμοκρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η εδαφική οργανική μάζα, ο λόγος C:N, η εδαφική αναπνοή και τέλος η εδαφική μικροβιακή βιομάζα. [38],[39]

Όπως αναγράφεται και στο Κεφάλαιο 1.1, η δομή του εδάφους ορίζεται ως η διάταξη και οργάνωση σωματιδίων της εδαφικής μάζας. Επιπλέον, σε συνδυασμό με τη δομή, παίζει ρόλο και η εδαφική σταθερότητα, η οποία ορίζεται ως «*η αντίσταση των αδρανών του εδάφους σε εξωγενείς ενέργειες*» [38]. Ο κύριος ρόλος τους στην υγεία του εδάφους είναι η τροφοδότηση των φυτών καθώς και των μικροοργανισμών που συμβιώνουν στο έδαφος, μέσω του ελέγχου και της κίνησης του νερού και του αέρα στο υπέδαφος, πράγμα που την καθιστά βασικό και χρήσιμο εδαφικό δείκτη υγείας. Η εδαφική δομή επηρεάζεται από τα ανόργανα συστατικά που υπάρχουν μέσα στο έδαφος, την ποσότητα και την ποιότητα της οργανικής ύλης, τις μεθόδους καλλιεργειών που εφαρμόζονται στη συγκεκριμένη περιοχή καθώς και από τις φυσικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα (διογκώσιμο, πάγωμα κλπ). [39]

Εδαφικό πορώδες είναι στην ουσία ο λόγος των κενών χώρων ως προς τον συνολικό όγκο συγκεκριμένου κλάσματος υλικού [38]. Το μέτρο του πορώδους καθώς και η κατανομή του παρέχει στο έδαφος τις ικανότητες αερισμού και υδάτινο δυναμικό καθώς ταυτόχρονα επηρεάζει την ανάπτυξη ριζών των φυτών. Το εδαφικό πορώδες μπορεί να επηρεαστεί από έντομα και σκουλήκια τα οποία κινούνται εντός του εδάφους με αποτέλεσμα να δημιουργούν διάστημα πόρων, από παγιδευμένα αέρια εντός του εδάφους, από την κίνηση και την ανάπτυξη των ριζών και τέλος από υλικά στο έδαφος τα οποία μπορεί να διαλυθούν με το πέρασμα του χρόνου.

Η εδαφική θερμοκρασία εξαρτάται από το ισοζύγιο πρόσληψης και απώλειας ηλιακής ακτινοβολίας στην επιφάνεια του εδάφους, την εξάτμιση, την αγωγιμότητα της θερμότητας μέσω του εδαφικού προφίλ και της μεταφοράς μέσω του υδάτινου κύκλου. Επιπλέον, η θερμοκρασία του εδάφους επηρεάζεται και επηρεάζει παράλληλα την βλάστηση στην επιφάνεια του. Θεωρείται μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν τις διεργασίες στο έδαφος. Για παράδειγμα, όταν η εδαφική θερμοκρασία είναι υψηλή, επιταχύνεται η αποσύνθεση οργανικής ύλης στο έδαφος που έχει ως αλυσιδωτό αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιολογικής δραστηριότητας, οδηγώντας σε

μείωση συσσωρευμένης βιομάζας, εξάντληση του C και μείωση της αναλογίας C:N [38],[39]

Το εδαφικό pH είναι μέτρο της οξύτητας ή της αλκαλικότητας του εδάφους και θεωρείται μια συνάρτηση του υλικού, των μακροπρόθεσμων καιρικών συνθηκών και του γενικότερου κλίματος καθώς και της βλάστησης που υπάρχει [38]. Δεδομένου πως δεν προκύπτουν ταχείες αλλαγές στο pH λόγω ακραίων καιρικών φαινομένων ή λίπανσης και εναπόθεσης CO₂ και N αντίστοιχα, θεωρείται σημαντικός δείκτης της υγείας του εδάφους και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση αλλαγής χρήσης γης και γεωργικών πρακτικών [38]. Επιπλέον, θεωρείται σημαντικός δείκτης λόγω της επιρροής που έχει στην διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των φυτών. Στην κλίμακα pH, όταν η τιμή είναι 7,0 θεωρείται ουδέτερο. Εδάφη με ενδείξεις κάτω από 7,0 θεωρούνται όξινα ενώ ενδείξεις μεγαλύτερες από 7,0 θεωρούνται αλκαλικά. Σε περίπτωση που το έδαφος είναι πολύ όξινο, μερικά στοιχεία (κυρίως αλουμίνιο και μαγγάνιο) μπορεί να γίνουν πολύ τοξικά προς τα φυτά λόγω αύξησης της διαθεσιμότητας τους με ταυτόχρονη μείωση της διαθέσιμης ποσότητας ασβεστίου, φώσφορου και μαγνησίου. Στην περίπτωση του αλκαλικού εδάφους, πολλά από τα μικροθρεπτικά συστατικά γίνονται λιγότερο διαθέσιμα.

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα (electrical conductivity- EC) του εδάφους χρησιμοποιείται ως χημικός δείκτης της ποιότητας και είναι μέτρο συγκέντρωσης άλατος. Δίνει βραχυπρόθεσμα στοιχεία για πιθανές τάσεις αλατότητας, για τη βιολογική δραστηριότητα του εδάφους, την απόδοση καλλιέργειας καθώς και για τον κύκλο των θρεπτικών ουσιών [38]. Επηρεάζεται έντονα από τις καιρικές συνθήκες που μπορεί να επικρατούν σε μια περιοχή καθώς συνδυασμός υψηλών θερμοκρασιών και μειωμένης βροχόπτωσης αυξάνουν την EC. Με βάση την βιβλιογραφία, εδάφη τα οποία έχουν ηλεκτρική αγωγιμότητα μεγαλύτερη από 4mmhos/cm θεωρούνται αλατούχα (ή αλκαλιωμένα).

Εδαφική οργανική μάζα (soil organic mass – SOC) είναι το σύνολο της οργανικής ύλης του εδάφους και περιλαμβάνει τόσο ζωντανά όσο και νεκρά συστατικά. Χαρακτηριστικό της SOC είναι η ετερογένεια σύνθεσης της ενώ έχει μεγάλη επίρρεια στην βιοποικιλότητα, στη γονιμότητα καθώς και στις φυσικές ιδιότητες του εδάφους όπως την ευστάθεια των αδρανών και τις υδραυλικές ιδιότητες γενικότερα [38]. Το ζωντανό μέρος της SOC είναι η εδαφική μικροβιακή βιομάζα, η οποία θεωρείται *«ευαίσθητος δείκτης αλλαγών στις διεργασίες εδάφους με συνδέσμους με το εδαφικό δυναμικό των θρεπτικών ουσιών και ενέργειας συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς μεταξύ κλασμάτων του εδαφικού οργανικού C»* [38] και επηρεάζει άμεσα τον κύκλο των θρεπτικών ουσιών. Αξίζει να σημειωθεί πως αν και ασταθής, η μικροβιακή βιομάζα έχει γρήγορη ανταπόκριση στις περιβαλλοντικές αλλαγές.

1.1.2 Οργανική ύλη στο έδαφος

Ο ενεργός κύκλος άνθρακα (carbon - C) χωρίζεται σε τέσσερις αποθήκες. Η μεγαλύτερη αποθήκη C είναι οι ωκεανοί, με την μεγαλύτερη ποσότητα C να είναι εκτός κυκλοφορίας και αποθηκευμένη στα βαθύτερα στρώματα του ωκεανού. Μια άλλη αποθήκη ενεργού C είναι η ατμόσφαιρα με τον C που περιέχει να είναι στη μορφή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) ενώ ταυτόχρονα τα έμβια (κυρίως φυτά) περιέχουν την ίδια τάξης μεγέθους C. Η τέταρτη αποθήκη C θεωρείται το έδαφος. [34]

Όπως αναφέρει ομόφωνα η επιστημονική κοινότητα, «το έδαφος θεωρείται η πλέον μεγαλύτερη δεξαμενή ενεργού κύκλου του C στα επίγεια οικοσυστήματα» ενώ είναι η δεύτερη μεγαλύτερη σε συνολική αποθήκευση C [34]. Ο επιστήμονας Janzen H.H. (2004) [34] επισημαίνει πως υπάρχει σύνδεση μεταξύ των προαναφερόμενων αποθηκών C για την ολοκλήρωση του κύκλου C. Συγκεκριμένα, η σύνδεση του ατμοσφαιρικού C και του εδάφους γίνεται μέσω φωτοσύνθεσης, ενώ γίνεται ταχεία απελευθέρωση περίπου του μισού ποσού C πίσω στην ατμόσφαιρα λόγω αναπνοής των φυτών. Το υπόλοιπο ποσό C εισέρχεται μέσω του φυτικού ιστού στο έδαφος κατά τη διάρκεια γήρανσης των φυτών ενώ λόγω της ετεροτροφικής αναπνοής των εδαφικών μικροοργανισμών ο C επιστρέφει στην ατμόσφαιρα σε μορφή CO₂ κι έτσι κλείνει ο κύκλος. [34]

Οι ρυθμοί εισροών οργανικής ύλης στο έδαφος μέσω απορριμμάτων ζώων και φυτών σε μορφή κοπριάς, φύλλων και ριζών σε συνδυασμό με την αποσύνθεση τους είναι παράγοντες κλειδιά για τον καθορισμό του οργανικού περιεχομένου του εδάφους. Οι μικροοργανισμοί που συμβιώνουν στο έδαφος είναι υπεύθυνοι για την αποσύνθεση της οργανικής ύλης με αποτέλεσμα την προσφορά απαραίτητων θρεπτικών συστατικών στα φυτά για την υγεία και την ανάπτυξη τους. Η ταχύτητα αποσύνθεσης της οργανικής ύλης εξαρτάται από την πολυπλοκότητα των ενώσεων που έρχονται αντιμέτωποι οι μικροοργανισμοί καθώς και από την σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων. Μερικοί μικροοργανισμοί μπορούν να αποσυνθέσουν σε διαφορετικούς ρυθμούς διαφορετικές ενώσεις, πράγμα που καθιστά πολύ σημαντική την ευρεία εδαφική βιοποικιλότητα.

1.2 Εδαφική βιοποικιλότητα

Ο όρος εδαφική βιοποικιλότητα (biodiversity) έχει χρησιμοποιηθεί πρώτη φορά το 1988 από τους Wilson & Peter και εκ τότε έχει πάρει διάφορους ορισμούς. Όσον αφορά το έδαφος, βιοποικιλότητα ορίζεται ως «η μεταβλητότητα των ζωντανών οργανισμών στο έδαφος και στα οικολογικά συμπλέγματα του οποίου αποτελούν μέρος, συμπεριλαμβάνοντας την ποικιλότητα εντός των ειδών, μεταξύ των ειδών και των οικοσυστημάτων» [13].

Λόγω του φάσματος της ποικιλότητας και μεταβλητότητας των ιδιοτήτων του εδάφους, οι Jensen, Torn & Harte (1990) [14] χώρισαν την βιοποικιλότητα σε πέντε ομάδες. Τις ομάδες αυτές ορίζουν:

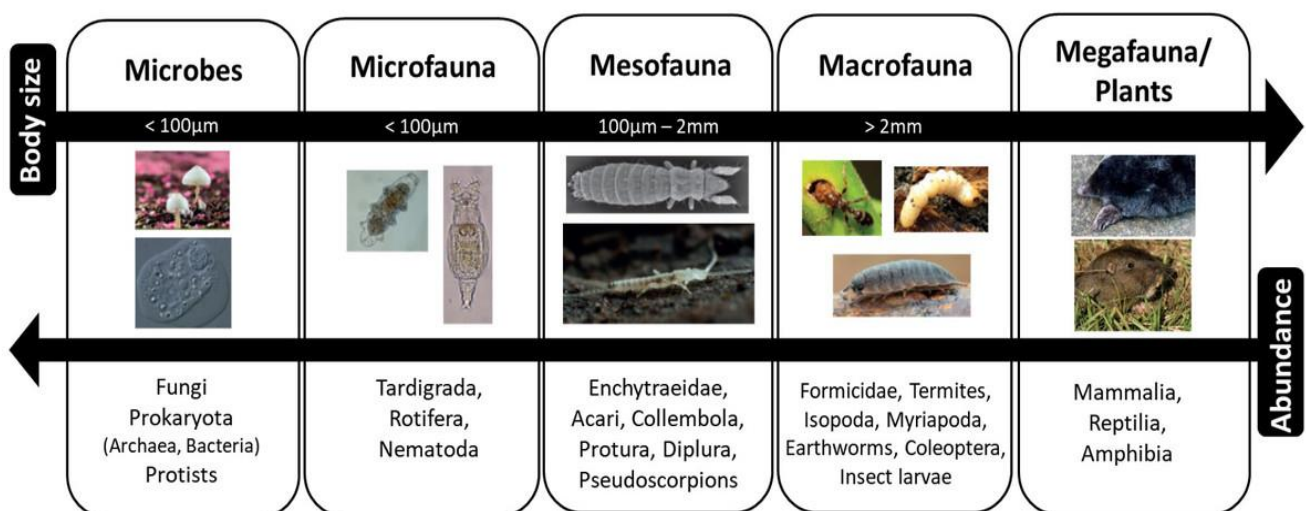
1. η ποικιλομορφία του οικοσυστήματος (ecosystem diversity) στην οποία λαμβάνουν υπόψη την ποικιλομορφία ενδιαιτημάτων που βρίσκονται στο έδαφος
2. η ποικιλότητα των ειδών (species diversity) όπου το είδος και η αφθονία διαφορετικών οργανισμών κατοικούν στο έδαφος (παρόμοιο με ταξινομική ποικιλομορφία)
3. η γενετική ποικιλομορφία ως συνδυασμός διαφορετικών γονιδίων που βρίσκονται σε έναν πληθυσμό ενός μεμονωμένου πληθυσμιακού είδους (single species) ή μιας κοινότητας οργανισμών και το μοτίβο της παραλλαγής που βρίσκεται σε διαφορετικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους
4. η φαινοτυπική ποικιλότητα με βάση οποιαδήποτε και/ή όλες τις μορφολογικές, βιοχημικές ή φυσιολογικές πτυχές του οργανισμού στο έδαφος και είναι αποτέλεσμα γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων

5. η λειτουργική ποικιλότητα ως τα είδη των λειτουργιών που εκτελούνται από τη χλωρίδα του εδάφους

Τα εδάφη θεωρούνται ως μια από τις μεγαλύτερες «δεξαμενές» βιοποικιλότητας, λόγω του μεγάλου αριθμού έμβιων οργανισμών που διαβιούν στα εδαφικά οικοσυστήματα.

1.2.1 Ποικιλότητα ειδών

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ποικιλότητα των ειδών αναφέρεται στα είδη και στην αφθονία των οργανισμών που διαβιούν στο έδαφος. Λόγω του μεγάλου εύρους των οργανισμών αυτών, η επιστημονική κοινότητα (ενδεικτικά οι Swift, Heal & Anderson (1979) και Wurst et al. (2012)) τους ταξινόμησαν σε πέντε ομάδες με βάση το μέγεθος τους [13]. Οι ομάδες αυτές είναι μικροοργανισμοί, μικροπανίδα με διάμετρο κυττάρου μικρότερο από 100μm, μεσοπανίδα με διάμετρο σώματος-κυττάρου μεταξύ 100 μm και 2 mm, μακροπανίδα και μέγα-πανίδα (≥ 2 mm). Σημειώνεται ότι διαπιστώνεται διαφορά ερμηνείας για μερικά τμήματα της ταξινόμησης αυτής λόγω του ορίου μεγέθους τους, για αυτό το λόγο η ταξινόμηση τους μπορεί να γίνει με βάση τις διαστάσεις του σώματος τους. [13]



Εικόνα 5: Ταξινόμηση μεγέθους των εδαφικών οργανισμών (Πηγή: PeerJ [13])

1.2.2 Κατηγορίες μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί, παρά το μικρό μέγεθος τους, είναι αναμφισβήτητα η πιο ποικιλόμορφη ομάδα στο έδαφος. Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στο εδαφικό οικοσύστημα είναι πολύ μεγάλη καθώς είναι ο συνδετικός κρίκος του κύκλου εργασιών άνθρακα στο έδαφος. Συνεισφέρουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως την αποσύνθεση οργανικής ύλης, τη μεσολάβηση στις αλληλεπιδράσεις των φυτών και η ανοργανοποίηση και ανακύκλωση θρεπτικών ουσιών. Επιπλέον είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή του μεγαλύτερου μέρους της εδαφικής βιομάζας και την παραγωγή χούμου. Υπάρχουν πέντε κύρια είδη μικροοργανισμών στο έδαφος, τα βακτήρια, τα αρχαία, οι μύκητες, οι πρῶτιστες και οι ιοί.

Βακτήρια

Τα βακτήρια (bacteria) είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί οι οποίοι μπορούν να βρεθούν σχεδόν παντού και είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των οικοσυστημάτων. Η ταξινόμηση τους μπορεί να γίνει με βάση τα διάφορα χαρακτηριστικά τους. Ταξινομούνται με βάση το σχήμα τους σε ραβδοειδή, σφαιρικά, σπειροειδή,



Εικόνα 6: Εδαφικά βακτήρια (Πηγή: Michael T. Holmes, Oregon State University, Corvallis)

ακτινομύκητες (νήματα λεπτής διακλάδωσης) ενώ ένα μέρος τους ανήκει σε διαφορετικές ομάδες σχημάτων πράγμα που τα καθιστά περίπλοκα. Ακόμα, μπορούν να χωριστούν σε αερόβια και αναερόβια, σε Gram θετικά και Gram αρνητικά. Ένας από τους σημαντικότερους διαχωρισμούς των βακτηρίων είναι σε αυτότροφους και ετερότροφους οργανισμούς. Ο Hoogman J.J. (2011) [15] αναφέρει πως «αυτότροφα βακτήρια είναι τα βακτήρια που παίρνουν τον αναγκαίο άνθρακα για τις λειτουργίες τους από το διοξείδιο του άνθρακα. Μερικά αυτότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν το ηλιακό φως για την κατευθείαν παραγωγή σακχάρων από το CO₂, ενώ άλλα εξαρτώνται από διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις». Από την άλλη, τα ετεροτροφικά βακτήρια, παίρνουν τις απαραίτητες τροφές που χρειάζονται (υδατάνθρακες, σάκχαρα) από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται είτε αυτό είναι κύτταρα ή ακόμα οργανισμοί μέσα στους οποίους διαβιούν [15]. Τέλος, αυτό που χαρακτηρίζει τα βακτήρια είναι οι λειτουργίες τους οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για την ισορροπία του εδάφους καθώς και άλλων οικοσυστημάτων. Τα βακτήρια μπορεί να ομαδοποιηθούν [15] ως:

1. «αποικοδομητές (βακτήρια που καταναλώνουν απλά σάκχαρα και απλές ενώσεις άνθρακα, όπως εκκρίματα ρίζας και φρέσκα απορρίμματα φυτών)»
2. «συμβιωτές (τα βακτήρια δημιουργούν συνεργασίες με φυτά συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων που δεσμεύουν το άζωτο)»
3. «παθογόνα (τα βακτήρια μπορούν να γίνουν παθογόνα προς άλλους οργανισμούς)»
4. «λιθοτροφικά ή χημειοτροφικά (αποκτούν ενέργεια από αζωτούχες, θειούχες, σιδηρούχες ή υδρογονούχες ενώσεις αντί από ενώσεις C)»

Υπολογίζεται ότι η βιοποικιλότητα των βακτηρίων και μόνο, είναι τόσο μεγάλη όπου ένα 1 g ενεργού εδάφους μπορεί να περιέχει από δέκα χιλιάδες μέχρι εκατοντάδες εκατομμύρια είδη. [15]

Αρχαία

Τα Αρχαία (Archaea), όπως και τα βακτήρια, είναι μονοκύτταροι οργανισμοί. Η εξελικτική διαφορά τους με τα βακτήρια είναι η αντοχή τους σε ακραίες καιρικές και περιβαλλοντικές συνθήκες (υψηλές θερμοκρασίες ή θερμοκρασίες παγετού, υψηλή αλατότητα) ενώ μερικά είδη των αρχαίων έχουν αντοχή σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Σε σχέση με τα υπόλοιπα εδαφικά μικρόβια (βακτήρια, ιούς, μύκητες), τα αρχαία έχουν την μικρότερη ποικιλομορφία. Οι μεγαλύτερες αφθονίες των αρχαίων βρίσκονται στην ριζόσφαιρα του εδάφους ενώ με βάση τις μελέτες που εκπονήθηκαν φαίνεται πως αλληλοεπιδρούν άμεσα με τα φυτά. Σε απουσία φυτικών ριζών, δεν ανιχνεύθηκαν κύτταρα Αρχαίων, ενώ σε άλλη μελέτη ανιχνεύθηκαν στις ρίζες φυτών χωρίς την παρουσία εδαφικού πορώδους. Ο συνδυασμός των συμπερασμάτων από τις έρευνες που εκπονήθηκαν ως τώρα δείχνει πως τα αρχαία έχουν αναπτύξει μερικές λειτουργίες στο φυτικό οικοσύστημα οι οποίες αφορούν τον κύκλο θρεπτικών ουσιών και ειδικά το N, λειτουργίες αφομοίωσης και καταβολισμού. [16]

Μύκητες

Οι μύκητες κατατάσσονται στους Ευκαρυότες μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί και υπάρχουν σχεδόν σε όλο το εδαφικό οικοσύστημα, λόγω της αντοχής τους σε μεγάλο εύρος pH. Η προσαρμογή τους αυτή, τους δίνει τη δυνατότητα να έχουν πρόσβαση σε εναλλακτικά αποθέματα άνθρακα, πράγμα που καθιστά τις κοινωνίες στις οποίες κυριαρχούν πιο αποδοτικές ως προς τη παραγόμενη βιομάζα [8]. Η ταξινόμηση τους γίνεται με βάση τις λειτουργίες τους και χωρίζονται σε τρεις βασικές ομάδες, βιολογικοί ελεγκτές, ρυθμιστές οικοσυστήματος και είδη που συμμετέχουν στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης [17]. Όπως επισημαίνουν οι Frac et al. (2018), ένα χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα ρύθμισης της ισορροπίας των θρεπτικών συστατικών μέσω αποσύνθεσης των φυτικών ιστών που εναποτίθενται ή ελευθερώνονται στο έδαφος, μετατρέποντας επομένως το οργανικό υλικό σε βιομάζα, CO₂ και οργανικά οξέα. Αξίζει να σημειωθεί πως στον γεωργικό τομέα παρατηρείται τα τελευταία έτη πρόοδος όσον αφορά την συνεισφορά ειδών μυκήτων αλλά και βακτηρίων στη μείωση της ανάγκης σε θρεπτικά στοιχεία των καλλιεργειών με ταυτόχρονη αντικατάσταση των λιπασμάτων και αύξηση παραγωγικότητας τους [19].

1.3 Κλίμακα εξέτασης βιοποικιλότητας

Για τον υπολογισμό της βιοποικιλότητας πρέπει να γίνει καθορισμός της κλίμακας καθώς και του επιπέδου σύγκρισης. Ο Robert H. Whittaker (1960) [30] εισήγαγε για πρώτη φορά τις ορολογίες α-ποικιλότητα, β-ποικιλότητα και γ-ποικιλότητα.

- Άλφα- ποικιλότητα (α- ποικιλότητα ή alpha diversity ή α-diversity) ορίζεται ως η μέση ποικιλότητα μικροοργανισμών που αλληλοεπιδρούν εντός συγκεκριμένων τοποθεσιών ή ενδιαιτημάτων σε μια δεδομένη περιοχή.
- Βήτα- ποικιλότητα (β- ποικιλότητα ή beta diversity ή β-diversity) εκφράζει την απόκριση μικροοργανισμών σε χωρική ετερογένεια δηλαδή μεταξύ διαφορετικών βιοτόπων εντός ίδιας γεωγραφικής περιοχής [13]. Χαμηλή β-

diversity μεταφράζεται σε υψηλή ομοιότητα σύνθεσης μικροβιακών κοινοτήτων μεταξύ διαφορετικούς βιότοπους.

- Γάμμα- ποικιλότητα (γ- ποικιλότητα ή gamma diversity ή γ-diversity) ορίζει το σύνολο βιοποικιλότητας σε μια ευρείας κλίμακας περιοχή.

1.4 Αξιολόγηση εδαφικής βιοποικιλότητας

Για την μέχρι τώρα μελέτη της εδαφικής βιοποικιλότητας έχουν αναπτυχθεί διάφορες πρακτικές αξιολόγησης που βασίζονται είτε σε ειδικούς δείκτες είτε σε υπολογισμένες μετρήσεις.

1.4.1 Πλούτος γένους (Species richness)

Η πιο απλή αλλά και παλιά αξιολόγηση βιοποικιλότητας είναι ο πλούτος γένους (species richness) η οποία βασίζεται στον αριθμό ειδών που βρίσκεται σε μια προκαθορισμένη περιοχή. Ο όρος πλούτος γένους προτάθηκε το 1967 από τον McIntosh R. P. ως εναλλακτικός για το «αριθμός ειδών (species number)» που προτάθηκε από τους Ghelardi et al. (1964) [21]. Με βάση τον Peet R. K. (1974) [21] η αλλαγή της ορολογίας έγινε αφού «ο όρος αριθμός ειδών υπονοούσε ότι ο αριθμός των ειδών σε μια κοινότητα μπορεί πράγματι να προσδιοριστεί» με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείτε πολύ από την επιστημονική κοινότητα. Αξίζει να σημειωθεί πως και οι δύο ορολογίες προέρχονται σε μεταγενέστερο στάδιο από τους Fisher, Corbet & Williams οι οποίοι ήταν από τους πρώτους που ασχολήθηκαν με την ποσοτικοποίηση σε αυτό τον τομέα. Επιπλέον, εισήγαγαν λογαριθμικό δείκτη ποικιλότητας. [21]

Στην περίπτωση της εδαφικής βιοποικιλότητας, ο πλούτος γένους αφορά τα είδη που υπάρχουν σε μια μικροβιακή κοινότητα ή σε συγκεκριμένο δείγμα εδαφικού πορώδους. Παρά την θεωρητική ευκολία της μεθόδου αυτής, προκύπτουν προβλήματα. Αρχικά, η διαδικασία αυτή εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος, πράγμα που την καθιστά λιγότερο έμπιστη λόγω της άνισης προσπάθειας λήψης δειγμάτων [22]. Επιπλέον, λόγω της ποικιλόμορφης φύσης των μικροοργανισμών, «*κοινά είδη μπορούν να βρεθούν με μικρή προσπάθεια δειγματοληψίας και άλλα με μεγαλύτερη δειγματοληπτική προσπάθεια*» [13], καθιστώντας πλέον την διαδικασία σχετικά αναξιόπιστη. Έτσι, οι επιστήμονες ανέπτυξαν άλλες αριθμητικές μεθόδους αξιολόγησης της βιοποικιλότητας.

1.4.2 Δείκτης Chao1

Όπως και ο species richness, έτσι και ο δείκτης Chao1, αντιπροσωπεύει τον πλούτο των ειδών μιας μικροβιακής κοινότητας. Αναπτύχθηκε το 1984 από την Anne Chao και η βάση αυτής της μη παραμετρικής μεθόδου είναι ότι «*τα σπάνια είδη συνάγουν τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των ειδών που λείπουν*» [26] .

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

Όπου S_{obs} ο συνολικός αριθμός των ειδών που παρατηρήθηκαν στο δείγμα, F_1 ο αριθμός των μοναδιαίων ειδών (singletons – είδη που έχουν βρεθεί μόνο μια φορά στο δείγμα) και αντίστοιχα F_2 ο αριθμός των μικροβιακών ειδών τα οποία είχαν μόνο δύο έμβιες μονάδες στο δείγμα (doubleton) [25]. Παρατηρείται ευαισθησία όσον αφορά σπάνια είδη χαμηλής αφθονίας στην μικροβιακή κοινότητα, σε αντίθεση με τον δείκτη πλούτου. Η μείωση του συγκεκριμένου δείκτη μεταφράζεται σε πιθανές απώλειες σπάνιων ειδών. [25, 26]

1.4.3 Φυλογενετική ποικιλότητα

Ο όρος φυλογενετική ποικιλότητα (phylogenetic diversity – PD, γνωστή και ως “Tree of life”) είναι μέτρο βασισμένο στη φυλογένεια και χαρακτηρίζει την δομή οικολογικών κοινοτήτων. Ορίστηκε πρώτη φορά από τον Daniel P. Faith το 1992 ως «το άθροισμα των μηκών όλων των φυλογενετικών κλαδιών που είναι μέλη των αντίστοιχων ελάχιστων διαδρομών» [27] ή αλλιώς ως «το άθροισμα του μήκους κλαδιών ενός φυλογενετικού δέντρου που συνδέει όλα τα είδη» [28]. Όπως αναφέρει ο ίδιος ο D. P. Faith σε πιο πρόσφατη δημοσίευση του [29], «ο ορισμός αυτός προκύπτει από το εξελικτικό μοντέλο στο οποίο τα μήκη κλαδιών αντικατοπτρίζουν τις εξελικτικές αλλαγές σε χαρακτηριστικά, έτσι ώστε η κοινή καταγωγή αναμένεται να αντιπροσωπεύει κοινά χαρακτηριστικά».

Η PD υπολογίζεται με βάση χρονικές εκτιμήσεις ή μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά δεδομένα ενώ ταυτόχρονα γίνεται υπόθεση για τις εξελικτικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά αυτά [29]. Χρησιμοποιώντας τον δείκτη PD μπορούν να ληφθούν πληροφορίες που αφορούν τις λειτουργίες του οικοσυστήματος και τους παράγοντες φυτικής παραγωγής.

1.4.4 Δείκτης Shannon – Weaver

Ο δείκτης Shannon-Weiner (γνωστός και ως Shannon index ή Shannon’s diversity index) αναπτύχθηκε το 1948 από τον μαθηματικό Claude E. Shannon ως φόρμουλα για την ποσοτικοποίηση της εντροπίας σε γραμμές κειμένου. Πλέον χρησιμοποιείται στην οικολογία ως λογαριθμικό μέτρο βιοποικιλότητας (H):

$$H = - \sum p_i \cdot \log_e p_i$$

Όπου H ο δείκτης Shannon-Weiner, p_i είναι η αναλογία ατόμων του κάθε είδους(i) σε μια ολόκληρη μικροβιακή κοινότητα. Το p_i υπολογίζεται από τον λόγο έμβιων οργανισμών συγκεκριμένου είδους (n) ως προς τον συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών της κοινότητας (N), $p_i = n/N$ [23].

Σε αντίθεση με τον πλούτο γένους και τον δείκτη Chao1, «ο δείκτης Shannon λαμβάνει υπόψη τον πλούτο και την σχετική αφθονία διαφορετικών ειδών» [25]. Η ελάχιστη τιμή που παίρνει ο δείκτης είναι το μηδέν. Μηδενική τιμή δείκτη Shannon σημαίνει πως δεν υπάρχει ποικιλότητα στην κοινότητα μικροοργανισμών που αναλύεται καθώς υπάρχει μοναδικότητα είδους. Η μέγιστη τιμή δείκτη προκύπτει εφόσον όλα τα είδη περιέχουν τον ίδιο αριθμό ατόμων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ανώτατο όριο [23]. Όσο μεγαλύτερος ο δείκτης, τόσο μεγαλύτερη η ποικιλότητα.

1.5 Μικροβιακή Βιομάζα

Στη διεθνή βιβλιογραφία, ο όρος μικροβιακή βιομάζα (microbial biomass) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Postgate το 1969 [7] ο οποίος έδωσε και τον ορισμό της. Συγκεκριμένα, όρισε την βιομάζα ως την μάζα κυττάρων που μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός είναι τα χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν την βιομάζα από την νεκρομάζα. Ο ορισμός αυτός είναι παλιός καθώς δεν συμπεριλαμβάνει μεταβολικά ενεργούς μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε ελεγχόμενες συνθήκες.

Ένας νέος ορισμός έχει έρθει στο παρασκήνιο, ο οποίος αφορά την μικροβιακή βιομάζα η οποία ορίζεται ως το ζωτικό μέρος του οργανικού υλικού του εδάφους. Ο ορισμός αυτός δεν περιλαμβάνει ρίζες φυτών και έμβιους οργανισμούς οι οποίοι έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από $5 \cdot 10^3 \mu m^3$.

Οι del Giorgio & Cole (1998) όρισαν την συνολική παραγωγή βιομάζας ως το ποσοστό της μικροβιακής παραγωγής ως προς το άθροισμα της παραγωγής και της αναπνοής, κάτι που την καθιστά θεμελιώδη έννοια της αποδοτικότητας χρήσης οργανικού C (CUE).

Επιπλέον, στην σύγχρονη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται συχνά ο όρος βιοσύνθεση ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την σύνθεση, τον πολυμερισμό και την οργάνωση τους που οδηγούν στην δημιουργία νέας βιομάζας. [3]

1.6 Αποδοτικότητα Χρήσης Οργανικών Υποστρωμάτων (CUE)

Η αποδοτικότητα χρήσης οργανικών υποστρωμάτων (Carbon Use Efficiency – CUE) ορίζεται ως το ποσοστό του C που καταναλώνεται από μικροοργανισμούς οι οποίοι στη συνέχεια το μετατρέπουν σε βιομάζα [2]. Η διαδικασία αυτή είναι κρίσιμο βήμα για τον κύκλο του άνθρακα στα διάφορα οικοσυστήματα αφού τα διαθέσιμα αυτά οργανικά υποστρώματα οι μικροοργανισμοί τα μετατρέπουν σε σταθερά κυτταρικά προϊόντα. Ο ορισμός αυτός ωστόσο, παραμένει ασαφής ως όσων αφορά τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά που λαμβάνονται υπόψη καθώς και ποια η βαρύτητα τους. Στην ουσία, η CUE περιλαμβάνει πολυάριθμες φυσιολογικές διεργασίες καθώς και χαρακτηριστικά του δυναμικού της κοινότητας που επηρεάζει τον μεταβολισμό του οργανικού C σε διαφορετικές κλίμακες χρόνου και χώρου. [3]

Η αναγνώριση που παίρνει από πολλούς επιστήμονες διαφορετικών ειδικοτήτων, οφείλεται στη βοήθεια που προσφέρει για την κατανόηση αιτιών και συνεπειών του μικροβιακού κύκλου του άνθρακα καθώς και στην προστασία αυτών.

1.6.1 Μικροβιακή Αποδοτικότητα Χρήσης Οργανικών Υποστρωμάτων

Η μικροβιακή αποδοτικότητα χρήσης οργανικών υποστρωμάτων (microbial CUE - MCUE) είναι το μέρος του C που καταναλώνεται από μικρόβια το οποίο συμπεριλαμβάνεται μέσα στη βιομάζα. Εκφράζει την αναλογία της μικροβιακής απορρόφησης και ανάπτυξης, η οποία διαιρείται σε μεθόδους βασισμένες στον ρυθμό

μικροβιακής ανάπτυξης, σε μικροβιακή βιομάζα, ρυθμό απορρόφησης υποστρώματος καθώς και στην αλλαγή συγκέντρωσης υποστρώματος. Ένα ποσοστό κατανέμεται στη συσσώρευση βιομάζας μέσω ενδεργονικής διαδικασίας (αναβολισμός) ενώ το υπόλοιπο ποσοστό κατανέμεται στην καταβολική φάση του μεταβολισμού, κατά την οποία λαμβάνει μέρος η αναπνοή η οποία παρέχει την αναγκαία ενέργεια για συντήρηση, ανάπτυξη, παραγωγή ενζύμων και απόκτηση θρεπτικών στοιχείων.

Για την μικροβιακή CUE έχει τεθεί ένα θεωρητικό ανώτατο όριο (maximum microbial CUE) το οποίο υπολογίζεται γύρω στο 0.8. Σε θεωρητικό επίπεδο οι μικροοργανισμοί χρειάζονται τουλάχιστον 20% των μεταβολιζόμενων υποστρωμάτων για λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας μέσω αναπνοής ώστε να μπορούν να συντηρούν τη βιομάζα. Στην πραγματικότητα, η μικροβιακή CUE σχεδόν ποτέ δεν ταυτίζεται με το θεωρητικό ανώτατο όριο λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών – χρειάζονται περισσότερο από το ελάχιστο ποσοστό ενέργειας για την συντήρηση.

1.6.2 Εξωγενείς επιρροές CUE

Θερμοκρασία

Στην μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, υπάρχουν μικτές απόψεις όσον αφορά την αντίδραση των μικροοργανισμών στην αύξηση της θερμοκρασίας και ως συνέπεια την επιρροή που έχει στην CUE. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην σύνδεση της θερμικής προσαρμογής των μικροοργανισμών με αλλαγές στην σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων, αλλαγές στα μεταβολικά τους μονοπάτια και μειωμένη διαθεσιμότητα πόρων, το υπόστρωμα καθώς και την μέθοδο παρατήρησης.

Ενώ η ακριβής διαδικασία παραμένει ακόμη άγνωστη, μια θεωρία υποστηρίζει πως το ενεργειακό κόστος συντήρησης των μικροοργανισμών αυξάνεται ανάλογα της αύξησης της θερμοκρασίας ή λόγω απόκρισης στο θερμικό στρες (Manzoni et al., 2012) με αποτέλεσμα την μείωση της CUE. Οι Berggren et al., (2010) υποστηρίζουν πως όσο επικρατεί θερμοκρασιακή άνοδος, γίνεται αύξηση του μεταβολικού ρυθμού των μικροοργανισμών ο οποίος επικρατεί της μικροβιακής ανάπτυξης λόγω υψηλότερης θερμοκρασιακής ευαισθησίας, μειώνοντας έτσι την CUE [8]. Μια άλλη θεωρία, υποστηρίζει πως η εκρόφηση χημικά ασταθών και υψηλού λόγου C:N μορίων από ορυκτές επιφάνειες, η οποία ευνοείται από υψηλότερες θερμοκρασίες, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της CUE στις μικροβιακές κοινότητες που διαβιούν στο έδαφος (Hilasvuori et al., 2010). Άλλες έρευνες ωστόσο έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα, ότι η CUE παραμένει ανεπηρέαστη από την αύξηση της θερμοκρασίας καθώς η μείωση της με την θέρμανση μπορεί να αποδοθεί σε μεγαλύτερη μικροβιακή συγκέντρωση ή ακόμα και σε μεθοδολογικούς περιορισμούς των χρησιμοποιούμενων μεθοδολογιών (Hagerty et al., 2014; Dijkstra et al., 2011). [8]

Σε επίπεδο κοινοτήτων μικροοργανισμών, η CUE αναμένεται να αυξηθεί παράλληλα με την θερμοκρασία λόγω της ικανότητας προσαρμογής των μικροοργανισμών στις μεταβολές θερμοκρασίας αλλά και λόγω της ανάπτυξης τους η οποία υπερβαίνει την αναπνοή σε αυτή τη διαδικασία. Η μακροχρόνια θέρμανση ωστόσο πιθανώς να οδηγήσει τους μικροοργανισμούς να μειώσουν τον βασικό ρυθμό αναπνοής τους. Ως αποτέλεσμα, η CUE σε υψηλότερες θερμοκρασίες εξαρτάται από τη φυσιολογία των μικροβίων, την επιλογή υποστρώματος καθώς και από την μεθοδολογία μέτρησης. [8]

Ποιότητα υποστρώματος

Η ποιότητα υποστρώματος έχει σημαντική βαρύτητα επιρροής στην εδαφική CUE λόγω της ενσωμάτωσης του στην βιομάζα μέσω απορρόφησης οργανικού C και υπολειμμάτων της βλάστησης από τους μικροοργανισμούς. Το αποτέλεσμα αυτό επηρεάζεται από την ποικιλόμορφη σύνθεση του υποστρώματος, τα βιοχημικά μονοπάτια αποδόμησης, την διαθεσιμότητα και την αποτελεσματικότητα χρήσης του υποστρώματος. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την CUE είναι η ποιότητα του υποστρώματος που έχουν καταναλώσει οι μικροοργανισμοί σε προγενέστερη περίοδο. Όπως αναφέρουν οι Adingo S. et al., (2021) [8], «*βακτήρια τα οποία ήταν εκτεθειμένα σε περιορισμένη ανθρακική σύνθεση μπορούν να μεταβολίσουν πολύ μεγαλύτερο εύρος υποστρώματος από αυτά που ήταν εκτεθειμένα σε πλούσια ανθρακική σύνθεση*».

Διαθεσιμότητα αζώτου

Παρά τις διχασμένες απόψεις που αφορούν τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, συγκεκριμένα τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και την CUE, υπάρχει αναμφίβολα σύνδεση της διαθεσιμότητας του αζώτου (N) με την διαδικασία παραγωγής βιομάζας. Η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων επηρεάζεται άμεσα από την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Όσο τα θρεπτικά στοιχεία βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, η CUE θα διατηρείται επίσης σε χαμηλά επίπεδα γιατί η παραγωγή βιομάζας προκύπτει αφού καλυφθούν οι ανάγκες των μικροοργανισμών για επιβίωση και συντήρηση.

pH

Ένας ακόμα έμμεσος παράγοντας που επηρεάζει την CUE είναι το εδαφικό pH. Στην ουσία δρα ως παράγοντας καταπόνησης στη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων αλλά και στην διαθεσιμότητα θρεπτικών πόρων αφού μπορεί να επηρεάσει την διαλυτότητά τους. Σε ουδέτερο pH παρατηρείται η μεγαλύτερη βακτηριακή ποικιλομορφία ενώ οι Sinsabaugh et al. (2016) υπέδειξαν ότι η ελάχιστη CUE παρατηρείται σε όξινες τιμές pH ίσες με 5,4. Η ιδιαιτερότητα αυτή των βακτηρίων σε σχέση με το pH δεν ισχύει και για τους μύκητες για τους οποίους δεν έχει παρατηρηθεί αντίστοιχη απόκριση. [8]

1.7 Μεταβολισμός μικροοργανισμών

Μέσω του μεταβολισμού οι μικροοργανισμοί αποσκοπούν στην ικανοποίηση των αναγκών τους σε άνθρακα και θρεπτικά στοιχεία. Για το λόγο αυτό μεταβολίζουν ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων, επηρεάζοντας το δυναμικό συσσώρευσης – απώλειας των αποθεμάτων του εδαφικού οργανικού υλικού και την έκλυση CO₂ από τα οικοσυστήματα στην ατμόσφαιρα. Η βιομάζα στην ουσία παράγεται μέσω του μεταβολισμού των μικροοργανισμών.

1.7.1 Βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους έμβιους οργανισμούς

Ο μεταβολισμός αυτός χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση είναι ο καταβολισμός όπου γίνεται διάσπαση οργανικών μορίων σε μικρότερες μονάδες. Στην ουσία, ο καταβολισμός περιλαμβάνει όλες τις χημικές και ενζυματικές διεργασίες που σχετίζονται με την διάσπαση των οργανικών ενώσεων σε πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπαρά οξέα και άλλες ενώσεις. Η δεύτερη φάση είναι ο αναβολισμός, κατά την οποία δημιουργούνται νέες ενώσεις χρησιμοποιώντας τα προϊόντα του καταβολισμού.

1.7.2 Βήματα μεταβολισμού των μικροοργανισμών

Το πρώτο βήμα του μεταβολισμού είναι η πρόσληψη (uptake) υποστρώματος. Κατά την πρόσληψη, γίνεται εσωτερική επεξεργασία της οργανικής ύλης. Γίνεται κίνηση υποστρωμάτων με κατεύθυνση κυρίως προς τον κεντρικό μεταβολισμό με συνδεδεμένες διαδικασίες γλυκόλυσης και κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος. Εφόσον υπάρχει μεταβολική απαίτηση για C ή ενέργεια, ανάλογα τις συνθήκες ο κεντρικός μεταβολισμός προχωρά σε ανομοίωση ή αφομοίωση του υποστρώματος. [3]

Ανοβολισμός (dissimilation) είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται κατακερματισμός σύνθετων ουσιών σε πιο απλές με απελευθέρωση ενέργειας. Λαμβάνει χώρα όταν οι ενεργειακές απαιτήσεις (συμπεριλαμβανομένου δραστηριότητας συντήρησης) είναι υψηλές, υπάρχει περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών ή όταν υπάρχει περιορισμός ενέργειας. Γίνεται εξόρυξη οργανικής ύλης κατά την έρευνα για N, P ή άλλα θρεπτικά στοιχεία μέσω μη αποδοτικών αναπνευστικών μηχανισμών. Σε θεωρητικό επίπεδο, η CUE είναι μηδενική κατά τον ανοβολισμό καθώς όλο το οργανικό υλικό χρησιμοποιείται για την αναπνευστική λειτουργία των μικροοργανισμών. Οργανισμοί που βιώνουν συνθήκες ελάχιστης ανάπτυξης, περιορισμένων καθώς και κακής ποιότητας πόρων έχουν χαμηλή CUE. [3]

Η αφομοίωση (assimilation) χαρακτηρίζεται από καταβολικές και αναβολικές διαδικασίες οι οποίες παράγουν αντίστοιχα ενεργειακά ισοδύναμα και πρόδρομες ενώσεις C απαραίτητες για την βιοσύνθεση. Αντίθετα από την ανομοίωση, η αφομοίωση λαμβάνει χώρα σε ευνοϊκές συνθήκες για βιοσύνθεση, με υψηλής ποιότητας πόρων ή αφθονία θρεπτικών συστατικών, ενώ ταυτόχρονα οι απαιτήσεις συντήρησης των μικροοργανισμών έχουν ικανοποιηθεί και υπάρχουν διαθέσιμα ποσά C και ενέργειας. Ο Gommers (1988) αναφέρει πως λόγω απωλειών κατά την αφομοίωση, επηρεάζεται η CUE με αποτέλεσμα να έχει μέγιστο γύρω στο 0,85. [3]

Οι περιβαλλοντικοί ή βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν το ποσό υποστρώματος που θα αναμοιωθεί ή αφομοιωθεί έχουν επήρεια στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών, ως συνέπεια έχουν θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο στην CUE. Για παράδειγμα, σε συνθήκες όπου υπάρχει αύξηση θερμοκρασίας, πιθανώς να αυξηθεί και η αποτελεσματικότητα εφόσον γίνει πρόκληση αφομοίωσης να συντηρήσει υψηλότερα ποσοστά βιοσύνθεσης. Εναλλακτικά, εάν αυξηθούν οι απαιτήσεις σε ανομοίωση, θα υπάρξει μείωση της CUE.

1.8 Γεωργία

Με βάση τα ιστορικά δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, η ανάπτυξη της γεωργίας εμφανίζεται σε πολλές περιοχές, ενώ η αρχαιότερη περιοχή βρίσκεται στην νοτιοδυτική Ασία. Η απόλυτη επισήμανση της αρχής της γεωργίας είναι πολύ δύσκολη καθώς ξεκίνησε χιλιάδες χρόνια πριν την εφεύρεση της γραφής αλλά εκτιμάται να είναι τουλάχιστον 10.000 χρόνια πριν. Αυτό που μπορεί να ειπωθεί με σιγουριά είναι πως η ανάπτυξη της γεωργίας του εδάφους βοήθησε στην ανάπτυξη του ανθρώπινου πολιτισμού καθώς και στην παραμονή των διαφόρων φυλών σε μία τοποθεσία με την πάροδο των γενιών.

Αντίκτυπο αλλαγής χρήσης γης

Λόγω της πληθυσμιακής ανάπτυξης βέβαια που ακολούθησε με την πάροδο των χρόνων έγινε αλλαγή χρήσης γης για την κάλυψη των αναγκών με αποτέλεσμα την αποξήλωση μεγάλης έκτασης δασών και λιβαδιών τα οποία μετατράπηκαν σε καλλιεργήσιμη γη και βοσκοτόπια, πράγμα που έγινε ακόμα εντονότερο τους τελευταίους τέσσερις αιώνες [34]. Επιπλέον, για την κάλυψη των αναγκών καθώς και για την αύξηση του κέρδους, ακολουθούνται μη βιώσιμες πρακτικές με αποτέλεσμα οι ήπιες μορφές καλλιέργειες να αντικαθίστανται από εντατικά συστήματα μονοκαλλιεργειών (monoculture), υποβιβάζοντας την υγεία και την ποιότητα του εδάφους [36]. Ακόμα, για την διατήρηση της αυξημένης παραγωγής γίνεται μεγάλη χρήση ανόργανων λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών τα οποία σε συνδυασμό με τις έντονες γεωργικές πρακτικές και την κλιματική αλλαγή έχουν αντίκτυπο μακράς διάρκειας στο εδαφικό οικοσύστημα απειλώντας τόσο την επίγεια βιοποικιλότητα όσο και την μικροβιακή ποικιλότητα εντός του εδαφικού πορώδους. [36]

Η αλλαγή της χρήσης γης, η κλιματική αλλαγή, η απειλή της εδαφικής βιοποικιλότητας, η υποβάθμιση των εδαφών, η έλλειψη πόρων καθώς και η αυξανόμενη ζήτηση λόγω της ραγδαίας πληθυσμιακής αύξησης τα τελευταία χρόνια ώθησαν τους επιστήμονες και τους γεωργούς να στραφούν σε πιο βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον πρακτικές. Η πρόκληση που υπάρχει είναι το πως θα καταφέρουμε να έχουμε την απαιτούμενη παραγωγή χωρίς να έχουμε τις ίδιες συνέπειες στο περιβάλλον.

1.8.1 Βιολογικές καλλιέργειες

Λόγω των μεγάλων προκλήσεων που έχουν να αντιμετωπίσουν οι γεωργοί τα επόμενα χρόνια (έλλειψη νερού, καταστροφή βιοποικιλότητας, κλιματική αλλαγή, ανταγωνισμός) έχει στραφεί η προσοχή πολλών επιστημών καθώς και γεωργών στις βιολογικές καλλιέργειες.

Για την Ευρωπαϊκή Ένωση, το Άρθρο 5 του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 [11], αναφέρει τις αρχές στις οποίες βασίζονται οι βιολογικές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα:

- «Η συντήρηση και ενίσχυση της ζωής του εδάφους και της φυσικής γονιμότητας του εδάφους, της εδαφικής σταθερότητας και εδαφικής βιοποικιλότητας προβλέποντας και καταπολεμώντας την συμπίεση και διάβρωση του εδάφους, καθώς και την θρέψη των φυτών κυρίως μέσω του εδαφικού οικοσυστήματος»

- «Την ελαχιστοποίηση της μη χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας»
- « Στην ανακύκλωση αποβλήτων και υποπροϊόντων φυτικής και ζωικής προέλευσης ως ενέργεια σε φυτικά και κτηνοτροφικά προϊόντα»
- «Λαμβάνοντας υπόψιν την τοπική ή περιφερειακή οικολογική ισορροπία κατά τη λήψη αποφάσεων παραγωγής»
- «Στη διατήρηση της υγείας των φυτών με προληπτικά μέτρα, όπως η επιλογή των κατάλληλων ειδών και ποικιλιών ανθεκτικές σε παράσιτα και ασθένειες, κατάλληλες αμειψισπορές, μηχανικές και φυσικές μεθόδους κατά την προστασία των φυσικών εχθρών των παρασίτων»

1.8.2 Θερμοκήπια

Ιστορική αναδρομή

Όπως αναφέρει ο Castilla N. (2013) στο βιβλίο του «Greenhouse Technology and Management», η πρώτη καταγεγραμμένη προσπάθεια στην κατεύθυνση της προστατευόμενης καλλιέργειας έγινε κατά τη διάρκεια της βασιλείας του αυτοκράτορα Τιβέριου Καίσαρα όπου έγινε χρήση μικρών κινούμενων κατασκευών στις οποίες καλλιεργήθηκαν αγγουριές και ανάλογα των καιρικών συνθηκών, τα κάλυπταν με φύλλα μαρμαρυγιάς και αλάβαστρου ή τα άφηναν στην ύπαιθρο [41]. Οι συγκεκριμένες γεωργικές πρακτικές σταμάτησαν να χρησιμοποιούνται όταν «έπεσε» η Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία μέχρι και την επανεμφάνισή τους σε Αγγλία, Ολλανδία, Γαλλία, Ιαπωνία και Κίνα. Αυτή τη φορά τα θερμοκήπια ήταν κατασκευασμένα από ξύλο ή μπαμπού, ενώ η κάλυψη τους γινόταν με γυαλί ή λαδωμένο χαρτί [41]. Στο βόρειο ημισφαίριο εμφανίστηκαν τα πρώτα θερμοκήπια με προσανατολισμό στον νότο, ένα τοίχο από τούβλα στην βόρεια πλευρά και μονωτικές κουβέρτες από άχυρο και καλάμι για την προστασία των καλλιεργειών κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η οικονομική ανάπτυξη του 20^{ου} αιώνα σε συνδυασμό με την εμφάνιση των πλαστικών μεμβρανών επέκτεινε την βιομηχανία των θερμοκηπίων και «έβαλε» τα προϊόντα τόσο στις εθνικές όσο και στις ευρωπαϊκές αγορές λόγω αυξημένης ζήτησης. [41]

Ορισμός θερμοκηπίου

Στην τελευταία τους αναφορά για την παραγωγή θερμοκηπίων, η ομάδα εμπειρογνώμων για τεχνικές συμβουλές για τη βιολογική παραγωγή (EGTOP), όρισε τα θερμοκήπια ως « όλες οι μόνιμες κατασκευές, με ή χωρίς θέρμανση, καλυμμένες από γυαλί ή πλαστικό ή άλλο υλικό που αφήνει το φως της ημέρας, στο οποίο καλλιεργούνται σοδιές, μεταμοσχεύματα ή καλλωπιστικά, θεωρούνται ως θερμοκήπια». Ένας ελαφρά διαφοροποιημένος ορισμός έχει δοθεί στο Άρθρο 3(27) του Καν. (ΕΚ) 1107/2009 ο οποίος αφορά τη «διάθεση στην φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά» - « θερμοκήπιο είναι ένας στατικός, κλειστός χώρος φυτικής παραγωγής με συνήθως ημιδιαφανές εξωτερικό κέλυφος, το οποίο επιτρέπει ελεγχόμενη ανταλλαγή υλικού και ενέργειας με το περιβάλλον και αποτρέπει την απελευθέρωση των προϊόντων προστασίας των φυτών στο περιβάλλον». [9]

Στην ουσία, θερμοκήπια είναι μόνιμες κατασκευές με διαφανές ή ημιδιαφανές κέλυφος, μέσα στις οποίες ο γεωργός μπορεί να ελέγχει το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η

EGTOP αναφέρει πως «η θερμοκρασία, το φως, η υγρασία της ατμόσφαιρας, η παροχή νερού καθώς και το CO₂ είναι ελεγχόμενα. Σε μερικές περιπτώσεις σύγχρονων θερμοκηπίων, μπορεί να υπάρχει μέχρι και περιορισμός ή ακόμα και αποτροπή πρόσβασης παρασίτων και παθογόνων μικροοργανισμών» [9]. Ο έλεγχος των συνθηκών που επικρατούν εντός των θερμοκηπίων, δίνει την δυνατότητα στους γεωργούς να έχουν παραγωγή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα θερμοκήπια έχουν δύο βασικές έννοιες, του μέγιστου και του ελάχιστου κλιματικού ελέγχου. Ο μέγιστος κλιματικός έλεγχος έχει ως στόχο την μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας μέσω της χρήσης εξελιγμένων τεχνολογικά θερμοκηπίων με την εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών. Σε αντίθεση με την πρώτη έννοια, η πρακτική θερμοκηπίων ελάχιστου κλιματικού ελέγχου αποσκοπεί στην παραγωγή καλλιεργειών υπό τροποποιημένες συνθήκες χαμηλού κόστους (μη βέλτιστες) και συνήθως εφαρμόζεται στις χώρες της Μεσογείου (μεσογειακός τύπος θερμοκηπίων). Ωστόσο, όπως αναφέρει και ο Castilla N. (2013) [41] αυτοί οι δύο τύποι είναι τα άκρα του φάσματος με αποτέλεσμα η επιλογή του τύπου θερμοκηπίου να βασίζεται σε τέσσερα κριτήρια:

- τον μέγιστο ή ελάχιστο έλεγχο κλίματος
- τον τύπο της καλλιέργειας που θα φυτευτεί στο θερμοκήπιο (οι ανάγκες διαφέρουν από καλλιέργεια σε καλλιέργεια)
- την τοποθεσία
- τις επικρατούσες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες [41]



Εικόνα 7: Θερμοκήπιο μεσογειακού τύπου (Πηγή: Castilla N., "Greenhouse technology and management")

Επιπλέον, η στρατηγική τοποθέτηση των θερμοκηπίων, μπορεί να προσφέρει την δυνατότητα στους γεωργούς να καλλιεργήσουν σε περιοχές όπου η παραγωγή ανοικτού πεδίου δεν είναι δυνατή [9]. Οι υψηλές παραγωγικές επιδόσεις των θερμοκηπίων οφείλονται και στην θερμοκρασία που επικρατεί μέσα στα θερμοκήπια, χρησιμοποιώντας υψηλού επιπέδου ενέργεια. Ένα πολύ μεγάλο μέρος της κατανάλωσης ενέργειας οφείλεται στην θέρμανση θερμοκηπίων η οποία επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο με ορυκτά καύσιμα. Υπάρχουν θερμοκήπια στα οποία δεν χρησιμοποιείται θέρμανση για την παραγωγή τους, με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας αλλά και χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής γιατί οι συνθήκες που επικρατούν δεν είναι βέλτιστες. [10]

Παρά την αυξημένη παραγωγή που μπορούν να προσφέρουν τα θερμοκήπια, υπάρχει μεγάλη τάση εντατικοποίησης στην διαδικασία αυτή πράγμα που προκαλεί ανησυχίες. Τα συμβατικά θερμοκήπια χαρακτηρίζονται από *«υψηλές αποδόσεις αλλά και από υψηλή χρήση πόρων όπως θρεπτικά συστατικά, φως, θέρμανση, CO₂ και άλλες εξωτερικές εισροές όπως πλαστικά αχυροστρώματα, δοχεία, υλικά συσκευασίας κλπ.»* [9]. Συστήματα πιο φιλικά προς το περιβάλλον είναι τα βιολογικά θερμοκήπια λόγω των βάσεων τους που είναι η διατήρηση φυσικής γονιμότητα του εδάφους, η εδαφική σταθερότητα και η εδαφική βιοποικιλότητα. Βέβαια χρειάζεται προσοχή, καθώς εάν ο απώτερος σκοπός είναι η εντατική παραγωγή και αύξηση κέρδους, μπορεί να χάσουν τον βιώσιμο χαρακτήρα τους.

1.8.3 Συμβατικά και βιολογικά θερμοκήπια

Παρόλο που κατασκευαστικά τα θερμοκήπια συμβατικής και βιολογικής παραγωγής είναι παρόμοια, υπάρχουν βασικές διαφορές. Οι βασικές διαφορές μεταξύ των δύο τύπων θερμοκηπίων αφορούν την προσέγγιση του μέσου καλλιέργειας καθώς και η διαχείριση της εδαφικής γονιμότητας τους. Με βάση τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 834/2007 [11] και κανονισμό (ΕΚ) 889/2008 [12], στην βιολογική παραγωγή η υδροπονική καλλιέργεια είναι απαγορευμένη. Συγκεκριμένα στον καν. (ΕΚ) 889/2008 αναφέρεται πως *«η βιολογική φυτική παραγωγή βασίζεται στη θρέψη των φυτών κυρίως μέσω του εδαφικού οικοσυστήματος. Επομένως η υδροπονική καλλιέργεια, όπου τα φυτά αναπτύσσονται με τις ρίζες τους σε ένα αδρανές μέσο και τρέφονται με διαλυτά μέταλλα και θρεπτικά συστατικά, δεν πρέπει να επιτρέπεται»* [10]. Επιπλέον, στις βιολογικές καλλιέργειες είναι οριοθετημένη η χρήση λιπάσματος. Συγκεκριμένα, με βάση την EGTOP (2013), ως λίπασμα και εδαφοβελτιωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιολογικές εισροές όπως κόμποστ και στερεά κοπριά βραδείας αποδέσμευσης θρεπτικών συστατικών εν αντίθεση με τις καλλιέργειες συμβατικών θερμοκηπίων όπου χρησιμοποιούνται χημικά λιπάσματα. Λόγω της μη χρήσης χημικών για την παραγωγή βιολογικών θερμοκηπίων, απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στην διαχείριση κλίματος και επιπέδων υγρασίας ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μυκητιακών ασθενειών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα βιολογικά θερμοκήπια να έχουν υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας από τα συμβατικά. Όσον αφορά τα βιολογικά θερμοκήπια, η διαχείριση της υγείας των σοδιών γίνεται μέσω πρόληψης, ενώ για τα συμβατικά θερμοκήπια υπάρχουν εμπορικά παρασκευάσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Συγκεκριμένα, τα κύρια εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη παρασίτων και ασθενειών στα βιολογικά θερμοκήπια είναι οι εναλλαγές των καλλιεργειών, η διαχείριση των

περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν εντός του θερμοκηπίου, η επιλογή των ποικιλιών που καλλιεργούνται, καθώς και οι τεχνικές με τις οποίες γίνεται η καλλιέργεια. [9]

Σε πολλά συστήματα βιολογικών θερμοκηπίων ενώ θεωρητικά εφαρμόζονται οι κανονισμοί που έθεσε η ΕΕ για την βιολογική γεωργία, παρουσιάζεται εντατική παραγωγή και αναφέρονται ως συστήματα «συμβατικής» βιολογικής γεωργίας. Στην ουσία, η μόνη διαφορά αυτών των συστημάτων από τα συμβατικά, είναι η χρήση πιστοποιημένων βιολογικών λιπασμάτων κάτι που τα κάνει λιγότερο φιλικά προς το περιβάλλον, λόγω του πολύ εντατικού τους χαρακτήρα.

1.9 Επώαση εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου(CHCl_3)

1.9.1 Ιστορικά:

Η εκχύλιση υποκαπνισμού χλωροφορμίου για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας του εδάφους χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Powlson και Jenkinson το 1976. Υπολόγισαν την διαφορά C μεταξύ της εκχύλισης υποκαπνισμένου και μη υποκαπνισμένου εδαφικού δείγματος (E_c) καθώς και την έκλυση $\text{CO}_2\text{-C}$ (F_c , [$\text{CO}_2\text{-C}$ το οποίο εξελίχθηκε από υποκαπνισμένο εδαφικό δείγμα, το οποίο επωάστηκε αερόβια στους 25 °C για 10 μέρες] – [$\text{CO}_2\text{-C}$ το οποίο εξελίχθηκε από μη- υποκαπνισμένο εδαφικό δείγμα και επωάστηκε στις ίδιες συνθήκες]) [1]. Η μέθοδος αυτή έγινε δημοφιλής επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μεγαλύτερο εύρος των κύριων στοιχείων που περιέχονται σε μικροβιακά κύτταρα [43]. Το επόμενο βήμα έγινε από τον E. D. Vance [1] το 1987 ο οποίος κάνει την πρώτη αναφορά για μια απλή και γρήγορη μεθοδολογία για εκχύλιση απελευθερωμένου άνθρακα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για τον καθορισμό της εδαφικής μικροβιακής βιομάζας (soil microbial biomass - SMB). [45]

Η επιλογή του χλωροφορμίου ως υποκαπνιστικό μέσο στην προκειμένη μεθοδολογία υπολογισμού μικροβιακής βιομάζας, με βάση τον Jenkinson (1976), προκύπτει λόγω της μη διαλυτοποίησης οργανικής ύλης εδάφους που δεν αντιστοιχεί σε μικροοργανισμούς καθώς και της αποτελεσματικής βιοκτόνου δράσης του [1]. Αυτό έρχεται σε κόντρα με πρόσφατες μελέτες που ολοκληρώθηκαν. Έχει φανεί πως τα αποτελέσματα δέχονται επήρεια από την ύπαρξη κυτταρικών μεμβρανών νεαρών ριζών, καθώς επηρεάζονται από το χλωροφόρμιο κατά την λύση μικροβιακών κελιών [4].

Ωστόσο, όπως αναφέρουν και οι Gong H. et al., (2021) [43] υπάρχουν μερικά μειονεκτήματα όσον αφορά την χρήση του χλωροφορμίου στη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Συγκεκριμένα, μπορεί να θεωρηθεί ως χρονοβόρα διαδικασία (χρειάζονται 48-72 ώρες επώαση με έκθεση σε χλωροφόρμιο) ενώ η χρήση τόσο δυνατής ένωσης μπορεί να φανεί επιβλαβής για την υγεία, εάν δεν χρησιμοποιηθεί σωστά. Όσον αφορά τους περιορισμούς της χρήσης του χλωροφορμίου, αφορούν κυρίως τον τύπο των εδαφικών δειγμάτων (εδαφικό pH) [43]. Ακόμα, στην περίπτωση που το δείγμα προέρχεται από ξηρές ζώνες, ίσως προκληθεί πρόβλημα στην σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων (υποκαπνισμένα με χλωροφόρμιο και μη) λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε μικροβιακή βιομάζα [43].

1.9.2 Σκοπός της μεθόδου

Η μέθοδος εκχύλισης υποκαπνισμού χλωροφορμίου χρησιμοποιείται ευρέως για τον υπολογισμό εδαφικής μικροβιακής βιομάζας. Ο σκοπός της μεθόδου αυτής είναι η εκτίμηση της βιομάζας των ζωντανών εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων μέσω της περιεκτικότητας τους σε άνθρακα (C).

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας είναι ότι τα ανέπαφα μικροβιακά κύτταρα λύνονται κατά την υποκάπνιση του εδαφικού δείγματος με χλωροφόρμιο, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν οργανικό C. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης οργανικού C. Για την ποσοτικοποίηση της οργανικής ύλης γίνεται εκχύλιση με θειικό κάλιο (K_2SO_4) συγκέντρωσης 0.5 M και ακολουθεί ανάλυση με αναλυτή Ολικού Οργανικού Άνθρακα (TOC) σε υποκαπνισμένα και μη- υποκαπνισμένα υπό-δείγματα. Με βάση την ανάλυση αυτή υπολογίζεται η διαφορά στον εκχυλισμένο TOC, μεταξύ των δύο τύπων υπό-δείγματος. Για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή χλωροφορμίου καθώς και αποτελεσματική υποκάπνιση, η περιεκτικότητα του νερού στα δείγματα πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 30% της ικανότητας συγκράτησης νερού (water-holding capacity, WHC).

Η πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε βασίζεται πάνω στο πρωτόκολλο «Allison Lab Protocol: Microbial Biomass by Fumigation» του Steve Allison για προσδιορισμό του άνθρακα που βρίσκεται στην εδαφική μικροβιακή βιομάζα.

1.9.3 Σύγκριση παραλλαγών της μεθόδου

Με το πέρασμα των χρόνων, κι ενώ έχει αποκτήσει προσοχή η μελέτη του εδάφους προσπαθώντας να κατανοήσουμε τα ανεξήγητα που το περικλείουν, έχουν τροποποιηθεί ελαφρώς οι διαδικασίες, με αποτέλεσμα να διαφέρουν σε ορισμένα σημεία. Αυτό φαίνεται με την σύγκριση μεθοδολογιών που υιοθετήθηκαν με διαφορά δέκα χρόνων.

Σε αυτό το κομμάτι θα γίνει σύγκριση μεταξύ των μεθοδολογιών που μελετήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, με σκοπό να παρουσιαστούν οι διαφορές τους.

Η πρώτη συγκρίσιμη μεθοδολογία είναι από το αρχείο “Handbook on WP4 protocols for sampling, sample procedure and analysis” των Soren Thiele- Bruhn και Raul Zornoza (2018). Συγκεκριμένα, από το κεφάλαιο 10 (Soil Microbial Biomass), μελετήθηκε το υπό-κεφάλαιο 10.1 με τίτλο “Soil Microbial Biomass Carbon and Nitrogen – Fumigation Extraction Method (based on ISO 14240-2)” με συγγραφέα τον Soren T. B. [4]. Η δεύτερη συγκρίσιμη μεθοδολογία είναι το πρωτόκολλο, που βασίστηκε πάνω η διπλωματική εργασία, με τίτλο “Chloroform Fumigation Direct Extraction (CDFE) Protocol for Microbial Biomass Carbon and Nitrogen” του Steve Allison (2008) [6].

Οι διαφορές ξεκινάνε από το μέγεθος δειγμάτων. Στη μεθοδολογία με βάση το ISO γίνεται αναφορά για δείγματα μάζας 25 g ενώ στο πρωτόκολλο για 10 g. Στην πρώτη μεθοδολογία γίνεται λόγος για ανομοιογένεια του εδάφους και αυξημένη αβεβαιότητα που μπορεί να προκύψει με δείγματα μικρότερης μάζας, αφού μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικά.

Όσον αφορά το βήμα της υποκάπνισης χλωροφορμίου (fumigation), στη πρώτη μεθοδολογία αναφέρει την τοποθέτηση υγρού χάρτινου φίλτρου στον πυθμένα του ξηραντήρα, καθώς και την τοποθέτηση γυάλινου ποτηριού ζέσεως (beaker) με soda lime πάνω στο φίλτρο. Αυτό γίνεται για την πρόσληψη διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) κατά την υποκάπνιση. Επιπλέον, υπάρχει διαφορά στον όγκο του χλωροφορμίου που χρησιμοποιείται για την υποκάπνιση, με την πρώτη μεθοδολογία να κάνει αναφορά για 25 ml ενώ η δεύτερη για 20 ml. Άλλη μια διαφορά μεταξύ των δυο μεθοδολογιών, είναι και η διάρκεια παραμονής των δειγμάτων σε κενό αέρος. Με βάση την πρώτη μεθοδολογία, τα δείγματα πρέπει να παραμείνουν σε κενό αέρος στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (25 ± 2 °C) για 22 με 24 ώρες. Στο πρωτόκολλο, τα δείγματα πρέπει να παραμείνουν στον ξηραντήρα με κενό αέρος στο σκοτάδι για τρεις μέρες. Το σκοτάδι προστατεύει το χλωροφόρμιο από το να “σπάσει”.

Στο στάδιο της εκχύλισης, στην πρώτη μεθοδολογία ως αντιδραστήριο χρησιμοποιείται χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂, 0.1 M) ως εναλλακτικό του θειικού καλίου (K₂SO₄, 0.5 M) με λόγο δείγματος – εκχυλιστικού μέσου 1:4. Στο ίδιο επιστημονικό άρθρο αναφέρεται και στο ISO 14240-2, όπου αντί για 100 ml CaCl₂ 0.1 M, πραγματοποιείται εκχύλιση με 200 ml K₂SO₄, 0.5 M για δείγματα μάζας 25 g. Από την άλλη, στο πρωτόκολλο γίνεται χρήση K₂SO₄ (0.5 M) με λόγο 1:5. Για δείγματα μάζας 10 g, χρησιμοποιούνται για το κάθε δείγμα 50 ml K₂SO₄, 0.5 M.

1.9.4 Υπολογισμός τυπικού σφάλματος

Το τυπικό σφάλμα (standard error) υπολογίστηκε με σκοπό να βρεθεί η ακρίβεια του μέσου όρου TOC για τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία επώασης εξαέρωσης και κατευθείαν απόσπασης με τη χρήση χλωροφορμίου. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό είναι η διαίρεση της τυπικής απόκλισης μέσου όρου με την τετραγωνική ρίζα του συνολικού αριθμού υπό-δειγμάτων για κάθε εδαφικό δείγμα.

$$\text{Τυπική απόκλιση: } \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Τυπικό σφάλμα: } \sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

1.10 Προσδιορισμός βιομάζας μέσω εξαγωγής DNA

Ο προσδιορισμός βιομάζας μέσω εξαγωγής DNA μπορεί να βοηθήσει στην ποιοτική και ποσοτική περιγραφή των μικροβιακών κοινοτήτων στην προσπάθεια περιγραφής της εδαφικής βιοποικιλότητας και μικροβιακής βιομάζας, καθώς θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους βιοδείκτες του εδαφικού οικοσυστήματος. Στις αρχές του 1980, όπου άρχισαν να δημιουργούνται άμεσες μέθοδοι εκχύλισης DNA βασισμένες στην λύση μικροβιακών κυττάρων, γινόταν παράληψη της αδυναμίας ανάπτυξης των περισσότερων εδαφικών μικροοργανισμών σε εργαστηριακές συνθήκες, με αποτέλεσμα να αργήσει να γίνει κατανοητή η εδαφική μικροβιακή ποικιλότητα [31]. Λόγω της ευρείας πρωτόκολλων μεθοδολογιών και χρήσης των εμπορευματοποιημένων εργαλείων-kit εκχύλισης DNA τα οποία περιέχουν από μικρές μέχρι μεγάλες τροποποιήσεις, η τυποποίηση μεθόδου ήταν κάτι αναγκαίο. Το 2006 οι Philippot L, Abbate C, Bispo A,

Chesnot T, Hallin S, et al. [31] έκαναν πρόταση στον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization - ISO) να γίνει τυποποίηση της εξαγωγής εδαφικού DNA. Έτσι, δημιουργήθηκε το ISO 11063 – “Soil quality method” και είναι βασισμένο στη μεθοδολογία των Martin-Laurent et al. (2001) [32]. Οι Philippot L. et al. (2011) [31] επισημαίνουν πως τυποποίηση των μεθοδολογιών αφορά μόνο το στάδιο εξαγωγής του DNA μιας και είναι ο κύριος παράγοντας διαφορών μεταξύ των μεθόδων.

Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι περιορισμοί της συγκεκριμένης μεθοδολογίας. Αρχικά, η πληθώρα των εργαλείων-kit που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μικροβιακής βιομάζας οδηγεί σε ανομοιόμορφες προσεγγίσεις λόγω της διαφορετικής αποτελεσματικότητας εξαγωγής DNA που έχει το καθένα. Το PowerSoil® DNA Isolation Kit που χρησιμοποιείται για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έχει χαμηλότερες αποδόσεις από άλλα, ωστόσο έχει υψηλότερα ποσοστά καθαρότητας DNA [43]. Ένας ακόμα περιορισμός των DNA-kit είναι και η επιρροή που έχουν τα διάφορα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα στην απόδοσή τους (δομή εδάφους, παρουσία διάφορων στοιχείων και ενώσεων). Επιπλέον η συγκέντρωση του εξαγόμενου DNA επηρεάζεται από φυτικά υπολείμματα εντός δειγμάτων καθώς και από εξωκυτταρικό DNA λόγω απελευθέρωσης γενετικού υλικού από κυτταρικό θάνατο, κάτι που θα οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της υπό μελέτη συγκέντρωσης. Τέλος, η πολυπλοκότητα και ποικιλότητα της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων οδηγούν σε διαφορά περιεκτικότητας DNA ανά μονάδα C. Έχει παρατηρηθεί πως σε οικοσυστήματα με σχετικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε βακτήρια, ο C από το DNA έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση από οικοσυστήματα που αφθονούν σε μύκητες.

1.10.1 Φθορισμός

Ως εξορισμού, «*φθορισμός είναι το αποτέλεσμα διαδικασίας τριών σταδίων που λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα μόρια (πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες ή ετερόκυκλοι), τα οποία ονομάζονται φθοροφόρα ή φθορίζουσες βαφές*» [5]. Για τον φθορισμό είναι υπεύθυνες διαδικασίες που σχετίζονται με την εκπομπή φωτονίου με ταυτόχρονη αλλαγή της ενεργειακής κατάστασης του μορίου λόγω άλματος ηλεκτρονίου.

1.10.2 Διαδικασία φθορισμού

Κατά την απορρόφηση UV ακτινοβολίας από ένα φθορίζον μόριο, προκαλείται διέγερση ηλεκτρονίων από μια διεγερμένη κατάσταση (ground state) σε υψηλότερη δονητική κατάσταση και ενέργεια [5][33]. Ένα μόριο υψηλού επιπέδου δόνησης θα μεταφέρει ενέργεια στα υπόλοιπα μόρια μέσω σύγκρουσης λόγω απότομης ενεργειακής πτώσης στα χαμηλότερα επίπεδα δόνησης της διεγερμένης κατάστασης, ενώ η επιπλέον ενέργεια θα μετατραπεί σε θερμότητα. Φθορισμός ουσιαστικά ονομάζεται το φωτόνιο μεγαλύτερου μήκους κύματος που εκπέμπεται κατά την επιστροφή του μορίου στην διεγερμένη κατάσταση. Το εκπεμπόμενο φως είναι χαρακτηριστικά μεγαλύτερου μήκους κύματος ενώ έχει μικρότερη ένταση λόγω απώλειας ενέργειας [33].

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Chloroform Fumigation Direct Extraction

2.1.1 Πειραματική διάταξη



Εικόνα 8: Διάταξη για τον υποκαπνισμό των δειγμάτων

Ηλεκτρική αντλία

Η ηλεκτρική αντλία χρησιμοποιείται για την δημιουργία κενού αέρος μέσα στον ξηραντήρα. Όταν κλείνει η βαλβίδα γραμμής κενού, γίνεται εκκένωση του αέρα που υπάρχει μέσα στον ξηραντήρα, μέσω των ελαστικών σωλήνων που τα συνδέουν. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται κενό αέρος. Η ένδειξη στην αντλία (πίεση) είναι 0.08 MPa.

Δοχείο ψύξης υδρατμών

Σκοπός του γυάλινου κωνικού δοχείου είναι η υγροποίηση των υδρατμών χλωροφορμίου. Όταν δημιουργηθεί κενό αέρος, οι υδρατμοί χλωροφορμίου περνάνε μέσω των ελαστικών σωλήνων με κατεύθυνση προς την ηλεκτρική αντλία με κίνδυνο να προκαλέσουν βλάβη. Συγκεκριμένα, ένα αποτέλεσμα που μπορεί να

επέλθει είναι η μη σταθεροποίηση στην επιθυμητή πίεση. Με πιο απλά λόγια, η αντλία δε θα μπορούσε να διατηρήσει την πίεση μέσα στον ξηραντήρα σε σταθερά επίπεδα χωρίς διαρροές ώστε να μπορεί να υπάρχει κενό αέρος για το επιθυμητό χρονικό διάστημα. Για την υγραποίηση, γίνεται τοποθέτηση της κωνικής φιάλης μέσα σε δοχείο με πάγο.

Ξηραντήρας κενού

Ο ξηραντήρας κενού είναι η συσκευή μέσα στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα και δημιουργείται το κενό αέρας. Σκοπός της δημιουργίας κενού αέρα είναι να φτάσει το χλωροφόρμιο σε σημείο βρασμού πιο γρήγορα, καθώς και αποτελεσματικός κορεσμός των δειγμάτων του εδάφους με χλωροφόρμιο.

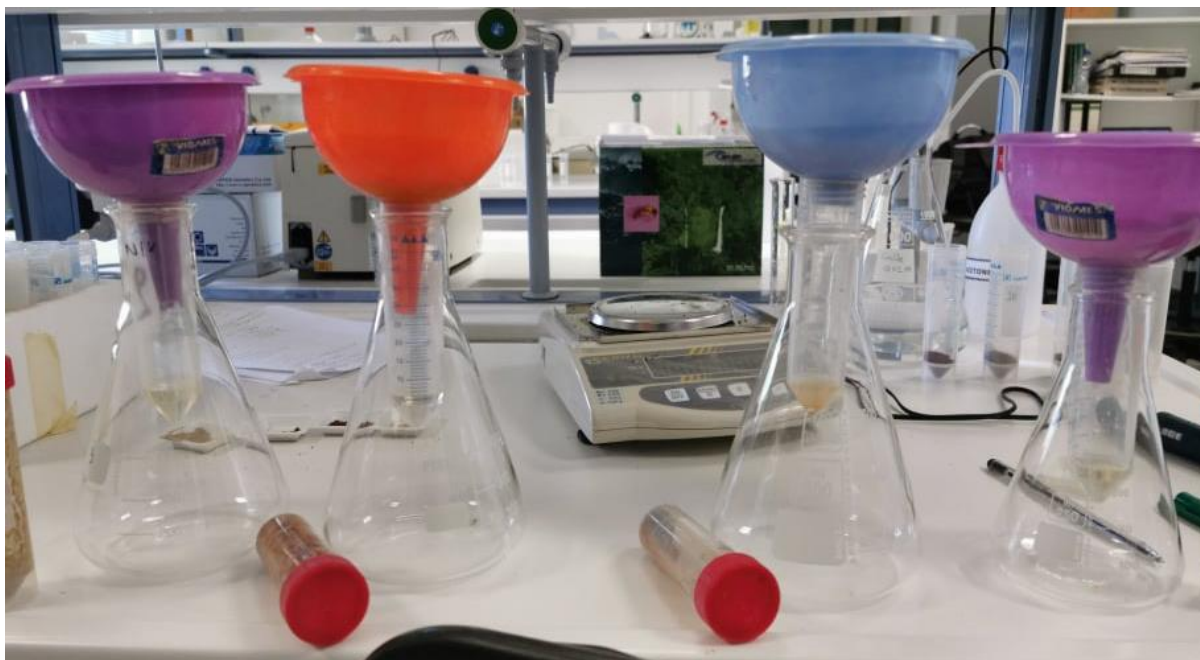
Μέσα στη βάση του ξηραντήρα (κάτω μέρος) τοποθετείται μια στρογγυλή πλάκα πορσελάνης διαμέτρου 24,2 cm, πάνω στην οποία τοποθετούνται τα γυάλινα ποτήρια ζέσεως που περιέχουν τα δείγματα προς υποκάπνιση καθώς και το ποτήρι ζέσεως που περιέχει χλωροφόρμιο. Στο καπάκι του ξηραντήρα υπάρχει ένα διάκενο διαμέτρου 0,7 cm στο οποίο συνδέεται μια γυάλινη βαλβίδα για την ρύθμιση της εκκένωσης του ξηραντήρα. Πάνω στην βαλβίδα αυτή γίνεται και η ένωση του ελαστικού σωλήνα που οδηγεί στο δοχείο ψύξης και στην αντλία.

Για το ορθό σφράγισμα του ξηραντήρα και για την μεγαλύτερη δυνατή μείωση απωλειών (για την διατήρηση κενού αέρος) χρησιμοποιείται βαζελίνη στην ένωση βάσης – καπάκι.



Εικόνα 9 : Πειραματική διάταξη κατά την διάρκεια υποκάπνισης δειγμάτων

2.1.1.2 Διάταξη για την απευθείας εκχύλιση δειγμάτων



Εικόνα 10: Πειραματική διάταξη για απευθείας εκχύλιση δειγμάτων

Η απευθείας εκχύλιση είναι θεωρητικά απλή μέθοδος, κατά την οποία γίνεται φιλτράρισμα μέσω χάρτινων φίλτρων Whatman No. 1442 -10 – Diameter 110 mm. Στην συγκεκριμένη πειραματική διάταξη χρησιμοποιήθηκαν, πέραν των φίλτρων, απλά πλαστικά χωνιά όπου μέσα έγινε η τοποθέτηση των φίλτρων καθώς και δοκιμαστικοί σωλήνες Falcon όπου μέσα κατέληξε το εκχύλισμα το οποίο αναλύθηκε σε επόμενο στάδιο.

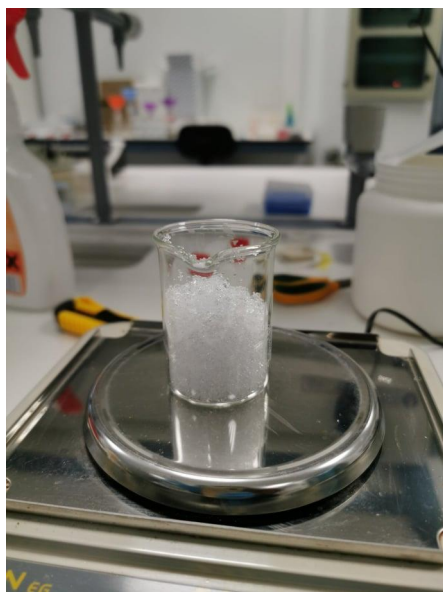
2.1.2 Προ επεξεργασία

2.1.2.1 Προ επεξεργασία εδαφικού δείγματος

Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας έγινε επεξεργασία των εδαφικών δειγμάτων. Αρχικά, αφαιρέθηκαν πέτρες, ξυλαράκια και τυχόν θραύσματα ριζών από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Στη συνέχεια, τα πέντε αυτά εδαφικά δείγματα λειοτριβήθηκαν χρησιμοποιώντας γουδί πορσελάνης ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα και να πάρουν την υφή πούδρας. Ακολούθως, τα δείγματα κοσκινίζονται χρησιμοποιώντας κόσκινα με άνοιγμα πόρων 2mm.

Τα πέντε αυτά αρχικά εδαφικά δείγματα, με τη χρήση εργαστηριακού ζυγού, διαχωρίστηκαν ανά 10 g και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml (Falcon Tubes) ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ml νερού με τη χρήση πιπέτας σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και αφέθηκαν για επώαση, για την εκ νέου ενεργοποίηση των μικροοργανισμών.

2.1.2.2 Προετοιμασία του θειικού καλίου



Εικόνα 11: Ζύγισμα θειικού καλίου για τη παρασκευή του αντιδρώντος που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των δειγμάτων

Το θειικό κάλιο (K_2SO_4) χρησιμοποιείται τακτικά για την εξαγωγή άνθρακα βιομάζας μέσω απευθείας εκχύλιση υποκαπνισμένων και μη- υποκαπνισμένων δειγμάτων. Ζυγίστηκε ποσότητα θειικού καλίου με τη βοήθεια του εργαστηριακού ζυγού ώστε να παρασκευαστεί το αντιδρών. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη πολυεθυλένιου 1000 ml και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Γίνεται τοποθέτηση μικρού μαγνήτη μέσα στην κωνική φιάλη και στην συνέχεια με την συσκευή Jenway Hotplate + Stirrer ανακατεύεται το αντιδραστήριο μέσω ανακίνησης που προκαλείται από τον μαγνήτη μέχρι να γίνει διαυγές και ομογενοποιημένο. Το πλέον ομογενοποιημένο θειικό κάλιο φυλάσσεται μέχρι την χρήση του.

2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Επώαση εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου

Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου επώασης των δειγμάτων, γίνεται ελαφρά επεξεργασία διαλύοντας πιθανά συσσωματώματα που έχουν δημιουργηθεί. Τα δείγματα ζυγίζονται ξανά και τοποθετούνται ανά 10 g μέσα στα γυάλινα ποτήρια ζέσεως (beakers). Ταυτόχρονα ζεσταίνεται η πορσελάνινη πλάκα βάσης του ξηραντήρα ώστε να φτάσει πιο εύκολα στο σημείο βρασμού το χλωροφόρμιο ($61.2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ακολούθως, γίνεται τοποθέτηση της πλάκας και των δειγμάτων αυτών μέσα στον ξηραντήρα, μαζί με ένα ποτήρι beaker το οποίο περιέχει 20 ml χλωροφόρμιο και 2 boiling chips. Ο ξηραντήρας σφραγίζεται και με τη χρήση ηλεκτρικής αντλίας δημιουργείται κενό αέρος ώστε να φτάσει σε βρασμό το χλωροφόρμιο και να εξατμιστεί γρηγορότερα. Γίνεται άνοιγμα αερισμού στον ξηραντήρα και επαναλαμβάνεται ο κύκλος κενό αέρος – αερισμός ακόμα 3 φορές. Στη συνέχεια τα δείγματα παραμένουν μέσα στον ξηραντήρα για τρεις μέρες στο σκοτάδι ενώ παράλληλα είναι εκτεθειμένα σε κορεσμένο από χλωροφόρμιο περιβάλλον.

Αφού περάσει το αναγκαίο αυτό διάστημα, τοποθετούνται σε Falcon των 50 ml μαζί με διάλυμα θειικού καλίου (50 ml K_2SO_4 με συγκέντρωση 0.5 M – αναλογία 1 g εδαφικού δείγματος προς 10 ml K_2SO_4), ανακινούνται και αφήνεται σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει το εδαφικό δείγμα. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση χρησιμοποιώντας χάρτινα φίλτρα Whatman No. 1442 -10. Στα φίλτρα γίνεται πλύση με θειικό κάλιο πριν την εκχύλιση των δειγμάτων για να μειωθούν οι απώλειες εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι να γίνει η ανάλυση τους.

Απευθείας εκχύλιση

Για τα δείγματα απευθείας εκχύλισης γίνεται επεξεργασία με τον ίδιο τρόπο (διάλυση συσσωματωμάτων – ζύγισμα 10 g και τοποθέτηση τους σε σωληνάκια Falcon 50 ml). Ακολούθως, τοποθετούνται κατευθείαν τα 50 ml θειικού καλίου 0.5 M (αναλογία 1 g εδαφικού δείγματος προς 10 ml K_2SO_4), αναδεύονται και αφήνονται σε ηρεμία για μια ώρα ώστε να πραγματοποιηθεί η καθίζηση του δείγματος για την επίσπευση της εκχύλισης. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και αποθήκευση με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 1.4.1 - Chloroform Fumigation.

2.2 Απομόνωση DNA

Για την εκπόνηση αυτού του μέρους της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το kit PowerSoil® DNA Isolation Kit. Όλα τα αντιδραστήρια καθώς και μερικός εξοπλισμός (Microtubes, PowerBead Tubes κ.ο.κ) περιλαμβάνονται μέσα στο kit. Τα δείγματα στο τέλος αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν.

Σημείωση: Τα εδαφικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA δεν έχουν υποβληθεί σε υποκάπνιση με τη χρήση χλωροφορμίου όπως ούτε σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2.1.

2.2.1 Ποσοτικοποίηση

Η ανάλυση DNA των δειγμάτων γίνεται με μεθοδολογία φθορισμού, χρησιμοποιώντας το φθοριόμετρο Denonix QFX Fluorometer. Για την ποσοτικοποίηση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Qubit® dsDNA HS kit ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Πειραματικά αποτελέσματα συμβατικών θερμοκηπίων

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται και αναλύονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία επώασης εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου, τον προσδιορισμό βιομάζας μέσω DNA καθώς και την ξηρή ανάλυση ολικού οργανικού άνθρακα (total organic carbon - TOC) για τα δείγματα συμβατικών θερμοκηπίων.

3.1.1 Σύγκριση παραμέτρων

Η παράμετρος που εξετάζεται και συγκρίνεται σε αυτό το κεφάλαιο είναι η χρονική διάρκεια λειτουργίας των θερμοκηπίων και πως αυτή επηρεάζει την σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων και ως συνέπεια την βιομάζα και τον TOC. Επιπλέον, γίνεται σύγκριση μεταξύ των θερμοκρασιών που επωάστηκαν τα δείγματα ώστε να εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζει η θερμοκρασία περιβάλλοντος τους μικροοργανισμούς, την παραγόμενη βιομάζα και συγκεκριμένα τον TOC.

Χρονική διάρκεια λειτουργίας

Τα πέντε συμβατικά θερμοκήπια έχουν διαφορετική χρονική διάρκεια λειτουργίας, καθώς το πιο παλιό είναι ενεργό από το 1985 ενώ το νεότερο θερμοκήπιο άρχισε να καλλιεργείται το 2019. Οι διαφορές στα έτη λειτουργίας μεταξύ των θερμοκηπίων αναμένεται να παίξουν ρόλο στα αποτελέσματα ανάλυσης ολικού οργανικού C (TOC). Επιπλέον, τα εδαφικά δείγματα επωάστηκαν αρχικά σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (30°C και 40°C). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί πως η δειγματοληψία των συμβατικών θερμοκηπίων έγινε το 2020 ενώ η επεξεργασία και η εφαρμογή της μεθοδολογίας για τα δείγματα συμβατικών θερμοκηπίων ολοκληρώθηκε το 2021. Κατά την περίοδο

Πίνακας 1: Χρονολογία δημιουργίας θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του κατά την επεξεργασία και πειραματική διαδικασία των δειγμάτων.

Δείγμα	Χρονολογία	Έτη Λειτουργίας
A	2020	1
B	2016	5
Γ	2007	14
Δ	1993	28
E	1985	36

Στους Πίνακες 2 και Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων για TOC στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Τα δείγματα αφού ομογενοποιήθηκαν και φιλτραρίστηκαν μετά την τήξη τους, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη συσκευή Multi N/C 2100 analyticalsena του εργαστηρίου 'Υδρογεωχημικής Μηχανικής και Αποκατάστασης Εδαφών'. Το φιλτράρισμα έγινε λόγω ευαισθησίας του οργάνου καθώς τυχόν συσσωματώματα θα προκαλούσαν φραγμό στην στήλη απορρόφησης δειγμάτων. Ακολούθως, έγινε επεξεργασία αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Excel όπου έγινε ο υπολογισμός μέσου όρου για κάθε δείγμα

στις διαφορετικές θερμοκρασίες ενώ ταυτόχρονα υπολογίστηκε και το τυπικό σφάλμα για το κάθε δείγμα όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 1.9.3. Στους πίνακες που ακολουθούν, το γράμμα F συμβολίζει πως στο δείγμα έγινε επώαση εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου (fumigation) και ακολούθως εκχύλιση ενώ το NF συμβολίζει πως στο δείγμα έγινε κατευθείαν εκχύλιση με θειικό κάλλιο, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία (Κεφάλαιο 2.1). Όπως είναι διακριτό, στον Πίνακα 2 δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα για το εδαφικό δείγμα Γ. Κατά την ανάλυση των εκχυλισμάτων το όργανο ανίχνευε <0,9 mg/L TOC στο συγκεκριμένο δείγμα. Το όριο ανίχνευσης του οργάνου ανάλυσης είναι 0,10 mg/L ενώ το όριο ποσοτικοποίησης του είναι 0,33 mg/L.

Πίνακας 2: Μέσες τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης στους 30 °C

Δείγμα	TOC [g/ kg soil]	Τυπικό σφάλμα
A [F]	3,41	0,423
A [NF]	2,95	0,066
B [F]	5,88	0,277
B [NF]	3,79	0,837
Γ [F]	-	-
Γ [NF]	-	-
Δ [F]	1,87	0,376
Δ [NF]	1,69	0,374
Ε [F]	2,41	0,143
Ε [NF]	2,25	1,098

Με βάση την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε, είναι γνωστό πως τα δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε υποκάπνιση με χλωροφόρμιο αναμένεται να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση TOC, λόγω της υψηλής βιοκτόνου δράσης που έχει το χλωροφόρμιο. Το τυπικό σφάλμα μέσου όρου (ή τυπικό σφάλμα) δείχνει πόσο διαφέρει ο μέσος όρος του πληθυσμού δειγμάτων από αυτόν του κάθε δείγματος. Όσο μεγαλύτερο είναι το τυπικό σφάλμα για το κάθε δείγμα τόσο μεγαλύτερο είναι το εύρος των αποτελεσμάτων για το συγκεκριμένο εδαφικό δείγμα. Όπως είναι εμφανές από τον Πίνακα 2, το δείγμα με το μικρότερο τυπικό σφάλμα ήταν αυτό που υποβλήθηκε σε κατευθείαν εκχύλιση με θειικό κάλλιο του εδαφικού δείγματος A [NF] (0,066) ενώ το μεγαλύτερο τυπικό σφάλμα το έχει το αντίστοιχο εδαφικό δείγμα E [NF] (1,098).

Με βάση τη χρονική διάρκεια λειτουργίας των θερμοκηπίων που μελετήθηκαν σε συνδυασμό με την βιβλιογραφία, αναμενόταν το εδαφικό δείγμα A (2019) να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC επειδή έχει τη μικρότερη διάρκεια λειτουργίας. Οι επιστήμονες Yu et al., (2020) [42], καταγράφουν σημαντική μείωση στον συνολικό SOC από την 5^η μέχρι τη 15^η χρονιά καλλιεργήσιμης έκτασης ενώ μέχρι το 70^ο έτος καταγράφουν συνολική αύξηση όσον αφορά τον SOC. Όπως αναφέρουν οι ίδιοι, «τόσο τα αποθέματα SOC και εδαφικός ανόργανος C (SIC) παρουσίασαν σημείο καμψής στα 15 χρόνια καλλιέργειας, το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την αξιολόγηση της δέσμευσης του εδαφικού C» [42].

Στο διάγραμμα Figure 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Πίνακα 3. Συγκεκριμένα, με μπλε χρώμα είναι ο μέσος όρος των δειγμάτων κάθε χρώματος τα οποία υποβλήθηκαν σε υποκάπνιση με χλωροφόρμιο και μετά εκχύλιση με K₂SO₄ ενώ με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν κατευθείαν με K₂SO₄. Επιπλέον, η χρονολογική διάρκεια λειτουργίας των θερμοκηπίων πάει

μικρότερη προς μεγαλύτερη (αριστερά προς δεξιά) ώστε να φανούν πιο ξεκάθαρα τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα για το εδαφικό δείγμα Γ δεν παρουσιάζονται στο διάγραμμα Figure 1 για τον λόγο που προαναφέρθηκε σε αυτό το κεφάλαιο.

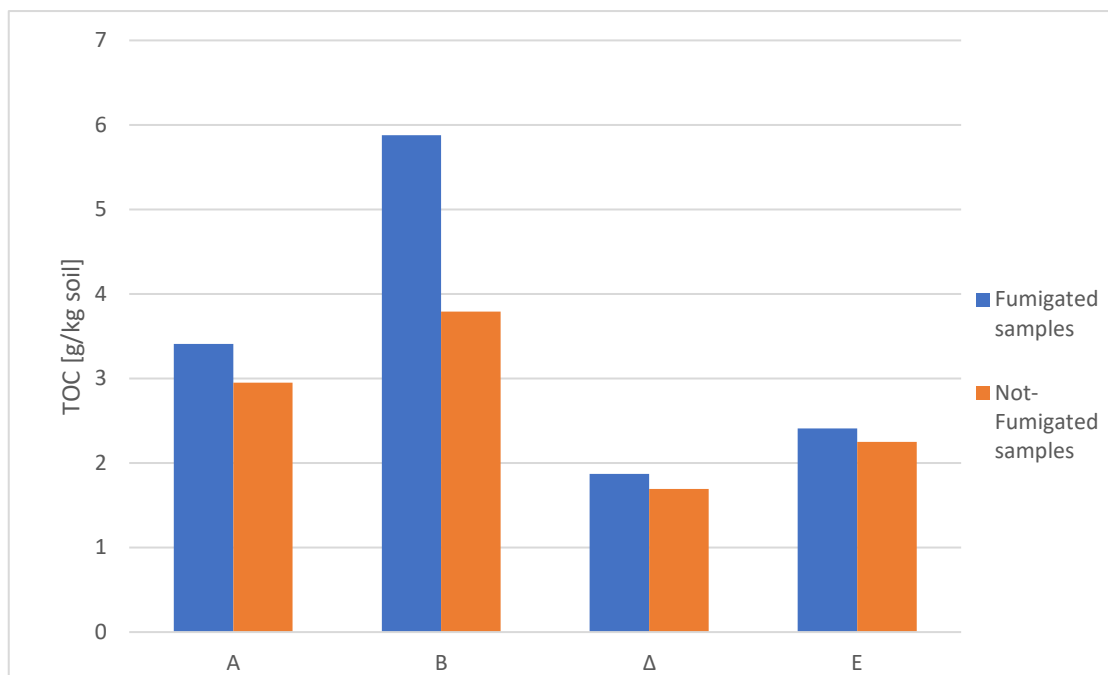


Figure 1: Παρουσίαση και σύγκριση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων (επωασμένα στους 30°C) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου (κόκκινο)

Η διαφορά στην συγκέντρωση TOC είναι εμφανής τόσο στα [F] δείγματα όσο και στα [NF]. Το δείγμα με τη μεγαλύτερη ανιχνευμένη ποσότητα TOC είναι το εδαφικό δείγμα B (τόσο τα [F] όσο και τα [NF]) ενώ στο εδαφικό δείγμα Δ ανιχνεύτηκε η μικρότερη ποσότητα TOC είναι το δείγμα Δ. Βέβαια για να φανούν πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα και να γίνει πιο ορθή σύγκριση, θα έπρεπε να γίνουν επανειλημμένες δειγματοληψίες στο κάθε θερμοκήπιο ξεχωριστά για μεγάλο χρονικό διάστημα (20-30 χρόνια με σταθερές πρακτικές καλλιέργειας). Γενικότερα, τα επίπεδα συγκέντρωσης TOC είναι χαμηλά για όλα τα εδαφικά δείγματα που μελετήθηκαν.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα δείγματα τα οποία επωάστηκαν αρχικά σε θερμοκρασία 40°C. Τα τυπικά σφάλματα είναι σε γενικές γραμμές μεγαλύτερα σε σχέση με τα τυπικά σφάλματα των δειγμάτων που επωάστηκαν στους 30°C. Αυτό δείχνει πως τα αποτελέσματα ανάλυσης για κάθε εδαφικό δείγμα ανήκε σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων TOC. Επιπλέον, σε αυτή τη περίπτωση ήταν δυνατή η ανίχνευση TOC για το εδαφικό δείγμα Γ.

Πίνακας 3: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 40°C

Δείγμα	TOC [g /kg soil]	Τυπικό σφάλμα
A [F]	3,21	0,725
A [NF]	2,89	0,434
B [F]	4,98	0,422
B [NF]	3,19	0,887
Γ [F]	2,64	0,181
Γ [NF]	1,62	0,773
Δ [F]	1,83	0,183
Δ [NF]	1,81	0,341
Ε [F]	3,50	0,142
Ε [NF]	3,12	1,130

Τα δεδομένα του διαγράμματος Figure 2 που παρουσιάζεται πιο κάτω, φαίνεται να έχουν την ίδια μορφή με τα δεδομένα του διαγράμματος Figure 1, με την προσθήκη βέβαια των εδαφικών δειγμάτων του θερμοκηπίου Γ. Συγκεκριμένα και σε αυτήν την περίπτωση στο εδαφικό δείγμα Β έχει ανιχνευτεί η μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC ενώ τα εδαφικά δείγματα Δ και Γ έχουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση TOC στα υποκαπνισμένα με χλωροφόρμιο δείγματα και κατευθείαν εκχυλισμένα δείγματα.

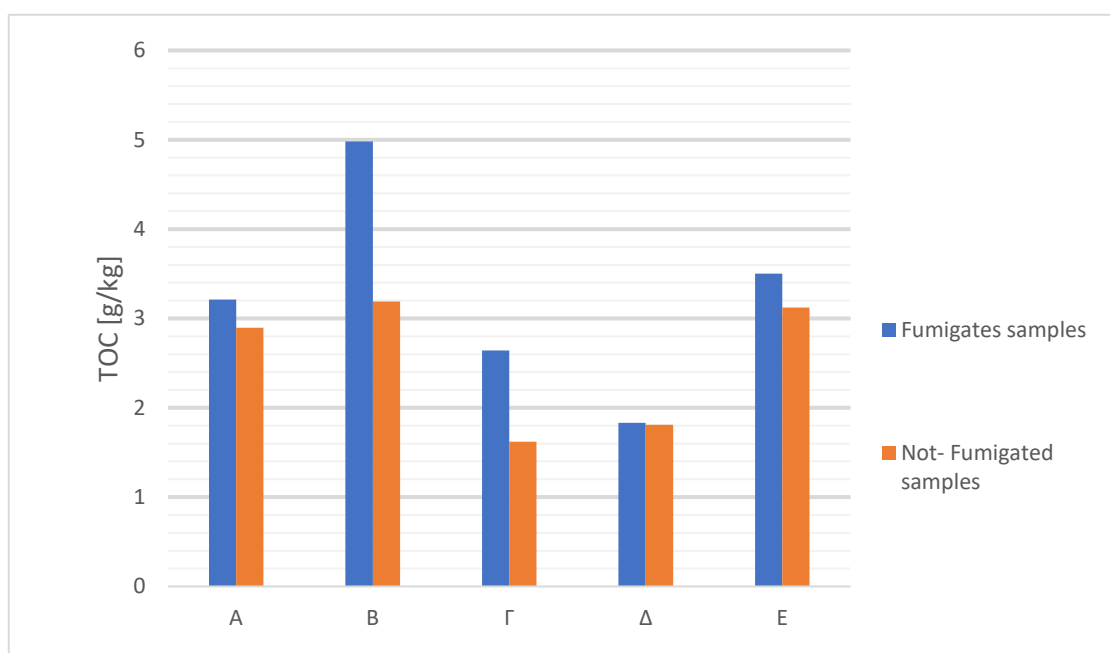


Figure 2: Παρουσίαση και σύγκριση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων (επωασμένα στους 30°C) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου

Όπως και για τα δείγματα που επωάστηκαν στους 30°C, για να είναι πιο καθαρή η επιρροή του χρονικού διαστήματος που καλλιεργείται μια έκταση, πρέπει να υπάρχουν πολλές δειγματοληψίες για μεγάλο χρονικό διάστημα στη συγκεκριμένη έκταση. Ωστόσο, εάν συγκρίνουμε μεμονωμένα το κάθε δείγμα, παρατηρούμε πως σε γενικές γραμμές υπάρχει όντως «σημείο καμπής» [42] στα 15 χρόνια καλλιέργειας της έκτασης.

Αντίκτυπο Θερμοκρασίας στον εδαφικό ολικό οργανικό άνθρακα

Για να εξετάσουμε το αντίκτυπο της θερμοκρασίας στον εδαφικό TOC θα γίνει σύγκριση μεταξύ των εδαφικών δειγμάτων που έχουν επωαστεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες (30°C και 40°C). Για την διευκόλυνση της σύγκρισης των τιμών, θα βρεθεί η μέση τιμή μεταξύ υποκαπνισμένων και μη-υποκαπνισμένων εδαφικών δειγμάτων.

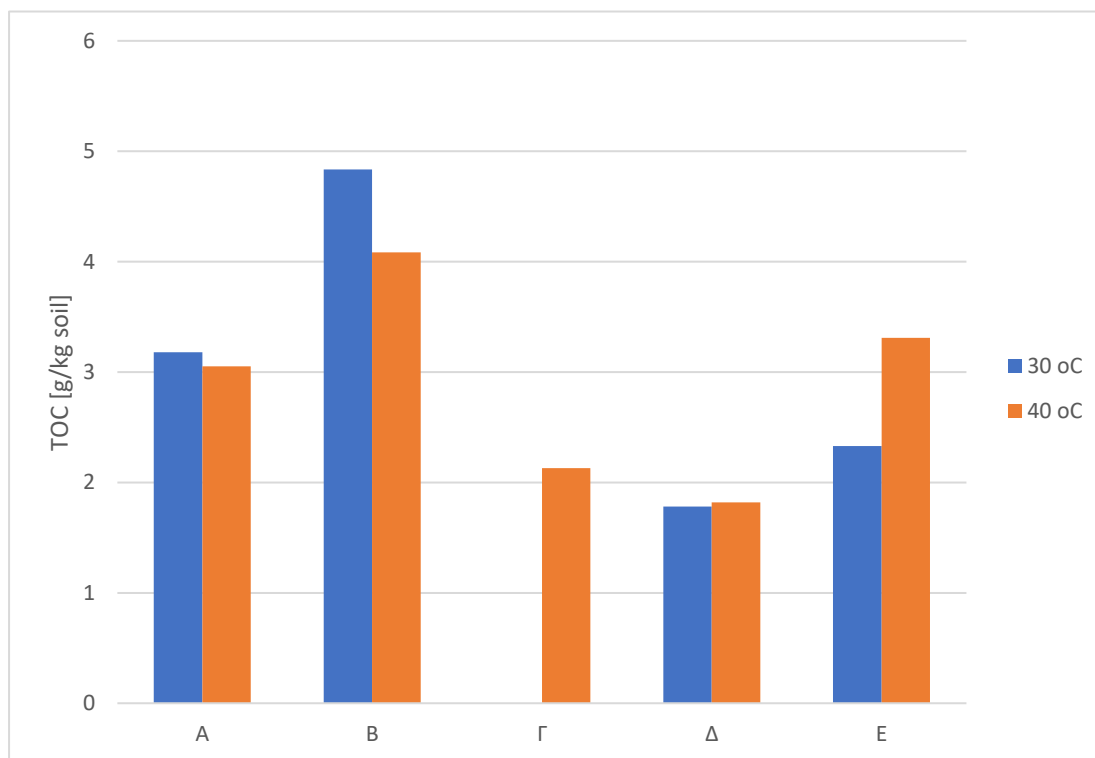


Figure 3: Σύγκριση των μέσων τιμών TOC για εδάφη που επωάστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 30 °C (μπλε χρώμα) και στους 40 °C (κόκκινο χρώμα).

Μέσω του διαγράμματος Fig. 3 μπορεί να γίνει παρατήρηση δύο διαφορετικών συμπεριφορών σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Αρχικά, τα θερμοκήπια Α και Β φαίνεται πως ευνοήθηκαν κατά την επώαση στους 30°C καθώς έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC. Αντίθετα, τα θερμοκήπια Γ, Δ και Ε εμφάνισαν μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC όταν επωάστηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία. Η διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων TOC (μεταξύ των δύο θερμοκρασιών) πιθανώς οφείλεται στην σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων του κάθε θερμοκηπίου (και ως συνέπεια του κάθε εδαφικού δείγματος), στην θερμική τους προσαρμογή, σε τυχόν αλλαγές στα μεταβολικά τους μονοπάτια ή σε μειωμένη διαθεσιμότητα πόρων. Όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 1.6.2, οι μικροοργανισμοί μπορεί να αντιδράσουν με διάφορους τρόπους στην θερμοκρασία. Για τα εδαφικά δείγματα Α και Β θα μπορούσε να ισχύει το συμπέρασμα των Manzoni et al., (2012) [8], δηλαδή η υψηλότερη θερμοκρασία να αύξησε το ενεργειακό κόστος συντήρησης των μικροοργανισμών λόγω θερμοκρασιακού στρες. Ωστόσο μια εξήγηση για την αύξηση συγκέντρωσης TOC για τα εδαφικά δείγματα Γ, Δ και Ε, με βάση τους Hiltunen et al. (2010) [8] είναι πως οι υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την εκρόφηση χημικά ασταθών υψηλού λόγου C:N μορίων ευνοώντας την αύξηση της CUE και ως αποτέλεσμα την αύξηση συγκέντρωσης των TOC. Λαμβάνοντας υπόψη πως για να χαρακτηριστούν γόνιμα τα εδάφη πρέπει να έχουν >30 g TOC/kg, θα

συμπεράναμε πως τα υπο εξέταση εδάφη δεν είναι γόνιμα [44]. Ωστόσο η χαμηλή συγκέντρωση TOC πιθανών να οφείλεται και σε σφάλματα, τα οποία αναλύονται στο Κεφάλαιο 3.4.

Απομόνωση DNA

Πέραν την ανάλυση ολικού οργανικού C, έγινε και προσδιορισμός βιομάζας μέσω DNA με τη χρήση του PowerSoil® DNA Isolation Kit ενώ στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας φθορίομετρο Denonix QFX Fluorometer. Η επώαση των δειγμάτων έγινε σε τρεις δραστικά διαφορετικές θερμοκρασίες (4 °C, 20 °C και 40 °C). Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανίχνευσης βιομάζας μέσω απομόνωσης DNA

Δείγματα	Συγκέντρωση βιομάζας [g/ g εδάφους] σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης		
	4 °C	20 °C	40 °C
A	65,07	46,47	54,87
B	198,80	124,87	163,73
Γ	235,80	175,13	125,47
Δ	135,93	186,27	203,53
E	67,73	113,87	131,20

Με μια πρώτη ματιά, βλέπουμε πως η μέθοδος απομόνωσης DNA είναι πιο αποδοτική λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της. Τα εδαφικά δείγματα A, B και Γ είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας στους 4°C (65,07 g/g εδάφους, 198,80 g/g εδάφους και 235,80 g/g εδάφους αντίστοιχα) ενώ για τα εδαφικά δείγματα Δ και Ε ανιχνεύτηκε μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας σε θερμοκρασία επώασης 40oC (203,53 g/g εδάφους και 131,20 g/g εδάφους αντίστοιχα).

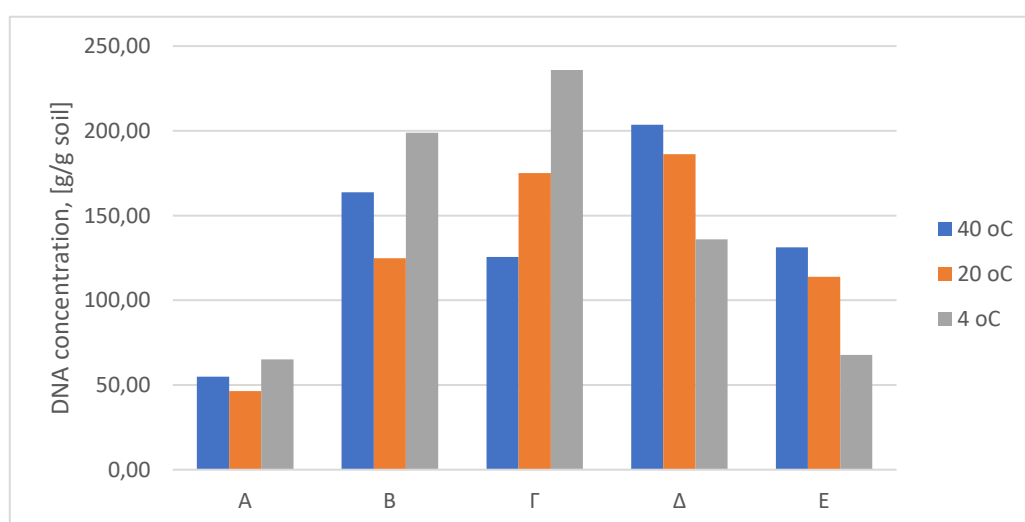


Figure 4: Παρουσίαση αποτελεσμάτων της ανάλυσης του απομονωμένου DNA για δείγματα που επώασθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 40 °C (μπλε χρώμα), 20 °C (πορτοκαλί χρώμα) και 4 °C (γκρι χρώμα)

Στην μελέτη που δημοσίευσαν πρόσφατα οι Gong H. et al., (2021) [43] σύγκριναν τον μικροβιακό C με την συγκέντρωση DNA για δείγματα που προέρχονταν από την Νότια Κίνα και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των δύο. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν μπορεί να γίνει η αντίστοιχη σύγκριση λόγω μη επαρκούς ποσότητας δειγμάτων για ανάλυση. Επιπλέον, η πειραματική διαδικασία της υποκάπνισης εφαρμόστηκε για δείγματα επωασμένα στους 40 °C και 30 °C ενώ η απομόνωση DNA έγινε σε εδαφικά δείγματα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε υποκάπνιση και επωάστηκαν στους 4°C, 20 και 40 °C. Στο διάγραμμα Figure 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2.2.

Είναι διακριτό και μέσω του διαγράμματος Figure 4 πως το κάθε έδαφος αντέδρασε διαφορετικά στις τρεις θερμοκρασίες επώασης. Η ανάλυση των δειγμάτων που επωάστηκαν στους 20 °C φαίνεται πως δίνει τη γενική μορφή του αποτελέσματος. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα, φαίνεται πως οι μικροοργανισμοί στα εδαφικά δείγματα των θερμοκηπίων Α, Β, Γ είναι πιο παραγωγικοί στην χαμηλότερη θερμοκρασία (4 °C) ενώ για τα εδαφικά δείγματα Δ και Ε είναι πιο παραγωγικοί στους 40 °C. Με βάση τον τρόπο λειτουργίας των Gong H. et al., (2021) [43] για να γίνει ουσιαστική σύγκριση μεταξύ συγκέντρωσης DNA και μικροβιακού C, θα πρέπει τα εδαφικά δείγματα και στις δύο περιπτώσεις να έχουν προ-επεξεργαστεί με τον ίδιο τρόπο. Όπως αναφέρεται και στη σημείωση του Κεφαλαίου 2.2, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA δεν υποκαπνίστηκαν, ούτε εκχυλίστηκαν όπως αναφέρει στο Κεφάλαιο 2.1. Έτσι, η απομόνωση DNA δεν είναι η συνολική αλλά ήταν η εύκολος διαλυόμενη οργανική ύλη. Αυτό που μπορούμε να λάβουμε από το διάγραμμα Figure 4, λοιπόν, είναι ότι πιθανώς στις ακραίες τιμές υπάρχει αυτή η αύξηση DNA λόγω κυτταρικού θανάτου (εξωκυτταρικό DNA). Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα είναι η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.10, η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για την απομόνωση DNA λόγω των διαφορών στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, η επιστημονική κοινότητα έχει παρατηρήσει πως ενώ οι μύκητες λόγω των χαρακτηριστικών και της μεγάλης προσαρμογής τους έχουν πρόσβαση σε εναλλακτικά αποθέματα άνθρακα με αποτέλεσμα μεγαλύτερη απόδοση στη παραγόμενη βιομάζα, οι μικροβιακές κοινότητες που είναι κυρίαρχοι έχουν μικρότερη συγκέντρωση μικροβιακού C από DNA, σε αντίθεση με τις μικροβιακές κοινότητες στις οποίες αφθονούν τα βακτήρια.

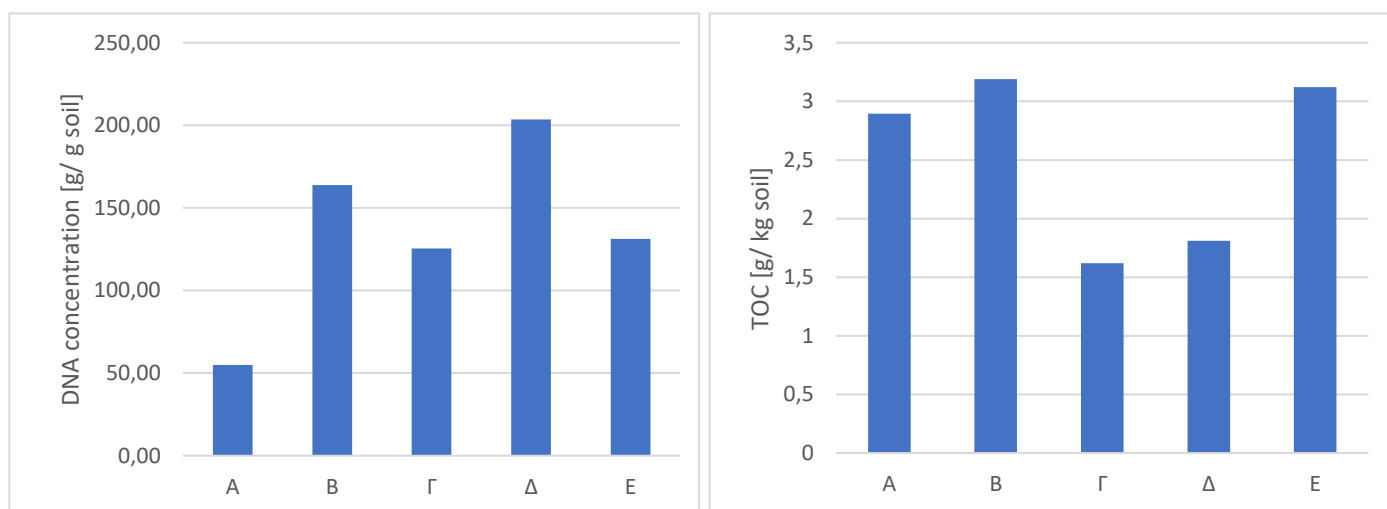


Figure 5: Σύγκριση του προφίλ των αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με τις αντίστοιχες τιμές TOC για δείγματα επωασμένα στους 40°C

Στο διάγραμμα Fig. 5 γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με τις τιμές TOC εδαφικών δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με K_2SO_4 . Και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα επωάστηκαν (πριν την επεξεργασία τους) στους 40°C. Η πρώτη παρατήρηση με βάση το συγκεκριμένο διάγραμμα είναι η μεγάλη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DNA και TOC. Τα εδάφη A, B και Γ έχουν παρόμοια μορφή στα διαγράμματα ενώ παρατηρείται απότομη άνοδος στην συγκέντρωση DNA του εδαφικού δείγματος Δ. Λαμβάνοντας υπόψη τους Yu et al., (2020) [42] σε συνδυασμό με τους περιορισμούς της μεθόδου απομόνωσης DNA μια εξήγηση για το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι η ταυτόχρονη πιθανή μείωση TOC και αύξηση του εξωκυτταρικού DNA (υπερεκτίμηση).

Ανάλυση ξηρών δειγμάτων

Τέλος, όσον αφορά τα συμβατικά θερμοκήπια έγινε ανάλυση των ξηρών δειγμάτων για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων TOC και ολικού αζώτου (TN). Ο προσδιορισμός των τιμών αυτών έγινε χρησιμοποιώντας τη συσκευή Multi N/C 2100 analytical του εργαστηρίου 'Υδρογεωχημικής Μηχανικής και Αποκατάστασης Εδαφών'. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα TOC και TN ξηρής ανάλυσης

Δείγμα	TOC [g/kg], 20°C	TN [g/kg]
A	3,62	0,36
B	11,59	2,13
Γ	8,21	0,59
Δ	11,45	1,09
E	7,76	0,49

Από τον πίνακα βλέπουμε πως οι συγκεντρώσεις TOC και TN του εδαφικού δείγματος Β είναι οι μεγαλύτερες (11,59 g/kg και 2,13 g/kg αντίστοιχα). Σε γενικό επίπεδο, οι συγκεντρώσεις TOC της ξηρής ανάλυσης είναι μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μεθοδολογία επώασης εξαέρωσης και απόσπασης με τη χρήση χλωροφορμίου (υποκαπνισμένα δείγματα και μη).

3.2 Πειραματικά αποτελέσματα βιολογικών θερμοκηπίων

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται και αναλύονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία επώασης εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου και τα αποτελέσματα αξιολόγησης δεικτών εδαφικής βιοποικιλότητας. Επιπλέον, γίνεται παρουσίαση μερικών χαρακτηριστικών που έχουν τα εδαφικά δείγματα βιολογικών θερμοκηπίων που εξετάστηκαν.

3.2.1 Σύγκριση παραμέτρων

Η παράμετρος που εξετάζεται στο παρόν κεφάλαιο είναι η χρονική διάρκεια λειτουργίας των θερμοκηπίων και πως αυτή επηρεάζει την σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων και ως συνέπεια την βιομάζα και τον TOC. Επιπλέον γίνεται σύγκριση μεταξύ τρεις δείκτες αξιολόγησης εδαφικής βιοποικιλότητας (Chao1, Shannon και PD) ώστε να βρεθεί πως η εδαφική ποικιλότητα επηρεάζει τον TOC.

Τα πέντε συμβατικά θερμοκήπια έχουν διαφορετική χρονική διάρκεια λειτουργίας, καθώς το πιο παλιό είναι ενεργό από το 2003 ενώ το νεότερο θερμοκήπιο χρησιμοποιείται για μόλις πέντε χρόνια. Στον Πίνακα 6 φαίνονται αναλυτικότερα τα έτη λειτουργίας για το κάθε θερμοκήπιο καθώς και η χρονολογία που άρχισε η λειτουργία τους.

Πίνακας 6: Χρονολογία κατασκευής θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του

Δείγμα	Χρονολογία	Έτη Λειτουργίας
Z	2017	5
H	2017	5
Θ	2013	9
I	2007	15
K	2003	19

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων για TOC στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Ομοίως με τα δείγματα συμβατικών θερμοκηπίων, τα δείγματα αφού ομογενοποιήθηκαν και φιλτραρίστηκαν μετά την τήξη τους, αναλύθηκαν ωστόσο χρησιμοποιώντας το όργανο TOC-L Organic Carbon Analyser του οίκου Shimadzu. Όπως και στο Κεφάλαιο 3.1.1 ο δείκτης [F] συμβολίζει πως το δείγμα υποβλήθηκε σε υποκαπνισμό με τη χρήση χλωροφορμίου ενώ ο δείκτης [NF] συμβολίζει πως στο δείγμα έγινε κατευθείαν εκχύλιση με K₂SO₄. Αξίζει να σημειωθεί πως για τα δείγματα βιολογικών θερμοκηπίων επωάστηκαν μόνο σε θερμοκρασία 20°C.

Πίνακας 7: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 20 °C

Δείγμα	TOC [g/ kg]	Τυπικό σφάλμα
Z [F]	27,55	0,668
Z [NF]	24,61	0,145
H [F]	42,40	1,784
H [NF]	38,93	2,356
Θ [F]	8,57	0,499
Θ [NF]	7,56	0,266
I [F]	3,32	0,171
I [NF]	2,46	0,342
K [F]	12,74	1,669
K [NF]	12,24	1,511

Στο διάγραμμα Figure 7 παρουσιάζονται και με γραφικό τρόπο τα αποτελέσματα ανάλυσης (Πίνακας 7). Οι στήλες μπλε χρώματος είναι για τα υποκαπνισμένα με χλωροφόρμιο δείγματα [F] ενώ οι κόκκινες στήλες είναι για τα δείγματα στα οποία έγινε κατευθείαν εκχύλιση με K₂SO₄ [NF]

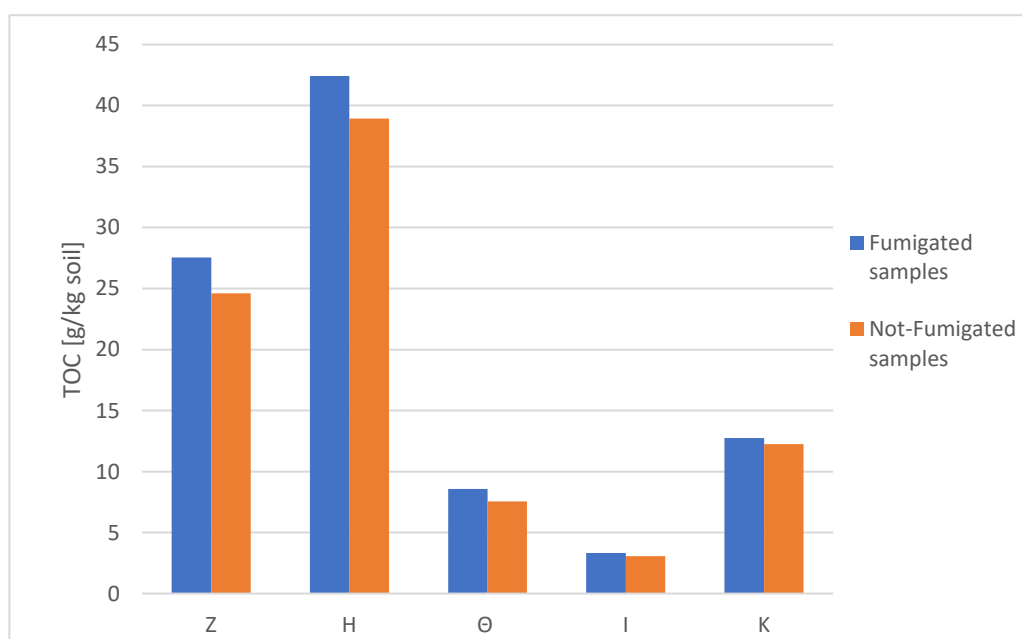


Figure 6: Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων από βιολογικά θερμοκήπια (επωασμένα στους 30oC) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου (πορτοκαλί)

Με βάση την μορφή του συγκεκριμένου διαγράμματος αλλά και τον Πίνακα 7, παρατηρούμε πως τα βιολογικά θερμοκήπια που μελετήθηκαν εμπίπτουν στην παρατήρηση των Yu et al., (2020) [42]. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως τα θερμοκήπια Z και H με χρονική διάρκεια λειτουργίας τα 5 έτη, έχουν τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις TOC και με βάση τη βιβλιογραφία εμπίπτουν στα γόνιμα εδάφη (TOC >30g/kg). Ωστόσο,

τα υπόλοιπα τρία θερμοκήπια Θ, Ι και Κ έχουν πολύ μικρότερη συγκέντρωση TOC με χρονική διάρκεια λειτουργίας 9, 15 και 19. Τα δείγματα των θερμοκηπίων Θ και Ι εμπίπτουν στο χρονικό εύρος των 5 με 15 χρόνια καλλιεργήσιμης έκτασης που ανέφεραν [42] ενώ το εδαφικό δείγμα Κ εμπίπτει μετά το σημείο καμψής των 15 χρόνων.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα εδαφικά δείγματα βιολογικών θερμοκηπίων έγιναν με σκοπό την επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας και τα χώματα ήταν «πιο φρέσκα» (η δειγματοληψία έγινε τέλη του 2021). Αυτό πιθανώς να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Τα πιθανά σφάλματα θα αναλυθούν περαιτέρω στο Κεφάλαιο 3.4.

Αξιολόγηση δεικτών βιοποικιλότητας

Για να είναι εφικτή η ορθή αξιολόγηση των δεικτών βιοποικιλότητας του εδάφους πρέπει να καθοριστεί η κλίμακα εξέτασης. Η κλίμακα και το επίπεδο σύγκρισης που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των δεικτών ποικιλότητας ήταν η άλφα-ποικιλότητα (α-diversity). Συγκεκριμένα, η μέση ποικιλότητα των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν αλληλοεπιδρούν εντός συγκεκριμένων ενδιαιτημάτων σε μια δεδομένη περιοχή (στα υπό εξέταση βιολογικά θερμοκήπια).

Πίνακας 8: Μέσες τιμές δεικτών αξιολόγησης της εδαφικής βιοποικιλότητας των βιολογικών θερμοκηπίων και η τυπική τους απόκλιση

Δείγμα	Δείκτες αξιολόγησης εδαφικής βιοποικιλότητας	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση
Ζ	Chao1	2138,5	287,746
	Shannon	6,81769	0,187
	PD [%]	2,19	20,287
Η	Chao1	2176	113,373
	Shannon	6,87686	0,130
	PD [%]	2,14	8,780
Θ	Chao1	2123,6	297,333
	Shannon	6,70209	0,364
	PD [%]	2,17	217,600
Ι	Chao1	1989,8	409,840
	Shannon	6,38076	0,602
	PD [%]	2,10	30,892
Κ	Chao1	1961,8	179,911
	Shannon	6,63616	0,124
	PD [%]	2,10	15,047

Δείκτης Chao1

Με βάση τον δείκτη Chao1, μπορεί να γίνει σύγκριση όσων αφορά τον πλούτο των ειδών μιας μικροβιακής κοινότητας με ευαισθησία στα σπάνια είδη χαμηλής αφθονίας (μοναδιαία ή είδη με δύο έμβιες μονάδες).

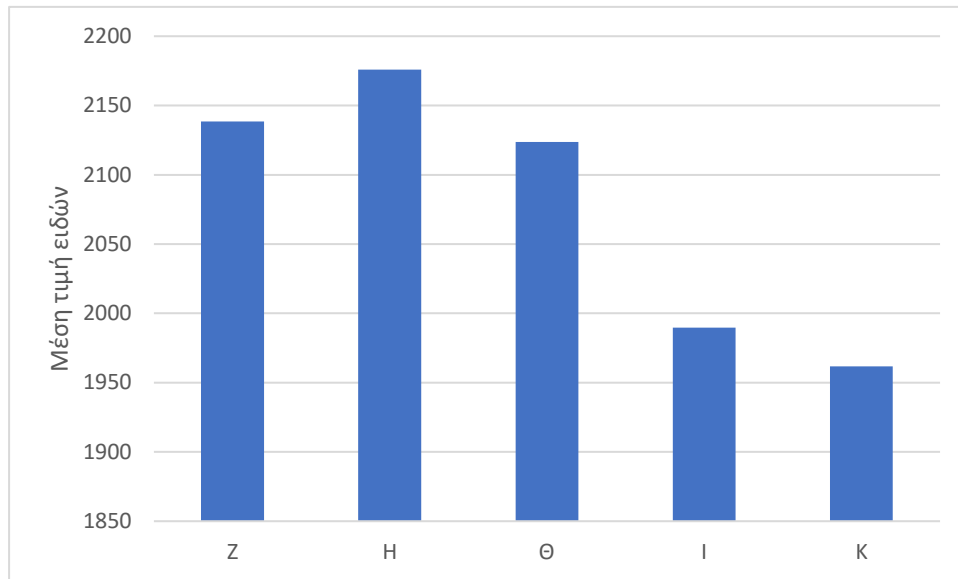


Figure 7: Μέσες τιμές των ειδών μικροοργανισμών που βρέθηκαν για κάθε θερμοκήπιο

Το διάγραμμα Fig. 8 παρουσιάζει τις μέσες τιμές των ειδών που βρέθηκαν στα εδαφικά δείγματα των υπό μελέτη θερμοκηπίων. Όπως φαίνεται, τα εδαφικά δείγματα για το H θερμοκήπιο είχαν τον μεγαλύτερο αριθμό σπάνιων ειδών χαμηλής αφθονίας (2176,0). Με βάση τον δείκτη αξιολόγησης Chao1 σημαίνει πως στο συγκεκριμένο θερμοκήπιο υπάρχει μεγάλη αφθονία ειδών (ποικιλότητα). Σε αντίθεση με αυτό, τα εδαφικά δείγματα του θερμοκηπίου K είχαν τον μικρότερο δείκτη (1961,8).

Δείκτης Shannon

Ο δείκτης Shannon, όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 1.4.4, είναι λογαριθμικός δείκτης μέτρου της βιοποικιλότητας. Αντίθετα από τον δείκτη αξιολόγησης Chao1, ο δείκτης Shannon αφορά τον πλούτο και την σχετική αφθονία διαφορετικών ειδών, ανεξάρτητα της σπανιότητάς τους. Με βάση τη βιβλιογραφία, σε αντίθεση με το μηδενικό κατώτατο όριο (μοναδικότητα ενός είδους – δεν υπάρχει ποικιλότητα) του δείκτη δεν υπάρχει ανώτατο όριο καθώς για την επίτευξη ανώτατου ορίου θα έπρεπε όλα τα είδη των έμβιων μικροοργανισμών να είχαν τον ίδιο αριθμό ατόμων, πράγμα σχεδόν αδύνατο.

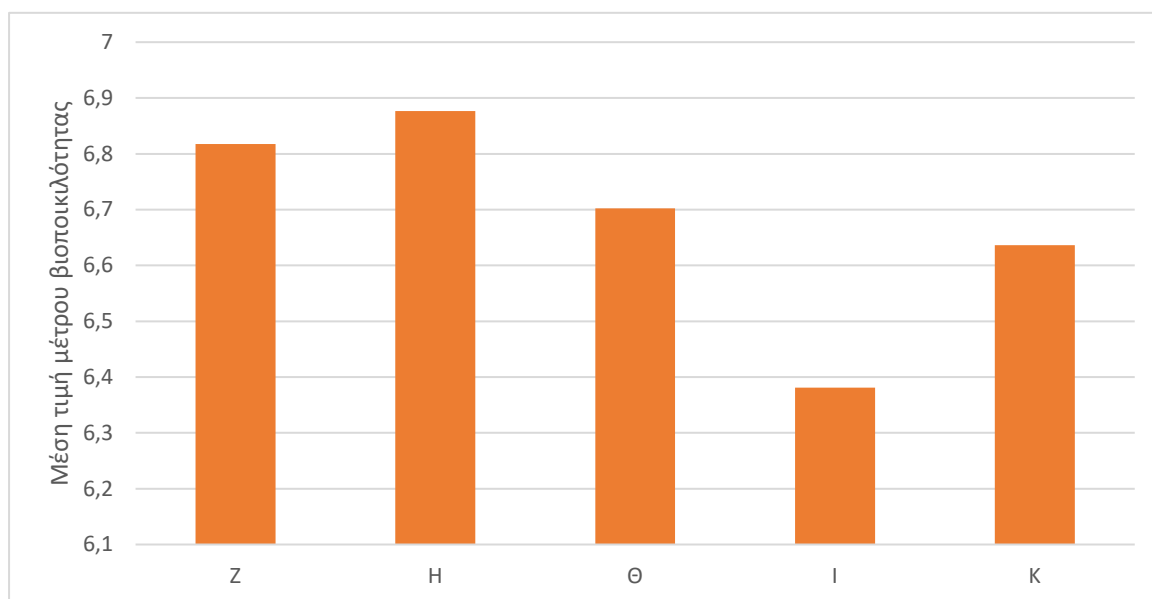


Figure 8: Μέσες τιμές του μέτρου βιοποικιλότητας με βάση τον δείκτη αξιολόγησης Shannon για τα υπο μελέτη βιολογικά θερμοκήπια

Το θερμοκήπιο H έχει και σε αυτή τη περίπτωση τον μεγαλύτερο δείκτη βιοποικιλότητας. Όταν υπάρχει σχετικά μεγάλη εδαφική βιοποικιλότητα, είναι αναμενόμενο να υπάρχει και μεγάλη ποσότητα εδαφικού άνθρακα και βιομάζας λόγω των διαφορετικών ικανοτήτων που έχουν διαφορετικοί μικροοργανισμοί. Μικροβιακές κοινότητες με μικρή βιοποικιλότητα αναμένεται να έχουν μικρότερη απόδοση όσον αφορά γονιμότητα και σε συνέπεια θρεπτικά συστατικά (σε αυτή τη περίπτωση TOC). Το γεγονός αυτό καθιστά αναμενόμενη την χαμηλή τιμή του δείκτη βιοποικιλότητας του θερμοκηπίου I.

Δείκτης φυλογενετικής ποικιλότητας

Ο δείκτης PD υπολογίζεται με βάση μορφολογικά και μοριακά δεδομένα ενός πληθυσμού λαμβάνοντας υπόψη τις εξελικτικές αλλαγές των χαρακτηριστικών αυτών. Παρά τα πλεονεκτήματα που έχει, χρησιμοποιείται πιο σπάνια ως το κύριο μέτρο της βιοποικιλότητας γιατί δε βασίζεται σε εξωτερικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο δείκτης PD θα χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση φυλογενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των πέντε θερμοκηπίων. Όπως μπορεί να διακριθεί από τον Πίνακα 8, τον μεγαλύτερο δείκτη τον έχει το εδαφικό δείγμα Z. Αυτό σημαίνει πως η ποικιλότητα που υπάρχει στο συγκεκριμένο θερμοκήπιο έχει την μεγαλύτερη απόσταση από την “ρίζα”, δηλαδή οι τελικές ταξονομικές ομάδες της συγκεκριμένη μικροβιακή κοινότητα είχαν μεγαλύτερη εξέλιξη ή είναι περισσότερες σε αριθμό.

Επιπλέον χαρακτηριστικά των εδαφικών δειγμάτων

Σε προηγούμενα κεφάλαια έγινε αναφορά στην σημασία φυσικών και βιοχημικών εδαφικών χαρακτηριστικών για την αξιολόγηση της εδαφικής υγείας – ποιότητας και γονιμότητας. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται διάφοροι παράμετροι για την ολοκλήρωση της εικόνας σχετικά με την ποιότητα των υπό μελέτη βιολογικών θερμοκηπίων.

Πίνακας 9: Παρουσία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των εδαφικών δειγμάτων

Δείγμα	Τύπος καλλιέργειας	SOC [mg/kg]	TN [mg/kg]	Νιτρικά [mg/kg]	Αμμωνιακά [mg/kg]	pH	EC [dS/m]
Ζ	Αγγούρια	31,23	6,32	3788,15	74,50	7,1	8,53
		24,93	5,19	3155,94	44,29	7,0	6,99
		40,88	6,59	4039,06	45,62	6,5	8,955
Η	Πιπεριές	33,64	7,09	6587,94	102,82	7,4	12,97
		52,73	6,82	3340,94	79,48	6,9	10,47
		46,60	5,89	2215,17	30,78	6,8	5,88
Θ	Αγγούρια	15,36	2,13	2364,94	48,83	5,1	6,89
		17,58	3,35	2247,08	52,33	7,6	5,57
		22,59	5,77	4349,96	67,83	6,7	4,64
Ι	Πιπεριές	12,31	1,80	1448,58	25,29	7,9	4,54
		9,56	1,73	710,64	12,83	7,8	4,47
		9,94	1,35	244,72	12,22	7,9	3,08
Κ	Ντομάτες	15,36	2,13	2364,94	48,83	7,8	5,69
		17,58	3,35	2247,08	52,33	7,8	6,71
		22,59	5,77	4349,96	67,83	7,8	9,18

Η υψηλότερη τιμή SOC ανήκει στο θερμοκήπιο Η (μέση τιμή SOC 44,32 mg/kg) ενώ αντίστοιχα η χαμηλότερη τιμή ανήκει στο θερμοκήπιο Ι (μέση τιμή SOC 10,61 mg/kg). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα καθώς τα θερμοκήπια Η και Ι έχουν τις υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις TOC αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα συγκέντρωσης του SOC εμπίπτουν στην παρατήρηση των Yu et al., (2020). Η ίδια τάση φαίνεται να ακολουθείται και όσον αφορά τον TN, καθώς το θερμοκήπιο Η έχει την υψηλότερη μέση συγκέντρωση TN σε αντίθεση με το θερμοκήπιο Ι. Επιπλέον παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση νιτρικών και αμμωνιακών. Τα νιτρικά και αμμωνιακά προκύπτουν από την ανοργανοποίηση και συχνή νιτροποίηση του Ν στο έδαφος. Όσον αφορά το pH, με βάση τη βιβλιογραφία, το εύρος 6,8-7,2 είναι κοντά στο ουδέτερο ενώ το εύρος 6,0-7,5 είναι αποδεκτό από τα περισσότερα φυτά. Ωστόσο, γίνεται παρατήρηση πως τα θερμοκήπια Ι και Κ έχουν μέσο όρο pH 7,86 και 7,78 αντίστοιχα. Σε εδάφη με pH γύρω στο 7,5 εμφανίζεται πρόβλημα όσον αφορά την διαθεσιμότητα σιδήρου [46]. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι σημαντικός δείκτης για την ποιότητα και την γονιμότητα του εδάφους. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, η χαμηλότερη τιμή ανήκει στο θερμοκήπιο Ι (μέσος όρος EC 4,03 dS/m = 4,03 mmhos/cm) πράγμα που σημαίνει πως το συγκεκριμένο θερμοκήπιο είναι στο όριο χαρακτηρισμού ως «αλατούχο». Σε αντίθεση με το θερμοκήπιο Ι, τα θερμοκήπια Ζ, Η, Θ και Κ έχουν αρκετά μεγαλύτερες τιμές. Αυτό σημαίνει πως περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις υδατοδιαλυτών αλάτων. Επιπλέον, ένα χαρακτηριστικό του σχηματισμού των αλατούχων εδαφών είναι το ξηρό/ημί-ξηρό κλίμα, τα αβαθή αλατούχα υπόγεια νερά καθώς και η κακής ποιότητας νερού άρδευσης.

3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων συμβατικών και βιολογικών θερμοκηπίων

Η μεθοδολογία επώασης εξαέρωσης και απόσπασης μέσω χλωροφορμίου (CFDE) ακολουθήθηκε τόσο για τα εδαφικά δείγματα συμβατικών όσο και βιολογικών θερμοκηπίων. Ωστόσο η επώαση των δειγμάτων έγινε σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Τα εδαφικά δείγματα των συμβατικών θερμοκηπίων επωάστηκαν σε θερμοκρασίες 30 °C και 40°C ενώ αυτά των βιολογικών θερμοκηπίων στους 20 °C (θερμοκρασία δωματίου). Αυτό περιπλέκει την σύγκριση των αποτελεσμάτων καθώς δεν βρίσκονται σε κοινό παρονομαστή.

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν το χρονικό διάστημα λειτουργίας των θερμοκηπίων σε συνδυασμό με την ανταπόκριση που έχουν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και πως αυτές επηρεάζουν την συγκέντρωση εδαφικού TOC. Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές συγκέντρωσης TOC των θερμοκηπίων είναι αδιαμφισβήτητο πως τα βιολογικά θερμοκήπια (Πίνακας 7) έχουν πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TOC από τα θερμοκήπια συμβατικών καλλιεργειών (Πίνακες 2 και 3). Λαμβάνοντας υπόψη και τα υπόλοιπα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα βιολογικά θερμοκήπια που εξετάστηκαν (ειδικά το Z και H) έχουν πιο γόνιμο έδαφος από τα συμβατικά. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται στα θερμοκήπια, όπως για παράδειγμα η χρήση χημικών λιπασμάτων στα συμβατικά σε αντίθεση με τη χρήση βιολογικών λιπασμάτων όπως κοπριά στα βιολογικά θερμοκήπια. Επιπλέον πιθανώς να παίζει ρόλο και η θερμοκρασία που επωάστηκαν τα δείγματα. Ακόμα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τα θερμοκήπια συμβατικής καλλιέργειας ίσως επηρεάστηκαν από το χρονικό διάστημα μεταξύ δειγματοληψίας και χρήσης τους για την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών. Ωστόσο με βάση τα διαγράμματα Fig. 1, Fig. 2 Fig. 7, τα αποτελέσματα φαίνεται να υπακούουν στο συμπέρασμα των Yu et al., (2020) [42] που αφορά την διακύμανση της συγκέντρωσης του οργανικού C.

Εάν ληφθούν υπόψη οι τιμές του Πίν. 5 για τα δείγματα συμβατικών θερμοκηπίων τα οποία επωάστηκαν στους 20°C, βλέπουμε πως οι τιμές είναι πιο κοντά σε αυτές των βιολογικών θερμοκηπίων. Βέβαια τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διαδικασία δεν υποβλήθηκαν σε υποκάπνιση με τη χρήση χλωροφορμίου αλλά ούτε σε κατευθείαν εκχύλιση με K₂SO₄.

Πέραν της διαδικασίας CFDE, εφαρμόστηκαν κι άλλες πειραματικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα, για τα θερμοκήπια συμβατικής καλλιέργειας έγινε απομόνωση DNA και ξηρή ανάλυση για τον υπολογισμό TOC ενώ για τα βιολογικά θερμοκήπια έγινε αξιολόγηση δεικτών βιοποικιλότητας. Επιπλέον, για τα βιολογικά θερμοκήπια βρέθηκαν κι άλλα δεδομένα, από τον επιβλέπων καθηγητή κύριο Νικόλαο Παρανυχιανάκη, που αφορούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εδαφικών δειγμάτων. Λόγω των διαφορετικών μεθοδολογιών που εφαρμόστηκαν και λόγω έλλειψης δεδομένων, δεν μπορεί να γίνει κάποια απευθείας σύγκριση στα δεδομένα αυτά.

3.4 Προβλήματα και πιθανά σφάλματα

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάστηκαν διάφορα προβλήματα που οδήγησαν σε σφάλματα.

Γενικά, σφάλματα μπορεί να προκύψουν σε κάθε βήμα των πειραματικών διαδικασιών, ακόμα και στην προ-επεξεργασία. Για παράδειγμα, εάν δεν γίνει σωστή αφαίρεση τυχών πετρών, θραυσμάτων φύλλων ή ριζών πριν το λειοτρίβισμα των χωμάτων δειγμάτων θα γίνει υπερεκτίμηση στις διάφορες συγκεντρώσεις που μελετιούνται. Ακόμα, η χρήση μικρότερης μάζας δείγματος από την ποσότητα που αναφέρεται στα πρωτόκολλα μεθοδολογιών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα αφού παρά την καλή ομογενοποίηση, πιθανών να μην είναι αντιπροσωπευτικά. Επίσης, για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα θα πρέπει η επεξεργασία των δειγμάτων, η πειραματική διαδικασία γενικότερα, να γίνει όσο το δυνατόν συντομότερα από την στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία ώστε να μην υπάρχουν αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες και τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά και «πραγματικά».

Μια ακόμα σημαντική παράληψη που μπορεί να καταλήξει σε σφάλματα είναι ο μικρός αριθμός δειγμάτων, τόσο αριθμητικά όσο και σε χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, για να μπορούν να αξιολογηθούν και να συγκριθούν τα πειραματικά αποτελέσματα θα πρέπει να γίνουν επαλείψεις δειγματοληψιών για εκτεταμένο χρονικό διάστημα, ώστε να φανεί καθαρά το αντίκτυπο που έχει ο χρόνος και η επανάληψη καλλιεργειών πρακτικών σε μια γεωργική έκταση. Ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται σε μια πειραματική διαδικασία παίζει ρόλο στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Τα περισσότερα προβλήματα, ωστόσο, αφορούσαν την CFDE μεθοδολογία. Αρχικά, λόγω των ιδιοτήτων του χλωροφορμίου, «έλιωνε» το ελαστικό στην ένωση της βαλβίδας με το πώμα (αφερούμενο μέρος) του ξηραντήρα. Αυτό οδήγησε στην μη διατήρηση του κενού αέρος και είχε ως αποτέλεσμα το περιβάλλον εντός του ξηραντήρα να μην είναι κορεσμένο με χλωροφόρμιο μετά την εξάτμισή του. Επιπλέον, επειδή τα δείγματα που υποβάλλονται σε υποκάπνιση πρέπει να μείνουν σε κενό αέρος για τρεις μέρες καθιστούν την διαδικασία θεωρητικά χρονοβόρα, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σε πρώτο χρόνο για όλα τα δείγματα.

Τέλος, εξωτερικά προβλήματα στις συγκεκριμένες μεθοδολογίες μπορεί να οφείλονται σε υπερεκτίμηση λόγω μη αιεφόρων γεωργικών πρακτικών και υπέρμετρης λίπανσης των καλλιεργειών για την αύξηση παραγωγής.

4. Συμπεράσματα

Με βάση την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι εμφανές ότι υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την εύρεση και αξιολόγηση των φυσικών και βιοχημικών παραμέτρων, ιδιοτήτων και γενικότερα ποιότητας του εδάφους. Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα θερμοκήπια βιολογικών πρακτικών ήταν πιο γόνιμα (ειδικά τα θερμοκήπια Ζ και Η), κάτι που φαίνεται τόσο από τις συγκεντρώσεις TOC όσο και από τους δείκτες βιοποικιλότητας.

Η επώαση των δειγμάτων στις διαφορετικές θερμοκρασίες αποσκοπούσε στην έρευνα της θερμικής ανταπόκρισης των μικροοργανισμών. Στην πραγματικότητα, η θερμοκρασία σε ένα θερμοκήπιο δεν θα έχει τιμή 4°C λόγω του κλιματικού ελέγχου που γίνεται εντός των θερμοκηπίων.

Όσον αφορά την CFDE μεθοδολογία, η υλοποίηση της είναι σχετικά χρονοβόρα. Μπορεί να δώσει στοιχεία για την αποδοτικότητα χρήσης άνθρακα των μικροβιακών κοινωνιών σε ένα εδαφικό δείγμα και για τον TOC του εδάφους. Η αποτελεσματικότητα της στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία φαίνεται πιο καθαρά στην επανάληψη της που έγινε για τον υπολογισμό συγκέντρωσης TOC των βιολογικών θερμοκηπίων. Τα αποτελέσματα της έδειξαν πως υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC στα βιολογικά θερμοκήπια που επωάστηκαν στους 20°C. Ωστόσο, τα θερμοκήπια συμβατικής γεωργίας φάνηκαν να ευνοούνται από τις χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Η μέθοδος απομόνωσης DNA αν και βασισμένη σε κιτ, είναι υψηλότερης ευαισθησίας και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό μικροβιακής βιομάζας. Οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες-κιτ έχουν αναπτυχθεί για να είναι ταχείες και αυτοματοποιημένες. Βέβαια στην σύγχρονη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την μεθοδολογία CFDE για πιο ακριβή και αξιοποιήσιμα αποτελέσματα όσων αφορά τον υπολογισμό του μικροβιακού C. Με βάση τα αποτελέσματα, γίνεται παρατήρηση πως οι συγκεντρώσεις DNA που μετρήθηκαν είχαν διαφορά τάξης μεγέθους σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μικροβιακής βιομάζας μέσω της μεθόδου CFDE. Αυτό πιθανώς οφείλεται και στα νεκρά κύτταρα τα οποία μετρήθηκαν μέσω της διαδικασίας.

Ένας πολύ σημαντικός δείκτης για την εκτίμηση της υγείας του εδάφους είναι η εδαφική βιοποικιλότητα. Η ύπαρξη βιοποικιλότητας στο έδαφος είναι ένα βασικό στοιχείο καλής ποιότητας του εδάφους. Χρησιμοποιώντας την άλφα-ποικιλότητα ως κλίμακα εξέτασης σε συνδυασμό με τους δείκτες Chao1, Shannon και PD αποκτήθηκε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις μικροβιακές κοινωνίες των υπό εξέταση εδαφών. Ειδικότερα ο συνδυασμός των δεικτών Chao1 και Shannon βοήθησαν στην κατανόηση της ύπαρξης ή μη σπάνιων και μοναδιαίων ειδών καθώς και στην σχετική αφθονία και πλούτο των ειδών, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως το θερμοκήπιο με την υψηλότερη συγκέντρωση μικροβιακής βιομάζας, έχει και τους υψηλότερους δείκτες αξιολόγησης βιοποικιλότητας (Chao1 και Shannon).

Τέλος, εάν τα δείγματα από τα δύο είδη θερμοκηπίων είχαν επωαστεί σε κοινές θερμοκρασίες ενώ ταυτόχρονα είχαν υποβληθεί στις ίδιες πειραματικές μεθοδολογίες θα μπορούσε να γίνει μια πιο ολοκληρωμένη σύγκριση με καλύτερα αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

- [1] E. D. Vance,* P. C. Brooks and D. S. Jenkinson, An extraction method for measuring soil microbial biomass C
- [2] Shannon B. Hagerty . Steven D. Allison . Joshua P. Schimel, 2018. Evaluating soil microbial carbon use efficiency explicitly as a function of cellular processes: implications for measurements and models
- [3] Kevin M. Geyer, Emily Kyker- Snowman, A. Stuart Grandy, Serita D. Frey, 2016, Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem – scale controls over the fate of metabolized organic matter. *Biochemistry*
- [4] Sören Thiele-Bruhn, Raul Zornoza, 2018, Crop diversification and low-input farming across Europe: from practitioners’ engagement and ecosystems services to increased revenues and value chain organisation, p. 98-102
- [5] R. E. Madrid & C. J. Felice (2005) Microbial Biomass Estimation, *Critical Reviews in Biotechnology*, 25:3, 97-112, DOI: 10.1080/07388550500248563
- [6] Steve Allison, 2008, Allison Lab Protocol, Microbial Biomass by Fumigation, Chloroform Fumigation Direct Extraction(CFDE) protocol from microbial biomass carbon and nitrogen
- [7] Postgate J. R., 1969.Viable counts and viability. *Methods Microbiol.* 1: 611–628
- [8] Adingo S, Yu J-R, Xuelu L, Li X, Jing S, Xiaong Z. 2021. Variation of soil microbial carbon use efficiency (CUE) and its Influence mechanism in the context of global environmental change: a review. *PeerJ* 9:e12131
- [9] Expert group for technical advice on organic production (EGTOP), 2013, Final report on greenhouse production (protected cropping)
- [10] Tittarelli F., 2020, Organic greenhouse production: towards an agroecological approach in the framework of the new European regulation – a review, *Agronomy*
- [11] Council regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labeling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. *OJ L* 2007, 189, 1–23.
- [12] Commission Regulation (EC) No. 889/2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No. 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. *OJ L* 2008, 250, 1–84
- [13] Tibbett M, Fraser TD, Duddigan S. 2020. Identifying potential threats to soil biodiversity. *PeerJ* 8:e9271
- [14] Jensen DB, Torn MS, Harte J. 1990. In our own hands: a strategy for conserving California’s biological diversity. Berkeley: University of California P
- [15] Hoorman J. J. 2011, The role of soil bacteria, Ohio State University

- [16] Jung J., Kim J.-S., Taffner J., Berg G., Ruy C.-M., 2020, Archaea, tiny helpers of land plants, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18 (2020) 2494–2500
- [17] Fṙac M, Hannula SE, Beřka M and J̇edryczka M (2018) Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* 9:707
- [18] Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 78–91. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00245-4
- [19] Bagyaraj, D. J., and Ashwin, R. (2017). Soil biodiversity: role in sustainable horticulture. *Biodivers. Hortic. Crops* 5, 1–18
- [20] Sinsabaugh RL, Turner BL, Talbot JM, Waring BG, Powers JS, Kuske CR, Moorhead DL, Follstad Shah JJ. 2016. Stoichiometry of microbial carbon use efficiency in soils. *Ecological Monographs* 86(2):172–189
- [21] Peet R. K., 1974, The measurement of species diversity, Section of ecology and systematics, Langmuir laboratory, Cornell University, Ithaca, New York 14850
- [22] Walther B. A. & Morand S., 1997 Comparative performance of species richness estimation methods, *Parasitology* (1998), 116, 395-405
- [23] Rain R., (2021, November 12), Shannon diversity index calculator, Retrieved from <https://www.omnicalculator.com/ecology/shannon-index>
- [24] Chao, A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11, 265–270
- [25] Wang C., Liu D., Bai E., 2018, Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing biomass under nitrogen addition, *Soil Biodiversity and Biochemistry* 120 (2018) 126-133
- [26] Kim B. R., Shin J., Guevarra R. B., Lee J. H., Kim D. W., Seol K. H., Lee J.H., Kim H. B., Isaacson R. E., 2017, Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2017), 27(12), 2089–2093
- [27] Faith D. P., 1992, Conservation evaluation and phylogenetic diversity, *Biological Conservation* 1992, 61, 1-10
- [28] Chao A., Chiu C. H., Hseih T. C., Davis T., Nipperess D. A., Faith D. P., 2014, Rarefaction and extrapolation of phylogenetic diversity, *Methods in Ecology and Evolution* Volume 6, Issue 4 p. 380-388
- [29] Faith D. P., 2013, Biodiversity and evolutionary history: useful extensions of the PD phylogenetic diversity assessment framework, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923
- [30] Whittaker R. H., 1960, Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California, *Ecol. Monogr.* 30: 279-338
- [31] Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, et al., 2010 Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction, *J Soils Sediments* 10: 1344– 1345

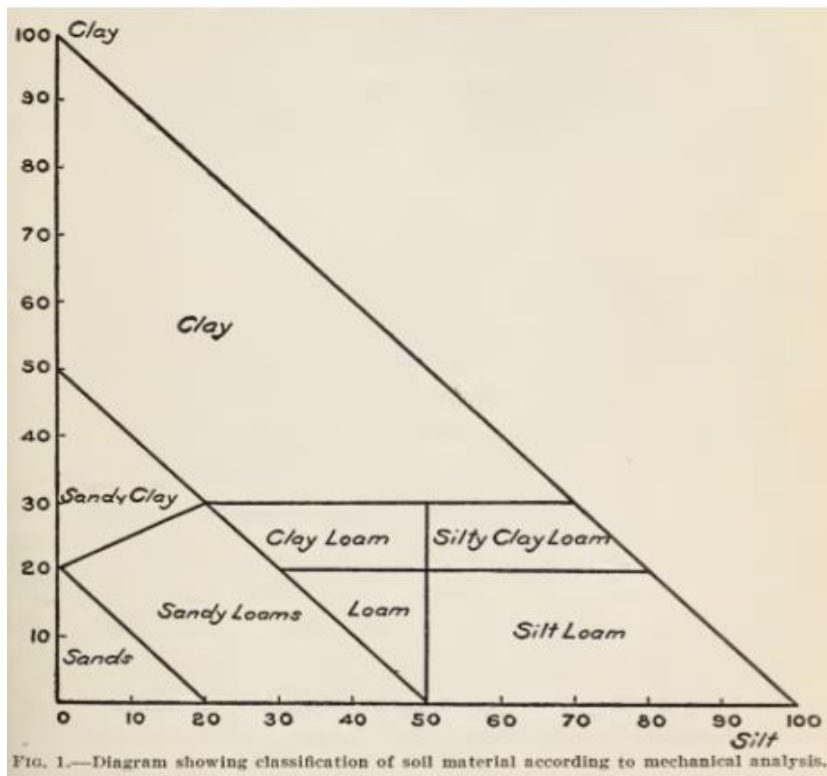
- [32] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G et al., (2001), DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods, *Appl Environ Microbiol* 67:2354–2359
- [33] Li Y., Dick W. A, Tuovinen O. h., 2004, Fluorescence microscopy for a visualization of soil microorganisms – a review, *Biol Fertil Soils* (2004) 39:301–311, DOI 10.1007/s00374-004-0722-x
- [34] Janzen H. H., 2004, Carbon cycling in earth systems – a soil science perspective, Elsevier B. V. doi:10.1016/j.agee.2004.01.040
- [35] Luo Z., Feng W., Luo Y., Baldock J., Wang E., Soil organic carbon dynamics jointly controlled by climate, carbon inputs, soil properties and soil carbon fractions, *Glob Change Biol.* 2017;23:4430–4439. <https://doi.org/10.1111/gcb.13767>
- [36] Κοτρωνάκης Ι. Μ., 2018, Ο ρόλος της οργανικής ουσίας στη δομή και στην ποιότητα του εδάφους, Διδακτορική Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης
- [37] Stockmann U., Adams M.A., Crawford J.W., Field D. J., Henakaarchchi N., Jenkins M., Minasny B., McBratney A.B., Vivien de Remy de Courcelles, Singh K., Wheeler I., Abbott L., Angers A., Baldock J., Bird M., Brookes P.C., Chenu C., Jastrow J.D., Lal R., Lehmann J., O'Donnell A.G., Parton W.J., Whitehead D., Zimmermann M., 2013, The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon., Elsevier, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 164(2013) 80-90
- [38] Patil A & Lamnganbi M., 2018, Impact of climate change on soil health: a review, *International Journal of Chemical Studies* 2018; 6(3): 2399-2404
- [39] Singh B. P, Cowie A. L., Chan K.Y. (editors), 2011, *Soil health and climate change*, Springer, *Soil Biology*, Volume 29
- [40] Jelinski N., 2014, The historical development of the USDA textural triangle, University of Minnesota, Retrieved from <http://umnsoilsteam.blogspot.com/2014/09/the-historical-development-of-usda.html>
- [41] Castilla N., 2013, *Greenhouse technology and management*, Cabi
- [42] Yu X., Zhou W., Wang Y., Cheng P., Hou Y., Xiong X., Du H., Yang L., Wang Y., 2020, Effects of land use and cultivation time on soil organic and inorganic carbon storage in deep soils, *J. Geogr. Sci.* 2020, 30(6): 921-934, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11442-020-1762-3>
- [43] Gong H., Du Q., Xie S., Hu W., Akram M. A., Hou Q., Dong L., Sun Y., Deng Y., Ran J., Deng J., 2021, Soil microbial DNA is a powerful indicator for estimating soil microbial biomass C and N across arid and semi-arid regions in northern China, Elsevier, *Applied Soil Ecology* 160 (2021) 103869
- [44] Αποστολάκης Α., 2015, Κατανομή μάζας, χημικές και βιοχημικές ιδιότητες συσσωματωμάτων σε χρονοσειρά εδαφών, Πολυτεχνείο Κρήτης, Διπλωματική Εργασία

[45] V.L. Bailey, A.D. Peacock, J.L. Smith, H. Bolton Jr., 2002, Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation – extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis, *Soil Biology & Biochemistry* 34 (1385-1389)

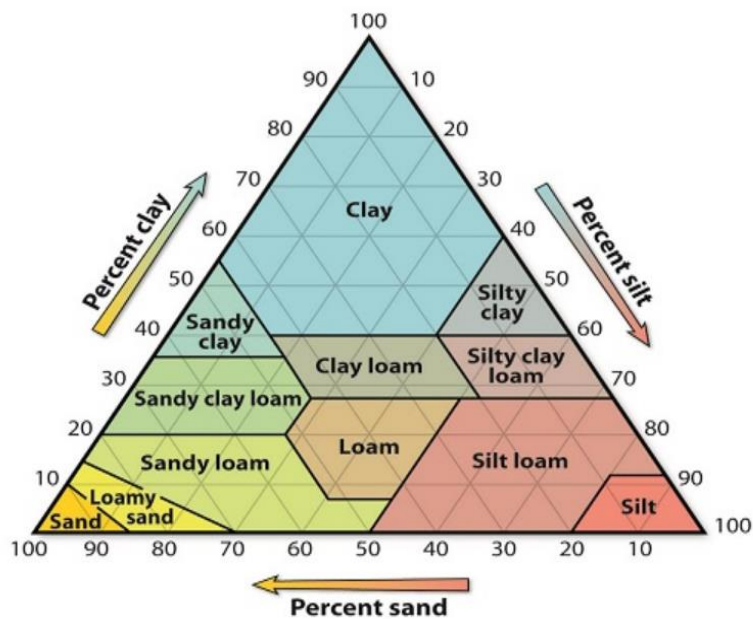
[46] (2015), Soil pH and nutrient availability, Laqua Horiba, Retriever from <https://www.horiba.com/int/water-quality/applications/agriculture-crop-science/soil-ph-and-nutrient-availability/>

Παραρτήματα

Παράρτημα εικόνων

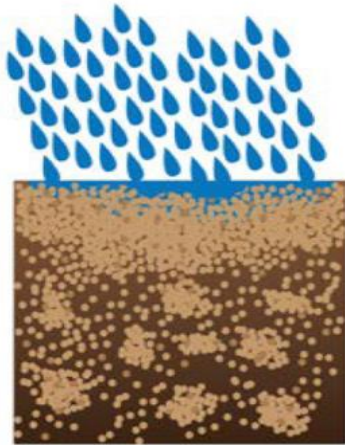


Εικόνα 12: Τρίγωνο εδαφικής υφής του καθηγητή Milton Whitney, 1911 (Πηγή: Jelinski Nic)

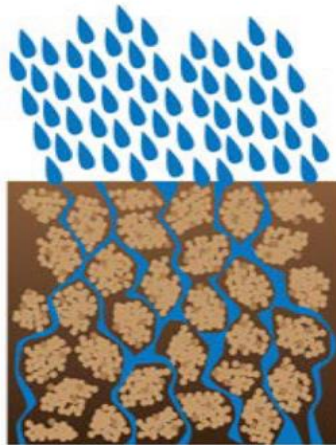


Εικόνα 13: Εικόνα 2: Το ισόπλευρο υφικό τρίγωνο που χρησιμοποιείται σήμερα για τον υπολογισμό της υφής του εδάφους., USDA, 1951 (Πηγή εικόνας: <https://www.soils4teachers.org/physical-properties/>)

COMPACTED SOIL



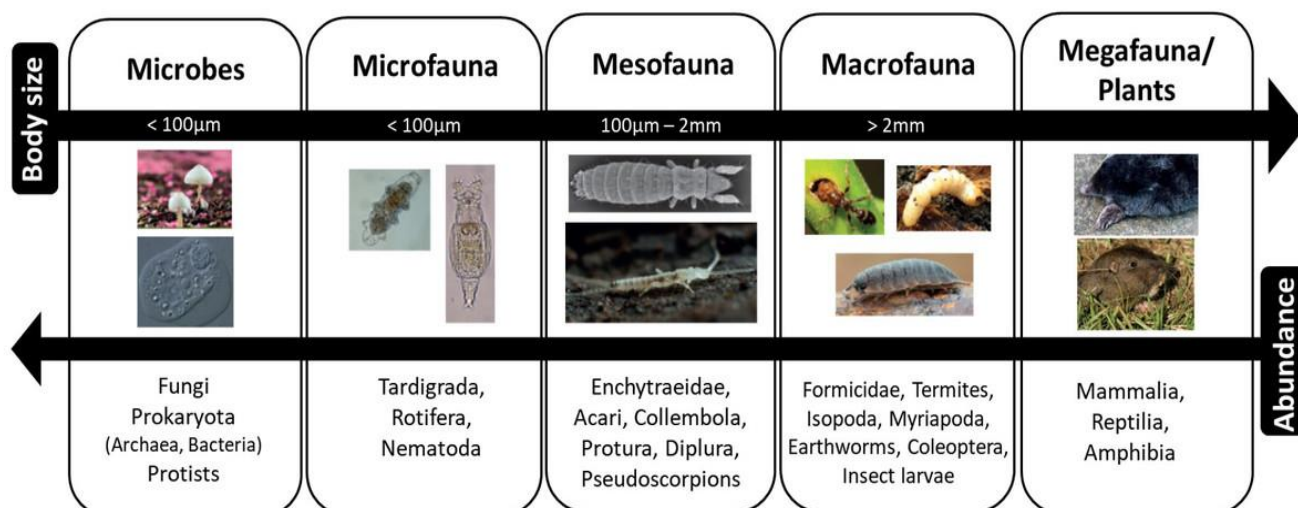
STRUCTURED SOIL



Εικόνα 14: Παρουσίαση της διαφοράς μεταξύ συμπιεσμένου (αριστερά) και δομημένου χώματος (δεξιά). Όπως παρουσιάζει η εικόνα, στο δομημένο έδαφος το νερό και ο αέρας κυκλοφορούν κανονικά σε αντίθεση με το συμπιεσμένο. (Πηγή: urthagriculture.com)



Εικόνα 15: Χρωματικές διαφορές εδαφικών δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές. (Πηγή: Geologyin.com)



Εικόνα 17: Ταξινόμηση μεγέθους των εδαφικών οργανισμών (Πηγή: PeerJ [13])



Εικόνα 16: Εδαφικά βακτήρια (Πηγή: Michael T. Holmes, Oregon State University, Corvallis)



Εικόνα 18: Θερμοκήπιο μεσογειακού τύπου (Πηγή: Castilla N., "Greenhouse technology and management")



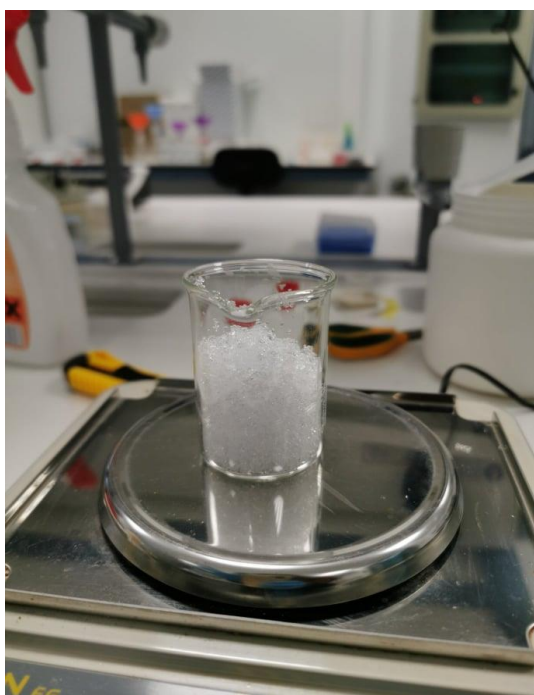
Εικόνα 20: Διάταξη για τον υποκαπνισμό των δειγμάτων



Εικόνα 19 : Πειραματική διάταξη κατά την διάρκεια υποκάπνισης δειγμάτων



Εικόνα 22: Πειραματική διάταξη για απευθείας εκχύλιση δειγμάτων



Εικόνα 21: Ζύγισμα θειικού καλίου για τη παρασκευή του αντιδρώντος που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των δειγμάτων

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας 10: Χρονολογία δημιουργίας θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του κατά την επεξεργασία και πειραματική διαδικασία των δειγμάτων.

Δείγμα	Χρονολογία	Έτη Λειτουργίας
A	2020	1
B	2016	5
Γ	2007	14
Δ	1993	28
E	1985	36

Πίνακας 11: Μέσες τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης στους 30 °C

Δείγμα	TOC [g/ kg soil]	Τυπικό σφάλμα
A [F]	3,41	0,423
A [NF]	2,95	0,066
B [F]	5,88	0,277
B [NF]	3,79	0,837
Γ [F]	-	-
Γ [NF]	-	-
Δ [F]	1,87	0,376
Δ [NF]	1,69	0,374
E [F]	2,41	0,143
E [NF]	2,25	1,098

Πίνακας 12: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 40°C

Δείγμα	TOC [g /kg soil]	Τυπικό σφάλμα
A [F]	3,21	0,725
A [NF]	2,89	0,434
B [F]	4,98	0,422
B [NF]	3,19	0,887
Γ [F]	2,64	0,181
Γ [NF]	1,62	0,773
Δ [F]	1,83	0,183
Δ [NF]	1,81	0,341
E [F]	3,50	0,142
E [NF]	3,12	1,130

Πίνακας 13: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανίχνευσης βιομάζας μέσω απομόνωσης DNA

Δείγματα	Συγκέντρωση βιομάζας [g/ g εδάφους] σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης		
	4 °C	20 °C	40 °C

A	65,07	46,47	54,87
B	198,80	124,87	163,73
Γ	235,80	175,13	125,47
Δ	135,93	186,27	203,53
E	67,73	113,87	131,20

Πίνακας 14: Αποτελέσματα TOC και TN ξηρής ανάλυσης

Δείγμα	TOC [g/kg], 20°C	TN [g/kg]
A	3,62	0,36
B	11,59	2,13
Γ	8,21	0,59
Δ	11,45	1,09
E	7,76	0,49

Πίνακας 15: Χρονολογία κατασκευής θερμοκηπίου και έτη λειτουργίας του

Δείγμα	Χρονολογία	Έτη Λειτουργίας
Z	2017	5
H	2017	5
Θ	2013	9
I	2007	15
K	2003	19

Πίνακας 16: Τιμές TOC με θερμοκρασία επώασης 20 °C

Δείγμα	TOC [g/ kg]	Τυπικό σφάλμα
Z [F]	27,55	0,668
Z [NF]	24,61	0,145
H [F]	42,40	1,784
H [NF]	38,93	2,356
Θ [F]	8,57	0,499
Θ [NF]	7,56	0,266
I [F]	3,32	0,171
I [NF]	2,46	0,342
K [F]	12,74	1,669
K [NF]	12,24	1,511

Πίνακας 17: Μέσες τιμές δεικτών αξιολόγησης της εδαφικής βιοποικιλότητας των βιολογικών θερμοκηπίων και η τυπική τους απόκλιση

Δείγμα	Δείκτες αξιολόγησης	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση
--------	---------------------	-----------	-----------------

	εδαφικής βιοποικιλότητας		
Z	Chao1	2138,5	287,746
	Shannon	6,81769	0,187
	PD [%]	2,19	20,287
H	Chao1	2176	113,373
	Shannon	6,87686	0,130
	PD [%]	2,14	8,780
Θ	Chao1	2123,6	297,333
	Shannon	6,70209	0,364
	PD [%]	2,17	217,600
I	Chao1	1989,8	409,840
	Shannon	6,38076	0,602
	PD [%]	2,10	30,892
K	Chao1	1961,8	179,911
	Shannon	6,63616	0,124
	PD [%]	2,10	15,047

Πίνακας 18: Παρουσία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των εδαφικών δειγμάτων

Δείγμα	Τύπος καλλιέργειας	SOC [mg/kg]	TN [mg/kg]	Νιτρικά [mg/kg]	Αμμωνιακά [mg/kg]	pH	EC [dS/m]
Z	Αγγούρια	31,23	6,32	3788,15	74,50	7,1	8,53
		24,93	5,19	3155,94	44,29	7,0	6,99
		40,88	6,59	4039,06	45,62	6,5	8,955
H	Πιπεριές	33,64	7,09	6587,94	102,82	7,4	12,97
		52,73	6,82	3340,94	79,48	6,9	10,47
		46,60	5,89	2215,17	30,78	6,8	5,88
Θ	Αγγούρια	15,36	2,13	2364,94	48,83	5,1	6,89
		17,58	3,35	2247,08	52,33	7,6	5,57
		22,59	5,77	4349,96	67,83	6,7	4,64
I	Πιπεριές	12,31	1,80	1448,58	25,29	7,9	4,54
		9,56	1,73	710,64	12,83	7,8	4,47
		9,94	1,35	244,72	12,22	7,9	3,08
K	Ντομάτες	15,36	2,13	2364,94	48,83	7,8	5,69
		17,58	3,35	2247,08	52,33	7,8	6,71
		22,59	5,77	4349,96	67,83	7,8	9,18

Παράρτημα διαγραμμάτων

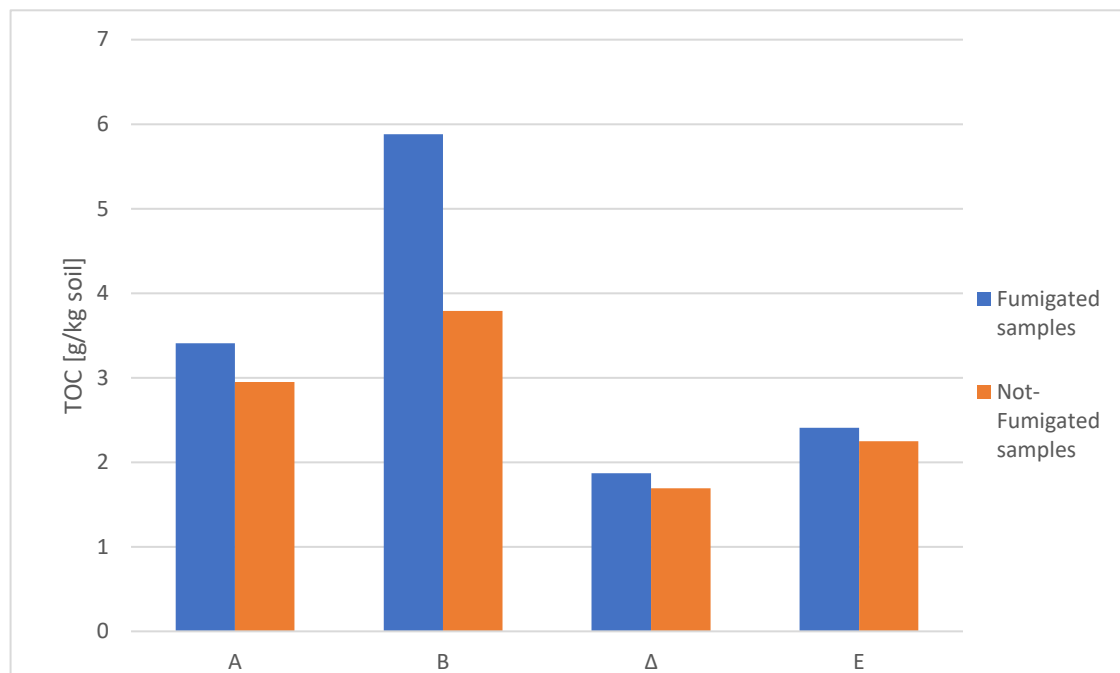


Figure 9: Παρουσίαση και σύγκριση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων (επωασμένα στους 30°C) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου (κόκκινο)

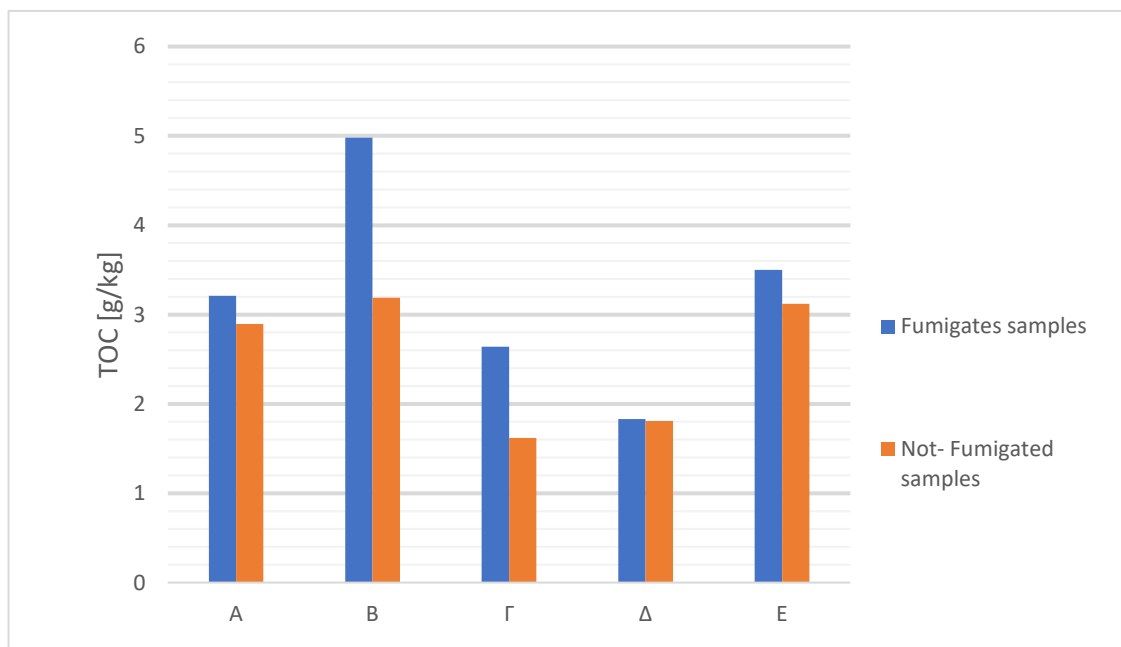


Figure 10: Παρουσίαση και σύγκριση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων (επωασμένα στους 30oC) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου

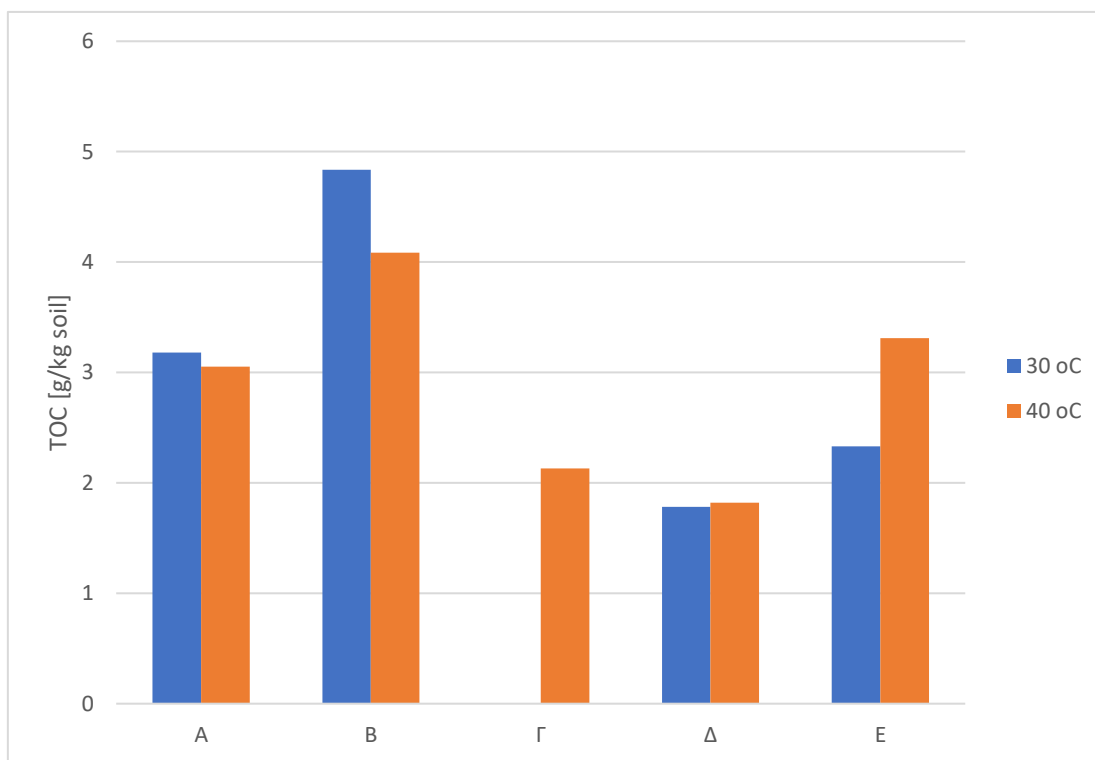


Figure 11: Σύγκριση των μέσων τιμών TOC για εδάφη που επώαστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 30 °C (μπλε χρώμα) και στους 40 °C (κόκκινο χρώμα).

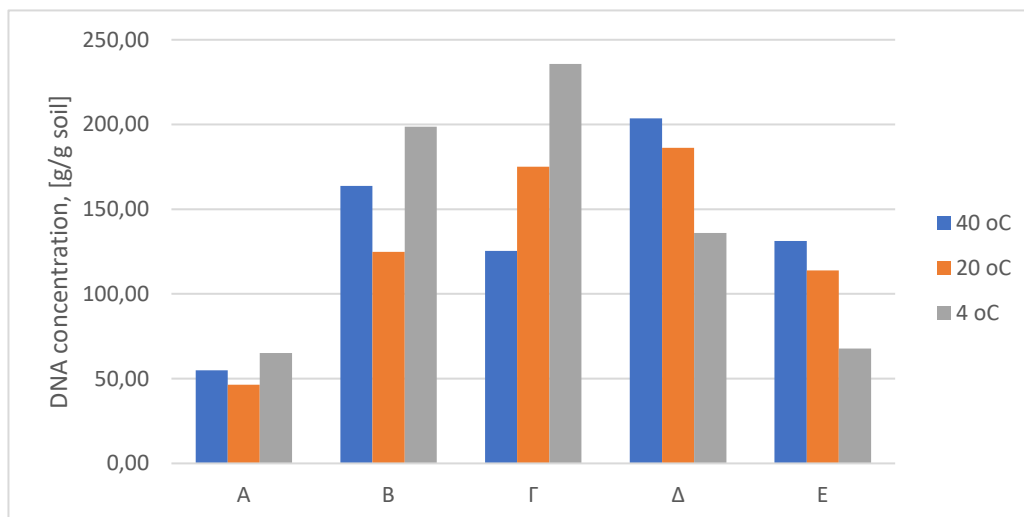


Figure 12: Παρουσίαση αποτελεσμάτων της ανάλυσης του απομονωμένου DNA για δείγματα που επώαστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 40 °C (μπλε χρώμα), 20 °C (πορτοκαλί χρώμα) και 4 °C (γκρι χρώμα)

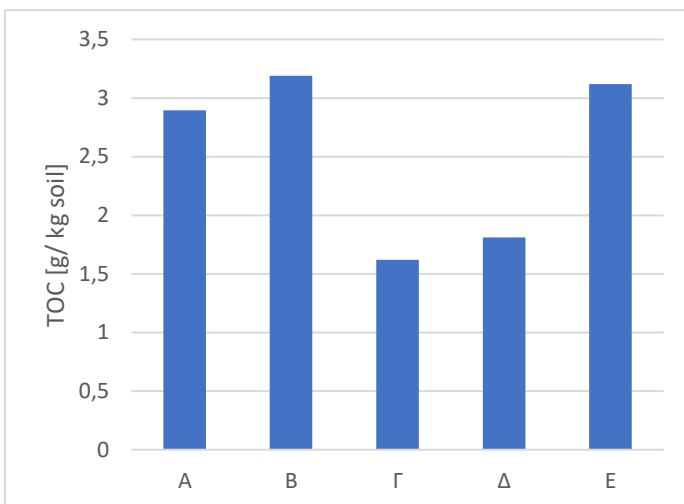
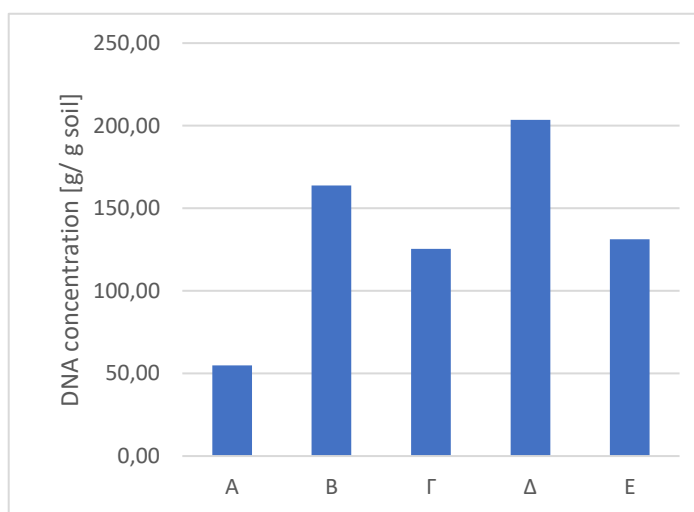


Figure 13: Σύγκριση του προφίλ των αποτελεσμάτων απομόνωσης DNA με τις αντίστοιχες τιμές TOC για δείγματα επωασμένα στους 40°C

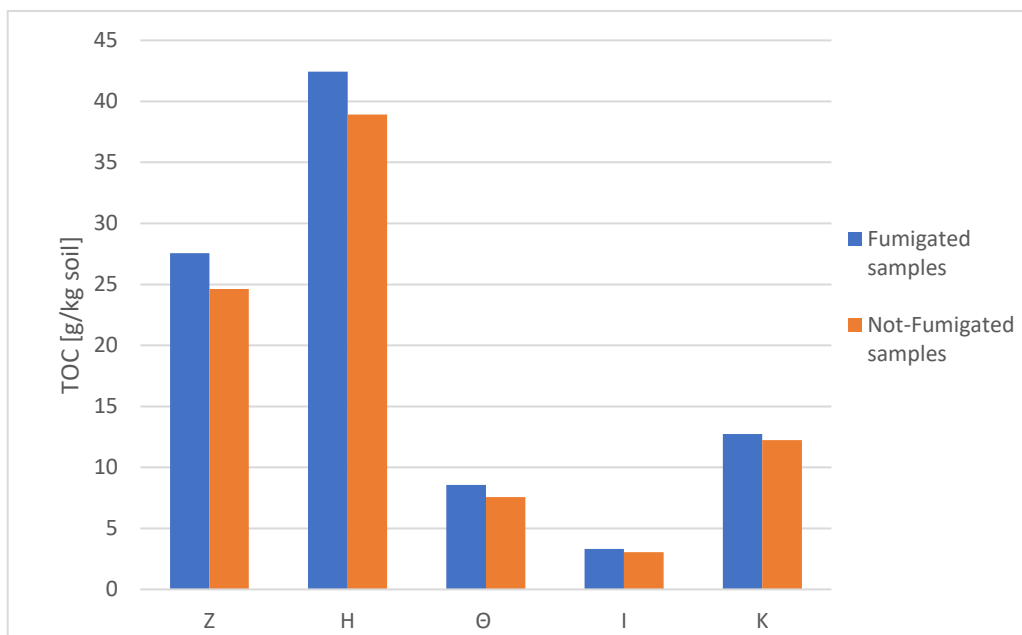


Figure 14: Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμού TOC δειγμάτων από βιολογικά θερμοκήπια (επωασμένα στους 30oC) τα οποία υποβλήθηκαν σε επώαση εξαέρωσης και απόσπαση μέσω χλωροφορμίου (μπλε) και δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε κατευθείαν εκχύλιση με τη χρήση θειικού καλίου (πορτοκαλί)

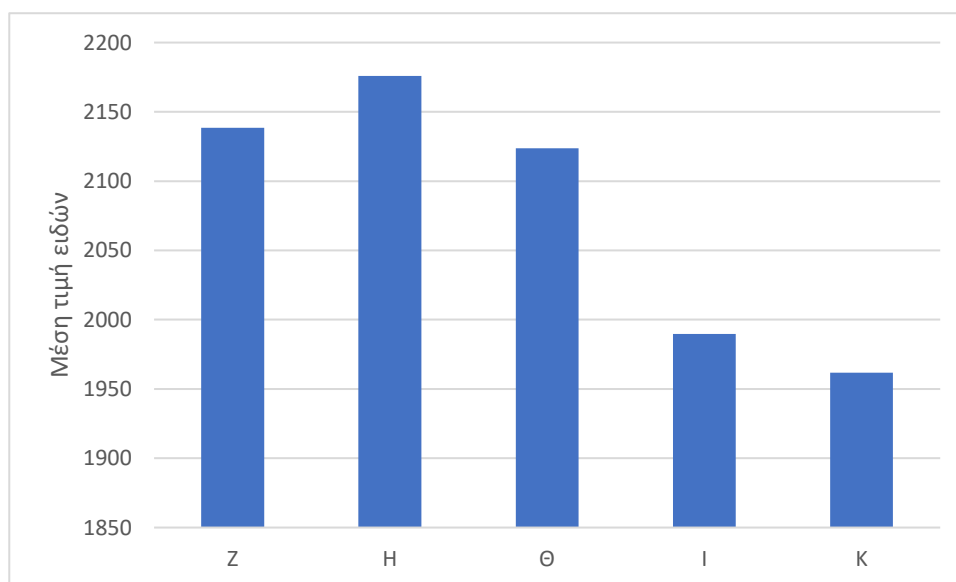


Figure 15: Μέσες τιμές των ειδών μικροοργανισμών που βρέθηκαν για κάθε θερμοκήπιο

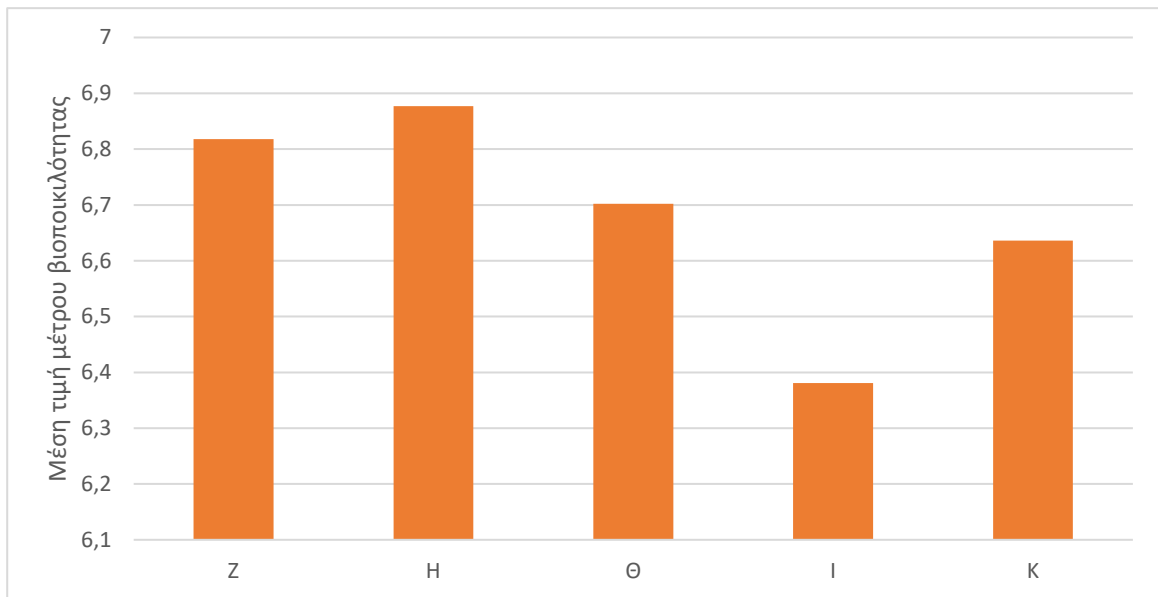


Figure 16: Μέσες τιμές του μέτρου βιοποικιλότητας με βάση τον δείκτη αξιολόγησης Shannon για τα υπό μελέτη βιολογικά θερμοκήπια