ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΦΑΛΑΣΣΑΡΝΑ

Ντούλιας Δημήτριος

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Δ. Βενιέρη (επιβλέπουσα)
Β. Γκέκας
Ν. Παρανυχιανάκης

ΧΑΝΙΑ
2009

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια των σπουδών μου στο Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η εκπόνησή της ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2008 και ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2009, υπό την επίβλεψη της Λέκτορος Βενιέρη Δανάης .

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της και κυρίως την κυρία Βενιέρη Δανάης για την συνεχή και πολύτιμη βοήθεια και συμπαράστασή, την εξαιρετική συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω το εργαστήριο Οικολογίας και Βιοποκιλότητας για την διάθεση του χώρου και του εξοπλισμού τους και συγκεκριμένα την κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα για την διάθεση του χρόνου της και την καθοδήγησή της.

Τέλος, η εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς την συμπαράσταση της οικογένειάς μου και των φίλων μου τους οποίους και ευχαριστώ θερμά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία είχε σαν σκοπό την μελέτη της επίδρασης των θερμοκηπιακών καλλιεργειών σε περιβαλλοντικά ευαίσθητες ή ενδιαφέρουσες περιοχές, τόσο σε επίπεδο βιοποικιλότητας όσο και σε επίπεδο βιώσιμης ανάπτυξης. Η περιοχή της Φαλάσαρνας που επιλέχτηκε ανήκει στο δίκτυο Natura-2000, αποτελεί πόλο έλξης πολλών επισκεπτών κυρίως κατα τους θερινούς μήνες και έχει παράλληλα αρκετά ανεπτυγμένη γεωργική δραστηριότητα.

Οι πειραματικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για τον έλεγχο της μικροβιακής βιοποικιλότητας επιλέχθησαν βάσει του ότι η ικανοποιητική παρουσία μικροοργανισμών σε ένα έδαφος αποτελεί εξ ορισμού δείκτη ποιότητας του εδάφους.

Το κριτήριο με βάση το οποίο επιλέχθησαν τα 6 σημεία που μελετήθηκαν ήταν να προκύψουν κάποια συγκριτικά αποτελέσματα ανάμεσα στο νότιο τμήμα της παραλίας όπου είναι έντονη η παρουσία θερμοκηπίων και στο βόρειο τμήμα που χρησιμοποιείται κυρίως για αναψυχή.

Τα δείγματα από κάθε μια από τις δύο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν ελέγθηκαν ως προς τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης, την ύπαρξη του ενζύμου της δεϋδρογονάσης και την ποικιλότητα των μυκήτων και των βακτηρίων σε βιώσιμες ετεροτροφικές καλλιέργειες.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων τα εδάφη που βρίσκονται πλησίον θερμοκηπιακών καλλιεργειών παρουσιάζουν αρκετά μειωμένη μικροβιακή βιοποικιλότητα και υψηλά επίπεδα ευτροφισμού σε σύγκριση με εκείνα στα οποία ανήκουν στην μη ανεπτυγμένη γεωργικά περιοχή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Σκοπός της Εργασίας.....1

1.2 Ορισμός της Βιοποικιλότητας 2

1.3 Τρόποι (Δείκτες) εκτίμησης της Βιοποικιλότητας 7

1.4 Η Μικροβιακή Ποικιλότητα ως Δείκτης Ποιότητας Εδαφών..9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Περιγραφή της περιοχής των Φαλασσάρνων

2.1 Γεωγραφική Τοποθέτηση και Γενικά Χαρακτηριστικά.....11

2.2 Μορφολογία.....11

2.3 Θεσμικές Ρυθμίσεις.....12

2.4 Υδρογεωλογικές Συνθήκες.....12

2.5 Κλιματολογικές Συνθήκες.....14

2.6 Χρήσεις Γης και Κύριες Δραστηριότητες.....15

2.7 Κύριες Φορτίσεις.....16

2.8 Βλάστηση, Χλωρίδα και Πανίδα.....22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Πειραματικό τμήμα: Υλικά & μέθοδοι

3.1 Δειγματοληψία.....25

3.2 Μέτρηση Χλωροφύλλης.....29

3.3 Δράση της Δεϋδρογονάσης στο Χώμα.....32

3.4 Μέθοδοι Καλλιέργειας για την Μέτρηση Πληθυσμού Μικροοργανισμών.....35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα Χλωροφύλλης.....42

4.2 Αποτελέσματα Δεϋδρογονάσης.....43

4.3 Αποτελέσματα Καλλιεργειών.....44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα……52

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Σκοπός της Εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη αφενός της ποιότητας των εδαφών των θερμοκηπιακών καλλιεργειών με γνώμονα την μικροβιακή βιοποικιλότητα και αφετέρου η επίδραση της γεωργικής δραστηριότητας που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια στην περιοχή των Φαλασάρνων και με περισσότερες από 260 μονάδες θερμοκηπίων καλύπτει περίπου 3000 στρέμματα το 40% δηλαδή του κάμπου [5].

Η μελέτη που έγινε σε ύδατα και εδάφη της περιοχής περιλαμβάνει αναλύσεις της τροφικής κατάστασης των υδάτων μέσω της συγκεντρώσεως της χλωροφύλλης , της μεταβολικής ικανότητας των μικροοργανισμών των εδαφών μέσω της συγκεντρώσεως του ενζύμου της δεϋδρογονάσης και της μυκητιακής και βακτηριακής ποικιλότητας με την μέθοδο των βιώσιμων ετεροτροφικών καλλιεργειών.

Οι επισκέψεις που πραγματοποιήθηκαν για την συλλογή των δειγμάτων, μας προμήθευσαν και με το φωτογραφικό υλικό που παρατίθεται και παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον όσον αφορά την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων σε περιοχή που ανήκει στον κατάλογο του Natura-2000.

1.2 Ορισμός της Βιοποικιλότητας

Μετά τη συνάντηση και την υπογραφή της συνθήκης του "Ρίο" το 1992, ο όρος "βιοποικιλότητα" άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως. Ο όρος ήταν γνωστός στην οικολογία πολύ πιο πριν από τη συνάντηση του Ρίο και χρησιμοποιούταν για να εκφράσει την ποικιλία των μορφών ζωής σε έναν συγκεκριμένο χώρο. Παρά όμως την απλότητα και σαφήνεια του όρου, το περιεχόμενό του είναι μια από τις πλέον αφηρημένες και αμφιλεγόμενες έννοιες της οικολογίας. Ο λόγος είναι ότι δεν υπάρχει μία, αλλά πολλές βιοποικιλότητες, σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης της ζωής και ότι δεν είναι ενιαίος ο τρόπος έκφρασης ή καλύτερα εκτίμησής της.

Πρακτικά, μπορούν να διακριθούν τέσσερα διαφορετικά επίπεδα βιοποικιλότητας, το καθένα από τα οποία έχει διαφορετική σημασία αλλά στην πράξη, αποτελεί κομμάτι αναπόσπαστο ενός ενιαίου συνόλου.

1. Το πρώτο επίπεδο είναι εκείνο της "γενετικής βιοποικιλότητας". Η γενετική βιοποικιλότητα εκφράζει το εύρος των κληρονομικών καταβολών ενός συγκεκριμένου είδους. Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος αυτό, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα επιβίωσης του είδους απέναντι σε εξωτερικές πιέσεις (stress) όπως επιδημίες, κλιματικές αντιξοότητες κ.λπ. Είναι αυτονόητο ότι τα φυσικά είδη έχουν πολύ μεγαλύτερο εύρος κληρονομικών καταβολών και συνεπώς πολύ μεγαλύτερη αντοχή και ικανότητα επιβίωσης από τα "τεχνητά" ή γενετικά βελτιωμένα είδη. Στην Ελλάδα, εξαιτίας της γεωγραφικής της θέσης, της ποικιλίας των κλιματικών της τύπων, της ορεογραφικής της διαμόρφωσης και της ιστορίας της, τα είδη φυτών και ιδιαίτερα δένδρων, παρουσιάζουν πολύ μεγάλη γενετική βιοποικιλότητα, η οποία όμως δεν έχει ερευνηθεί παρά ελάχιστα. Κατά τη διάρκεια των παγετώνων, πολλά είδη της Κ. και Β. Ευρώπης μετανάστευσαν νοτιότερα και έφθασαν μέχρι την Ελλάδα, δημιουργώντας είτε ετερογενείς πληθυσμούς ενός είδους, είτε υβρίδια με τα προϋπάρχοντα είδη, διευρύνοντας έτσι το εύρος των κληρονομικών τους καταβολών. Είναι γνωστά τα υβρίδια της ελάτης μεταξύ της προϋπάρχουσας κεφαλληνιακής και της λευκής ελάτης, η γνωστή υβριδογενής ελάτη καθώς και η υβριδογενής μοισιακή οξιά, υβρίδιο μεταξύ της ανατολικής και δασικής οξιάς. Στους πληθυσμούς των υβριδίων αυτών συναντά κανείς όλες τις αποκλίσεις και τις ενδιάμεσες μορφές από το ένα ως το άλλο είδος, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και το τοπικό κλίμα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της ετερογένειας και συνεπώς της μεγάλης γενετικής βιοποικιλότητας, προέρχεται από την ανάλυση των πληθυσμών της δασικής πεύκης των Πιερίων και της

ερυθρελάτης της Ροδόπης. Τα είδη αυτά έφθασαν στην Ελλάδα κατά την περίοδο των παγετώνων από διαφορετικές περιοχές, τα χαρακτηριστικά των οποίων φέρουν μέχρι σήμερα. Έτσι για παράδειγμα στη δασική πεύκη και σε μια μικρή σχετικά έκταση, απαντούν όλες οι μορφές, από τις στενόκομες, λεπτόκλαδες αλπικές μέχρι τις ευρύκομες, χονδρόκλαδες των πεδιάδων της Πολωνίας. Το ίδιο ισχύει και για την ερυθρελάτη. Μορφές τις οποίες συναντά κανείς στην Κ Ευρώπη σε διάφορες περιοχές, τις απαντά και στην Ελλάδα, σε μια σχετικά μικρή έκταση. Η ίδια όμως μεγάλη γενετική βιοποικιλότητα των παραπάνω ειδών (ελάτης, οξυάς, δασικής πεύκης και ερυθρελάτης) συναντάται σε όλα σχεδόν τα δασοπονικά είδη της χώρας. Το ίδιο πιθανόν συμβαίνει και με τα άλλα είδη φυτών και ζώων. Το γεγονός αυτό, μαζί με το μεγάλο πλεονέκτημα διατήρησης της φυσικότητας των οικοσυστημάτων της Ελλάδας, σε ό,τι αφορά την ποιοτική σύνθεσή τους και παρά την έντονη υποβάθμισή τους, προσδίδει μια πολύ μεγάλη σημασία στη χώρα ως τράπεζα γονιδίων και γενικότερα γενετικού υλικού, το οποίο πρέπει να ερευνηθεί και διατηρηθεί.

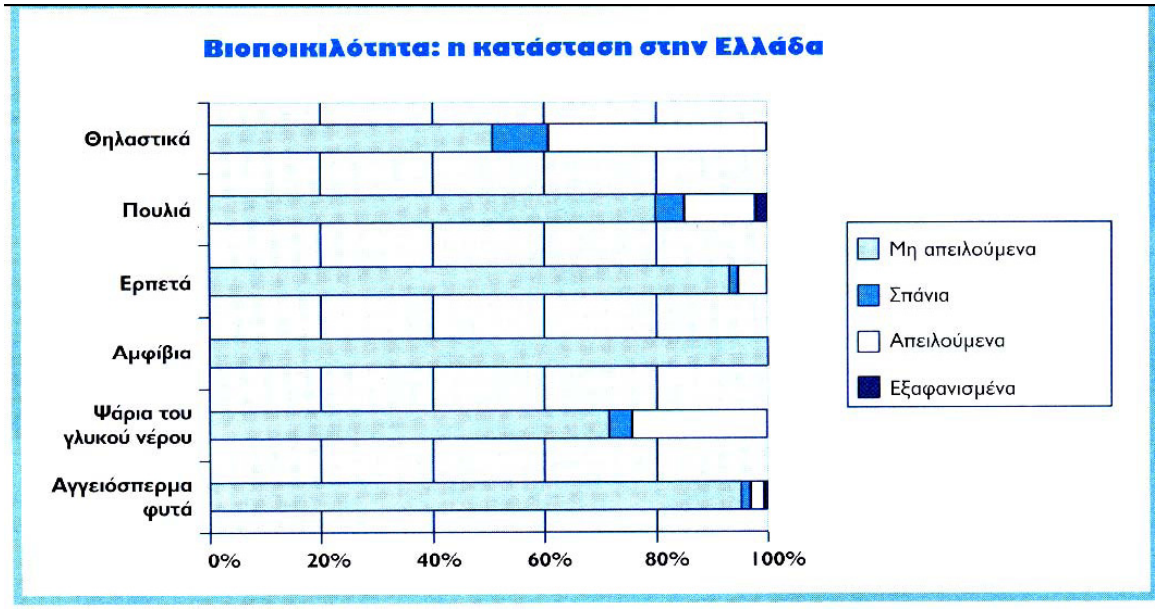
2. Το δεύτερο επίπεδο βιοποικιλότητας είναι αυτό της βιοποικιλότητας των ειδών φυτών και ζώων. Η βιοποικιλότητα αυτή εκφράζεται με τον αριθμό (πλήθος) των ειδών φυτών και ζώων που απαντούν σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Για πολλούς ερευνητές όμως αυτό δεν αρκεί. Ο αριθμός των ειδών δεν εκφράζει πάντοτε τη βιοποικιλότητα διότι υπεισέρχονται παράμετροι όπως ο πληθυσμός των ειδών, το μέγεθος των ατόμων, η βιομάζα τους και η κυριαρχία ορισμένων ειδών. Άλλοι δέχονται ως έκφραση της βιοποικιλότητας τον αριθμό των λειτουργιών που ασκούν τα είδη σε ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα δηλαδή τον αριθμό των οικολογικών φωλεών. Επειδή όμως η εκτίμηση όλων αυτών των παραμέτρων είναι δύσκολη, θεωρείται, προς το παρόν, ικανοποιητική η έκφραση της βιοποικιλότητας των ειδών με βάση τον αριθμό των ειδών φυτών και ζώων μιας συγκεκριμένης περιοχής ή ενός συγκεκριμένου οικοσυστήματος. Η σημασία της βιοποικιλότητας των ειδών είναι προφανής για την οικολογική ισορροπία, σταθερότητα και λειτουργία των αναδραστικών μηχανισμών ενός οικοσυστήματος. Όσο περισσότερα είδη μετέχουν στη σύνθεση ενός οικοσυστήματος τόσο μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάζει το οικοσύστημα, τόσο πυκνότερο δίκτυο τροφικών αλυσίδων και βιοσυστημάτων δημιουργείται, τόσο πιο απρόσκοπτες είναι οι ροές βιομάζας και ενέργειας καθώς και η ανακύκλωση θρεπτικών στοιχείων και τόσο καλύτερα και αποτελεσματικότερα λειτουργούν οι μηχανισμοί ανάδρασης. Πέρα από

αυτό, πολλά είδη στην οντογενετική τους εξέλιξη έχουν συνδεθεί στενά μεταξύ τους και η ύπαρξη του ενός εξαρτάται από την ύπαρξη του άλλου. Για το λόγο αυτό, η εξαφάνιση ενός είδους μπορεί να έχει συνέπειες που δεν μπορούν να προβλεφτούν. Η Ελλάδα, για τους λόγους που ήδη αναπτύχθηκαν, παρουσιάζει πολύ μεγάλη βιοποικιλότητα ειδών φυτών και ζώων. Αναλογικά με την έκτασή της εμφανίζει τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα από όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η βιοποικιλότητα αυτή, παρ' όλο ότι έχει μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλη βαθμίδα, αφήνει ακόμη πολλά περιθώρια έρευνας, κυρίως σε ό,τι αφορά στη γεωγραφική κατανομή των ειδών. Η σημασία της διατήρησης της βιοποικιλότητας των ειδών αναφέρθηκε ήδη και είναι πρόδηλο ότι δεν μπορεί να ασκηθεί αειφορική διαχείριση χωρίς την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών.

3. Το τρίτο επίπεδο βιοποικιλότητας, γνωστό ως βιοποικιλότητα οικοσυστημάτων ή φυτοκοινωνιών (habitats), εκφράζεται με τον αριθμό (πλήθος) των συνδυασμών ειδών φυτών και ζώων (οικοσυστημάτων) που συναντώνται σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Ο αριθμός των οικοσυστημάτων και ο τρόπος κατανομής τους στο χώρο, δηλαδή το μωσαϊκό των τύπων οικοσυστημάτων, χαρακτηρίζει και δίνει τη σφραγίδα του στο τοπίο της περιοχής. Η προστασία των οικοσυστημάτων εξασφαλίζει όχι μόνο την προστασία των ειδών που τα συνθέτουν αλλά και τη διατήρηση της φυσιογνωμίας των τοπίων. Η Ελλάδα, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού συνδυασμών ειδών φυτών και ζώων, εμφανίζει πολύ μεγάλη βιοποικιλότητα φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων (habitats). Δυστυχώς, μέχρι σήμερα, η μεγάλη αυτή βιοποικιλότητα των φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στη χώρα, παρά την προφανή σημασία της.

4. Το τέταρτο επίπεδο βιοποικιλότητας είναι εκείνο της βιοποικιλότητας των τοπίων, το οποίο εκφράζεται με τον αριθμό ή το πλήθος των τύπων τοπίων που εμφανίζονται σε μια περιοχή ή σε μια χώρα. Στη σύνθεση ενός τοπίου δε μετέχουν μόνο φυσικά οικοσυστήματα αλλά και τεχνητά, όπως οι διάφορες γεωργικές καλλιέργειες αλλά και τύποι οικισμών. Ο αριθμός των τύπων οικοσυστημάτων, φυσικών και τεχνητών, η κατανομή τους στον χώρο και η αναλογία συμμετοχής τους προσδιορίζουν το χαρακτήρα και τη φυσιογνωμία του τοπίου. Εκτός από την αρχιτεκτονική τοπίου, επιστήμη που έχει ήδη αναπτυχθεί και διδάσκεται σε πολλές σχολές, αναπτύχθηκε τελευταία και η επιστήμη της οικολογίας τοπίου, η οποία ασχολείται με τις αλληλεπιδράσεις και αλληλεξαρτήσεις μεταξύ των

οικοσυστημάτων που συνθέτουν ένα τοπίο και ιδιαίτερα μεταξύ των φυσικών και τεχνητών οικοσυστημάτων.



Εικόνα 1: Βιοποικιλότητα στην Ελλάδα

Η Ελλάδα εμφανίζει επίσης πάρα πολύ μεγάλη βιοποικιλότητα τοπίων, για τους ίδιους λόγους που εμφανίζει μεγάλη γενετική βιοποικιλότητα, βιοποικιλότητα ειδών και οικοσυστημάτων. Στη χώρα απαντούν τοπία από τα ημιερημικά της Α Κρήτης μέχρι τα σκανδιναβικά (βόρεια) της Ροδόπης και τα αλπικά του Ολύμπου, του Σμόλικα, της Τύμφης, του Βόρα και άλλων οροσειρών της Β Ελλάδας. Σε μια σύντομη σχετικά διαδρομή από την Αμφίπολη μέχρι την κεντρική Ροδόπη, συναντά κανείς όλους τους τύπους τοπίων από τον ευμεσογειακό με την ελιά, την αριά, την κουμαριά κ.λπ., μέχρι τα βόρεια τοπία των ψυχρόβιων κωνοφόρων δασών της ερυθρελάτης, της δασικής πεύκης και της σημύδας.

Συνοψίζοντας, είναι εμφανές ότι η Ελλάδα διαθέτει μεγάλη βιοποικιλότητα σε όλα τα επίπεδά της (γενετική βιοποικιλότητα, βιοποικιλότητα ειδών, βιοποικιλότητα φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων και βιοποικιλότητα τοπίων). Παρά τη διάκριση της βιοποικιλότητας σε διάφορα επίπεδα, η προστασία της πρέπει να αντιμετωπίζεται ως κάτι ενιαίο. Η προστασία κάθε επιπέδου εξαρτάται από την προστασία του προηγούμενου ή επόμενου επιπέδου. Η προστασία και διατήρηση των τοπίων εξαρτάται από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων που τα συνθέτουν, η σταθερότητα των οικοσυστημάτων εξαρτάται από την

προστασία και διατήρηση των ειδών που συμμετέχουν στη δομή τους δηλαδή από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών και η προστασία και επιβίωση των ειδών, εξαρτάται από τη διατήρηση και προστασία της γενετικής βιοποικιλότητάς τους δηλαδή τη διατήρηση των κληρονομικών μεταβολών τους σε όλο το εύρος τους.

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι η προστασία της βιοποικιλότητας σε όλα της τα επίπεδα, για την οποία τόσα πολλά λέγονται και τόσα λίγα γίνονται, δεν επιβάλλεται για λόγους καθαρά ρομαντικούς, αλλά από την ανάγκη ορθολογικής και αειφορικής διαχείρισης των φυσικών πόρων, συνεπώς για την επιβίωση του ίδιου του ανθρώπου [1].

1.3 Τρόποι (Δείκτες) εκτίμησης της βιοποικιλότητας

Έχουν διατυπωθεί πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση του αντίκτυπου των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στο περιβάλλον και για την αξιολόγηση της απόδοσης προγραμμάτων. Άσχετα με το ποια προσέγγιση χρησιμοποιείται, υπάρχουν κάποιοι δείκτες που αποτελούν βασικά εργαλεία για τη βιοποικιλότητα και την αξιολόγηση των φυσικών πόρων. Δεν υπάρχει καμιά καθολική συμφωνία για την επιλογή δεικτών ή τις απαραίτητες ιδιότητες.

Κριτήρια επιλογής δεικτών

1. Γενικά κριτήρια:
• Να αντιπροσωπεύουν ένα ζήτημα που είναι σημαντικό στη βιώσιμη ανάπτυξη.
• Να είναι κατανοητοί σε ένα γενικό ακροατήριο.
• Να είναι ποσοτικά προσδιοριζόμενοι.
• Να βασίζονται σε διαθέσιμα στοιχεία.
• Να είναι εθνικά ή σχετικά με ένα ζήτημα εθνικής ανησυχίας.
• Να είναι εξελικτικοί στα διαφορετικά επίπεδα.

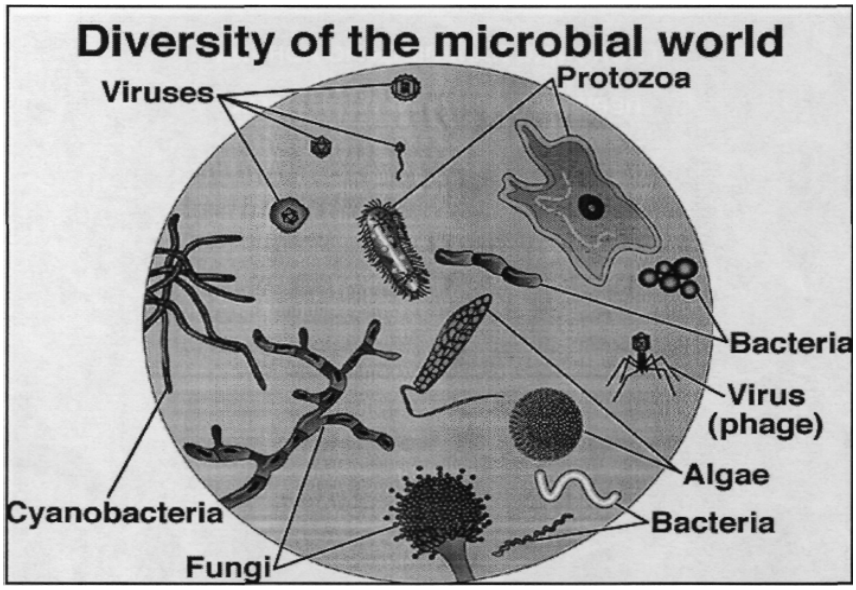
2. Ειδικά κριτήρια:
• Ικανότητα να απεικονίζουν τις αλλαγές στις σημαντικές χρηματοδοτήσεις
• Να αντιπροσωπεύουν ένα ζήτημα που θα μπορούσε να έχει σημαντικές δαπάνες ή κέρδη για τις τρέχουσες ή μελλοντικές γενεές
• Να αντιπροσωπεύουν ένα ζήτημα που θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί για μια χρονική περίοδο
• Να απεικονίζουν ένα ζήτημα που περιλαμβάνει το κατώτατο όριο πέρα από το οποίο οι μικρές αλλαγές θα μπορούσαν ενδεχομένως να οδηγήσουν στα αμετάκλητα αποτελέσματα
Άλλα επιθυμητά χαρακτηριστικά των δεικτών:
1. Να μπορούν να ποσοτικοποιήσουν και να απλοποιήσουν τις πληροφορίες κατά τέτοιο τρόπο ώστε η σημασία τους να είναι σαφής.
2. Να είναι σε θέση να ανιχνεύσουν τις αλλαγές στο χρόνο και στο χώρο.
3. Να έχουν επιστημονική αξιοπιστία.
4. Να είναι σε θέση να αντιπροσωπευθούν με διαφορετικούς τρόπους και να εξετασθούν από διαφορετικές πηγές.

5. να υπάρξει η δυνατότητα να διακριθούν οι φυσικές και προκαλούμενες από τον άνθρωπο αλλαγές και να είναι εύκολο να κατανοηθούν αναφορικά με τα προβλεπόμενα από τη σύμβαση για τη βιολογική ποικιλότητα
6. η καθολικότητα (εφαρμόσιμοι σε πολλές περιοχές, καταστάσεις και κλίμακες της μέτρησης)
7. φορητότητα (επανάληψη και δυνατότητα αναπαραγωγής)
8. ευαισθησία στην αλλαγή
9. λειτουργικά απλοί και ανέξοδοι
10. ήδη υπαρκτοί με ιστορικά στοιχεία
11. ευρείας διεθνούς χρήσης
12. να μπορούν να σταθμιστούν χρησιμοποιώντας τα διαφορετικά σχέδια
13. να μπορούν να αθροιστούν στα διαφορετικά επίπεδα για τους διαφορετικούς τύπους στοιχείων
14. να είναι κατάλληλοι για στατιστική επεξεργασία
15. να εξασφαλιστούν με τυποποιημένες μεθόδους και σε πρωτόκολλα, δηλαδή έτσι ώστε οι χρήστες να μπορούν να μετρήσουν και να κάνουν δίκαιες συγκρίσεις των τάσεων των δεικτών για διαφορετικές στιγμές, θέσεις, συστήματα ή κλίμακες [2].

1.4 Η Μικροβιακή Ποικιλότητα ως Δείκτης Ποιότητας Εδαφών

Τα μικρόβια (βακτήρια, αρχαία, μύκητες, ζύμες) βρίσκονται οπουδήποτε στον πλανήτη. Ένα γραμμάριο εδάφους περιέχει περισσότερα από 100.000.000 μικροβιακά κύτταρα, με 100 - 1000 διαφορετικά είδη ενώ το ανθρώπινο σώμα περιέχει περισσότερο από 1 δισ. μικροβιακά κύτταρα. Υπάρχουν περίπου 100.000 γνωστά 'είδη' ενώ η ποικιλότητα των ειδών εκτιμάται να είναι 10^6 έως 10^7. Οι μικροοργανισμοί συμμετέχουν σε όλες τις διαδικασίες (π.χ. ανακύκλωση στοιχείων) και παίζουν σημαντικό ρόλο στη Βιοτεχνολογία (π.χ. αντιβιοτικά, ζυμώσεις, ξενιστές έκφρασης, βιοαποκατάσταση περιβάλλοντος).

Η σπουδαιότητα της μελέτης της μικροβιακής ποικιλότητας έγκειται στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας καθώς και στην κατανόηση των σχέσεων ποικιλότητας-δομής-λειτουργίας. Καθώς η επίπτωση ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (π.χ. Μόλυνση, γεωργία, ανάπτυξη πόλεων) επηρεάζουν τη μικροβιακή ποικιλότητα η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν νέες λειτουργίες χρήσιμες στη βιομηχανία, βιοϊατρική και βιοαποκατάσταση περιβάλλοντος με χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροβίων (π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ένζυμα) ή την κατανόηση σχέσεων μεταξύ οργανισμών και περιβάλλοντος με σκοπό την καλύτερη διαχείριση τους σε περιβαλλοντικές μελέτες, γεωργία, αντιμετώπιση ασθενειών κ.λ.π. [6].



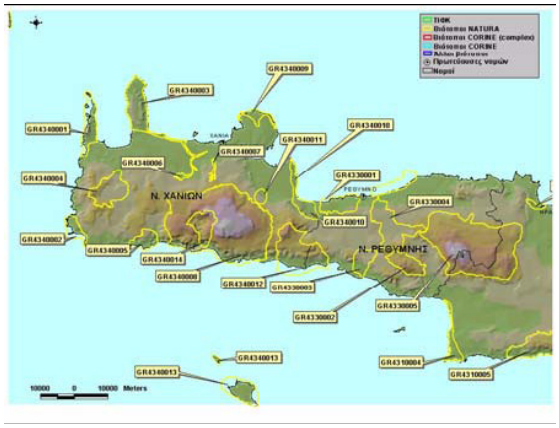
Εικόνα 2: Μικροβιακή ποικιλότητα

Για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί (π.χ. χρώση φθορισμού, μοριακή ανίχνευση, υβριδοποίηση κ.λ.π.) ανάλογα με το μελετώμενο αντικείμενο. Οι αφυδρογονάσες είναι ένζυμα που περιέχονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτά τα ένζυμα που έχουν μια εξαιρετικά ειδική δράση, παίρνουν μέρος σε πολλές αντιδράσεις που αφορούν μεταφορά ζεύγους ηλεκτρονίων. Σε καταβολικές αντιδράσεις όπως αντιδράσεις που αφορούν τροποποίηση συμπλόκων ή ενώσεων υψηλής ενέργειας σε απλούστερες ή χαμηλής ενέργειας ενώσεις, οι αφυδρογονάσες καταλύουν τη μεταφορά ζεύγους ηλεκτρονίων από κάποιο υπόστρωμα σε κάποια άλλη ένωση, χρησιμεύοντας έτσι σαν μεταφορέας ηλεκτρονίων. Για να κρατιέται η ισορροπία φορτίου, με τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται ακολουθούν δυο άτομα υδρογόνου. Καθώς οι αφυδρογονάσες παίρνουν μέρος και σε σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων αερόβιων οργανισμών, η ενέργεια αυτών των ενζύμων είναι επίσης και μια μέτρηση της αναπνοής και γενικότερα μεταβολικών δραστηριοτήτων. Παρόλα αυτά η καταλληλότητα της χρήσης αφυδρογονασών για τη μέτρηση μικροβιακής δραστηριότητας συναντά προβλήματα. Δεν πιστεύεται ότι οι αφυδρογονάσες είναι ενεργές στο έδαφος όσο τα εξωκυτταρικά ένζυμα. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη εκδοχή χρήσης των αφυδρογονασών είναι αυτή του Casida. Αυτή η χρήση αφορά κυρίως επωαζόμενο χώμα που ανακατεύετε με διάλυμα του ανταγωνιστικού αναστολέα του NAD^+, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) σε αεροστεγώς κλεισμένα δοχεία για την απομάκρυνση οξυγόνου, το οποίο σε διαδικασίες αναπνοής είναι ο τελικός υποδοχέας ηλεκτρονίων. Το χώμα πρέπει να είναι φρέσκο, καθώς έρευνες δείξανε ότι τα αποτελέσματα της δράσης αφυδρογονασών επηρεάζονται αρνητικά από την αποθήκευση, ακόμα και στους 4 ^oC. Ο αποκλεισμός του οξυγόνου ευνοεί τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο TTC, ανάγοντας την κίτρινη υδατοδιαλυτή ένωση στο αδιάλυτο κόκκινο dye triphenyl formazan (TPF). Σε εύφορα εδάφη, δεν χρειάζεται η προσθήκη θρεπτικών υλικών. Ένα από τα πλεονεκτήματα της δράσης των αφυδρογονασών σε σχέση με τη δράση άλλων ενζύμων είναι ότι δεν απαιτεί άλλα προσθετικά και δεν δείχνει προτίμηση σε κάποια ομάδα μικροοργανισμών. Με αυτή την ιδιότητα σχετίζεται επίσης η τοξικότητα του TCC. Παρόλα αυτά η προσθήκη κάποιου είδους οργανικών είναι απαραίτητη σε εδάφη με μικρή γονιμότητα, όπως χώματα της ερήμου. Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε ότι η μικροβιακή ποικιλότητα αποτελεί και δείκτη καλού επιπέδου αποικοδόμησης στο έδαφος και συνεπώς δείκτη ποιότητας του εδάφους [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Περιγραφή της περιοχής των Φαλασάρνων

2.1 Γεωγραφική Τοποθέτηση και Γενικά Χαρακτηριστικά

Τα Φαλάσαρνα βρίσκονται στη δυτική ακτή του νομού Χανίων, 25 Km δυτικά από το Καστέλλι Κισσάμου και απέχουν 58 Km από την πόλη των Χανίων. Η περιοχή διοικητικά υπάγεται στο Δήμο Κισσάμου (δημοτικό διαμέρισμα Πλατάνου).



Εικόνα 3: Οι περιοχές Natura της δυτικής Κρήτης (περιοχή NATURA με κωδικό A4340010) .

Ο Δήμος Κισάμου, στον οποίο υπάγονται διοικητικά τα Φαλάσαρνα .

2.2 Μορφολογία

Το τοπίο στην περιοχή είναι ιδιαίτερου φυσικού κάλους και παρουσιάζει έντονη πολυμορφία χαρακτηριστική του Κρητικού χώρου. Έτσι, η δυτική πλευρά της περιοχής περιβάλλεται από την θάλασσα όπου εκτείνεται μια επιμήκη ακτή μήκους περίπου 6 km. Οι παραλίες είναι αμμώδεις με μεγάλο βάθος παραλίας. Επίσης, στην ευρύτερη περιοχή υπάρχουν και αρκετές βραχώδεις παραλίες. Ο κάμπος των Φαλασάρνων (καλλιεργούμενη γη) περιβάλλεται από μια περιοχή με ήπια κλίση (πλαγιά) που καταλήγει περιμετρικά του κάμπου σε υψόμετρο 300 m περίπου. Οι βουνοπλαγιές είναι καλυμμένες με χορτολιβαδικές εκτάσεις και δασικούς θαμνώνες. Στην ευρύτερη περιοχή υπάρχουν και σημαντικοί ορεινοί όγκοι. Προς νότο υπάρχει ο Προφήτης Ηλίας, στον οποίο υπάρχει και ο ομώνυμος ναός, που απέχει οριζοντιογραφικά μόλις 2.5 km από τη θάλασσα και φτάνει σε ύψος 891 m. Προς βορρά υπάρχει το Ακρωτήριο της Γραμβούσας που καταλήγει στο Νησί Γραμβούσα με το ιστορικό Κάστρο της Γραμβούσας, με τεράστια

συνεισφορά κατά τα χρόνια της Κρητικής Επανάστασης, διατηρημένο σε άριστη κατάσταση.

Εικόνα 4: Πανοραμική άποψη της ακτής των Φαλασάρνων.

2.3 Θεσμικές Ρυθμίσεις

Επιπλέον σημειώνουμε ότι η περιοχή υπάγεται στις παρακάτω θεσμικές ρυθμίσεις :

- Η περιοχή έχει καταχωρηθεί στο δίκτυο NATURA 2000 με το όνομα ΗΜΕΡΗ ΚΑΙ ΑΓΡΙΑ ΓΡΑΜΒΟΥΣΑ - ΤΗΓΑΝΙ ΚΑΙ ΦΑΛΑΣΑΡΝΑ - ΠΟΝΤΙΚΟΝΗΣΙ και κωδικό GR4340001.
- Η περιοχή έχει καταχωρηθεί στο δίκτυο CORINE-Biotopes (AG0020039, AG0050008).
- Η ευρύτερη περιοχή του Κόλπου Λειβάδι έχει χαρακτηρισθεί σαν περιοχή ιδιαίτερου φυσικού κάλους. ΦΕΚ 1242/Β/16-10-1973.
- Αρχαιολογικός χώρος Φαλάσαρνας Κισάμου Ν. Χανίων ΦΕΚ 23/Β/17-1-1995.

2.4 Υδρογεωλογικές Συνθήκες

Οι γεωλογικοί σχηματισμοί που επικρατούν στην περιοχή είναι οι ασβεστολιθικοί. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον γεωλογικό χάρτη του νομού Χανίων, η περιοχή των Φαλασάρνων, αποτελείται από τεταρτογενείς αποθέσεις παραλιακά, και όσο αυξάνεται το υψόμετρο από αποθέσεις του

νεογενούς. Το ανάγλυφο του εδάφους είναι ηπίως κεκλιμένο. Το έδαφος προέρχεται από μητρικά πετρώματα ασβεστολίθων και τύπου terra rossa με κύρια χαρακτηριστικά την έλλειψη καλίου και φωσφόρου, το υψηλό pH, την σχετικά μεγάλη περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο και την έλλειψη υγρασίας.

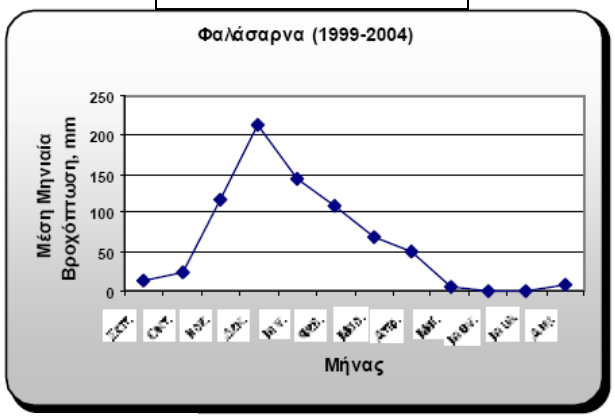
Τα Φαλάσαρνα ανήκουν στην ευρύτερη υδρολογική λεκάνη Γραμβούσας – Πλατάνου – Σφηναρίου. Η εν λόγω λεκάνη βρίσκεται στο δυτικό τμήμα του Ν. Χανίων, και είναι μια δευτερεύουσα υδρολογική λεκάνη της επαρχίας Κισσάμου. Η επιφανειακή απορροή περιορίζεται στην έκταση που καταλαμβάνουν οι σχιστολιθικοί σχηματισμοί στο νοτιοδυτικό τμήμα της λεκάνης. Σύμφωνα με την Υδρολογική Μελέτη του Κάμπου Χανίων, η ευρύτερη αυτή υδρολογική λεκάνη χωρίζεται σε δύο μικρότερες υδρολογικές λεκάνες, αυτή των Φαλασάρνων, έκτασης 6,1 km^2 και του Πλατάνου – Γραμβούσας έκτασης 10,83 km^2. Στην υδρολογική λεκάνη των Φαλασάρνων, βάσει των μέσων ετήσιων βροχοπτώσεων, οι οποίες υπολογίστηκαν σε 650 mm, λαμβάνοντας κατείσδυση 10% λόγω του αυξημένου πορώδους των μαργαϊκών ασβεστολίθων και των κροκαλοπαγών εμφανίσεων των νεογενών, θεωρείται ότι διακινούνται υπόγεια ποσότητες νερού της τάξεως των 0.4 10^6 m^3/yr. Σημαντικότερη πηγή της περιοχής είναι αυτή του Σφηναρίου η οποία δίνει μέσο ετήσιο όγκο νερού (έτη 1970 – 1993) 1.6 10^6 m^3 νερού. Υπάρχουν ακόμη και άλλες πηγές, οι περισσότερες από τις οποίες παρουσιάζουν έντονα φαινόμενα υφαλμύρησης. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στην πηγή «Ποταμός» με αξιόλογη παροχή, της οποίας το νερό όμως είναι ποιοτικά υποβαθμισμένο, ακατάλληλο για κάθε χρήση. Οι γεωτρήσεις που έχουν ανορυχθεί στην περιοχή αυτή, εκμεταλλεύονται τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα που αναπτύσσεται τόσο στους τεταρτογενείς και νεογενείς σχηματισμούς όσο και στο ανθρακικό υπόβαθρό της. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη περιοχή, υπάγεται στα μέτρα προστασίας υδάτινου δυναμικού του νομού, υπό καθεστώς απαγόρευσης ανόρυξης νέων γεωτρήσεων και πηγαδιών, καθώς και μεταβολής των συνθηκών λειτουργίας των ήδη υπαρχόντων υδροληπτικών έργων. Η απόφαση αυτή έχει ληφθεί στα πλαίσια της έντονης υφαλμύρησης που παρουσιάζεται στην παραλιακή ζώνη. Γενικά, η υδρολογική λεκάνη αυτή είναι περιορισμένης δυναμικότητας. Η γεωλογία της περιοχής, η γειτνίαση με την θάλλασσα και η υπεράντληση, επιβαρύνουν την ποιότητα του νερού, ενώ η ολοένα και μεγαλύτερη ανάγκη εξασφάλισης νερού για την μερική κάλυψη των αναγκών της περιοχής μεγαλώνει τον κίνδυνο περαιτέρω ποιοτικής υποβάθμισης του υδροφορέα.

2.5 Κλιματολογικές Συνθήκες

Το κλίμα της περιοχής των Φαλασάρνων είναι μεσογειακό με έντονα θερμομεσογειακό χαρακτήρα και συμπίπτει με το συνολικό κλίμα του νομού Χανίων. Η μελέτη των κλιματολογικών συνθηκών της περιοχής έγινε με τη χρήση βροχομετρικών στοιχείων και στοιχείων θερμοκρασίας από το Σταθμό του Ινστιτούτου Υποτροπικών και Ελιάς Χανίων στα Φαλάσαρνα. Ο σταθμός αυτός βρίσκεται σε υψόμετρο 24m με γεωγραφικές συντεταγμένες πλάτος 35° 30' και μήκος 23° 35'. Μετεωρολογικά δεδομένα για τον υπολογισμό της εξάτμισης χρησιμοποιήθηκαν από τον σταθμό της Σούδας.

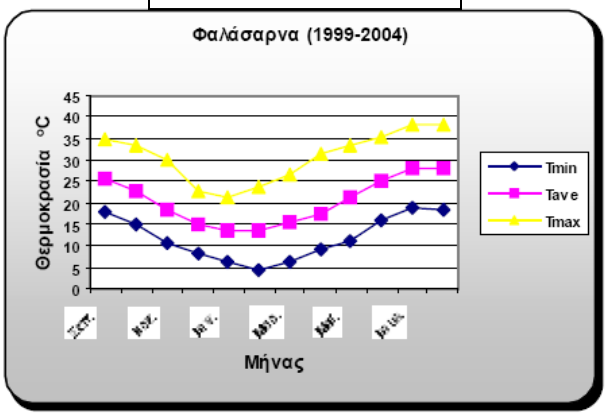
Η μέση βροχόπτωση στην περιοχή είναι 750 mm (610-1153 mm). Ψυχρότερος μήνας στην περιοχή είναι ο Φεβρουάριος με μέση ελάχιστη θερμοκρασία 4.5 ^{o}C και θερμότερος ο Ιούλιος με μέση μέγιστη θερμοκρασία 38 ^{o}C. Τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό του ελλείμματος για τα υδρολογικά έτη 2000-01 έως 2003-04 έδειξαν ότι η περιοχή παρουσιάζει δυνητικό υδατικό έλλειμμα από τους μήνες Φεβρουάριο-Μάιο έως τον μήνα Οκτώβριο, ενώ το αθροιστικό έλλειμμα είναι αρνητικό της τάξεως των 120 mm (μέση τιμή). Στο διάγραμμα 3 απεικονίζεται το δυνητικό υδατικό έλλειμμα για το χαρακτηριστικό υδρολογικό έτος 2001-02 (βροχόπτωση 683 mm).

Διάγραμμα 1



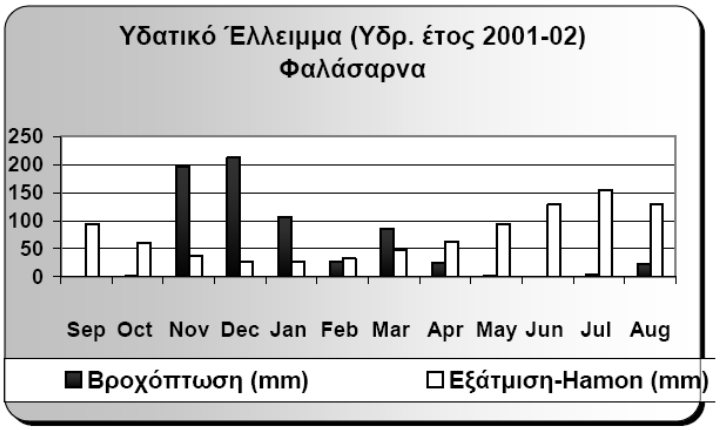
Μέση μηνιαία βροχόπτωση για τα Φαλάσαρνα.

Διάγραμμα 2



Ελάχιστη, μέση και μέγιστη μηνιαία θερμοκρασία για τα Φαλάσαρνα.

Διάγραμμα 3



Το δυνητικό υδατικό έλλειμμα για την περιοχή των Φαλασάρνων το υδρολογικό έτος 2001-02.

2.6 Χρήσεις Γης και Κύριες Δραστηριότητες

Στην περιοχή των Φαλασάρνων είναι αναπτυγμένες κυρίως οι παρακάτω δραστηριότητες :

***Αγροτική δραστηριότητα*:** υπάρχουν θερμοκηπιακές καλλιέργειες, καλλιέργειες ελιάς και αμπελοκαλλιέργειες (κυρίως στον κάμπο της Κισάμου).

***Αλιευτική δραστηριότητα*:** στο λιμανάκι του Πλατάνου υπάρχει μικρός αριθμός αλιευτικών σκαφών, όπως και στον γειτονικό λιμενίσκο Σφηνάρι, ενώ μεγαλύτερος αριθμός σκαφών υπάρχει στο μεγάλο λιμάνι του Καβονησίου

***Τουριστική δραστηριότητα*:** η τουριστική δραστηριότητα στην περιοχή είναι ανεπτυγμένη. Υπάρχουν στην ευρύτερη περιοχή αρκετές εγκαταστάσεις ενοικιαζόμενων δωματίων – διαμερισμάτων καθώς και λίγα ξενοδοχεία.

***Εμπορική δραστηριότητα*:** στην ευρύτερη περιοχή υπάρχουν εμπορικές δραστηριότητες που έχουν να κάνουν κυρίως με τον τουρισμό, όπως ενοικιάσεις αυτοκινήτων, εποχιακά τουριστικά εμπορικά καταστήματα, mini markets κ.λ.π.

***Αρχαιολογικοί χώροι*:** στην ευρύτερη περιοχή υπάρχει αρχαιολογικός χώρος (Αρχαία πόλη Φαλάσαρνας), με σημαντικά αρχαιολογικά ευρήματα (αρχαίο λιμάνι, οχυρωματικά έργα κ.λ.π). στο Καβούσι υπάρχει Ενετικός Πύργος καθώς και ισόγειες κατοικίες στην παραδοσιακή τους μορφή.

Εικόνα 5: Αρχαιολογικοί χώροι στα Φαλάσαρνα

Οι τουριστικές εγκαταστάσεις καθώς και τα τουριστικά εμπορικά καταστήματα, έχουν δώσει στην περιοχή τουριστικό χαρακτήρα. Οι βιομηχανικές εγκαταστάσεις της περιοχής περιλαμβάνουν τέσσερα ελαιοτριβεία, τον Αγροτικό Συνεταιρισμό με Μονάδες Τυποποίησης Λαδιού και εμφιαλωτήρια κρασιού [3]

2.7 Κύριες Φορτίσεις

Οι κύριες φορτίσεις της περιοχής είναι οι εξής:

- Ρύπανση από τουριστικές δραστηριότητες της περιοχής (πχ. λύματα από ξενοδοχειακές μονάδες, ταβέρνες κτλ) καθώς και στερεά απορρίμματα που προκύπτουν από την απουσία οργανωμένης διαχείρισης της ακτής. Σημειώνεται ότι στην περιοχή δεν υπάρχει μονάδα επεξεργασίας των λυμάτων ούτε των απορριμμάτων, με αποτέλεσμα η διαχείρισή τους να γίνεται με σηπτικούς βόθρους και με απόρριψή τους αυθαίρετα σε παράνομες χωματερές.
- Ρύπανση από Γεωργική Δραστηριότητα

Τα φυτά παρέχουν άμεσα ή έμμεσα την κύρια πηγή τροφής για τον άνθρωπο, τα ζώα και ένα πλήθος κατώτερων οργανισμών. Χάρις στην ανάπτυξη της γεωργίας κατά τον εικοστό αιώνα, η κατά κεφαλή παραγωγή τροφής έχει αυξηθεί, παρά τη θεαματική αύξηση του πληθυσμού. Η μηχανοποίηση, η επέκταση των αρδευτικών συστημάτων και η εκτεταμένη χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων έδωσαν μεγάλη ώθηση στην παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Ταυτόχρονα, όμως, δημιουργήθηκε και ένας μεγάλος κύκλος σοβαρών περιβαλλοντικών

επιπτώσεων από τη γεωργία, οι οποίες επεκτείνονται όχι μόνο σε τοπικό αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο.

Εικόνα 6: Υπολείμματα θερμοκηπίων στα Φαλάσαρνα

Η καθεαυτή χρήση βαρέων μηχανημάτων και χημικών είχε πρώτα απ' όλα επιπτώσεις στο ίδιο το έδαφος προκαλώντας τον εκφυλισμό του και μετατρέποντας το σε λεπτή σκόνη. Μέσα στο νέο ανοιχτό αγροτικό τοπίο ο άνεμος και η βροχή ολοκληρώνουν πιο εύκολα την επιφανειακή διάβρωση του εδάφους. Η αλόγιστη επέκταση των αρδευόμενων εκτάσεων οδηγεί σε υπερεκμετάλλευση καθώς και σε εναλάτωση των εδαφών, που προέρχεται είτε από την ίδια την άρδευση είτε από την υπερβολική άντληση υπόγειων νερών. Η χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων οδηγεί στη ρύπανση του εδάφους και κατ' επέκταση του υδροφόρου ορίζοντα, ενώ δεν πρέπει να παραγνωρίζονται και οι συνέπειες της στην υγεία των καλλιεργητών αλλά και των καταναλωτών.

.Στην Ελλάδα, η γεωργία ασκείται στο 30% της συνολικής έκτασης της χώρας. Στη γεωργική δραστηριότητα και κυρίως στην άρδευση καταναλώνεται περισσότερο από το 80% των χρησιμοποιούμενων υδατικών πόρων. Είναι λοιπόν δεδομένο ότι η γεωργική δραστηριότητα έχει περιβαλλοντικές επιπτώσεις, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στα νερά και στο έδαφος. Λόγω της αυξημένης άντλησης για την κάλυψη των αναγκών ύδρευσης των θερμοκηπιακών καλλιεργειών, έχει παρουσιαστεί έντονο πρόβλημα επιβάρυνσης σε άλατα του αντλούμενου νερού (Υφαλμύρωση).

Το πρόβλημα αυτό έχει παρουσιαστεί τόσο στις γεωτρήσεις άντλησης όσο και στις τρεις υπάρχουσες πηγές της περιοχής.

Λιπάσματα

Τα φυτά χρειάζονται για την ανάπτυξη τους (εκτός από νερό, ήλιο και CO_2) μικρές ποσότητες από ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι το άζωτο (N), το κάλιο (K), ο φώσφορος (P), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg) και το θείο (S). Από τα στοιχεία αυτά, η ύπαρξη N, K και P στο έδαφος είναι συχνά ο καθοριστικός παράγοντας για τη δυνατότητα ανάπτυξης των φυτών. Έτσι, η προσθήκη των τριών αυτών στοιχείων με μορφή λιπασμάτων στο έδαφος βοηθάει την ανάπτυξη των φυτών και αυξάνει τη σοδειά των αγροτικών καλλιεργειών.

Είναι χαρακτηριστικό ότι η παγκόσμια αγροτική παραγωγή διπλασιάστηκε κατά την περίοδο 1950-1990 και αυτό αποδίδεται, σε μεγάλο βαθμό, στην αυξανόμενη χρήση λιπασμάτων. Συγκεκριμένα, το 1950 η χρήση λιπασμάτων ήταν κατά μέσο όρο παγκοσμίως 20 kg/ha (κιλά ανά εκτάριο) και το 1990 έφτασε τα 91 kg/ha. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι ενώ αυξήθηκε κατά 4,5 φορές η ποσότητα των λιπασμάτων, η απόδοση των αγροτικών καλλιεργειών αυξήθηκε κατά 2 φορές. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην υπερλίπανση των εδαφών που προορίζονται για καλλιέργεια, επειδή αγνοείται από τους καλλιεργητές η πραγματική ανάγκη του εδάφους σε θρεπτικά συστατικά.

Η Ελλάδα παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει χρήση λιπασμάτων σχετικά μικρότερη από το μέσο όρο των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (περίπου 87% του ευρωπαϊκού μέσου όρου), εμφανίζει φαινόμενα υπερλίπανσης. Το σύνολο των λιπασμάτων αυξήθηκε 18 φορές κατά την περίοδο 1950-90 και οφείλεται κυρίως στη μεγάλη αύξηση των αζωτούχων λιπασμάτων (23 φορές στην ίδια περίοδο).

Το φαινόμενο της υπερλίπανσης οδηγεί στη συσσώρευση κυρίως αζωτούχων και φωσφορούχων ουσιών στο έδαφος. Οι ουσίες αυτές είναι κυρίως νιτρικά και φωσφορικά άλατα, τα οποία με τα νερά της βροχής διαλυτοποιούνται και μεταφέρονται είτε σε υπόγεια είτε σε επιφανειακά νερά (ποταμών, λιμνών, θαλασσών), μεταφέροντας με τον τρόπο αυτό τη ρύπανση από το έδαφος στα νερά.

Εικόνα 7: Κανάλι δίπλα σε θερμοκήπιο (σημείο 1 δειγματοληψίας) με εμφανή ίχνη ευτροφισμού

Φυτοφάρμακα

Η καλλιέργεια του εδάφους και η αναμενόμενη καλή σοδειά συχνά παρεμποδίζονται από την παρουσία οργανισμών που μειώνουν την ποιότητα, τη δυνατότητα ή και την αξία της αγροτικής παραγωγής. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν διάφορες χημικές ουσίες που στόχο έχουν να εξουδετερώσουν τη δράση τους. Τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες με βάση τον οργανισμό που στοχεύουν να εξουδετερώσουν: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα

- Τα ζιζανιοκτόνα είναι η μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων αποτελώντας τα 2/3 περίπου του συνόλου των χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων. Περιλαμβάνουν διάφορες οργανικές ενώσεις που καθαρίζουν τα εδάφη από ζιζάνια. Τα εδάφη όμως που καθαρίζουν με τέτοια μέθοδο παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό διάβρωσης.

- Τα εντομοκτόνα περιλαμβάνουν ανόργανες χημικές ουσίες, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις και διάφορες άλλες οργανικές ουσίες. Τα εντομοκτόνα είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων και παρ' όλο που χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες από τα ζιζανιοκτόνα, προκαλούν μεγαλύτερο περιβαλλοντικό πρόβλημα, λόγω της αυξημένης τοξικότητας τους.

- Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ιδίως για την προστασία των φρούτων και λαχανικών.

Τα φυτοφάρμακα, όπως και τα λιπάσματα, μεταφέρονται με τα νερά της βροχής είτε σε υπόγεια νερά είτε σε επιφανειακά νερά (ποταμών, λιμνών, θαλασσών). Επιπλέον, εισέρχονται στα φυτά και στους καρπούς των καλλιεργειών με αποτέλεσμα να φτάνουν απευθείας στον άνθρωπο.

Εικόνα 8: Υπολείμματα θερμοκηπιακών δραστηριοτήτων σε λιμνάζοντα ύδατα της περιοχής

Θερμοκήπια

Με τον όρο θερμοκήπιο αναφερόμαστε στην κατασκευή που:

- είναι ειδικά σχεδιασμένη ώστε να χρησιμεύει στην καλλιέργεια και/ή προστασία των φυτών επιτρέποντας την είσοδο της ηλιακής ακτινοβολίας κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες με σκοπό να βελτιώσει το περιβάλλον ανάπτυξης τους και
- έχει τέτοιο μέγεθος ώστε να επιτρέπει την εργασία ανθρώπων μέσα σε αυτή.

Τα προϊόντα που παράγονται στο θερμοκήπιο ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- τρόφιμα (λαχανικά και φρούτα) και
- καλλωπιστικά φυτά (φυτά γλάστρας και κομμένα άνθη).

Στο θερμοκήπιο γίνεται προσπάθεια ώστε να τεθούν υπό έλεγχο όσοι περισσότεροι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή είναι δυνατό, η εξέλιξη της προσπάθειας αυτής ήταν και είναι ανάλογη της

προόδου του ανθρώπου τόσο στο χώρο των φυσικών όσο και των βιολογικών και τεχνικών επιστημών.

Τα θερμοκήπια έκαναν την εμφάνιση τους στην Ελλάδα στα μέσα της δεκαετίας του 1950. Η σημαντική όμως εξάπλωση τους αρχίζει μετά το 1960 με τη χρήση των πλαστικών φύλλων ως υλικού κάλυψης και έκτοτε παρατηρείται μια συνεχής αύξηση της έκτασης των θερμοκηπίων που σήμερα φτάνει τα 50.000 στρέμματα περίπου.

Εικόνα 9: Παρέμβαση στην μορφολογία του εδάφους

Οι κλιματολογικές συνθήκες αποτελούν τον καθοριστικό παράγοντα εξάπλωσης και ανάπτυξης των θερμοκηπίων. Τα περισσότερα θερμοκήπια είναι συγκεντρωμένα στις περιοχές που χαρακτηρίζονται από ήπιο -χωρίς παγετούς- χειμώνα επειδή μειώνονται σημαντικά οι ανάγκες για θέρμανση.

Το 79% της συνολικής έκτασης θερμοκηπίων χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια λαχανοκομικών και το 10% για ανθοκομικά προϊόντα. Τα κυριότερα είδη που καλλιεργούνται είναι η ντομάτα και το αγγούρι από τα λαχανοκομικά ενώ από τα ανθοκομικά φυτά, τα γαρύφαλλα και τα τριαντάφυλλα.

Σε ότι αφορά τη μέση παραγωγή, ενδεικτικά αναφέρεται ότι φτάνει τους 10 τόνους ανά στρέμμα για τη ντομάτα (διπλάσια της παραγωγής στην ύπαιθρο). Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι η αντίστοιχη απόδοση για την ντομάτα στην Ολλανδία φτάνει τους 60 τόνους ανά στρέμμα [4].

2.8 Βλάστηση, Χλωρίδα και Πανίδα

<u>Βλάστηση και χλωρίδα</u>

Η περιοχή από οικολογική, φυσιογνωμική και ιστορική άποψη ανήκει στην Ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης. Στην περιοχή αναπτύσσονται κατά θέσεις υπολείμματα της μεσογειακής μακίας κυρίως πλησίον της κοίτης των ρεμάτων που το εδαφικό περιβάλλον είναι ευνοϊκό. Τα απαντώμενα είδη, όσο αφορά την βλάστηση είναι:

Ceratonia siliqua	*Origanum dictamnus*
Nerium oleander	*Genista acathoclada*
Pistacia lentiscus	*Calicotome villosa*
Vitex angus castus	*Juniperus oxycedrus*
Coridothymus capitatus	*Phlomis cretica*

Ενδιαφέρον, παρουσιάζει η Βραχοχλωρίδα της περιοχής που είναι εξαιρετικά πλούσια σε αριθμό και ποικιλία ειδών, όπως τα *Verbascum arcturus*, *Achillea cretica*, *Petromarula pinnata*, *Campanula saxatills*, *Centaurea argentea*, *Tulipa goulimyi*. Επίσης η βλάστηση της παραλιακής ζώνης είναι σημαντική με τα: *Pancratium maritimum* (κρίνος της θάλασσας), *Otanthus maritimus*, *Euphorbia paralias*, *Tamarix smyrnensis.*

Επιπλέον πρέπει να τονίσουμε ότι η παραλία είναι ένα από τα 3 μέρη της Κρήτης όπου μπορεί κανείς να παρατηρήσει το πολύ όμορφο ενδημικό της Κρήτης κρινάκι *Androcymbium reichingeri* (Ανδροκύμβιο) Η σπανιότητά του το κατατάσσει στα είδη που κινδυνεύουν και προστατεύεται από προεδρικά διατάγματα και διεθνείς συνθήκες.

<u>Πανίδα</u>

Σύμφωνα με τη μελέτη Αναγνώρισης του φυσικού Περιβάλλοντος της Χώρας (ΥΠΕΧΩΔΕ) τα είδη στην ευρύτερη περιοχή είναι:

- **Αμφίβια**

Bufo viridis

- **Ασπόνδυλα**

Είναι κολεόπτερα, λεπιδόπτερα, υμενόπτερα, δίπτερα και μαλάκια του γένους (Helix) σαλιγκάρια.

- **Ερπετά**

Coluber gemonensis gemonensis	Lacerta trilineata
Natrix tesselata	Chalcides ocellatus
Elaphe situla	Mauremys caspica
Podarcis erhardi cretensis	Tarentola mauritania

- **Θηλαστικά**

Meles meles arcalus	Rattus rattus frugivorous
Martes foina bunites	Lepus capensis
Mustela nivalis galinthias	Erinaceus concolor
Acomus cahirinus	

- **Ορνιθοπανίδα**

Ο κατάλογος ξεπερνά τα 150 είδη τα περισσότερα από τα οποία είναι μεταναστευτικά πουλιά που σταθμεύουν για να τραφούν και να ξεκουραστούν. Από τα φωλιάζοντα ξεχωρίζουν όσα χρησιμοποιούν τις νησίδες και τις κάθετες ακτές: μύχος, θαλασσοκόρακας, αρτέμης, πετρίτης, μαυροπετρίτης, αγριοπερίστερο, βουνοσταχτάρα, γαλαζοκότσυφας και κόρακας. Η θαμνώδης έκταση γύρω από τον αρχαιολογικό χώρο και το ελληνιστικό λιμάνι είναι κατάλληλη για φώλιασμα δεντροσταρήθρων, ασπροκόλλων, μαυροτσιροβάκων, κοκκινοτσιροβάκων, καλόγερων και γαλαζοπαπαδίτσων. Στον καλαμιώνα και τις κοντινές αμμοθίνες φωλιάζουν το ψευταηδόνι, ο κατσουλιέρης, ο κοκκινοκεφαλάς και ο ποταμοσφυριχτής. Οι πλαγιές των κοντινών βουνών είναι κατάλληλες για φώλιασμα αρπακτικών και αναφέρονται στην περιοχή ο φιλάδελφος, ο χρυσαετός και ακόμη ο γυπαετός. Το χειμώνα έρχονται πολλά νεροπούλια όπως το μπεκατσίνι, η καλημάνα, το κιρκίρι, ο κορμοράνος και σπανιότερα ο γελαδάρης, ο κύκνος και η βαρβάρα, καθώς επίσης και αρπακτικά όπως ο καλαμόκιρκος και ο βαλτόκιρκος. Μεταξύ των περαστικών πουλιών ο κατάλογος περιλαμβάνει τα ακόλουθα: ήταυρος, μικροτσικνιάς, κρυπτοτσικνιάς, λευκοτσικνιάς, σταχτοτσικνιάς, τσιχλογέρακο, διπλοσάϊνο, ακτίτης, μικρογαλιάνδρα, δεντροχελίδονο, οχθοχελίδονο, καστανολαίμης, αηδόνι, τσιχλοποταμίδα, μαυρομυγοχάφτης, αμπελουργός, κηποτσιροβάκος, θαμνοτσιροβάκος, μαυροσκούφης, νανοσκαλίδρα, δρεπανοσκαλίδρα,

χαλικοκυλιστής, ψαλιδιάρης, αετομάχος, χωραφοσπουργίτης, πετροτριλίδα [3].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Πειραματικό τμήμα: Υλικά & μέθοδοι

3.1 Δειγματοληψία

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους από 6 σημεία της περιοχής της παραλίας των Φαλασσάρνων και δειγματοληψίες υδάτων από 4 σημεία πλησίον των παραπάνω, όπου αυτό ήταν εφικτό. Τα 4 πρώτα δείγματα (εδάφους και υδάτων) ανήκουν στο έδαφος και τις υδάτινες απορροές περιμετρικά θερμοκηπίων του νοτίου τμήματος της παραλίας όπου η γεωργική δραστηριότητα είναι ιδιαιτέρα ανεπτυγμένη ενώ τα δύο τελευταία εδαφικά δείγματα ανήκουν στο βόρειο τμήμα της παραλίας όπου είναι πιο έντονη η τουριστική δραστηριότητα.
Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε δύο ημερομηνίες: Η πρώτη έγινε στις στις 20/11/2008 και η δεύτερη 6 μήνες αργότερα στις 10/5/2009. Κατά την δεύτερη περίοδο δειγματοληψίας τα υδάτινα δείγματα περιορίστηκαν από 4 σε 1. Ο πιθανός λόγος είναι ότι λόγω των καιρικών συνθηκών (άνοδος θερμοκρασίας, υψηλότερες απαιτήσεις άρδευσης) οι απορροές από τα θερμοκήπια είναι πολύ λιγότερες.
Οι δειγματοληψίες εδάφους έγιναν με την χρήση σκαπάνης σε βάθος περίπου 10 εκ. και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε νάιλον αποστειρωμένες σακούλες ενώ οι δειγματοληψίες νερού έγιναν απευθείας με αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια. Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι σε ψυγείο σε χρονικό διάστημα περίπου 2 ωρών.
Τα σημεία δειγματοληψίας φαίνονται στις ακόλουθες φωτογραφίες.

Εικόνα 10: Σημείο 1

Εικόνα 11: Σημείο 2

Εικόνα 12: Σημείο 3

Εικόνα 13: Σημείο 4

Εικόνα 14: Σημεία 5 και 6

3.2 Μέτρηση Χλωροφύλλης

Η χλωροφύλλη αποτελεί τη φωτοσυνθετική χρωστική των φυτών , είναι ένα μόριο που φθορίζει και γι αυτό η συγκέντρωσή της μπορεί να υπολογισθεί με τη μέθοδο του φθορισμού. Οι τεχνικές φθορισμού τώρα πλέον χρησιμοποιούνται για ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις τόσο των χλωροφυλλών ,όσο και των φαιοφυτινών (χλωροφύλλες που έχουν χάσει το κεντρικό ιόν Mg) . Σε πολλές εφαρμογές έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους σπεκτροφωτομέτρησης και έχουν κάνει τις αναλύσεις πιο πρακτικές.

Υλικά και όργανα

- Φθοριόμετρο
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή διήθησης
- Αντλία κενού
- Αλουμινόχαρτο
- Κύλινδροι ογκομετρικοί , 500 m1 και 11
- Ογκομετρικές φιάλες 25 m1, 50 m1, 100 mI και 11
- Πιπέτες
- Κιουβέτες για το φθοριόμετρο
- Απιονισμένο νερό
- Υδατικό διάλυμα ακετόνης - 90% ακετόνη/ 10% νερό

Συλλογή Δειγμάτων , Διατήρηση και Αποθήκευση

Το νερό πρέπει να ληφθεί με μια αντλία ή έναν δειγματολήπτη. Το υγιές φυτοπλαγκτόν συλλέγεται από την ευφωτική ζώνη. Ο όγκος του νερού που φιτράρεται εξαρτάται από το ιδιαίτερο φορτίο του νερού. Τέσσερα λίτρα μπορεί να χρειασθούν για το νερό από ωκεανούς όπου η πυκνότητα του φυτοπλαγκτόν είναι συνήθως χαμηλή, όμως ένα λίτρο ή και λιγότερο είναι αρκετό για νερό από λίμνες , κόλπους, δέλτα ποταμών. Όλες οι συσκευές πρέπει να είναι καθαρές και απαλλαγμένες από οξέα. Το φιλτράρισμα πρέπει να λάβει χώρα, σε σκούρα δοχεία, όσον το δυνατόν γρηγορότερα μετά την δειγματοληψία , γιατί οι πληθυσμοί των αλγών επομένως και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α, μπορούν να αλλάξουν σε σχετικά μικρές χρονικές περιόδους.

Εκτέλεση Πειράματος

- Συλλογή δείγματος
- Διήθηση 100 ml δείγματος αραιωμένο με 100 ml απιονισμένου νερού (αραίωση 1:1) σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0.45μm
- Τοποθέτηση φίλτρου σε γυάλινο δοχείο και τεμαχισμός σε μικρά κομμάτια ούτως ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί η χλωροφύλλη.
- Προσθήκη 15 ml από το υδατικό διάλυμα της ακετόνης 90%.
- Ανακατεύουμε το φίλτρο έως ότου πολτοποιηθεί αλλά προσέχουμε το δείγμα να μην υπερθερμανθεί.
- Τοποθετούμε το δείγμα σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15m1
- Σκεπάζομε το σωλήνα και ανακινούμε δυνατά.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 1000 στροφές.
- Μετά την προθέρμανση του φθοριόμετρου για 15 λεπτά περίπου χρησιμοποιούμε διάλυμα ακετόνης 90% για να μηδενίσουμε το όργανο.
- Τοποθετούμε το δείγμα σε κιουβέτα.
- Εάν η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α στο δείγμα είναι μεγαλύτερη από την ανώτερη συγκέντρωση βαθμονόμησης του οργάνου, αραιώνουμε το δείγμα με 90% ακετόνη και επαναλαμβάνουμε την ανάλυση καταγράφοντας τις μετρήσεις του οργάνου.

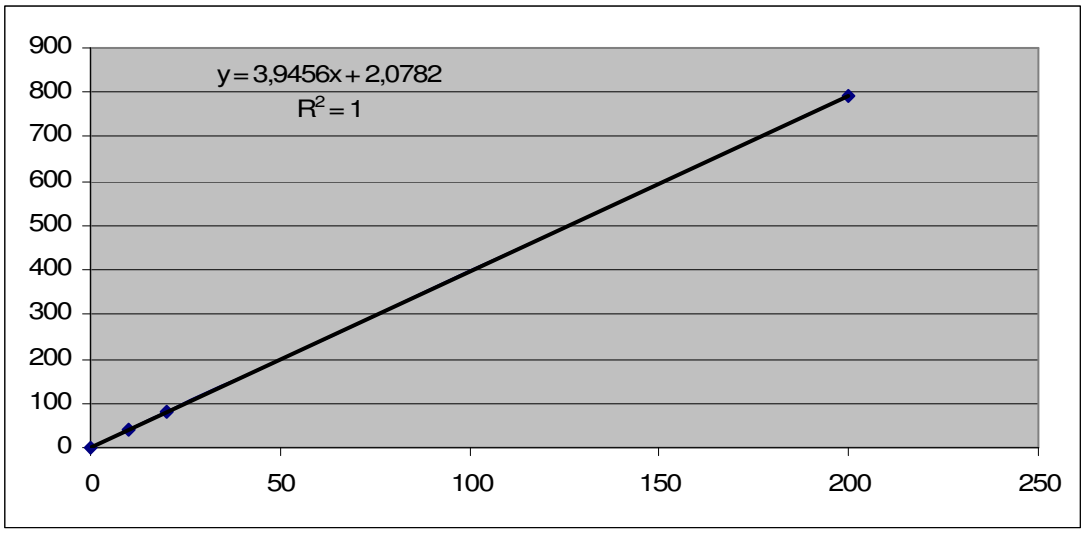
Ανάλυση Δεδομένων- Υπολογισμοί

Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης από την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από τις ακόλουθες τιμές πρότυπων διαλυμάτων.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων

Calibration Standard Summary:

Std.	Conc.	Raw Fluor.
BLK	0	0
Std.3	10.00	42.29
Std.2	20.00	82.50
Hi Std.	200.0	791.1



Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη χλωροφύλλης

3.3 Δράση της Δεϋδρογονάσης στο Χώμα

Ο τρόπος με τον οποίο η δεϋδρογονάση ενεργεί στα εδάφη παρουσιάστηκε αναλυτικά στην εισαγωγή επεξηγώντας τους λόγους για τους οποίους θεωρείται καλός δείκτης των μεταβολικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών του εδάφους.

Υλικά και όργανα

- 1 πλαστικό φιαλίδιο (για το τυφλό)
- 6 πλαστικά φιαλίδια (για κάθε δείγμα)
- αναλυτικός ζυγός
- εργαστηριακός ζυγός
- πιάτα ζυγίσεως
- σπάτουλα
- απιονισμένο νερό
- 3 ml 1% TTC για κάθε φιαλίδιο
- μεθανόλη
- ογκομετρικός κύλινδρος των 10ml
- 1 χωνί διηθήσεως για κάθε φιαλίδιο
- χαρτί διηθήσεως Whatman #42
- ογκομετρικές φιάλες των 25,50,100, και 200 ml
- σιφώνια των 5ml
- φωτόμετρο στα λ=485 nm

Συλλογή Δειγμάτων , Διατήρηση και Αποθήκευση

Το δείγματα των χωμάτων πρέπει να είναι φρέσκα και απαλλαγμένα από την περιεχόμενη υγρασία. Για τον λόγο αυτό τοποθετούμε μια επαρκή ποσότητα από κάθε δείγμα (25 g) στον κλίβανο στους 37 ^{o}C για 24 ώρες.

Εκτέλεση Πειράματος

Το πείραμα εκτελείται σε διάστημα δύο ημερών.

1η ημέρα

- Ζυγίζουμε και τοποθετούμε στα φιαλίδια 3 g δείγματος (ξηρού)
- Προσθέτουμε 3ml 1% TCC σε κάθε φιαλίδιο.
- Ανακατεύουμε το χώμα με το νερό και κλείστε τα φιαλίδια, για να μην έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο του αέρα. Στην επιφάνεια του χώματος μόλις που εμφανίζεται μια μικρή ποσότητα ελεύθερου υγρού.
- Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37 ^{o}C

2η ημέρα

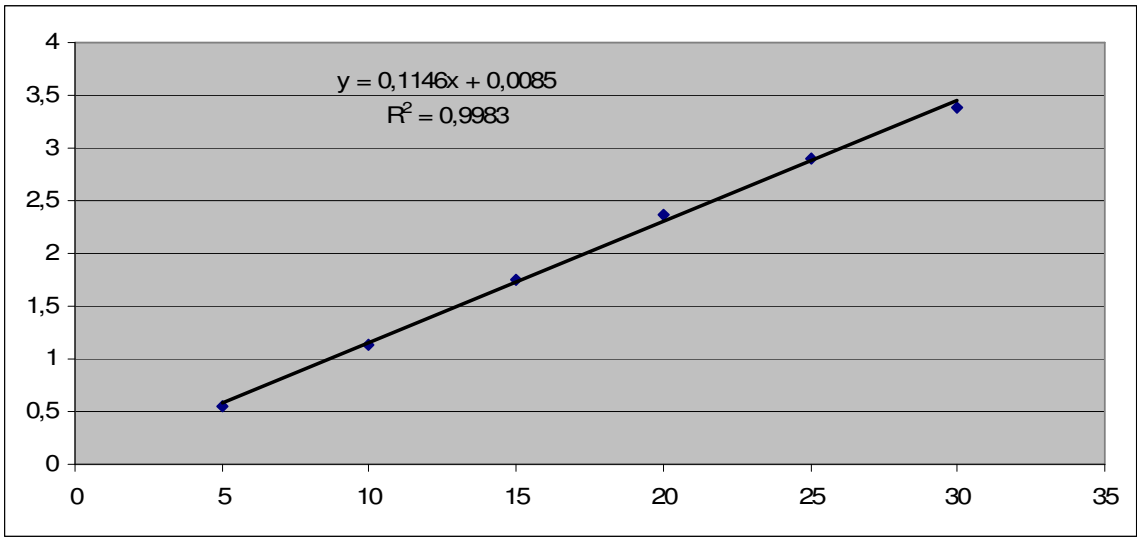
- Σε κάθε φιαλίδιο προσθέτουμε 10ml μεθανόλης, αναδεύουμε και μεταφέρουμε όλο το μίγμα σε ένα χωνί με διηθητικό χαρτί. Συλλέγουμε τα διηθήματα σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml .
- Ξεπλένουμε το φιαλίδιο και το ίζημα στο χωνί δυο η και περισσότερες φορές με μεθανόλη μέχρι το χρώμα του διηθήματος να είναι κόκκινο διαυγές. Συμπληρώνουμε με μεθανόλη μέχρι την ένδειξη της φιάλης.
- Καταγράφουμε την απορρόφηση κάθε διαλύματος στο φωτόμετρο στα 485 nm χρησιμοποιώντας το τυφλό (μεθανόλη) ως μηδέν.

Ανάλυση Δεδομένων- Υπολογισμοί

Υπολογίζομε τη συγκέντρωση της δεϋδρογονάσης από την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από τις ακόλουθες τιμές πρότυπων διαλυμάτων.

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων

Dehydrogenase (μg/ml)	OD
5	0,553
10	1,1375
15	1,748
20	2,359
25	2,899
30	3,3835



Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη δεϋδρογονάσης

3.4 Μέθοδοι Καλλιέργειας για την Μέτρηση Πληθυσμού Μικροοργανισμών

Οι κλασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πληθυσμού μικροβίων αφορούν συνήθως τεχνικές ανάπτυξης που προϋποθέτουν διαλύσεις και μεθόδους καλλιέργειας σε εξειδικευμένα θρεπτικά υλικά.

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών επιτρέπει την μέτρηση του συνολικού πληθυσμού ή συγκεκριμένου είδους μικροβίων ή δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών. Πραγματοποιείται με την ανάπτυξη και διατήρηση των μικροοργανισμών κάτω από τεχνητές, ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος.

Εκτός από τις κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος πρέπει να εξασφαλιστεί και το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, το θρεπτικό υλικό. Τα θρεπτικά υλικά διακρίνονται σε στερεά και υγρά. Τα υγρά μπορούν να πάρουν στερεή μορφή με την προσθήκη ενός στερεοποιητικού παράγοντα, το άγαρ. Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος εξάγεται από τα ροδοφύκη με εκχύλιση. Προστίθεται σε μικρή αναλογία στο θρεπτικό υλικό (1,5-2%) και πήζει στους 44 ^{o}C.

Στο θρεπτικό υλικό εκτός από το άγαρ πρέπει να περιέχεται :

- Πηγή άνθρακα και ενέργειας, δεδομένου ότι μας απασχολούν συνήθως ετερότροφοι μικροοργανισμοί. Συνήθως προστίθεται γλυκόζη. Οι χημειοαυτότροφοι και οι φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί έχουν ως πηγή άνθρακα το CO_2.
- Πηγή αζώτου, απαραίτητο για την σύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων.
- Ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία.
- Νερό

Συνήθως με όλα τα παραπάνω προσθέτονται και εκχυλίσματα (extracts) διαφόρων φυσικών υποστρωμάτων.

Πριν χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται σε κλίβανο αποστείρωσης έτσι ώστε να μην υπάρχουν σε αυτό ζωντανοί οργανισμοί.

Ακολουθεί εμβολιασμός (inoculation) του αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού με μια πολύ μικρή ποσότητα του μικροοργανισμού, το μόλυσμα (inoculum*)*. Είναι απαραίτητη η αποστείρωση όχι μόνο του θρεπτικού

υλικού αλλά και όλων των αντικειμένων που χρησιμοποιούνται και η οποία για μερικά από αυτά (π.χ. κρίκος) μπορεί να γίνει και την ίδια στιγμή σε φλόγα.

Μετά τον εμβολιασμό τα δοχεία καλλιέργειας (τριβλία, σωλήνες, φιάλες κ.λ.π.) μεταφέρονται για επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία στον επωαστικό θάλαμο (incubator).

Τα παρακάτω πειράματα αφορούν τη μέτρηση μικροοργανισμών χώματος χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές καλλιέργειας και συγκεκριμένα βιώσιμη ετεροτροφική καλλιέργεια. Η μέτρηση σε βιώσιμη ετεροτροφική καλλιέργεια είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ανάπτυξη μικροοργανισμών σε στερεό θρεπτικό υλικό και ανάλογα με την παρουσία ή απουσία θρεπτικών (που βοηθούν στην ανάπτυξη κάποιων βακτηρίων) ή αναστολέων γίνεται επιλογή συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών.

Αρχικά γίνεται εμβολιασμός δειγμάτων εδάφους διαφορετικής διαλυτότητας σε στερεό θρεπτικό υλικό, και στη συνέχεια αυτά επωάζονται σε κατάλληλη θερμοκρασία και αφού έχουν σχηματιστεί μακροσκοπικές αποικίες γίνεται η μέτρηση. Για την τεχνική ανάλυση χρησιμοποιείται ο όρος Colony Forming Units (CFUs) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους μικροοργανισμού ανά γραμμάριο χώματος ξηραμένου σε φούρνο, με την προϋπόθεση ότι μια αποικία προέρχεται από ένα οργανισμό. Ο μέσος όρος από δύο όμοια χρησιμοποιείται για παραπέρα υπολογισμούς.

Η διαδικασία διάλυσης γίνεται ως εξής:

Προσθέτονται 10 g υγρού χώματος σε 95ml απιονισμένου νερού και αναδεύονται καλά για τον διασκορπισμό των οργανισμών. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται 10g χώματος είναι γιατί καταλαμβάνουν όγκο περίπου 5ml. Έτσι έχοντας 10g σε 100ml συνολικό όγκο έχουμε σχηματίσει διάλυμα 1:10 w/v. Το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά. Ακολούθως 1ml του μίγματος μεταφέρεται από το μπουκάλι σε δεύτερο σωληνάριο που περιέχει 9ml του ίδιου μέσου διάλυσης όπως και στο προηγούμενο. Εδώ πρέπει να δώσει κανείς προσοχή στο να μην κατακάτσουν τα σωματίδια του χώματος πριν την μεταφορά μέρους του μίγματος, μιας και οι μικροοργανισμοί συνδέονται με αυτά τα σωματίδια ή κλείνονται μέσα σε μικροσύνολα. Το σωληνάριο κλείνει και αναδεύεται μηχανικά. Δουλεύοντας επιμελώς η σειρά διάλυσης συνεχίζεται μέχρι την υψηλότερη επιθυμητή διάλυση. Τα δύο πιο αραιά δείγματα αναπτύσσονται σε θρεπτικό άγαρ. Αναπτύσσονται δύο διαφορετικά διαλύματα έτσι ώστε να αυξάνονται οι πιθανότητες απόδοσης ικανοποιητικού αριθμού οργανισμών.

Μύκητες

Οι μύκητες εμφανίζονται σε αφθονία στη φύση και μπορούν να βρεθούν σε δείγματα χώματος, ιζημάτων, υδάτινων περιβαλλόντων όπως λίμνες, ποτάμια, θαλασσινό και πόσιμο νερό, και αποβλήτων. Είναι ετερότροφοι οργανισμοί, κυρίως αερόβιοι. Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην μορφολογία και στη φυσική τους κατάσταση και γι' αυτό παρουσιάζονται δυσκολίες κατά τον προσδιορισμό και την ταυτοποίησή τους με τεχνικές καλλιέργειας.

Οι μέθοδοι καλλιέργειας μυκήτων είναι ίδιες με αυτές των βακτηρίων αλλά τροποποιούνται για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων. Αυτό γίνεται συνήθως με την προσθήκη αντιβιοτικών ή χρωστικών, όπως Rose Bengal ή με την μείωση του pH του θρεπτικού υλικού. Δεν θεωρούνται όμως απολύτως κατάλληλες για ποσοτικό προσδιορισμό, εξαιτίας των σφαλμάτων που παρουσιάζονται κατά την μέτρηση από την παρουσία σπορωδών μυκήτων. Σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται αποικίες που προέρχονται από τους σπόρους και έτσι ο αριθμός των μετρούμενων αποικιών δεν είναι αυτός που αντιστοιχεί στον πραγματικό αριθμό αποικιών του δείγματος.

Παρόλα αυτά οι τεχνικές καλλιέργειας αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση των μυκήτων στο περιβάλλον, λαμβάνοντας υπόψη τον περιορισμό ότι οι αποικίες των μυκήτων προέρχονται είτε από ένα σπόρο, είτε από συσσωματώματα σπόρων ή μικκύλια.

Κατά την μέθοδο καλλιέργειας των μυκήτων πραγματοποιείται αρχικά η διαδικασία διάλυσης του δείγματος που περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθως το σωληνάριο που μας ενδιαφέρει αναδεύεται μηχανικά και 1ml από το μίγμα μεταφέρεται σε κάθε ένα από τα τρία αποστειρωμένα τριβλία. Το κατάλληλο άγαρ προστίθεται μαζί με το 1ml. Το άγαρ έχει τέτοια θερμοκρασία ώστε να παραμένει υγρό και να μην είναι τόσο ζεστό ώστε να σκοτώνει τους οργανισμούς ή να καταστρέφει την ευαισθησία των πρόσθετων υλικών στο άγαρ, όπως τα αντιβιοτικά. Έπειτα το τριβλίο στροβιλίζεται απαλά για το διασκορπισμό του μίγματος στο άγαρ, χωρίς να πέσει άγαρ στα τοιχώματα ή έξω από το πιάτο. Τελικά, το άγαρ αφήνεται να στερεοποιηθεί και τα τριβλία επωάζονται ανάποδα για να προληφθεί συμπύκνωση «πέφτοντας» από την αναπτυσσόμενη επιφάνεια του άγαρ. Η καταμέτρηση γίνεται μετά την απαραίτητη, για κάθε οργανισμό, περίοδο επώασης (συνήθως 5-7 μέρες).

Βακτήρια και ακτινομύκητες

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί όπως και οι ακτινομύκητες, οι οποίοι είναι και αυτοί βακτήρια αλλά διαφέρουν μορφολογικά από αυτά. Αναπτύσσονται σε μεγάλο αριθμό θρεπτικών μέσων. Κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό άγαρ τα βακτήρια παράγουν μικρές αποικίες που είναι από άχρωμες μέχρι έντονα χρωματισμένες ενώ οι ακτινομύκητες έχουν νηματοειδής ανάπτυξη. Έτσι είναι εύκολη η οπτική διάκριση των δυο αποικιών. Είναι σημαντικός ο διαχωρισμός αυτών των δυο μικροοργανισμών στο χώμα. Η δυνατότητα χρήσης των ακτινομυκήτων ως πηγή αντιβιοτικών ή εξωκυτταρικών ενζύμων οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων για την απομόνωση τους από τους άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Η ανθεκτικότητα των ακτινομυκήτων στην ανομβρία τους δίνει οικολογικό πλεονέκτημα απέναντι στα βακτήρια σε χώματα ερήμων, που είναι ξηρά και αλκαλικά. Έτσι ένας τρόπος για να μειωθεί αισθητά η εμφάνιση βακτηρίων, είναι η ξήρανση του χώματος πριν την μέτρηση βιώσιμων ετεροτροφικών επωάσεων.

Μια άλλη μέθοδος είναι η χρήση αντιβιοτικών, όπου γίνεται επιλεκτική απομόνωση των ακτινομυκήτων στο χώμα. Η προσθήκη αντιβακτηριακών παραγόντων μειώνει τις μετρήσεις ακτινομυκήτων. Ενώ αντιμυκητιακοί παράγοντες όπως cycloheximide (actinodione) και/ή nystatin προστίθενται για έλεγχο των μυκήτων.

Άλλες τεχνικές για τον διαχωρισμό ακτινομυκήτων από τα βακτήρια αφορούν την χρήση φίλτρων στην επιφάνεια του άγαρ. Επίσης η χρήση χρωστικής methyl red αναστέλλει την ανάπτυξη σπορογόνων βακτηρίων.

Έχουν αναπτυχθεί πολλά ποιοτικά τεστ για αναλύσεις μικροοργανισμών στο έδαφος και έχουν να κάνουν μόνο με τα χαρακτηριστικά των οργανισμών και όχι με την ποσότητα τους.

Ένας συνήθης τρόπος διαχωρισμού οργανισμών είναι η ανάπτυξη στο άγαρ με γράμμωση. Σε μια τέτοια καλλιέργεια, το δείγμα χώματος διαλύεται διαδοχικά και αναπτύσσεται για να παράγει καλλιέργειες με ευδιάκριτες και ξεχωριστές αποικίες. Μετά την ανάπτυξη σε μακροσκοπικό μέγεθος, οι αποικίες που μας ενδιαφέρουν ξανά αναπτύσσονται σε καινούργιο άγαρ με αποστειρωμένο inoculation loop (κρίκο) που αποχωρίζει ένα μικρό δείγμα της αποικίας. Ο κρίκος έπειτα γραμμώνει καινούργιο αποστειρωμένο

τριβλίο με άγαρ. Καθώς ο κρίκος σχηματίζει γραμμές, ο αριθμός των οργανισμών που μεταφέρονται με τον κρίκο στην καλλιέργεια ανά μονάδα μήκους μετακίνησης αυξάνεται. Ο κρίκος ξαναποστειρώνεται σε φλόγα και ακουμπάει στο τέλος της γραμμής για να πάρει μικρή ποσότητα οργανισμών. Ξανά ο κρίκος σύρεται για να διασπείρει στους οργανισμούς και επαναποστειρώνεται. Μετά την επώαση οι πρώτες γραμμές εμφανίζουν αχνή θολούρα. Στο τέλος της γραμμής ξεχωριστές αποικίες φαίνονται καθαρά. Έτσι αυτές οι καλλιέργειες υπολογίζονται για καθαρότητα αποικιών. Μορφολογικά αποκλίνουσες αποικίες στην τελική γραμμή είναι σημάδι ότι η αποικία που απομονώθηκε από την αρχική καλλιέργεια δημιουργήθηκε από περισσότερες από ένα τύπο οργανισμούς.

Υλικά και όργανα

Α) ΜΥΚΗΤΕΣ

- αποστειρωμένο νερό
- 150ml rose Bengal agar
- διάλυμα στρεπτομυκίνης αποστειρωμένο με φίλτρο,30μg/ml στο άγαρ
- 9 αποστειρωμένα τριβλία
- 6 αποστειρωμένες σιφώνια του 1ml
- απιονισμένο νερό
- ζυγός εργαστηρίου(±0.01gr.)
- μηχανικός αναδευτήρας

Β) ΒΑΚΤΗΡΙΑ

- ζυγός εργαστηρίου
- 9 τριβλία με peptone-yeast άγαρ
- αποστειρωμένο νερό
- 10 αποστειρωμένα σιφώνια του 1ml
- Glass hockey stick spreader
- αιθυλική αλκοόλη για αποστείρωση σε φλόγα
- μηχανικός αναδευτήρας
- φλόγα γκαζιού

Συλλογή Δειγμάτων , Διατήρηση και Αποθήκευση

Τα δείγματα των χωμάτων πρέπει να είναι φρέσκα και απαλλαγμένα από την περιεχόμενη υγρασία. Για τον λόγο αυτό τοποθετούμε μια επαρκή ποσότητα από κάθε δείγμα (25 g) στον κλίβανο στους 37 ^{o}C για 24 ώρες.

Εκτέλεση Πειράματος

Α) ΜΥΚΗΤΕΣ

- Ζυγίζουμε 10g δείγματος
- Ετοιμάζουμε τη σειρά 1/10 διαλυμάτων όπως περιγράφεται παρακάτω:
  - Διαλύουμε τα 10 g δείγματος σε 95 ml νερό αναδεύοντας καλά.
  - Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο σιφώνιο μεταφέρουμε 1ml του παραπάνω σε 9ml αποστειρωμένου νερού και αναδεύουμε μηχανικά.
  - Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα, χρησιμοποιώντας κάθε φορά το τελευταίο διάλυμα και φρέσκο αποστειρωμένο νερό 9 ml. Τα παραπάνω θα δώσουν διαλύματα των 10^{-1}, 10^{-2} , 10^{-3} , και 10^{-4} g χώματος ανά ml μίγματος.

Το μέσο είναι άγαρ Rose Bengal-στρεπτομυκίνη. Για την κατασκευή 1 λίτρου άγαρ Rose Bengal χρησιμοποιούνται

- 10 g γλυκόζης
- 5 g πεπτόνης
- 1 g όξινου φωσφορικού καλίου
- 0,5 g ένυδρου θειικού μαγνησίου
- 0,033 g Rose Bengal
- 15 g άγαρ
- 1000 ml νερό

Αποστειρώνουμε το μείγμα στους 45 ^{o}C αφού το αναδεύσουμε καλά. Προσθέτουμε τη στρεπτομυκίνη στο άγαρ αφού έχει κρυώσει αρκετά (45 ^{0}C). Κατά αυτό τον τρόπο πετυχαίνεται σωστή συγκέντρωση στρεπτομυκίνης (30μgr./ml). Ετοιμάζουμε δύο καλλιέργειες για κάθε ένα

από τα διαλύματα , 10^{-3} και 10^{-4} προσθέτοντας 1 ml από κάθε διάλυμα σε δύο αποστειρωμένα τριβλία. Τα τελικά διαλύματα θα έχουν , 10^{-3} και 10^{-4} g χώματος ανά καλλιέργεια. Αμέσως μετά προσθέτουμε περίπου 15 ml άγαρ σε κάθε τριβλίο στροβιλίζοντας απαλά ώστε να κατανεμηθεί το χώμα στο μέσο. Αφήνουμε για 10 λεπτά να στερεοποιηθεί και μετά το τοποθετούμε ανάποδα για επώαση σε RT για μία εβδομάδα.

Β) ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Η διαδικασία δημιουργίας των διαλυμάτων είναι ακριβώς ίδια με αυτήν που προαναφέρθηκε με μόνη διαφορά ότι στα τριβλία για τα βακτήρια χρησιμοποιείται peptone-yeast άγαρ.

Για την κατασκευή 1 λίτρου peptone-yeast άγαρ χρησιμοποιούνται

5 g πεπτόνης

3 g yeast extract

15 g άγαρ

1000 ml νερό

Αποστειρώνουμε το μείγμα στους 45°C αφού το αναδεύσουμε καλά. Προσθέτουμε 10 ml χλωριούχο ασβέστιο συγκεντρώσεως 1M για την ρύθμιση του pH στο 7.Φτιάχνουμε δύο καλλιέργειες εξάπλωσης για τα διαλύματα 10^{-3} ,10^{-4} τοποθετώντας 0,1ml από κάθε διάλυμα σε δύο τριβλία με peptone-yeast άγαρ (έτσι αυξάνεται η πραγματική διάλυση με ένα παράγοντα του δέκα).Κάνοντας χρήση του αποστειρωμένου κρίκου διασκορπίζουμε το υγρό στην επιφάνεια του μέσου. Τοποθετούμε τις καλλιέργειες, ανάποδα, σε RT για επώαση για μια εβδομάδα.

Ανάλυση Δεδομένων- Υπολογισμοί

Μετά από την επώαση των καλλιεργειών καταγράφουμε τις αποικίες μυκήτων και βακτηριών για τα διαλύματα χώματος .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα Χλωροφύλλης

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης μας δώσανε με βάση την πρότυπη καμπύλη τις ακόλουθες τιμές συγκέντρωσης της Χλωροφύλλης για κάθε δειγματοληψία:

Ά Δειγματοληψία

Πίνακας 3

Αρ. Δείγματος	Τιμή συγκεντρώσεως (μg/l)	Ένδειξη οργάνου
1	1,441302	7,765
2	2,641373	12,5
3	7,236692	30,58
4	137,3991	544,2

Ί Β Δειγματοληψία

Πίνακας 4

Αρ. Δείγματος	Τιμή συγκεντρώσεως (μg/l)	Ένδειξη οργάνου
1	56,60021	225.45

4.2 Αποτελέσματα Δεϋδρογονάσης

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης μας δώσανε με βάση την πρότυπη καμπύλη τις ακόλουθες τιμές συγκέντρωσης της Δεϋδρογονάσης για κάθε δειγματοληψία:

Ά Δειγματοληψία

Πίνακας 5

Αρ. Δείγματος	Ένδειξη οργάνου	DEYDR (mg/ml)
1	0,063	0,47556719
2	0,09	0,711169284
3	0,047	0,335951134
4	0,007	0
5	0,03	0,187609075
6	0,534	4,585514834

Έ Β Δειγματοληψία

Πίνακας 6

Αρ. Δείγματος	Ένδειξη οργάνου	DEYDR (mg/ml)
1	0,01	0,013089005
2	0,007	0
3	0,006	0
4	0,012	0,030541012
5	0,442	3,782722513
6	0,027	0,161431065

4.3 Αποτελέσματα Καλλιέργειας Μικροοργανισμών

Μετά την επώαση των καλλιεργειών παρατηρήθηκαν στα τριβλία 10 διαφορετικά είδη μυκήτων και 13 διαφορετικά είδη βακτηρίων τα οποία αναφέρονται παρακάτω, για να μπορούμε να τα διακρίνουμε, ως: Είδος Ά, Είδος ΄Β κλπ.

ΜΥΚΗΤΕΣ

Ά Δειγματοληψία

Πίνακας 7

	ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ (CFU/g χώματος) ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΩΜΑΤΟΣ					
ΕΙΔΗ	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	33500	20250	5000	4000		12000
B	500	6000	5750	8000	3500	10000
C	500		5500			10000
D	5000	14750	1500	8500	3000	
E		6500	3000	21000	4000	22750
F			5000			500
G					1000	
H						12750
I						3250
J		5000				10000

΄Β Δειγματοληψία

Πίνακας 8

	ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ (CFU/g χώματος) ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΩΜΑΤΟΣ					
ΕΙΔΗ	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	10000				10000	
B	20000	10000	10000		90000	25000
C	10000	10000		10000		10000
D						10000
E	10000	10000		20000	10000	
F						
G	10000		10000	10000	15000	30000
H			10000		20000	

ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ά Δειγματοληψία

Πίνακας 9

	ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (CFU/g χώματος) ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΩΜΑΤΟΣ					
ΕΙΔΗ	1	2	3	4	5	6
A	21000				40000	
B	22000	54000	100000	530000	62000	1100000
C		3000	60000		30000	30000
D		9000	60000	10000	58000	220000
E			20000		150000	
F				10000		
G				20000		
H						220000
I						20000
J						120000

Έ Δειγματοληψία

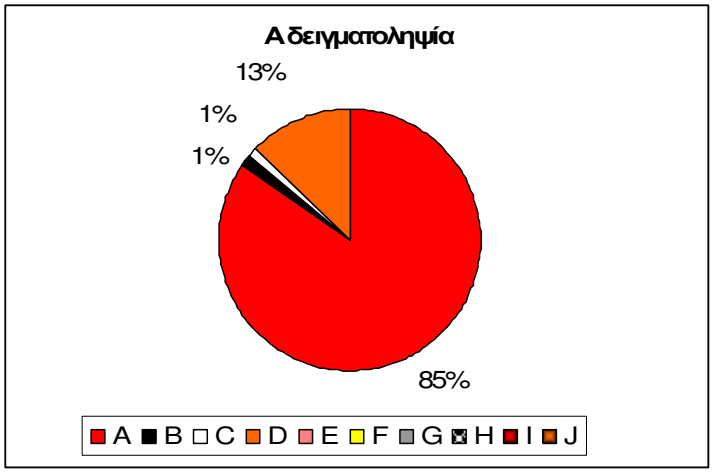
Πίνακας 10

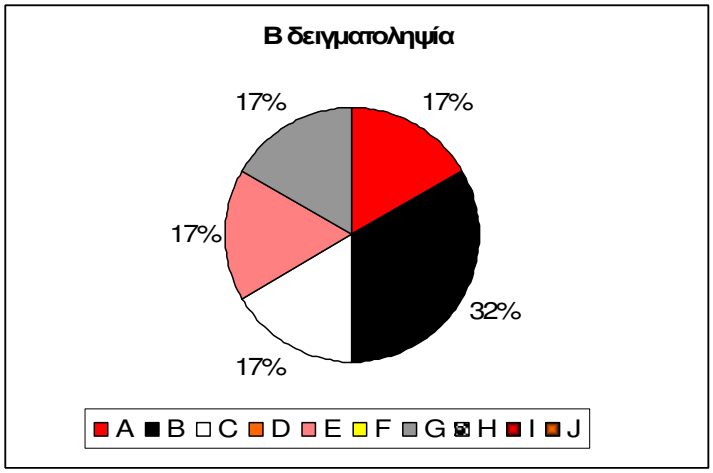
	ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (CFU/g χώματος) ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΩΜΑΤΟΣ					
ΕΙΔΗ	1	2	3	4	5	6
A		15000				
B	10000	10000	15000	220000	270000	75000
C				10000	85000	15000
D	15000	25000		15000		35000
E					20000	
F						
G	30000				30000	10000
H						
I	10000	20000	10000	10000	20000	10000
J						
K	190000	30000	10000		225000	60000
Λ		10000		10000	15000	10000
M					10000	

Σε κάθε δείγμα η ποικιλότητα των μυκήτων και βακτηρίων που εμφανίστηκαν ανά δειγματοληψία παρουσιάζεται στα ακόλουθα διαγράμματα:

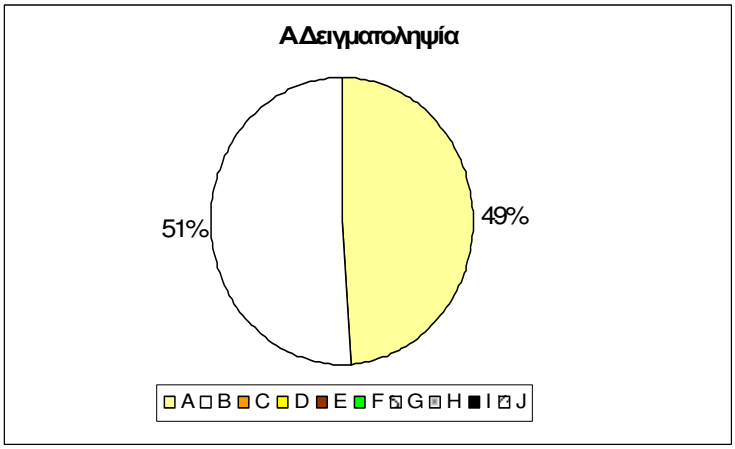
▪ **Δείγμα 1**

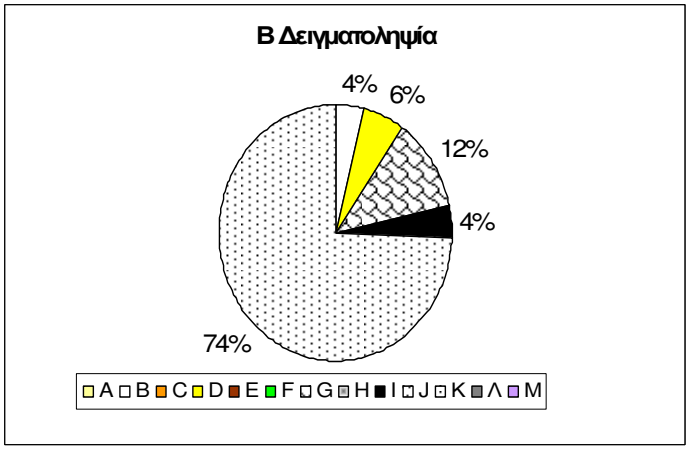
Μύκητες





Βακτήρια

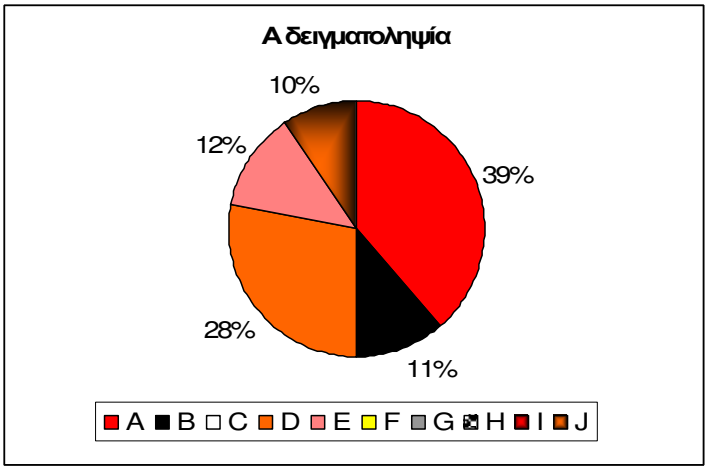


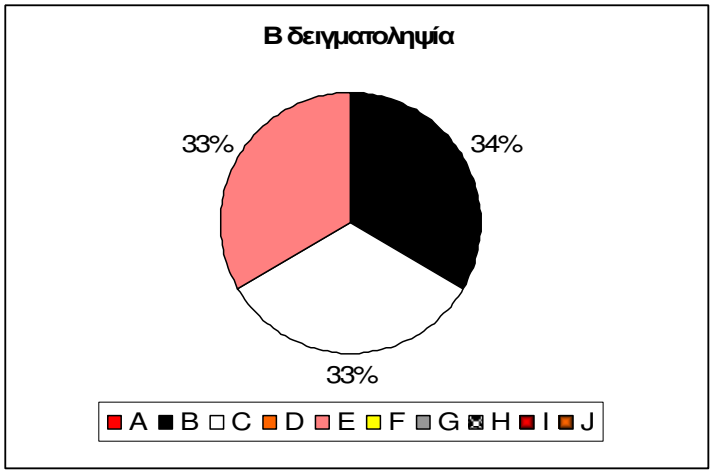


Εικόνα 15: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 1 για τις δύο δειγματοληψίες

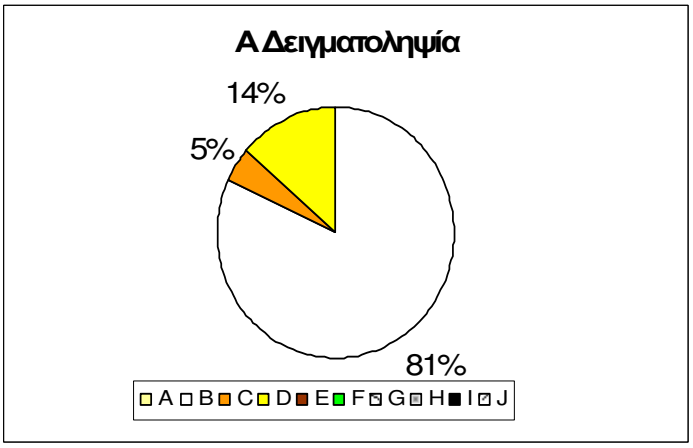
▪ **Δείγμα 2**

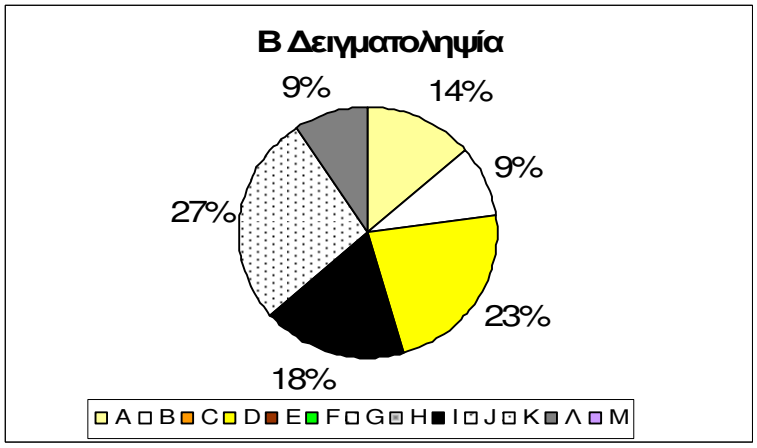
Μύκητες





Βακτήρια

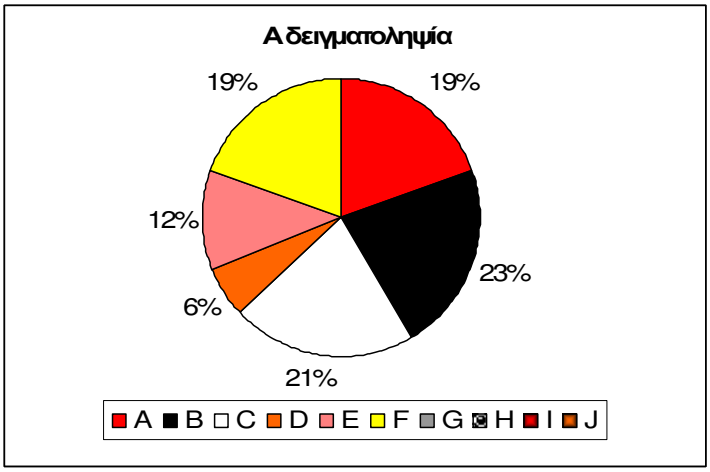


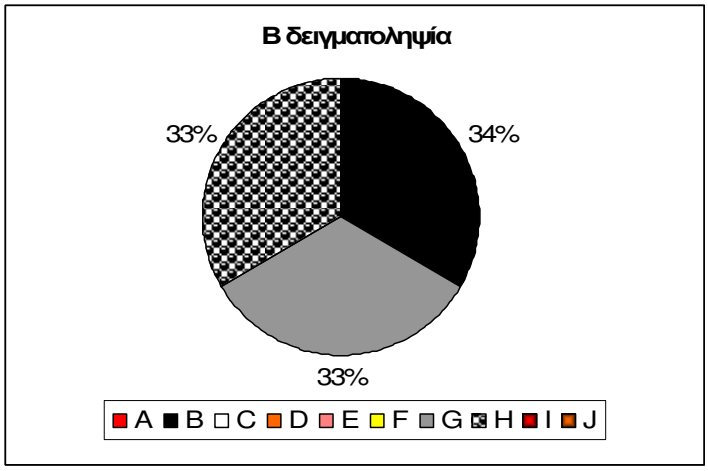


Εικόνα 16: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 2 για τις δύο δειγματοληψίες

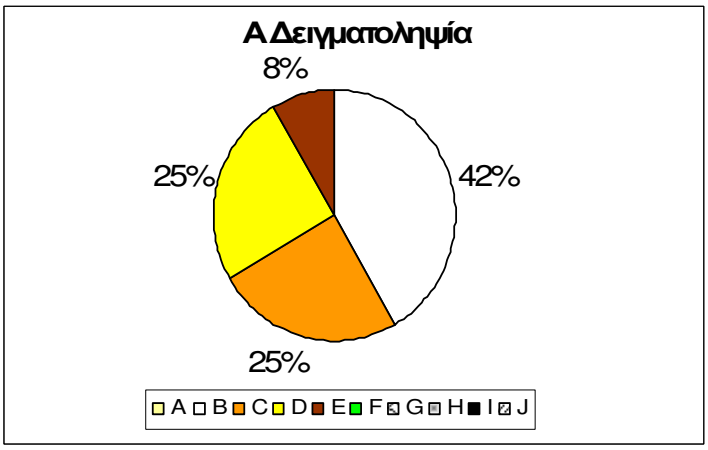
▪ **Δείγμα 3**

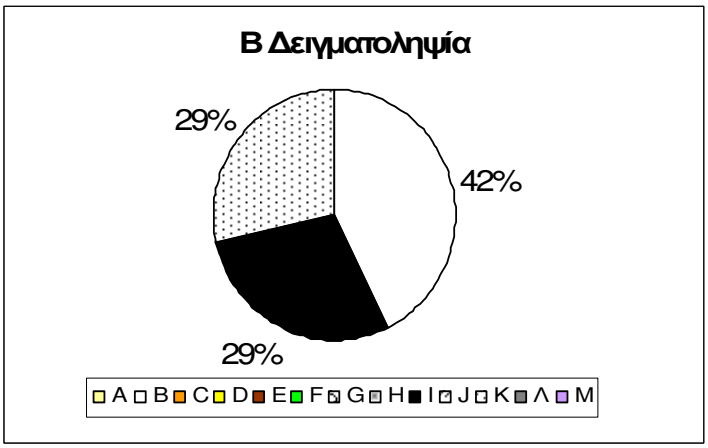
Μύκητες





Βακτήρια

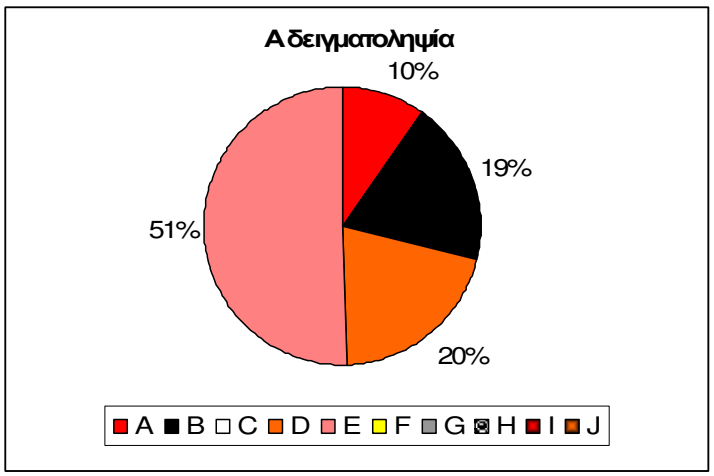


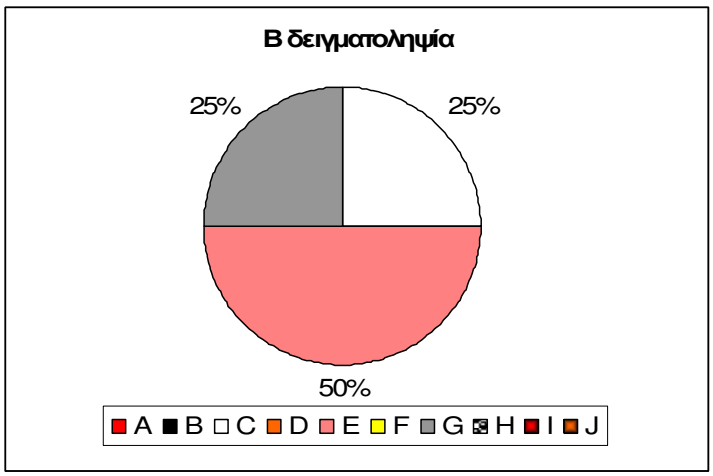


Εικόνα 17: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 3 για τις δύο δειγματοληψίες

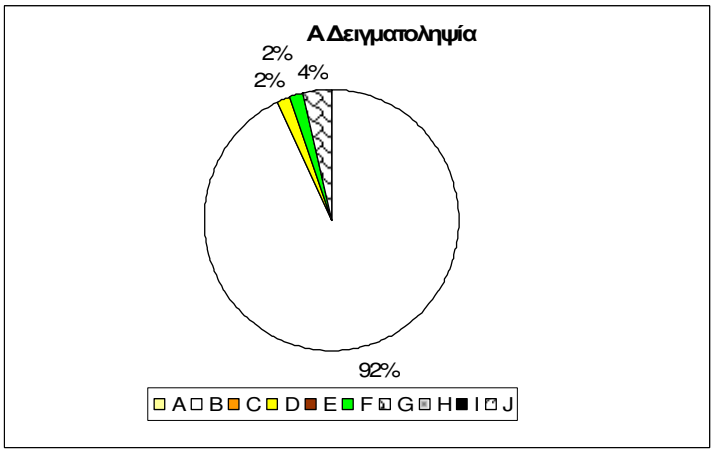
▪ **Δείγμα 4**

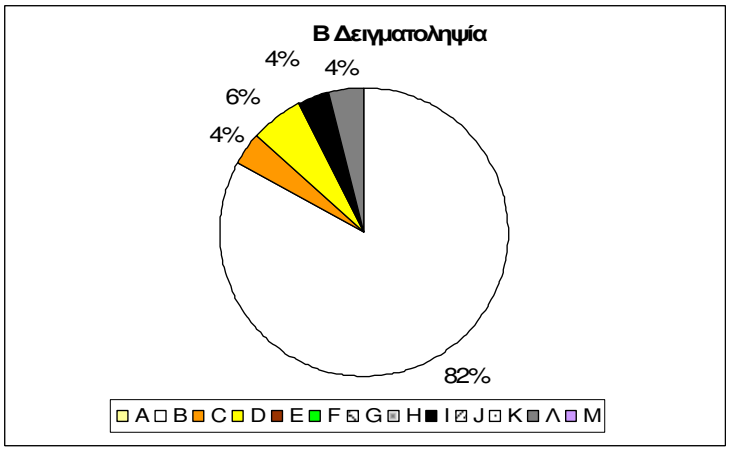
Μύκητες





Βακτήρια

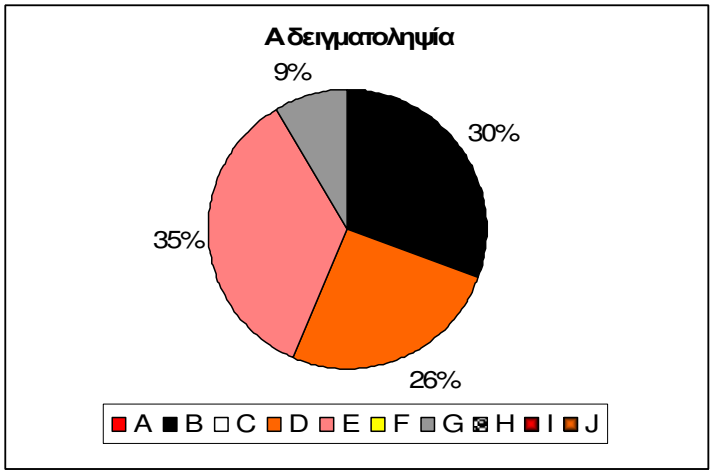


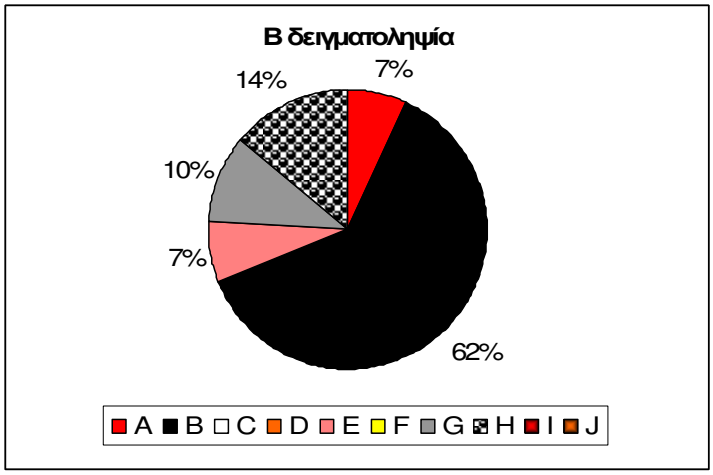


Εικόνα 18: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 4 για τις δύο δειγματοληψίες

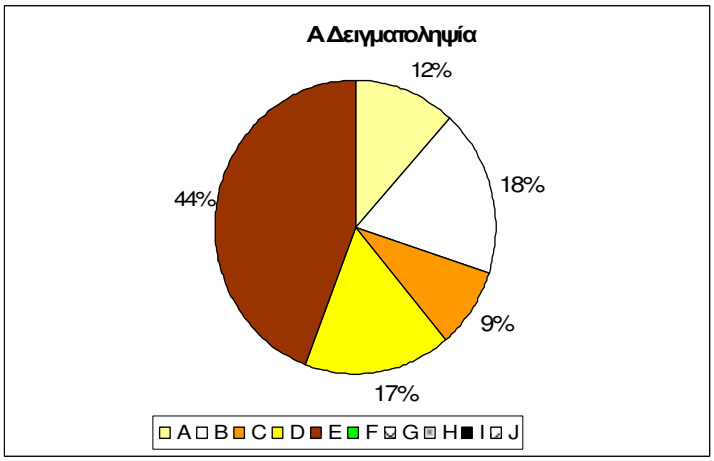
▪ **Δείγμα 5**

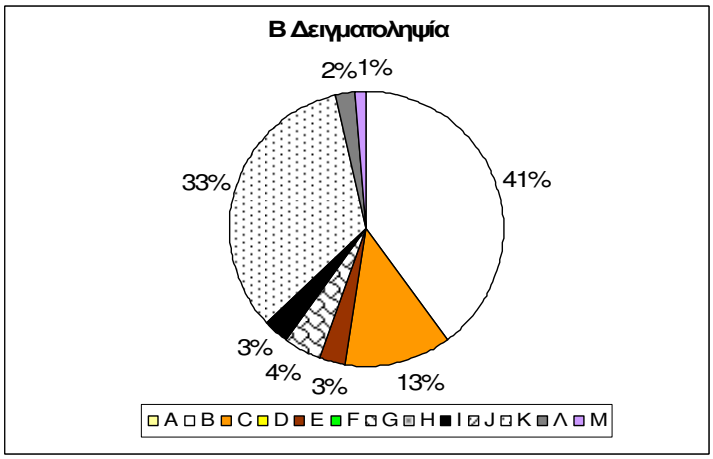
Μύκητες





Βακτήρια

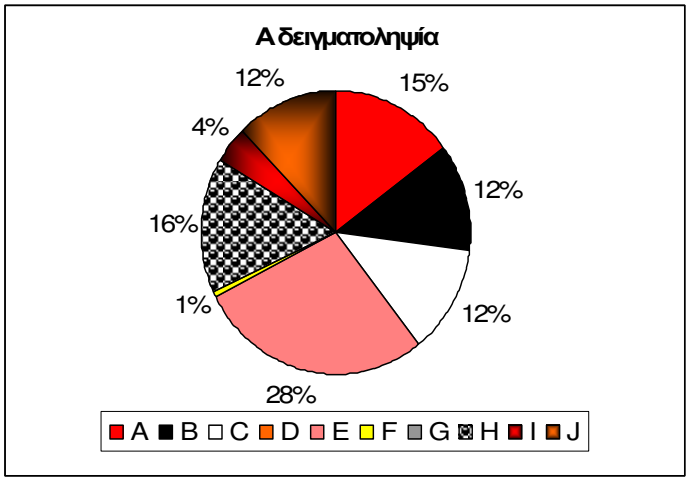


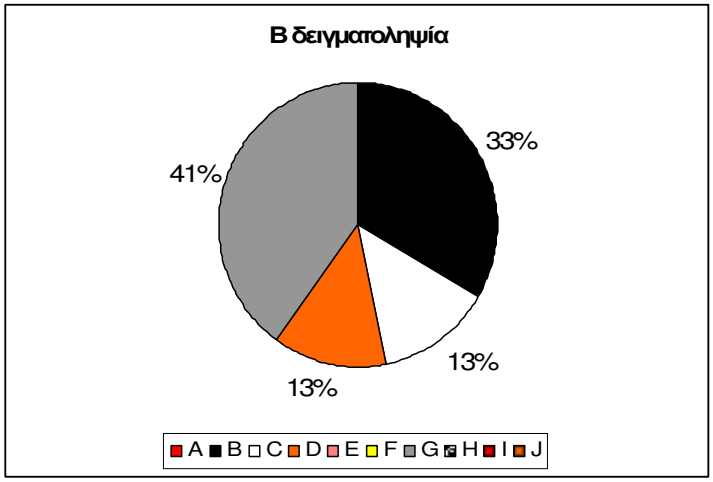


Εικόνα 19: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 5 για τις δύο δειγματοληψίες

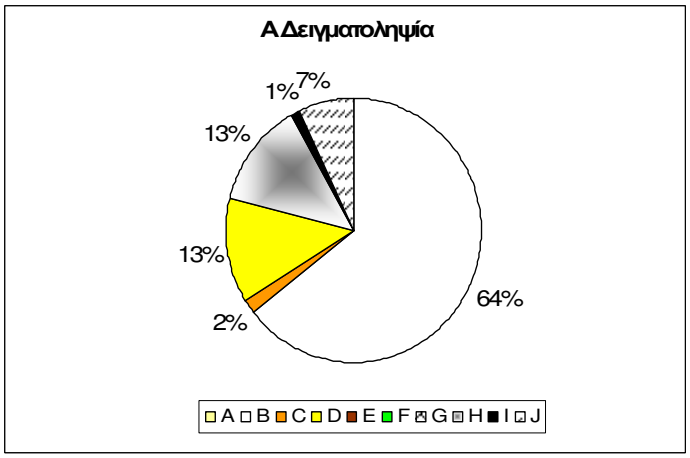
▪ **Δείγμα 6**

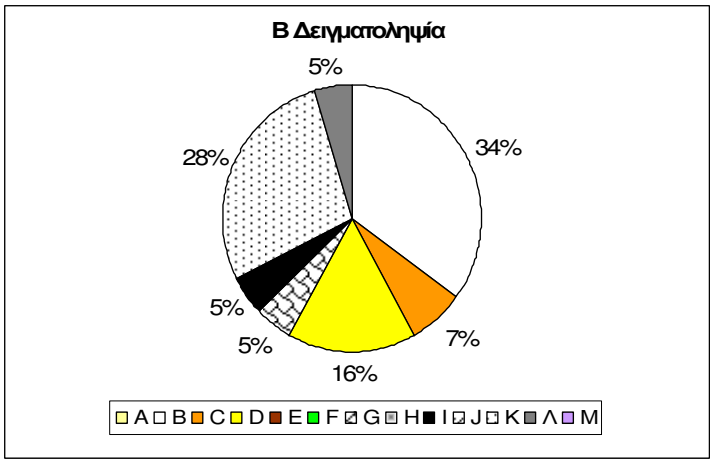
Μύκητες





Βακτήρια





Εικόνα 20: Παρουσία των διαφορετικών ειδών μυκήτων & βακτηρίων (%) στο δείγμα 6 για τις δύο δειγματοληψίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία είχε σαν σκοπό την μελέτη της επίδρασης των θερμοκηπιακών καλλιεργειών στην περιοχή της Φαλάσαρνας όσον αφορά κυρίως στη μικροβιακή ποικιλότητα της περιοχής. Γι' αυτό το σκοπό επιλέχθηκαν καλλιεργητικές μέθοδοι, ενώ παράλληλα έγιναν εκτιμήσεις των δεικτών της χλωροφύλλης και του ενζύμου «δεϋδρογονάση». Τόσο οι μικροβιακές καλλιέργειες όσο και οι άλλοι δύο δείκτες επιλέχθηκαν για μια πρώτη εκτίμηση των επιδράσεων των θερμοκηπίων στους μικροοργανισμούς του εδάφους της συγκεκριμένης περιοχής και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το βαθμό ποιότητας του εδάφους.

Το επίκεντρο της εργασίας ήταν η ανάδειξη τυχόν διαφοροποιήσεων στη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού στις επιλεγμένες περιοχές δειγματοληψίας. Για τη δειγματοληψία εδάφους επιλέχθηκαν 6 σημεία, εκ των οποίων τα 4 πρώτα ήταν πλησίον θερμοκηπίων και αρδευτικών καναλιών τους, όπου κατέληγαν οι απορροές των θερμοκηπίων. Τα δύο τελευταία ήταν σε περιοχές απομακρυσμένες από τα θερμοκήπια και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίστηκαν ως υγιείς, προκειμένου να αναδειχθεί κάποια διαφοροποίηση στις τιμές των επιλεγμένων παραμέτρων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα νερού από τα αρδευτικά κανάλια, όπου αυτό ήταν εφικτό.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν η πρώτη το Νοέμβριο του 2008 και η δεύτερη το Μάιο του 2009.

Μικροβιακή ποικιλότητα μεταξύ των δειγμάτων

<u>1η Δειγματοληψία</u>

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 7 προκύπτει σαφής διακύμανση των ειδών των μυκήτων μεταξύ των δειγμάτων. Ο αριθμός των ειδών ποικίλει από 4 έως 8 με μικρότερο αριθμό στο 1^{ο} δείγμα (4) και μεγαλύτερο στο 6^{ο} (8).

Όσον αφορά τον πληθυσμό των μυκήτων παρατηρήθηκε σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων αλλά και διαφορετική εμφάνιση των ειδών ανάμεσα στα δείγματα. Τα είδη A, D και E παρατηρούνται στο 83%

των δειγμάτων, το Β στο 100 %, το C στο 50 %, τα F και J στο 33 % ενώ τα G, H, I στο 17 %.
Αντίστοιχα ο Πίνακας 8 μας πληροφορεί για μια παρόμοια διακύμανση των ειδών των βακτηρίων μεταξύ των δειγμάτων. Ο αριθμός των ειδών ποικίλει από 2 έως 6 με μικρότερο αριθμό στο $1^{ο}$ δείγμα (2) και μεγαλύτερο στο $6^{ο}$ (6).
Επίσης παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων και διαφορετική εμφάνιση των ειδών ανάμεσα στα δείγματα με τα είδη Α και Ε να συμμετέχουν στο 33 % των δειγμάτων, το Β στο 100%, το D στο 83 % , το C στο 67 % και τα είδη F,G,H,I και J στο 17 %.

2η Δειγματοληψία

Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 για τους μύκητες με τον αριθμό των ειδών να ποικίλει από 3 έως 5 με μικρότερο αριθμό στο $2^{ο}$ δείγμα (3) και μεγαλύτερο στο $5^{ο}$ και το $1^{ο}$ (6).
Η εμφάνιση των ειδών ανάμεσα στα δείγματα είναι με τα είδη Α και Η με ποσοστό συμμετοχής στα δείγματα 33 %, τα Β και G με 83 %, τα Ε και C με 67 % και το είδος D με ποσοστό 17%.
Κατά αντιστοιχία από τον Πίνακα 10 των βακτηρίων παρατηρούμε ότι ο μικρότερος αριθμός των ειδών παρουσιάζεται στο $3^{ο}$ δείγμα (3) ενώ στο 5^{0} δείγμα βρίσκεται ο μεγαλύτερος (8). Η κατανομή εδώ είναι για τα είδη Β και Ι στο 100% των δειγμάτων, τα Ε,Μ,Α στο 17% , το είδος Κ συμμετέχει στο 83 %, τα G και C στο 50%ενώ τα είδη D και Λ στο 67%.

Συγκρίνοντας τις δύο δειγματοληψίες μεταξύ τους παρατηρούμε ότι η Ί Β Δειγματοληψία χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ποικιλότητα σε σχέση με την Ά, τόσο σε επίπεδο διαφορετικότητας των ειδών όσο και σε επίπεδο αριθμητικής εκτίμησης των πληθυσμών. Ενδεχόμενοι λόγοι για την παραπάνω διαφορά είναι αφενός μεν οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών την περίοδο του Μαΐου (θερμοκρασία, ηλιοφάνεια...) αντί του Νοεμβρίου. Αφετέρου υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ψεκασμού των θερμοκηπίων με ζιζανιοκτόνα και άλλα απολυμαντικά, τα οποία πιθανώς να

καταστέλλανε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών την συγκεκριμένη περίοδο.

Επίσης, ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει αποφασιστικά στη σύσταση μικροβιακών κοινοτήτων στο έδαφος είναι τα όμβρια ύδατα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα όμβρια ύδατα φέρουν εκτός των άλλων και μικροοργανισμούς και αναλόγως των βροχοπτώσεων μπορεί να αλλάξουν τη σύνθεση των πληθυσμών μικροβίων. Οπότε, στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεδομένου ότι το Μάιο που έγινε η δεύτερη δειγματοληψία είχε παρέλθει περίοδος έντονων βροχοπτώσεων η μικροβιακή σύσταση των δειγμάτων άλλαξε πιθανώς λόγω του μικροβιακού φορτίου των όμβριων υδάτων (βλ. Διάγραμμα 1).

Και στις δύο δειγματοληψίες παρατηρούμε σαν γενική εικόνα μεγαλύτερη ποικιλότητα στα δείγματα 5 και 6 τόσο σε μύκητες όσο και σε βακτήρια σε σχέση με τα 4 πρώτα. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ένα δείγμα εδάφους αποτελεί δείκτη καλής ποιότητας, λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών, ο οποίος είναι η ολοκληρωμένη αποικοδόμηση του οργανικού υλικού. Τα δείγματα 5 & 6 έχουν μεγάλο βαθμό μικροβιακής ποικιλότητας και ικανοποιητικό αριθμό μικροοργανισμών ανά γραμμάριο που έγιναν οι μετρήσεις, υποδηλώνοντας ότι επιτελείται η διαδικασία της ανοργανοποίησης και η ολοκλήρωση των σχετικών βιογεωχημικών κύκλων. Αντίθετα, τα δείγματα που ελήφθησαν πλησίον των θερμοκηπίων παρουσίασαν χαμηλούς αριθμούς μικροοργανισμών και περιορισμένη ποικιλότητα, στοιχεία που τα καθιστούν μη υγιή. Οι μικροοργανισμοί για την ανάπτυξή τους χρειάζονται ανόργανα άλατα, τα οποία διοχετεύονται στο περιβάλλον από τη λειτουργία των θερμοκηπίων. Εντούτοις, στη συγκεκριμένη περίπτωση το ποσό τους ξεπερνά τα αποδεκτά όρια, καθιστώντας ανοξικές τις συνθήκες και καθόλου ευνοϊκές για τους αερόβιους μικροοργανισμούς που εξετάσαμε.

Οφείλουμε να τονίσουμε το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητικές τεχνικές για την ανάδειξη και καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας στα υπό εξέταση δείγματα. Το γεγονός αυτό περιορίζει κατά πολύ τα εξαγόμενα αποτελέσματα, δεδομένου ότι πρόκειται για περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς, εκ των οποίων μόνο ένα μικρό

ποσοστό καλλιεργείται. Γενικά χαρακτηρίζονται «ζωντανοί αλλά μη καλλιεργήσιμοι» μικροοργανισμοί (viable but non culturable). Αυτό αποτελεί ένα γενικότερο πρόβλημα στις μελέτες περιβαλλοντικών μικροβιακών στελεχών, το οποίο δύναται να αντιμετωπιστεί με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών, οι οποίες αναλύουν κι επεξεργάζονται το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών, αποφεύγοντας έτσι το «εμπόδιο» των καλλιεργειών. Εντούτοις, πολλοί ερευνητές επιμένουν στη χρήση κι εφαρμογή των καλλιεργειών, καθώς δίνουν άμεσα αποτελέσματα, σχετικά εύκολα και με χαμηλό κόστος, το οποίο είναι καθοριστικός παράγοντας κυρίως κατά την εφαρμογή περιβαλλοντικών μελετών. Επίσης, οι καλλιέργειες παραμένουν ακόμα στην προτίμηση των ερευνητών καθώς δεν απαιτούν δύσκολα πρωτόκολλα κι εξειδικευμένες γνώσεις μοριακής και κυτταρικής βιολογίας [12].

Κρίνοντας τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν μπορούμε να πούμε ότι είναι κατάλληλες για να αποκτήσουμε κάποια γενικά συμπεράσματα και μια ενδεικτική εικόνα καθώς το πεδίο μελέτης των μικροοργανισμών είναι πάρα πολύ μεγάλο και διαρκώς σε εξέλιξη. Ιδιαίτερο πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την κατηγοριοποίηση των μυκήτων, οι οποίοι διακρίνονται από εκτεταμένη ποικιλομορφία και ξεχωριστά χαρακτηριστικά για κάθε είδος, τα οποία πολλές φορές δεν είναι διακριτά. Γενικά, όταν επιλεγούν οι καλλιεργητικές μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακής ποικιλότητας συνιστάται η ταυτόχρονη παρατήρηση στο μικροσκόπιο, το οποίο είναι σε θέση να συμβάλει στην αποφυγή λαθών.

Δεϋδρογονάση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο τμήμα της εισαγωγής οι αφυδρογονάσες είναι ένζυμα που περιέχονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτά τα ένζυμα που έχουν μια εξαιρετικά ειδική δράση, παίρνουν μέρος σε πολλές αντιδράσεις που αφορούν μεταφορά ζεύγους ηλεκτρονίων. Σε καταβολικές αντιδράσεις όπως αντιδράσεις που αφορούν τροποποίηση συμπλόκων ή ενώσεων υψηλής ενέργειας σε απλούστερες ή χαμηλής ενέργειας ενώσεις, οι αφυδρογονάσες καταλύουν τη μεταφορά ζεύγους ηλεκτρονίων από κάποιο υπόστρωμα σε κάποια άλλη ένωση, χρησιμεύοντας έτσι σαν μεταφορείς ηλεκτρονίων. Η μέτρηση των ενζύμων

αυτών σε δείγματα εδάφους αποτελεί μια κλασική μέθοδο εκτίμησης της αναπνοής και γενικότερα μεταβολικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές κατά την ανάλυση των δειγμάτων 5 & 6 (υγιή δείγματα) και στις δύο δειγματοληψίες, σε αντίθεση με τα εδάφη πλησίον των θερμοκηπίων, όπου σε ορισμένες μετρήσεις φτάνει και το μηδέν (βλ. Πίνακες 5, 6).

Οι τιμές των αφυδρογονασών όπως αυτές ελήφθησαν για τα συγκεκριμένα δείγματα μας πληροφορούν κυρίως για το πλήθος μικροβιακού φορτίου στο έδαφος και όχι τόσο για την ποικιλότητα αυτού. Εντούτοις, αποτελεί έναν από τους σημαντικούς δείκτες ποιότητας εδαφών, δεδομένου ότι μας πληροφορεί για το πλήθος των αποικοδομητών [13].

Παρόλα αυτά η καταλληλότητα της χρήσης αφυδρογονασών για τη μέτρηση μικροβιακής δραστηριότητας συναντά προβλήματα. Δεν πιστεύεται ότι οι αφυδρογονάσες είναι ενεργές στο έδαφος όσο τα εξωκυτταρικά ένζυμα [9]. Επίσης, οφείλουμε να επισημάνουμε ότι δεν υπάρχουν σαφή και διακριτά όρια εντός των οποίων ένα έδαφος να χαρακτηρίζεται υγιές ή ευτροφικό βάσει της μέτρησης των αφυδρογονασών.

Χλωροφύλλη

Βάσει βιβλιογραφιών [11], οι τιμές της χλωροφύλλης που έχουν υπολογιστεί σε ύδατα απορροών πλησίον των 4 πρώτων σημείων, μας διευκρινίζουν ότι βρισκόμαστε σε μια περιοχή σχετικά κοντά στην ευτροφική ζώνη και σε κάποιες περιπτώσεις την ξεπερνάμε κατά πολύ. Συγκεκριμένα οι τιμές και τα όρια που υποδεικνύονται είναι:

Τιμές χλωροφύλλης 1-4μg/l → ολιγοτροφικό περιβάλλον

Τιμές χλωροφύλλης 5-10μg/l → μεσοτροφικό περιβάλλον

Τιμές χλωροφύλλης >10μg/l → ευτροφικό περιβάλλον

Σύμφωνα με τα παραπάνω τα δείγματα που εξετάστηκαν για παρουσία και καταμέτρηση χλωροφύλλης χαρακτηρίζονται ως εξής:

Κατά τη δειγματοληψία Νοεμβρίου τα δείγματα 1 & 2 ολιγοτροφικά, το δείγμα 3 μεσοτροφικό και το 4 ευτροφικό. Συγκεκριμένα θα μπορούσαμε να το χαρακτηρίσουμε υπερτροφικό, καθώς η τιμή είναι μεγαλύτερη των 20μg/l. Επίσης υπερτροφικό ήταν το δείγμα που συλλέχθηκε το Μάιο κατά τη δεύτερη δειγματοληψία.

Επισημαίνουμε ότι δεν κατέστη δυνατόν να πάρουμε όλα τα προβλεπόμενα δείγματα κατά τη δεύτερη δειγματοληψία. Ωστόσο, ιδιαίτερα στα δείγματα 3 & 4 φαίνονται οι επιπτώσεις λειτουργίας των θερμοκηπίων από τις τιμές της χλωροφύλλης που πήραμε. Όσον αφορά στα δείγματα 1 & 2 οι τιμές που πήραμε ήταν χαμηλές, γεγονός που δεν δικαιολογείται απόλυτα, καθώς τα συγκεκριμένα σημεία βρίσκονταν σε κανάλια απορροών των θερμοκηπίων και παράλληλα η μικροβιακή ποικιλότητα ήταν μικρή (βλ. Πίνακες 3, 4). Μια πιθανή αιτία που πήραμε χαμηλές τιμές είναι το γεγονός ότι είχε προηγηθεί περίοδος βροχοπτώσεων, οι οποίες προκάλεσαν αραίωση των στραγγισμάτων. Επίσης, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα υποδηλώνουν την αδυναμία του δείκτη αυτού για την εκτίμηση ποιότητας περιβάλλοντος. Εντούτοις, προσέθεσε στοιχεία στις υπόλοιπες μετρήσεις μας για μια συνολική αποτίμηση της κατάστασης.

Τελικό Συμπέρασμα – Μελλοντικές Προοπτικές

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν σαφώς επιπτώσεις στο περιβάλλον εξαιτίας της λειτουργίας θερμοκηπίων στα Φαλάσαρνα. Επικεντρωθήκαμε κυρίως στην ανάδειξη επιπτώσεων στη μικροβιακή ποικιλότητα στο έδαφος της περιοχής, η οποία έχει σημασία για την ποιότητα του εδάφους και την αποικοδόμηση του οργανικού υλικού που περιέχεται σε αυτό. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η λειτουργία των θερμοκηπίων υποβαθμίζει ποιοτικά την εδαφική μικροβιακή ποικιλότητα, την οποία βρήκαμε εξαιρετικά περιορισμένη, ιδιαίτερα σε δείγματα πλησίον αρδευτικών καναλιών, που δέχονται τις απορροές των θερμοκηπίων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι σε δείγματα απομακρυσμένα των θερμοκηπίων η κατάσταση ήταν κατά πολύ βελτιωμένη, επιβάλλει περαιτέρω ελέγχους και μέτρα διαχείρισης, ώστε να περιοριστεί ή και να σταματήσει η υποβάθμιση της περιοχής.

Επισημαίνεται ότι ήταν η πρώτη φορά που έγινε προσπάθεια εκτίμησης της μικροβιακής ποικιλότητας στη συγκεκριμένη περιοχή, με κύριο στόχο να αναδειχθεί η ανάγκη για βελτίωση των εδαφικών χαρακτηριστικών της περιοχής. Περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να διεξαχθεί με εφαρμογή επιπλέον μεθόδων και κυρίως μοριακών, οι οποίες για λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί, έχουν τη δυνατότητα να αναδείξουν

την κατάσταση στην πραγματική της διάσταση αντικατοπτρίζοντας μια πιο ρεαλιστική εικόνα για τη μικροβιακή ποικιλότητα στα Φαλάσαρνα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ντάφης Σ. Ε. Παπαστεργιάδου, Κ. Γεωργίου, Δ. Μπαμπαλώνας, Θ. Γεωργιάδης, Μ. Παπαγεωργίου, Θ. λαζαρίδου και Β. Τσιαούση. 1997. Οδηγία 92/43/ΕΟΚ. Το έργο των Οικοτόπων στην Ελλάδα: Δίκτυο ΦΥΣΗ 2000. Συμβόλαιο αριθμός Β4-3200/84/756. Γεν. Δ/νση XI ΕΕ, Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας - ΕΚΒΥ. 932 σελ.

2. Σφουγγάρης Αθ., Βιοποικιλότητα Αγροτικών Οικοσυστημάτων. Διατμηματικό ΠΜΣ, Σχολής Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Σταμάτη Φωτεινή , Υδρολογία και Γεωχημεία των Μεσογειακών Εποχικών Λιμνίων (ΜΕΛ) της Δυτικής Κρήτης , ΠΜΣ Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική,Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης

4.Κιζλάρη Έλλη, Μελέτη Ρύπανσης Εδάφους Θερμοκηπίων Από Φυτοφάρμακα, ΠΜΣ Γεωτεχνολογία και Περιβάλλον, Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Πολυτεχνείο Κρήτης.

5. Δρ. Θεόδωρος Κουσουρής,Φαλάσσαρνα και Natura-2000, Ινστιτούτο Εσωτερικών Υδάτων, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών.

6.Ταμπακάκη Α., Μοριακές Μέθοδοι Μικροβιακής Οικολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

7. Ιστοσελίδα του προγράμματος LIFE-ΦΥΣΗ 2004 ‘‘Δράσεις Προστασίας των Μεσογειακών Εποχικών Λιμνίων Νήσο Κρήτη’ (http://www.life-kriti.gr).

8. Ιστοσελίδα Δήμου Χανίων (http://www.chania.gr)

9. «Environmental Microbiology», Raina M. Maier, Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, Academic Press 2005.

10. Linfei Zhou, Shiguo Xu, 2006. Application of Grey Clustering Method

in Eutrophication Assessment of Wetland. Journal of American Science, 2(4), 53-58.

11. http://books.google.gr/books?id=4ru_0wmkCkwC&pg=PA203&lpg=PA203&dq=chla+eutrophication+limits&source=bl&ots=u_-6xFyGQL&sig=RgjwMaTmQ2FW6Wz11McGadXiY0o&hl=el&ei=BSYuSpXkCsiPsAaJoqHACQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8

12. Pious Thomas, Ganiga K. Swarna, Pulak K. Roy, Prakash Patil, 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. Plant Cell Tiss Organ Cult 93:55–63.

13. Claire Serra-Wittling, Sabine Houot, Enrique Barriuso, 1995. Soil enzymatic response to addition of municipal solid-waste compost. Biol Fertil Soils, 20:226-236.