



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«Επίδραση υπολειμμάτων εκτροφής του εντόμου *Tenebrio molitor* στην ανάπτυξη και σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά σπανάκιου (*Spinacea oleracea*)»

Λιχούνας Αριστοτέλης

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λεβίζου Ευθυμία

Βόλος, 2023

«Επίδραση υπολειμμάτων εκτροφής του εντόμου *Tenebrio molitor* στην ανάπτυξη και σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά σπανάκιου (*Spinacea oleracea*)»

“Effects of *Tenebrio molitor* frass on growth and physiological characteristics of spinach (*Spinacea oleracea*)”

Λιχούνας Αριστοτέλης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ευθυμία Λεβίζου (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Αντωνιάδης Βασίλειος (Μέλος), Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Αθανασίου Χρήστος (Μέλος), Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εντομολογίας, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

«Βεβαιώνω ότι εγώ, ο Αριστοτέλης Λιχούνας είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος».

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Λεβίζου Ευθυμία για το χρόνο που διέθεσε, τη βοήθεια της κατά τη πειραματική διαδικασία και τις καθοριστικής σημασίας διορθώσεις και υποδείξεις που πραγματοποίησε στο κείμενο της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αθανασίου Χρήστο για την παροχή του frass και τον κ. Αντωνιάδη Βασίλειο για την συνεργασία και τη βοήθεια του κατά την προετοιμασία του πειράματος, αλλά και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που θα αφιερώσουν στη μελέτη και αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ κα. Τσουμαλάκου Εύα για την καθοδήγηση της κατά την πειραματική διαδικασία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
1. Εισαγωγή	9
1.1 Κλιματική κρίση	9
1.1.1 Κλιματική κρίση και αλυσίδα τροφής	9
1.1.2 Ο ρόλος της γεωργίας στην κλιματική κρίση.....	9
1.2 Βιομηχανία μαζικής εκτροφής εντόμων	10
1.3 Λίπασμα frass	11
1.3.1 Γενικά στοιχεία	11
1.3.2 Θρέψη φυτών	11
1.3.3 Βελτίωση γονιμότητας και ωφέλιμης μικροβιακής δραστηριότητας εδαφών .	14
1.3.4 Αύξηση ανθεκτικότητας και επαγωγή μηχανισμών άμυνας	16
1.4 Σπανάκι	17
1.5 Σκοπός της εργασίας	19
2. Υλικά και Μέθοδοι	20
2.1 Σχεδιασμός πειράματος	20
2.2 Μετρήσεις.....	22
2.2.1 Δείκτης SPAD συγκέντρωσης ολικών χλωροφυλλών	22
2.2.2 Ανακλαστικότητα φύλου-Δείκτης PRI.....	22
2.2.3 Φθορισμού χλωροφύλλης <i>a in vivo</i>	22
2.2.4 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος	23
2.2.5 Ξηρό βάρος ριζών	23
2.2.6 Ποσοστιαία περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό	23
2.2.7 Κατανομή βιομάζας στο φυτικό σώμα	23
2.2.8 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα φύλλα	23
2.3 Στατιστική ανάλυση	24
3. Αποτελέσματα.....	25
3.1 Φυσιολογικά χαρακτηριστικά	25
3.1.1 Δείκτης SPAD συγκέντρωσης χλωροφυλλών	25
3.1.2 Ανακλαστικότητα – δείκτης PRI	28
3.1.3 Φθορισμός χλωροφύλλης	32
3.2 Αναπτυξιακά χαρακτηριστικά φυτών	35
3.2.1 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου και υπόγειου τμήματος	35
3.2.2 Περιεκτικότητα σε νερό και κατανομή βιομάζας	38
3.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά	40

3.3.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις	40
4. Συζήτηση.....	41
5. Συμπεράσματα	46
Βιβλιογραφία	48
Ελληνική βιβλιογραφία	48
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	48

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια καταγράφεται ραγδαία ανάπτυξη στην μαζική εκτροφή εντόμων, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ζωοτροφές αλλά και για ανθρώπινη κατανάλωση με ελάχιστο περιβαλλοντικό κόστος. Το κύριο παραπροϊόν της εκτροφής τους είναι τα απεκκρίματα και τα εκδύματα τους που σε συνδυασμό με υπολείμματα τροφών αποτελούν το frass. Το frass μελετάται ως βιολογικό λίπασμα λόγω των θετικών επιπτώσεων που φαίνεται να έχει στα φυτά, του περιβαλλοντικά και οικονομικά φιλικού του χαρακτήρα αλλά και της εκτιμώμενης ποσότητας που θα παράγεται στο κοντινό μέλλον. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση του frass, από το έντομο *Tenebrio molitor*, στην ανάπτυξη και στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά φυτών σπανακιού (*Spinacia oleracea*). Το πείραμα περιλάμβανε συνολικά 6 μεταχειρίσεις: 4 μεταχειρίσεις με προσθήκη frass στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 1%, 5%, 10%, 20%, αρνητικό μάρτυρα (NC, που ποτίζονταν μόνο με νερό), αλλά και θετικό μάρτυρα (PC, όπου προστέθηκαν συμβατικά λιπάσματα σε επίπεδα θρεπτικών ίδια με το 1% frass). Κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου που διήρκεσε 2 μήνες (Οκτώβριος-Δεκέμβριος) πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα μετρήσεις που αφορούσαν φυσιολογικές παραμέτρους του φυτού. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν η συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών μέσω του δείκτη SPAD, η αποδοτικότητα χρήσης φωτός μέσω του δείκτη ανακλαστικότητας PRI και η μέγιστη απόδοση του φωτοσυστήματος II μέσω του φθορισμού της χλωροφύλλης *a in vivo* (Fv/Fm). Κατά τη συγκομιδή των φυτών, μετρήθηκε η υπέργεια και υπόγεια βιομάζα των φυτών, και εκτιμήθηκε το περιεχόμενο των φύλλων σε νερό, αλλά και η κατανομή βιομάζας μεταξύ των φυτικών μερών.

Η εφαρμογή frass σε συγκέντρωση 1% προώθησε την ανάπτυξη του σπανακιού, όπως φάνηκε από όλες τις αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους που καταγράφηκαν. Τα φυτά-μάρτυρες (NC) που ποτίστηκαν μόνο με νερό εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά σε όλες τις μετρηθείσες παραμέτρους με τη μεταχείριση 1% frass. Η εφαρμογή frass σε συγκεντρώσεις 5%, 10% και 20%, προκάλεσε σημαντική καταπόνηση στα φυτά. Η εφαρμογή χημικών λιπασμάτων σε επίπεδα θρεπτικών παρόμοια με αυτά του 1% frass είχε καταστροφικές επιπτώσεις για τα

φυτά της μεταχείρισης του θετικού μάρτυρα (PC). Η συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών στα φύλλα ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τη ποσότητα frass που προστέθηκε στις διάφορες μεταχειρίσεις. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται κυρίως στις αντίστοιχες διαφορές στα νεαρά φύλλα των φυτών, ενώ τα ώριμα δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων. Ο δείκτης PRI της αποδοτικότητας χρήσης φωτός από την φωτοσυνθετική συσκευή ήταν σημαντικά υψηλότερος στις μεταχειρίσεις NC και 1% frass, ενώ οι τιμές του στα φυτά των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων frass παρέπεμπαν σε ισχυρή καταπόνηση. Η φωτοχημική απόδοση του PSII που εκτιμάται με το δείκτη Fv/Fm επιβεβαίωσε την αυξανόμενη καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής με την αύξηση του ποσοστού frass στο έδαφος. Η εφαρμογή frass σε ποσότητα 1% αύξησε σημαντικά την υπέργεια και υπόγεια βιομάζα των φυτών, ενώ οι μεταχειρίσεις 10% και 20% frass προκάλεσαν μία κατά 92% μείωση της βιομάζας της ρίζας. Το περιεχόμενο σε νερό στα φύλλα και ο λόγος της βιομάζας της ρίζας προς τη βιομάζα του υπέργειου τμήματος, μειώθηκαν με την προσθήκη frass πέραν του 5%. Η χρήση frass δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων στα φυτά.

Συμπερασματικά λοιπόν, στις συγκεκριμένες συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το παρόν πείραμα φάνηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση frass ήταν το 1%, το οποίο προώθησε την ανάπτυξη και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του σπανακιού. Αντιθέτως, υψηλότερες συγκεντρώσεις frass δεν προτείνονται για την καλλιέργεια του φυτού αυτού καθώς οδηγούν σε καταπονητικές συνθήκες που επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη.

1. Εισαγωγή

1.1 Κλιματική κρίση

1.1.1 Κλιματική κρίση και αλυσίδα τροφής

Αναντίρρητα η κλιματική κρίση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο πλανήτης σήμερα. Όσο αυξάνεται ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται και η ανάγκη για τροφή. Πιο συγκεκριμένα εκτιμάται πως η παραγωγή τροφής θα πρέπει να αυξηθεί κατά 70% μέχρι το 2050 (FAO, 2009). Το οικολογικό κόστος από την παραγωγή τροφής είναι μεγάλο λόγω κυρίως δύο παραγόντων, των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται και της μεγάλης ποσότητας κρέατος που παράγεται λόγω της αυξημένης ζήτησης που σχετίζεται με αλλαγές στις διατροφικές προτιμήσεις (Barragán-Fonseca et al., 2022). Το 26% της γης χρησιμοποιείται για την κτηνοτροφία (Blakstad, 2021) και εκτιμάται πως το 2012 το 29% των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου προερχόταν από την αλυσίδα παραγωγής τροφής (Vermeulen et al., 2012). Επιπροσθέτως, περίπου το ένα τρίτο από τη τροφή που παράγεται παγκοσμίως δεν αξιοποιείται ενώ για την παραγωγή του χρησιμοποιείται το 30% της καλλιεργήσιμης γης (FAO, 2013). Αυτή είναι μία αξιοσημείωτη σπατάλη πόρων που επιπλέον επιβαρύνει την κλιματική κρίση.

Είναι ξεκάθαρο λοιπόν πως θα πρέπει να μειωθεί το αποτύπωμα στον πλανήτη από την γεωργία και την κτηνοτροφία και ταυτόχρονα να αυξηθεί η παραγωγή τροφής κατά τουλάχιστον 70%. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελετώντας εναλλακτικές πηγές ζωοτροφών και πηγές ζωικής πρωτεΐνης για ανθρώπινη κατανάλωση αλλά και αλλάζοντας την προσέγγιση στη διαχείριση της λίπανσης και προστασίας των καλλιεργειών.

1.1.2 Ο ρόλος της γεωργίας στην κλιματική κρίση

Μία σημαντική προσπάθεια για την βελτίωση της κατάστασης είναι η αειφορική γεωργία που έχει ως βασικό πυλώνα της την οργανική λίπανση. Αυτή έχει ως στόχο τη μείωση της χρήσης συνθετικών λιπασμάτων των οποίων η παραγωγή συμβάλλει στην εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου, ενώ υποβιβάζουν την ποιότητα των εδαφών αλλά και μολύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα και τα χερσαία οικοσυστήματα προκαλώντας έτσι σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον αλλά και

στην υγεία του καταναλωτή (Poveda, 2021, Wang et al., 2018). Αντίθετα, μέσω των οργανικών λιπασμάτων γίνεται δυνατή η αειφορική γεωργία και παράλληλα μπορεί να αυξηθεί η ποιότητα και η ποσότητα της παραγωγής καθώς έχουν ταυτόχρονα και εδαφοβελτιωτική δράση. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως βελτιώνουν αποτελεσματικά το pH του εδάφους, την οργανική ύλη και τη διαθεσιμότητα και διατήρηση των θρεπτικών συστατικών (Beesigamukama et al. 2020).

1.2 Βιομηχανία μαζικής εκτροφής εντόμων

Προκύπτει λοιπόν, πως μία πιθανή λύση μπορεί να αποτελέσει η εκτροφή εντόμων καθώς δίνει τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεΐνης με ελάχιστο αποτύπωμα στον πλανήτη, ενώ ταυτόχρονα τα έντομα μπορούν να τρέφονται με οργανικά απορρίμματα. Πιο συγκεκριμένα για την εκτροφή τους απαιτείται ελάχιστο νερό και μπορούν να παραχθούν σε εσωτερικό χώρο σε κουτιά τοποθετημένα σε κάθετη διάταξη. Αυτό σημαίνει πως μπορούν να παραχθούν σχεδόν παντού, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τοπικές παραγωγές και παραγωγικές μονάδες κοντά στον καταναλωτή ή κοντά στην πηγή τροφής (π.χ. δίπλα σε εργοστάσια που επεξεργάζονται οργανικά απορρίμματα), μειώνοντας έτσι την μετακίνηση (Blakstad, 2021).

Το γεγονός ότι μπορούν να μετατρέψουν φυτικά και ζωικά υπολείμματα καθώς και άλλα οργανικά απορρίμματα σε υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες και υγιεινά λιπαρά καθιστά τα έντομα ιδιαίτερα χρήσιμα. Πολλά έντομα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση περιέχουν παρόμοιες ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων με διάφορα κρέατα όπως το μοσχάρι. Ακόμα, περιέχουν υψηλά ποσοστά βιταμινών, μετάλλων, αμινοξέων, ωμέγα 3 και 6 λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών (Van Huis et al., 2013).

Το 80% των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με τη γεωργία και την κτηνοτροφία προέρχεται από τα φυτά που καλλιεργούνται για ζωτροφές. Έτσι με την αντικατάσταση συμβατικών ζωοτροφών με έντομα που τρέφονται με οργανικά υπολείμματα μπορεί να μειωθεί σημαντικά το αποτύπωμα άνθρακα της κτηνοτροφίας (Blakstad, 2021).

Για αυτόν τον λόγο παρατηρείται ραγδαία αύξηση σε εταιρίες που εκτρέφουν έντομα για ζωοτροφές αλλά και για ανθρώπινη κατανάλωση (Blakstad, 2021). Κυρίως χρησιμοποιούνται τα είδη *Tenebrio molitor* (σκώληκας του αλεύρου), *Hermetia illucens* L. (black soldier fly) και το *Alphitobius diaperinus* (buffalo worm).

Υπάρχουν επίσης μερικά είδη εντόμων της οικογένειας *Tenebrionidae* τα οποία έχουν την ιδιότητα να βιοδιασπούν πλαστικό (Wu & Criddle, 2021). Όπως είναι αντιληπτό αυτό καθιστά τα συγκεκριμένα έντομα εξαιρετικά χρήσιμα για τη κυκλική οικονομία αλλά και για μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

1.3 Λίπασμα frass

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Το μεγαλύτερο παραπροϊόν από τη βιομηχανία εκτροφής εντόμων είναι τα απεκκρίματα των εντόμων τα οποία σε συνδυασμό με τα εκδύματα τους και μη χωνεμένη τροφή προβλέπεται να φτάσουν αρκετά εκατομμύρια τόνους ετησίως μέχρι το 2030 και να αποτελέσουν πρόβλημα εάν δεν αξιοποιηθούν κατάλληλα. Η προνύμφη του *T. molitor* μέχρι να φτάσει στο ενήλικο στάδιο μπορεί να κάνει έκδυση έως και 20 φορές (Blakstad, 2021). Για αυτόν τον λόγο αρχίζουν να μελετώνται ως βιολογικός τρόπος λίπανσης για τα καλλιεργούμενα φυτά. Απαιτείται πρώτα μία ελαφριά επεξεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται άλεση των συστατικών μέχρι να γίνουν σε μορφή λεπτής άμμου. Το λίπασμα αυτό ονομάστηκε frass και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό οργανικό μέσο λίπανσης στο κοντινό μέλλον. Έτσι επιτυγχάνεται και η μείωση του περιβαλλοντικού κόστους των καλλιεργειών εφόσον και αυτές ευθύνονται σε μεγάλο ποσοστό στην επιδείνωση της κλιματικής κρίσης (Vermeulen et al., 2012).

1.3.2 Θρέψη φυτών

Το frass είναι ιδιαίτερα θρεπτικό για τα φυτά, καθώς προσθέτει θρεπτικά που απορροφούνται εύκολα από το ριζικό σύστημα των φυτών (Poveda, 2021). Περιέχει ποσότητες αζώτου, φωσφόρου, καλίου και σιδήρου (Barragán-Fonseca et al., 2022). Έχοντας χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες

θρεπτικών στοιχείων ανά κιλό συγκριτικά με κοπριά από κτηνοτροφικά είδη (Blakstad, 2021). Συγκεκριμένα, οι Poveda et al. (2021) πήραν frass από *T. molitor* με αναλογία NPK 3-2-2 (g/100g) και περιεκτικότητα σιδήρου 140 mg/Kg που χρησιμοποιήθηκε σε γλάστρες και ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών, αυξάνοντας την συγκέντρωση χλωροφύλλης στα φύλλα και το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος. Έχει επίσης βρεθεί πως το frass μπορεί να παρέχει στο έδαφος διάφορα ιχνοστοιχεία όπως ο χαλκός (Cu), το μολυβδαίνιο (Mo), ο ψευδάργυρος (Zn) και το νικέλιο (Ni) χωρίς την παρουσία βαρέων μετάλλων. Αυτά τα μικροθρεπτικά συστατικά συχνά βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο έδαφος και επιτελούν σημαντικούς ρόλους στη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών. Αναλυτικότερα, ο χαλκός συμπεριλαμβάνεται στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διαδικασιών του φυτού, όπως η φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων και η μιτοχονδριακή αναπνοή (Taiz et al., 2014, Yruela, 2005). Το μολυβδαίνιο αποτελεί ένα βασικό συστατικό της νιτρικής αναγωγής, η οποία βοηθά στη μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη άρα και κατ' επέκταση στη απορρόφηση αζώτου από το φυτό (Moraes et al., 2009, Taiz et al., 2014). Ο ψευδάργυρος παίζει σημαντικό ρόλο στις μεταβολικές διεργασίες και βοηθά στη προστασία από οξειδωτικές βλάβες (Chiam et al. 2021, Taiz et al., 2014). Το νικέλιο ενεργοποιεί το ένζυμο ουρεάση που διασπά την ουρία, η οποία καθίσταται τοξική εφόσον συσσωρευτεί (Fabiano et al. 2015). Η αναλογία των θρεπτικών στο frass εξαρτάται από το είδος, το στάδιο του βιολογικού κύκλου στο οποίο βρίσκονται τα έντομα αλλά και από τη διατροφή και τις συνθήκες ανάπτυξης τους (Blakstad, 2021). Ένα ακόμα σημαντικό συστατικό του frass των εντόμων είναι η χιτίνη, ένας υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτης που έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του σε εδάφη προάγει την ανάπτυξη των φυτών (Barragán-Fonseca et al., 2022).

Ακόμα, στο frass πραγματοποιείται η ανοργανοποίηση των NPK πιο γρήγορα καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τα θρεπτικά διαθέσιμα στα φυτά χωρίς να χάνεται σημαντική ποσότητα τους στο έδαφος (Chavez and Uchanski, 2020). Παρόλο που η λίπανση με frass του εντόμου *Tenebrio molitor* μπορεί να προσφέρει στα φυτά ταχύτατα ποσότητες N,P,K, η αποδοτικότητα λίπανσης αζώτου επηρεάζεται από τον ρυθμό εφαρμογής του frass καθώς μεταβάλλεται μαζί με αυτόν η ταχύτητα ανοργανοποίησης του N άρα και η διαθεσιμότητα N στα φυτά (Houben et al., 2020).

Βέβαια η ταχύτητα ανοργανοποίησης του αζώτου επηρεάζεται και από άλλους εδαφικούς παράγοντες όπως το pH, η μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους και η αναλογία C/N του εδαφικού υποστρώματος. Για το φώσφορο και το κάλιο η διαθεσιμότητα στα φυτά παραμένει υψηλή ανεξάρτητα από τον ρυθμό εφαρμογής του frass λόγω της έτοιμης, αξιοποιήσιμης μορφής που τα συγκεκριμένα στοιχεία βρίσκονται στο frass (Houben et al., 2020). Σε ένα άλλο πείραμα που έγινε σε φυτά ηλίανθου (*Helianthus annuus*) και υπήρχε έλλειψη θρεπτικών στο έδαφος, φάνηκε πως η προσθήκη frass 5% μπόρεσε να εξασφαλίσει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά στο φυτό σε επαρκείς ποσότητες, εκτός του αζώτου (Blakstad, 2021). Το frass εκτός από τα πλεονεκτήματα που έχει ως μέσο λίπανσης, υπερτερεί συγκριτικά με τα συμβατικά χημικά λιπάσματα στο ότι είναι πολύ πιο ασφαλές. Περιέχει συστατικά που δεν βλάπτουν το ανθρώπινο σώμα, σε αντίθεση με τα συνθετικά λιπάσματα που συχνά περιέχουν επιβλαβή ιχνοστοιχεία όπως κάδμιο (Cd), ουράνιο (U) και αρσενικό (As) τα οποία είναι καρκινογόνα (Choi et al., 2019).

Έρευνες έχουν δείξει πως φυτά που για τη θρέψη τους χρησιμοποιήθηκε frass αντί για κοπριά είχαν καλύτερα αποτελέσματα. Μια από αυτές είναι των Quilliam et al. (2020) όπου έγινε συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης του λιπάσματος frass από το είδος *Hermetia illucens* που τράφηκε με απορρίμματα ζυθοποιείου και κοπριάς από κοτόπουλα στην ανάπτυξη φυτών καυτερής πιπεριάς και κρεμμυδιού και βρέθηκε πως η λίπανση με frass ήταν πιο αποδοτική. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε συνδυασμό frass και ανόργανου λιπάσματος NPK, καλύτερα και από αυτά του σκέτου ανόργανου λιπάσματος (Quilliam et al., 2020). Σε μία άλλη έρευνα των Dulaurent et al. (2020) με frass από *T. molitor* (με αναλογία θρεπτικών 5-2-2) και ταυτόχρονη παρουσία γαιοσκωλήκων (*Lumbricus terrestris*) σε γλάστρες σε φυτά κριθαριού έγινε ξεκάθαρο πως η παρουσία γαιοσκωλήκων δρα συνεργατικά με το λίπασμα frass βελτιώνοντας τη γονιμότητα του εδάφους. Παρατηρήθηκε πως οι υψηλότερες ποσότητες N,P,K και Ca βρέθηκαν στην μεταχείριση της ταυτόχρονης παρουσίας γαιοσκωλήκων και frass.

Φαίνεται πως ένα ποσό του N στο frass ανοργανοποιείται γρήγορα τις πρώτες 20 μέρες και στη συνέχεια το υπόλοιπο N ανοργανοποιείται σταδιακά τους επόμενους μήνες (Blakstad, 2021). Για να υπάρξει λοιπόν επαρκής ποσότητα αζώτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ανόργανα λιπάσματα όπως

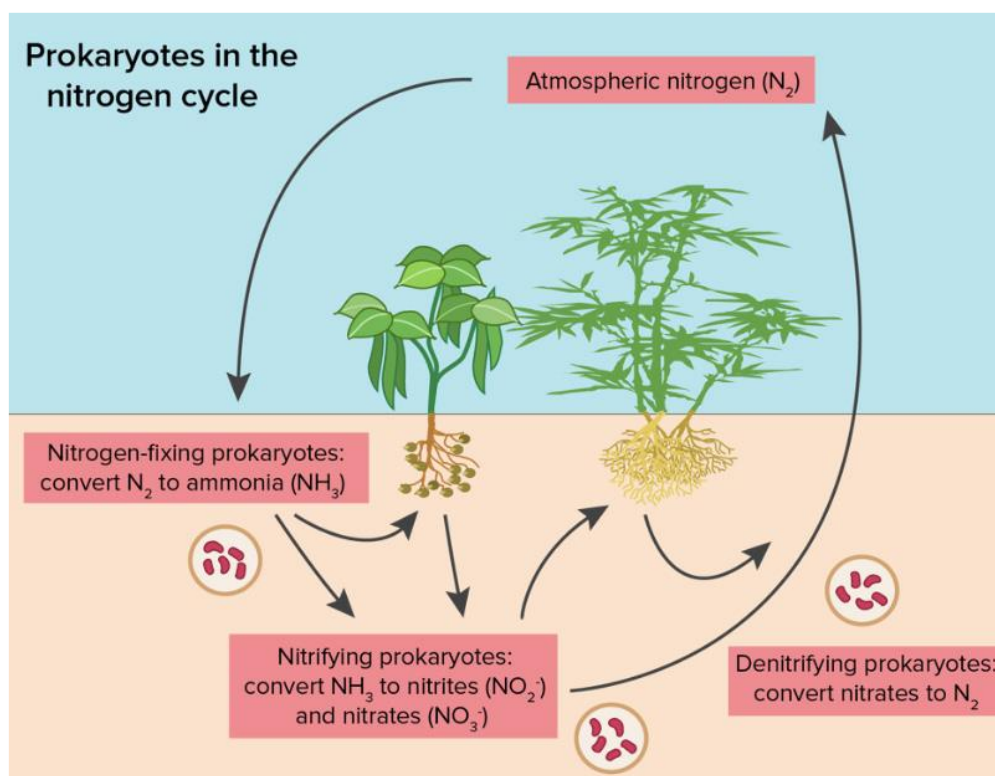
έδειξε η έρευνα των Quilliam et al. Δυστυχώς όμως τα δεδομένα για τη χρήση του frass ως λίπασμα δεν είναι ακόμα αρκετά και οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες με γλάστρες ή σε θερμοκήπια (Beesigamukama et al. 2020). Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν περισσότερες έρευνες που μελετούν το συγκεκριμένο λίπασμα ως προς τη σύσταση του ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες ανάπτυξης των εντόμων, τον βέλτιστο ρυθμό εφαρμογής του για κάθε είδος καλλιέργειας αλλά και σε συνθήκες αγρού για να εδραιωθούν συμπαγή στοιχεία για τη χρήση του.

1.3.3 Βελτίωση γονιμότητας και ωφέλιμης μικροβιακής δραστηριότητας εδαφών

Εκτός από τα θρεπτικά που περιέχει το frass έχει αποδειχθεί πως μπορεί να βελτιώσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και να το καταστήσει πιο γόνιμο. Βρέθηκε πως το frass μειώνει το pH του εδάφους, πιθανότατα λόγω της ελαφρώς όξινης φύσης του καθώς και της ταχείας αποσύνθεσής του, η οποία οδηγεί στην παραγωγή CO₂ και οργανικών οξέων (Houben et al., 2020). Επιπλέον, συμβάλει στην ανάπτυξη της ωφέλιμης μικροβιακής δραστηριότητας του εδάφους και την έκκριση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, σε πείραμα που έγινε σε φυτά rakchoi (*Brassica rapa L.*) βρέθηκε ότι η δραστηριότητα των ενζύμων ουρεάση και φωσφομονοεστεράση (PME-ase) ήταν υψηλότερη στις μεταχειρίσεις που περιείχαν frass (Agustiyananni et al 2020). Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο ουρεάση είναι σημαντικό καθώς διασπά την ουρία. Πιθανότατα η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού που παρατηρήθηκε στο πείραμα των Agustiyananni et al. (2020) να σχετίζεται με την περιεκτικότητα του frass σε νικέλιο (Ni). Η φωσφομονοεστεράση είναι σημαντικό ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του P στο έδαφος. Το ένζυμο αυτό έχει μεγάλη αγρονομική σημασία επειδή υδρολύει ενώσεις οργανικού P και τις μετατρέπει σε διάφορες μορφές ανόργανου P, οι οποίες μπορούν να απορροφηθούν από τα φυτά. Η υψηλή δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου στο έδαφος μπορεί να υποδηλώνει τον υψηλό πληθυσμό και δραστηριότητα των βακτηρίων που διαλύουν τον P στο έδαφος (Agustiyananni et al., 2020).

Σύμφωνα με τις σχετικές έρευνες έχουν ανιχνευθεί συνολικά 4772 είδη βακτηρίων και 1225 είδη μυκήτων σε frass, πολλά από τα οποία θεωρούνται PGPMs

(Plant Growth Promoting Microorganisms) (Poveda et al., 2019). Κάποια από τα βακτήρια που βρίσκονται στο frass είναι ριζοβακτήρια (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), τα οποία δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό. Τρέφονται από εκκρίματα των ριζών και ως αντάλλαγμα συνθέτουν ορμόνες που βοηθούν την ανάπτυξη του φυτού, όπως κυτοκίνες, αυξίνες και γιβερελλίνες. Ταυτόχρονα μπορεί να προσφέρουν πρόσβαση στο φυτό σε θρεπτικά όπως ο φώσφορος και ο σίδηρος. Τα βακτήρια αυτά έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να καταστήσουν διαθέσιμα μεταλλικά στοιχεία από ιζηματογενή πετρώματα ή να καθηλώσουν ατμοσφαιρικό άζωτο καθιστώντας το διαθέσιμο για τα φυτά. Τα ριζοβακτήρια αυτά είναι κυρίως των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas*. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που υπάρχουν στο frass δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και σε συνδυασμό με άλλα βακτήρια τα οποία μετατρέπουν το άζωτο από αμμωνιακή σε νιτρική μορφή το καθιστούν διαθέσιμο για τα φυτά. Επομένως γίνεται εύκολα αντιληπτό πως διαδραματίζουν ρόλο μείζονος σημασίας στον κύκλο του αζώτου (Choi et al., 2019). Η σημασία αυτών των μικροοργανισμών στην αποδοτικότητα του frass έγινε ξεκάθαρη όταν με την αποστείρωση του λιπάσματος πριν την χρήση του παρατηρήθηκε μείωση της απόδοσης των φυτών (Barragán-Fonseca et al., 2022).



Εικόνα 1: Ο ρόλος των βακτηρίων στον κύκλο του N. Πηγή: (Choi et al., 2019).

1.3.4 Αύξηση ανθεκτικότητας και επαγωγή μηχανισμών άμυνας

Οι μικροοργανισμοί που περιέχονται στο frass μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση προσβολών από ασθένειες, παράσιτα και εχθρούς. Ταυτόχρονα ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας του φυτού και σε αβιοτικές καταπονήσεις και αυξάνουν τις αποδόσεις της καλλιέργειας. Κάποια από τα ριζοβακτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν επίσης την ιδιότητα να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα σε παράσιτα και ασθένειες. Αρκετά στελέχη πυροδοτούν μηχανισμούς άμυνας έναντι παθογόνων και φυτοφάγων ζώων στα φυτά ξενιστές τους ή διεγείρουν την προσέλκυση των φυσικών αρπακτικών των εχθρών του φυτού. Επιπλέον, πολλά ευεργετικά βακτήρια ελέγχουν τα φυτοφάγα και τα παθογόνα των φυτών μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων. Μπορεί δηλαδή να είναι παθογόνα στα έντομα ή να εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροβίων και έτσι να συμβάλλουν στην προστασία των φυτών ανεξάρτητα από το ίδιο το φυτό. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως στο frass του *T. molitor* υπάρχουν ριζοβακτήρια, που εμπλέκονται στην αποσύνθεση της χιτίνης, όπως για παράδειγμα τα *Bacillus cereus* και *B. subtilis*, τα οποία προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, πυροδοτούν μηχανισμούς άμυνας των φυτών και δρουν ανταγωνιστικά έναντι ενός ευρέος φάσματος φυτοπαθογόνων και παρασίτων (Barragán-Fonseca et al., 2022).

Η χιτίνη έχει χρησιμοποιηθεί στη γεωργία εδώ και δεκαετίες ως λίπασμα, βελτιωτικό εδάφους, παράγοντας καταπολέμησης ασθενειών, ρυθμιστής της ανάπτυξης των φυτών και ως βελτιωτικό της άμυνας των φυτών (Blakstad, 2021). Αναγνωρίζεται από τα φυτά ως microbe-associated molecular pattern (MAMP) και πυροδοτεί ποικίλες αμυντικές αποκρίσεις στα φυτά, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, τη συστηματική έκφραση αμυντικών γονιδίων, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Συνεπώς η ανθεκτικότητα των φυτών σε παράγοντες καταπόνησης αυξάνεται με την προσθήκη χιτίνης. Αυτό επιβεβαιώθηκε και πειραματικά, σε θερμοκήπια και στον αγρό, όταν με την προσθήκη χιτίνης στο έδαφος παρατηρήθηκε μείωση προσβολών από μύκητες που μολύνουν το ριζικό σύστημα όπως οι *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani* (Barragán-Fonseca et al., 2022). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά φράουλας (*Fragaria ananassa*) με τους μύκητες

Botrytis cinerea και *Colletotrichum fructicola* και σε φυτά λάχανου (*Brassica oleracea*), με τον *Alternaria brassicicola* παρατηρήθηκε πως εκτός της ενεργοποίησης των άμεσων μηχανισμών δράσης, η αναγνώριση της χιτίνης από το φυτό, το προετοιμάζει και για μελλοντική μόλυνση (Blakstad, 2021).

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στην αβιοτική καταπόνηση, σε πείραμα που έγινε σε φυτά φασολιού φάνηκε πως το frass από το *T. molitor* αύξησε την ανθεκτικότητα στην ξηρασία, την υπερβολική υγρασία και στην αλατότητα (Poveda, 2021). Παρόλα αυτά η επίδραση του frass ως φυτοπροστατευτικό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, με αποτέλεσμα να μην έχουν όλα τα frass όλων των εντόμων τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα φυτικά είδη (Poveda, 2021).

1.4 Σπανάκι

Το σπανάκι (*Spinacia oleracea*) είναι ένα φυλλώδες λαχανικό, ψυχρής εποχής και ανήκει στην οικογένεια των Αμαρανθίδων (*Amaranthaceae*). Είναι ετήσιο, σπάνια διετές, διπλοειδές φυτό ($2n=12$ και $2n=24$) που φτάνει τα 30cm. Το ριζικό του σύστημα έχει μία κεντρική ρίζα και πολλές δευτερεύουσες, εξαπλώνεται γύρω από το φυτό σε βάθος 5 ως 10cm. Ο βλαστός, από τον οποίο εκφύονται τα φύλλα και η ταξικαρπία είναι βραχύς, εδώδιμος και σκληρότερος από τα φύλλα. Τα φύλλα, που είναι το εδώδιμο μέρος του φυτού, είναι έλλοβα, παχιά, πλατιά, με βαθυπράσινο χρώμα και διατάσσονται σπειροειδώς πάνω στον βλαστό σχηματίζοντας ροζέτα. Η επιφάνεια των φύλλων μπορεί να είναι από λεία ως κυματιστή και το σχήμα τους ωοειδές ως τριγωνικό ανάλογα με την ποικιλία. Είναι φυτό κατά κύριο λόγο δίοικο και δίκλινο με ατελή άνθη. Τα αρσενικά άνθη έχουν περιάνθιο με 2 ως 5 λοβούς και 3 ως 5 στήμονες. Τα θηλυκά άνθη δεν έχουν περιάνθιο αλλά περιβάλλονται από 2 ως 4 βρακτοειδή φύλλα, τα οποία θα σχηματίσουν ένα σκληρό περίβλημα που θα καλύψει τον καρπό. Η επικονίαση γίνεται με τον άνεμο. Πρώτα εμφανίζονται τα αρσενικά άνθη που σχηματίζουν ταξιανθία και έπειτα τα θηλυκά που βρίσκονται στις μασχάλες των φύλλων. Ο καρπός είναι κάρυο με σκληρό εξωτερικό περίβλημα και περιέχει ένα σπέρμα (Πετρόπουλος et al., 2014).

Για την καλλιέργεια του σπανακιού συνιστώνται γόνιμα, εύθρυπτα, πλούσια σε οργανική ουσία, αργιλώδη εδάφη. Παρόλα αυτά μπορεί να καλλιεργηθεί σε αρκετά εδάφη, από αμμώδη, εφόσον πρόκειται για καλλιέργεια κατά τη χειμερινή περίοδο ή νωρίς την άνοιξη, μέχρι και βαριά εδάφη αρκεί να στραγγίζουν εύκολα και η άρδευση να είναι προσεκτική. Τα φυτά είναι ευαίσθητα στην οξύτητα του εδάφους και το pH θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 7 με άριστη τιμή pH 6,5 ως 7. Σε χαμηλότερες τιμές pH εμφανίζονται συμπτώματα καχεξίας όπως: περιφερειακό κιτρίνισμα ή καφέτiasμα φύλλων στα νεαρά στάδια ανάπτυξης, καφέτiasμα των ριζών, επιβράδυνση της ανάπτυξης και τελικά το φυτό πεθαίνει. Η θερμοκρασία για την ανάπτυξη του φυτού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 24°C με βέλτιστη ανάπτυξη στους 15 ως 18 °C. Η σπορά γίνεται από μέσα Αυγούστου μέχρι τις αρχές του Φεβρουαρίου αναλόγως την ποικιλία και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Ωριμάζει σε 37 ως 70 ημέρες αναλόγως πάλι των καιρικών συνθηκών και της ποικιλίας. Η συγκομιδή θα πρέπει να γίνεται πριν την εμφάνιση του ανθικού στελέχους, συνήθως πραγματοποιείται 40 με 50 ημέρες από τη σπορά (Πετρόπουλος et al., 2014).

Σήμερα το φυτό είναι διαδεδομένο σε όλο τον κόσμο και έχει πολλές χρήσεις στη μαγειρική και χρησιμοποιείται αρκετά σε σαλάτες λαχανικών. Είναι πλούσιο σε βήτα καροτένιο, φολικό οξύ, βιταμίνη C, φλαβονοειδή, βιταμίνες B1, B2, B6, E, νιασίνη, ασβέστιο, σίδηρο, φώσφορο, νάτριο, κάλιο, ψευδάργυρο και το καροτενοειδές λουτεΐνη (Morelock et al, 2008, Πετρόπουλος et al., 2014). Το σπανάκι είναι επίσης αξιοσημείωτη πηγή αντιοξειδωτικών, διαθέτοντας μία από τις υψηλότερες τιμές ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου μεταξύ των λαχανικών (Morelock et al, 2008). Είναι μια καλή πηγή του βιοφλαβονοειδούς κερκετίνη με πολλά άλλα φλαβονοειδή, τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιισταμινικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα παρουσιάζει προστατευτικές ιδιότητες έναντι της ακτινοβολίας γ και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Το σπανάκι χρησιμοποιείται επίσης για την πρόληψη της μείωσης της οστικής πυκνότητας που σχετίζεται με την οστεοπόρωση και για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του στην ανακούφιση του πόνου της αρθρίτιδας. Ακόμα, βοηθά στην ομαλή λειτουργία της καρδιάς και του κυκλοφορικού συστήματος (Metha et al, 2014). Τέλος είναι διουρητικό, τονωτικό, καταπραϋντικό και συνίσταται κατά της αναιμίας (Πετρόπουλος et al., 2014).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Το frass είναι πιθανό να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό οργανικό λίπασμα στο μέλλον, λόγω της θετικής επίδρασης στην ανάπτυξη φυτών, σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία, των μεγάλων ποσοτήτων που αναμένονται από την συνεχώς εξελισσόμενη βιομηχανία εκτροφής εντόμων αλλά και του μικρού περιβαλλοντικού του αποτυπώματος. Ακόμα, εκτός από εξαιρετικά φιλικό στο περιβάλλον, φαίνεται πως θα είναι και πιο οικονομικό από τα συμβατικά λιπάσματα. Για αυτόν τον λόγο είναι σημαντικό να μελετηθεί σε βάθος η επίδρασή του στη λειτουργία του φυτού, όπως και την ανάπτυξή του. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του frass του εντόμου *Tenebrio molitor* στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του σπανάκιου (*Spinacia oleracea*) και η αξιολόγηση της πιθανότητας μελλοντικής χρήσης του ως οργανικό λίπασμα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σχεδιασμός πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στη Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος κατά το διάστημα Οκτώβριο με Δεκέμβριο του 2020. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε σκεπασμένο χώρο, χωρίς ρύθμιση των περιβαλλοντικών συνθηκών, στον οποίο έγιναν και οι μετρήσεις πριν την συγκομιδή. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν μετά από αυτή πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ζιζανιολογίας του Τμήματος.

Πείραμα ανάπτυξης φυτών σπανακιού

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε γλάστρες των 2 L. Χρησιμοποιήθηκε έδαφος που είχε συλλεχθεί από το Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου στο Βελεστίνο, περλίτης, «frass» από προνύμφες του εντόμου *Tenebrio molitor* που προέκυψε από εκτροφές του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος και συμβατικά λιπάσματα 12-48-8 και 13,5-0-46.

Οι μεταχειρίσεις του πειράματος ήταν έξι με 8 γλάστρες η κάθε μία. Σε κάθε γλάστρα αναμίχθηκαν 1400g εδάφους και 500mL περλίτη. Στη συνέχεια έγιναν τα εξής ανά μεταχείριση:

1) Αρνητικός μάρτυρας (negative control, NC). Αυτή η μεταχείριση δεν περιείχε ούτε frass ούτε ανόργανο λίπασμα. Επομένως είχε μόνο το έδαφος και τον περλίτη.

2) Θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC). Εδώ προστέθηκε ανόργανο λίπασμα και η κάθε γλάστρα είχε, εκτός από το έδαφος και τον περλίτη, 84 g λιπάσματος 12-48-8 και 78g λιπάσματος 13,5-0-46.

3) Frass 1%. Προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 4 g frass σε κάθε γλάστρα.

4) Frass 5%. Προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 20 g frass σε κάθε γλάστρα.

5) Frass 10%. Προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 40 g frass σε κάθε γλάστρα.

6) Frass 20%. Προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 80 g frass σε κάθε γλάστρα.

Στις 13/10/2020, δημιουργήθηκαν τα υποστρώματα των διάφορων μεταχειρίσεων και προστέθηκε 300ml νερό βρύσης σε κάθε γλάστρα. Δύο μέρες αργότερα αγοράστηκαν σπανάκια σε πλάκες φυτωρίου και για δέκα μέρες ποτίστηκαν, όπως και οι γλάστρες ανά δεύτερη μέρα, δηλαδή 5 φορές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση των φυτών στις γλάστρες και ποτίστηκαν. Επομένως η 26^η/10/2020 ήταν η πρώτη ημέρα του πειράματος.

Ο Οκτώβρης ήταν ηλιόλουστος και τα σπανάκια ποτιζόταν σχεδόν καθημερινά, με 150 ml ανά γλάστρα κάθε φορά, ενώ ο Νοέμβριος ήταν υγρός και συννεφιασμένος οπότε τα ποτίσματα γινόταν πιο αραιά, περίπου 3 φορές την εβδομάδα. Τον Δεκέμβριο χρειάστηκε ακόμα λιγότερη άρδευση.

Ταυτόχρονα, όποτε ήταν αναγκαίο γινόταν αφαίρεση των ζιζανίων με το χέρι σε όσες μεταχειρίσεις εμφανιζόταν.

Τελική συγκομιδή

Στις 19/12/2020 μεταφέρθηκαν τα φυτά με τα φυτοδοχεία τους στο εργαστήριο. Όλο το υπέργειο τμήμα του φυτού κοβόταν σύριζα με το έδαφος με την βοήθεια ψαλίδας κλαδέματος και ζυγίζονταν αμέσως για να καταγραφεί το νωπό βάρος. Στη συνέχεια επιλεγόταν από κάθε φυτό 1 ώριμο φύλλο το οποίο αποκοβόταν και τοποθετούνταν σε νάιλον σακουλάκι στους -80 °C για περαιτέρω μετρήσεις. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η δειγματοληψία εδάφους με σωλήνα από 2 αντιδιαμετρικά σημεία στη κάθε γλάστρα. Τέλος πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των ριζών με τη βοήθεια μεταλλικού κόσκινου και τρεχούμενου νερού. Η ρίζα αφηνόταν σε ηθμό στον ήλιο για 15 περίπου λεπτά για να απομακρυνθεί ένα μέρος του νερού.

2.2 Μετρήσεις

2.2.1 Δείκτης SPAD συγκέντρωσης ολικών χλωροφυλλών

Οι μετρήσεις του περιεχομένου των φύλλων σε ολικές χλωροφύλλες (a+b) έγιναν με φορητό χλωροφυλλόμετρο SpadPlus 502 της εταιρίας Minolta. Η πρώτη μέτρηση πάρθηκε στις 10/11 και μετά από τις 13/11 μέχρι και την ολοκλήρωση του πειράματος οι μετρήσεις επαναλαμβανόταν μία φορά την εβδομάδα (7 φορές). Προκειμένου να γίνει εκτίμηση των χλωροφυλλών των διαφόρων ηλικιακών κλάσεων φύλλων του φυτού γίνονταν μετρήσεις κατά τον κατακόρυφο άξονα του φυτού, ως εξής: παίρνονταν 4 μετρήσεις ανά φυτό, δύο σε νεαρά και δύο σε ώριμα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα.

2.2.2 Ανακλαστικότητα φύλου-Δείκτης PRI

Οι μετρήσεις ανακλαστικότητας έγιναν με τη βοήθεια του φορητού οργάνου PlantPen της εταιρίας Photon Systems Instruments. Η διαδικασία των μετρήσεων ήταν πανομοιότυπη με αυτή των ολικών χλωροφυλλών. Το όργανο αυτό μετρά τον δείκτη PRI (Photochemical reflectance index) συγκρίνοντας την ανακλαστικότητα των φύλλων σε δύο στενά φάσματα με κέντρα κοντά στα 530 nm και 590 nm. Και σε αυτή την παράμετρο γίνονταν μετρήσεις κατά τον κατακόρυφο άξονα του φυτού, όπως περιγράφηκε στο 2.2.1.

2.2.3 Φθορισμός χλωροφύλλης α *in vivo*

Οι μετρήσεις αυτές έγιναν με το φορητό φθορισμόμετρο χλωροφύλλης PAM-2500 της εταιρίας Walz. Η διαδικασία πάλι ήταν η ίδια με τις προηγούμενες δύο μετρήσεις. Το όργανο αυτό μετρά την παράμετρο PAR (photosynthetically active radiation) που είναι το ποσό της ηλιακής ακτινοβολίας που αξιοποιεί το φύλλο για φωτοσύνθεση, την παράμετρο Yield (F_v/F_m) που είναι η φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II (PSII) και την παράμετρο ETR (electron transport rate) που είναι ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα. Και σε αυτή την παράμετρο γίνονταν μετρήσεις κατά τον κατακόρυφο άξονα του φυτού, όπως περιγράφηκε στο 2.2.1.

2.2.4 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος

Μετά τη συγκομιδή από το κάθε φυτό που είχε επιβιώσει ζυγίστηκε ολόκληρο το υπέργειο τμήμα με ηλεκτρονικό ζυγό. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το νωπό υπέργειο τμήμα στον φούρνο στους 80 °C σε χάρτινα σακουλάκια για δύο ημέρες. Έτσι μετά την αποξήρανση του ζυγίστηκε και πάλι το ξηρό πλέον υπέργειο τμήμα.

2.2.5 Ξηρό βάρος ριζών

Αφού απομονώθηκε το ριζικό σύστημα από τα φυτά που επιβίωσαν τοποθετήθηκε και αυτό, όπως το υπέργειο τμήμα, σε χάρτινα σακουλάκια και στον φούρνο στους 80 °C για δύο ημέρες. Έπειτα, το αποξηραμένο ριζικό σύστημα ζυγίστηκε.

2.2.6 Ποσοστιαία περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό

Με βάση τις μετρήσεις νωπού και ξηρού βάρους των φύλλων υπολογίστηκε η επί τοις εκατό περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό.

2.2.7 Κατανομή βιομάζας στο φυτικό σώμα

Προκειμένου να εκτιμηθεί η κατανομή/επένδυση βιομάζας μεταξύ του υπέργειου και υπόγειου μέρους του φυτικού σώματος υπολογίστηκε με βάση τα αντίστοιχα ξηρά βάρη ο λόγος της βιομάζας του ριζικού συστήματος προς τη βιομάζα του υπέργειου τμήματος.

2.2.8 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα φύλλα

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών στο ξηρό ιστό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994). Για την εκχύλιση ζυγίστηκαν 200 mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και εκχυλίστηκαν με 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης

50%. Ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα, διηθήθηκαν με χάρτινα φίλτρα και το διαυγές διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέους μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την αντίδραση, σε μεγαλύτερους δοκιμαστικούς προστέθηκαν 3,95ml απιονισμένου νερού, 0,05ml του εκχυλίσματος των φύλλων, 0,25ml αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Στο τυφλό διάλυμα σε αντικατάσταση των 0,05ml του υπερκείμενου, προστέθηκαν 0,05ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%. Μετά από ανάδευση του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε vortex, προστέθηκαν 0,75ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) και επαναλήφθηκε ανάδευση με vortex. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h με συχνές αναδεύσεις με vortex κάθε μισή ώρα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 760 nm. Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρής ουσίας (GAE, gallic acid equivalents), σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση.

$$\text{GAE (mg/g)} = C \cdot V / M.$$

Όπου C, η τιμή GA σε mg/ml όπως προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη.

V, ο όγκος εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται (50λ=0,50ml).

M τα g του ιστού.

2.3 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα των μετρήσεων μεταφέρθηκαν σε υπολογιστικό φύλλο Microsoft Excel και στη συνέχεια με το στατιστικό πρόγραμμα JASP (Version 0.14.1.0) πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) στις περιπτώσεις που ικανοποιούνταν οι προϋποθέσεις της ANOVA (κανονική κατανομή και ομοιογένεια διακυμάνσεων). Στις περιπτώσεις των λόγων (υπόγειου/υπέργειο και Fv/Fm) χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ελέγχθηκαν με post-hoc test, σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0,05$).

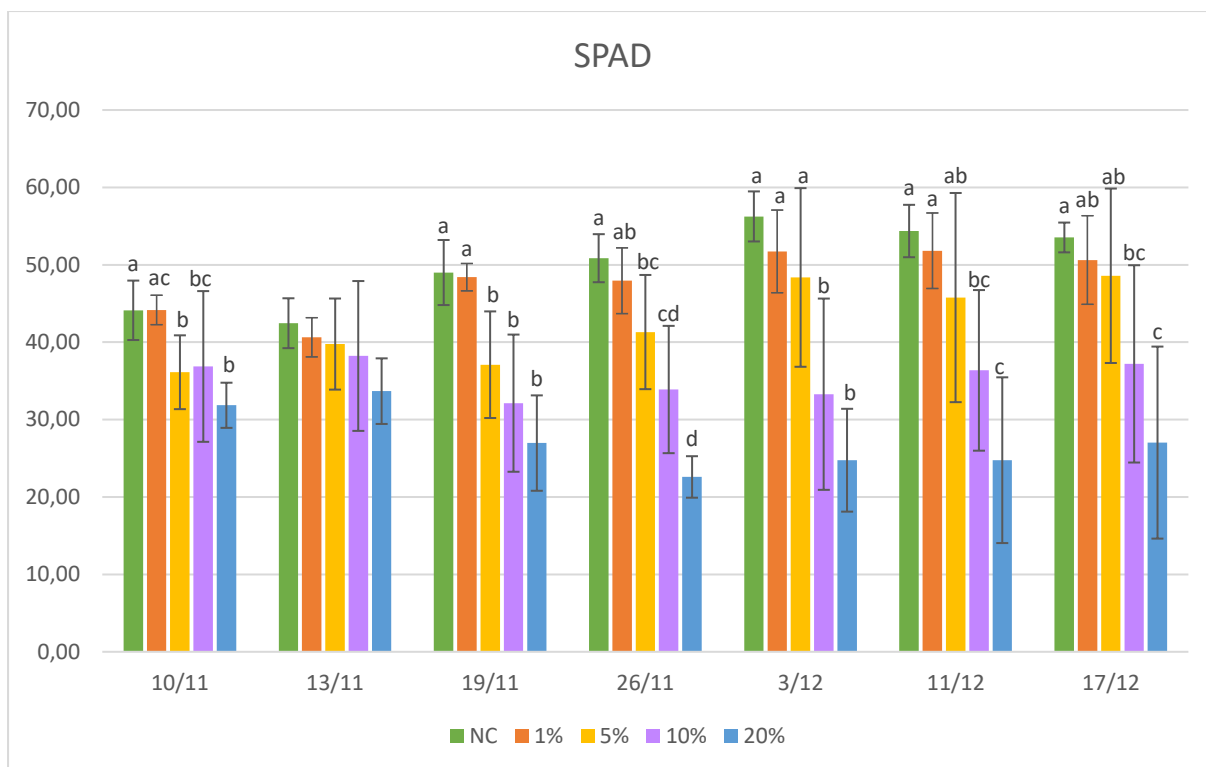
3. Αποτελέσματα

3.1 Φυσιολογικά χαρακτηριστικά

Στα παρακάτω υποκεφάλαια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Τα φυτά του θετικού μάρτυρα (PC) παρέμειναν ζωντανά για πολύ λίγες ημέρες, επομένως δεν συμπεριλήφθηκαν στα γραφήματα.

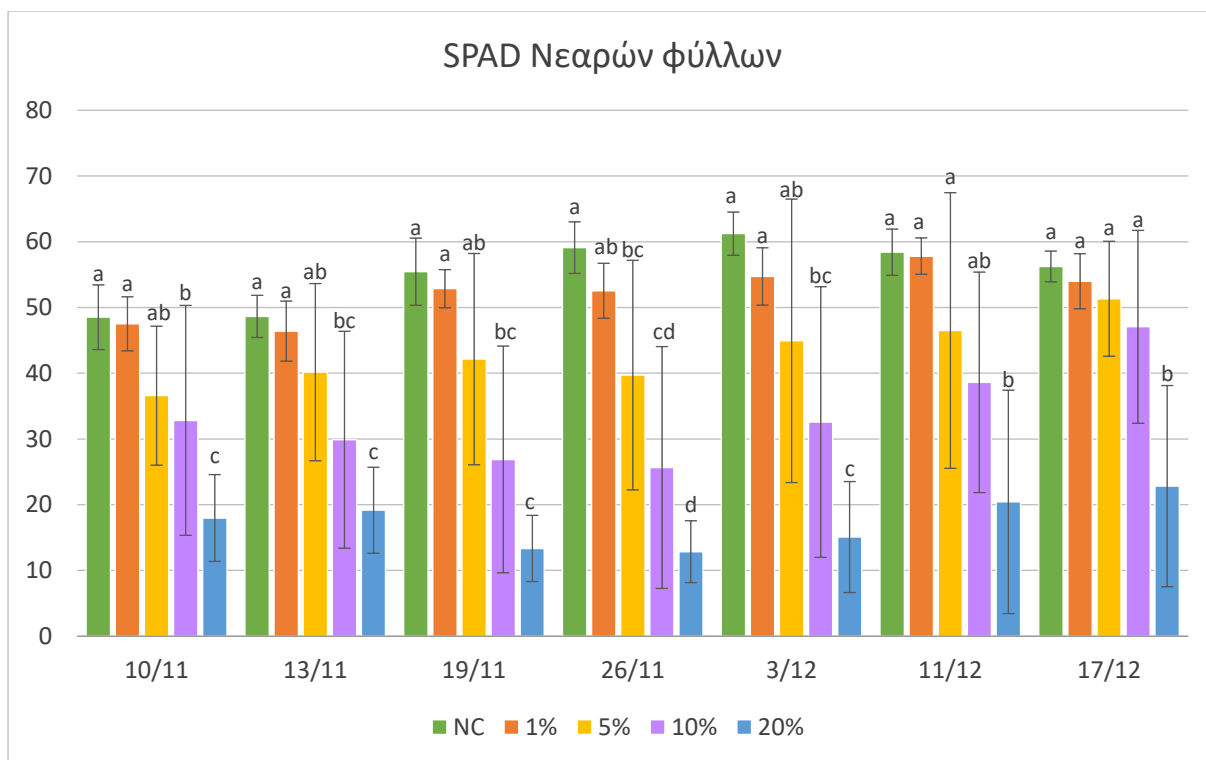
3.1.1 Δείκτης SPAD συγκέντρωσης χλωροφυλλών

Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται η διακύμανση του δείκτη SPAD που παραπέμπει στη συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι τιμές αφορούν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση όλων των μετρήσεων ανά φυτό, και δίνουν την γενική εικόνα της παραμέτρου, ανεξαρτήτως ηλικιακής κλάσης των φύλλων. Η συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στη μεταχείριση του αρνητικού μάρτυρα (NC), σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Πολύ κοντά σε αυτή ήταν η μεταχείριση με 1% frass που δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική διαφορά με την προηγούμενη σε καμία από τις 7 μετρήσεις. Οι μεταχειρήσεις 10% και 20% frass ήταν εμφανώς αυτές με τις μικρότερες τιμές ολικών χλωροφυλλών χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους αλλά με σημαντικές διαφορές με τις μεταχειρήσεις NC και 1%. Η μεταχείριση 20% είχε σταθερά τις πιο χαμηλές τιμές. Τέλος, τα φυτά της 5% εμφάνισαν σε όλες τις περιπτώσεις μία ενδιάμεση τιμή SPAD συγκρινόμενα με τις παραπάνω ομάδες, με αποτέλεσμα να μην διαφέρουν σημαντικά από αυτές με εξαίρεση τις σημαντικές διαφορές με την NC μέχρι την μέτρηση στη μέση των τιμών έχοντας συνήθως στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο με αυτά της NC.



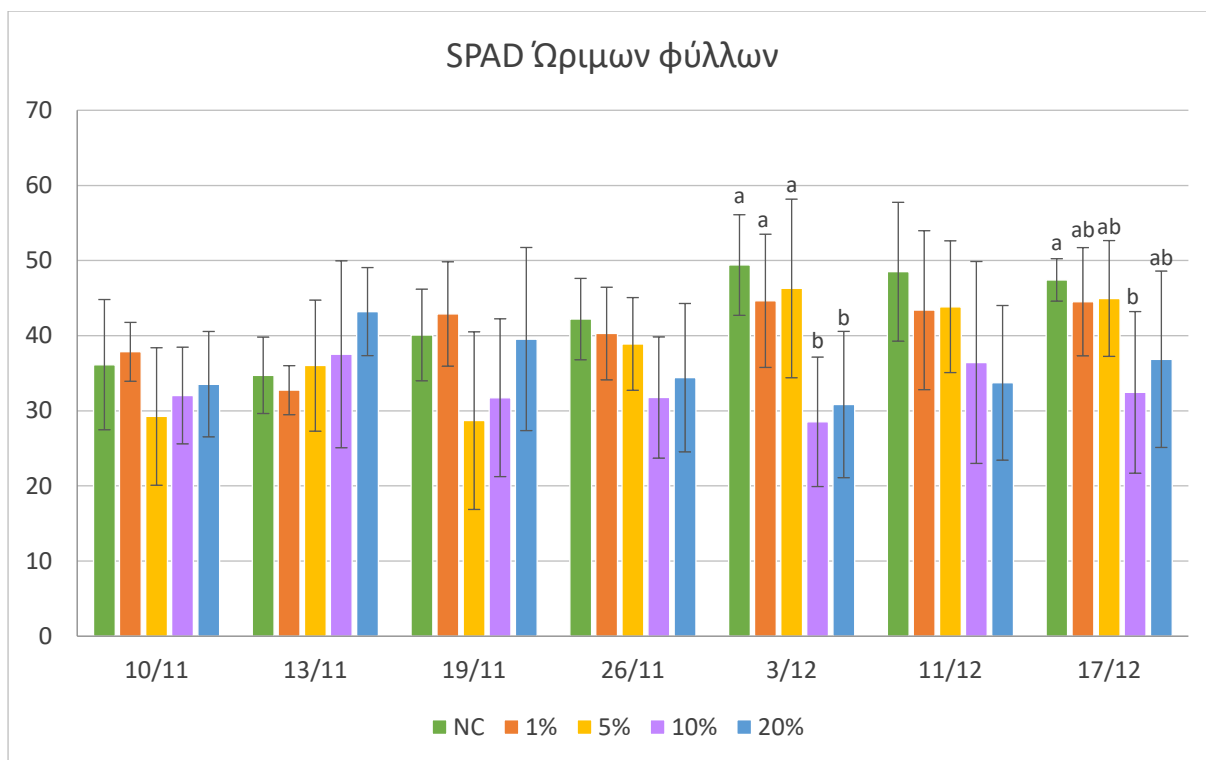
Γράφημα 1. Τιμές του δείκτη SPAD φύλλων ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Στη συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών στα νεαρά φύλλα των φυτών, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τα παραπάνω με την διαφορά ότι στην τελευταία μέτρηση η μεταχείριση 10% είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο με την μεταχείριση με 20% frass (Γράφημα 2).



Γράφημα 2. Τιμές του δείκτη SPAD των νεαρών φύλλων ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

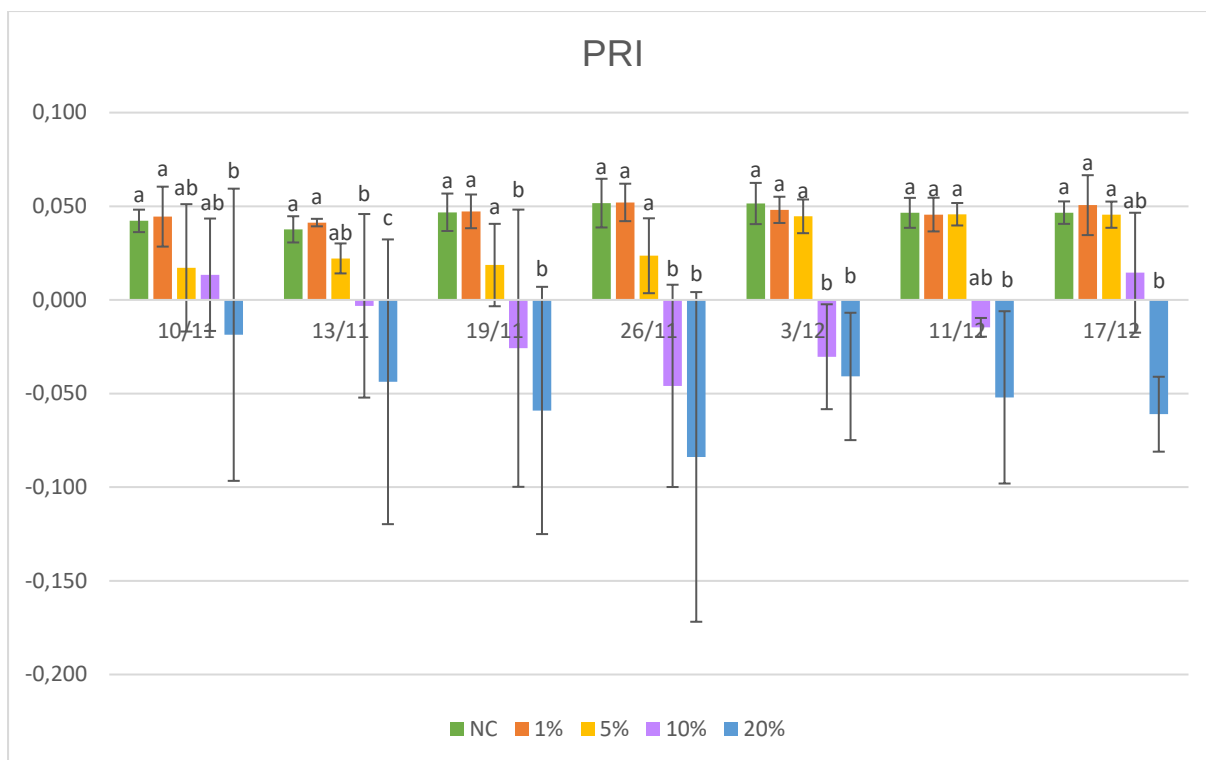
Στα ώριμα φύλλα η συγκέντρωση χλωροφυλλών δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις περισσότερες μετρήσεις. Εξαίρεση αποτελούν δύο από αυτές, στις οποίες οι μεταχειρίσεις με υψηλά ποσοστά frass (10%, 20%) είχαν εμφανώς χαμηλότερες τιμές.



Γράφημα 3. Τιμές του δείκτη SPAD των ώριμων φύλλων ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

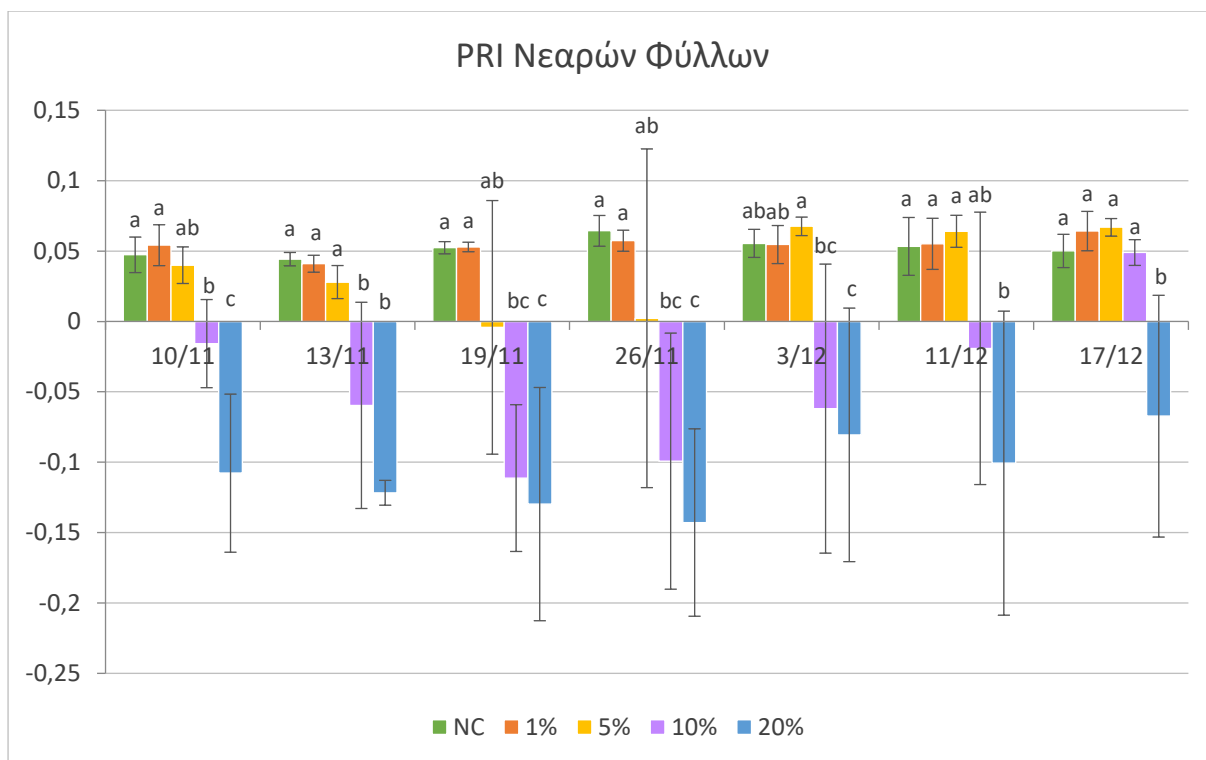
3.1.2 Ανακλαστικότητα – δείκτης PRI

Όσον αφορά την ανακλαστικότητα των φύλλων σπανακιού, οι μεταχειρήσεις NC και 1% πάλι είχαν τις μεγαλύτερες τιμές δείκτη PRI (Γράφημα 4). Η μεταχείριση 5% παρότι αρχικά είχε χαμηλότερες τιμές με τις δύο προηγούμενες, σε κανένα χρονικό σημείο δεν είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές με αυτές. Στο δεύτερο μισό του πειράματος μάλιστα εμφάνισε παρόμοιες και στο τέλος ίδιες τιμές με αυτές. Στις 10% και 20% frass παρατηρήθηκαν κυρίως αρνητικές τιμές έχοντας έτσι στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις προηγούμενες μεταχειρήσεις αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις όχι μεταξύ τους.



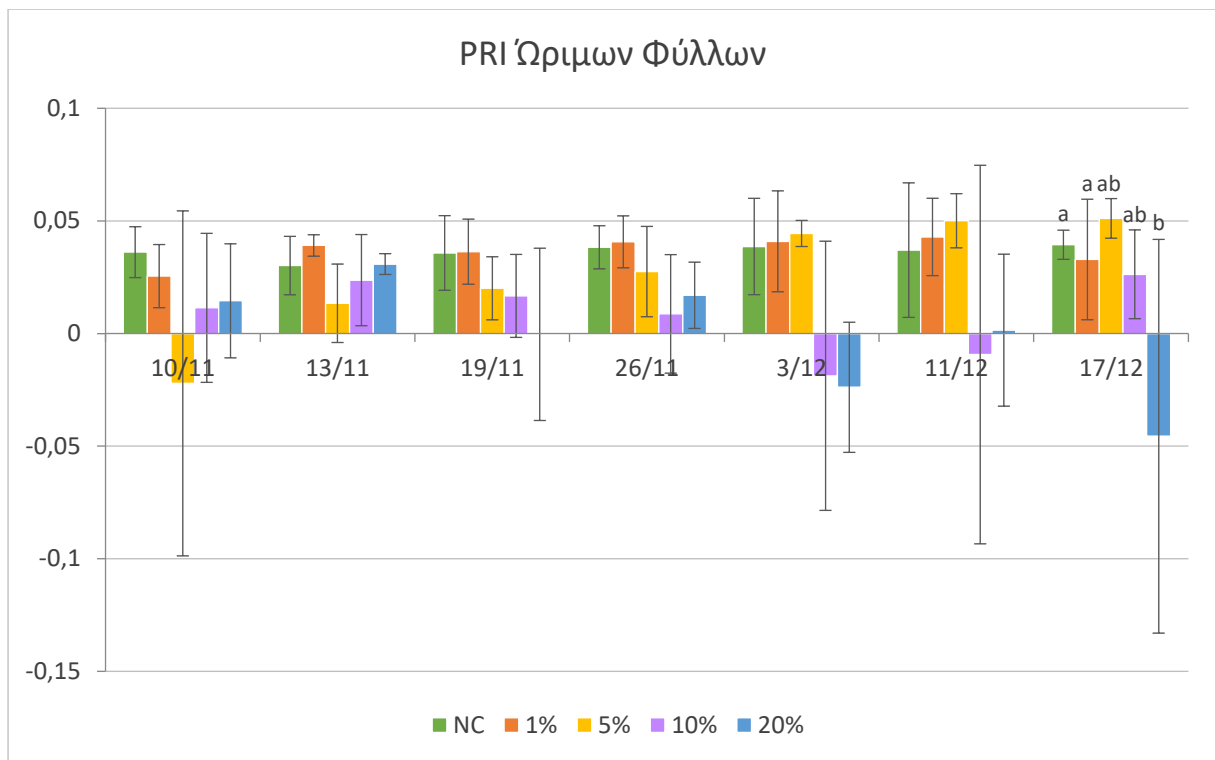
Γράφημα 4. Τιμές του μέσου δείκτη PRI των φύλλων ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Ο δείκτης PRI στα νεαρά φύλλα των φυτών εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στις μεταχειρίσεις του αρνητικού μάρτυρα και στην 1% frass (Γράφημα 5). Μετά τα μισά του πειράματος όμως η μεταχείριση 5% ξεπέρασε τις τιμές των προηγούμενων δύο, χωρίς όμως να παρατηρηθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους σε καμιά ημέρα μέτρησης. Οι μεταχειρίσεις 10% και 20% είχαν σταθερά αρνητικές τιμές με αποτέλεσμα να έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις προηγούμενες τρεις αλλά όχι μεταξύ τους. Εξαίρεση αποτέλεσε η τελευταία μέτρηση για το 10%.



Γράφημα 5. Τιμές του δείκτη PRI στα νεαρά φύλλα ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

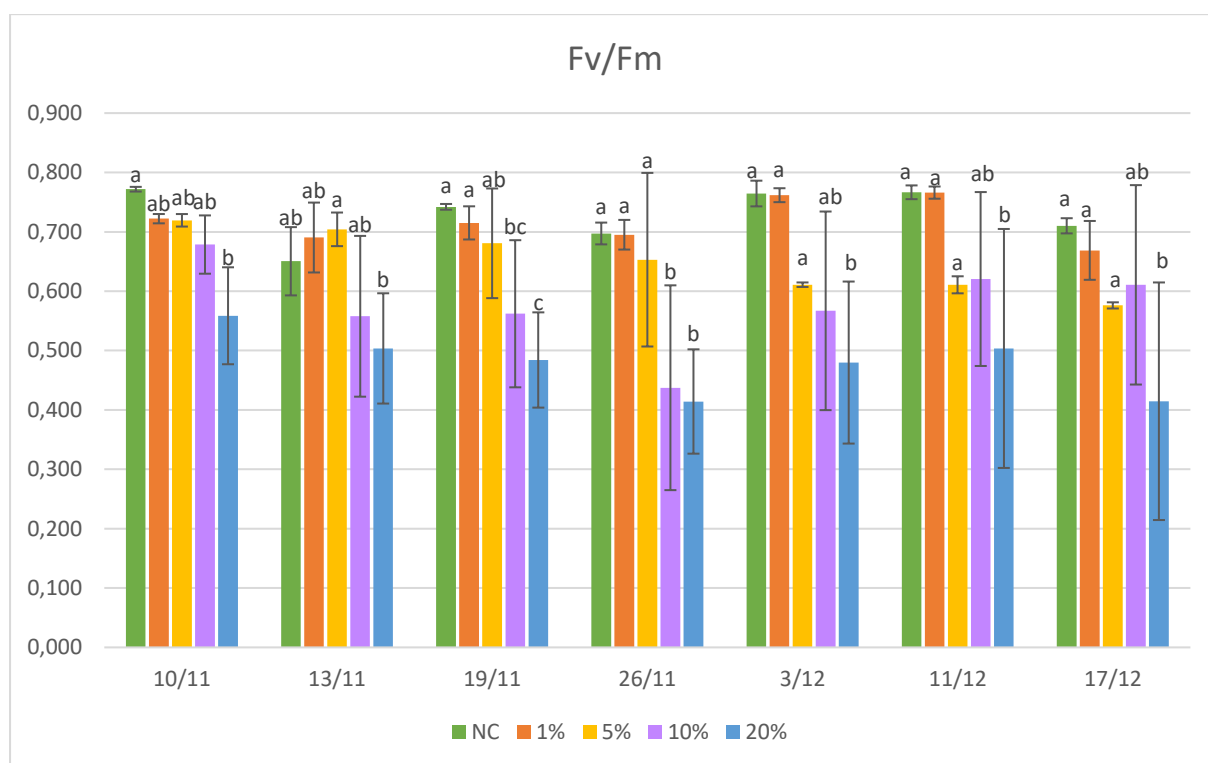
Στα ώριμα φύλλα των φυτών του πειράματος, ο δείκτης PRI δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Η απουσία τέτοιων διαφορών πιθανώς οφείλεται στη μεγάλη διασπορά των μετρήσεων, άρα την ανομοιομορφία στην απόκριση μεταξύ φυτών της ίδιας ομάδας, όπως φαίνεται στο Γράφημα 6. Εξαίρεση αποτέλεσε η τελευταία μέτρηση όπου η μεταχείριση 20% είχε σημαντική διαφορά με τις μεταχειρίσεις NC και 1%.



Γράφημα 6. Τιμές του δείκτη PRI στα ώριμα φύλλα ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

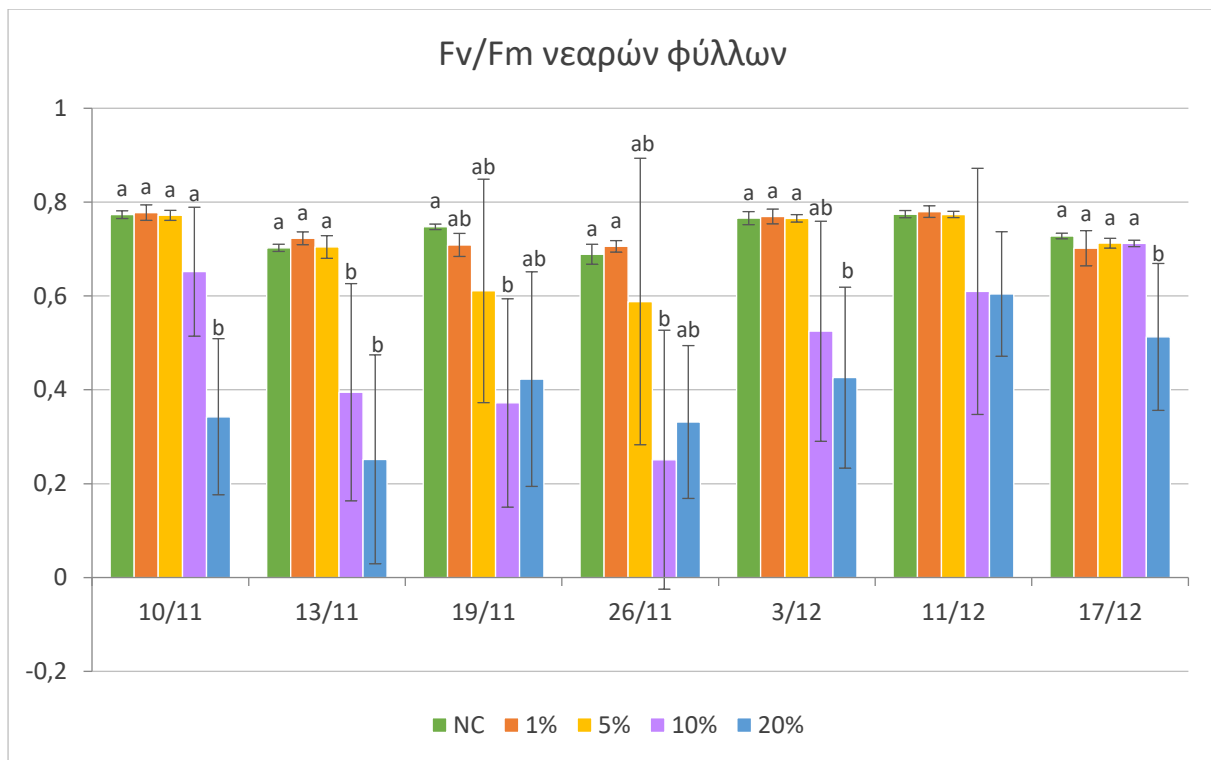
3.1.3 Φθορισμός χλωροφύλλης

Από την μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης παρουσιάζεται ο δείκτης Fv/Fm ως μέση εικόνα όλου του φυτού (Γράφημα 7). Οι μεταχειρήσεις με υψηλά ποσοστά frass παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές στο συγκεκριμένο δείκτη. Συγκεκριμένα, οι μεταχειρίσεις NC, 1% και 5% δεν είχαν σε κανένα χρονικό σημείο στατιστικές σημαντικές διαφορές, ενώ η μεταχείριση 20% είχε σταθερά στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις προηγούμενες τρεις. Η μεταχείριση 10% εμφάνισε ενδιάμεσες των παραπάνω τιμές και δεν διέφερε σημαντικά με καμία μεταχείριση.



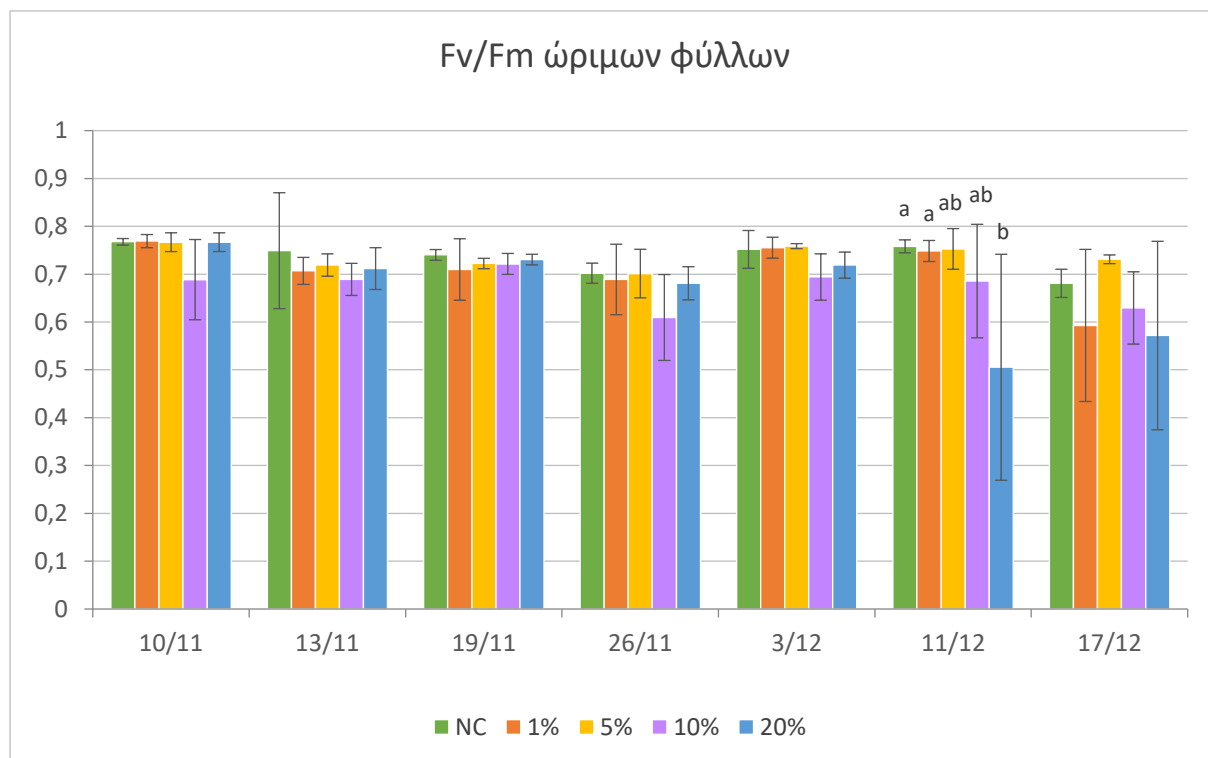
Γράφημα 7. Η παράμετρος φθορισμού Fv/Fm ως συνολική εικόνα των φυτών ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Στα νεαρά φύλλα οι τιμές του δείκτη ήταν πάλι μικρότερες για τις μεταχειρίσεις 10% και 20%. Οι υπόλοιπες τρεις μεταχειρίσεις είχαν παρόμοιες τιμές, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στην τελευταία μέτρηση η μεταχείριση 10% έφτασε τις τιμές των NC, 1% και 5%. Η μεταχείριση 20% είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις μεταχειρίσεις NC, 1% και 5%.



Γράφημα 8. Η παράμετρος φθορισμού Fv/Fm στα νεαρά φύλλα ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Η παράμετρος φθορισμού Fv/Fm στα ώριμα φύλλα των φυτών δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων σχεδόν σε καμία μέτρηση. Εξάιρεση ήταν η προτελευταία, όπου η μεταχείριση 20% διέφερε σημαντικά από τις NC και 1%.

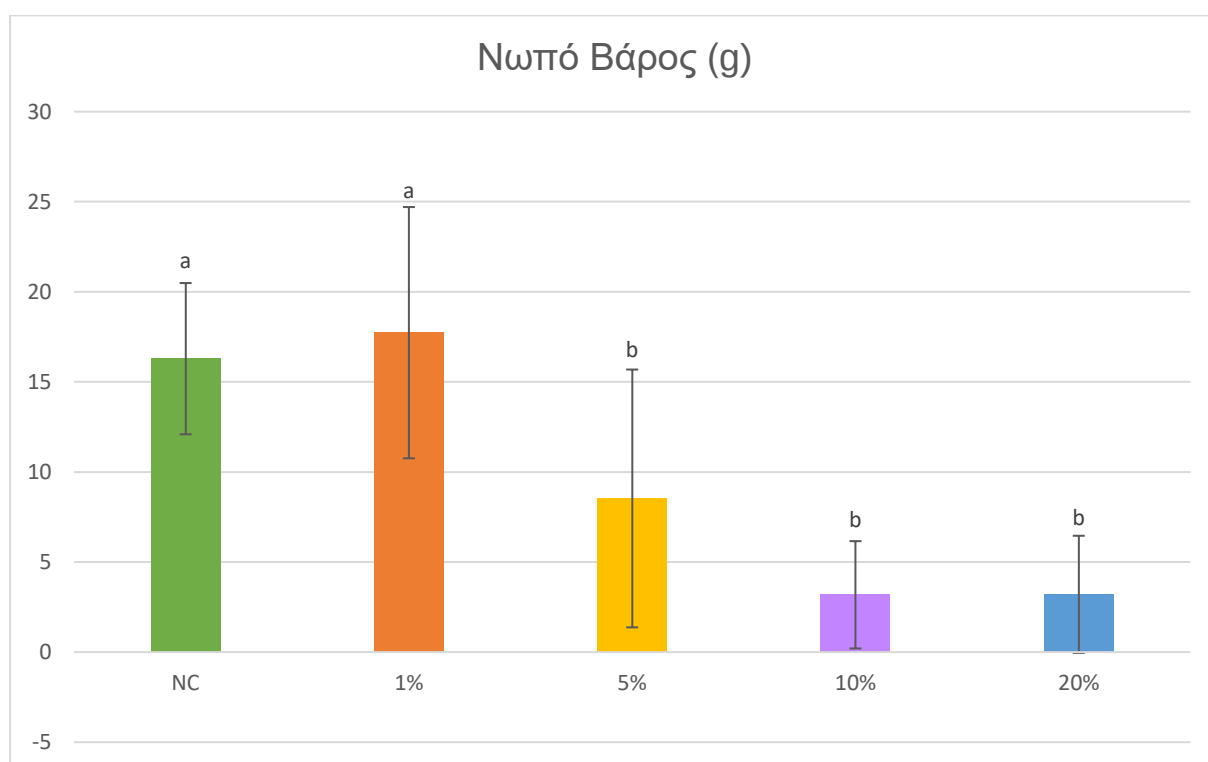


Γράφημα 9. Η παράμετρος φθορισμού Fv/Fm στα ώριμα φύλλα ανά ημερομηνία πειράματος (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

3.2 Αναπτυξιακά χαρακτηριστικά φυτών

3.2.1 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου και υπόγειου τμήματος

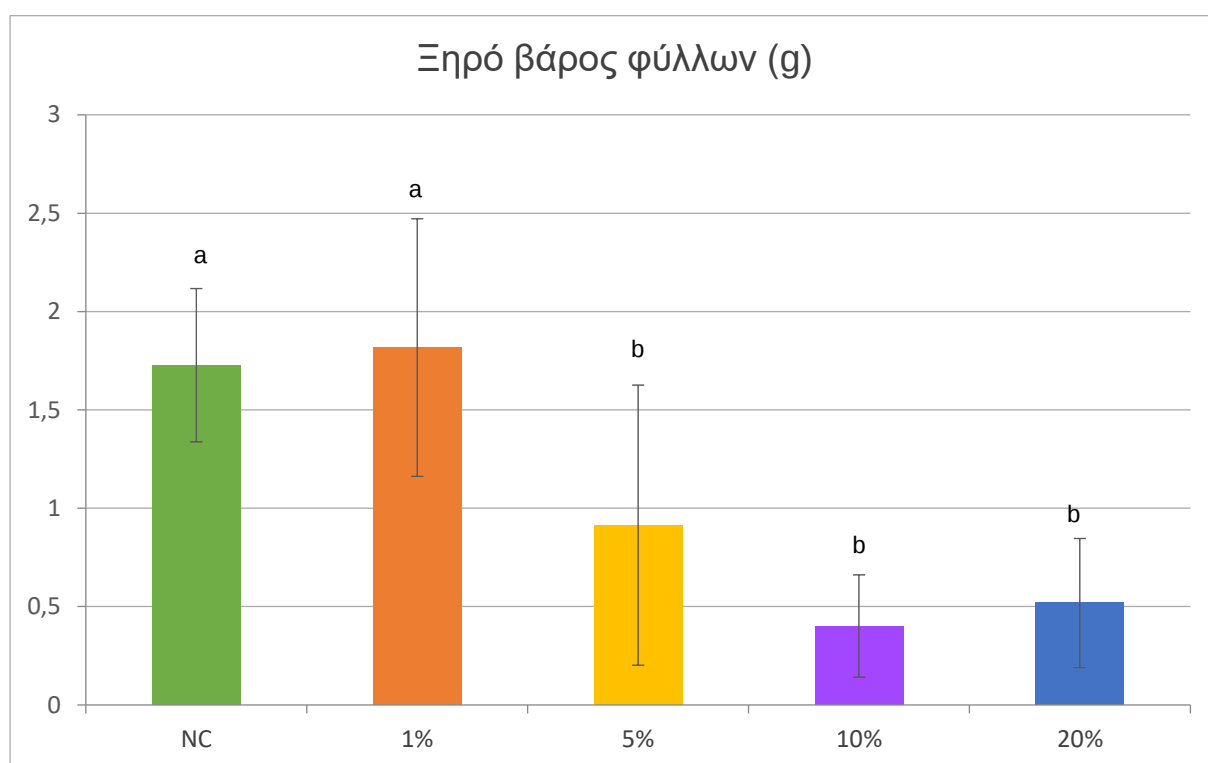
Η μεταχείριση 1% εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών και ακολούθησε με παρόμοιες τιμές η NC, χωρίς να εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 10). Αντίθετα διέφεραν σημαντικά από τις υπόλοιπες, με τις μεταχειρίσεις 10% και 20% να εμφανίζουν μία κατά 80% μείωση ως προς το NC. Η μεταχείριση 5% εμφάνισε ενδιάμεσες τιμές και μείωση 47% ως προς το NC.



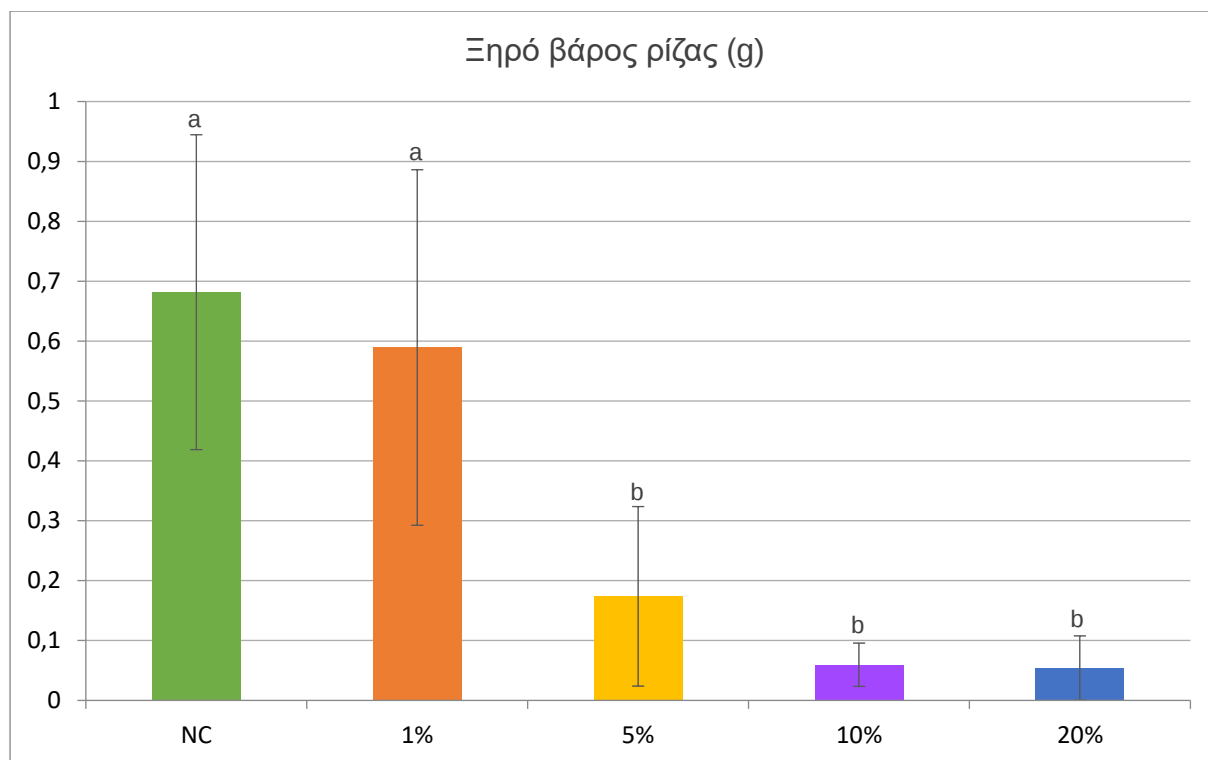
Γράφημα 10. Νωπό βάρος φύλλων των μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Στο ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος τα αποτελέσματα ήταν όμοια με αυτά του νωπού με τη διαφορά ότι τα φυτά με 20% frass πήγαν ελαφρώς καλύτερα από αυτά με 10% (Γράφημα 11). Και πάλι η εκατοστιαίες διαφορές είναι πολύ σημαντικές ανάμεσα στις 5%, 10% και 20% με το NC, οι οποίες φτάνουν το 47%, 76% και 70% αντίστοιχα.

Σε ότι αφορά το ξηρό βάρος του ριζικού συστήματος (Γράφημα 12) η μεταχείριση του αρνητικού μάρτυρα (NC) είχε τις μεγαλύτερες τιμές και ακολουθεί η 1% χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Οι επόμενες τρεις μεταχειρίσεις (5%,10%,20%) δεν είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους αλλά είχαν με τις NC και 1%. Οι μειώσεις της βιομάζας της ρίζας στις τρεις αυτές μεταχειρίσεις ως προς τον μάρτυρα ήταν της τάξης του 75%, 91% και 92% αντίστοιχα.



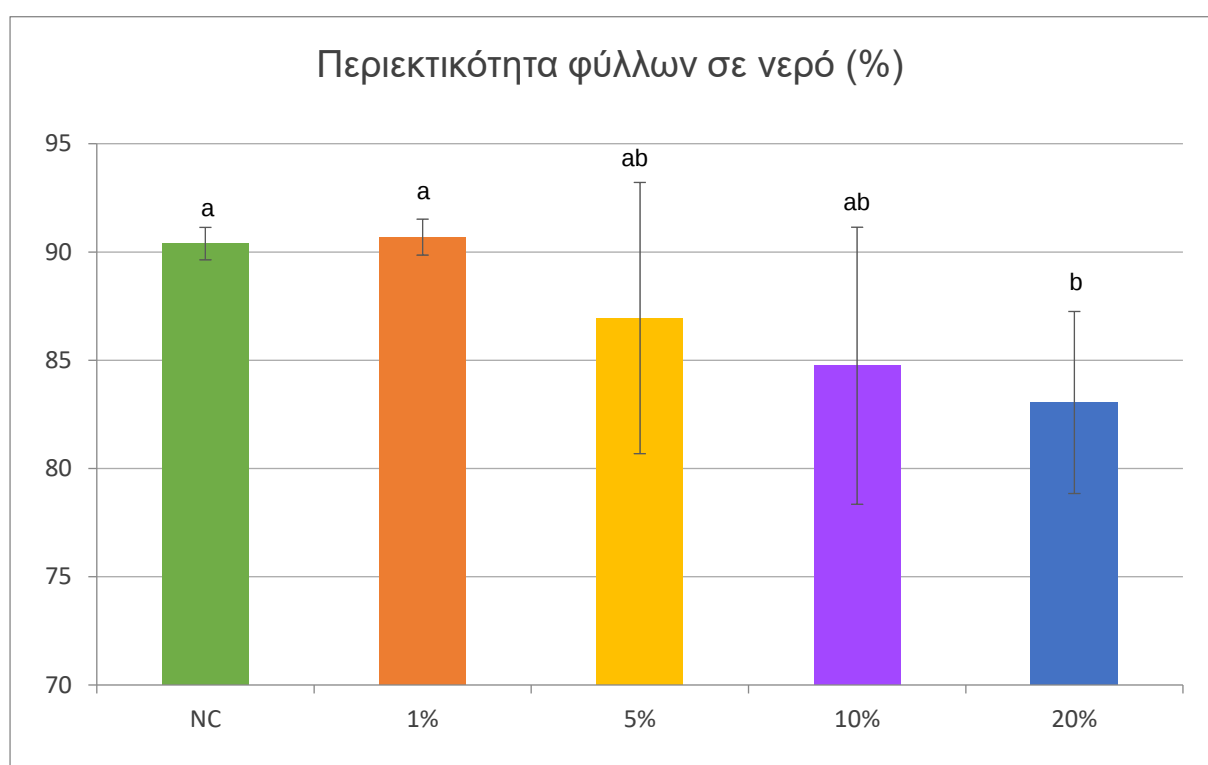
Γράφημα 11. Ξηρό βάρος φύλλων των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±T.A.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.



Γράφημα 12. Ξηρό βάρος ριζικού συστήματος των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

3.2.2 Περιεκτικότητα σε νερό και κατανομή βιομάζας

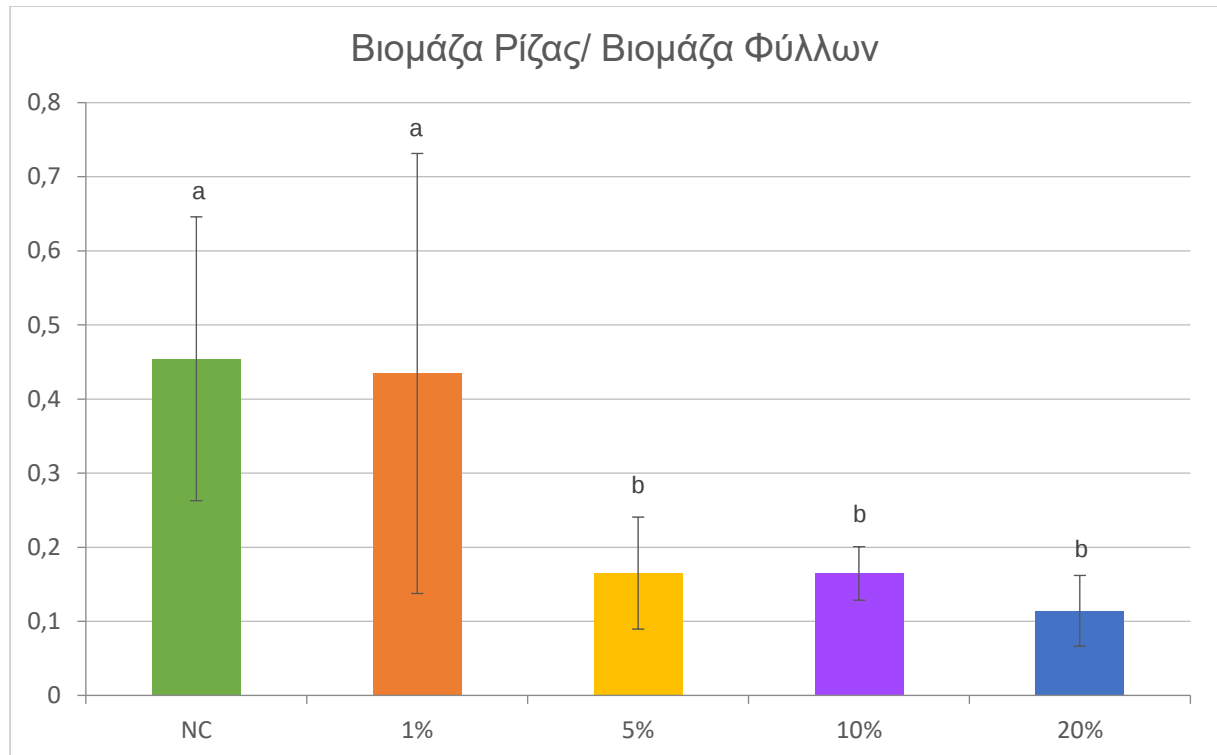
Στην περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό ως επί τοις εκατό παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές στις μεταχειρίσεις του αρνητικού μάρτυρα (NC) και στην 1% συγκέντρωση frass (Γράφημα 13). Αυτές οι δύο μεταχειρίσεις είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με την μεταχείριση 20%, ενώ οι συγκεντρώσεις 5% και 10% δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με καμία μεταχείριση. Η μεταχείριση 20% εμφάνισε το σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό νερού, αφού έπεσε στο 83% σε αντίθεση με το 90% των NC και 1%.



Γράφημα 13. Περιεκτικότητα νερού, επί τις εκατό, στα φύλλα των διάφορων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±Τ.Α.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

Όσον αφορά την κατανομή βιομάζας μεταξύ υπόγειου και υπέργειου τμήματος όπως αυτή εκφράζεται από το λόγο των αντίστοιχων ξηρών βαρών, οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρήθηκαν πάλι στις μεταχειρίσεις NC και 1%, χωρίς να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους αλλά υπήρξαν μεταξύ αυτών και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων. Οι μεταχειρίσεις με 5%, 10% και 20% frass είχαν

παρόμοιες αναλογίες, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

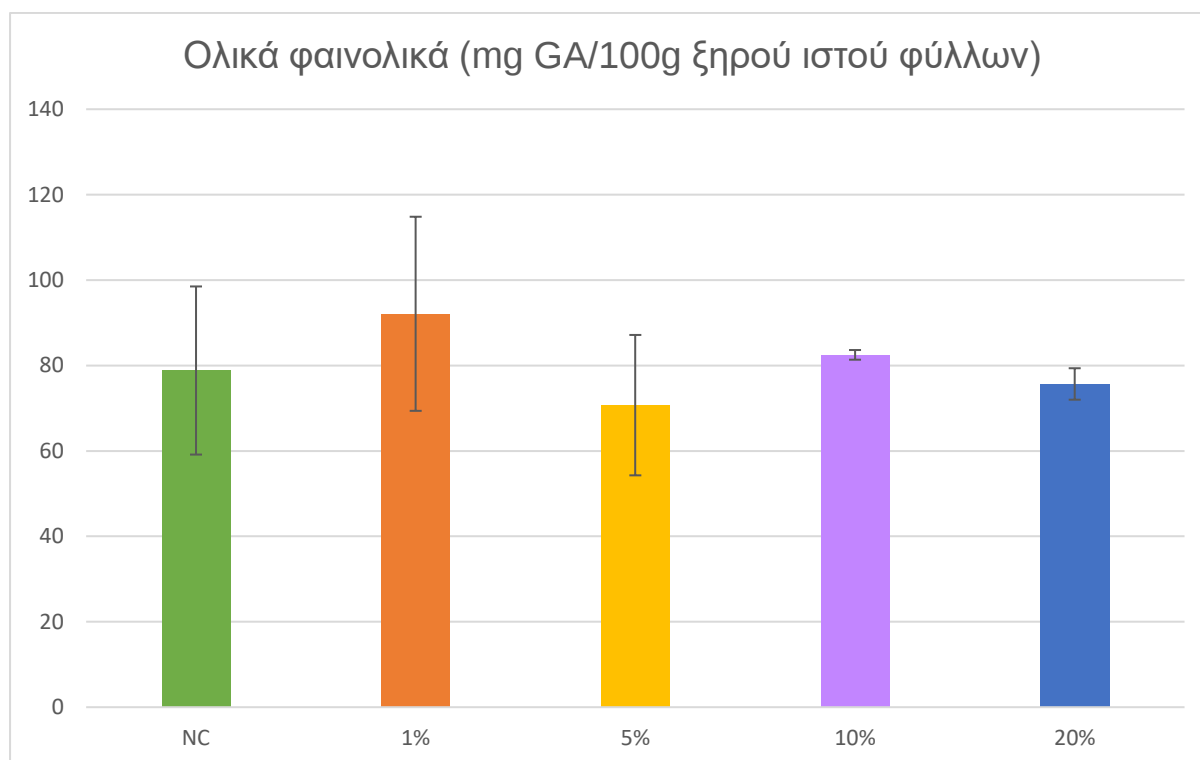


Γράφημα 14. Λόγος ξηρού βάρους ριζικού συστήματος προς ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος των διάφορων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±T.A.). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0,05$.

3.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά

3.3.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών ενώσεων στα φύλλα των φυτών σπανακιού ήταν σε όλες τις μεταχειρίσεις σε αρκετά κοντινές τιμές, με υψηλότερες στη μεταχείριση 1%. Δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Γράφημα 15. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών, εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGA / 100g ξηρού ιστού) κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο±Τ.Α.).

4. Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη εργασία ερευνήθηκε η επίδραση του frass του εντόμου *Tenebrio molitor* στα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά φυτών σπανακιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αποδοτικότητα του frass ως οργανικό λίπασμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το ποσό εφαρμογής του. Τα φυτά της μεταχείρισης του θετικού μάρτυρα ξεράθηκαν τις πρώτες μέρες του πειράματος, λόγω κατακόρυφης αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν δεδομένα για τη συγκεκριμένη μεταχείριση.

Οι χλωροφύλλες είναι εξαιρετικά σημαντικά μόρια καθώς είναι απαραίτητα για τη φωτοσύνθεση. Η μη καταστροφική μέτρηση των συγκεντρώσεων ολικών χλωροφυλλών γίνεται με τον δείκτη SPAD που επιτρέπει τις συχνές καταγραφές και μάλιστα πολλαπλές μετρήσεις στο φυτό. Οι τελευταίες που πραγματοποιήθηκαν και στην παρούσα έρευνα επιτρέπουν την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης στο επίπεδο χλωροφυλλών αναλόγως με την ηλικία του φύλλου. Στο πείραμα μελέτης της επίδρασης του frass στο σπανάκι παρατηρήθηκε πως η μεταχείριση του αρνητικού μάρτυρα είχε τις υψηλότερες τιμές του συγκεκριμένου δείκτη. Από την 1η μέτρηση που έγινε 15 ημέρες μετά την αρχή του πειράματος τα 5-20% frass είχαν μειωμένες χλωροφύλλες. Το πρότυπο των διαφορών σταθεροποιήθηκε μετά τις 25 ημέρες πειράματος και διατηρήθηκε σχεδόν αναλλοίωτο μέχρι το τέλος. Κατ' αυτό, η μεταχείριση του 20% εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τις υπόλοιπες εκτός της 10% που είχε παρόμοιες τιμές. Τα φυτά της μεταχείρισης 5% παρουσίασαν ενδιάμεσες τιμές συγκέντρωσης ολικών χλωροφυλλών, ενώ το NC και το 1% frass ευνόησαν τη βιοσύνθεση σημαντικά περισσότερων χλωροφυλλών. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται πλήρως με τις μετρήσεις σε νεαρά φύλλα, αντικατοπτρίζοντας κυρίως τις μεταξύ αυτών διαφορές καθώς τα ώριμα φύλλα δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων παρά μόνο στην τελευταία μέτρηση. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς σε αντίστοιχο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε φυτά *Brassica rapa*, το οποίο είναι επίσης ένα φυλλώδες λαχανικό, βρέθηκε πως η μεταχείριση με 15% frass είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα χλωροφυλλών και ακολούθησε η 10%, μετά η 5% και τελευταία ήταν η μεταχείριση του αρνητικού μάρτυρα (Agustiyananni et al., 2020). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην έρευνα των Beesigamukama et

al. (2020), όταν σύγκριναν τις τιμές SPAD μεταξύ μεταχειρίσεων σε φυτά αραβόσιτου. Βρέθηκε πως η προσθήκη frass αύξησε τις τιμές του δείκτη. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν οι Poveda et al., (2019) καθώς σε φυτά σέσκουλου (*Beta vulgaris*) που προστέθηκε frass 2% αυξήθηκε η περιεκτικότητα των χλωροφυλλών στα φύλλα.

Ο δείκτης PRI (Photochemical Reflectance Index) σχετίζεται με την αποδοτικότητα χρήσης του φωτός από την φωτοσυνθετική συσκευή (Vanikiotis et al. 2021). Μέσω του δείκτη αυτού γίνονται αντιληπτές οι αλλαγές στη φωτοσυνθετική απόδοση που προκύπτουν από παράγοντες καταπόνησης. Αυτό γίνεται καθώς η μέτρηση ανακλαστικότητας του φύλλου στο συγκεκριμένο φάσμα φωτός σχετίζεται με τη δραστηριότητα του κύκλου των ξανθοφυλλών. Μία υψηλή τιμή του δείκτη παραπέμπει σε χαμηλή δραστηριότητα του κύκλου των ξανθοφυλλών και συγκεκριμένα σε χαμηλές συγκεντρώσεις των ανθεραξανθίνης και ζεαξανθίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας, επομένως παραπέμπει σε μεγαλύτερη αποδοτικότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής. Άρα, όσο χαμηλότερος είναι ο δείκτης τόσο λιγότερο αποδοτική είναι η φωτοσυνθετική συσκευή (Sukhova et al., 2022, Demmig-Adams et al., 1996). Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι τιμές του δείκτη PRI έδειξαν πως στις μεταχειρίσεις του αρνητικού μάρτυρα και η 1% δεν υπήρχαν σημαντικές καταπονήσεις καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αντιθέτως οι μεταχειρίσεις με υψηλά ποσοστά frass (10%, 20%) παρουσίασαν κυρίως αρνητικές τιμές του δείκτη που σημαίνει πως είχαν έντονη καταπόνηση. Στη μεταχείριση 5% ο δείκτης PRI αρχικά ήταν κοντά στις τιμές των 10% και 20% αλλά μετά τα μέσα του πειράματος η αποδοτικότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής φάνηκε να φτάνει στα επίπεδα του 1% frass. Όπως στην περίπτωση του SPAD έτσι και εδώ, τα νεαρά φύλλα ευθύνονται κυρίως για το συγκεκριμένο πρότυπο διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων, καθώς στα ώριμα φύλλα παρατηρήθηκε σημαντική ανομοιομορφία στην απόκριση μεταξύ φυτών της ίδιας ομάδας. Αυτό οδήγησε σε μεγάλη διασπορά των μετρήσεων, επομένως ο δείκτης PRI δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, παρόλον ότι η τάση ήταν παρόμοια με τα νεαρά φύλλα.

Η μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης αποτελεί μια μη καταστροφική μέθοδο αξιολόγησης της δραστηριότητας και των αποδόσεων του φωτοσυστήματος

II (PSII). Συγκεκριμένα, μετράται το μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας που επανεκπέμπεται ως φως από το PSII (Murchie et al., 2013). Η μείωση της τιμής του F_v/F_m παραπέμπει σε καταπόνηση που μπορεί να μειώσει την απόδοση του PSII, ενώ εάν η μείωση παρατηρείται συνεχώς να υποδηλώνει κάποια βλάβη. Στο πείραμα με τα φυτά σπανακιού, οι μεταχειρίσεις του NC και η 1% εμφάνισαν την καλύτερη απόδοση του PSII καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με τις υψηλότερες τιμές F_v/F_m . Με την αύξηση του ποσοστού frass στο έδαφος πέραν του 5% παρατηρήθηκε αύξηση της καταπόνησης της φωτοσυνθετικής συσκευής, όπως καταγράφηκε στις πολύ χαμηλές τιμές του δείκτη φθορισμού. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της αύξησης της φωτοσυνθετικής ικανότητας που βρέθηκε σε αντίστοιχα πειράματα προσθήκης frass στο έδαφος (Terfa, 2021). Επίσης, στο πείραμα των Khan et al. (2002) που έγινε διαφυλλική εφαρμογή χιτίνης σε φυτά αραβοσίτου και σόγιας, βρέθηκε πως η χιτίνη, που περιέχεται και στο frass, αυξάνει τη φωτοσυνθετική ικανότητα των φυτών. Επομένως, ήταν αναμενόμενο να παρατηρηθεί μία αύξηση των τιμών F_v/F_m κατά τη διάρκεια του πειράματος στις μεταχειρίσεις με frass. Η σημαντική μείωση και αυτού του παράγοντα επιβεβαιώνει πως οι μεγάλες συγκεντρώσεις frass προκάλεσαν έντονη καταπόνηση στα φυτά.

Η ανάπτυξη του φυτού ευνοήθηκε σημαντικά από την προσθήκη 1% frass, όπως φάνηκε σε όλες τις αναπτυξιακές παραμέτρους που μετρήθηκαν στην τελική συλλογή. Στο νωπό αλλά και στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών του σπανακιού η μεταχείριση 1% είχε ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές από αυτές του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Αναλυτικότερα, στο πείραμα των Poveda et al., (2019) με την προσθήκη frass 2%, του εντόμου *T. molitor*, αυξήθηκε το βάρος του υπέργειου τμήματος των σέσκουλων (*Beta vulgaris*). Μία ακόμα έρευνα με παρόμοια αποτελέσματα ήταν αυτή των Watson et al. (2021) όπου με την προσθήκη 1,5% frass, του εντόμου *T. molitor*, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Στο παρόν πείραμα, οι υψηλότερες του 1% συγκεντρώσεις frass όπως φάνηκε και με τις προηγούμενες μετρήσεις, αντιμετώπισαν προβλήματα στην ανάπτυξη τους. Σημαντικά χαμηλότερες τιμές νωπού και ξηρού βάρους του υπέργειου τμήματος, αλλά και της ρίζας καταγράφηκαν στις μεταχειρίσεις 10% και 20%, με τις μειώσεις στην τελευταία παράμετρο να φτάνουν στο 92% σε σύγκριση με το NC. Άρα, η προσθήκη frass στο

έδαφος μείωσε την ικανότητα των φυτών να αναπτύξουν το ριζικό τους σύστημα. Τα τελευταία αποτελέσματα έρχονται σε διαφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς στο πείραμα που έγινε σε φυτά *Brassica rapa* παρατηρήθηκε πως σε συγκεντρώσεις frass της τάξεως 5%,10% και 15% το νωπό βάρος των φυτών αυξήθηκε σημαντικά (Agustiysianni et al., 2020).

Η κατανομή βιομάζας μεταξύ του υπέργειου και του υπόγειου φυτικού τμήματος είναι απόκριση στις επικρατούσες συνθήκες ανάπτυξης του φυτού που καθορίζουν και τις προτεραιότητες του ως προς την αναζήτηση ενέργειας ή/και νερού-θρεπτικών. Η κατανομή βιομάζας εκφράζεται ως λόγος του ξηρού βάρους της ρίζας προς το ξηρό βάρος των φύλλων. Στην παρούσα έρευνα, η εφαρμογή 1% frass αλλά και το NC εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ σημαντικές μειώσεις καταγράφηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις frass, οι οποίες παρουσίασαν ίδιες τιμές μεταξύ τους. Αυτό σχετίζεται με το προαναφερθέν αποτέλεσμα των μεταχειρίσεων στη βιομάζα της ρίζας, όπου φάνηκε ότι τα φυτά που δέχτηκαν υψηλά ποσοστά frass δεν ανέπτυξαν επαρκώς το ριζικό τους σύστημα. Η συγκεκριμένη παρατήρηση συνάδει με το αποτέλεσμα του πειράματος του Blakstad, 2021, όπου βρέθηκε πως σε φυτά ντομάτας (*Solanum lycopersicum* var. *MoneyMaker*) ο λόγος της βιομάζας της ρίζας προς τη βιομάζα του υπέργειου τμήματος μειώθηκε με την προσθήκη 2% frass, του εντόμου *Tenebrio molitor*. Αυτό το αποτέλεσμα είναι και το αναμενόμενο καθώς με την προσθήκη frass ικανοποιούνται ευκολότερα οι ανάγκες του φυτού για εξεύρεση θρεπτικών. Επομένως η ρίζα αναπτύσσεται λιγότερο και το μεγαλύτερο μέρος του φωτοσυνθετικού προϊόντος κατευθύνεται στην ανάπτυξη του υπέργειου μέρους για την μέγιστη εκμετάλλευση της ενεργειακής πηγής (ηλιακό φως), ώστε να προωθήσει την περαιτέρω ανάπτυξη του φυτού.

Η περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό επίσης μειώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης frass, ενώ και πάλι, η συγκέντρωση 1% εμφάνισε παρόμοια υψηλό με το NC περιεχόμενο νερό. Το αποτέλεσμα αυτό παραπέμπει σε υδατική καταπόνηση των φυτών με υψηλά ποσοστά frass, παρόλο που η άρδευση ήταν ίδια σε όλες τις μεταχειρίσεις. Η μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό στα φύλλα των συγκεκριμένων φυτών μπορεί να οφείλεται στην καχεκτική ανάπτυξη του ριζικού τους συστήματος. Είναι γνωστό πως η υδατική καταπόνηση μπορεί να προκαλέσει μείωση της δραστηριότητας των στομάτων των φύλλων, με αποτέλεσμα την καταστολή γονιδίων

που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και την μειωμένη διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα στο φυτό (Osakabe et al., 2014). Επομένως, η μειωμένη φωτοσυνθετική ικανότητα που παρατηρήθηκε στα φυτά των μεταχειρίσεων με υψηλά ποσοστά frass μπορεί να οφείλεται και στην υδατική καταπόνηση που προκλήθηκε, πιθανώς λόγω της καχεκτικής ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών αυτών.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και αποτελούνται από υδροξυλιωμένους αρωματικούς δακτυλίους (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012). Είναι εξαιρετικά σημαντικές ενώσεις για το φυτό διότι σχετίζονται με πολλές βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως η άμυνα απέναντι σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, έντομα και φυτοφάγα ζώα, η προσέλκυση επικονιαστών και η εξοικονόμηση νερού. Επίσης, με την αντιοξειδωτική τους δράση παρέχουν προστασία στα φυτά και από αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012). Απομακρύνουν δηλαδή τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται με την παρουσία αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Salim et al., 2022). Στο πείραμα της παρούσας εργασίας, η συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα φύλλα ήταν ελαφρώς υψηλότερη στη μεταχείριση 1% αλλά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Συνεπώς, η προσθήκη frass στο έδαφος δεν ενεργοποίησε μηχανισμούς άμυνας στα φυτά σπανακιού, όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία (Barragán-Fonseca et al., 2022).

5. Συμπεράσματα

- Η εφαρμογή frass σε συγκέντρωση 1% προώθησε την ανάπτυξη του σπανακιού, όπως φάνηκε από όλες τις αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους που καταγράφηκαν.
- Τα φυτά-μάρτυρες (NC) που ποτίστηκαν μόνο με νερό εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά σε όλες τις μετρηθείσες παραμέτρους με τη μεταχείριση 1% frass.
- Η εφαρμογή frass σε συγκεντρώσεις 5%, 10% και 20%, προκάλεσε σημαντική καταπόνηση στα φυτά.
- Η εφαρμογή χημικών λιπασμάτων σε επίπεδα θρεπτικών παρόμοια με αυτά του 1% frass είχε καταστροφικές επιπτώσεις για τα φυτά της μεταχείρισης του θετικού μάρτυρα (PC).
- Η συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών στα φύλλα ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τη ποσότητα frass που προστέθηκε στις διάφορες μεταχειρίσεις. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται κυρίως στις αντίστοιχες διαφορές στα νεαρά φύλλα των φυτών, ενώ τα ώριμα δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων.
- Ο δείκτης PRI της αποδοτικότητας χρήσης φωτός από την φωτοσυνθετική συσκευή ήταν σημαντικά υψηλότερος στις μεταχειρίσεις NC και 1% frass, ενώ οι τιμές του στα φυτά των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων frass παρέπεμπαν σε ισχυρή καταπόνηση.
- Η φωτοχημική απόδοση του PSII, που εκτιμάται με το δείκτη Fv/Fm, επιβεβαίωσε την αυξανόμενη καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής με την αύξηση του ποσοστού frass στο έδαφος.
- Η εφαρμογή frass σε ποσότητα 1% αύξησε σημαντικά την υπέργεια και υπόγεια βιομάζα των φυτών, ενώ οι μεταχειρίσεις 10% και 20% frass προκάλεσαν μία κατά 92% μείωση της βιομάζας της ρίζας.
- Το περιεχόμενο σε νερό στα φύλλα και ο λόγος της βιομάζας της ρίζας προς τη βιομάζα του υπέργειου τμήματος, μειώθηκαν με την προσθήκη frass πέραν του 5%.

- Η χρήση frass δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων στα φυτά.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

- Καραμπουρνιώτης Γ.Α., Λιακόπουλος Γ., Νικολόπουλος Δ., (2012). *Φυσιολογία Καταπονήσεων των φυτών*, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Χα Ι. Α., Πετρόπουλος Σ., (2014). *Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος. σελ. 667-675
- Taiz L., Zeiger E., Møller I.M., Murphy A., (2014), *Φυσιολογία και ανάπτυξη φυτών*, Γενική επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Κ. Θάνος, Εκδόσεις Utopia

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Adams, W. W. (1996). *The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis*. In *trends in plant science*. Elsevier Ltd.
- Agustiyani, D., Agandi, R., Arinafril, Nugroho, A. A., & Antonius, S. (2021). *The effect of application of compost and frass from Black Soldier Fly Larvae (Hermetia illucens L.) on growth of Pakchoi (Brassica rapa L.)*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 762. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/762/1/012036>
- Barragán-Fonseca, K. Y., Nurfikari, A., van de Zande, E. M., Wantulla, M., van Loon, J. J. A., de Boer, W., & Dicke, M. (2022). Insect frass and exuviae to promote plant growth and health. In *Trends in Plant Science* (Vol. 27, Issue 7, pp. 646–654). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.01.007>
- Beesigamukama, D., Mochoge, B., Korir, N. K., Fiaboe, K. K. M., Nakimbugwe, D., Khamis, F. M., Subramanian, S., Dubois, T., Musyoka, M. W., Ekesi, S., Kelemu, S., & Tanga, C. M. (2020). Exploring Black Soldier Fly Frass as Novel Fertilizer for Improved Growth, Yield, and Nitrogen Use Efficiency of Maize Under Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.574592>
- Blakstad, J. I. (2021). *The utilization of frass from the yellow mealworm (Tenebrio molitor) as a plant fertilizer and immune stimulant*.

- Chavez, M., & Uchanski, M. (2021). Insect left-over substrate as plant fertiliser. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7, 683–694. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0063>
- Chiam, Z., Lee, J. T. E., Tan, J. K. N., Song, S., Arora, S., Tong, Y. W., & Tan, H. T. W. (2021). Evaluating the potential of okara-derived black soldier fly larval frass as a soil amendment. *Journal of Environmental Management*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112163>
- Choi, S., & Hassanzadeh, N. (2019). BSFL Frass: A Novel Biofertilizer for Improving Plant Health While Minimizing Environmental Impact. *The Canadian Science Fair Journal*. <https://doi.org/10.18192/csfj.v2i220194146>
- Dulaurent, A. M., Daoulas, G., Faucon, M. P., & Houben, D. (2020). Earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) mediate the fertilizing effect of frass. *Agronomy*, 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060783>
- Fabiano Caio C., TiagoTezotto, JoséL.Favarin, JosephC.Polacco and Paulo Mazzafera (2015), Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses, *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00754>
- Food and Agriculture Organization. (2009). *How to Feed the World in 2050*.
- Food and Agriculture Organization. (2013). *Food wastage footprint : impacts on natural resources : summary report*. FAO.
- Houben, D., Daoulas, G., & Dulaurent, A. M. (2021). Assessment of the Short-Term Fertilizer Potential of Mealworm Frass Using a Pot Experiment. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.714596>
- Houben, D., Daoulas, G., Faucon, M. P., & Dulaurent, A. M. (2020). Potential use of mealworm frass as a fertilizer: Impact on crop growth and soil properties. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61765-x>
- Khan, W. M., Prithiviraj, B., & Smith, D. L. (2002). Effect of Foliar Application of Chitin and Chitosan Oligosaccharides on Photosynthesis of Maize and Soybean. *Photosynthetica*, 40, 621–624. <https://doi.org/10.1023/A:1024320606812>
- Milton Ferreira Moraes, Andr Rodrigues Reis, Larissa Alexandra C. Moraes, Jos LavresJunior, Rafael Vivian, Cleusa Pereira Cabral & Eurpedes Malavolta (2009) Effects of Molybdenum, Nickel and Nitrogen Sources on the Mineral Nutrition and Growth of Rice Plants, *Communications in Soil Science and*

- Morelock, T. E., & Correll, J. C. (2008). Spinach. In *Vegetables I* (pp. 189–218). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_6
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 64, Issue 13, pp. 3983–3998). <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Nedi Terfa, G. (2021). Role of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Frass Bio-fertilizer on Vegetable Growth and Sustainable Farming in Sub-Saharan Africa. *Reviews in Agricultural Science*, 9, 92–102. https://doi.org/10.7831/ras.9.0_92
- Osakabe Yuriko, Osakabe Keishi, Shinozaki Kazuo and Lam-Son P. Tran (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in PLANT SCIENCE*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Poveda, J. (n.d.). *Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review*. <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x/Published>
- Poveda, J., Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Usategui-Martín, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2019). Mealworm frass as a potential biofertilizer and abiotic stress tolerance-inductor in plants. *Applied Soil Ecology*, 142, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.016>
- Pulles, J. P. J., Haveman, M. P. J., & Den Haan, J. (1976). PRIMARY REACTIONS OF PHOTOSYSTEM II AT LOW pH. LIGHT-INDUCED CHANGES OF ABSORBANCE AND ELECTRON SPIN RESONANCE IN SPINACH CHLOROPLASTS. In *Biochim. Biophys. Acta* (Vol. 423).
- Quilliam, R. S., Nuku-Adeku, C., Maquart, P., Little, D., Newton, R., & Murray, F. (2020). Integrating insect frass biofertilisers into sustainable peri-urban agro-food systems. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(3), 315–322. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0049>
- Salim, M., Saeed, A., Iqbal, M., Khan, B. A., Khan, N., Rabbani, I., Alsenani, F., & Rasul, A. (2024). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. *Brazilian Journal of Biology*, 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256486>

- Vanikiotis, T.; Stagakis, S.; Kyparissis, (2021) A. MODIS PRI Performance to Track Light Use Efficiency of a Mediterranean Coniferous Forest: Determinants, Restrictions and the Role of LUE Range. *Agricultural and Forest Meteorology*, 307, 108518
- Vermeulen, S. J., Campbell, B. M., & Ingram, J. S. I. (2012). Climate change and food systems. In *Annual Review of Environment and Resources* (Vol. 37, pp. 195–222). <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-020411-130608>
- Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, S., & Wang, Y. (2018). What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers? *Journal of Cleaner Production*, 199, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.222>
- Watson, C., Preißing, T., & Wichern, F. (2021). Plant Nitrogen Uptake From Insect Frass Is Affected by the Nitrification Rate as Revealed by Urease and Nitrification Inhibitors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.721840>
- Wu, W. M., & Criddle, C. S. (2021). Characterization of biodegradation of plastics in insect larvae. In *Methods in Enzymology* (Vol. 648, pp. 95–120). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.029>
- Yruela I. (2005), Copper in plants. In toxic metals in plants. *Brazilian journal of Plant Physiology*.
- Zhang, C., Filella, I., Liu, D., Ogaya, R., Llusià, J., Asensio, D., & Peñuelas, J. (2017). Photochemical Reflectance Index (PRI) for detecting responses of diurnal and seasonal photosynthetic activity to experimental drought and warming in a Mediterranean shrubland. *Remote Sensing*, 9. <https://doi.org/10.3390/rs9111189>