

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ-ΥΔΡΟΒΙΑΣ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»**

**« Επίδραση διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην  
αποικοδόμηση νεκρής φυτικής οργανικής ύλης από προνύμφες  
Τριχοπτέρων »**

**ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ**

**ΒΟΛΟΣ 2010**

**« Επίδραση διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην αποικοδόμηση νεκρής φυτικής οργανικής ύλης από προνύμφες Τριχοπτέρων »**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1) **Δημήτριος Σταμόπουλος**, Καθηγητής Ζωολογίας και Υδρόβιας Εντομολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***
- 2) **Νικόλαος Παπαδόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***
- 3) **Χρήστος Ρούμπος**, Διδάσκοντας Π.Δ. 407/80, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***

*Στην οικογένεια μου*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή κ. Δημήτριο Σταμόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο και τον κύριο Χρήστο Ρούμπο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χρήστο Ρούμπο για την άμεση, ανιδιοτελή και αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη και τον Λέκτορα κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την βοήθεια τους στις μετρήσεις με το ειδικό δυναμόμετρο. Ομοίως, τον Καθηγητή κ. Κων/νο Κίττα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Έλενα Μεντέ για την διάθεση των εργαστηριακών αιθουσών τους, καθώς και τον Λέκτορα κ. Χρήστο Λύκα και τον Διδάσκοντα Π.Δ 407/80 κ. Βασίλειο Καραλάζο για την βοήθειά τους στην χρήση των μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) και Kjeldahl, αντίστοιχα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας του νερού καθώς επίσης και η επίδραση της ηλικίας και του μικροβιακού φορτίου των φύλλων στο ρυθμό κατανάλωσης της τροφής από τις προνύμφες του Τριχοπτέρου *Micropterna sequax* σε συνθήκες εργαστηρίου. Το Τριχόπτερο *M. sequax* απαντάται ευρέως στα υδάτινα οικοσυστήματα της περιοχής του Πηλίου. Η τροφή που επιλέχθηκε να προσφερθεί στις προνύμφες ήταν φύλλα οξιάς, γιατί αποτελεί την κυρίαρχη βλάστηση στην περιοχή που έχει ως ενδιαίτημα το έντομο. Οι προνύμφες του *M. sequax* συλλέχθηκαν του Απρίλιο του 2009 από την περιοχή Κοντόρεμα Πηλίου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου και αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 3 μέρες πριν ξεκινήσουν τα πειράματα. Τα φύλλα οξιάς συλλέχθηκαν ξερά το φθινόπωρο και αποθηκεύτηκαν στο εργαστήριο. Δύο εβδομάδες πριν την έναρξη των πειραμάτων τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε ένα κοντινό ρέμα, ώστε να υποστούν τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού (conditioning).

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στο ρυθμό κατανάλωσης της τροφής πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5.5 °C, 9.5 °C, 13 °C και 19 °C). Η τροφή που προσφέρθηκε στις προνύμφες ήταν ξηρά φύλλα οξιάς ενώ μετρήθηκε η ημερήσια κατανάλωση της τροφής από τις προνύμφες. Στο δεύτερο πείραμα, μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax*. Στις προνύμφες προσφέρθηκαν ξηρά και φρέσκα φύλλα οξιάς, τα οποία είχαν υποστεί ή όχι τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού. Η διάρκεια όλων των πειραμάτων ήταν 10 ημέρες. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε χημική ανάλυση των φύλλων καθώς και μέτρηση

της σκληρότητας τους, προκειμένου να διερευνηθούν τα αίτια των προτιμήσεων των προνυμφών.

Από την πρώτη σειρά πειραμάτων φάνηκε ότι η θερμοκρασία παίζει ένα πρωτεύοντα ρόλο στην αποικοδόμηση της φυτικής ύλης από τις προνύμφες *M. sequax*, καθώς παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων τροφής στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Ο μεγαλύτερος ρυθμός κατανάλωσης τροφής από τις προνύμφες καταγράφηκε στους 13 °C και οι μικρότεροι στους 5.5 °C και 9.5 °C. Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος έδειξαν ότι οι προνύμφες *M. sequax* προτιμούν τα ξηρά φύλλα οξιάς έναντι των φρέσκων ενώ αντίθετα δεν καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων φύλλων οξιάς που είχαν ή δεν είχαν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού.

Συνοψίζοντας, η θερμοκρασία του νερού και η ηλικία των φύλλων επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *Micropterna sequax*. Αντίθετα, ο μικροβιακός αποικισμός των φύλλων δεν φαίνεται να επηρεάζει, θετικά ή αρνητικά, την κατανάλωση τους από τις προνύμφες. Σε κάθε περίπτωση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν την κατανάλωση τροφής και την αποικοδόμηση της φυτικής οργανικής ύλης από τις προνύμφες *M. sequax*.

**Λέξεις κλειδιά:** αποικοδόμησης φυτικής ύλης, Trichoptera, *Micropterna sequax*, ρυθμός κατανάλωσης τροφής, μικροβιακός αποικισμός.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>10</b>
1.1. Η σημασία του νερού και των υδάτινων οικοσυστημάτων .....	10
1.2. Ο ρόλος και η σημασία των υδρόβιων εντόμων στα υδάτινα οικοσυστήματα .....	11
1.3. Η τάξη Trichoptera .....	12
1.4. Το γένος <i>Micropterna</i> sp .....	15
1.5. Συστηματική κατάταξη του εντόμου <i>Micropterna sequax</i> .....	16
1.6. Σκοπός ερευνητικής εργασίας.....	16
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>17</b>
2.1. Συλλογή προνυμφών <i>Micropterna sequax</i> .....	17
2.2. Φύλλα Οξιάς .....	18
2.3. Πειραματικός Σχεδιασμός.....	19
2.4. Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών <i>M. sequax</i> . .....	21
2.5. Επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών <i>M. sequax</i> .....	21
2.6. Χημικές αναλύσεις φρέσκων και ξηρών φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν ...	23
2.7. Έλεγχος σκληρότητας φύλλων που εξετάστηκαν.....	28
2.8. Στατιστική Ανάλυση .....	29
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>30</b>
3.1. Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών <i>M. sequax</i> . .....	30



3.2. Επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών <i>M. sequax</i> .....	34
3.3. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης φύλλων οξιάς.....	38
3.4. Αποτελέσματα ελέγχου σκληρότητας φύλλων οξιάς .....	39
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>40</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>44</b>
<b>6. ABSTRACT.....</b>	<b>48</b>
<b>7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>50</b>

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Η σημασία του νερού και των υδάτινων οικοσυστημάτων**

Το νερό αποτελεί πηγή ζωής και απαραίτητο στοιχείο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Όλα τα ζωντανά πλάσματα περιέχουν νερό ως συστατικό στοιχείο τους και τα περισσότερα από αυτά πρέπει να πίνουν ή να απορροφούν νερό σε κανονικά διαστήματα. Επιπρόσθετα, οι λίμνες και τα ποτάμια προσελκύουν μια τεράστια ποικιλία ζώων που διαβιούν στην ξηρά, ενώ πολλά είδη εξαρτώνται εντελώς από το νερό και τους ζωικούς οργανισμούς που διαβιούν μέσα σε αυτό. Φαίνεται έτσι καθαρά ότι τα ποτάμια και οι λίμνες της γης και γενικότερα τα υδάτινα οικοσυστήματα αποτελούν ένα σημαντικό περιβάλλον που συντηρεί έναν πολύπλοκο κόσμο πάνω και κάτω από την επιφάνεια τους (Οικολογική Εγκυκλοπαίδεια 1977).

Επιπλέον, το νερό είναι ένας πόρος που καλύπτει βασικές ανάγκες για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Τα υδάτινα οικοσυστήματα, στο σύνολο τους, (λίμνες, ποτάμια κ.α.) είναι σημαντικά για το ανθρώπινο είδος, γιατί του εξασφαλίζουν την παροχή πόσιμου νερού καθώς και γιατί αποτελούν πεδίο για διάφορες άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες. Για τους λόγους αυτούς καθίσταται αναγκαία η μελέτη των υδάτινων οικοσυστημάτων, των ζωντανών οργανισμών που διαβιούν σε αυτά, καθώς και των σχέσεων και αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ζωντανών οργανισμών και των αβιοτικών παραγόντων.

## **1.2. Ο ρόλος και η σημασία των υδρόβιων εντόμων στα υδάτινα οικοσυστήματα.**

Η μελέτη των υδρόβιων μακροσπόνδυλων και ιδιαίτερα της κλάσεως Insecta, έχει μεγάλη οικολογική σημασία δεδομένου ότι οι οργανισμοί αυτοί έχουν υψηλή δυναμική ως αποικοδομητές της νεκρής οργανικής ουσίας, ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες της καταστάσεως των υδάτινων οικοσυστημάτων.

Τα υδρόβια έντομα παρουσιάζουν μια τεράστια ποικιλία μορφών προσαρμοστικότητας τόσο σε επίπεδο ανατομικών χαρακτηριστικών όσο και σε επίπεδο φυσιολογίας και συμπεριφοράς και αυτό τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε ποικίλα υδάτινα οικοσυστήματα μερικές φορές ιδιαίτερα ακραία.

Η παρουσία των υδρόβιων εντόμων στα υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών νερών είναι έντονη. Αυτό φανερώνει και το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό των μακροσπονδύλων που διαβιεί στα υδάτινα οικοσυστήματα ανήκει στην κλάση των εντόμων (Ward 1992).

Ορισμένα υδρόβια έντομα, μεταβάλλοντας τη συμπεριφορά τους σε υψηλότερες θερμοκρασίες, επιτυγχάνουν την πρόσληψη αρκετού οξυγόνου, π.χ. οι νύμφες των εφημεροπτέρων εκτίθενται περισσότερο στο ρεύμα για να εξασφαλίσουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα οξυγόνου (Wiley and Kohler 1980).

Η σημαντικότερη λειτουργία των υδροβίων εντόμων είναι αυτή της αποικοδόμησης της νεκρής οργανικής ύλης στα υδάτινα οικοσυστήματα. Με τον όρο αποικοδομητές εννοούμε τους οργανισμούς οι οποίοι αποικοδομούν την νεκρή οργανική ύλη και αφομοιώνουν τα προϊόντα αυτής της διαδικασίας. Ταυτόχρονα, μπορούν να αποτελέσουν ένδειξη για την κατάσταση διαφόρων στρεσογόνων

παραγόντων σε ένα υδάτινο οικοσύστημα όπως η θερμοκρασία, το pH και το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο.

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η διαδικασία της αποικοδόμησης και ο ρόλος που διαδραματίζουν σε αυτή οι προνύμφες της *Micropterna seguax* (Trichoptera: Limnephilidae) στα υδρόβια οικοσυστήματα μελετήθηκε ο ρόλος της θερμοκρασίας αλλά και της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού της προτεινόμενης τροφής στην ποσότητα της νεκρής οργανικής ύλης που καταναλώνεται από τις προνύμφες.

### 1.3. Η τάξη Trichoptera

Η τάξη των Τριχοπτέρων αποτελείται από μικρού ως μετρίου μεγέθους ( 1.5-40 mm) έντομα που μοιάζουν με μικρά νυχτόβια Lepidoptera. Τα ακμαία Τριχόπτερα έχουν τριχωτές πτέρυγες που τηρούνται υπό γωνία, σαν στέγη, όταν το έντομο δεν πετά. Οι κεραίες είναι νηματοειδείς και τα στοματικά μόρια λείχοντος μυζητικού τύπου, με τις άνω γνάθους ατροφικές ή ανύπαρκτες και τις γναθικές και χειλικές προσακτρίδες καλοαναπτυγμένες. Τα ενήλικα πετούν λίγο και βρίσκονται κοντά σε γλυκό νερό (Εικόνα 1).

Οι προνύμφες των περισσότερων ειδών κατασκευάζουν χαρακτηριστική θήκη (κολεό) μέσα στην οποία ζουν και την οποία κουβαλούν μαζί τους όταν μετακινούνται. Η θήκη αποτελείται από μετάξινο πλέγμα πάνω στο οποίο η προνύμφη προσκολλά διάφορα υλικά (Εικόνα 2). Το σχήμα και τα δομικά υλικά της θήκης ποικίλουν με το είδος του εντόμου. Υπάρχουν όμως και προνύμφες που ζουν χωρίς θήκη κάτω από πέτρες ή και άλλες προστατευόμενες θέσεις μέσα στο νερό. Οι

προνύμφες μερικών ειδών κατασκευάζουν και δίκτυ, όπως οι αράχνες για να συλλαμβάνονται εκεί τα θύματά τους. Αυτό συμβαίνει στα λίγα σαρκοφάγα, αρπακτικά είδη. Στα περισσότερα Τριχόπτερα οι προνύμφες είναι φυτοφάγες ή σαπροφάγες. Ο βιολογικός κύκλος συμπληρώνεται σε ένα έτος περίπου (Τζανακάκης 1980).

Τα Trichoptera έχουν μεγάλη οικολογική σημασία καθώς μπορούν να μελετηθούν σαν βιοδείκτες των υδάτινων οικοσυστημάτων και του βαθμού της ενδεχόμενης ρύπανσης τους από ανθρωπογενείς ή μη εισροές (Clubb et al. 1975). Επιπλέον, οι προνύμφες των Τριχοπτέρων αποτελούν αξιόλογη τροφή για ψάρια και άλλα υδρόβια ζώα (Τζανακάκης 1980).

Οι προνύμφες των Τριχοπτέρων παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην αποικοδόμηση της νεκρής φυτικής οργανικής ύλης των υδάτινων οικοσυστημάτων (Malicky 1990: Graca 2001: Gonzalez and Graca 2003). Ο ρυθμός αποικοδόμησης της νεκρής φυτικής ύλης από τις προνύμφες των Τριχοπτέρων εξαρτάται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες (Graca 2001). Πολλές μελέτες για παράδειγμα, έχουν φανερώσει την προτίμηση των προνυμφών των Τριχοπτέρων για συγκεκριμένα φύλλα, τα οποία καταναλώνουν με μεγαλύτερο ρυθμό έναντι άλλων φύλλων (Nolen and Pearson 1993: Friberg and Jacobsen 1999: Rincón and Martinez 2006). Πρόσφατη μελέτη, στην οποία εξετάστηκαν οι τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών *Micropterna sequax* έδειξε ότι επιλέγουν την τροφή τους και δείχνουν προτίμηση σε συγκεκριμένες τροφές, και απέδωσε τις προτιμήσεις αυτές σε διαφορές στο θρεπτικό περιεχόμενο και τη σκληρότητα των φύλλων (Γεωργούλας 2009: Ρούμπος και συν. 2009).



**Εικόνα 1:** Ενήλικο άτομο της τάξης των Τριχοπτέρων

(<http://insects.tamu.edu/extension/youth/bug/bug088.html>)



**Εικόνα 2:** Θήκες (κολεοί) προνυμφών Trichoptera που έχουν κατασκευάσει από υλικά της περιοχής που διαβιούν (μικρές πέτρες, άμμος).

(<http://magickcanoe.com/blog/2007/03/05/aquatic-invertebrates-part-one/>)

#### 1.4 Το γένος *Micropterna* sp.

Το γένος *Micropterna* ανήκει στην οικογένεια Limnephilidae (McLachlan, 1983) και περιλαμβάνει 6 είδη: *M. fissa*, *M. lateralis*, *M. nycterobia*, *M. sequax*, *M. taurica* και *M. testacea*. Τα είδη αυτά συνήθως απαντώνται σε καθαρά και καλά οξυγονωμένα νερά και για αυτό θεωρούνται δείκτες υψηλής καθαρότητας νερών. Τα περισσότερα είδη δρουν ως αποικοδομητές της νεκρής οργανικής ύλης και είναι ευαίσθητα σε χαμηλές τιμές pH (< 4-5) ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες της κατάστασης των υδάτινων οικοσυστημάτων (Σταμόπουλος 2007).



**Εικόνα 3:** Ενήλικο άτομο *Micropterna sequax*.

<http://www.flickr.com/photos/8793530@N03/3287924863/>

## 1.5 Συστηματική κατάταξη του εντόμου *Micropterna sequax*

Βασίλειο (Regnum) : **Animalia**

Φύλο (Phylum) : **Arthropoda**

Ομοταξία (Classis): **Insecta**

Τάξη (Ordo): **Trichoptera**

Οικογένεια (Familia): **Limnephilidae**

Γένος (Genum): *Micropterna*

Είδος (Species) : *sequax*

## 1.6 Σκοπός ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα εργασία εστιάζεται στην δράση και το ρόλο των Τριχοπτέρων ως αποικοδομητών της νεκρής οργανικής φυτικής ύλης των υδάτινων οικοσυστημάτων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στο ρυθμό αποικοδόμησης και κατανάλωσης φύλλων οξιάς, τα οποία προσφέρθηκαν ως τροφή σε προνύμφες *Micropterna sequax*. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας και του μικροβιακού φορτίου των φύλλων οξιάς στο ρυθμό κατανάλωσης από τις προνύμφες *M. sequax*.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Συλλογή προνυμφών *Micropterna sequax*

Η συλλογή των προνυμφών *Micropterna sequax* (Trichoptera: Limnephilidae) έγινε στο ρέμα Κοντόρεμα (Εικόνα 4) της περιοχής Καλορίζα Πηλίου (39° 27' 39'' Β - 23° 01' 09'' Α, 1015 m υψόμετρο) τον Απρίλιο του 2009. Οι προνύμφες συλλέχθηκαν προσεκτικά με το χέρι και τοποθετήθηκαν σε βάζα γεμάτα νερό από το ρέμα μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Μετά τη συλλογή τους οι προνύμφες εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες εργαστηρίου για τρεις ημέρες πριν την έναρξη των πειραμάτων. Ο εγκλιματισμός των προνυμφών έγινε σε γυάλινο ενυδρείο με φιλτραρισμένο (διάμετρος οπής φίλτρου = 400 mesh) ποταμίσιο νερό από το ρέμα Κοντόρεμα, που οξυγονωνόταν με αντλίες αέρα, ενώ ο πυθμένας του ενυδρείου



**Εικόνα 4 :** Ρέμα Κοντόρεμα, Καλορίζα, όρος Πήλιον(φωτ.:Δ.Σταμόπουλος)

καλυπτόταν από στρώμα ποταμίσις άμμου απαλλαγμένη από οργανική ουσία μετά από καύση 4 ωρών στους 550 °C .

## 2.2. Φύλλα Οξιάς

Ως τροφή των προνυμφών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν φύλλα οξιάς (*Fagus sylvatica*, Οικογένεια Fagaceae) επειδή η οξιά είναι το κυρίαρχο είδος της παρόχθιας βλάστησης στον τόπο συλλογής των προνυμφών *M. sequax*.

Τα ξηρά φύλλα οξιάς συλλέχθηκαν το φθινόπωρο του 2008 από το έδαφος. Φύλλα κομμένα, που έφεραν μηχανικές κακώσεις (κοψίματα, τρυπήματα, σχισίματα) ή στα οποία υπήρχαν εμφανή συμπτώματα προσβολής από μικροοργανισμούς ή έντομα αποκλείστηκαν κατά τη συλλογή. Τα φύλλα αφέθηκαν να στεγνώσουν και ακολούθως αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο εργαστήριο μέχρι την έναρξη των πειραμάτων. Επιπλέον, συλλέχθηκαν φρέσκα φύλλα οξιάς την άνοιξη του 2009.

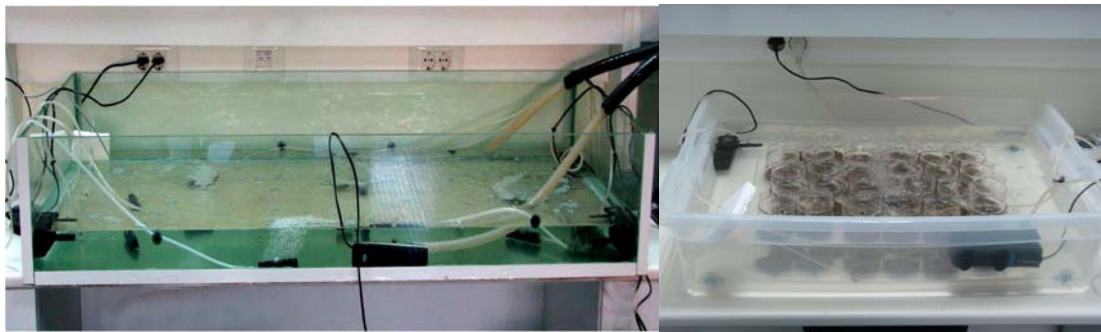
Πριν από την έναρξη των πειραμάτων τα φύλλα οξιάς τοποθετήθηκαν σε διχτυωτές πλαστικές θήκες και τοποθετήθηκαν σε ένα τοπικό ρεύμα με σκοπό να επιτευχθεί ο μικροβιακός αποικισμός τους (conditioning). Οι πλαστικές θήκες είχαν άνοιγμα ματιού 500 μm, έτσι ώστε να επιτρέπουν την επαφή των φύλλων με το νερό και τους διάφορους υδρόβιους μικροοργανισμούς, αλλά ταυτόχρονα να μην επιτρέπουν την πρόσβαση μακροασπονδύλων σε αυτά (Carvalho and Graça 2007).

Τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή στις προνύμφες κόπηκαν σε μορφή κυκλικών δισκίων ( $\varnothing = 20$  mm), ώστε να έχουν όλα το ίδιο μέγεθος, σχήμα και διαστάσεις ώστε να εξαλειφθούν οι ανομοιομορφίες μεταξύ των φύλλων. Τα δισκία των φύλλων στερεώθηκαν στον πυθμένα των δοχείων με τη βοήθεια πινέζας. Σε όλα

τα πειράματα, τα δισκία των φύλλων αντικαθιστούνταν όταν είχαν φαγωθεί περίπου τα 2/3 της επιφάνειας του κάθε φύλλου.

### 2.3. Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο ενυδρεία: ένα πλαστικό, διαστάσεων 60 x 60 x 15 και ένα γυάλινο, με διαστάσεις 150 x 60 x 25 (Εικόνα 5). Και τα δύο ενυδρεία ήταν γεμάτα μέχρι το ύψος των 12 εκ. με φιλτραρισμένο νερό (διάμετρος οπής φίλτρου = 400 mesh) από το ρέμα συλλογής των προνυμφών. Το νερό οξυγονωνόταν με τη συνεχή λειτουργία αντλιών νερού ενώ γίνονταν έλεγχοι των επιπέδων του οξυγόνου στο νερό ανά τακτά χρονικά διαστήματα με φορητό οξυγονόμετρο (WTW OXI 330). Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του νερού στα επιθυμητά επίπεδα χρησιμοποιήθηκε συσκευή ψύξης νερού (TECO TR-15, Εικ. 6).



(A)

(B)

**Εικόνα 5:** Γυάλινο (A) και πλαστικό (B) ενυδρείο που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Μέσα στο ενυδρείο τοποθετήθηκαν διάτρητα πλαστικά δοχεία (15 cm. ύψος και 6 cm διάμετρο, Εικ. 6) στον πυθμένα των οποίων τοποθετήθηκε ποταμίσις άμμος (κοκκομετρική διάμετρος < 2 mm) που συλλέχθηκε από την περιοχή συλλογής των προνυμφών. Η άμμος πριν την χρησιμοποίηση είχε υποστεί καύση για 4 ώρες στους

550°C προκειμένου να απαλλαγεί από μικροοργανισμούς και τυχόν υπολείμματα οργανικής ουσίας (Carvalho and Graça 2007).



**Εικόνα 6:** Συσκευή ψύξης νερού (TECO TR-15) και πλαστικό διάτρητο δοχείο που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Τα δισκία των φύλλων που προσφέρονταν ως τροφή στις προνύμφες *M. sequax* στερεώνονταν με μια ανεστραμένη πινέζα στον πυθμένα των πλαστικών δοχείων. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκε μία προνύμφη της *M. sequax* τελευταίου σταδίου, ίδιου περίπου μεγέθους (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Πλαστικό διάτρητο δοχείο με άμμο, δισκίο φύλλου (κόκκινος κύκλος) και προνύμφη *M. sequax* (κίτρινο βέλος).

#### **2.4. Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax***

Για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ρυθμό κατανάλωσης των προνυμφών *Micropterna sequax* πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε πλαστικά ενυδρεία σε τέσσερις θερμοκρασίες νερού:  $5.5 \pm 0.2$  °C, στους  $9.5 \pm 0.2$  °C, στους  $13 \pm 0.2$  °C και στους  $19 \pm 0.2$  °C. Η τροφή που προσφέρθηκε στις προνύμφες ήταν φύλλα οξιάς.

Για κάθε μια από τις παραπάνω θερμοκρασίες υπήρχαν 30 επαναλήψεις ενώ η διάρκεια κάθε πειράματος ήταν 10 μέρες. Σε κάθε προνύμφη δόθηκε ως τροφή ένα κυκλικό δισκίο φύλλου οξιάς, το οποίο αντικαθιστούνταν όταν είχαν φαγωθεί περίπου τα 2/3 της επιφάνειας του. Τα επίπεδα του οξυγόνου που μετρήθηκαν σε όλα τα πειράματα ήταν της τάξης των 8.5-9 mg l<sup>-1</sup>.

Μετά το τέλος του κάθε πειράματος τα υπολείμματα των φύλλων τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 48 ώρες στους 60 °C και στην συνέχεια ζυγίστηκαν προκειμένου να υπολογιστεί το τελικό ξηρό τους βάρος. Τα τελικά αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d<sup>-1</sup>) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d<sup>-1</sup> mg<sub>π</sub><sup>-1</sup>).

#### **2.5. Επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax***

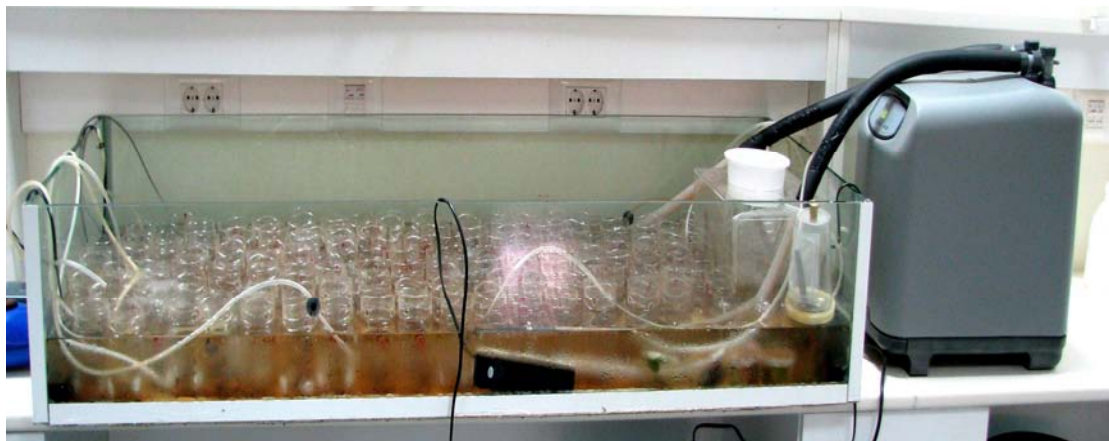
Για τη μελέτη της επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών της *M. sequax*



πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα σε γυάλινο ενυδρείο διαστάσεων 150 x 60 x 25 (Εικόνα 8). Ειδικότερα, υπήρχαν οι παρακάτω μεταχειρίσεις: (α) φρέσκα φύλλα οξιάς, (β) φρέσκα φύλλα οξιάς που υπέστησαν τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού (γ) ξηρά φύλλα οξιάς και (δ) ξηρά φύλλα οξιάς που υπέστησαν τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού.

Η θερμοκρασία του νερού στο ενυδρείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν  $13 \pm 0.2$  °C, ενώ τα επίπεδα του οξυγόνου στο νερό κυμαίνονταν στα  $8.5 \pm 0.3$  mg l<sup>-1</sup>. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 10 μέρες.

Μετά το τέλος του κάθε πειράματος τα υπολείμματα των φύλλων τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 48 ώρες στους 60 °C και στην συνέχεια ζυγίστηκαν προκειμένου να υπολογιστεί το τελικό ξηρό τους βάρος. Τα τελικά αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d<sup>-1</sup>) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d<sup>-1</sup> mg<sub>π</sub><sup>-1</sup>).



**Εικόνα 8:** Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax*.

## 2.6. Χημικές αναλύσεις φρέσκων και ξερών φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής διατριβής έγινε μια πρώτη προσπάθεια να διερευνηθούν οι πιθανές αιτίες της προτίμησης ή μη φρέσκων ή ξηρών φύλλων οξιάς από τις προνύμφες *M. sequax*. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις βασικών ανόργανων ιόντων καθώς και η περιεκτικότητα σε άζωτο των ξηρών και των φρέσκων φύλλων οξιάς που εξετάστηκαν ως τροφικό υπόστρωμα στα παραπάνω πειράματα.

*2.6.1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των φύλλων σε βασικά ανόργανα ιόντα με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).*

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ξηρών και φρέσκων φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν ως τροφικό υπόστρωμα σε ορισμένα βασικά ανόργανα ιόντα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

*A. Προετοιμασία Δειγμάτων:* Επειδή η προετοιμασία του δείγματος του φυτικού ιστού παίζει σημαντικό ρόλο για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων έγινε προσεκτική προετοιμασία των δειγμάτων. Αναλυτικότερα, ο φυτικός ιστός καθαρίστηκε και απαλλάχθηκε από ξένες ουσίες όπως χόμα, σκόνη και τυχόν υπολείμματα άλλων ουσιών και τα δείγματα σκουπίστηκαν με ελαφρώς νοτισμένο με απιονισμένο νερό απορροφητικό χαρτί. Μετά τον καθαρισμό, το δείγμα ξηράνθηκε προκειμένου να σταματήσουν οι ενζυματικές αντιδράσεις και να σταθεροποιηθεί ο φυτικός ιστός. Η ξήρανση των φύλλων έγινε σε κλίβανο στους 110 °C για 24 ώρες.

Στη συνέχεια, το δείγμα αλέσθηκε σε μύλο (επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων 0.5 – 1.0 mm), ώστε να επιτευχθεί η ομογενοποίηση του δείγματος. Ένα μέρος του δείγματος χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση των κατιόντων, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε σε κατάλληλες συνθήκες για να γίνει αργότερα η ανάλυση των ανιόντων και ο προσδιορισμός των ολικών αζωτούχων ενώσεων. Η αποθήκευση έγινε σε πλαστικές αεροστεγείς σακούλες σε δροσερό, σκοτεινό και χωρίς υγρασία μέρος.

#### *B. Ανάλυση Προσδιορισμού Κατιόντων*

*D) Αποικοδόμηση Οργανικής Ουσίας - Ξηρή και Υγρή Καύση:* Ποσότητα 1 g αλεσμένου και πλήρως ομογενοποιημένου φυτικού ιστού ζυγίστηκε με ακρίβεια και μεταφέρθηκε σε πυρίμαχες κάψες. Η ξηρή καύση πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό φούρνο στους 400 °C για 4 ώρες. Στο τέλος έμεινε μια καθαρή και άσπρη στάχτη, που σημαίνει ότι η οξείδωση της οργανικής ουσίας ήταν πλήρης. Μόλις οι κάψες κρύωσαν, απομακρύνθηκαν από το φούρνο για να ξεκινήσει η ανάλυση. Η υγρή καύση έγινε ρίχνοντας 1 ml HCl σε κάθε κάψα. Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 ml  $H_2O_{Υπερκαθ}$  σε κάθε κάψα και το περιεχόμενο της κάψας μεταφέρθηκε σε ποτήρια ζέσεως των 50 ml. Κάθε κάψα ξεπλύθηκε με 5 ml  $H_2O_{Υπερκαθ}$ . Το ξέπλυμα της κάψας με 1 ml HCL και στην συνέχεια 5 ml  $H_2O_{Υπερκαθ}$  επαναλήφθηκε και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε στα ποτήρια ζέσεως. Στη συνέχεια, τα ποτήρια ζέσεως τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 90 °C για 30 λεπτά. Το περιεχόμενο των ποτηριών ζέσεως μεταφέρθηκε σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 50 ml και ενώ προστέθηκε και η απαραίτητη ποσότητα  $H_2O_{Υπερκαθ}$ , ώστε ο τελικός όγκος των διαλυμάτων να είναι 20 ml και τα δείγματα να είναι έτοιμα προς ανάλυση.



II) *Προετοιμασία Χρωματογράφου (HPLC)*: Για την προετοιμασία του χρωματογράφου Alltech (526 HPLC Pump, ERIS 1000HP Autosuppressor), ελέγχθηκε η πίεση, επιλέχθηκε η κατάλληλη στήλη για τον προσδιορισμό κατιόντων (Universal Cation 7u) και προετοιμάστηκε η κινητή φάση, με τη διάλυση 0.1945 ml methanosulfonic acid σε 1 L υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O.

III) *Ανάλυση δείγματος*: Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κατιόντων του διαλύματος δειγμάτων φυτικού ιστού ήταν 1:200 (0.1 ml διαλύματος σε 19.9 ml H<sub>2</sub>O<sub>Υπερκαθ</sub>). Από τα χρωματογράφηματά που προέκυψαν προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των φύλλων σε κατιόντα.

Γ) *Ανάλυση Προσδιορισμού Ανιόντων*

D) *Εκχύλιση Ανιόντων*: Ζυγίστηκε 1 g αλεσμένου φυτικού ιστού και τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 ml. Προστέθηκαν 20 ml διαλύματος μεθανόλης και το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά στις 150 στροφές ανά λεπτό (rpm). Ακολούθως, το αιώρημα διηθήθηκε μέσα από φίλτρο (Whatman – 90 mm), ώστε να εκχυλιστούν τα ανιόντα μέσα σε ογκομετρικούς σωλήνες των 50 ml και προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα H<sub>2</sub>O<sub>Υπερκαθ</sub>, ώστε ο τελικός όγκος των διαλυμάτων να είναι 30 ml. Τα δείγματα ήταν έτοιμα προς ανάλυση.

II) *Προετοιμασία Χρωματογράφου (HPLC)*: Για τον προσδιορισμό των ανιόντων χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη στήλη (Allsep Anion 7u) ενώ για την προετοιμασία της κινητής φάσης διαλύθηκαν 0.0954 g Sodium Carbonate και 0.0714 g Sodium Bicarbonate σε 1 L υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O.

III) *Ανάλυση δείγματος*: Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανιόντων του διαλύματος δείγματος φυτικού ιστού ήταν 1: 60 (0.2

ml διαλύματος σε 11.8 ml  $H_2O_{Υπερκαθ}$ ). Από τα χρωματογραφημένα που προέκυψαν προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των φύλλων σε ανιόντα.

### *2.6.2. Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων ουσιών και πρωτεΐνης των φύλλων με τη μέθοδο Kjeldahl*

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ξηρών και φρέσκων φύλλων οξιάς σε ολικές αζωτούχες ουσίες με τη μέθοδο Kjeldahl χρησιμοποιήθηκαν ειδικές συσκευές απόσταξης και καύσης της εταιρίας BEHR Labor Technik GmbH. Η συσκευή καύσης αποτελούνταν από τη μονάδα Inkjel, η οποία ήταν αναγκαία για τη δέσμευση και εξουδετέρωση των τοξικών αερίων που σχηματίζονται κατά την υγρή καύση των δειγμάτων. Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

*A. Προετοιμασία δειγμάτων:* Ζυγίστηκαν 0.2 g αλεσμένου φύλλου και τοποθετήθηκαν σε φιάλη βρασμού μαζί με 2 ταμπλέτες καταλύτη Kjeldahl (Kjeltabs CX, Gerhardt GmbH) και 15 ml πυκνού  $H_2SO_4$ .

*B. Πέψη:* Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων, οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ειδική βάση. Επιπλέον, τέθηκε σε λειτουργία ο απαγωγός και η ειδική παγίδα αερίων. Εντός της συσκευής πέψης το δείγμα έμεινε για 85 λεπτά σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο κράτησε 5 λεπτά (100% Power), το δεύτερο 20 λεπτά (55% Power) και το τρίτο 60 λεπτά (90% Power). Μετά το πέρας της διαδικασίας της πέψης οι φιάλες παρέμειναν εντός της συσκευής στην θέση ψύξης για 20-30 λεπτά.

*Γ. Απόσταξη:* Στη συσκευή απόσταξης τοποθετήθηκαν μια φιάλη του δείγματος στην ειδική θέση της και μια άδεια κωνική φιάλη στην οποία είχε προστεθεί ο κατάλληλος δείκτης για την υποδοχή του απεσταγμένου δείγματος. Επιλέχθηκε το κατάλληλο πρόγραμμα και προστέθηκαν 100 ml  $H_2O$  και 80 ml NaOH στην φιάλη του δείγματος

και 50 ml  $\text{H}_2\text{BO}_3$  στην κωνική φιάλη με το δείκτη. Ακολούθως, το δείγμα θερμάνθηκε και αποστάχθηκαν τα αέρια του στην κωνική φιάλη μαζί με το βορικό οξύ και την δεσμευμένη αμμωνία.

Δ. *Τιτλοδότηση*: Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη μαζί με το περιεχόμενο της τοποθετήθηκε στον ειδικό ηλεκτρονικό δοσομετρητή τιτλοδότησης. Ο δοσομετρητής γεμίστηκε με δεκατοκανονικό διάλυμα (0.1N)  $\text{HCl}$  και μηδενίστηκε η ένδειξη της οθόνης. Με αργό ρυθμό προσθέτονταν το διάλυμα του  $\text{HCl}$  ενώ ταυτόχρονα γινόταν συνεχής ανάδευση του διαλύματος μέχρι να παρατηρηθεί αλλαγή του χρώματος του διαλύματος. Η ένδειξη του δοσομετρητή με τα ml που προστέθηκαν για να αλλάξει το χρώμα του διαλύματος καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς.

Ε) *Υπολογισμοί*: Οι κύριες χημικές αντιδράσεις που συντελέστηκαν ήταν:

- Πέψη: Οργανικό N +  $\text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{λοιπά}$
- Απόσταξη:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2 \text{NaOH} \longrightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2 \text{NH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$
- Τιτλοδότηση (με 0.1  $\text{HCl}$ ):  $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \longrightarrow \{\text{NH}_4^+:\text{H}_2\text{BO}_3^-\} + \text{H}_3\text{BO}_3$



Η περιεκτικότητα του δείγματος μας σε N % υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\text{N}\% = (\text{ml HCl} - \text{ml Μάρτυρα}) \times 0.4007 / \text{Βάρος Δείγματος (g)}$$

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε με τη βοήθεια της σχέσης: **Πρωτεΐνη % = N % x 6.25**, όπου 6.25 ο γενικός συντελεστής μετατροπής σε πρωτεΐνες του οργανικού αζώτου.

## 2.7. Έλεγχος σκληρότητας φύλλων που εξετάστηκαν

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η σκληρότητα των φύλλων παίζει κάποιο ρόλο στις τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών *M. sequax*, μετρήθηκε η σκληρότητα ξηρών και φρέσκων φύλλων οξιάς.

Η μέτρηση της σκληρότητας των φύλλων έγινε υπολογίζοντας τη δύναμη Newton που προκαλούσε την θραύση των ελασμάτων των ξηρών και φρέσκων φύλλων. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ειδικό δυναμόμετρο (Admet Interface SM-250), το οποίο πύεζε το κάθε φύλλο με ένα έμβολο (διαμέτρου 2 mm) μέχρι να προκληθεί η θραύση του. Το δυναμόμετρο είχε συνδεθεί με υπολογιστή, ο οποίος με τη βοήθεια του ειδικού λογισμικού προγράμματος WinCom Plus κατέγραφε τις μέγιστες τιμές δύναμης που ασκούνταν σε κάθε μέτρηση. Πραγματοποιήθηκαν 25 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε δύναμη Newton.



**Εικόνα 9:** Το ειδικό δυναμόμετρο (Admet Interface SM-250) που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της σκληρότητας των ξηρών και φρέσκων φύλλων οξιάς.

## 2.8 Στατιστική Ανάλυση

Οι μετρήσεις των πειραμάτων εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση τροφής των προνυμφών (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής ( $\text{mg d}^{-1}$ ) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ( $\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$ ). Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13 για Windows. Αρχικά, έγινε έλεγχος των κριτηρίων για παραμετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επειδή οι τιμές των δεδομένων δεν ικανοποιούσαν όλες τις προϋποθέσεις για την παραμετρική ανάλυση (οι παραλλακτικότητες των αποτελεσμάτων ήταν διαφορετικές), για την ανάλυση της διακύμανσης χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ των Kruskal-Wallis και το στατιστικό κριτήριο Mann-Whitney σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sexta*

Σε όλες τις θερμοκρασίες παρατηρήθηκε κατανάλωση τροφής από τις προνύμφες *M. sexta*, όταν σε αυτές προσφέρθηκαν ως τροφή ξηρά φύλλα οξιάς, που είχαν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, που διεξήχθησαν σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες ( $5.5 \pm 0.2$  °C,  $9.5 \pm 0.2$  °C,  $13 \pm 0.2$  °C και  $19 \pm 0.2$  °C) έδειξαν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό το ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων φανέρωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων φύλλων στις διαφορετικές θερμοκρασίες, είτε αυτές εκφράστηκαν ως ημερήσια κατανάλωση τροφής ( $\text{mg d}^{-1}$ ), είτε ως ολική κατανάλωση ( $\text{mg}$ ), είτε ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ( $\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$ ) (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Αναλυτικότερα, ο μεγαλύτερος ημερήσιος ρυθμός κατανάλωσης τροφής καταγράφηκε στους  $13 \pm 0.2$  °C ( $2.7 \text{ mg d}^{-1}$ ) και ήταν στατιστικώς μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο στους  $19 \pm 0.2$  °C ( $1.9 \text{ mg d}^{-1}$ ). Οι μικρότεροι ημερήσιοι ρυθμοί κατανάλωσης τροφής καταγράφηκαν στους  $5.5 \pm 0.2$  °C και  $9.5 \pm 0.2$  °C και ανήλθαν σε 0.5 and 0.6  $\text{mg d}^{-1}$  αντίστοιχα. Επειδή, η μέγιστη κατανάλωση καταγράφηκε στους  $13 \pm 0.2$  °C, αυτή η θερμοκρασία νερού επιλέχθηκε ως η πλέον κατάλληλη και για το επόμενο πείραμα.

Κατά τη διάρκειά και των τεσσάρων πειραμάτων στις διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε το φαινόμενο της νύμφωσης αρκετών προνυμφών. Τα ποσοστά νύμφωσης που καταγράφηκαν στα πειράματα ήταν διαφορετικά στις τέσσερις

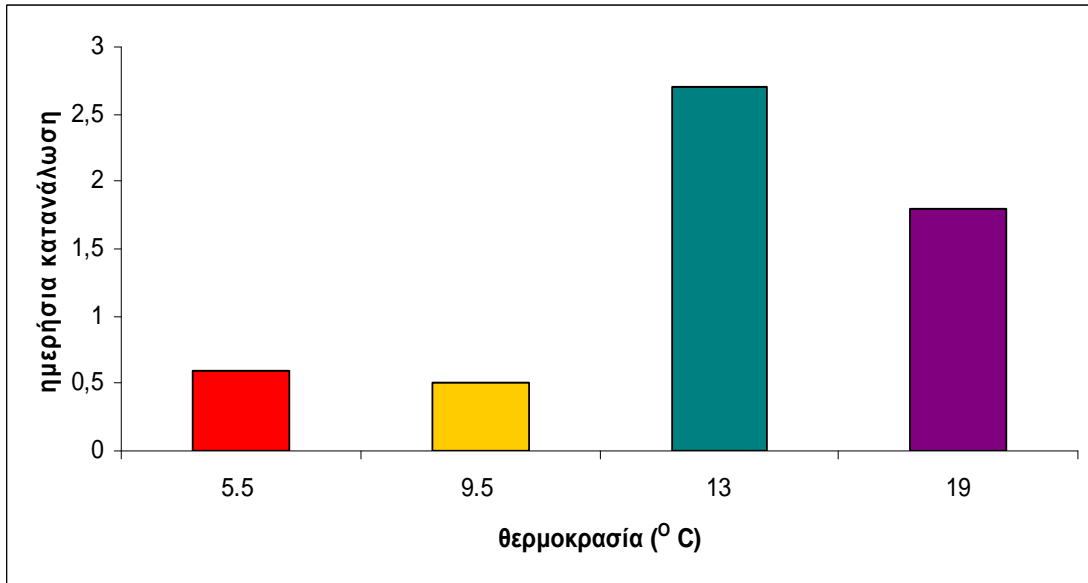
θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν (Σχήμα 2). Το υψηλότερο ποσοστό νύμφωσης καταγράφηκε στην θερμοκρασία των  $19 \pm 0.2$  °C (60 %), ενώ αντίθετα το χαμηλότερο ποσοστό νύμφωσης παρατηρήθηκε στους  $5.5 \pm 0.2$  °C (16.7 %).

Η θνησιμότητα των προνυμφών ήταν μηδενική για όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, εκτός από τους  $19 \pm 0.2$  °C, όπου στο τέλος του πειράματος καταγράφηκε θνησιμότητα της τάξης του 6.7 %.

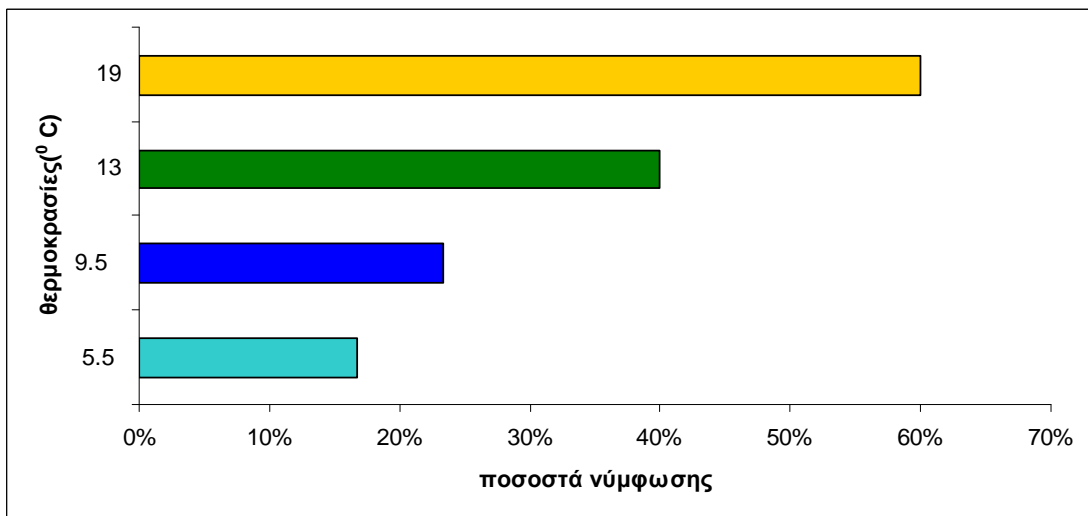
**Πίνακας 1:** Καταναλώσεις φύλλων οξιάς στους 5.5 °C, 9.5 °C, 13 °C και 19 °C ( $\pm 0.2$ ) από προνύμφες της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο (n = 30).

Θερμοκρασία (°C)	Ημερήσια κατανάλωση (mg d <sup>-1</sup> )	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	Ποσοστό νύμφωσης (%)	Ποσοστό θνησιμότητας (%)
5.5	0.6 ± 0.1 a	5.7 ± 1.1 a	0.03 ± 0.0 a	16.7	0.0
9.5	0.5 ± 0.1 a	4.7 ± 1.3 a	0.02 ± 0.0 a	23.3	0.0
13	2.7 ± 0.3 b	25.4 ± 3 b	0.20 ± 0.0 b	40	0.0
19	1.9 ± 0.4 c	17.3 ± 3.8 c	0.05 ± 0.0 b	60	6.7

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$  (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



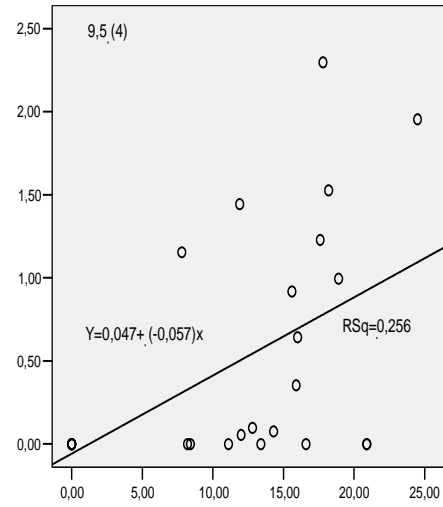
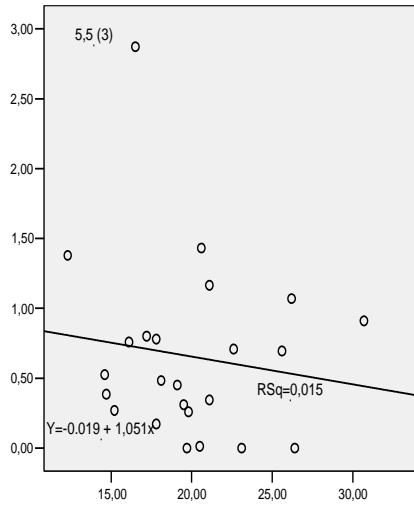
**Σχήμα 1:** Ημερήσια κατανάλωση ( $\text{mg d}^{-1}$ ) των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με ξηρά φύλλα οξιάς σε τέσσερις θερμοκρασίες νερού (5.5, 9.5, 13 και  $19 (\pm 0.2)$  °C ( $n=30$ )).



**Σχήμα 2:** Ποσοστά νύμφωσης (%) των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο σε τέσσερις θερμοκρασίες νερού (5.5, 9.5, 13 και  $19 (\pm 0.2)$  °C ( $n=30$ )).

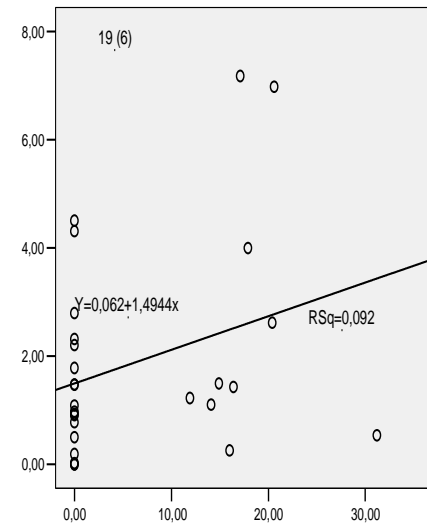
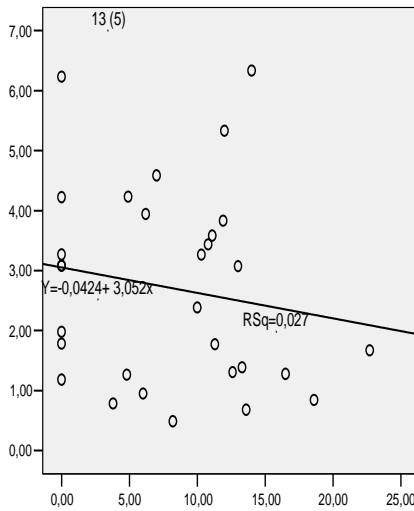


Ημερήσια κατανάλωση ( $\text{mg d}^{-1}$ )



Ξηρό βάρος προνυμφών (mg)

Ημερήσια κατανάλωση ( $\text{mg d}^{-1}$ )



Ξηρό βάρος προνυμφών (mg)

**Σχήματα 3-6:** Συσχετίσεις μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων οξιάς και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M.sepium* σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες.

### 3.2 Επίδρασης της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax*

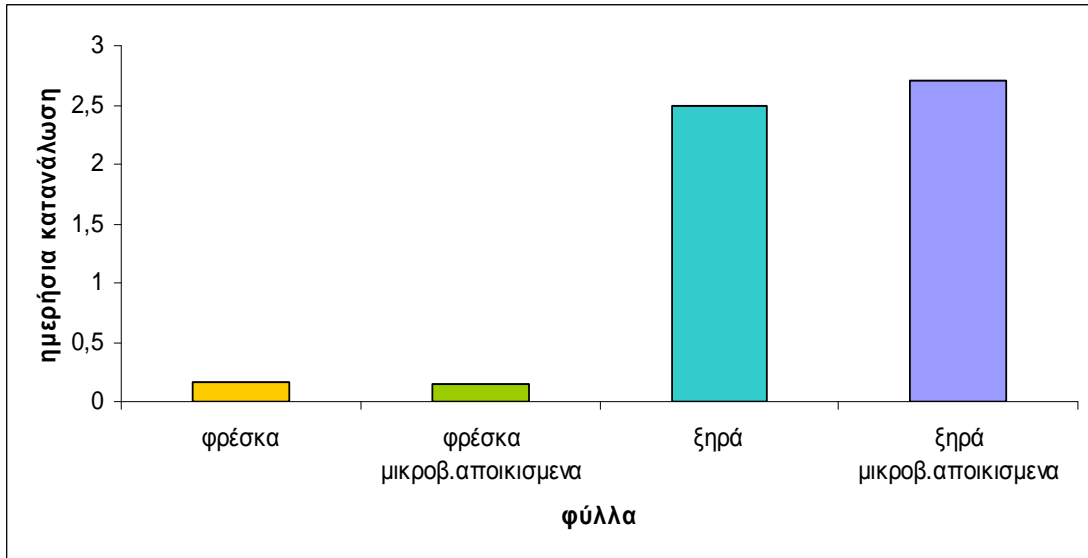
Όταν στις προνύμφες *M. sequax* προσφέρθηκαν ως τροφή φύλλα οξιάς σε διαφορετική κατάσταση (φρέσκα, φρέσκα που υπέστησαν μικροβιακό αποικισμό, ξηρά και ξηρά που υπέστησαν μικροβιακό αποικισμό), παρατηρήθηκε κατανάλωση τροφής από τις προνύμφες σε όλες τις μεταχειρίσεις. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων φύλλων διαφορετικής ηλικίας, μικροβιακά αποικισμένων ή μη, είτε αυτά εκφράστηκαν ως ημερήσια κατανάλωση τροφής ( $\text{mg d}^{-1}$ ), είτε ως ολική κατανάλωση ( $\text{mg}$ ), είτε ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ( $\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$ ) (Πίνακας 2, Σχήμα 7). Πιο αναλυτικά, οι προνύμφες έδειξαν μια σαφή προτίμηση για ξηρά φύλλα οξιάς, μικροβιακά αποικισμένα ή μη, με ημερήσιες καταναλώσεις 2.5 και 2.7  $\text{mg d}^{-1}$  αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες καταναλώσεις στα φρέσκα φύλλα ήταν 0.17 και 0.14  $\text{mg d}^{-1}$ .

Κατά τη διάρκειά του πειράματος παρατηρήθηκε το φαινόμενο της νύμφωσης αρκετών προνυμφών. Τα ποσοστά νύμφωσης που καταγράφηκαν στο πείραμα κυμάνθηκαν μεταξύ 20 και 26.7 %, ενώ δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στα ποσοστά νύμφωσης μεταξύ των μεταχειρίσεων που εξετάστηκαν (Πίνακας 2, Σχήμα 8). Αντίστοιχα, η θνησιμότητα των προνυμφών κινήθηκε στα επίπεδα μεταξύ 3.4 και 10 % μεταξύ των μεταχειρίσεων που εξετάστηκαν.

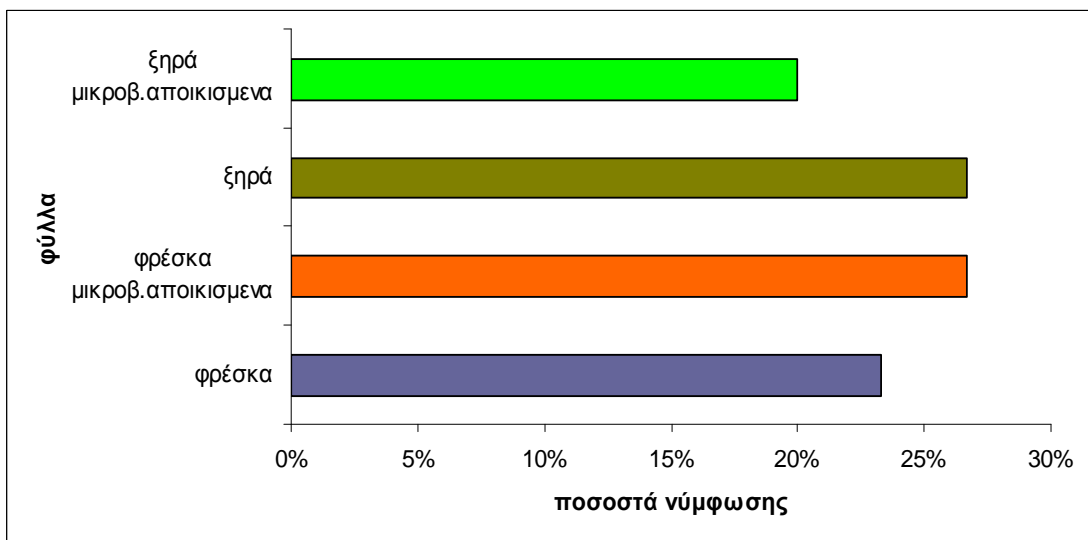
**Πίνακας 2.** Καταναλώσεις φύλλων οξιάς διαφορετικής ηλικίας και μικροβιακού φορτίου (φρέσκα, φρέσκα μικροβιακά αποικισμένα, ξηρά και ξηρά μικροβιακά αποικισμένα) στους 13 °C από προνύμφες της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο (n = 30).

<b>Κατάσταση φύλλου</b>	<b>Ημερήσια κατανάλωση (mg d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ολική κατανάλωση (mg)</b>	<b>Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d<sup>-1</sup> mg<sub>π</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Ποσοστό νύμφωσης (%)</b>	<b>Ποσοστό θνησιμότητας (%)</b>
Φρέσκα	0.17 ± 0.1a	17 ± 0.8 a	0.12 ± 0.02 a	23.3	3.4
Φρέσκα μικροβιακά αποικισμένα	0.14 ± 0.1 a	17.6 ± 1.0 a	0.14 ± 0.02 a	26.7	10
Ξηρά	2.5 ± 0.3 b	29.4 ± 2.8 b	0.25 ± 0.04 b	26.7	6.7
Ξηρά μικροβιακά αποικισμένα	2.7 ± 0.4 b	27.7 ± 3.2 b	0.21 ± 0.03 b	20	10

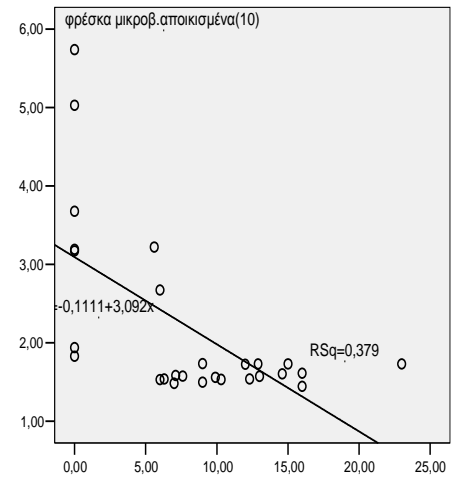
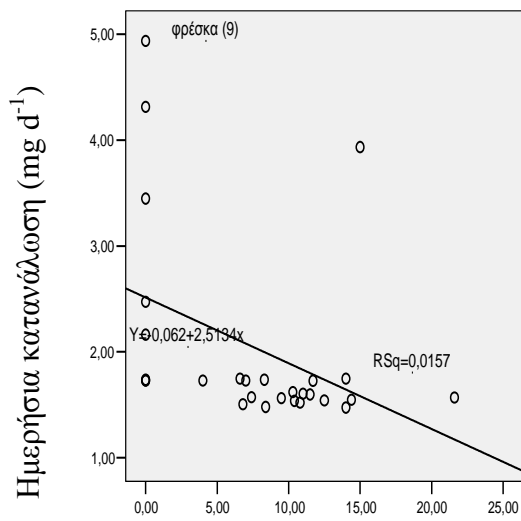
Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$  (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney)



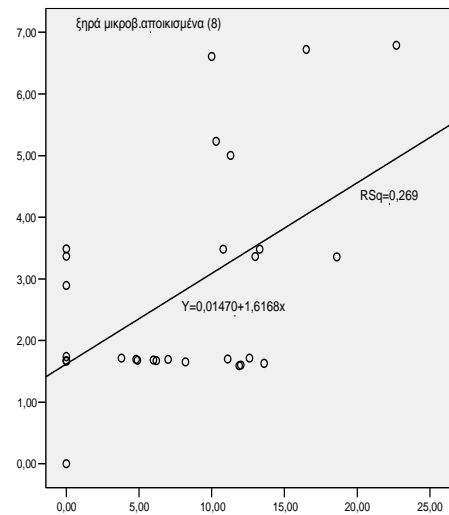
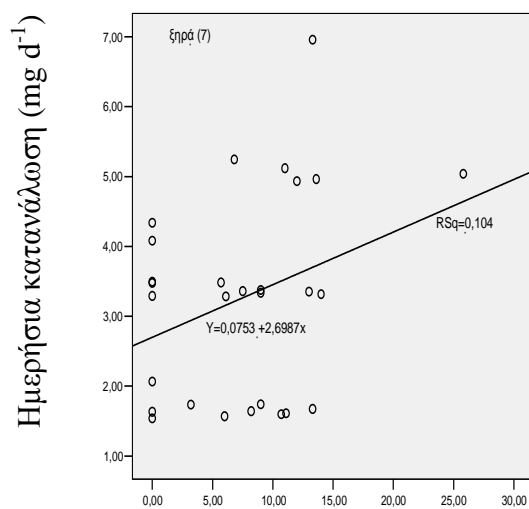
**Σχήμα 7:** Ημερήσια κατανάλωση ( $\text{mg d}^{-1}$ ) των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα οξιάς διαφορετικής ηλικίας και μικροβιακού φορτίου (φρέσκα, φρέσκα μικροβιακά αποικισμένα, ξηρά και ξηρά μικροβιακά αποικισμένα στους  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $n = 30$ )).



**Σχήμα 8:** Ποσοστά νύμφωσης (%) των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα οξιάς διαφορετικής ηλικίας και μικροβιακού φορτίου (φρέσκα, φρέσκα μικροβιακά αποικισμένα, ξηρά και ξηρά μικροβιακά αποικισμένα) στους  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $n = 30$ )).



Ξηρό βάρος προνυμφών (mg)



Ξηρό βάρος προνυμφών (mg)

**Σχήματα 9-12 :** Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φρέσκων και ξηρών φύλλων οξιάς με ή χωρίς μικροβιακό αποικισμό και του ξηρού βάρους των προνυμφών του *M. Sequax*.

### 3.3. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης φύλλων οξιάς

Η χημική ανάλυση των φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν στα παραπάνω πειράματα έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φρέσκων και των ξηρών φύλλων , όσον αφορά στην περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά στοιχεία. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνολικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τις μεθόδους Kjeldahl και Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης .

**Πίνακας 3.** Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) σε πρωτεΐνες και θρεπτικά στοιχεία (N, K, Mg, Ca, SO<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>) φρέσκων και ξηρών φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν στα πειράματα.

Θρεπτικά στοιχεία	Φύλλα Οξιάς	
	Ξηρά	Φρέσκα
<b>N (%)</b> <sup>α</sup>	0.939	1.725
<b>Πρωτεΐνη (%)</b>	5.867	10.786
<b>K<sup>+</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.182	1.28
<b>Mg<sup>+</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.092	0.158
<b>Ca<sup>+</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	1.270	0.416
<b>Cl<sup>-</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.017	0.040
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.007	0.022
<b>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.012	0.306
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (%)</b> <sup>β</sup>	0.005	0.084

<sup>α</sup> Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl

<sup>β</sup> Ανάλυση με HPLC

### 3.4. Αποτελέσματα ελέγχου σκληρότητας φύλλων οξιάς

Ο έλεγχος της σκληρότητας των φύλλων οξιάς που δοκιμάστηκαν στα παραπάνω πειράματα ως υποστρώματα τροφής για τις προνύμφες της *M. sequax* έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ της σκληρότητας των φρέσκων και των ξηρών φύλλων οξιάς. Τα ξηρά φύλλα είναι περισσότερα σκληρά, αφού η δύναμη που χρειάζεται να ασκηθεί προκειμένου να διατηρηθούν ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με τα φρέσκα φύλλα (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4:** Δύναμη (Newton) που προκαλεί την θραύση των ελασμάτων των φρέσκων και ξηρών φύλλων οξιάς που εξετάστηκαν (n = 25).

	<b>Φύλλα Οξιάς</b>	
<b>Είδος φύλλων</b>	<b>Ξηρά</b>	<b>Φρέσκα</b>
<b>Δύναμη (Newton)</b>	1.69 ± 0.07 a	0.97 ± 0.05 b

Στατιστικώς σημαντικά διαφορετικοί μέσοι όροι σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$  (t-test).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα των προνυμφών *M. sequax* να αποικοδομούν νεκρή φυτική οργανική ύλη σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό κατανάλωσης της τροφής τους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά των προνυμφών, όσον αφορά στην κατανάλωση της τροφής τους, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία για τη διατροφή τους ήταν οι 13 °C. Πιο συγκεκριμένα, η ημερήσια κατανάλωση φύλλων στους 13 °C ήταν σχεδόν η διπλάσια από την ημερήσια κατανάλωση φύλλων στους 19 °C, ενώ ήταν σχεδόν τριπλάσια από την αντίστοιχη στους 5 °C και 9 °C.

Η θερμοκρασία του νερού είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης των προνυμφών Τριχοπτέρων, καθώς είναι μια παράμετρος που επηρεάζει το μεταβολισμό τους (Buzby and Perry 2000: González and Graça 2003). Από την βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι υπάρχει συνήθως μια θετική συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και του ρυθμού κατανάλωσης τροφής των μακροασπονδύλων (Nolen and Pearson 1993: Buzby and Perry 2000: González and Graça 2003). Στην παρούσα μελέτη η κατανάλωση τροφής από τις προνύμφες *M. sequax* ήταν μειωμένη στις χαμηλές θερμοκρασίες, έφτασε σε ένα μέγιστο στους 13 °C, για να ξαναμειωθεί όταν η θερμοκρασία ήταν 19 °C, δείχνοντας ότι η κατανάλωση τροφής από τις προνύμφες αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ενός σημείου, για να μειωθεί με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας. Μια παρόμοια παρατήρηση έκαναν και οι Pritchard and Berté (1987) οι οποίοι ανέφεραν ότι η διάρκεια του βιολογικού κύκλου και η ανάπτυξη του *Limnephilus externus* και του *Nemotaulius hostilis*, δύο προνυμφών Τριχοπτέρων της οικογένειας



Limnerphilidae, αυξάνονταν με την άνοδο της θερμοκρασίας μέχρι ενός σημείου, για να μειωθούν με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας.

Η ηλικία των φύλλων που είναι διαθέσιμα ως τροφή φαίνεται να επηρεάζει το βαθμό κατανάλωσης και αποικοδόμησης τους από τα μακροσπόνδυλα. Στην παρούσα εργασία η κατανάλωση φρέσκων φύλλων οξιάς από τις προνύμφες *Micropterna* ήταν περιορισμένη, σε αντίθεση με την αντίστοιχη των ξηρών φύλλων, φανερώνοντας ότι η ηλικία των φύλλων καθορίζει την προτίμηση των προνυμφών. Στα ρέοντα υδάτινα οικοσυστήματα της εύκρατης ζώνης, η σημασία των φρέσκων φύλλων ως τροφής για τα μακροασπόνδυλα είναι περιορισμένη, καθώς η οργανική φυτική ύλη που συσσωρεύεται στα ρέματα και τα ποτάμια αποτελείται κυρίως από ξηρά, πεσμένα φύλλα. Για αυτόν τον λόγο, είναι πιθανόν τα μακροασπόνδυλα των υδάτινων οικοσυστημάτων που βασίζουν τη διατροφή τους στη φυτική οργανική ύλη, να είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στην αξιοποίηση των ξηρών, παλαιών φύλλων. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, ο κανόνας αυτός δεν επιβεβαιώνεται. Οι Nolen and Pearson (1993) αναφέρουν ότι προνύμφες *Anisocentropus kirramus* (Trichoptera: Calamoceratidae) κατανάλωσαν περισσότερα φρέσκα φύλλα από ότι παλιά, για δύο από τα πέντε είδη φύλλων που τους προσφέρθηκαν και υποστήριξαν ότι ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των φύλλων, οι προνύμφες μπορούν να αξιοποιούν εξίσου καλά και φρέσκα φύλλα για να ικανοποιήσουν τις διατροφικές τους ανάγκες.

Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μακροασπόνδυλα προτιμούν φύλλα που έχουν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού (conditioning) και φέρουν μικροβιακό φορτίο (Bärlocher and Kendrick 1975: Suberkropp *et al.* 1983: Graça *et al.* 1993). Είναι γενικά αποδεκτό ότι αυτό οφείλεται είτε στο ότι τα έντομα μπορούν να τραφούν απευθείας από τους μικροοργανισμούς αυτούς, είτε στο ότι το conditioning ευνοεί την αποσύνθεση, καθώς παράγονται ένζυμα που

αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνονται θρεπτικά στοιχεία με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η λήψη τους από τους καταναλωτές (Suberkropp 1992: Graça 1993: Graça *et al.* 2001: Chung and Suberkropp 2009).

Σε αντίθεση με αυτές τις παρατηρήσεις, οι προνύμφες *M. sequax* δεν έδειξαν προτίμηση για φύλλα που είχαν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού για δύο εβδομάδες, τόσο στην περίπτωση των φρέσκων όσο και των παλιών φύλλων. Έχει όμως παρατηρηθεί ότι η διάρκεια που τα φύλλα παραμένουν στο νερό, πριν καταναλωθούν, μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό κατανάλωσης τους. Οι Campos and González (2009) έδειξαν ότι η ημερήσια κατανάλωση βελόνων πεύκου από προνύμφες *Sericostoma vittatum* (Trichoptera: Sericostomatidae) αυξήθηκε όταν ο χρόνος του μικροβιακού τους αποικισμού επιμηκύνθηκε από τέσσερις σε οκτώ εβδομάδες. Θα είχε ενδιαφέρον λοιπόν να διερευνηθεί στο μέλλον κατά πόσο ο χρόνος του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης τους από τις προνύμφες *M. sequax*.

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ένα ποσοστό προνυμφών της *M. sequax* νυμφώνονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ειδικότερα στο πείραμα όπου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, στο οποίο προσφέρθηκαν στις προνύμφες ξηρά φύλλα οξιάς σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν ποσοστά νύμφωσης έως και 23.3 %. Το μεγαλύτερο ποσοστό νύμφωσης σημειώθηκε όταν οι προνύμφες διατράφηκαν με φύλλα οξιάς στους 9 °C, οπότε και καταγράφηκε και η μικρότερη ημερήσια κατανάλωση. Αντίθετα, το μικρότερο ποσοστό νύμφωσης παρατηρήθηκε όταν οι προνύμφες τράφηκαν με φύλλα οξιάς στους 19 °C. Από το γεγονός αυτό, φαίνεται να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και της διαδικασίας νύμφωσης των προνυμφών *M. sequax*.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο ρυθμός κατανάλωσης της τροφής από τις προνύμφες της *M. sequax* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία του νερού όσο και από την ηλικία των φύλλων. Δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο όμως και για την παρουσία ή μη μικροβιακού φορτίου στα φύλλα, το οποίο δεν φαίνεται να επηρεάζει τις προτιμήσεις και το ρυθμό κατανάλωσης τροφής από τις συγκεκριμένες προνύμφες. Σε κάθε περίπτωση, τα στοιχεία αυτά είναι προκαταρκτικά και θα χρειαστεί περαιτέρω διερεύνηση για να διερευνηθούν σε βάθος οι παράγοντες που επηρεάζουν την κατανάλωση τροφής και τη διατροφή των προνυμφών *Micropterna sequax*.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1. Ελληνική

- **Γεωργούλας Γ.. (2009).** «Τροφικές προτιμήσεις και ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών *Trichoptera*». Μεταπτυχιακή Διπλωματική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 97.
- **Οικολογική Εγκυκλοπαίδεια. (1977).** Τόμος 9, Εκδόσεις Μπουκουμάνη, Αθήνα.
- **Ρούμπος Χ. Ι., Γεωργούλας Γ., Σταμόπουλος Δ. και Νικολοπούλου Ε., (2009).** Τροφικές προτιμήσεις και ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών της *Micropterna* sp. (Trichoptera: Limnephilidae) σε συνθήκες εργαστηρίου. 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, 3-6 Νοεμβρίου 2009.
- **Σταμόπουλος Δ. Κ., (2007).** Υδρόβια Εντομολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ 200.
- **Τζανακάκης Μ. Ε, (1980).** Μαθήματα εφαρμοσμένης εντομολογίας, Τόμος Β', Εκδόσεις Ζήτη Ο.Ε., Θεσσαλονίκη, σελ 49-50.

### 5.2. Ξένη

- **Bärlocher F. and Kendrick B., (1975).** Leaf-conditioning by microorganisms. *Oecologia*, 20: 359–362.
- **Buzby K. M. and Perry S. A., (2000) .** Modeling the potential effects of climate change on leaf pack processing in central Appalachian streams, *Aquatic Sciences*, 57: 1773–1783.

- **Campos J. and González J.M., (2009)** . *Sericostoma vittatum* (Trichoptera) larvae are able to use fine litter as an energy source, *International Review of Hydrobiology*, 94: 472 - 483
- **Carvalho E. M. and Graça M. A. S., (2007)** . A laboratory study on feeding plasticity of the shredder *Sericostoma vittatum* Rambur (Sericostrimatidae). *Hydrobiologia*, 575: 353–359.
- **Chung N. and Suberkropp K., (2009)** . Effects of aquatic fungi on feeding preferences and bioenergetics of *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae), *Hydrobiologia* 630: 257–26.
- **Clubb R. W., Gaufin A. R. and Lords J. L., (1975)** . A cute cadmium toxicity studies upon nine species of aquatic insects. *Environmental Research*, 9: 332-341.
- **Friberg N. and Jacobsen D., (1999)** . Variation in growth of the detritivore-shredder *Sericostoma personatum* (Trichoptera), *Freshwater Biology* 42, 625-635.
- **Gonzalez J. M. and Graça M. A. S., (2003)**. Conversion of leaf litter to secondary production by a shredding caddis-fly. *Freshwater Biology*, 48: 1578–1592.
- **Graça M. A. S., (2001)**. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review. *International Review of Hydrobiology*, 86: 383-393.
- **Graça M. A. S., Cressa, C., Cessner, M. O., Feio, M. J., Callies K. A. and Barrios C., (2001)** Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biology*, 46: 947-957.

- **Graça, M. A. S., Maltby L. and Calow P., (1993)** . Importance of fungi in diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. II. Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia*, 96: 304–309.
- **Malicky H., (1990)** . Feeding tests with caddis larvae (Insecta: Trichoptera) and amphipods (Crustacea: Amphipoda) on *Platanus orientalis* (Platanaceae) and other leaf litter. Academic Publishers, *Hydrobiologia*, 206: 163-173.
- **Mclachlan M., (1983)**.Light-trapped caddisflies (Trichoptera) as water quality indicators in large rivers: results from the Danube at Veröce, Hungary, *International Journal of freshwater entomology*, 5: 33-37.
- **Nolen, J. A. and Pearson R. G. (1993)** . Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirramus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. *Freshwater Biology*, 29: 469–479.
- **Pritchard, G. and Berte SB., (1987)** . Growth and food choice by two species of limniphilid caddis larvae given natural and artificial foods.*Freshwater Biology* 18:529–535.
- **Rincon J. and Martinez I., (2006)** . Food quality and feeding preferences of *Phylloicus sp.* (Trichoptera:Calamoceratidae). *Journal of North American Benthology Society*, 25: 207–213.
- **Suberkropp, K., Arsuffi T. L. and Anderson J. P., (1983)** . Comparison of degradative ability, enzymatic activity, and palability of aquatic hyphomycetes grown on leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 237–244.
- **Ward J. V., (1992)** Aquatic insect ecology. 1.. Biology and habitat. John Wiley and Sons, New York, 438 pp.

- **Wiley M . J . , and. Kohlerl S. L. (1980) .** Positioning changes of mayfly nymphs due to behavioural regulation of oxygen consumption. *Can. J. Zool.* 58: 618-622.

### 5.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- <http://insects.tamu.edu/extension/youth/bug/bug088.html>
- <http://magickcanoe.com/blog/2007/03/05/aquatic-invertebrates-part-one/>
- <http://www.flickr.com/photos/8793530@N03/3287924863/>

## 6. ABSTRACT

The purpose of this paper was to study the effect of water temperature as well as the influence of age and microbial load of the leaves to the food consumption rate by the larvae of Trichoptera *Micropterna sequax* under laboratory conditions. *M. sequax* occurs widely in aquatic ecosystems of the region of Pelion. The selected food, which was offered to larvae was beech leaves, because it is the dominant vegetation in the region. The *M. sequax* larvae were collected in April 2009 from Kontorema stream, in the Kaloriza region of mountain Pilion and were transferred to the laboratory where were left to acclimatize for 3 days before initiation of the experiments. Shed beech leaves were collected at the autumn and were stored in the laboratory until used. Two weeks before the beginning of the experiments the leaves were placed in a nearby stream, to undergo the procedure of conditioning.

In order to assess the influence of water temperature to the food consumption rate, four experiments at different temperatures (5.5 °C, 9.5 °C, 13 °C and 19 °C) were conducted. The food offered to larvae was dried beech leaves and the daily consumption of food by the larvae was measured. In the second experiment, the influence of the age and conditioning of leaves on the food consumption rate by *M. sequax* larvae was studied. Shed and fresh beech leaves, conditioned or not, were offered to the larvae. The duration of all the experiments was 10 days. In addition, chemical analysis of the leaves as well as measurements of the leaves hardness were undertaken, in order to investigate the possible causes of larvae preferences.

From the first series of experiments it appeared that the temperature affects the consumption of the plant material from the *M. sequax* larvae, since considerable



differences between the consumptions at different temperatures were observed. The largest food consumption rate by the larvae was recorded at 13 °C and the smallest at 5.5 °C and 9.5 °C. The results of the second experiment showed that the *M. sequax* larvae prefer shed against fresh beech leaves. Moreover, no significant differences between the consumption of conditioned and not conditioned beech leaves were recorded.

In conclusion, the water temperature and the age of leaves exert a sound effect on the food consumption rate by the *Micropterna sequax* larvae. In contrast, the conditioning of the leaves does not seem to affect, positively or negatively, the consumption by the larvae. In any case it's necessary to further investigate the factors which may affect the food consumption of the plant organic material by the larvae *M. sequax*.

**Keywords:** Trichoptera, *Micropterna sequax*, food consumption rate, microbial colonization, conditioning.

## 7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων οξιάς σε τέσσερις θερμοκρασίες (5.5, 9.5, 13 και 19 °C) στο πείραμα στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax*

A/A	Προνύμφη (g)	Ξηρά φύλλα οξιάς - 5.5 °C (g)	Προνύμφη (g)	Ξηρά φύλλα φύλλα οξιάς - 9.5 °C (g)	Προνύμφη (g)	Ξηρά φύλλα φύλλα οξιάς - 13 °C (g)	Προνύμφη (g)	Ξηρά φύλλα φύλλα οξιάς - 19 °C (g)
1		0.0127	0.0128	0.016	0.0108	0.0194		0.0098
2	0.0123	0.0209	0.012	0.0164	0.0048	0.0481		0.0083
3	0.0146	0.0289	0.0245	0.0155	0.0165	0.0363	0.0312	0.0112
4	0.0197	0.0176	0.0134	0.0194		0.0164		0.0075
5	0.0178	0.0096		0.0172	0.0126	0.0284	0.0164	0.0186
6		0.0185	0.0119	0.0372	0.0113	0.0122		0.0085
7	0.0234	0.0389	0.0194	0.0357		0.0287		0.0099
8	0.0256	0.0104	0.0166	0.0178		0.0324	0.0149	0.0179
9		0.0175	0.0084	0.0194	0.013	0.033		0.0109
10		0.0116	0.0082	0.0187	0.0111	0.024		0.0337
11	0.0211	0.0229	0.0078	0.023	0.0082	0.0272		0.016
12	0.0198	0.0314	0.0209	0.0225		0.028	0.0119	0.0208
13	0.0307	0.0422	0.0209	0.0222	0.007	0.0376		0.0267
14	0.0172	0.0094	0.0156	0.0083	0.0119	0.0306		0.0266
15		0.023	0.0111	0.0253	0.012	0.0556		0.0106
16	0.0262	0.0238	0.016	0.0278	0.0133	0.0301	0.016	0.0142
17	0.0152	0.0313		0.0212	0.0049	0.0304	0.0171	0.0251
18	0.0191	0.0296	0.0182	0.0195	0.0038	0.0239		0.014
19	0.0178	0.0153		0.0179		0.0358		0.0159
20	0.0206	0.0204	0.0159	0.0136	0.0103	0.0289		0.0246
21	0.0195	0.014	0.0207	0.0343		0.0286		0.0337
22	0.0211	0.306	0.0209	0.0485	0.0136	0.0324	0.0179	0.0251
23	0.0161	0.0098	0.0178	0.0292	0.0186	0.0254	0.0206	0.0272
24	0.0264	0.0202	0.0143	0.0162	0.01	0.0273		0.0237
25	0.0165	0.0238	0.0189	0.0245	0.0062	0.0333		0.0337
26	0.0147	0.0133	0.0176	0.0223		0.0269		0.0176
27	0.0181	0.0293		0.0205	0.0227	0.0354		0.0343
28	0.0231	0.0222		0.018	0.014	0.0335		0.0207
29	0.0205	0.0168		0.0417		0.0328	0.0204	0.0229
30	0.0226	0.0441		0.0186	0.006		0.0141	0.039

Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων των φρέσκων και ξηρών, μικροβιακά αποικισμένων ή μη φύλλων οξιάς στο πείραμα στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας και του μικροβιακού αποικισμού των φύλλων στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής των προνυμφών *M. sequax*.

A/A	Προνύμφη (g)	Φρέσκα φύλλα οξιάς (g)	Προνύμφη (g)	Φρέσκα μικροβιακά αποικισμένα φύλλα Οξιάς (g)	Προνύμφη (g)	Ξηρά φύλλα Οξιάς (g)	Προνύμφη (g)	Ξηρά μικροβιακά αποικισμένα φύλλα Οξιάς (g)
1	0.015	0.0319	0.0071	0.014		0.0163	0.0108	0.0194
2	0.0103	0.0169	0.006	0.016	0.006	0.022	0.0048	0.0481
3	0.0074	0.0181	0.006	0.015	0.0057	0.0218	0.0165	0.0363
4	0.0084	0.0172	0.013	0.017	0.0075	0.0275		0.0164
5	0.004	0.0273		0.0144	0.012	0.0198	0.0126	0.0284
6	0.014	0.0303	0.009	0.0174		0.0253	0.0113	0.0122
7	0.0083	0.0185	0.007	0.0253	0.011	0.0206		0.0287
8	0.0104	0.0247	0.015	0.0145	0.0133	0.0202		0.0324
9	0.0117	0.0285	0.0076	0.0166	0.0032	0.018	0.013	0.033
10		0.017		0.0203		0.0189	0.0111	0.024
11	0.0095	0.0223	0.004	0.018	0.006	0.0175	0.0082	0.0272
12	0.0216	0.0173	0.009	0.0143	0.0133	0.0277		0.028
13		0.0217	0.016	0.0185	0.0136	0.0423	0.007	0.0376
14	0.014	0.0201	0.0146	0.0172	0.009	0.0235	0.0119	0.0306
15	0.0144	0.0195		0.0154	0.0107	0.0259	0.012	0.0556
16	0.011	0.0185	0.0103	0.0161	0.0258	0.0201	0.0133	0.0301
17	0.0066	0.0222		0.0137		0.0227	0.0049	0.0304
18	0.0115	0.0174	0.0099	0.0191	0.0061	0.021	0.0038	0.0239
19		0.0169	0.0056	0.0143	0.009	0.0225		0.0358
20		0.0186	0.023	0.018	0.014	0.0272	0.0103	0.0289
21		0.0205	0.0123	0.0125	0.013	0.0455		0.0286
22	0.0095	0.0217	0.016	0.0173		0.0198	0.0136	0.0324
23	0.0125	0.0265	0.0129	0.0133	0.0111	0.0236	0.0186	0.0254
24		0.0196		0.0233	0.009	0.0196	0.01	0.0273
25		0.018	0.006	0.019	0.0068	0.0476	0.0062	0.0333
26	0.007	0.0161	0.0063	0.0114		0.0218		0.0269
27		0.0266	0.0098	0.0143		0.0318	0.0227	0.0354
28	0.0068	0.0233		0.0197		0.0372	0.014	0.0335
29	0.0108	0.0288	0.012	0.0143		0.0282		0.0328
30		0.0164		0.0165	0.0082	0.0305	0.006	0.0392

## Αποτελέσματα των μετρήσεων της μεθόδου Kjeldahl σε φρέσκα και ξηρά φύλλα οξιάς

Δείγμα	Βάρος δείγματος (g)	ml HCl	ml Blank	N (HCl)	(ml HCl - ml Blank)	N (%)	Πρωτεΐνη (%)
<b>Φρέσκα Φύλλα</b>							
Μάρτυρας 1	0	0.25	0.32	0.1	0.00	0	0
Μάρτυρας 2	0	0.33	0.32	0.1	0.00	0	0
Μάρτυρας 3	0	0.38	0.32	0.1	0.00	0	0
Οξιά 1	0.2001	2.75	0.32	0.1	2.43	1.70	10.63
Οξιά 2	0.2	2.82	0.32	0.1	2.50	1.75	10.94
<b>Ξηρά Φύλλα</b>							
Μάρτυρας 1	0	0.27	0.29	0.1	0.00	0	0
Μάρτυρας 2	0	0.17	0.29	0.1	0.00	0	0
Μάρτυρας 3	0	0.44	0.29	0.1	0.00	0	0
Οξιά 1	0.2002	1.53	0.29	0.1	1.24	0.86	5.40
Οξιά 2	0.2002	1.74	0.29	0.1	1.45	1.01	6.32

Αποτελέσματα των μετρήσεων της σκληρότητας φρέσκων και ξηρών φύλλων οξιάς (εκφρασμένα σε δύναμη Newton).

Επαναλήψεις	Φρέσκα φύλλα (Newton)	Ξηρά φύλλα (Newton)
1	0.8	1.58
2	1.41	1.61
3	0.84	1.52
4	0.93	1.41
5	0.76	1.58
6	0.94	0.88
7	0.72	2
8	0.77	2.3
9	0.50	1.74
10	0.75	1.52
11	0.84	1.54
12	0.94	1,66
13	1.36	1.1
14	1.06	1.27
15	0.59	1.22
16	0.68	1.86
17	0.98	1.72
18	1.38	2.23
19	1.26	1.77
20	0.97	1.83
21	1.19	2.04
22	1.06	2.12
23	1.27	2.04
24	1.02	1.38
25	1.40	2.15