



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία

**Barcoding περιβαλλοντικού DNA για χαρτογράφηση των
χωροχρονικών διαφοροποιήσεων σε κοινότητες
μακροασπόνδυλων του γλυκού νερού**



Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας

Σκοτίδα Αγγαΐα του Χρήστου

Λάρισα 2022



**UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
& BIOTECHNOLOGY**



Diploma Thesis

**Environmental DNA barcoding for mapping spatiotemporal
differences in freshwater macroinvertebrate communities**



Laboratory of Genetics, Comparative & Evolutionary Biology

Skotida Aglaia

Larisa 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, κα. Μούτου Αικατερίνη, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το πολύ ενδιαφέρον θέμα. Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στον Επίκουρο Καθηγητή Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας του τμήματος Ζωικής παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή, που ήταν σε κάθε βήμα και δυσκολία εκεί, για να δώσει συμβουλές και λύσεις. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την κα. Σαραφίδου Θεολογία ως μέλους της τριμελούς μου επιτροπής, καθώς και τους υποψήφιους Διδάκτορες Αγγελακόπουλο Ραφαήλ και Τσιπουρλιανό Ανδρέα, για την πολύτιμη βοήθεια τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο και ανάλαφρο κλίμα, καθώς και την ομάδα του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης για την συνεργασία που έγινε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στην οικογένεια μου, που χωρίς την στήριξή τους το ταξίδι αυτό δεν θα είχε γίνει πραγματικότητα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μούτου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Γιαννούλης Θεμιστοκλής, Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης & Βιοποικιλότητας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Πηνειός είναι ο τρίτος μεγαλύτερος ποταμός της Ελλάδας, διασχίζει όλη την Θεσσαλία και εκβάλλει στο Αιγαίο Πέλαγος. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οικονομική δραστηριότητα της Θεσσαλίας, με τα ύδατα του να αξιοποιούνται εκτενώς σε δραστηριότητες, όπως η άρδευση και η ύδρευση. Επιπλέον, η διαρκής ρύπανσή του από απορροές αστικών λυμάτων, γεωργικών λιπασμάτων, κ.ο.κ., οδηγούν στην υποβάθμιση των υδάτων του και στην απώλεια της βιοποικιλότητάς του.

Στα πλαίσια της Οδηγίας 2000/60/EK για την προστασία των επιφανειακών υδάτων, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής κανονισμών προστασίας και διατήρησης του οικοσυστήματός του Πηνειού. Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η συνεχής αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων του. Στην παρούσα μελέτη, για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, εφαρμόστηκε η τεχνική της βιοπαρακολούθησης. Ως βιοδείκτες χρησιμοποιήθηκαν τα βενθικά μακροασπόνδυλα, δεδομένου ότι η σύσταση των βιοκοινοτήτων τους αντικατοπτρίζει την ποιότητα των υδάτων. Αυτή επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, όπως οι αλλαγές στην αλατότητα, στην διαθεσιμότητα της τροφής και στην υδρολογική κατάσταση του ποταμού.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η στρατολόγηση της κλασικής και μοριακής ταξινομικής για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό των βιοκοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων του Πηνειού. Τα περιβαλλοντικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν κατά τους καλοκαιρινούς και χειμερινούς μήνες, από περιοχές ανάντη και κατάντη ενός τεχνητού φράγματος στην Γυρτώνη και μιας τεχνητής αναβαθμίδας στο Ομόλιο, καθώς και από τις εκβολές του ποταμού στην θάλασσα. Τα δεδομένα από την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθοδολογιών της φαινοτυπικής αναγνώρισης και του eDNA metabarcoding, ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ταξινόμηση των οργανισμών. Επιπλέον, μελετήθηκε ο τρόπος επίδρασης της εποχικότητας, της χωροταξικής προέλευσης των δειγμάτων και της ποιότητας των υδάτων στην σύσταση των κοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων.

Βάσει των αποτελεσμάτων υπολογισμού των βιοτικών δεικτών α - και β -diversity για την κλασική και μοριακή μέθοδο, διεξήχθη το συμπέρασμα πως αυτές παρουσιάζουν διαφορές στην ταξινομική τους ανάλυση. Αναφορικά με τις αποκλίσεις στα επίπεδα βιοποικιλότητας μεταξύ των δειγμάτων, αυτές φάνηκαν να μην επηρεάζονται από την περιοχή συλλογής ή

την θέση των τελευταίων ως προς το φράγμα. Ωστόσο, σημαντικές ήταν οι επιδράσεις της εποχικότητας στην βιοποικιλότητα.

Λέξεις κλειδιά: ποτάμιο οικοσύστημα, βιοποικιλότητα, βενθικά μακροασπόνδυλα, κλασική ταξινόμηση, μοριακή ταξινόμηση, γονίδιο COI, δείκτες βιοποικιλότητας, βιοπληροφορική ανάλυση

ABSTRACT

Pinios is the third largest river in Greece. Its watercourse crosses the plain of Thessaly and empties into the Aegean Sea. The river plays a crucial role in the economy of Thessaly, as it is extensively used in activities such as irrigation and water supply. Furthermore, its constant pollution from runoffs of urban sewage, agricultural fertilizers, etc. results in the degradation of its waters and loss of biodiversity.

According to the Directive 2000/60/EK for the protection of surface waters, it is important to establish regulations for the protection and conservation of the ecosystem of Pinios. Consequently, it is essential to frequently evaluate the ecological state of its waters. In the current study, for the achievement of this purpose, the method of biomonitoring was applied. Benthic macroinvertebrates were used as bioindicators, since the structure of their biocommunities reflect the quality of the waters. Numerous factors can affect the structure, such as changes in the salinity, the availability of food and the hydrological regime of the river.

The purpose of this study is the use of classical and molecular taxonomy for the qualification and quantification of the biocommunities of benthic macroinvertebrates. The environmental samples that were used, were collected during summer and winter, from sites upstream and downstream of a sluice Girtoni and a rock ramp at Omolio, as well as from the mouth of the river at the sea. The data from the bioinformatic analyses were used for the comparison of the effectiveness of phenotypic identification and eDNA metabarcoding in classifying the organisms. Additionally, the way seasonal variability, sampling site and quality of waters affect the composition of benthic macroinvertebrates' communities was studied.

The calculation of α - and β -diversity led to the conclusion that the classical method differs from the molecular one in its taxonomic resolution. Furthermore, the biodiversity levels between the samples were not affected by the sampling point, whereas seasonality was found to have great effects on them.

Key words: *river ecosystem, biodiversity, benthic macroinvertebrates, classical taxonomy, molecular taxonomy, gene COI, biodiversity indices, bioinformatics*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ποτάμια	9
1.1.1 Οικοσύστημα ποταμών.....	9
1.1.3 Τεχνητά φράγματα & αναβαθμίδες	11
1.2 Πηνείος ποταμός.....	11
1.2.1 Γεωμορφολογία.....	11
1.2.2 Ανθρωπογενείς επιδράσεις & Οδηγία 2000/60/ΕΚ	12
1.3 Τα ασπόνδυλα στην εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων	15
1.3.1 Βιοποικιλότητα & Ποιότητα υδάτων	16
1.3.2 Τα βενθικά μακροασπόνδυλα ως βιολογικοί δείκτες	20
1.3.3 Επιδρώντες παράγοντες στην βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων.....	24
1.4 Κλασική ταξινομική & Σύγχρονες μοριακές μέθοδοι.....	26
1.4.1 Κλασική ταξινομική.....	27
1.4.2 Μοριακή ταξινομική	28
1.5 Το γονίδιο <i>COI</i> ως μοριακός δείκτης	31
1.6 Σκοπός.....	33
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Δείγματα & Διαδικασία δειγματοληψίας.....	34
2.2 Προεπεξεργασία δειγμάτων	36
2.3 Απομόνωση DNA	37
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA	39
2.5 Φωτομέτρηση DNA	41
2.6 Προετοιμασία για Αλληλούχηση Illumina	41
2.7 Αλληλούχηση Illumina	43
2.8 Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων	44
2.8.1 Ανάλυση δεδομένων Illumina	44
2.8.2 Υπολογισμός δεικτών βιοποικιλότητας	47
2.9 Μακροοργανισμοί.....	51
2.9.1 Προετοιμασία δειγμάτων	51
2.9.2 Απομόνωση DNA	52
2.9.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	53
2.9.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR	56

2.9.5 Αλληλούχηση κατά Sanger.....	57
2.9.6 Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Ηλεκτροφόρηση DNA	61
3.2 Φωτομέτρηση DNA	61
3.3 Μακροοργανισμοί.....	63
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	63
3.3.2 Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων προϊόντων PCR.....	63
3.6 Κλασική ταξινόμηση	64
3.7 Μοριακή ταξινόμηση.....	66
3.8 Σύγκριση κλασικής & μοριακής ταξινόμησης.....	69
3.9 Παρατηρούμενα γεωγραφικά μοτίβα	70
3.10 Σύγκριση σταθμών Γυρτώνης.....	70
3.11 Σύγκριση σταθμών Ομολίου	72
3.12 Σύγκριση των περιοχών Γυρτώνης & Ομολίου	73
3.13 α -diversity κλασικής & μοριακής ταξινόμησης.....	75
3.14 β -diversity κλασικής & μοριακής ταξινόμησης.....	76
3.15 Μελέτη επίδρασης της εποχικότητας στην βιοποικιλότητα	80
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85
4.1 Σύγκριση κλασικής & μοριακής ταξινόμησης	86
4.1.1 α -diversity	87
4.1.2 β -diversity.....	90
4.2 Επίδραση εποχικότητας στην βιοποικιλότητα.....	92
4.3 Συμπέρασμα.....	93
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ποτάμια

Οι ποταμοί αποτελούν τύπο υγροτόπων. Σύμφωνα με το Άρθρο 1 της Συνθήκης Ramsar (1971), ως υγρότοπος (ή υγροβιότοπος) ορίζεται η φυσική ή τεχνητή περιοχή η οποία αποτελείται από έλη ή νερό. Είναι μόνιμα ή προσωρινά κατακλυσμένη με στάσιμο ή ρέων νερό, υφάλμυρο, αλμυρό ή γλυκό (Φίλης, κ.ά., 1996).

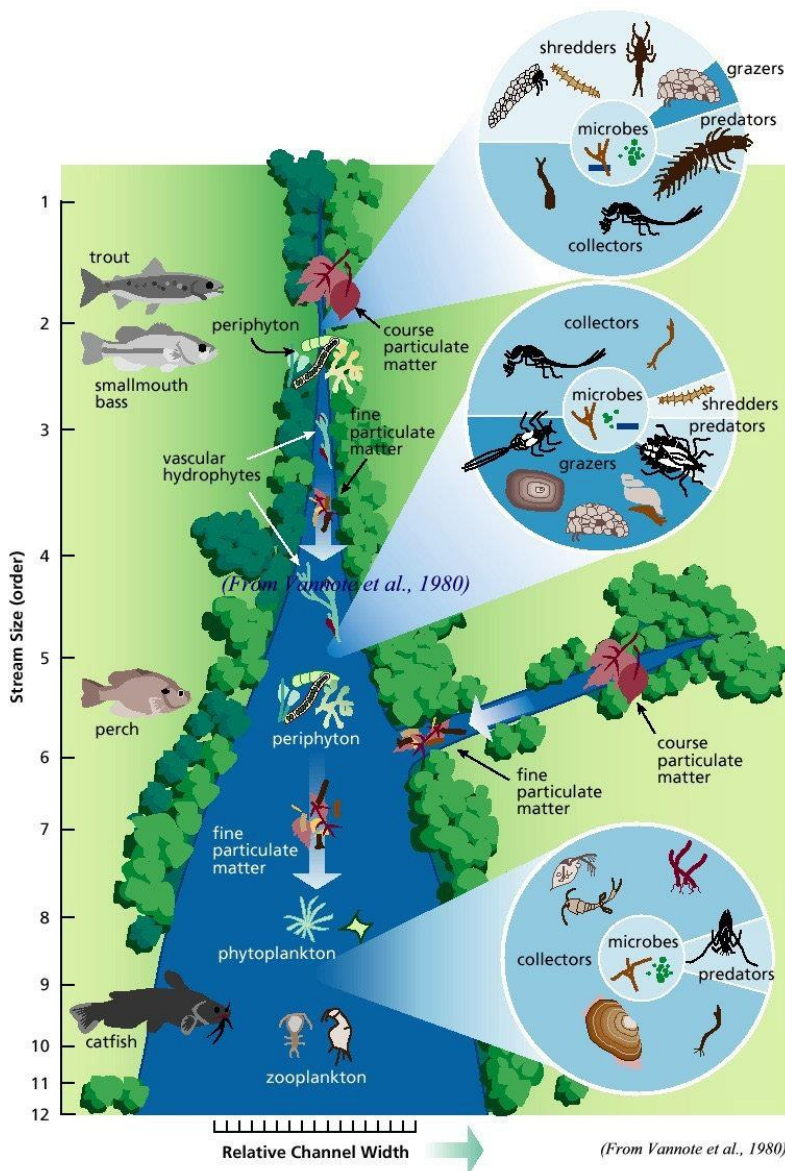
Αδιαμφισβήτητα, οι υγρότοποι αποτελούν ένα ανεκτίμητο οικονομικό, κοινωνικό, πολιτιστικό και φυσικό κεφάλαιο, γεγονός που επιβάλλει την εφαρμογή κανονισμών προστασίας και αναδημιουργίας τους. Αυτό γιατί φέρουν ποικίλες φυσικές λειτουργίες, όπως η απορρόφηση διοξειδίου του άνθρακα, η τροποποίηση πλημμυρικών φαινομένων και η παγίδευση ιζημάτων, καθώς και μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο, ως υδρευτική, αλιευτική, κτηνοτροφική αξία, κ.ο.κ. (Φίλης, κ.ά., 1996).

1.1.1 Οικοσύστημα ποταμών

Τα ποτάμια είναι ετερότροφα υδάτινα οικοσυστήματα, με το 99% της ενέργειας τους να προέρχεται από την εναπόθεση και αποικοδόμηση οργανικής ύλης (φύλλα, ξύλα, κ.ο.κ.) από περιβάλλοντα χερσαία οικοσυστήματα. Τροφοδοτούνται από τα υπόγεια ύδατα, τις βροχοπτώσεις και χιονοπτώσεις, με το ποσοστό των τελευταίων να καθορίζει την ταχύτητα του ρεύματος του ποταμού, που διαμορφώνει τα χαρακτηριστικά του (σχήμα και κλίση της κοίτης, βάθος και αδρότητα του πυθμένα) (Ζίφα, κ.ά., 2011).

Η δομή και φυσιογνωμία ενός ποταμού διαφέρει καθ' όλο το μήκος και πλάτος του. Ως προς το πλάτος παρουσιάζει οριζόντια ζώνωση αποτελούμενο από την κοίτη και την περιοχή που καλείται πλημμυρική κοίτη (Mihon & Hristov, 2011). Ως προς το μήκος του, εμφανίζει αλλαγές από το σημείο που πηγάζει, έως το σημείο στο οποίο εκβάλλει (Δέλτα ποταμού). Στην πηγή, το ρεύμα φέρει μικρό βάθος, βραχώδη πυθμένα, κρύο νερό και κινείται με υψηλή ταχύτητα και σε μεγάλη κλίση (παρατηρείται, επίσης, σχηματισμός καταρρακτών). Οι οργανισμοί που διαβιούν εκεί τρέφονται με οργανική ύλη που εισρέει από τη χέρσο. Έχουν, μάλιστα, προσαρμοστεί ανάλογα το μέγεθός τους και έτσι συναντώνται είτε πολύ λεπτοί οργανισμοί που ακολουθούν το ρεύμα, είτε πολύ πεπλατυσμένοι που είναι προσκολλημένοι ή κρυμμένοι σε κάποιο υπόστρωμα (π.χ. βράχος).

Όσο ο ποταμός κατευθύνεται προς χαμηλότερα υψόμετρα για να καταλήξει στην πεδιάδα, η ταχύτητα ροής του νερού ελαττώνεται, το πλάτος της κοίτης μεγαλώνει και οι πέτρες αντικαθίσταται, πλέον, από άμμο, όπου τα ασπόνδυλα πρέπει να σκάψουν για να σχηματίσουν τις φωλιές τους. Οι κύριοι πρωτογενείς παραγωγοί είναι φύκη και διάφορα υδροχαρή φυτά, ενώ μεταβάλλονται οι καταναλωτές και αποικοδομητές, με τους διηθηματοφάγους οργανισμούς και τα βενθικά είδη ψαριών να αποτελούν την κυρίαρχη πανίδα. Τελικά, τα νερά του ποταμού εκβάλλουν στην θάλασσα, όπου παρατηρείται μια μετάβαση από ένα οικοσύστημα γλυκού νερού σε ένα οικοσύστημα αλμυρού νερού. Οι κυρίαρχοι οργανισμοί που απαντώνται στα εκβολικά συστήματα είναι βενθικοί (Εικ.1) (Ζίφα, κ.ά., 2011).



Εικόνα 1: Αλλαγή της φυσιογνωμίας των οργανισμών και του ποταμού από την πηγή έως το σημείο εκβολής (Kennen, 2007).

1.1.3 Τεχνητά φράγματα & αναβαθμίδες

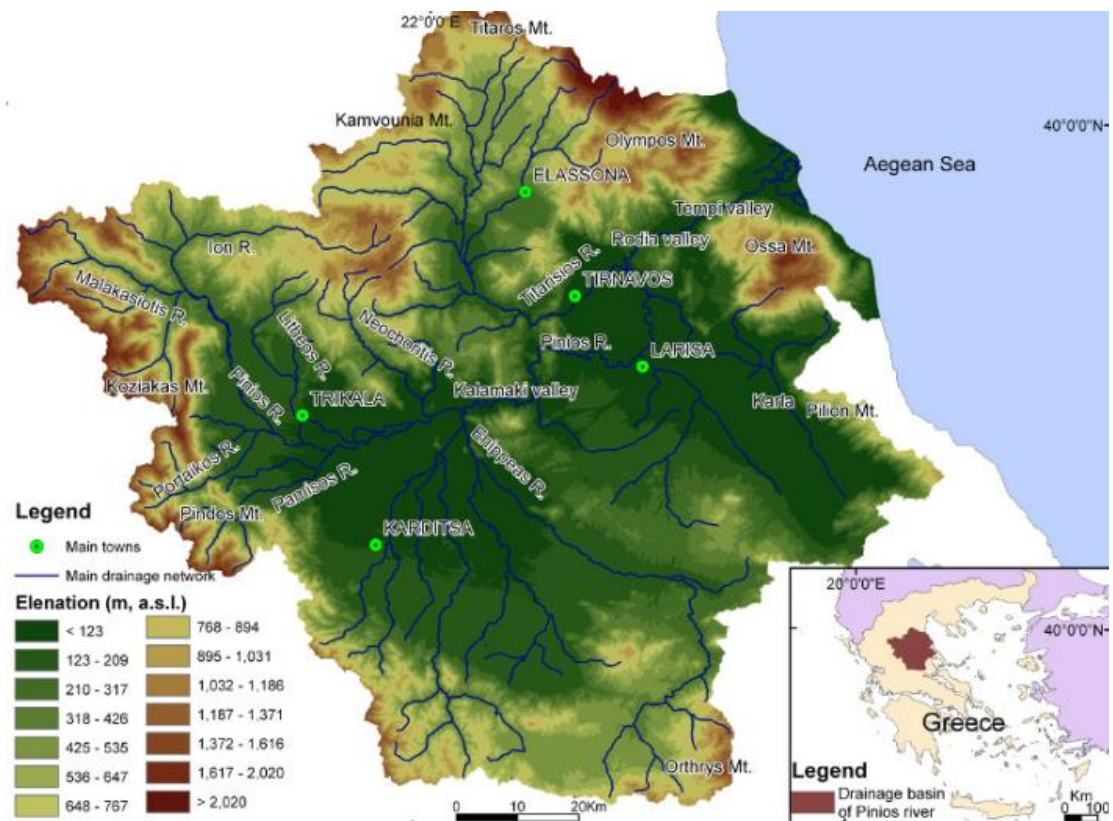
Η κατασκευή φραγμάτων και αναβαθμίδων στους ποταμούς εξυπηρετεί ποικίλες ανάγκες. Η βασικότερη λειτουργία των πρώτων (μέγεθος ≥ 10 μέτρα) είναι η ταμίευση νερού για άρδευση ή ύδρευση. Από την άλλη πλευρά, οι αναβαθμίδες (2 μέτρα \leq μέγεθος ≤ 10 μέτρα) κατασκευάζονται με σκοπό τον έλεγχο των πλημμύρων, την διατήρηση της στάθμης του νερού του ποταμού σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, καθώς και την μέτρηση του όγκου του νερού που μεταφέρει (Franklin, et al, 2018). Ωστόσο, η ύπαρξη τέτοιων εμποδίων στους ποταμούς επιφέρει σοβαρές συνέπειες στο οικοσύστημά τους. Οι υδρολογικές, γεωμορφολογικές και οικολογικές αλλαγές που προκαλούν μπορούν να οδηγήσουν στην εξαφάνιση ειδών ή στην παντελή μορφοποίηση των υδρόβιων κοινοτήτων τόσο στα ανάντη, όσο και στα κατάντη τμήματα του εμποδίου (Birnie-Gauvin, et al., 2017; Mihon & Hristov, 2011).

1.2 Πηνειός ποταμός

1.2.1 Γεωμορφολογία

Ο Πηνειός είναι ο τρίτος σε μήκος ποταμός της Ελλάδας και η λεκάνη απορροής του, η μεγαλύτερη της χώρας (Migiros, et al, 2011; Mouratiadou & Moran, 2007). Διασχίζει όλη την Θεσσαλία, μια εκτενής πεδιάδα που περιβάλλεται από οροσειρές και εκβάλλει στο Αιγαίο Πέλαγος σχηματίζοντας Δέλτα (Εικ.2) (Migiros, et al, 2011; Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017).

Η πορεία του Πηνειού ξεκινά από το βορειοανατολικό τμήμα της Θεσσαλίας, από τη διασταύρωση των ποταμών Μαλακασιώτη και Ιών. Οι κύριοι παραπόταμοί του (ο Πορταϊκός, ο Πάμισος και ο Ενιπέας στα νοτιοδυτικά και ο Λιθαίος, ο Νεοχωρίτης και ο Τιταρήσιος στα βόρεια) αποστραγγίζουν μεγάλες, γεωλογικά, ετερογενής περιοχές, καθιστώντας τον Πηνειό ένα ιδιαίτερα ετερογενές σύστημα (Εικ.2) (Migiros, et al, 2011). Επιπλέον, ο ποταμός παρουσιάζει ήρεμη ροή, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε πλημμύρες εξαιτίας της εναπόθεσης ιζήματος (Καλινδέρης, 2006).



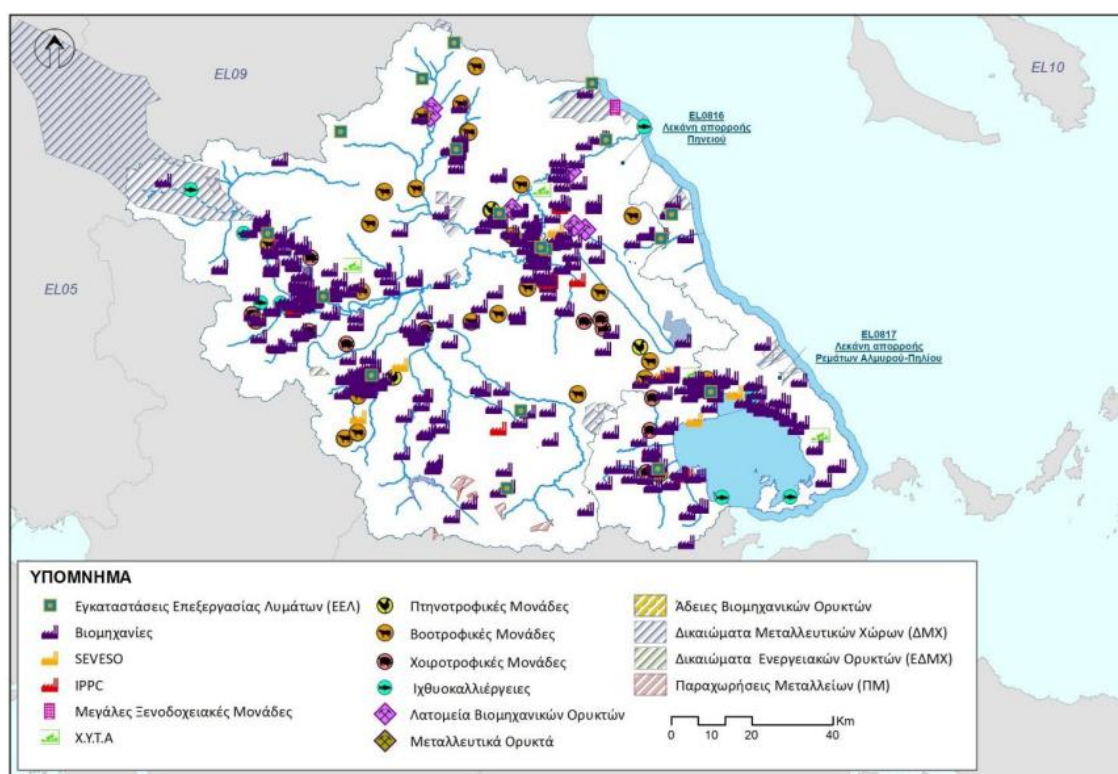
Εικόνα 2: Η λεκάνη απορροής του Πηνειού στην Θεσσαλική πεδιάδα, οι κύριοι παραπόταμοί του και οι περιβάλλουσες οροσειρές (Migiros, et al, 2011).

1.2.2 Ανθρωπογενείς επιδράσεις & Οδηγία 2000/60/ΕΚ

Η Θεσσαλία είναι η κυρίαρχη και γεωργικά πιο παραγωγική αγροτική περιοχή της Ελλάδας, δεδομένου του μεγάλου αριθμού των καλλιεργειών που καταλαμβάνουν τεράστιες γεωργικές εκτάσεις (Mouratiadou & Moran, 2007). Ο Πηνειός είναι ο πιο σημαντικός ποταμός της, με τα νερά του να συνεισφέρουν σημαντικά στην οικονομία της περιοχής και να αξιοποιούνται στην προμήθεια πόσιμου νερού και σε ποικίλες αγροτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες. (Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017). Ο ποταμός χρησιμοποιείται κατά βάση για άρδευση, κάτι που έχει οδηγήσει στην κατασκευή μεγάλων έργων αξιοποίησης των υδάτων του, όπως είναι έργα εκτροπής και ταμίευσης νερών (φράγματα) (Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2014).

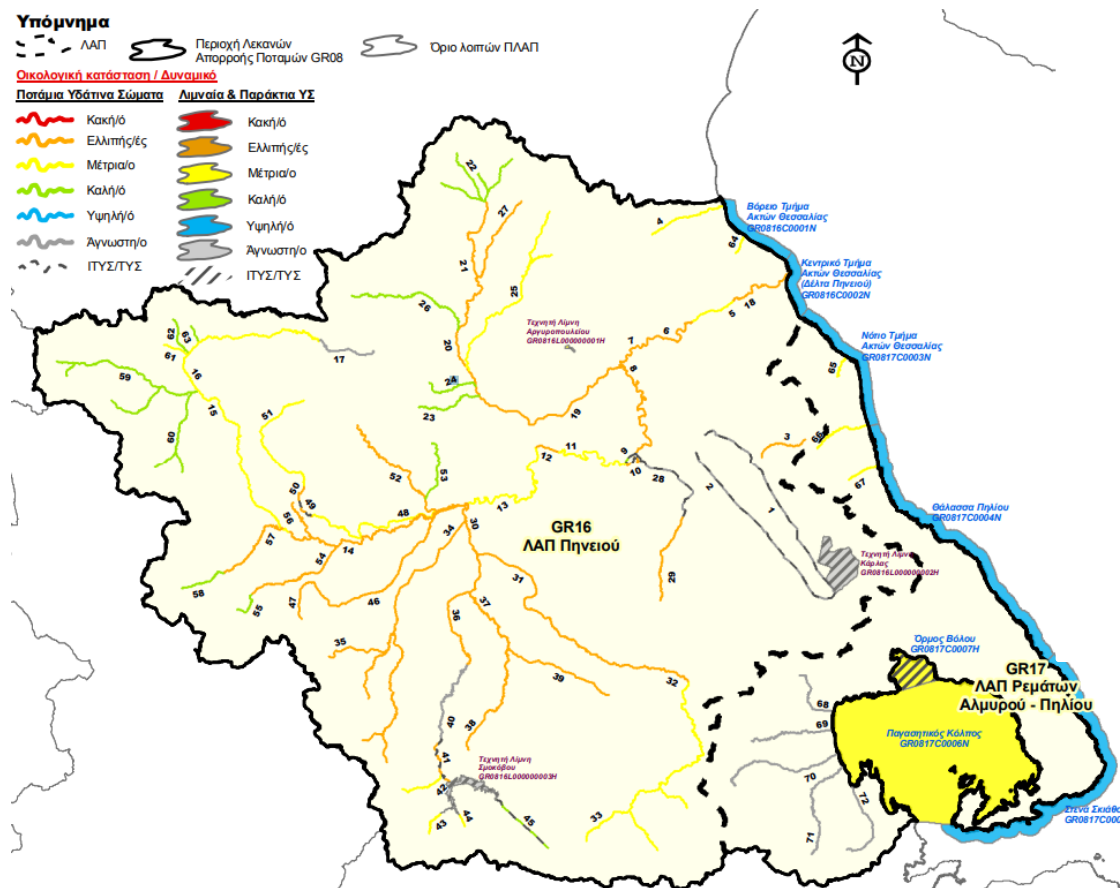
Ο Πηνειός δέχεται τεράστιες πιέσεις από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (πηγές ρύπανσης), κυρίως στην περιοχή της Λάρισας. Αυτές περιλαμβάνουν ενέργειες όπως οι απολήψεις ύδατος, ο τεχνητός εμπλουτισμός των υπόγειων υδάτων, ενώ άλλες κατηγοριοποιούνται σε σημειακές και διάχυτες πηγές. Στις διάχυτες πηγές ρύπανσης συγκαταλέγονται οι

κτηνοτροφικές και γεωργικές δραστηριότητες (π.χ. νιτρορύπανση) και τα αστικά λύματα που δεν καταλήγουν σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων. Από την άλλη, ως σημειακές θεωρούνται μεγάλες ξενοδοχειακές, κτηνοτροφικές και βιομηχανικές μονάδες, διαρροές από ΧΑΔΑ-ΧΥΤΑ, κ.ο.κ. (Εικ.3) (Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017).



Εικόνα 3: Σημειακές πιέσεις στο Υδατικό Διαμέρισμα Θεσσαλίας (Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017).

Όλα τα παραπάνω φέρουν σημαντικές επιδράσεις στο οικοσύστημά του ποταμού, λόγω υποβάθμισης της ποιότητας των υδάτων του και της απώλειας ενός ποσοστού της βιοποικιλότητάς του (Εικ.4).



Εικόνα 4: Εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων του Πηνειού ποταμού (Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017).

Γενικότερα, είναι εύκολο να συμπεράνει κανείς ότι οι διάφορες κοινωνίες ανά τον κόσμο εκμεταλλεύονται εκτενώς τα ποτάμια για τις ανάγκες τους, κάτι που τα καθιστά άμεσα από τα πιο επηρεασμένα οικοσυστήματα στη γη. Επομένως, αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη για λήψη πρωτοβουλιών και θέσπιση νόμων από αρμόδιους φορείς, με σκοπό την επίτευξη καλής οικολογικής κατάστασης των ποταμών (AQEM Consortium, 2002) (Fernández, et al, 2019). Στην Ευρώπη για την διεκπεραίωση αυτού του στόχου θεσπίστηκε το Water Framework Directive (WFD), που τέθηκε σε ισχύ το 2000 με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ, για την προστασία των επιφανειακών, υπογείων και παράκτιων/μεταβατικών υδάτων συνολικά σε επίπεδο Λεκάνης Απορροής Ποταμού (ΛΑΠ) (Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων, 2017; Fernández, 2019). Το πλαίσιο αυτό, μεταξύ άλλων, στοχεύει στην αποτροπή περαιτέρω υποβάθμισης των υδατινών οικοσυστημάτων, στον εμπλουτισμό αυτών και στη λήψη συγκεκριμένων μέτρων για τον έλεγχο της μόλυνσης (Καλινδέρης, 2006).

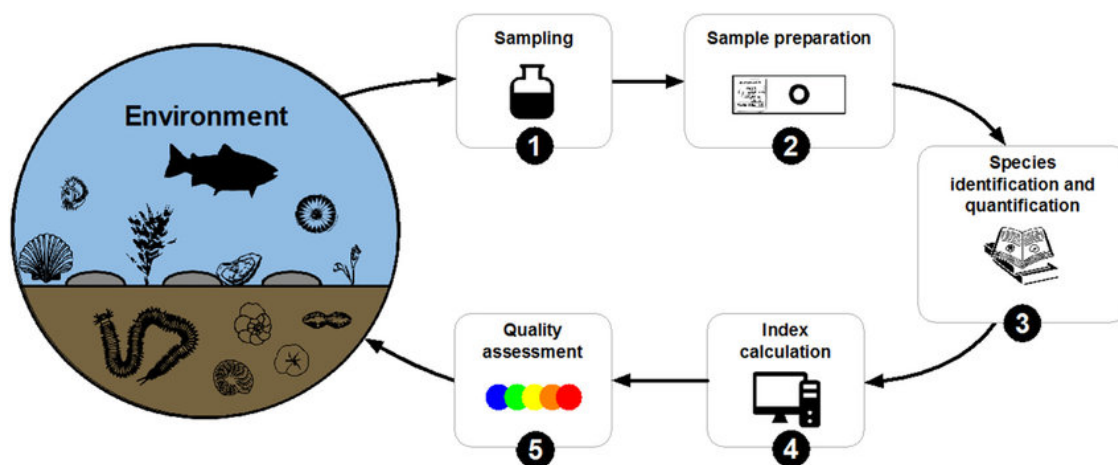
1.3 Τα ασπόνδυλα στην εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων

Η επίτευξη των απαιτήσεων του WFD προϋποθέτει την τακτική παρακολούθηση της οικολογικής ποιότητας των υδάτων των ποταμών, μέσω στρατολόγησης κατάλληλων μεθόδων (Fernández, et al, 2019).

Στις περισσότερες μελέτες η εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων των ποταμών στηρίζεται σε μετρήσεις των επιπέδων διαφόρων ρυπαντών (οργανικοί, ανόργανοι ρύποι), χημικών ενώσεων και στοιχείων (επίπεδα αζώτου, διαλυμένου οξυγόνου, κ.ο.κ.), της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στα ύδατα, που αποτελεί ένδειξη της τροφικής τους κατάστασης, καθώς και άλλων φυσικών παραμέτρων (θερμοκρασία, pH, ποσοστό παρόχθιας βλάστησης, κ.ο.κ.). Η προσέγγιση αυτή εντοπίζει μεταβολές στα επίπεδα διαφόρων ουσιών, οι τιμές των οποίων πρέπει να διατηρούνται εντός ενός εύρους για την διατήρηση της καλής ποιότητας των υδάτων. Ωστόσο, οι μετρήσεις αντικατοπτρίζουν τις συνθήκες για την δεδομένη χρονική στιγμή και σημείο της δειγματοληψίας, ενώ δεν δίνουν την δυνατότητα να μελετηθούν οι επιδράσεις των παρατηρηθέντων μεταβολών στην βιοποικιλότητα (HaRa, et al, 2019).

Για τους λόγους αυτούς, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη στροφή της έρευνας προς την χρήση βιολογικών μεθόδων, με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται να είναι πιο αξιόπιστες, οικονομικές και γρήγορες από τις αντίστοιχες χημικές. Η βιοπαρακολούθηση (biomonitoring) είναι η βασική εφαρμογή αυτών, η οποία αξιολογεί την οικολογική κατάσταση του περιβάλλοντος και τον βαθμό μόλυνσης μελετώντας αλλαγές στην βιοποικιλότητα, δηλαδή στην αφθονία και δομή των βιοκοινοτήτων οργανισμών-δεικτών (φυτοπλαγκτόν, μακρόφυτα, βενθικά διάτομα, βενθικά μακροασπόνδυλα, ψάρια) (Saad Abdelkarim, 2020; Szczerbińska & Gałczyńska, 2015) (Εικ.5). Το σημαντικό πλεονέκτημα που φέρει έναντι των χημικών μεθόδων είναι η χρήση ζωντανών οργανισμών, οι οποίοι αντανακλούν την συνολική οικολογική κατάσταση των υδάτων (βιολογικές και φυσικοχημικές παράμετροι) για ένα εύρος περιοχής και καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου (Ko, et al, 2020). Επιπλέον, αυτοί χαρακτηρίζονται από μια καθορισμένη ανοχή/ευαισθησία στα επίπεδα διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων και ρύπων, συνθήκες από τις οποίες εξαρτάται η παρουσία ή απουσία τους από ένα περιβάλλον (Szczerbińska & Gałczyńska, 2015). Αυτό επιτρέπει την εκτίμηση της ποιότητας του εκάστοτε οικοσυστήματος, του βαθμού στον οποίο ο κάθε ρυπαντής έχει συνεισφέρει στην υποβάθμιση του και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των δράσεων ελέγχου και αποκατάστασης των οικοσυστημάτων (Κάντζαρης, 2003).

Παρ' όλο αυτά, επειδή οι βιολογικές μέθοδοι εντοπίζουν την μεταβολή στην ποιότητα των υδάτων, αλλά όχι την ακριβή πηγή ρύπανσης, τίθενται αναγκαίος ο συνδυασμός τους με τις χημικές μεθόδους και την μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υδάτων σε κάθε σημείο δειγματοληψίας (Κάντζαρης, 2003).



Εικόνα 5: Διαδικασία βιοπαρακολούθησης. Τα βήματα περιλαμβάνουν: 1) Δειγματοληψία, 2) Προετοιμασία του δείγματος, 3) Ταξινόμηση και ποσοτικοποίηση των οργανισμών δεικτών, 4) Υπολογισμός βιοτικών δεικτών και 5) Εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων, μέσω σύγκρισης των παρατηρηθέντων βιοτικών δεικτών με αντίστοιχους δείκτες αναφοράς (Pawlowski, et al, 2018).

1.3.1 Βιοποικιλότητα & Ποιότητα υδάτων

Η βιοποικιλότητα αντιπροσωπεύει την μορφολογική (γενότυπος, φαινότυπος), ταξινομική (ποικιλότητα ειδών) και οικολογική (οικολογικές αλληλεπιδράσεις) ποικιλότητα σε όλα τα επίπεδα ζωής (Εικ.6) (Fedor & Zvarikova, 2019). Η προστασία και διατήρησή της κατοχυρώνεται από το διεθνές, νομικό όργανο Convention on Biological Diversity (CBD), με την υπογραφή μιας συνθήκης ορόσημο μεταξύ 150 εθνών, το 1992 (Gaston & Spicer, 1998).

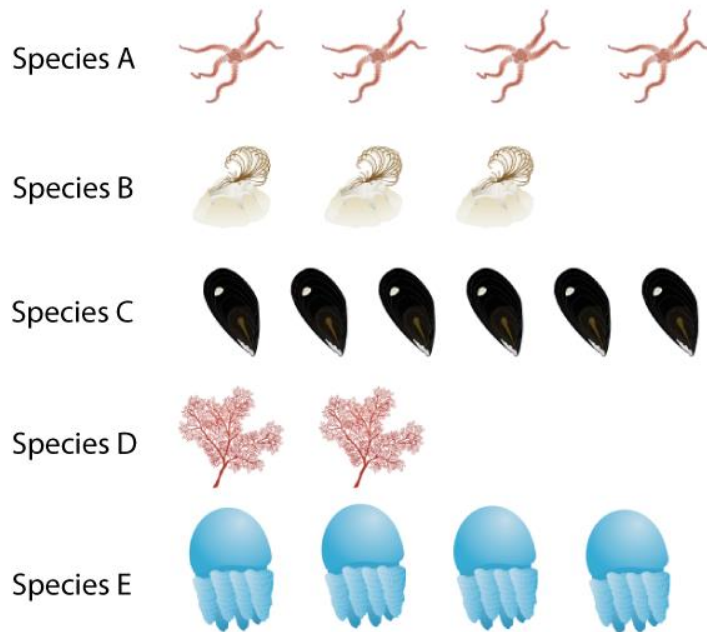
Ecological diversity		Organismal diversity
Biomes		Domains or Kingdoms
Bioregions		Phyla
Landscapes		Families
Ecosystems		Genera
Habitats		Species
Niches	Genetic diversity	Subspecies
Populations	Populations	Populations
	Individuals	Individuals
	Chromosomes	
	Genes	
	Nucleotides	

Εικόνα 6: Τύποι βιοποικιλότητας (Gaston & Spicer, 1998).

Η ποσοτικοποίηση της βιοποικιλότητας είναι αναγκαία για την εκτίμηση της οικολογικής ποιότητας των υδάτων μέσω της βιοπαρακολούθησης. Ωστόσο, δεδομένου ότι αποτελεί μια πολυδιάστατη ιδιότητα των φυσικών συστημάτων, είναι δύσκολο να περιγραφεί από την χρήση ενός μόνο δείκτη, ενώ οι επιστήμονες δεν έχουν συμφωνήσει ακόμη στο ποιους δείκτες είναι οι καταλληλότεροι και πιο πληροφοριακοί. Η έκφραση της βιοποικιλότητας μπορεί να επιτευχθεί μέσα από τους παρακάτω βιοτικούς δείκτες (Εικ.7) (Morris, 2014):

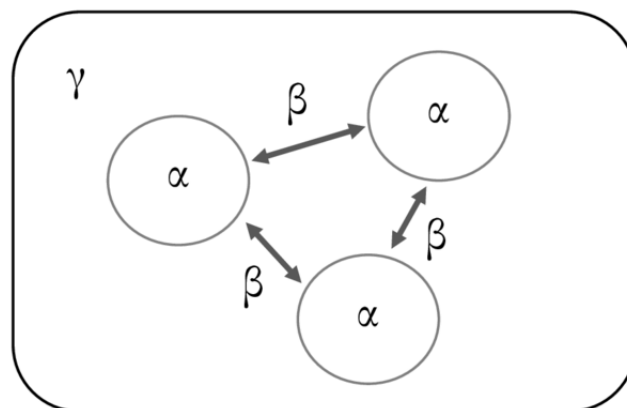
- **Ποικιλότητα ειδών (Species Richness)**, δηλαδή ο αριθμός των διαφορετικών ειδών σε ένα δείγμα. Είναι η απλούστερη μέθοδος ποσοτικοποίησης της βιοποικιλότητας και η πιο συχνά εφαρμοζόμενη.
- **Αφθονία ειδών (Species Abundance)**, δηλαδή ο αριθμός των ατόμων κάθε είδους σε ένα δείγμα.
- **Ομαλότητα κατανομής ειδών (Species Evenness)**, δηλαδή ο βαθμός στον οποίο τα άτομα διαχωρίζονται ανάμεσα στα είδη. Οι χαμηλές τιμές υποδηλώνουν ότι στο δείγμα κυριαρχούν ένα ή λίγα είδη, ενώ οι υψηλές τιμές υποδηλώνουν ότι σχετικά ίσος αριθμός ατόμων ανήκουν σε κάθε είδος.

Φυσικά, υπάρχουν ακόμη πολλοί δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, κάποιοι από τους οποίους στηρίζονται στον συνδυασμό των παραπάνω, όπως είναι ο δείκτης Simpson, που συνδυάζει τόσο την ποικιλότητα των ειδών, όσο και την αφθονία τους σε ένα δείγμα (Morris, 2014).



Εικόνα 7: Παράδειγμα μέτρησης της βιοποικιλότητας. Στο παραπάνω δείγμα, υπάρχουν 5 είδη (ποικιλότητα ειδών), με διαφορετικό αριθμό ατόμων ανά είδος (αφθονία ειδών), χωρίς αυτά να είναι ισότιμα κατανομημένα (ομαλότητα κατανομής ειδών) (AQUATIC LIFE LAB, 2018).

Οι προαναφερθέντες δείκτες μετρούν την βιοποικιλότητα εντός μιας κοινότητας, το οποίο καλείται **alpha-diversity (α -diversity)**. Για την μελέτη αυτής σε μεγαλύτερο επίπεδο χρησιμοποιούνται δύο επιπλέον δείκτες. Το **beta-diversity (β -diversity)** το οποίο συγκρίνει την βιοποικιλότητα τοπικά, μεταξύ δύο κοινοτήτων και το **gamma-diversity (γ -diversity)** που το κάνει για ένα μεγαλύτερο γεωγραφικό επίπεδο (Εικ.8) (Swingland, 2013).



Εικόνα 8: Το γ -diversity αντικατοπτρίζει την συνολική βιοποικιλότητα της περιοχής, το α -diversity αναφέρεται στην ποικιλότητα εντός των κοινοτήτων, μεμονωμένα και το β -diversity μεταξύ αυτών (Daly, et al, 2018).

Η βιοποικιλότητα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ευημερία των ανθρώπινων κοινωνιών, καθώς συνεισφέρει σημαντικά σε ποικίλους τομείς, όπως η οικονομία, μέσω της αλιείας, του τουρισμού, της γεωργίας κ.α. Οι τεράστιες, ωστόσο, πιέσεις που δέχεται από τις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, έχουν οδηγήσει σε σημαντική υποβάθμισή της, δεδομένης της απώλειας οικοσυστημάτων και ειδών (προσεγγιστικά ο ρυθμός εξαφάνισης των ειδών είναι κατά 100-1000 φορές μεγαλύτερος του φυσικού ρυθμού) (Clark, et al, 2014; Young, et al, 2010).

Ιδιαίτερα ευαίσθητα θεωρούνται τα οικοσυστήματα του γλυκού νερού (λίμνες, ποτάμια, ρυάκια), κυρίως λόγω του ότι υποστηρίζουν δυσανάλογα υψηλά επίπεδα βιοποικιλότητας (6% των χαρακτηρισμένων ειδών) συγκριτικά με τον χώρο που καταλαμβάνουν (0,01% των υδάτων στον πλανήτη) (Heino, et al, 2009). Τα περιβάλλοντα αυτά επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων, όπως για παράδειγμα είναι:

- Η γεωργία, η τρίτη μεγαλύτερη πηγή μόλυνσης των συστημάτων των γλυκών νερών, σύμφωνα με τον οργανισμό Environmental Protection Agency (EPA). Η υπέρμετρη χρήση λιπασμάτων αζώτου και φωσφόρου στις καλλιέργειες, οδηγεί στον εμπλουτισμό των επιφανειακών υδάτων σε αυτά τα θρεπτικά στοιχεία και κατά συνέπεια στον ευτροφισμό, με σημαντικές επιδράσεις στην βιοποικιλότητα (Abbasi, et al., 2014).
- Η κλιματική αλλαγή και ειδικότερα η αύξηση της θερμοκρασίας στα ύδατα, οδηγεί στην μείωση της βιοποικιλότητας (Heino, et al, 2009).
- Τα τεχνητά φράγματα και αναβαθμίδες στους ποταμούς. Πιο συγκεκριμένα, στις ανάντη περιοχές των φραγμάτων δημιουργούνται τεχνητές λίμνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ομοιογένεια ως προς το υπόστρωμα και την βλάστηση, μεγάλο βάθος και μικρή ταχύτητα ρεύματος, ενώ στα βαθύτερα στρώματα νερού, προς τον πυθμένα, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα οξυγόνου και κρύο νερό (Birnie-Gauvin, et al., 2017). Από την άλλη πλευρά, στις κατάντη περιοχές, λόγω διακοπής της φυσιολογικής ροής των υδάτων, αναστέλλεται η εναπόθεση ιζήματος και κατά συνέπεια επιταχύνεται η διάβρωση της κοίτης του ποταμού, οδηγώντας στην εκρίζωση ακίνητων ή αργά κινούμενων οργανισμών. Επιπλέον, ελαττώνεται το βάθος του ποταμού και μειώνονται τα ποσοστά της παρόχθιας βλάστησης, τα οποία οδηγούν σε αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και μείωση της διαθεσιμότητας του διαλυμένου οξυγόνου και της τροφής. Και στις δύο περιπτώσεις οι φυσικοχημικές αλλαγές φέρουν σημαντικές επιδράσεις στα επίπεδα

της βιοποικιλότητας. Αναμφίβολα, οι οργανισμοί που επηρεάζονται περισσότερο, είναι τα διάφορα μεταναστευτικά είδη που κινούνται κατά μήκος του ποταμού για αναπαραγωγή, τροφή, κ.ο.κ., όπως είναι τα ψάρια (Mihon & Hristov, 2011). Οι αναβαθμίδες φέρουν παρόμοιες, αλλά με μικρότερο αντίκτυπο, επιπτώσεις στην βιοποικιλότητα, για δύο κυρίως λόγους. Αρχικά, το μέγεθος τους είναι μικρότερο από αυτό των φραγμάτων. Κατά δεύτερον, δίνεται η δυνατότητα κατασκευής κατάλληλων δομών από πέτρες, που προσομοιάζουν τα υδρολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του ποταμού και επιτρέπουν την σταδιακή μετακίνηση διαφόρων μεταναστευτικών ειδών από τα κατάντη στα ανάντη τμήματα του εμποδίου (Franklin, et al, 2018).

1.3.2 Τα βενθικά μακροασπόνδυλα ως βιολογικοί δείκτες

Οι βιολογικές μέθοδοι αποτελούν αξιόλογο εργαλείο στην εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των οικοσυστημάτων των γλυκών νερών και του βαθμού στον οποίο αυτή έχει επηρεαστεί από βιοτικούς (π.χ. εισβάλλοντα είδη) και αβιοτικούς (π.χ. οργανικοί ρύποι) παράγοντες. Η χρήση των βενθικών μακροασπόνδυλων (benthic macroinvertebrates) ως οργανισμών βιοδεικτών έχει προσελκύσει την επιστημονική κοινότητα για αυτήν την διεργασία, εξαιτίας των σημαντικών πλεονεκτημάτων που προσφέρουν (Ko, et al, 2020).

Ως βενθικά μακροασπόνδυλα ορίζονται οι ορατοί με γυμνό οφθαλμό, ασπόνδυλοι οργανισμοί που διαβιούν στον βυθό/βένθος υδάτινων οικοσυστημάτων, για τουλάχιστον ένα διάστημα της ζωής τους. Είναι εξώθερμοι, φέρουν μέση διάρκεια ζωής και παρουσιάζουν μικρή κινητικότητα (μη-μεταναστευτικά), καθώς εντοπίζονται κυρίως προσκολλημένα σε πέτρες, κορμούς ξύλων ή βλάστηση ή είναι κρυμμένα στο έδαφος (Mandaville, 2002). Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα των ρεόντων υδάτων, καθώς συμμετέχουν στον κύκλο διαφόρων θρεπτικών συστατικών, διασπώντας και μεταφέροντας την οργανική ύλη μέσα στην τροφική αλυσίδα, δεδομένου ότι αποτελούν την πρωταρχική πηγή τροφής για ψάρια και άλλους θηρευτές (Ko, et al, 2020).

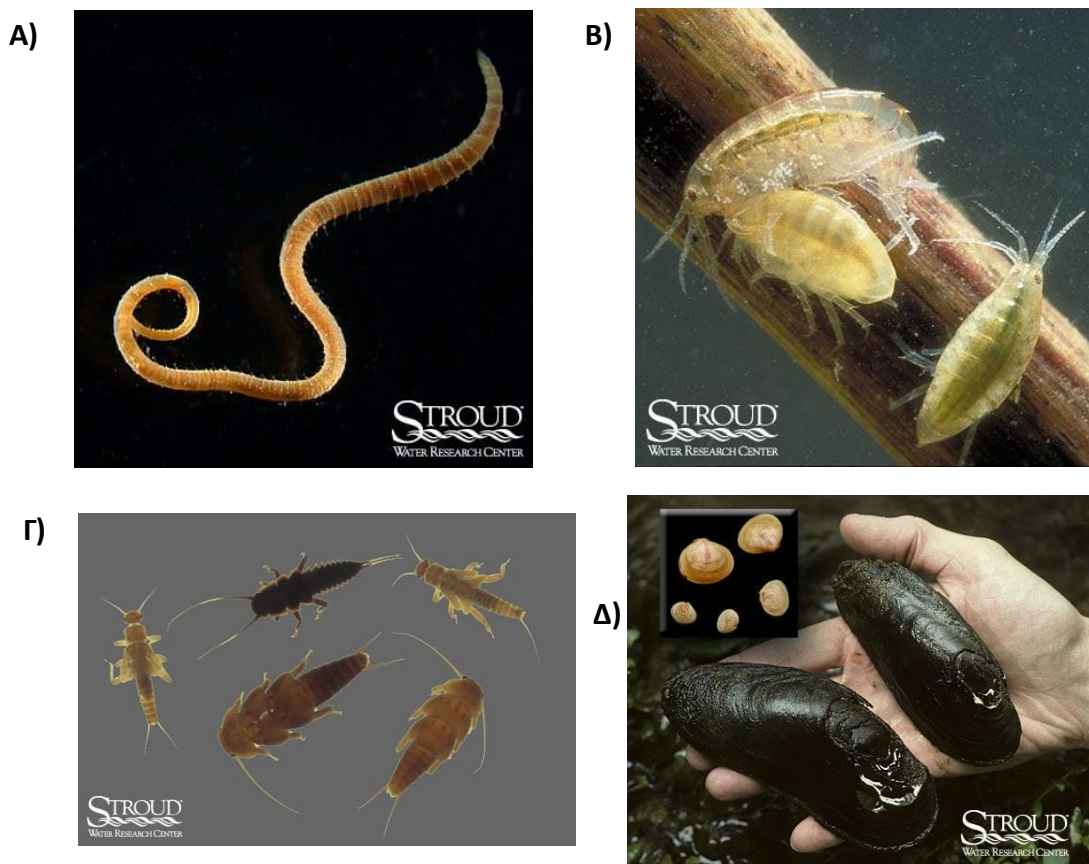
Τα βενθικά μακροασπόνδυλα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αλλαγές στο οικοσύστημά τους, καθώς για την επιβίωσή τους απαιτούν πολύ συγκεκριμένες φυσικοχημικές συνθήκες. Οποιαδήποτε διατάραξη αυτών θα οδηγήσει σε αλλαγές στην παρουσία ή απουσία, στον

αριθμό, στην μορφολογία, συμπεριφορά ή φυσιολογία των οργανισμών αυτών (Mandaville, 2002).

Τα βενθικά μακροασπόνδυλα που χρησιμοποιούνται εκτενώς σε μελέτες αξιολόγησης της ποιότητας των υδάτων των ποταμών περιλαμβάνουν τρία φύλα, τα οποία αποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στα διάφορα επίπεδα μόλυνσης (Tamro, et al, 2021) (Εικ.9):

- 1) *Δακτυλιοσκώληκες (Annelida)*. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανθεκτικότητα στους ρύπους και η παρουσία μόνο αυτών σε έναν βίοτοπο υποδηλώνει σημαντική υποβάθμισή του (Κάντζαρης, 2003). Η υφομοταξία των *Oligochaeta*, αποτελεί την πιο ποικίλη ομάδα οργανισμών των *Δακτυλιοσκώληκων* και χρησιμοποιείται εκτενώς για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων (Verdonschot, 2015). Οι οργανισμοί της διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τροφική αλυσίδα, αποικούν πολλά ενδιαίτηματα και ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους μέσα στο νερό, με αποτέλεσμα να εκτίθενται μόνο σε ρυπαντές που καταλήγουν σε αυτό (Rodríguez & Reynoldson, 2011).
- 2) *Αρθρόποδα (Arthropoda)*. Εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα οικοσυστήματα των γλυκών νερών και εκτός κάποιων εξαιρέσεων, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη ρύπανση, λόγοι που τα καθιστούν τους καλύτερους βιοδείκτες. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν την ομοταξία των Εντόμων (*Insecta*), που αποτελεί την πιο ποικίλη ομάδα των βενθικών μακροασπόνδυλων των γλυκών νερών, συνολικά και καταλαμβάνει το 80% των υδρόβιων *Αρθροπόδων*. Τα έντομα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της τροφικής αλυσίδας, ως πηγή τροφής πολλών θηρευτών (πουλιά, ψάρια, άλλα μακροασπόνδυλα) και περνούν ένα ή περισσότερα στάδια της ζωής τους στο νερό. Γενικότερα, παρουσιάζουν μικρή αντοχή στην ρύπανση, φυσικά με κάποιες εξαιρέσεις, όπως είναι η οικογένεια *Baetidae* της τάξης των *Ephemeroptera*, που φέρει μεγάλη ανεκτικότητα έναντι υψηλών συγκεντρώσεων οργανικών υποστρωμάτων. Ιδιαίτερα ευαίσθητα είναι τα έντομα των τάξεων των *Ephemeroptera*, *Plecoptera*, *Trichoptera* και *Odonata*, τα οποία σχηματίζουν την ομάδα ΕΡΤΟ που χρησιμοποιείται εκτενώς σε μελέτες βιοπαρακολούθησης (Κάντζαρης, 2003; Patra, et al, 2022). Εξίσου σημαντική στην αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων μέσω χρήσης των βενθικών μακροασπόνδυλων, καθίσταται η τάξη των *Diptera* και ειδικότερα η οικογένεια *Chironomidae*, η οποία φέρει είδη με υψηλή ανθεκτικότητα στους ρύπους (Bredenhand & Samways, 2008).

3) *Μαλάκια (Mollusca)*. Φέρουν κέλυφος που τους προσδίδει την ιδιότητα να διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τον θάνατό τους. Αυτό επιτρέπει την βιοπαρακολούθηση ακόμα και για ένα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (δεκάδες χρόνια) (Pruden, et al, 2021). Είναι ευαίσθητα στο περιβαλλοντικό στρες, ενώ συγκεκριμένα οι οργανισμοί της ομοταξίας των *Bivalvia*, εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας ζωής τους και του ρυθμού ανάπτυξης και αναπαραγωγής που επηρεάζεται από αλλαγές στο περιβάλλον, θεωρούνται πολύ καλοί βιοδείκτες ρύπανσης των υδάτων, ενώ εμφανίζουν ανθεκτικότητα στους διαφόρους ρύπους (Κάντζαρης, 2003).



Εικόνα 9: Παραδείγματα βενθικών μακροασπόνδυλων από τα διάφορα φύλα. Α) Annelida; Oligochaeta, Β) Arthropods; Amphipods, Γ) Arthropods; Plecoptera, Δ) Mollusca; Bivalvia (<https://stroudcenter.org/>).

Υπάρχουν σημαντικοί λόγοι για τους οποίους οι οργανισμοί αυτοί επιλέγονται στις μεθόδους βιολογικών εκτιμήσεων, καθώς συγκεντρώνουν πληθώρα πλεονεκτημάτων:

- Διαβιούν στον βυθό των υδάτινων οικοσυστημάτων, όπου διατηρούνται ακίνητα ή παρουσιάζουν μικρή κινητικότητα. Επομένως, δεν μπορούν να διαφύγουν της ρύπανσης, είναι αντιπροσωπευτικοί δείκτες των τοπικών συνθηκών και επιτρέπουν τον προσδιορισμό της έκτασης του χώρου που έχει επηρεαστεί από την ρύπανση (Mandaville, 2002; Κάντζαρης, 2003).
- Παρουσιάζουν ευρεία κατανομή, καταλαμβάνοντας πολλούς βιότοπους, γεγονός που επιτρέπει την διεξαγωγή συγκριτικών μελετών σε τοπικό, εθνικό και διεθνές επίπεδο (Mandaville, 2002; Johnson, et al, 1993).
- Εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς, καθιστώντας ευκολότερη την δειγματοληψία και μελέτη κατανομής τους (Johnson, et al, 1993).
- Απαιτούν για την ανάπτυξή τους πολύ συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Επομένως, οποιαδήποτε αλλαγή αυτών επηρεάζουν άμεσα τις βιοκοινότητες των βενθικών μακροασπόνδυλων (Johnson, et al, 1993).
- Ζουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, οπότε προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την οικολογική κατάσταση των υδάτων για ένα εύρος χρόνου (Mandaville, 2002).
- Αποτελούνται από πολλά είδη, με διαφορετική ευαισθησία στους ρύπους και τα επίπεδα μόλυνσης. Όλα, ωστόσο, χαρακτηρίζονται από άμεση απόκριση στους ρυπαντές (Κάντζαρης, 2003).
- Η διαδικασία δειγματοληψίας τους δεν φέρει επιπτώσεις στο οικοσύστημα, είναι εύκολη και οικονομική, όπως και η αναγνώριση και ταξινόμησή τους. Επιπλέον, ο χειρισμός των δειγμάτων στο εργαστήριο μπορεί να γίνει από επιστήμονες και μη (Κάντζαρης, 2003).

Παρ' όλα αυτά η χρήση των βενθικών μακροασπόνδυλων στις βιολογικές μεθόδους εγκυμονεί αρκετές δυσκολίες, κάποιες από τις οποίες μπορούν να ξεπεραστούν με σωστό πειραματικό σχεδιασμό (Mandaville, 2002):

- Πληθώρα βιοτικών (π.χ. ανταγωνισμός) και αβιοτικών (π.χ. ευτροφισμός) παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν τον αριθμό και την κατανομή τους σε ένα οικοσύστημα. Αυτό δυσχεραίνει την μελέτη του τρόπου επίδρασης ενός μόνο παράγοντα στην βιοποικιλότητά τους, με απόρροια κάθε φορά να πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη πολλοί παράμετροι.
- Είναι δύσκολη η ταξινόμηση κάποιων ομάδων των βενθικών μακροασπόνδυλων.
- Παρουσιάζουν ανομοιόμορφη κατανομή, γεγονός που δυσχεραίνει την ποσοτική δειγματοληψία και την κατ' επέκταση μελέτη της αφθονίας των πληθυσμών τους. Η

συλλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων είναι μια δυνατή λύση, ωστόσο, αυξάνεται σημαντικά το κόστος και ο απαιτούμενος χρόνος για την επεξεργασία τους. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει στρατολόγηση των λεγόμενων Rapid Bioassessment Protocols (RBP), όπου επιτυγχάνεται ημι-ποσοτική δειγματοληψία με την μέθοδο kick-and-sweep.

- Οι βενθικές βιοκοινότητες είναι μη-ισορροπημένα συστήματα, των οποίων η δομή μεταβάλλεται μεταξύ των εποχών. Αυτό γιατί πολλά είδη, κατά βάση έντομα, φέρουν εποχικό κύκλο ζωής, ενώ ακόμα επηρεάζονται από την εποχική μεταβολή συνθηκών, όπως η διαθεσιμότητα των θρεπτικών, οι καιρικές συνθήκες, κτλπ. Κατά συνέπεια, αυτό δυσκολεύει την μελέτη του τρόπου επίδρασης των ανθρωπογενών πιέσεων στην βιοποικιλότητα. Έτσι, μια μόνο έρευνα δεν είναι αρκετή για τον πλήρη χαρακτηρισμό ενός οικοσυστήματος και γι' αυτό απαιτείται η διεξαγωγή πολλών μελετών σε ένα εύρος χρόνου.

1.3.3 Επιδρώντες παράγοντες στην βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων

Πληθώρα παραγόντων, όπως οι ανθρωπογενείς πιέσεις και η αλλαγή των εποχών, επιδρούν στην αφθονία, βιοποικιλότητα και δομή των κοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων.

Οι έντονες βροχοπτώσεις, καθώς και δραστηριότητες όπως η γεωργία και η απόρριψη οικιακών αποβλήτων, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τα επίπεδα διαφόρων θρεπτικών συστατικών (φώσφορος, άζωτο) και οργανικών ουσιών στους ποταμούς. Η επίδραση στην βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων εξαρτάται από την φυσική κατάσταση του εκάστοτε υδάτινου οικοσυστήματος, εάν δηλαδή αυτό χαρακτηρίζεται ως ολιγοτροφικό ή ευτροφικό. Στην πρώτη περίπτωση, μια επιπλέον αύξηση στις συγκεντρώσεις των θρεπτικών θα οδηγήσει σε αύξηση της βιοποικιλότητας, λόγω αύξησης της βιομάζας και ποικιλότητας της άλγης, που αποτελεί τροφή για κάποιους οργανισμούς. Αντίθετα, στην δεύτερη περίπτωση το σύστημα θα μετατραπεί σε υπερτροφικό, κάτι που θα οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων του διαλυμένου οξυγόνου και του φωτός που φτάνουν στα βαθύτερα στρώματα νερού (Heino, et al, 2009; Johnson, et al, 1993). Αυτό θα φέρει ως αποτέλεσμα την μείωση της βιοποικιλότητας ή και την εξαφάνιση των πιο ευαίσθητων taxa, όπως είναι για παράδειγμα τα έντομα των τάξεων των EPTO και την επικράτηση άλλων, όπως η οικογένεια *Chironomidae* και η υφομοταξία των *Oligochaeta*. Τα τελευταία συσχετίζονται

αρνητικά με την αύξηση των συγκεντρώσεων του οξυγόνου στα ύδατα και θετικά με την αύξηση των επιπέδων διάφορων ουσιών, όπως του αζώτου (Tampro, et al, 2021).

Η κατασκευή φραγμάτων και αναβαθμίδων στους ποταμούς μεταβάλλει την φυσιολογία τους, με διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες να επικρατούν μεταξύ των ανάντη και κατάντη περιοχών τους. Η παρουσία τέτοιων εμποδίων επηρεάζει σημαντικά την βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων, με πολλές μελέτες να εντοπίζουν σημαντικές αλλαγές στον αριθμό και ποικιλία των ειδών, κυρίως, στις περιοχές αμέσως μετά τα εμπόδια, συγκριτικά με τις ανάντη ή τις μακρύτερα κατάντη περιοχές, όπου οι φυσιολογικές συνθήκες φαίνεται να επανέρχονται (Ko, et al, 2020). Για παράδειγμα, στις κατάντη περιοχές τα ύδατα χαρακτηρίζονται από αυξημένη θερμοκρασία, χαμηλή ροή και ιδιαίτερα μειωμένα επίπεδα οξυγόνου, γεγονός που φαίνεται να οδηγεί σε ελάττωση της αφθονίας των εντόμων των τάξεων των ΕΡΤΟ. Τις οικοθέσεις αυτές, πλέον, καταλαμβάνουν πιο ανθεκτικές ταξινομικές ομάδες, όπως η τάξη των *Diptera* (Bredenhand & Samways, 2008; Tampro, et al, 2021).

Ένας τρίτος επιδρών παράγοντας είναι η αύξηση της αλατότητας των υδάτων των ποταμών, μέσω αύξησης των επιπέδων διαφόρων ιόντων (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-). Το φαινόμενο παρατηρείται στα εκβολικά οικοσυστήματα, αλλά μπορεί να είναι και αποτέλεσμα ανθρώπινων δράσεων, όπως η εξόρυξη μετάλλων και οι επιπτώσεις του στην βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές. Ένας καλός δείκτης των επιπέδων αλατότητας των υδάτων είναι τα αρθρόποδα της τάξης των *Decapoda*, η βιοποικιλότητα των οποίων αυξάνεται αναλόγως (Tampro, et al, 2021). Ωστόσο, το φαινόμενο μπορεί να φέρει και αρνητικές συνέπειες, οι οποίες θα είναι είτε έμμεσες, με αλλαγές στην αναπαραγωγική ικανότητα των οργανισμών, είτε άμεσες, με εξαφάνιση ορισμένων taxa. Μελέτες και εργαστηριακά πειράματα έχουν αποδείξει πως τα έντομα και ειδικότερα τα *Ephemeroptera* είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αύξηση της αλατότητας (Timpano, et al, 2018). Η απώλεια των taxa αυτών απελευθερώνει οικοθέσεις, που ευνοούν την εισβολή και εγκαθίδρυση ανθεκτικών ταξινομικών ομάδων ('niche opportunity'), όπως είναι τα *Μαλάκια* και τα *Καρκινοειδή (Crustacea)* (Piscart, et al, 2005). Το φαινόμενο αυτό μεταβάλλει σημαντικά την ισορροπία του οικοσυστήματος.

Η μεταβολή της πληθυσμιακής δομής των κοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων συνδέεται με την εποχικότητα του κύκλου ζωής διαφόρων ταξινομικών ομάδων. Υπάρχει, λοιπόν, η υπόθεση πως η παραπάνω σχέση έχει εξελιχθεί ως απόκριση στους φυσικοχημικούς παράγοντες που επικρατούν στους ποταμούς (επίπεδα φωτός,

θερμοκρασία νερού, διαθεσιμότητα τροφής, υδρολογικό καθεστώς), οι οποίοι επίσης εμφανίζουν εποχικότητα. Έρευνες δείχνουν ότι η άνοιξη χαρακτηρίζεται από την μεγαλύτερη βιοποικιλότητα, κυρίως όσον αφορά την ομάδα των εντόμων, με χαρακτηριστικό το παράδειγμα των *Ephemeroptera* (Chi, et al, 2017).

Επιπλέον παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων είναι η κλιματική αλλαγή, το pH και η σκίαση των υδάτων. Αρχικά, η κλιματική αλλαγή μέσω αύξησης της θερμοκρασίας των υδάτων, μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνιση μη-ανθεκτικών ειδών και στην επικράτηση άλλων ταξινομικών ομάδων (Heino, et al, 2009). Ο παράγοντας αυτός σε συνδυασμό με τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου, τις συγκεντρώσεις και αναλογίες διαφόρων ανιόντων και κατιόντων, κ.α. στα ύδατα, μπορούν να μεταβάλλουν το pH. Γενικότερα, το επιθυμητό εύρος τιμών pH είναι 6,5-9 και οποιαδήποτε αλλαγή του μπορεί να φέρει επιπτώσεις στις φυσιολογικές λειτουργίες των βενθικών μακροασπόνδυλων, όπως η ανταλλαγή αερίων και ιόντων με το περιβάλλον τους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης ή ακόμα και στον θάνατο τους, με χαρακτηριστικό το παράδειγμα των *Ephemeroptera* και *Plecoptera*, για τα οποία έρευνες υποδεικνύουν ότι δεν επιβιώνουν σε όξινα περιβάλλοντα (pH<6) (Robertson-Bryan, Inc., 2004; Bredenhand & Samways, 2008). Σημαντικό ρόλο στην βιοποικιλότητα διαδραματίζει, επίσης, η σκίαση των υδάτων. Τα επίπεδα φωτός που καταφθάνουν στην επιφάνεια αυτών, είναι ιδιαίτερα αυξημένα κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και όταν το ποσοστό παρόχθιας βλάστησης είναι μειωμένο (για παράδειγμα στις κατάντη περιοχές ενός φράγματος). Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η ποικιλότητα και βιομάζα της άλγης, λόγω φωτοσύνθεσης, η αποτελεί τροφή για κάποια taxa των βενθικών μακροασπόνδυλων (*Chironomidae*, *Ephemeroptera*, *Amphipods*), οδηγώντας τελικά στην αύξηση της βιοποικιλότητας τους στις περιοχές αυτές ή ακόμη και στην μείωση τους εξαιτίας του φαινομένου του ευτροφισμού (Kelly, et al, 2012).

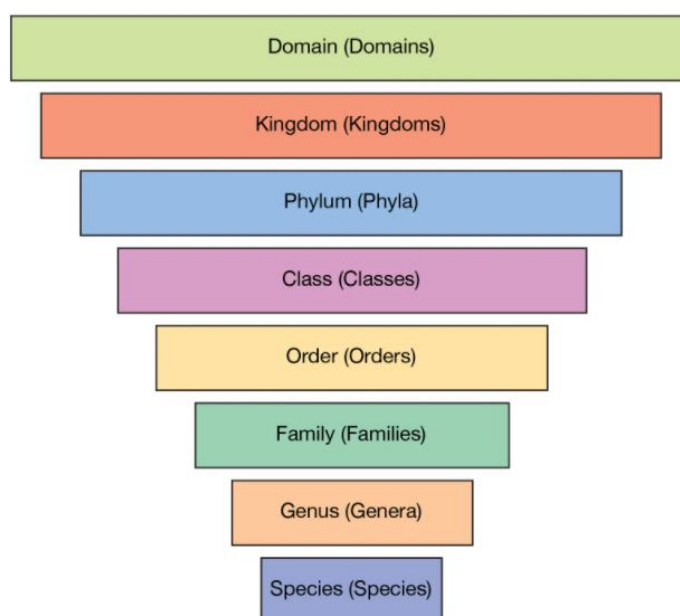
1.4 Κλασική ταξινομική & Σύγχρονες μοριακές μέθοδοι

Η οικολογική εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων προϋποθέτει την ταξινόμηση των βενθικών μακροασπόνδυλων, που απαντώνται σε κάθε σημείο δειγματοληψίας και κατά συνέπεια την μελέτη της σύστασης των διαφορετικών πληθυσμών.

Στο συνέδριο των Ηνωμένων Εθνών, Conference on Biological Diversity 2016, ως ταξινόμηση ορίστηκε: “Η επιστήμη ονομασίας, περιγραφής και κατηγοριοποίησης των οργανισμών και

περιλαμβάνει όλα τα φυτά, τα ζώα και τους μικροοργανισμούς του κόσμου” (Κοτον & Γολοιοβονα, 2016). Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μέσω της κλασικής όσο και της μοριακής ταξινομικής, η οποία περιλαμβάνει μεθόδους αλληλούχησης. Οι σύγχρονες και πιο εξελιγμένες αυτές μέθοδοι, προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών τεχνολογιών, ενώ μπορούν να δράσουν συμπληρωματικά της κλασικής ταξινομικής, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματά της (Martinez-Goss & Arguelles, 2020).

Την ιεραρχική ταξινόμηση των οργανισμών σε ομάδες εισηγήθηκε για πρώτη φορά ο Σουηδός ιατρός και φυσιολόγος Κάρολος Λινναίος (Carl von Linné). Οι οργανισμοί κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με τις κοινές μορφολογικές και γενετικές ιδιότητες που φέρουν (Εικ.10).



Εικόνα 10: Σύστημα ταξινόμησης Λινναίου. Οι οργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε ομάδες, ξεκινώντας από το γενικό, την επικράτεια και καταλήγοντας στο ειδικό, το είδος (Britannica, 1998).

1.4.1 Κλασική ταξινομική

Η κλασική ή ορθόδοξη ή παραδοσιακή ταξινομική εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Κάρολο Λινναίο, το 1758. Έκτοτε, αποτελεί την βασική μέθοδο στην κατηγοριοποίηση, αναγνώριση και ονομασία των οργανισμών, κυρίως διότι είναι σχετικά εύκολη και απλή στην εφαρμογή της, καθώς και οικονομική. Η ταξινόμηση περιλαμβάνει την σύγκριση του προς μελέτη οργανισμού με ήδη υπάρχοντες μιας ομάδας, ως προς τα μορφολογικά και

ανατομικά τους χαρακτηριστικά, αναζητώντας ομοιότητες και διαφορές. Όσα περισσότερα κοινά φέρουν μεταξύ τους, τόσο πιο πιθανό ο οργανισμός να ανήκει στην ομάδα αυτή και άρα τόσο μεγαλύτερη συγγένεια να φέρουν μέσα στον εξελικτικό χρόνο (Martinez-Goss & Arguelles, 2020). Ωστόσο, η κατάταξη των οργανισμών βάσει των χαρακτηριστικών τους εμφανίζει σημαντικές προκλήσεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένη ταξινόμησή τους, όπως (Anderson, 2009; Pires & Marinoni, 2010):

- Αρκετοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση εμφανίζουν φαινοτυπική πλαστικότητα.
- Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους, όπως στην περίπτωση του φυλετικού διμορφισμού.
- Σε κάποια είδη, οι μορφολογικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση τους εμφανίζονται μόνο στα ενήλικα στάδια. Συνεπώς, η διάκριση τους σε πιο ανώριμες μορφές καθίσταται δύσκολη.
- Τα κρυπτικά είδη εμφανίζουν πανομοιότυπα μορφολογικά χαρακτηριστικά.
- Αρκετές φορές μπορεί να μην διατίθενται ολόκληρος ο οργανισμός για την ταξινόμηση του, παρά μόνο ένα τμήμα αυτού, το οποίο μπορεί κάλλιστα να μην φέρει αρκετά μορφολογικά χαρακτηριστικά.
- Η κλασική ταξινόμηση απαιτεί κατάλληλους ειδικούς και δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

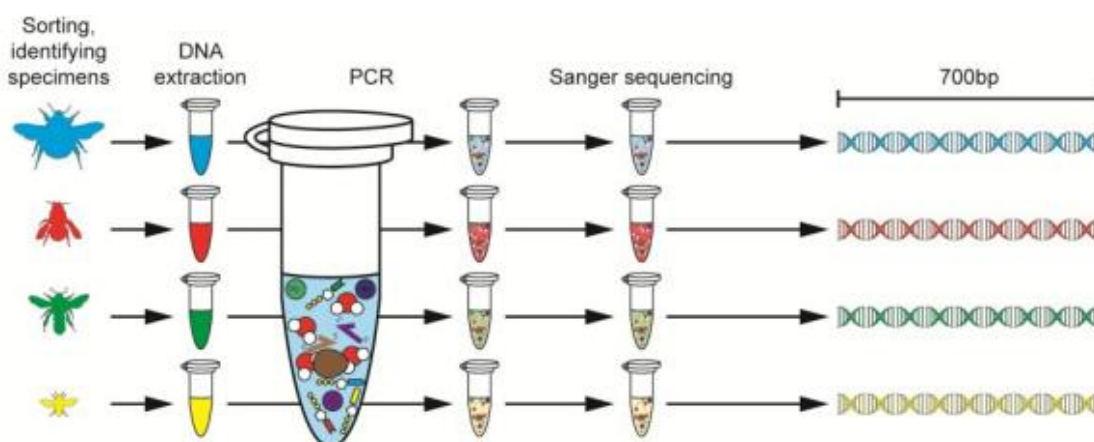
1.4.2 Μοριακή ταξινομική

Για περίπου 3 αιώνες, τα δεδομένα για την βιοποικιλότητα προέρχονται από την κλασική ταξινομική. Ωστόσο, η μοριακή βιολογία οδήγησε στην ιδέα ταυτοποίησης των οργανισμών μέσω της χρήσης μοριακών δεικτών, δηλαδή μικρών τμημάτων DNA, τα λεγόμενα barcodes. Αυτό αποτέλεσε την απαρχή της μοριακής ταξινομικής, την οποία εισηγήθηκε ο μοριακός βιολόγος Paul Hebert, το 2003 (Hebert, et al, 2003). Ως barcodes, επιλέγονται αλληλουχίες DNA οι οποίες φέρουν κάποια χαρακτηριστικά, όπως να υπακούν σε καλά μελετημένα μοτίβα μοριακής εξέλιξης, να φέρουν καλή ταξινομική ανάλυση επιτρέποντας την κατάταξη των οργανισμών σε επίπεδο είδους, κ.ο.κ. (Cristescu, 2014). Μελέτες έχουν δείξει πως τα barcodes που χρησιμοποιούνται διαφέρουν ανάλογα με το βιολογικό ερώτημα και τα είδη των οργανισμών. Έτσι, για τα ζωικά είδη προτείνεται ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (*COI*), για τα φυτά 2 περιοχές του πλαστιδιακού DNA, οι *matK* (maturaseK) και *rbcl* (Ribulose-1,5-

Bisphosphate Carboxylase), ενώ για τους μύκητες η περιοχή *ITS* (Internal Transcribed Spacer) του ριβοσωμικού DNA (Pires & Marinoni, 2010).

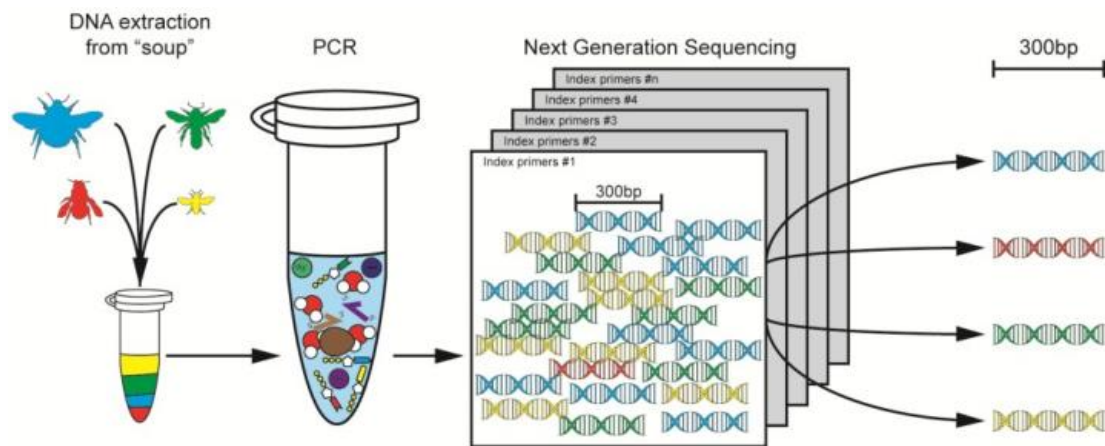
Η μοριακή ταξινομική μπορεί να αυξήσει την ταχύτητα, την ακρίβεια και το επίπεδο της ταξινομικής ανάλυσης κατά την ταυτοποίηση των οργανισμών, συγκριτικά με την κλασική ταξινομική. Επιπλέον, δεδομένου ότι στηρίζεται στην χρήση DNA, η ταξινόμηση μπορεί να επιτευχθεί σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και από πολύ μικρές ποσότητες DNA του, ενώ είναι δυνατή η διάκριση ακόμη και μεταξύ στενά συγγενικών και κρυπτικών ειδών (Anderson, 2009). Ακόμη, δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για την επεξεργασία των δειγμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ταξινόμησης (Fernández, et al, 2019). Περιλαμβάνει την μέθοδο του DNA barcoding και του DNA metabarcoding, με το είδος της μελέτης και των ερωτημάτων που πρέπει να απαντηθούν να καθορίζουν ποια μεθοδολογία θα χρησιμοποιηθεί (Corell & Rodríguez-Ezpeleta, 2014).

Το DNA barcoding χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με την κλασική ταξινομική. Στην μέθοδο αυτή η επεξεργασία του κάθε οργανισμού γίνεται ξεχωριστά από όλους τους υπόλοιπους και τα βασικά βήματα που ακολουθούνται, περιλαμβάνουν (Εικ.11), (α) την απομάκρυνση του οργανισμού από το περιβάλλον του και την αρχική ταξινόμηση του από εξειδικευμένους επιστήμονες, (β) την απομόνωση DNA από όλο τον οργανισμό ή τμήμα αυτού, (γ) την ενίσχυση τμήματος DNA (barcode) με PCR, (δ) την αλληλούχηση του ενισχυμένου προϊόντος, (ε) την σύγκριση της αλληλουχίας ως προς μια βάση δεδομένων και (στ) την ταξινόμηση του οργανισμού (Gill, et al, 2016). Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR γίνεται κατά βάση με την μέθοδο κατά Sanger. Η ιδέα αυτή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Βρετανό βιοχημικό Frederick Sanger, το 1977 και εφαρμόζεται ευρέως μέχρι και σήμερα, κυρίως σε μελέτες μικρής κλίμακας (Antal, P., et al, 2014).



Εικόνα 11: Διαδικασία DNA barcoding (Gill, 2016).

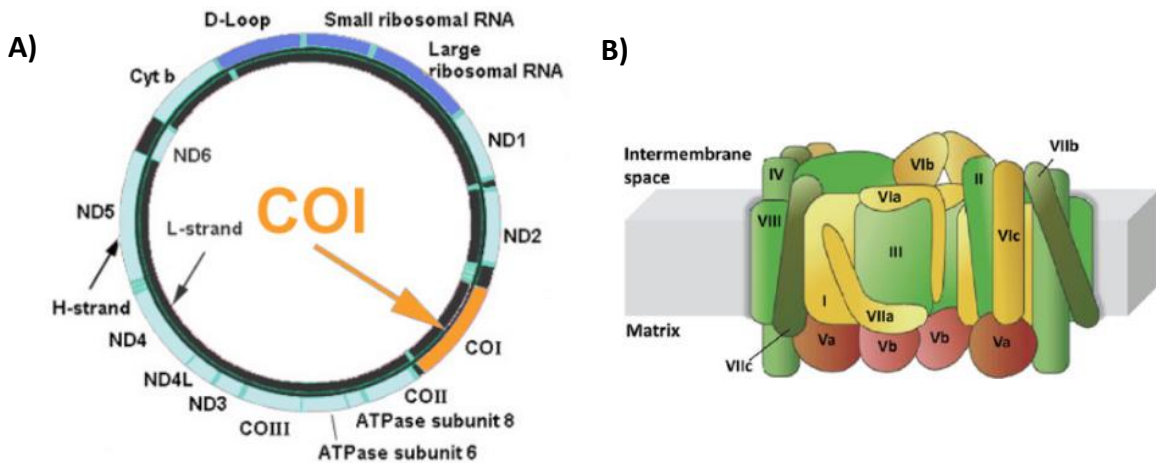
Από την άλλη πλευρά, η μεθοδολογία του DNA metabarcoding βρίσκει τεράστια εφαρμογή στην επεξεργασία περιβαλλοντικών δειγμάτων (ίζημα, νερό, αέρας), στα οποία οι οργανισμοί έχουν αποβάλλει ή απελευθερώσει το DNA τους (περιβαλλοντικό DNA, environmental DNA, eDNA), (Corell & Rodríguez-Ezpeleta, 2014). Κύριες πηγές του eDNA θεωρούνται τα περιττώματα, τα ούρα και άλλα σωματικά υγρά (εξωκυτταρικό DNA), καθώς και τα επιδερμικά κύτταρα (Bista, et al, 2017). Είναι μια μη-παρεμβατική μέθοδος, δεδομένου ότι τόσο η κλασική ταξινομική όσο και το DNA barcoding προϋποθέτουν την απομάκρυνση του οργανισμού από το περιβάλλον του και την θανάτωσή του για την περαιτέρω μελέτη του (Fernández, et al, 2019). Επιπλέον, πρόκειται για μια μέθοδο λιγότερο κοστοβόρα και χρονοβόρα από το DNA barcoding, καθώς δεν απαιτεί εκτενή δειγματοληψία μεμονωμένων οργανισμών και επεξεργασία καθέναν από αυτούς ξεχωριστά. Δεδομένης, λοιπόν, της ευκολίας που προσφέρει, χρησιμοποιείται ευρύτατα σε πεδία όπως είναι η μελέτη και διατήρηση της βιοποικιλότητας, η διαχείριση του περιβάλλοντος, κ.ο.κ. (Cristescu, 2014). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μοριακής ταξινόμησης πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά, καθώς εξαιτίας της ροής των υδάτων του ποταμού, eDNA μπορεί να μεταφερθεί από ανάντη περιοχές του σημείου δειγματοληψίας (Fernández, et al, 2019). Τα βήματα που ακολουθούνται, περιλαμβάνουν (Εικ.12), (α) την απομόνωση DNA από το περιβαλλοντικό δείγμα (μπορεί να απαιτείται ομογενοποίηση του), (β) την ενίσχυση τμήματος DNA (barcode) με PCR (μέγεθος προϊόντος < 400bp, καταλληλότερο για αποδομημένο DNA), (γ) την αλληλούχηση των ενισχυμένων προϊόντων, (δ) την σύγκριση των αλληλουχιών ως προς μια βάση δεδομένων και (ε) την αναγνώριση και ταξινόμηση των οργανισμών. Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR επιτυγχάνεται μέσω τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing, NGS), που επιτρέπουν την μαζική και παράλληλη αλληλούχηση σύνθετων δειγμάτων, που φέρουν τμήματα DNA από διαφορετικούς οργανισμούς (Gill, et al, 2016). Μια από αυτές είναι η Illumina, η αρχή της οποίας στηρίζεται στην αλληλούχιση-μέσω-σύνθεσης (Sequencing-By-Synthesis, SBS). Προϋπόθεση αποτελεί η δημιουργία κλώνων των τμημάτων DNA που έχουν ενισχυθεί μέσω PCR και η επακόλουθη αλληλούχησης τους μέσω χρήσης ειδικών νουκλεοτιδίων (Goodwin, et al, 2016).



Εικόνα 12: Διαδικασία DNA metabarcoding (Gill, 2016).

1.5 Το γονίδιο *COI* ως μοριακός δείκτης

Στις μεθοδολογίες DNA barcoding και metabarcoding ως δείκτες επιλέγονται, κυρίως, τα μιτοχονδριακά γονίδια έναντι των πυρηνικών. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι τα πρώτα εμφανίζουν μεγαλύτερους εξελικτικούς ρυθμούς, επιτρέποντας την καλύτερη ταξινομική διάκριση, ακόμη και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την λειτουργική υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (cytochrome c oxidase subunit I, *COI*) αποτελεί έναν τέτοιο σημαντικό μοριακό δείκτη για την ταξινόμηση των οργανισμών. Βρίσκεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και παρ' όλο που φέρει συνολικό μήκος 658bp, στην αλληλούχηση χρησιμοποιούνται μικρότερα τμήματα του. Γι' αυτό καλείται και ως mini-barcode (Εικ.13A) (Strüder-Kyrke & Lynn, 2010). Η υπομονάδα I μαζί με την υπομονάδα II απαρτίζουν τον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase, *COX*) (Εικ.13B) (Cooper, et al, 1991). Αυτή είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων, συμμετέχοντας στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και άρα στην παραγωγή ενέργειας, απαραίτητη για τον αερόβιο μεταβολισμό των ευκαρυωτών (Pentinsaari, et al, 2016).



Εικόνα 13: Α) Θέσεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες I, II και III της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI, COII, COIII) στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Trivedi, et al, 2016), Β) Δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης c και οι επιμέρους υπομονάδες της (Beck, et al, 2015).

Η ιδέα για την χρήση του γονιδίου *COI* ως μοριακού δείκτη εισήχθη για πρώτη φορά το 2003 από τον Paul Hebert και τους συνεργάτες του, ενώ έπειτα καθιερώθηκε από το Consortium for the Barcode of Life (CBOL) (Strüder-Kyrke & Lynn, 2010). Η επιλογή του γονιδίου *COI* στηρίζεται στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που προσφέρει:

- Υπάρχουν εκτεταμένες βάσεις δεδομένων με εκατομμύρια αλληλουχίες DNA, που επιτρέπουν την διάκριση πολλών taxa (Deagle, et al, 2014).
- Εκφράζεται σε σχεδόν όλους τους ευκαρυώτες, λόγω του κεντρικού ρόλου που φέρει στον μεταβολισμό (Strüder-Kyrke & Lynn, 2010). Συνεπώς, η εξελικτική πίεση το καθιστά αρκετά συντηρημένο. Ως αποτέλεσμα, σπάνια παρατηρούνται εισαγωγές ή διαγραφές νουκλεοτιδίων, που θα μπορούσαν να αλλάξουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και κατά συνέπεια να μειώσουν ή να απαλείψουν την λειτουργικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις είναι συχνές (κυρίως στην τρίτη βάση ενός κωδικονίου), χωρίς όμως να επιδρούν επιβλαβώς στην δραστικότητα ή δομή της πρωτεΐνης. Εξαιτίας αυτού, το γονίδιο *COI* εμφανίζει τόσο δια-ειδική ποικιλότητα επιτρέποντας την διάκριση μεταξύ κρυπτικών, στενά και μη συγγενικών ειδών, όσο και ενδο-ειδική ποικιλομορφία, αποκαλύπτοντας φυλογεωγραφικές δομές εντός των ειδών. Το ενδιαφέρον που παρουσιάζει ως δείκτης είναι ότι υπόκεινται σε συνεχή επιλογή, με

τον ρυθμό εξέλιξης του να διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών taxa (Pentinsaari, et al, 2016; Pires & Marinoni, 2010).

- Το γονίδιο *COI* μπορεί εύκολα να ενισχυθεί μέσω PCR με την χρήση παγκόσμιων εκκινητών, που επιτρέπουν την ανίχνευση πολλών Φύλων (Deagle, et al, 2014). Δεδομένου, όμως, ότι υπόκεινται σε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών δεν είναι συντηρημένες. Επιπλέον, η χρήση παγκόσμιων εκκινητών σε μεθοδολογίες eDNA metabarcoding, συνεπάγεται την ενίσχυση τμημάτων του *COI* από οργανισμούς στόχους και μη (βακτήρια, μύκητες, φυτοπλαγκτόν κλπ.), ακόμα και εάν οι εκκινητές δεν υβριδίζουν καλά με την αλληλουχία DNA. Έτσι, προτείνεται κάθε φορά πως ανάλογα την ταξινομική ομάδα που μελετάται και πρέπει να ανιχνευθεί, να σχεδιάζονται και να συνδυάζονται διαφορετικοί εκκινητές (Leese, et al, 2020).

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η στρατολόγηση της κλασικής και μοριακής ταξινομικής για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό των βιοκοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων του Πηνειού. Τα δεδομένα από την βιοπληροφορική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθοδολογιών της φαινοτυπικής αναγνώρισης και του eDNA metabarcoding, ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ταξινόμηση των οργανισμών. Επιπλέον, μελετήθηκε ο τρόπος επίδρασης της εποχικότητας, της χωροταξικής προέλευσης των δειγμάτων και της ποιότητας των υδάτων στην βιοποικιλότητα και σύσταση των κοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων. Για την επίτευξη αυτού, υπολογίστηκαν οι δείκτες βιοποικιλότητας α -diversity και β -diversity.

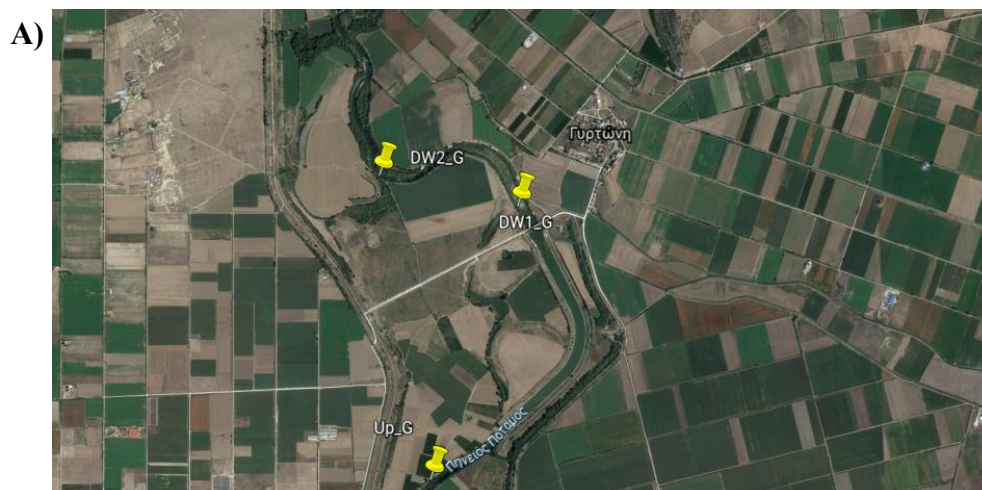
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα & Διαδικασία δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία για την μελέτη της χειμερινής βιοκοινότητας των βενθικών μακροασπόνδυλων, έλαβε χώρα στις 4 Οκτωβρίου 2021 από την ομάδα του Εργαστηρίου Υδρολογίας & Υδραυλικών Έργων του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Τα δείγματα ιζήματος συλλέχθηκαν από περιοχές εκατέρωθεν ενός τεχνητού φράγματος στην Γυρτώνη και μιας αναβαθμίδας στο Ομόλιο και χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την κλασική όσο και την μοριακή ταξινόμηση. Συγκεκριμένα, έγινε συλλογή ενός δείγματος από το ανάντη τμήμα κάθε εμπόδιου και δύο από το κατάντη, σε σημεία κοντά στο εμπόδιο και μακρύτερα από αυτό (Πιν.1). Το σημείο δειγματοληψίας OK2 βρίσκεται κοντά στις εκβολές του Πηνειού στην θάλασσα (Εικ.14).

Πίνακας 1: Περιοχές δειγματοληψίας. Τα σημεία μετά το εμπόδιο και κοντά σε αυτό υποδηλώνονται με τον αριθμό 1, ενώ μακρύτερα από αυτό με τον αριθμό 2.

Γυρτώνη Ανάντη (ΓΑ)	Ομόλιο Ανάντη (ΟΑ)
Γυρτώνη Κατάντη 1 (ΓΚ1)	Ομόλιο Κατάντη 1 (ΟΚ1)
Γυρτώνη Κατάντη 2 (ΓΚ2)	Ομόλιο Κατάντη 2 (ΟΚ2)





Εικόνα 14: A) Σημεία δειγματοληψίας στην Γυρτώνη. Ur_G: Γυρτώνη Ανάντη, DW1_G: Γυρτώνη Κατάντη 1, DW2_G: Γυρτώνη Κατάντη 2, B) Σημεία δειγματοληψίας στο Ομόλιο. Ur_E: Ομόλιο Ανάντη, DW1_E: Ομόλιο Κατάντη 1, DW2_E: Ομόλιο Κατάντη 2.

Η δειγματοληψία έγινε με την ποιοτική (παρουσία-απουσία και ποικιλότητα ειδών) και ημι-ποσοτική μέθοδο (σχετική αφθονία ειδών) του λακτίσματος-σάρωσης (kick-and-sweep), με χρήση απόχης σε σχήμα D. Αυτή αποτελούνταν από δίχτυ με άνοιγμα ματιού 0,09cm, επιφάνεια ανοίγματος 591,7cm², βάθος 28,7cm και κοντάρι ύψους 1,50m. Η διαδικασία περιλάμβανε την κάθετη τοποθέτηση της απόχης στον πυθμένα του ποταμού, αντίθετα της ροής των υδάτων του και την ανατάραξη του υποστρώματος με κατάλληλες κινήσεις. Αυτό είχε ως συνέπεια την μεταφορά και παγίδευση υλικού στο δίχτυ. Η συλλογή δειγμάτων έγινε σε βάθος ποταμού μικρότερου του 1m και από διαφορετικά σημεία του, προκειμένου να καλυφθούν όλοι οι τύποι ενδιαιτημάτων (Wright, et al, 2000). Η δειγματοληψία περιλάμβανε 1,30min λακτίσματος-σάρωσης των διαφόρων ενδιαιτημάτων (κύριο κανάλι, ρηχί ύφαλοι, κ.ο.κ..) και 30sec της παρόχθιας βλάστησης, όπου υπήρχε. Τα δείγματα, στην συνέχεια, αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά, αποστειρωμένα δοχεία, στα οποία αναγράφτηκαν τα στοιχεία τους και έγινε προσθήκη 70-75% διαλύματος αιθανόλης, για την διατήρησή τους. Τελικά, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την ανάλυσή τους.

Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας έγινε προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υδάτων, μέσω στρατολόγησης των κατάλληλων φυσικοχημικών μεθόδων (Πιν.2).

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σημείων δειγματοληψίας και αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων τους.

Σταθμός	Ημερομηνία	pH	Θερμοκρασία (οC)	Αλατότητα (ppt)	Υδρόβια βλάστηση (%)	Σκίαση (%)	Βιότοπος
Γυρτώνη Ανάντη	04/10/2021	8.27	20.9	0.3	0	0	Poor
Γυρτώνη Κατάντη 1	04/10/2021	8.42	22.8	0.3	5	0	Poor
Γυρτώνη Κατάντη 2	04/10/2021	8.4	22.3	0.3	10	100	Poor
Ομόλιο Ανάντη	04/10/2021	7.76	18.1	0.3	20	0	Poor
Ομόλιο Κατάντη 1	04/10/2021	8.32	17.1	0.3	10	100	Poor
Ομόλιο Κατάντη 2	04/10/2021	8.17	18.1	0.9	1	80	Rich

2.2 Προεπεξεργασία δειγμάτων

Το στάδιο της προεπεξεργασίας των δειγμάτων προηγείται της απομόνωσης eDNA για διάφορους λόγους. Αρχικά, η ύπαρξη οργανισμών πέραν των επιθυμητών έχει σαν αποτέλεσμα την μικρή αντιπροσώπευση των μακροασπόνδυλων στο απομονωμένο δείγμα. Επιπλέον, λόγω της ιδιαιτερότητας των δειγμάτων, αναμένεται να υπάρχει πληθώρα αναστολέων που δυσχεραίνουν τις περαιτέρω αναλύσεις, καθώς και ποσότητα δείγματος προσκολλημένη σε επιφάνειες (πέτρες, ξύλα, φύλλα). Συνεπώς, το στάδιο της προεπεξεργασίας είναι απαραίτητο για την βελτίωση της αντιπροσώπευσης των μακροασπόνδυλων στα δείγματα, τα οποία καθίσταται έτοιμα προς χρήση για περαιτέρω αναλύσεις.

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Σπάτουλα
- Τσιμπίδα
- Eppendorf tubes
- Ποτήρι ζέσεως
- Ομογενοποιητής
- Γουδί
- Υγρό άζωτο
- Falcon tubes

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

- 1) Διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος με χρήση σπάτουλας και τσιμπίδας. Απομάκρυνση πετρών, φύλλων, φυτών και ξύλων, για την μείωση της ποσότητας DNA οργανισμών μη-στόχων.
- 2) Συλλογή παρόντων μακροοργανισμών σε Eppendorf tubes και χαρακτηρισμός τους μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.
- 3) Μεταφορά του υπόλοιπου δείγματος σε ποτήρι ζέσεως και ομογενοποίηση του με χρήση ομογενοποιητή.

- 4) Μεταφορά ομογενοποιημένου σε γουδί και κονιορτοποίηση του με χρήση υγρού αζώτου. Το βήμα αυτό συμβάλλει στην απομάκρυνση της υγρασίας και στην πιο εύκολη μεταχείρισή του δείγματος σε επόμενα στάδια.
- 5) Αποθήκευση δείγματος σε Falcon tubes.

2.3 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα εδάφους χρησιμοποιήθηκε το DNeasy PowerSoil Pro Kit της QIAGEN, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για κάθε δείγμα η διαδικασία εφαρμόστηκε τουλάχιστον τρεις φορές, ώστε να διασφαλιστεί η όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτική εκπροσώπηση των μακροασπόνδυλων στο απομονωμένο DNA.

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Σπάτουλα
- Percellys Evolution Homogenizer
- Ζυγός
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Πιπέττες (1000μl, 200μl)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν, παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:

- 1) Ζύγισμα 0,25g δείγματος, μεταφορά με σπάτουλα σε PowerBead Pro tube, προσθήκη 800μl διαλύματος λύσης κυττάρων CD1 και ανάδευση με vortex σε μέτρια ταχύτητα, για ανάμειξη των συστατικών.
- 2) Μεταφορά στον ομογενοποιητή Precellys Evolution για ομογενοποίηση του δείγματος και λύση των κυττάρων. Επιλέγεται το πρόγραμμα mic, όπου το πρωτόκολλο ρυθμίζεται στα 4min ανάδευσης με 30sec διακοπή ανά περίπου 1min, στις 13.000rpm. Τα PowerBead Pro tubes φέρουν ρυθμιστικό διάλυμα και μικρά, γυάλινα σωματίδια που επιτρέπουν την ομογενοποίηση, την διάλυση των χουμικών οξέων, την διευκόλυνση λύσης των κυττάρων και την προστασία των νουκλεϊκών οξέων από την αποικοδόμηση. Στο διάλυμα CD1 περιλαμβάνονται παράγοντες που δρουν ως απορρυπαντικά, όπως είναι η ανιονική, επιφανειοδραστική ουσία SDS. Αυτή διαλυτοποιεί τις λιπιδιακές διπλοστιβάδες και καταργεί τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των διαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των ιστονών, συμβάλλοντας στην καθίζησή τους. Ο

συνδυασμός της μηχανικής ανάδευσης και των χημικών παραγόντων συμβάλλει στην λύση των κυττάρων.

- 3) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min και μεταφορά υπερκευμένου σε νέο Microcentrifuge tube (2ml). Το ίζημα φέρει χρώμα, κυτταρικά υπολείμματα, κ.ο.κ.
- 4) Προσθήκη 200μl διαλύματος CD2 και ανάδευση με vortex για 5sec. Φέρει αντιδραστήρια που συμβάλλουν στην κατακρήμνιση οργανικών και ανόργανων ουσιών, εκτός του DNA, όπως είναι οι πρωτεΐνες.
- 5) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min και μεταφορά υπερκευμένου σε νέο Microcentrifuge tube (2ml). Στο υπερκευμένο βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ στο ίζημα οργανική και ανόργανη ύλη, όπως πρωτεΐνες, χουμικά οξέα και υπολείμματα κυτταρικών μεμβρανών.
- 6) Προσθήκη 600μl διαλύματος CD3 και ανάδευση με vortex για 5sec. Πρόκειται για ένα διάλυμα αλάτων υψηλής ιονικής ισχύος, που επιτρέπει μόνο στο αρνητικά φορτισμένο DNA να προσδεθεί στην θετικά φορτισμένη μεμβράνη πυριτίου. Αυτό γιατί καταργεί τους δεσμούς υδρογόνου, καθιστώντας το λιγότερο υδρόφιλο. Οι άλλες οργανικές και ανόργανες ουσίες διαπερνούν την μεμβράνη.
- 7) Μεταφορά 650μl διαλύματος σε στήλη MB Spin Column και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min. Το DNA προσδένεται εκλεκτικά στην στήλη, ενώ το υπόλοιπο διάλυμα διαπερνά την μεμβράνη και πετιέται.
- 8) Επανάληψη του βήματος 7 έως ότου φορτωθεί όλο το διάλυμα στην στήλη.
- 9) Μεταφορά της στήλης σε Collection tube (2ml), προσθήκη 500μl του διαλύματος πλύσης EA και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min. Το διάλυμα πλύσης απομακρύνει από την στήλη πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις, αυξάνοντας την καθαρότητα του DNA.
- 10) Απομάκρυνση του διαλύματος που πέρασε την στήλη και τοποθέτηση της στο ίδιο Collection tube.
- 11) Προσθήκη 500μl του διαλύματος πλύσης C5 και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min. Το διάλυμα φέρει αιθανόλη που δρα ως αφυδατωτικό, απομακρύνοντας από την στήλη το επιπλέον νερό και άλατα, καθαρίζοντας περαιτέρω το DNA.
- 12) Μεταφορά της στήλης σε νέο Collection tube (2ml) και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 16.000g για 2min. Το βήμα αυτό συμβάλλει στην

περαιτέρω απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την μεμβράνη, καθώς η παρουσία της μπορεί εμποδίσει την PCR ή την ηλεκτροφόρηση.

- 13) Μεταφορά της στήλης σε Elution tube (1,5ml) και προσθήκη 50μl από το διάλυμα έκλουσης C6 στο κέντρο της μεμβράνης. Είναι ένα διάλυμα αλάτων χαμηλής ιονικής ισχύος, που επιτρέπει την αποδέσμευση του DNA από την μεμβράνη.
- 14) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 15.000g για 1min, για την ανάκτηση του DNA από την στήλη. Το DNA φυλάσσεται στην κατάψυξη.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της απομόνωσης DNA από τα δείγματα, ήταν απαραίτητη η ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης. Η γενική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και η άσκηση ηλεκτρικού πεδίου το αναγκάζει να κινηθεί μέσα στην πηκτή, από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, διαχωρίζοντάς το. Τα μεγάλα μόρια εντοπίζονται κοντά στον αρνητικό πόλο, ενώ τα μικρότερα κοντά στον θετικό. Η διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής για τα νουκλεϊκά οξέα κυμαίνεται από 200bp έως 50kbp. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο διάλυμα καθορίζει το μέγεθος των πόρων και άρα την αποτελεσματικότητα διαχωρισμού του DNA. Ειδικότερα, μικρές συγκεντρώσεις αυτής οδηγούν στον σχηματισμό μεγάλων πόρων και στον καλύτερο διαχωρισμό μεγάλου μήκους DNA, ενώ το αντίθετο ισχύει σε υψηλές συγκεντρώσεις της (Boyer, R. F., 2012).

Διαδικασία σχηματισμού πηκτώματος αγαρόζης

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Σπάτουλα
- Καλούπι-εκμαγείο
- Κωνική φιάλη
- Xpert Green DNA Stain Direct
- TBE 0,5X
- Πιπέττα (10μl)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1,5%, ήταν τα παρακάτω:

- 1) Προετοιμασία εκμαγείου και τοποθέτηση χτενών για τον σχηματισμό μικρών βοθρίων υποδοχής του δείγματος.

- 2) Ζύγισμα 0,6gr αγαρόζης, τοποθέτηση σε κωνική φιάλη, προσθήκη 50ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X.
- 3) Διάλυση της αγαρόζης με θέρμανση στον φούρνο μικροκυμάτων.
- 4) Έντονη ανάδευση του διαλύματος υπό τρεχούμενο νερό για μείωση της θερμοκρασίας του.
- 5) Προσθήκη 4μl της μη-τοξικής, ευαίσθητης χρωστικής Xpert Green DNA Stain Direct και έντονη ανάδευση. Η χρωστική προσδένεται στο DNA και επιτρέπει την απεικόνισή του κάτω από την ακτινοβολία UV.
- 6) Μεταφορά στο καλούπι για πήξη του.

Διαδικασία φόρτωσης των δειγμάτων στην πηκτή

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- Πιπέττα (10μl)
- Διάλυμα φόρτωσης

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

- 1) Προετοιμασία οριζόντιας συσκευής ηλεκτροφόρησης, τοποθέτηση πηκτώματος κατά την κατάλληλη φορά και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (έως ότου υπερκαλύψει την πηκτή).
- 2) Προετοιμασία δείγματος. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάμιξη 3μl του δείγματος με 3μl του διαλύματος φόρτωσης σε parafilm. Το διάλυμα φόρτωσης φέρει γλυκερόλη, μια ουσία υψηλής πυκνότητας, η οποία αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα, επιτρέποντας την καθίζησή του στα βοθρία. Επιπλέον, φέρει την χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, η οποία είναι ορατή και διευκολύνει την διαδικασία φόρτωσης των δειγμάτων. Στην πηκτή κινείται περίπου με την ταχύτητα ενός μικρού μορίου και κατά συνέπεια επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.
- 3) Φόρτωση δείγματος και εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης.
- 4) Παρατήρηση αποτελεσμάτων μετά από έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.

2.5 Φωτομέτρηση DNA

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στο φασματοφωτόμετρο της Quawell (Q5000), με την προσθήκη 1μl δείγματος. Με βάση τις τιμές των απορροφήσεων υπολογίστηκε η συγκέντρωση (ng/ul) του DNA και ο λόγος A_{260}/A_{280} , που δείχνει την καθαρότητα του. Ιδανικά ο λόγος πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 1,80 με 2,00. Δεδομένου ότι το DNA και RNA απορροφούν στα 260nm και οι πρωτεΐνες στα 280nm, αποκλίσεις μικρότερες από 1,80 υποδεικνύουν την ύπαρξη πρωτεϊνών στο δείγμα, ενώ αποκλίσεις μεγαλύτερες του 2,00 υποδηλώνουν την ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων RNA.

2.6 Προετοιμασία για Αλληλούχηση Illumina

Το επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η συνένωση του DNA (pooling) των επαναλήψεων κάθε δείγματος και η επακόλουθη κατακρήμνισή τους για την αύξηση της καθαρότητας του DNA. Στην συνέχεια, ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχηση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *COI* μέσω της πλατφόρμας MiSeq της Illumina, τα βασικά στάδια της οποίας είναι (Kulski, 2016):

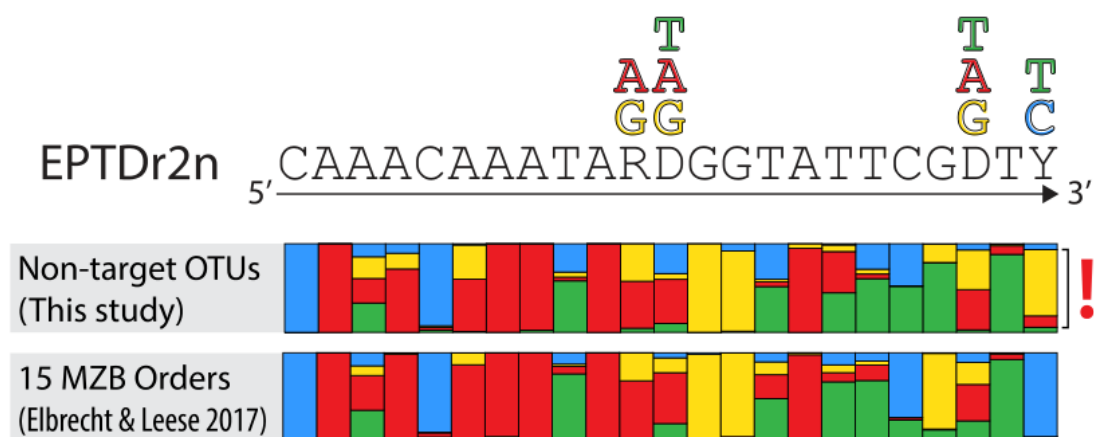
- 1) Κατασκευή βιβλιοθηκών DNA με γνωστά άκρα
- 2) Ενίσχυση βιβλιοθηκών μέσω σχηματισμού κλώνων
- 3) Αλληλούχηση των κλώνων
- 4) Βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η κατασκευή των βιβλιοθηκών DNA με γνωστά άκρα επιτυγχάνεται μέσα από δύο διαδοχικές PCR. Στην πρώτη γίνεται ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *COI* με τους εκφυλισμένους εκκινητές (primers) fwhF2 (εμπρόσθιος, forward) και EPTDr2n (ανάστροφος, reverse) (Πιν.3). Το μήκος του παραγόμενου προϊόντος είναι 142bp (Leese, et al, 2020).

Πίνακας 3: Αλληλουχίες των εκκινητών (Leese, et al, 2020).

Εκκινητής	Αλληλουχία
fwhF2	5'-GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC-3'
EPTDr2n	5'-CAAACAAATARDGGTATTCGDTY-3'

Ο εμπρόσθιος εκκινητής είναι καθολικός, ενώ ο ανάστροφος σχεδιάστηκε από τους Leese, et al. (2020), κατά τέτοιο τρόπο ώστε το 3' άκρο του να αναγνωρίζει εξειδικευμένα συντηρημένες βάσεις του COI των βενθικών μακροασπόνδυλων και όχι άλλων ταξινομικών ομάδων (Εικ.15).



Εικόνα 15: In silico αξιολόγηση του ανάστροφου εκκινητή EPTDr2n. Η επιλογή των βάσεων θυμίνης ή κυτοσίνης στο 3' άκρο του εκκινητή, αποκλείει πολλά είδη μη-στόχους και αυξάνει την εξειδίκευση εντοπισμού των βενθικών μακροασπόνδυλων (MacroZooBenthic, MZB) (Leese, et al, 2020).

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για 40 κύκλους, με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στον (Πιν.4).

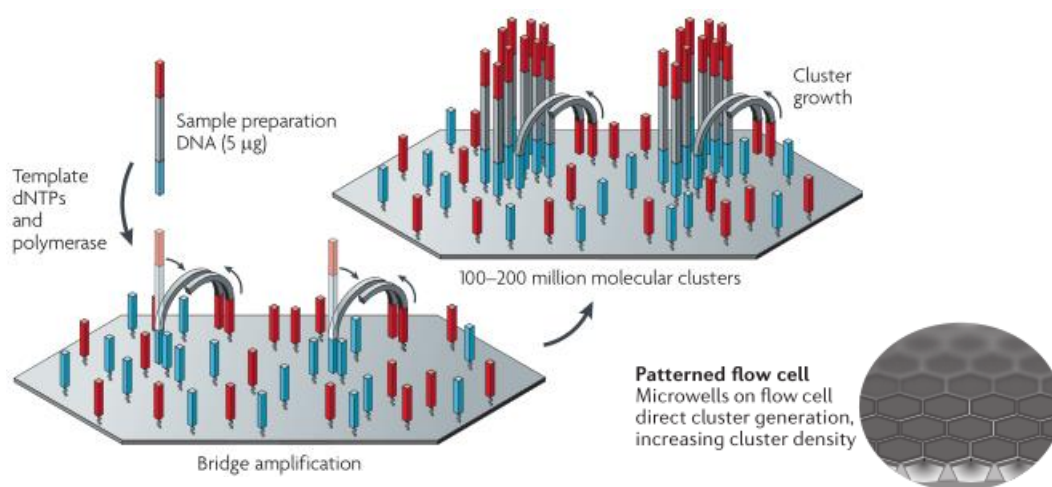
Πίνακας 4: Συνθήκες PCR (Leese, et al, 2020).

Διαδικασία	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min
Αποδιάταξη	95°C	30sec
Υβριδισμός εκκινητών	50°C	90sec
Επιμήκυνση	72°C	2min
Τελική επιμήκυνση	68°C	10min

Οι εκκινητές fwhF2 και EPTDr2n φέρουν στο 5' άκρο τους μια αλληλουχία DNA, στην οποία υβριδίζει ο δεύτερος εκκινητής που φέρει τον αντάπτορα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η δεύτερη PCR. Οι συνθήκες αυτής είναι ίδιες με την πρώτη, με την διαφορά ότι γίνεται σε 15 κύκλους και η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι 57 °C . Οι

αντάπτορες είναι αυτοί που επιτρέπουν την πολυπλεξία και την παράλληλη αλληλούχηση πολλών δειγμάτων στις τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Leese, et al, 2020).

Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την ενίσχυση των βιβλιοθηκών μέσω σχηματισμού κλώνων (solid-phase bridge amplification). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε μια γυάλινη επιφάνεια (flow cell), στην οποία τα αποδιαταγμένα προϊόντα των PCR υβριδίζουν με τα γειτονικά ακινητοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα άκρα τους. Με την δράση της DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται τελικά ο μονοκλωνικός πολλαπλασιασμός (Εικ.16) (Goodwin, et al, 2016).

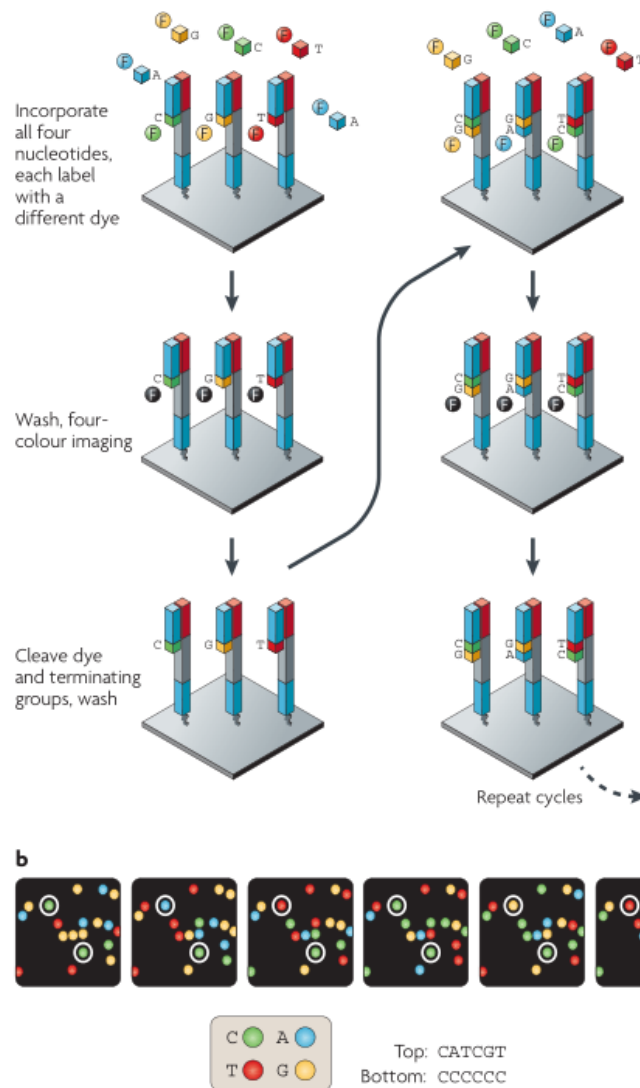


Εικόνα 16: Διαδικασία σχηματισμού κλώνων στα flow cells (Metzker, et al, 2009; Goodwin, et al, 2016).

2.7 Αλληλούχηση Illumina

Η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών στηρίζεται στην χρήση νουκλεοτιδίων σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές, τα οποία φέρουν μπλοκαρισμένο το 3' άκρο τους. Κατά συνέπεια, μετά την ενσωμάτωσή τους από την DNA πολυμέραση τερματίζουν την σύνθεση των νέων μορίων, επιτρέποντας με την χρήση laser την διέγερση της φθορίζουσας χρωστικής και την καταγραφή του νουκλεοτιδίου στην θέση αυτή. Έπειτα, οι φθορίζουσες χρωστικές απομακρύνονται, ενώ με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων το 3' άκρο των νουκλεοτιδίων αναγεννάται, επιτρέποντας ξανά τον πολυμερισμό. Η διαδικασία αυτή καλείται cyclic reversible termination (CRT) και επαναλαμβάνεται έως ότου αλληλουχηθεί ολόκληρο το μόριο (Εικ.17). Στα δείγματα εφαρμόστηκε, μάλιστα, η μέθοδος paired-end sequencing, η οποία επιτρέπει την αλληλούχηση ενός τμήματος DNA και από τα δύο άκρα.

Αυτό οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων reads, κάτι που αυξάνει σημαντικά την ποιότητα και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Metzker, et al, 2009).



Εικόνα 17: Διαδικασία αλληλούχησης με χρήση της μεθοδολογίας CRT (Metzker, et al, 2009).

2.8 Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων

2.8.1 Ανάλυση δεδομένων Illumina

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επιστράφηκαν σε μορφή fastq και ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυσή τους σε περιβάλλον εντολών bash και R Studio με χρήση κατάλληλων αλγορίθμων. Σκοπός ήταν η απομάκρυνση των αλληλουχιών κακής ποιότητας, οι οποίες έπειτα ομαδοποιήθηκαν σε ASVs για την κατασκευή του αντίστοιχου πίνακα, την

ταξινόμησή τους και τελικά τον υπολογισμό των δεικτών βιοποικιλότητας α -diversity και β -diversity.

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των αρχείων fastq περιλάμβανε τον ποιοτικό έλεγχο των αλληλουχιών με χρήση των πακέτων **fastqc** και **multiqc** στο terminal (Andrews, 2010; Ewels, 2016). Η ανάλυση αυτή επιστρέφει μια σειρά αποτελεσμάτων, όπως το περιεχόμενο των αλληλουχιών σε N βάσεις (N content), το μήκος τους, τον αριθμό των μοναδικών reads και των αντιγράφων τους, καθώς και το Quality score των αλληλουχιών (όταν το quality score \geq 25, τότε η αλληλουχία είναι καλής ποιότητας και πιο αξιόπιστη). Για την απομάκρυνση των αλληλουχιών μικρού μεγέθους, έγινε χρήση του cutadapt (Marcel, 2011). Τα αρχεία fastq ήταν demultiplexed και paired-end, δηλαδή σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 2 αρχεία, ένα με τα forward reads (R1) και ένα με τα reverse reads (R2). Αυτό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή των εντολών του cutadapt, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:

- 1) Προσδιορισμός της διεύθυνσης που βρίσκονται τα αρχεία fastq και ανάθεσή τους στις μεταβλητές fwd_files και rev_files για τα forward και reverse reads, αντίστοιχα.

```
path <- "path/to/files"
list.files(path)
fwd_files <- sort(list.files(path, pattern = "R1", full.names = TRUE))
rev_files <- sort(list.files(path, pattern = "R2", full.names = TRUE))
```

- 2) Δημιουργία της μεταβλητής samples με τα ονόματα των αρχείων, για τα forward και reverse reads.

```
samples = str_extract(basename(fwd_files), "^[^_]+")
names(fwd_files) <- samples
names(rev_files) <- samples
```

- 3) Προσδιορισμός της διεύθυνσης που βρίσκεται εγκατεστημένο το cutadapt και έλεγχος λειτουργίας του.

```
cutadapt <- path.expand("path/to/cutadapt")
system2(cutadapt, args = "--version")
```

- 4) Δημιουργία ενός directory, όπου θα καταλήξουν οι αλληλουχίες που δεν απομακρύνθηκαν λόγω μικρού μεγέθους.

```
cut_dir <- file.path(path, "cutadapt")
if (!dir.exists(cut_dir)) dir.create(cut_dir)
```

- 5) Δημιουργία των μεταβλητών fwd_cut και rev_cut για τα forward και reverse reads αντίστοιχα, καθώς και ένα αρχείο αναφοράς ανά δείγμα με την κατάληξη .log.

```
fwd_cut <- file.path(cut_dir, basename(fwd_files))
rev_cut <- file.path(cut_dir, basename(rev_files))
names(fwd_cut) <- samples
names(rev_cut) <- samples
cut_logs <- path.expand(file.path(cut_dir, paste0(samples, ".log")))
```

6) Απομάκρυνση των αλληλουχιών με μέγεθος <100 βάσεων.

```
cutadapt_args <- c(
  "-n", 2, "-m", 100, "--match-read-wildcards")
for (i in seq_along(fwd_files)) {
  system2(cutadapt,
    args = c(cutadapt_args,
      "-o", fwd_cut[i], "-p", rev_cut[i],
      fwd_files[i], rev_files[i]),
    stdout = cut_logs[i])
}
head(list.files(cut_dir))
```

Αφού, λοιπόν, απομακρύνθηκαν οι αλληλουχίες μικρού μεγέθους, το επόμενο βήμα ήταν η ομαδοποίησή τους σε Amplicon Sequence Variants (ASVs) και η κατασκευή του αντίστοιχου πίνακα. Η επιλογή κατασκευής ενός πίνακα με ASVs έναντι των Operational Taxonomic Units (OTUs), έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι τα πρώτα προσφέρουν καλύτερη ταξινομική διάκριση. Στην περίπτωση των OTUs οι αλληλουχίες ομαδοποιούνται εφ' όσον το ποσοστό ομοιότητάς τους ξεπερνά ένα κατώφλι (συνήθως $\geq 97\%$), δημιουργώντας τελικά μια συναινετική αλληλουχία. Αντιθέτως, στα ASVs οι αλληλουχίες ομαδοποιούνται μόνο εάν φέρουν 100% ομοιότητα, επιτρέποντας έτσι την διάκριση μεταξύ ειδών που διαφέρουν μόνο σε κάποια νουκλεοτίδια (Porter, et al, 2020). Για τον παραπάνω σκοπό, έγινε χρήση του αλγόριθμου DADA2 (Callahan, et al, 2016), όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

1) Προσδιορισμός της διεύθυνσης που βρίσκονται τα επεξεργασμένα αρχεία με τις αλληλουχίες χωρίς τους εκκινήτες, ανάθεσή τους στις μεταβλητές fnFs και fnRs, για τα forward και reverse reads αντίστοιχα και δημιουργία της μεταβλητής sample.names με τα ονόματα των αρχείων.

```
path <- ""
list.files(path)
fnFs <- sort(list.files(path, pattern="R1_001.fastq.gz", full.names = TRUE))
fnRs <- sort(list.files(path, pattern="R2_001.fastq.gz", full.names = TRUE))
sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 1)
```

2) Οπτικοποίηση των quality scores των forward και reverse reads ανά βάση.

```
plotQualityProfile(fnFs[1:18])
plotQualityProfile(fnRs[1:18])
```

3) Ανάθεση των ονομάτων και των αρχείων με τα forward και reverse reads στις μεταβλητές filtFs και filtRs, αντίστοιχα.

```
filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_F_filt.fastq.gz"))
filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_R_filt.fastq.gz"))
names(filtFs) <- sample.names
names(filtRs) <- sample.names
```

- 4) Φιλτράρισμα των reads, για την απομάκρυνση αυτών που φέρουν quality score ≤ 20 , N βάσεις, κ.ο.κ..

```
out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs,
                    maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE,
                    compress=TRUE, multithread=TRUE)
head(out)
```

- 5) Εύρεση και οπτικοποίηση των error rates και κατασκευή του παραμετρικού μοντέλου σφαλμάτων (machine-learning), στο οποίο στηρίζεται το DADA2 για τα επόμενα βήματα.

```
errF <- learnErrors(filtFs, nbases=1e10, multithread=TRUE, randomize = T)
errR <- learnErrors(filtRs, nbases=1e10, multithread=TRUE, randomize = T)
plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)
plotErrors(errR, nominalQ=TRUE)
```

- 6) Αναγνώριση των μοναδικών αλληλουχιών και της αφθονίας τους (dereplication) και ανάθεση ονομάτων.

```
derepFs <- derepFastq(filtFs, verbose=TRUE)
derepRs <- derepFastq(filtRs, verbose=TRUE)
names(derepFs) <- sample.names
names(derepRs) <- sample.names
```

- 7) Αναγνώριση των σωστών βιολογικά αλληλουχιών (denoising) και συγχώνευση των forward και reverse reads για την κατασκευή συναινετικών αλληλουχιών (ASVs).

```
dadaFs <- dada(filtFs, err=errF, multithread=TRUE)
dadaRs <- dada(filtRs, err=errR, multithread=TRUE)
mergers <- mergePairs(dadaFs, filtFs, dadaRs, filtRs, verbose=TRUE, minOverlap = 50, maxMismatch = 0, trimOverhang =F)
```

- 8) Κατασκευή πίνακα με τα ASVs.

```
seqtab <- makeSequenceTable(dadaFs)
dim(seqtab)
```

- 9) Απομάκρυνση των χιμαιρικών αλληλουχιών. Ο σχηματισμός τους οφείλεται στον συνδυασμό τμημάτων των δύο πιο άφθονων αλληλουχιών στο δείγμα.

```
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus", multithread=TRUE, verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)
sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)
```

Η αντιστοίχιση των αλληλουχιών των ASVs σε κάποια ταξινομική βαθμίδα, μέσω αναζήτησης σε κατάλληλη βάση δεδομένων, έγινε μέσω του αλγορίθμου BLAST (Madden, et al., 1996). Στην συνέχεια, η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ταξινόμησης έγινε μέσω του Taxallnomy (Sakamoto & Ortega, 2021).

2.8.2 Υπολογισμός δεικτών βιοποικιλότητας

Βάσει των αποτελεσμάτων της κλασικής και μοριακής ταξινόμησης, έγινε υπολογισμός των δεικτών βιοποικιλότητας α -diversity και β -diversity για κάθε μέθοδο, με σκοπό την σύγκριση τους.

Για το α-diversity χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες Sobs, Shannon, Simpson και inverse Simpson. Ειδικότερα, ο δείκτης Sobs ορίζει την ποικιλότητα ως τον αριθμό των διαφορετικών ειδών που υπάρχουν σε ένα δείγμα (ποικιλότητα ειδών). Ωστόσο, δεν λαμβάνει υπ' όψη του την ομαλότητα κατανομής των ειδών. Δεδομένου, λοιπόν, ότι η βιοποικιλότητα εξαρτάται και από τους δύο παράγοντες και αυξάνεται αναλόγως, στις αναλύσεις προτιμώνται, κυρίως, οι βιοτικοί δείκτες Shannon και Simpson. Ο δείκτης Shannon (H) ποσοτικοποιεί την αβεβαιότητα κατά την πρόβλεψη του είδους ενός ατόμου που επιλέγεται τυχαία από ένα δείγμα. Δίνει μεγαλύτερη βάση στην ποικιλότητα των ειδών και αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαφορετικών ειδών και η σχετική τους αφθονία (Εικ.18). Αντιθέτως, ο δείκτης Simpson (D) υπολογίζει την πιθανότητα δύο άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος να επιλεχθούν τυχαία από ένα δείγμα. Στηρίζεται προ παντός στην ομαλότητα κατανομής των ειδών, φέρει τιμές από 0 έως 1 και αυξάνεται όσο η βιοποικιλότητα μειώνεται (Εικ.18) (Kim, et al, 2017). Ο δείκτης inverse Simpson υπολογίζεται ως 1/D και όσο μικρότερη η βιοποικιλότητα τόσο μικρότερη η τιμή του.

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i \quad \text{Shannon-Weaver}$$

$$D_1 = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad \text{Simpson}$$

Εικόνα 18: Οι μαθηματικοί τύποι υπολογισμού των δεικτών βιοποικιλότητας Shannon-Weaver και Simpson, όπου S είναι ο αριθμός των διαφορετικών ειδών και p_i είναι η αναλογία του είδους i συγκριτικά με τα υπόλοιπα (Oksanen, 2022).

Για τον υπολογισμό του βιοτικού δείκτη α-diversity χρησιμοποιήθηκε το tidyverse, ένα πακέτο ανοιχτού κώδικα της γλώσσας προγραμματισμού R (Wickham, et al, 2019). Οι εντολές που εφαρμόστηκαν στο R Studio ήταν οι παρακάτω:

- 1) Κατασκευή του data frame "data1", το οποίο θα φέρει στις γραμμές τις περιοχές δειγματοληψίας και στις στήλες τα ονόματα των διαφορετικών taxa, με τον αριθμό των αλληλουχιών ASV που υπολογίστηκαν για κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Προσθήκη μιας νέας στήλης "group", με τις περιοχές δειγματοληψίας.

```
families <- read.table("~/path/to/families.txt", header=T)
names <- read.table("~/path/to/names.txt", header=T)
data1 <- cbind(names, families)

data1$group <- paste(data1$sampling, data1$dam, sep="_")
```


2) Υπολογισμός των δεικτών Sobs, Shannon, Simpson και inverse Simpson.

```
data2 <- data1 %>%
  select(-c(Sampling,Dam)) %>%
  pivot_longer(-group)%>%
  group_by(group)

richness <- function(x){
  sum(x>0)
}

shannon <- function(x){
  rabund <- x[x>0]/sum(x)
  -sum(rabund * log(rabund))
}

simpson <- function(x){
  n<-sum(x)
  sum(x*(x-1) / (n*(n-1)))
}

data3 <- data2 %>%
  group_by(group)%>%
  summarize(sobs = richness(value),
            shannon = shannon(value),
            simpson = simpson(value),
            invsimpson = 1/simpson,
            n = sum(value))
pivot_longer(cols=c(sobs, shannon, invsimpson, simpson),
             names_to = "metric")
```

Η μελέτη του βαθμού διαφοροποίησης των δειγμάτων μεταξύ τους (β-diversity) ως προς διάφορες μεταβλητές, όπως η περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και η θέση τους ως προς το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2), έγινε με χρήση του δείκτη Bray-Curtis (BC). Ο δείκτης αυτός λαμβάνει υπ' όψη του τόσο την παρουσία/απουσία των ειδών από τα δείγματα, όσο και την σχετική τους αφθονία, ποσοτικοποιώντας τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των πληθυσμών. Οι τιμές που μπορεί να λάβει είναι από 0 έως 1, με το 0 να υποδεικνύει ότι τα συγκρινόμενα δείγματα μοιράζονται τα ίδια είδη (Eικ.19) (Bray & Curtis, 1957; Glen, n.d.).

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

Εικόνα 19: Ο μαθηματικός τύπος υπολογισμού του δείκτη Bray-Curtis, όπου i και j είναι οι δύο περιοχές από τις οποίες λήφθηκαν τα δείγματα, S_i και S_j ο αριθμός των ειδών στις περιοχές i και j , αντίστοιχα και C_{ij} το άθροισμα των πληθυσμών των ειδών με τα λιγότερα άτομα, που βρέθηκαν για κάθε περιοχή (Glen, n.d.).

Ο πίνακας αποστάσεων που προέκυψε από τον υπολογισμό του β-diversity,

χρησιμοποιήθηκε από τον επαναληπτικό αλγόριθμο Non-metric Multi-dimensional Scaling (NMDS), για την 2D αναπαράσταση των πολυδιάστατων δεδομένων. Ο αλγόριθμος αυτός αντικαθιστά τις πραγματικές αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων με βαθμούς (1^{ος}, 2^{ος}, κ.ο.κ.), επιστρέφοντας ένα διάγραμμα όπου όσο πιο κοντά τα σημεία μεταξύ τους, τόσο πιο όμοια τα αντίστοιχα δείγματα ως προς τις παραμέτρους με τις οποίες κατασκευάστηκε το διάγραμμα (Buttigieg & Ramette, 2014).

Για τον υπολογισμό του β-diversity και την κατασκευή των διαγραμμάτων NMDS χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα εντολών tidyverse και vegan (Oksanen, et al, 2022; Wickham, et al, 2019). Οι εντολές που εφαρμόστηκαν στο R Studio ήταν οι παρακάτω:

- 1) Υπολογισμός αποστάσεων (β-diversity). Οι τιμές των δειγμάτων προσαρμόστηκαν ώστε να υπάρχει ίση αντιπροσώπευση αλληλουχιών σε όλα τα δείγματα. Η προσαρμογή έγινε με βάση την μικρότερη τιμή αλληλουχιών στα δείγματα (avgdist).

```
meta_data <- data1%>%
  select(Sampling, Dam, group)%>%
  mutate(New=paste0(Sampling))

dist <- data1%>%
  select (-Sampling, -Dam)%>%
  column_to_rownames("group")%>%
  avgdist(sample=number)

set.seed(1)

test <- dist%>%
  metaMDS()%>%
  scores() %>%
  as_tibble(rownames = "group")
```

- 2) Κατασκευή διαγραμμάτων NMDS.

```
metadata_nmds <- inner_join(meta_data, test)

centroid <- metadata_nmds%>%
  group_by(Sampling)%>%
  summarize(NMDS1=mean(NMDS1), NMDS2=mean(NMDS2))

metadata_nmds%>%
  ggplot(aes(x=NMDS1, y=NMDS2, color=Sampling))+
  geom_point()+
  stat_ellipse(show.legend = FALSE)+
  geom_point(data=centroid, size=5, shape=21, color="black",
    aes(fill=period), show.legend=FALSE)
```

Προκειμένου, όμως, να ελεγχθεί εάν τα δείγματα εμφάνιζαν πραγματικά κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις παραμέτρους που συγκρίθηκαν, εφαρμόστηκε το στατιστικό τεστ ANOSIM, με την μηδενική υπόθεση να υποστηρίζει ότι αυτά δεν διαφέρουν (Buttigieg & Ramette, 2014). Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Jaccard, ο

οποίος μετρά τις ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων βάσει του πίνακα παρουσίας/απουσίας ειδών από αυτά. Λαμβάνει τιμές από 0 έως 1, με το 0 να υποδηλώνει ότι τα συγκρινόμενα δείγματα είναι τελείως διαφορετικά μεταξύ τους (Eικ.20) (Jaccard, 1901). Τελικά, έγινε η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με box plots.

$$J(X,Y) = |X \cap Y| / |X \cup Y|$$

Εικόνα 20: Ο μαθηματικός τύπος υπολογισμού του δείκτη Jaccard, ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο του αριθμού των κοινών ειδών των δύο δειγμάτων με τον συνολικό αριθμό ειδών και των δύο δειγμάτων (Glen, n.d.).

Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο εντολών `vegan` (Oksanen, et al, 2022) και οι εντολές που εφαρμόστηκαν στο R Studio ήταν οι παρακάτω:

1) Κατασκευή πίνακα με την παρουσία (1) και απουσία (0) ειδών από τα δείγματα.

```
pres_abs1 <- as.data.frame(data1 %>%
  select(-c(Sampling,Dam)) %>%
  pivot_longer(-group)%>%
  group_by(group)%>% filter(value>0) %>% select(-value))

pres_abs2 <- as.data.frame(pres_abs1)
pres_abs3 <- dcast(pres_abs2, group ~ name, fun.aggregate = function(x){as.integer(length(x) > 0)})
```

2) Υπολογισμός ομοιοτήτων μεταξύ των δειγμάτων με τον δείκτη Jaccard και κατασκευή box plots.

```
pres_abs4 <- pres_abs3[,-1]
pres_abs5 <- as.matrix(pres_abs4)

ano1 <- anosim(pres_abs5, names$Sampling, distance = "jaccard", permutations = 9999)
plot(ano1, xlab="Sampling Site", ylab="Dissimilarity")

ano2 <- anosim(pres_abs5, names$Dam, distance = "jaccard", permutations = 9999)
plot(ano2,xlab="Dam Position", ylab="Dissimilarity")
```

2.9 Μακροοργανισμοί

2.9.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Πριν την απομόνωση DNA από τους μακροοργανισμούς που διαχωρίστηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα, ήταν αναγκαία η προετοιμασία τους.

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Νυστέρι
- Τρυβλίο petri
- Ποτήρι ζέσεως
- Αιθανόλη (EtOH) 100%
- Διηθητικό χαρτί
- Eppendorf tubes (1,5ml)

Η διαδικασία περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- 1) Τοποθέτηση των οργανισμών σε τρυβλίο petri, παρατήρηση και επεξεργασία τους στο στεροσκόπιο.
- 2) Τεμαχισμός τους σε διηθητικό χαρτί με νυστέρι και μεταφορά 0,25g από το ομογενοποίημα σε νέο Eppendorf tube (1,5ml). Στο βήμα αυτό, μέσω άσκησης μηχανικής πίεσης, επιτυγχάνεται η ομογενοποίηση των δειγμάτων και η απελευθέρωση DNA. Μεταξύ των ομογενοποιήσεων το νυστέρι καθαρίζεται σχολαστικά σε αιθανόλη 100%.

2.9.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από το ομογενοποίημα των μακροοργανισμών έγινε με χρήση του PureLink Genomic DNA Extraction Kit της Invitrogen, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Πιπέττα (20μl, 200μl, 1000μl)
- Vortex
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Eppendorf tubes (1,5ml)
- Αιθανόλη (EtOH) 100%

Τα βήματα ήταν τα εξής:

- 1) Προσθήκη 20μl από το ένζυμο Πρωτεϊνάση K και 180μl από το ρυθμιστικό του διάλυμα (PureLink™ Genomic Digestion Buffer) στο ομογενοποίημα και ανάδευση με vortex για 10sec. Η Πρωτεϊνάση K είναι μια πρωτεϊνάση σερίνης που δρα έναντι διαφόρων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεασών, προστατεύοντας το DNA από την αποικοδόμηση.

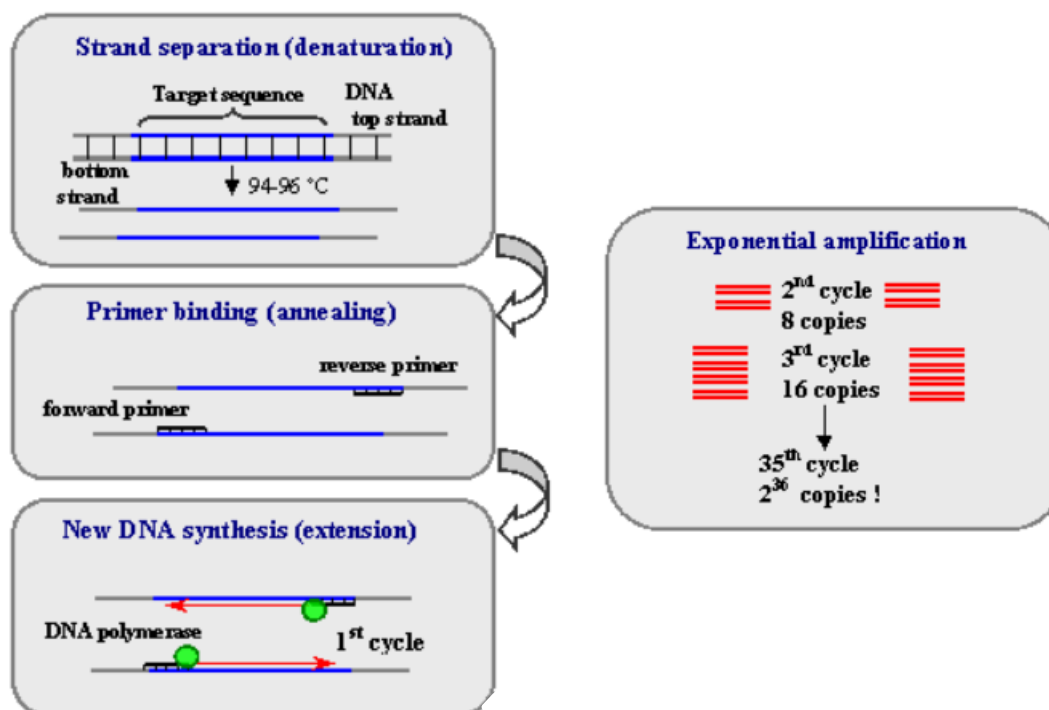
- 2) Επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 55°C για 1h. Αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία για την δραστικότητα της Πρωτεΐνης K.
- 3) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές για 3min.
- 4) Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf tube (1,5ml). Το ίζημα φέρει υπολείμματα ιστών, πρωτεϊνών, κ.α.
- 5) Προσθήκη 200μl από το διάλυμα λύσης κυττάρων (PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer) και έντονη ανάδευση με vortex.
- 6) Προσθήκη 200μl αιθανόλης 100% και έντονη ανάδευση με vortex.
- 7) Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη PureLink™ Spin Column.
- 8) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 10.000g για 1min.
- 9) Μεταφορά της στήλης σε νέο PureLink™ Collection tube.
- 10) Προσθήκη 500μl από το διάλυμα πλύσης 1 (PureLink™ Wash Buffer 1), το οποίο φέρει αιθανόλη.
- 11) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 10.000g για 1min.
- 12) Μεταφορά της στήλης σε νέο PureLink™ Collection tube.
- 13) Προσθήκη 500μl από το διάλυμα πλύσης 2 (PureLink™ Wash Buffer 2), το οποίο φέρει αιθανόλη.
- 14) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές για 3min.
- 15) Μεταφορά στήλης σε νέο σωληνάκι Eppendorf (1,5ml).
- 16) Προσθήκη 25μl από το διάλυμα έκλυσης (PureLink™ Genomic Elution Buffer), επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές για 1min. Το DNA έχει συλλεχθεί στο PureLink™ Collection Tube.
- 17) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% και φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA.

2.9.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την μοριακή ταξινόμηση των μακροοργανισμών μέσω αλληλούχησης κατά Sanger, ήταν αρχικά απαραίτητη η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου-δείκτη *COI* από το απομονωμένο DNA αυτών. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), μιας ενζυμικής διεργασίας που οδηγεί στην *in vitro* σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων ενός τμήματος DNA, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες. Την μέθοδο εισήγαγε για πρώτη φορά ο Αμερικανός χημικός Kary Mullis, την δεκαετία του '80.

Τα συστατικά που απαιτούνται για μια PCR είναι: (α) DNA, που λειτουργεί ως μήτρα για την σύνθεση νέων μορίων, (β) η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση, η οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, (γ) το ρυθμιστικό της διάλυμα, (δ) κατάλληλη συγκέντρωση $MgCl_2$, καθώς το Mg^{+2} δρα ως συμπαραγοντας του ενζύμου, (ε) μίγμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), που χρησιμοποιεί το ένζυμο για τον πολυμερισμό των νέων μορίων και (στ) ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων (primers), που δρουν ως εκκινητές της αντίδρασης, υβριδίζοντας και οριοθετώντας το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί, επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης (90-95°C) του δίκλωνου μορίου DNA, υβριδισμού των εκκινητών (50-65°C) και επιμήκυνσής τους για την σύνθεση νέων μορίων (70-78°C), σε αυτόματους θερμοκυκλοποιητές. Ο τελικός αριθμός των μορίων DNA που έχουν παραχθεί μετά από μια PCR είναι 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικ.21). Ο χρόνος και η θερμοκρασία που απαιτούνται σε κάθε φάση του κύκλου, διαφέρουν ανάλογα το μήκος και το περιεχόμενο σε GC τόσο του τμήματος DNA που ενισχύεται, όσο και των primers που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στον σχεδιασμό των primers, έτσι ώστε αυτοί να φέρουν παρόμοια περιεκτικότητα σε GC και να μην υβριδίζουν (Wages, 2005).



Εικόνα 21: Διαδικασία PCR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>).

Για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *COI* από το απομονωμένο DNA των μακροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των παγκόσμιων και εκφυλισμένων εκκινητών για τα μετάζωα, mICOLintF (εμπρόσθιος) και jgHCO2198 (ανάστροφος) (Πιν.5). Το μήκος του παραγόμενου προϊόντος μαζί με τους εκκινητές είναι 313bp (Rennstam-Rubbmark, et al, 2018).

Πίνακας 5: Αλληλουχίες των εκκινητών (Rennstam-Rubbmark, et al, 2018).

Εκκινητής	Αλληλουχία
mICOLintF	5'-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3'
jgHCO2198	5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3'

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ορίστηκε στα 25μl, ενώ η τελική ποσότητα DNA από κάθε δείγμα σε ένα PCR tube υπολογίστηκε στα 100ng. Ενδεικτικά, λοιπόν, για ένα δείγμα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων (Πιν.6).

Πίνακας 6: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκ/ση	Τελική Συγκ/ση	Ποσότητα (μl)
Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25mM	2mM	0,5
dNTPs	10mM	0,2mM	0,5
mICOLintF	50pmol	1pmol	0,5
jgHCO2198	50pmol	1pmol	0,5
BSA	10mol	0,4mol	1
Taq DNA πολυμεράση	5u/μl	1u	0,2
DNA	100ng		
ddH ₂ O	Συμπλήρωση έως 25μl		

Η ποσότητα από κάθε συστατικό πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των επιθυμητών αντιδράσεων για την κατασκευή ενός Master Mix. Αυτό μοιράζεται ισόποσα σε PCR tubes, που φέρουν την κατάλληλη ποσότητα δείγματος (τέτοια ώστε να υπάρχουν 100ng DNA) και στη συνέχεια γίνεται συμπλήρωση με ddH₂O έως τα 25μl.

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για 35 κύκλους, με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στον (Πιν.7).

Πίνακας 7: Συνθήκες PCR.

Διαδικασία	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min
Αποδιάταξη	95°C	40sec
Υβριδισμός εκκινητών	53°C	50sec
Επιμήκυνση	72°C	35sec
Τελική επιμήκυνση	72°C	7min

Τελικά, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2,5%.

2.9.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Από την αντίδραση PCR εκτός του γονιδίου στόχου που έχει ενισχυθεί, στο διάλυμα εντοπίζονται επιπλέον διμερή εκκινητών, άλλα μονόκλιωνα ή δίκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια, κτλπ. τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR από τα δείγματα έγινε με την χρήση του Nucleosprin® Gel and PCR Clean-Up, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Τα υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Πιπέττα (200μl, 1000μl)
- Φυγόκεντρος
- Eppendorf tubes (1,5ml)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

- 1) Προσθήκη 50μl από το αντιδραστήριο NTI και ανάδευση με πιπέττα. Το NTI είναι ένα διάλυμα χαοτροπικών αλάτων, που δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση μεγάλων μορίων DNA στην μεμβράνη.
- 2) Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 11.000g για 30sec. Μεγάλα μόρια DNA συγκρατούνται στην μεμβράνη, ενώ μικρότερα όπως τα διμερή εκκινητών απομακρύνονται.
- 3) Προσθήκη 700μl από το διάλυμα πλύσης NT3 και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 11.000g για 30sec. Ότι διαπερνά την στήλη, πετιέται. Το βήμα επαναλαμβάνεται δύο φορές έτσι ώστε να μειωθεί η ποσότητα των χαοτροπικών αλάτων που βρίσκονται ακόμα στην στήλη.

- 4) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 11.000g για 1min. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για να απομακρύνει υπολείμματα αιθανόλης από την μεμβράνη.
- 5) Μεταφορά της στήλης σε Eppendorf tube (1,5ml), προσθήκη 20μl του διαλύματος έκλουσης NE, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 11.000g για 1min. Το DNA έχει πλέον απομακρυνθεί από την μεμβράνη και χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

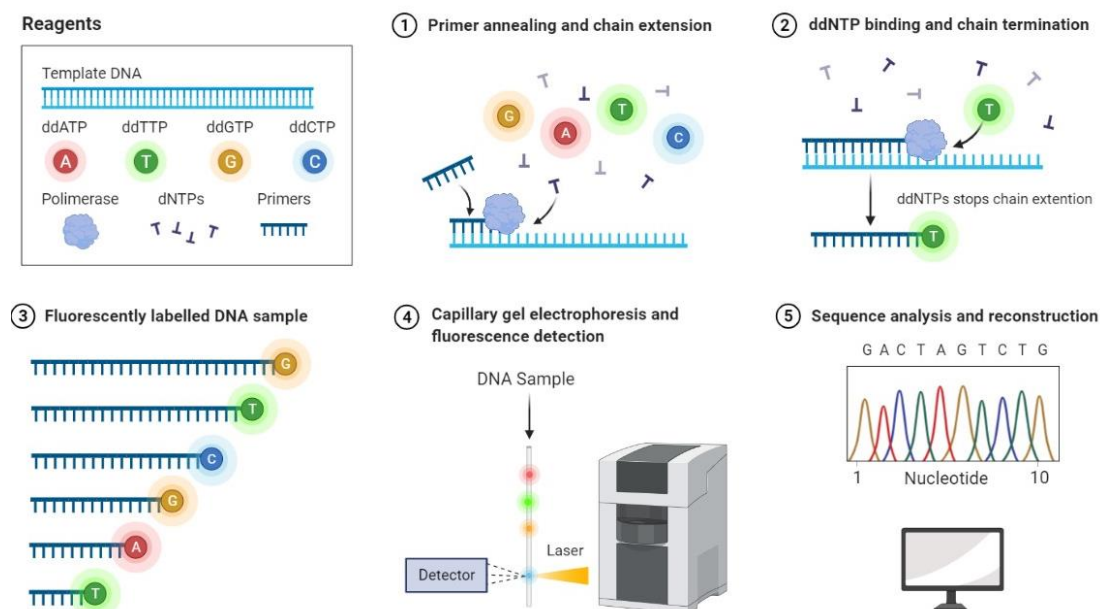
2.9.5 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η μοριακή αναγνώριση και ταξινόμηση των μακροοργανισμών μέσω αλληλούχησης κατά Sanger, προϋπέθετε την προετοιμασία ενός 96-well-plate, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρείας.

Τα συστατικά που απαιτούνται για την λειτουργία της *in vitro* αυτή ενζυμικής διεργασίας είναι (α) ένα DNA εκμαγείο, (β) η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση, (γ) το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, (δ) ένας εκκινητής (ή ζεύγος εκκινητών), που οριοθετεί το τμήμα DNA που αλληλουχείται και (ε) μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs), σε κατάλληλη αναλογία. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην χρήση των χημικών αναλόγων των dNTPs, των ddNTPs από τα οποία απουσιάζει η 3'-OH. Έτσι, μόλις η DNA πολυμεράση ενσωματώσει ένα ddNTP στο νεοσυντιθέμενο μόριο, σταματά η περαιτέρω επιμήκυνσή του καθώς δεν μπορεί να δημιουργηθεί ο 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός. Η διαδικασία της αλληλούχησης περιλαμβάνει διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης του DNA, υβριδισμού των εκκινητών και επιμήκυνσης τους από την DNA πολυμεράση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η σύνθεση πολλών, μονόκλωνων, ολιγονουκλεοτιδικών μορίων τα οποία διαφέρουν σε μήκος και στο καταληκτικό ddNTP (Zhang, et al, 2014).

Τα σύγχρονα συστήματα αλληλούχησης κατά Sanger στηρίζονται στην χρήση ddNTPs που είναι σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ολιγονουκλεοτίδια να φέρουν στο 3' άκρο τους ένα φθοροφόρο. Επιπλέον, ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται μέσω τριχοειδών συστημάτων, που επιτρέπουν τον παράλληλο χειρισμό 96 δειγμάτων (96-well-plate) ή παραπάνω. Στα τριχοειδή τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους, με τα μικρότερα να κινούνται γρηγορότερα και άρα να φτάνουν πρώτα στον ανιχνευτή. Εκεί η φθορίζουσα χρωστική κάθε ολιγονουκλεοτιδίου διεγείρεται μέσω laser, η εκπομπή φθορισμού ανιχνεύεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή και

κατάλληλα λογισμικά παράγουν ένα χρωματογράφημα, όπου κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε ένα νουκλεοτίδιο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανασύνθεση της αλληλουχίας του DNA (Εικ.22) (Zhang, et al, 2014).

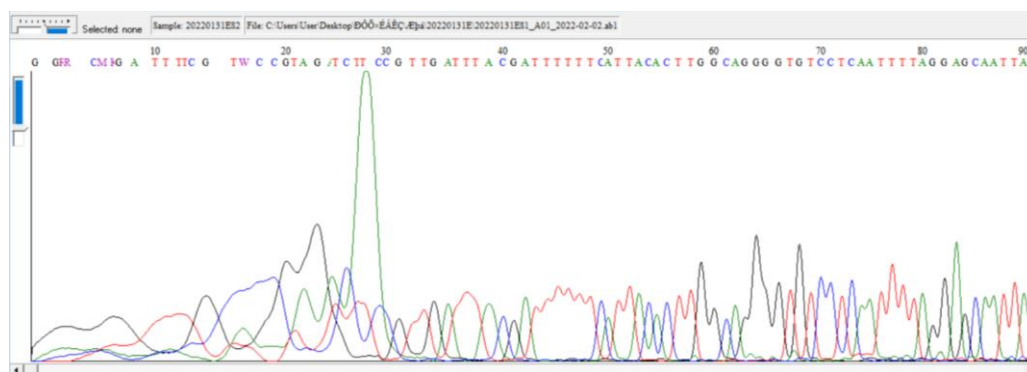


Εικόνα 22: Διαδικασία αλληλούχησης κατά Sanger. (1) Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, υβριδισμός του εκκινητή και πρόσδεση της Taq DNA πολυμεράσης. (2) Σύνθεση του νέου μορίου μέσω δράσης της πολυμεράσης, η οποία ενσωματώνει τυχαία τα νουκλεοτίδια. Η πρόσδεση ενός ddNTP σημασμένου με φθοροφόρο τερματίζει την επιμήκυνση (η συγκέντρωση των ddNTPs είναι μικρότερη αυτής των dNTPs). (3) Δημιουργία μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων διαφορετικού μήκους, τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική στο 3' άκρο τους. (4) Διαχωρισμός των μορίων με βάση την μάζα τους σε τριχοειδή συστήματα και διέγερση των φθοροφόρων με laser. (5) Μετατροπή του σήματος που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή σε χρωματογράφημα (<https://www.genscript.com/gene-news/sanger-sequencing-vs-next-generation-sequencing.html?scr=homenews>).

2.9.6 Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων

Από την αλληλούχηση κατά Sanger προέκυψαν χρωματογραφήματα. Γενικότερα, αυτά είναι υψηλής ποιότητας όταν φέρουν ευδιάκριτες κορυφές, ίσου ύψους, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια. Ωστόσο, μετά από ανάλυσή τους μπορεί να παρατηρηθούν κάποιες λιγότερο καλά χαρακτηρισμένες περιοχές εξαιτίας κακής αλληλούχησης, κυρίως

στην αρχή και τέλος τους. Επιπλέον, καθ' όλο το μήκος μιας αλληλουχίας μπορεί να υπάρχουν βάσεις που το μηχάνημα αλληλούχησης δεν κατάφερε να προσδιορίσει (σημειώνονται με N, W, κ.). Τα παραπάνω μειώνουν σημαντικά την ορθότητα και αξιοπιστία της αλληλούχησης και κατά συνέπεια πρέπει να απομακρυνθούν (Εικ.23). Η επεξεργασία τους για την παραγωγή αλληλουχιών DNA υψηλής ποιότητας, έγινε με το πρόγραμμα BioEdit (Hall, 1999).



Εικόνα 23: Το χρωματογράφημα χαρακτηρίζεται από χαμηλή ποιότητα στις πρώτες βάσεις του, όπου οι κορυφές αλληλοεπικαλύπτονται και δεν είναι ίσου ύψους, ενώ αρκετές από αυτές δεν αντιστοιχούν σε κάποιο νουκλεοτίδιο (R, M, K, W). Συνεπώς, με κατάλληλη επεξεργασία τα πρώτα 39 νουκλεοτίδια πρέπει να απομακρυνθούν. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας.

Μετά την επεξεργασία τους, οι αλληλουχίες επιστράφηκαν σε μορφή fasta και χρησιμοποιήθηκαν για την αντιστοίχισή τους με οργανισμούς μέσω του του αλγορίθμου BLAST (Madden, et al., 1996). Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα αποτελεί ένα διαδικτυακό εργαλείο αναζήτησης, που συγκρίνει νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες τις οποίες εισάγει ο χειριστής (query), με βιολογικές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων, υπολογίζοντας τελικά μια σειρά από παραμέτρους. Κάποιες από τις σημαντικότερες είναι τα ποσοστά ομοιότητας (Per.Ident.) και αλληλοεπικάλυψης (Query Cover) των αλληλουχιών, τα οποία πρέπει να είναι υψηλά ώστε να θεωρηθεί μια αντιστοίχιση αξιόπιστη. Επιπλέον, το E-value είναι ένας αριθμός που περιγράφει την πιθανότητα η αντιστοίχιση μεταξύ των αλληλουχιών να είναι τυχαία και άρα όσο μικρότερος είναι, τόσο πιο αξιόπιστο το αποτέλεσμα.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τις διάφορες παραμέτρους, έγινε τελικά η ταξινόμηση των οργανισμών σε επίπεδο οικογένειας (Πιν.8). Στην περιοχή Γυρτώνη Ανάντη δεν εντοπίστηκε κανένα ταχα των βενθικών μακροασπόνδυλων.

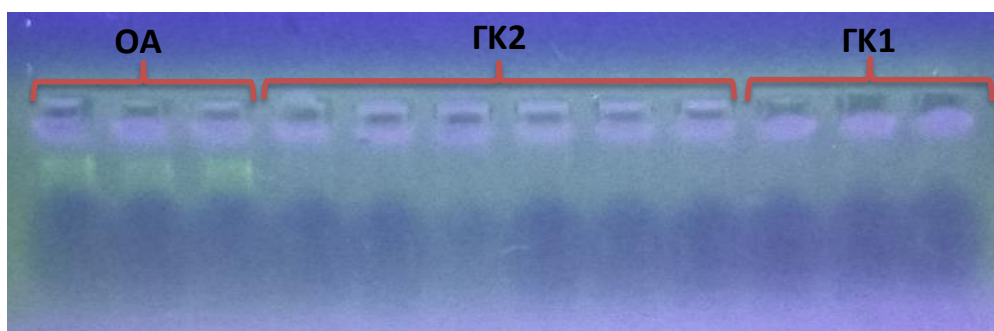
Πίνακας 8: Οικογένειες ανά σημείο δειγματοληψίας.

Ομόλιο Ανάντη	Ομόλιο Κατάντη 1	Ομόλιο Κατάντη 2	Γυρτώνη Κατάντη 1	Γυρτώνη Κατάντη 2
Atyidae	Atyidae	Asellidae	Atyidae	Atyidae
Baetidae	Chironomidae	Atyidae	Chironomidae	Chironomidae
Caenidae	Gammaridae	Chironomidae		Coenagrionidae
Chironomidae	Naididae	Corophiidae		
Corixidae		Erpobdellidae		
Gammaridae		Gammaridae		
Libellulidae		Physidae		
		Platycnemididae		

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της απομόνωσης DNA από τα δείγματα έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης όλων των επαναλήψεων κάθε δείγματος σε πηκτική αгарόζης 1,5% (Εικ.24). Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις Γυρτώνη περιοχές δεν παρατηρήθηκαν ζώνες, κάτι που μπορεί να οφείλεται τόσο στην μικρή και μειωμένης καθαρότητας ποσότητα DNA που μπορεί αυτά να έφεραν, όσο και στην χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 24: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης απομονωμένου DNA από περιβαλλοντικά δείγματα.

3.2 Φωτομέτρηση DNA

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA, ακολούθησε η φωτομέτρηση όλων των επαναλήψεων κάθε δείγματος (Πιν.9). Βάσει των αποτελεσμάτων, παρατηρείται πως σε γενικές γραμμές οι συγκεντρώσεις και οι λόγοι καθαρότητας του απομονωμένου DNA από τις Γυρτώνη περιοχές είναι αρκετά χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές του Ομόλιου.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων (ng/ul) και λόγων καθαρότητας (A_{260}/A_{280}) από την φωτομέτρηση των επαναλήψεων των δειγμάτων

Δείγμα	ng/ul	A_{260}/A_{280}
(S1) OA	(1) 8,4	1,73
	(2) 8,8	1,66
	(3) 17,3	1,52
(S2) OK1	(1) 21,8	1,53

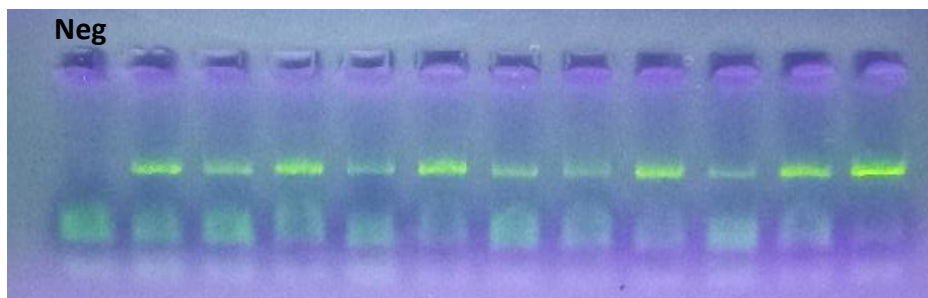
	(2) 17,3 (3) 10,4 (4) 28,4	1,71 1,84 1,76
(S3) OK2	(1) 8,4 (2) 11,5 (3) 6,9 (4) 14,6	1,73 1,44 1,59 1,71
(S4) OA 1/5	(1) 25,2 (2) 25,4 (3) 34,0	1,66 1,69 1,49
(S5) OK1 1/5	(1) 14,9 (2) 8,6 (3) 9,9 (4) 5,6	1,81 1,77 1,84 1,88
(S6) OK2 1/5	(1) 10,4 (2) 9,5 (3) 14,7	1,73 1,85 1,62
(S7) ΓΑ	(1) 5,7 (2) 2,2 (3) 6,8 (4) 7,7	1,20 1,67 1,36 1,89
(S8) ΓΚ1	(1) 5,5 (2) 5,0 (3) 3,9 (4) 7,3	1,40 1,80 1,74 1,46
(S9) ΓΚ2	(1) 4,6 (2) 9,4 (3) 4,9 (4) 3,8 (5) 5,8	1,51 1,27 1,83 1,52 1,91
(S10) ΓΑ 1/5	(1) 6,7 (2) 3,2 (3) 5,0	1,39 1,58 1,54
(S11) ΓΚ1 1/5	(1) 23,9	1,39

	(2) 17,3	1,25
	(3) 1,9	1,55
(S12) ΓΚ2 1/5	(1) 3,4	1,49
	(2) 3,2	1,35
	(3) 7,6	1,38
	(4) 4,0	1,34

3.3 Μακροοργανισμοί

3.3.1 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

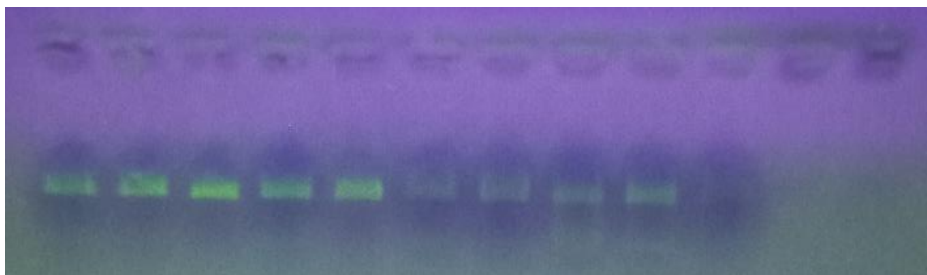
Την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *COI* με PCR, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πηκτή αγαρόζης 2,5% (Εικ.25).



Εικόνα 25: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR. Με βάση τον αρνητικό μάρτυρα (Neg) δεν υπήρξε επιμόλυνση.

3.3.2 Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων προϊόντων PCR

Για την επιβεβαίωση της απομάκρυνσης των διμερών των εκκινητών από τα δείγματα μετά τον καθαρισμό τους, έγινε ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης 2% (Εικ.26).



Εικόνα 26: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR μετά τον καθαρισμό τους.

3.6 Κλασική ταξινόμηση

Η αναγνώριση και ταξινόμηση των βενθικών μακροασπόνδυλων βάσει των μορφολογικών και ανατομικών τους χαρακτηριστικών, έγινε από το Εργαστήριο Υδρολογίας & Υδραυλικών Έργων του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Η ταξινόμηση έγινε κατά κύριο λόγο σε επίπεδο οικογένειας, με μικρές μόνο παρεκκλίσεις (*Araneae*, *Hydracarina*, *Lepidoptera*, *Nematoda*, *Oligochaeta*, *Ostracoda*, *Pupae*) (Πιν.10). Τα είδη *Branchiura sowerbyi* και *Chironomus plumosus*, ανήκουν στις Οικογένειες *Naididae* και *Chironomidae*, αντίστοιχα. Μεταξύ των οργανισμών, παρατηρήθηκαν και άδεια κελύφη γαστερόποδων. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν, στην συνέχεια, για σύγκριση με αυτά από την μοριακή ταξινόμηση, με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας κάθε μεθόδου.

Πίνακας 10: Ταξα και αριθμός ατόμων ανά ταξα για κάθε σημείο δειγματοληψίας, βάσει της κλασικής ταξινόμησης.

Taxa	Ομόλιο	Ομόλιο	Ομόλιο	Γυρτώνη	Γυρτώνη	Γυρτώνη
	Ανάντη	Κατάντη	Κατάντη	Ανάντη	Κατάντη	Κατάντη
		1	2		1	2
Asellidae	0	0	6	0	0	0
Atyidae	12	2	8	0	1	13
Araneae	0	1	0	0	0	0
Baetidae	14	0	1	0	4	1
<i>Branchiura sowerbyi</i>	4	4	1	4	0	0
Caenidae	1	1	8	0	1	0
Calopterygidae	0	3	1	0	0	0
Ceratopogonidae	3	1	2	0	1	0
Chironomidae	88	187	80	2	131	24
<i>Chironomus plumosus</i>	0	0	0	0	1	0
Coenagrionidae	11	0	7	0	0	8
Corixidae	6	2	0	0	0	1
Dixidae	0	1	0	0	0	0
Dolichopodidae	0	0	0	0	1	0
Elmidae (ad)	0	0	2	0	0	0

Empty shells (Neritidae)	0	1	0	0	0	0
Empty shells (Valvatidae)	0	1	0	2	1	0
Empty shells (Melanopsidae)	0	1	0	0	0	0
Ephemeridae	0	1	0	0	0	0
Gammaridae	1	225	21	0	0	0
Gomphidae	0	1	0	0	0	0
Haliplidae	5	1	0	0	0	0
Hydracarina	1	0	0	0	0	0
Hydrophilidae	0	0	0	1	0	0
Hydropsychidae	0	0	0	0	2	0
Leptophlebiidae	0	0	1	0	0	0
Leptoceridae	0	1	0	0	0	0
Lepidoptera	0	1	0	0	0	0
Libellulidae	0	0	0	0	0	1
Lymnaeidae	0	1	0	0	0	0
Mesoveliidae	1	0	0	0	0	0
Nematoda	0	0	0	0	0	1
Oligochaeta	226	182	59	9	79	4
Ostracoda	0	0	0	0	4	1
Platycnemididae	2	0	1	0	1	0
Polycentropodidae	0	0	1	0	0	0
Physidae	6	3	9	0	3	2
Pupae	3	0	0	0	0	2
Unionidae	0	1	0	0	0	0
Sphaeriidae	0	1	0	0	0	0
Simuliidae	0	0	0	0	1	0

3.7 Μοριακή ταξινόμηση

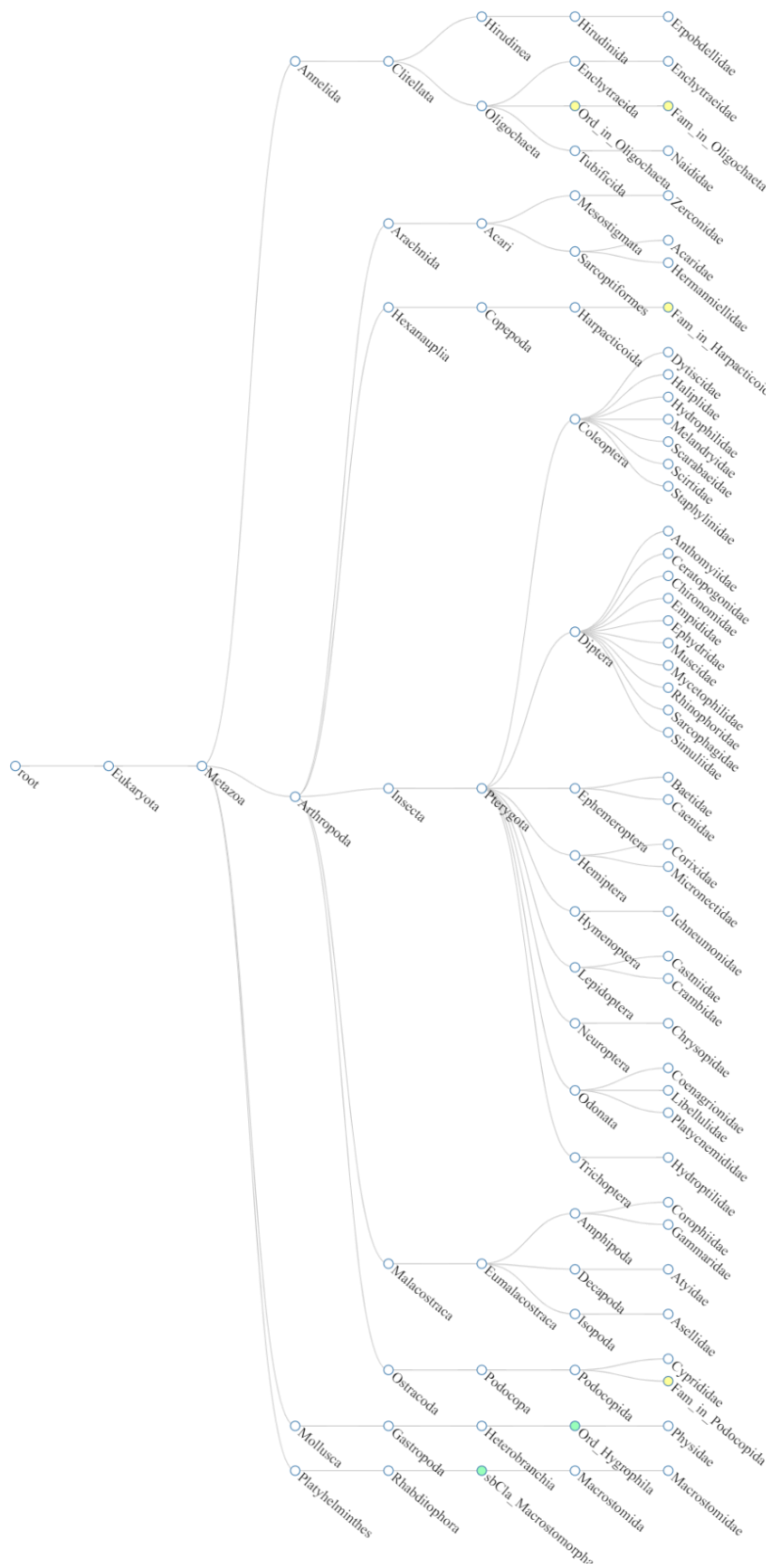
Η μοριακή ταξινόμηση των βενθικών μακροασπόνδυλων έγινε με αλληλούχηση (Illumina, Sanger) ενός τμήματος του γονιδίου-δείκτη *COI*. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει κάποια αξιόπιστη βάση δεδομένων για τα είδη των βενθικών μακροασπόνδυλων που απαντώνται στην Ελλάδα, καθώς και για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα της μοριακής ταξινόμησης με τα αντίστοιχα της κλασικής, η ταξινόμηση έγινε σε επίπεδο οικογένειας (Πιν.11).

Πίνακας 11: Ταχα και αριθμός ατόμων ανά ταχα για κάθε σημείο δειγματοληψίας, βάσει της μοριακής ταξινόμησης.

Taxa	Ομόλοιο	Ομόλοιο	Ομόλοιο	Γυρτώνη	Γυρτώνη	Γυρτώνη
	Ανάτη	Κατάτη	Κατάτη	Ανάτη	Κατάτη	Κατάτη
		1	2		1	2
Acaridae	0	0	15	0	0	0
Anthomyiidae	0	14	0	0	0	0
Asellidae	0	0	1	0	0	0
Atyidae	3	1	2	0	6	9
Baetidae	2	0	0	0	217	0
Caenidae	527	0	0	0	0	0
Castniidae	272	0	0	0	0	0
Ceratopogonidae	2046	0	0	0	0	0
Chironomidae	7763	9171	16136	677	11522	3685
Chrysopidae	0	0	0	0	2	0
Coenagrionidae	0	0	4	0	0	7
Corixidae	1	0	0	0	0	0
Corophiidae	0	0	1	0	0	0
Crambidae	0	425	0	0	0	0
Cyprididae	0	0	0	0	122	0
Dytiscidae	0	0	0	0	0	163
Empididae	0	38	0	0	0	0
Enchytraeidae	0	0	0	0	0	12
Ephydriidae	0	0	0	161	451	0
Erpobdellidae	0	0	2	0	0	0

Gammaridae	1	38	15	0	0	0
Haliplidae	1145	0	0	0	0	23
Hermannellidae	0	0	0	0	41	0
Hydrophilidae	0	0	0	492	0	0
Hydroptilidae	29	345	12	0	0	0
Ichneumonidae	9	0	0	0	0	0
Libellulidae	1	0	0	0	0	0
Macrostomidae	29	0	24	0	0	0
Melandryidae	242	0	0	0	16	0
Micronectidae	240	0	0	0	0	0
Muscidae	0	0	0	0	29	0
Mycetophilidae	0	580	0	0	0	0
Naididae	1511	5688	694	0	305	0
Oligochaeta	138	0	0	0	0	0
Harpacticoida	0	0	9	0	0	0
Podocopida	0	0	0	0	0	3
Physidae	1077	28	800	0	80	0
Platycnemididae	0	0	1	0	0	0
Rhinophoridae	0	0	98	0	0	0
Sarcophagidae	4231	0	0	0	0	0
Scarabaeidae	466	0	0	0	0	64
Scirtidae	0	0	0	0	18	0
Simuliidae	0	42	0	0	0	0
Staphylinidae	0	0	0	0	39	0
Zerconidae	0	0	16	0	0	0

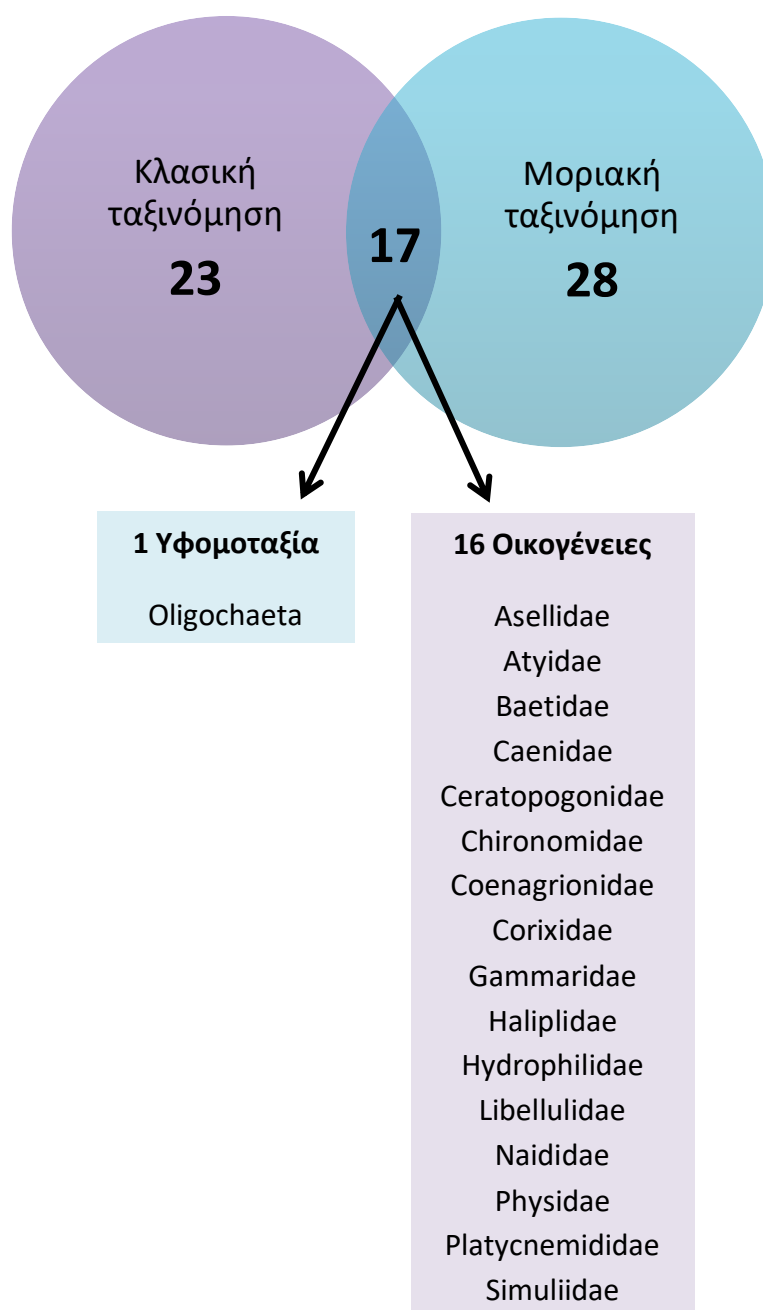
Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων στις ταξινομικές βαθμίδες Επικράτεια; Βασίλειο; Φύλο; Ομοταξία; Υφομοταξία; Τάξη; Οικογένεια, έγινε με το Taxallnomy (Εικ.27).



Εικόνα 27: Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης μέσω του Taxallnomy.

3.8 Σύγκριση κλασικής & μοριακής ταξινόμησης

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της κλασικής και μοριακής ταξινόμησης έγινε σε επίπεδο οικογένειας-κατά κύριο λόγο. Έτσι, βρέθηκε ότι 23 taxa εντοπίστηκαν μόνο από την κλασική μέθοδο, 28 μόνο από την μοριακή, ενώ 17 taxa (1 Υφομοταξία, 16 Οικογένειες) και από τις δύο (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Venn με τον αριθμό των μοναδικών και κοινών taxa για τις δύο μεθόδους ταξινόμησης.

3.9 Παρατηρούμενα γεωγραφικά μοτίβα

Τα 45 taxa που εντοπίστηκαν με τις μοριακές μεθόδους, δεν είναι εξίσου κατανεμημένα μεταξύ των περιοχών Γυρτώνη και Ομόλιο. Αντ' αυτού παρουσιάζουν ορισμένα γεωγραφικά μοτίβα. Πιο συγκεκριμένα, 11 taxa παρατηρούνται μόνο στην Γυρτώνη, 25 μόνο στο Ομόλιο, ενώ τα υπόλοιπα 9 είναι κοινά μεταξύ των δύο περιοχών. Επιπρόσθετα, τα taxa αυτά δεν εμφανίζονται σε κάθε σημείο δειγματοληψίας (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2), αλλά επίσης παρουσιάζουν ένα μοτίβο κατανομής (Πιν.12).

Πίνακας 12: Παρατηρούμενα γεωγραφικά μοτίβα των taxa στα διάφορα σημεία δειγματοληψίας των περιοχών Γυρτώνη και Ομόλιο.

Γεωγραφικά Μοτίβα	Γυρτώνη	Ομόλιο
Taxa που εμφανίζονται μόνο στην Ανάντη περιοχή	1	13
Taxa που εμφανίζονται μόνο στην Κατάντη1 περιοχή	10	5
Taxa που εμφανίζονται μόνο στην Κατάντη 2 περιοχή	6	9
Taxa που εμφανίζονται μόνο στην Κατάντη περιοχή	1	0
Taxa που εμφανίζονται στις Ανάντη και Κατάντη 1 περιοχές	1	0
Taxa που εμφανίζονται στις Ανάντη και Κατάντη 2 περιοχές	0	1
Taxa που εμφανίζονται στις Ανάντη και Κατάντη περιοχές	1	6

3.10 Σύγκριση σταθμών Γυρτώνης

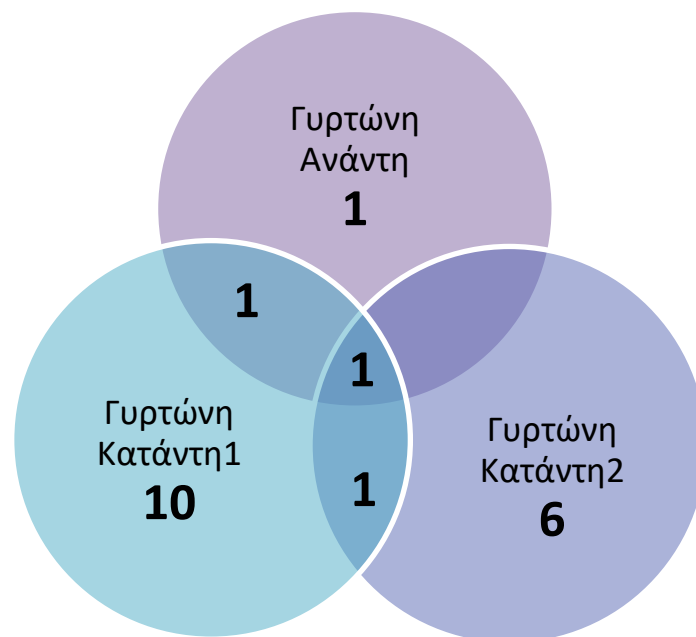
Βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης έγινε σύγκριση των σταθμών της Γυρτώνης ως προς τα taxa που εντοπίστηκαν σε αυτούς. Προκύπτει, λοιπόν, ότι στην Ανάντη περιοχή εντοπίζονται 3 taxa, 13 στην Κατάντη 1 και 8 στην Κατάντη 2 (Πιν.13).

Πίνακας 13: Taxa ανά σημείο δειγματοληψίας στην περιοχή της Γυρτώνης.

Γυρτώνη Ανάντη	Γυρτώνη Κατάντη 1	Γυρτώνη Κατάντη 2
Chironomidae	Atyidae	Atyidae
Ephydriidae	Baetidae	Chironomidae
Hydrophilidae	Chironomidae	Coenagrionidae
	Chrysopidae	Dytiscidae

	Cyprididae	Enchytraeidae
	Ephydriidae	Haliplidae
	Hermanniellidae	Podocopida
	Melandryidae	Scarabaeidae
	Muscidae	
	Naididae	
	Physidae	
	Scirtidae	
	Staphylinidae	

Ειδικότερα, η οικογένεια *Hydrophilidae* εντοπίστηκε μόνο στην περιοχή ΓΑ, οι οικογένειες *Baetidae*, *Chrysopidae*, *Cyprididae*, *Hermanniellidae*, *Melandryidae*, *Muscidae*, *Naididae*, *Physidae*, *Scirtidae* και *Staphylinidae* μόνο στην ΓΚ1, ενώ οι οικογένειες *Coenagrionidae*, *Dystiscidae*, *Enchytraeidae*, *Haliplidae*, και *Scarabaeidae* και η τάξη των *Podocopida* μόνο στην ΓΚ2. Η οικογένεια *Ephydriidae* ήταν κοινή για τις περιοχές ΓΑ και ΓΚ1, η οικογένεια *Atyidae* ήταν κοινή για τις ΓΚ1 και ΓΚ2, ενώ η οικογένεια *Chironomidae* εντοπίστηκε και στις 3 περιοχές (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα Venn με τα μοναδικά και κοινά taxa για τους σταθμούς της Γυρτώνης.

3.11 Σύγκριση σταθμών Ομολίου

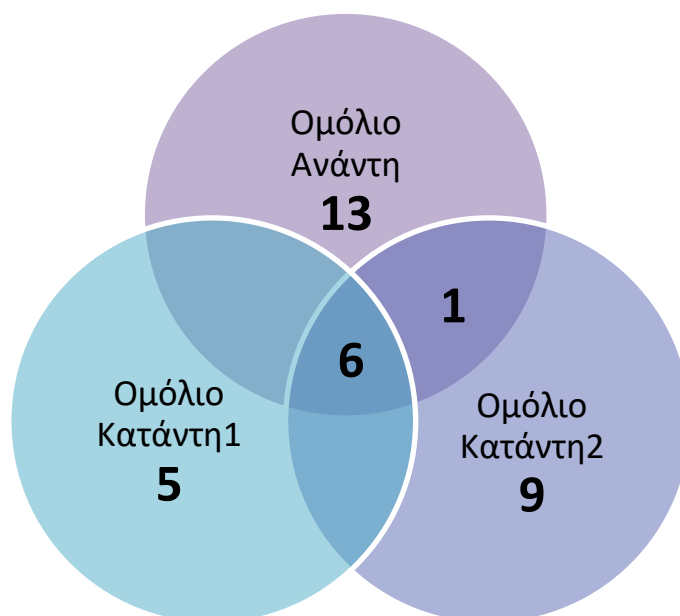
Βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης έγινε σύγκριση των σταθμών του Ομολίου ως προς τα taxa που εντοπίστηκαν σε αυτούς. Προκύπτει, λοιπόν, ότι στην Ανάντη περιοχή εντοπίζονται 20 taxa, 11 στην Κατάντη 1 και 16 στην Κατάντη 2 (Πιν.14).

Πίνακας 14: Taxa ανά σημείο δειγματοληψίας στην περιοχή του Ομολίου.

Ομόλιο Ανάντη	Ομόλιο Κατάντη 1	Ομόλιο Κατάντη 2
Atyidae	Anthomyiidae	Acaridae
Baetidae	Atyidae	Asellidae
Caenidae	Chironomidae	Atyidae
Castniidae	Crambidae	Chironomidae
Ceratopogonidae	Empididae	Coenagrionidae
Chironomidae	Gammaridae	Corophiidae
Corixidae	Hydroptilidae	Erpobdellidae
Gammaridae	Mycetophilidae	Gammaridae
Haliplidae	Naididae	Hydroptilidae
Hydroptilidae	Physidae	Macrostomidae
Ichneumonidae	Simuliidae	Naididae
Libellulidae		Harpacticoida
Macrostomidae		Physidae
Melandryidae		Platycnemididae
Micronectidae		Rhinophoridae
Naididae		Zerconidae
Oligochaeta		
Physidae		
Sarcophagidae		
Scarabaeidae		

Ειδικότερα, οι οικογένειες *Baetidae*, *Caenidae*, *Castniidae*, *Ceratopogonidae*, *Corixidae*, *Haliplidae*, *Ichneumonidae*, *Libellulidae*, *Melandryidae*, *Micronectidae*, *Sarcophagidae* και *Scarabaeidae* και η υφομοταξία των *Oligochaeta* εντοπίστηκαν μόνο στην περιοχή ΟΑ, οι οικογένειες *Anthomyiidae*, *Crambidae*, *Empididae*, *Mycetophilidae* και *Simuliidae* μόνο στο

OK1, ενώ οι οικογένειες *Acaridae*, *Asellidae*, *Coenagrionidae*, *Corophiidae*, *Erpobdellidae*, *Platycnemididae*, *Rhinophoridae* και *Zerconidae* και η τάξη των *Harpacticoida* μόνο στο OK2. Η οικογένεια *Macrostomidae* ήταν κοινή για τις περιοχές OA και OK2, ενώ οι οικογένειες *Atyidae*, *Chironomidae*, *Gammaridae*, *Hydroptilidae*, *Naididae* και *Physidae* εντοπίστηκαν και στις 3 περιοχές (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα Venn με τα μοναδικά και κοινά taxa για τους σταθμούς του Ομόλιου.

3.12 Σύγκριση των περιοχών Γυρτώνης & Ομόλιου

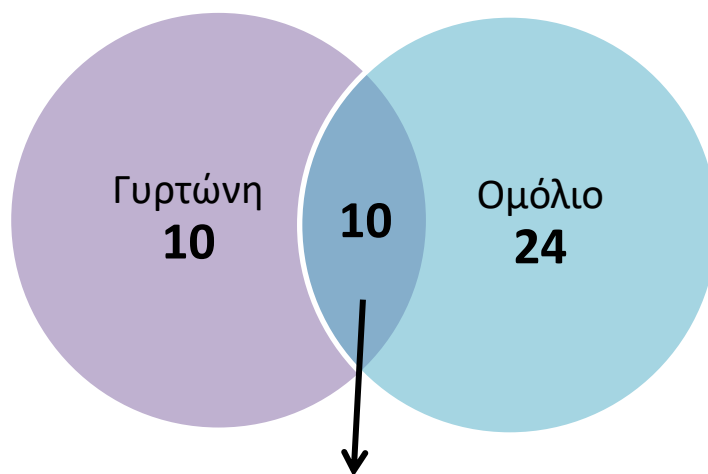
Από την σύγκριση μεταξύ των περιοχών Γυρτώνης και Ομόλιου προκύπτει ότι 20 taxa εντοπίζονται στην Γυρτώνη, ενώ 34 στο Ομόλιο (Πιν. 15).

Πίνακας 15: Taxa που εμφανίζονται στις περιοχές Γυρτώνη και Ομόλιο.

Γυρτώνη	Ομόλιο
Atyidae	Acaridae
Baetidae	Anthomyiidae
Chironomidae	Asellidae
Chrysopidae	Atyidae
Coenagrionidae	Baetidae
Cyprinidae	Caenidae

Dytiscidae	Castniidae
Enchytraeidae	Ceratopogonidae
Ephydriidae	Chironomidae
Haliplidae	Coenagrionidae
Hermannellidae	Corixidae
Hydrophilidae	Corophiidae
Melandryidae	Crambidae
Muscidae	Empididae
Naididae	Erpobdellidae
Podocopida	Gammaridae
Physidae	Haliplidae
Scarabaeidae	Hydroptilidae
Scirtidae	Ichneumonidae
Staphylinidae	Libellulidae
	Macrostomidae
	Melandryidae
	Micronectidae
	Mycetophilidae
	Naididae
	Oligochaeta
	Harpacticoida
	Physidae
	Platycnemididae
	Rhinophoridae
	Sarcophagidae
	Scarabaeidae
	Simuliidae
	Zerconidae

Πιο συγκεκριμένα, 10 taxa εντοπίστηκαν μόνο στην περιοχή της Γυρτώνης, 24 μόνο στο Ομόλιο, ενώ 10 βρέθηκαν κοινά και στις δύο περιοχές (Διάγραμμα 4).



10 Οικογένειες

- Atyidae
- Baetidae
- Chironomidae
- Coenagrionidae
- Halplidae
- Hydrophilidae
- Melandryidae
- Naididae
- Physidae
- Scarabaeidae

Διάγραμμα 4: Διάγραμμα Venn με τον αριθμό των μοναδικών και κοινών taxa ανάμεσα στις περιοχές Γυρτώνη και Ομόλιο.

3.13 α-diversity κλασικής & μοριακής ταξινόμησης

Ο δείκτης βιοποικιλότητας α-diversity υπολογίστηκε για κάθε σημείο δειγματοληψίας για τα αποτελέσματα της κλασικής (Πιν.16) και μοριακής ταξινόμησης (Πιν.17).

Πίνακας 16: α-diversity κλασικής ταξινόμησης.

Περιοχή	Sobs	Shannon	Simpson	invSimpson
Γυρτώνη Ανάντη	5	1.329	0.287	3.477
Γυρτώνη Κατάντη 1	15	1.123	0.437	2.288

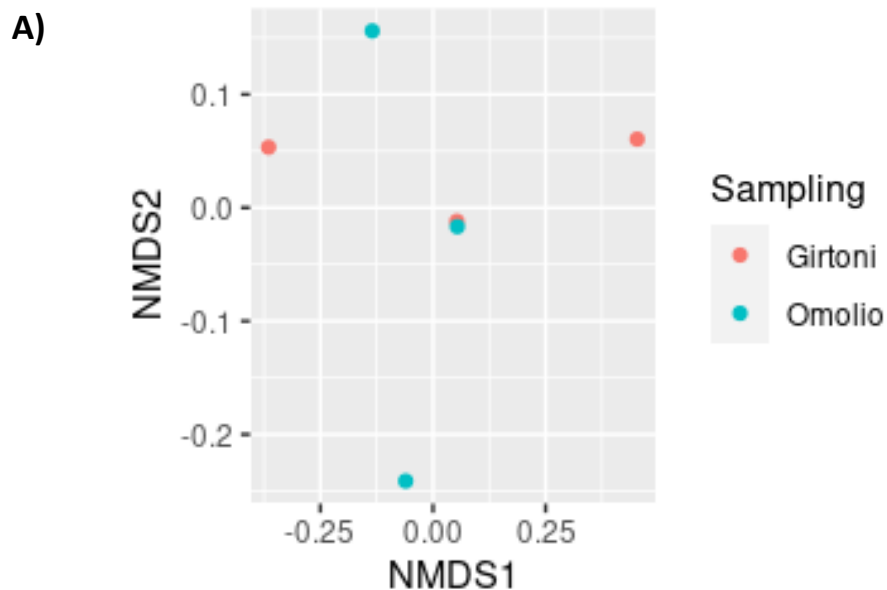
Γυρτώνη Κατάντη 2	11	1.740	0.235	4.238
Ομόλιο Ανάντη	17	1.390	0.401	2.491
Ομόλιο Κατάντη 1	24	1.367	0.304	3.279
Ομόλιο Κατάντη 2	16	1.802	0.242	4.131

Πίνακας 17: α -diversity μοριακής ταξινόμησης.

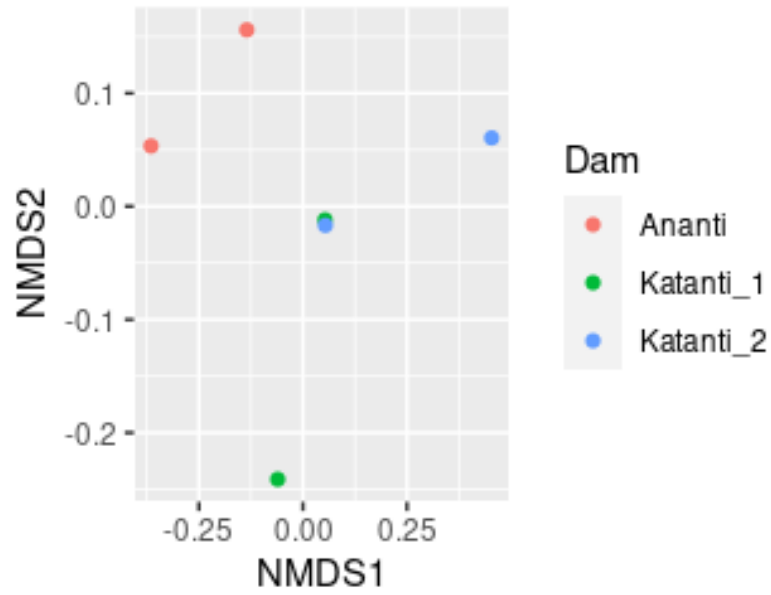
Περιοχή	Sobs	Shannon	Simpson	invSimpson
Γυρτώνη Ανάντη	3	0.967	0.410	2.438
Γυρτώνη Κατάντη 1	11	0.497	0.812	1.230
Γυρτώνη Κατάντη 2	7	0.322	0.870	1.148
Ομόλιο Ανάντη	15	1.862	0.225	4.431
Ομόλιο Κατάντη 1	10	1.039	0.438	2.282
Ομόλιο Κατάντη 2	9	0.410	0.825	1.210

3.14 β -diversity κλασικής & μοριακής ταξινόμησης

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των δειγμάτων (β -diversity) ως προς την περιοχή συλλογής τους και την θέση ως προς το φράγμα παρουσιάζονται με την μορφή διαγραμμάτων NMDS και Box plots, για τα αποτελέσματα της κλασικής (Διάγραμμα 5, 7) και μοριακής μεθόδου (Διάγραμμα 6, 8).

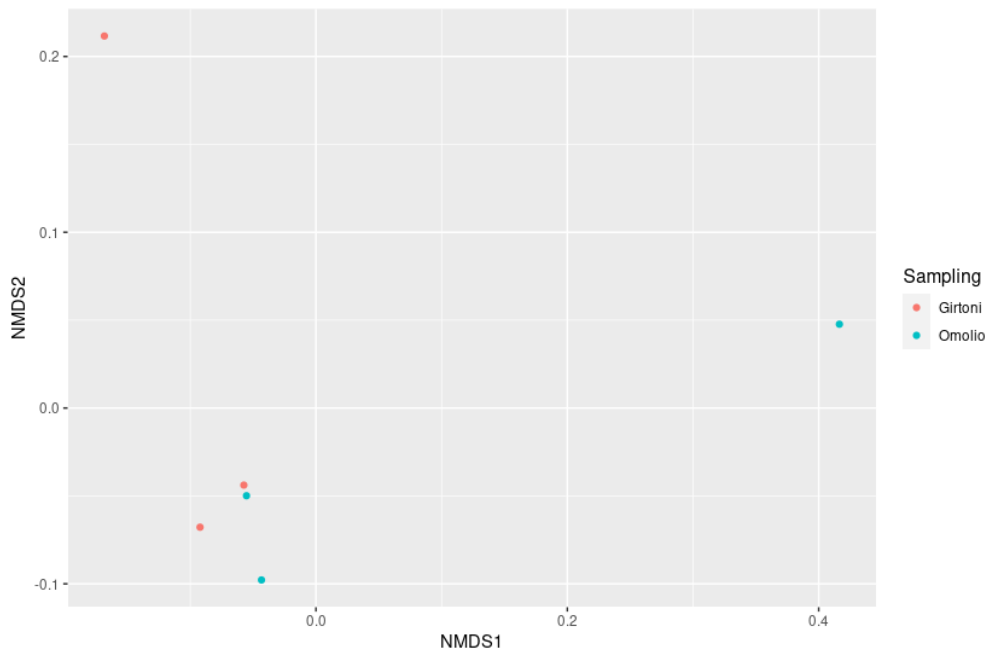


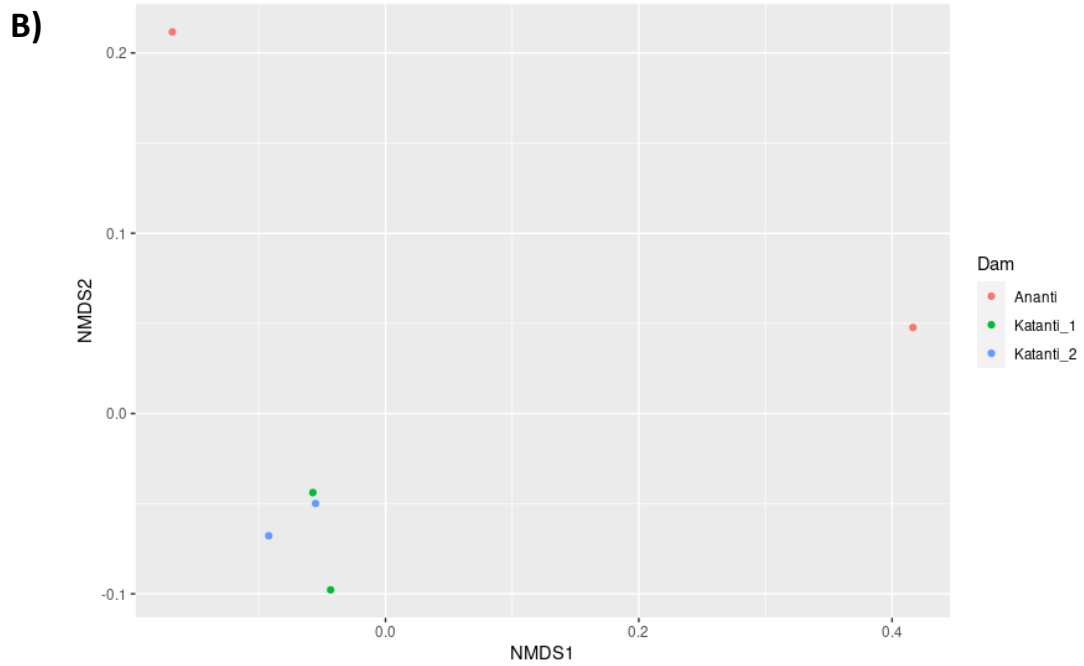
B)



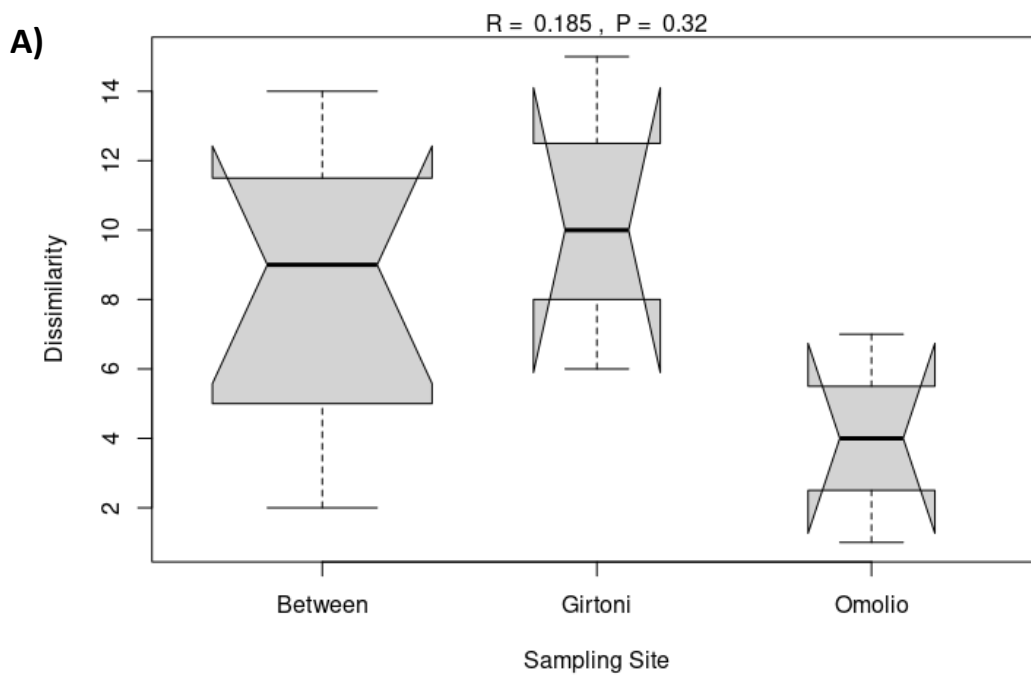
Διάγραμμα 5: Διαγράμματα NMDS βάσει των αποτελεσμάτων της κλασικής ταξινόμησης. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (A) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και (B) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2).

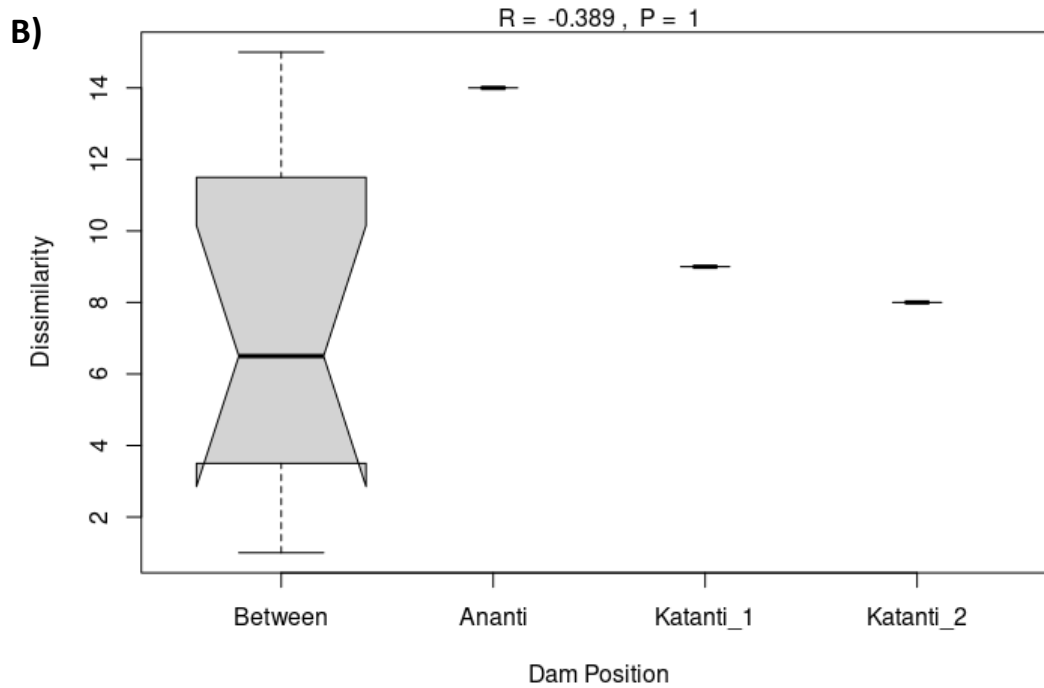
A)



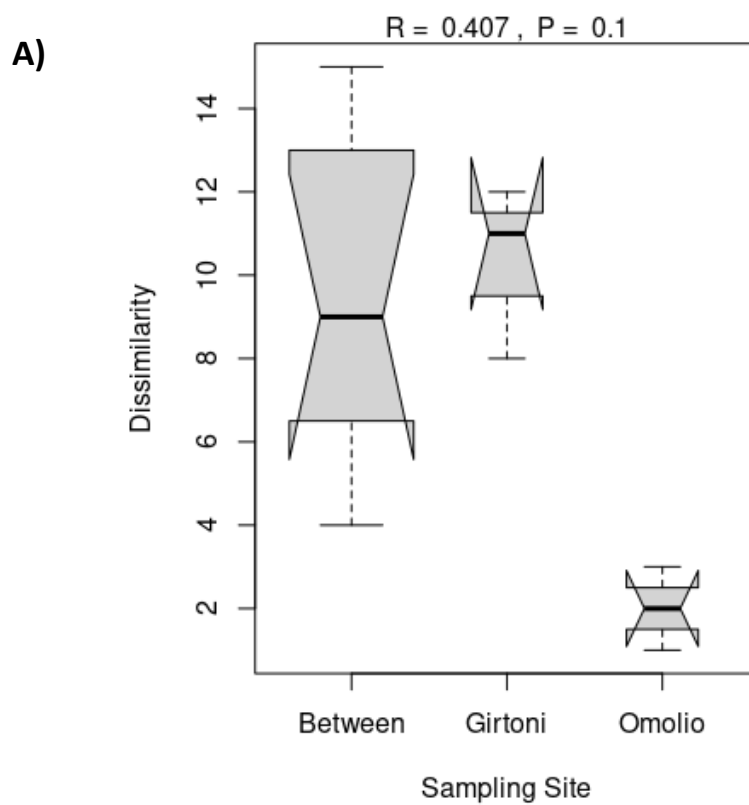


Διάγραμμα 6: Διαγράμματα NMDS βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (A) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και (B) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2).

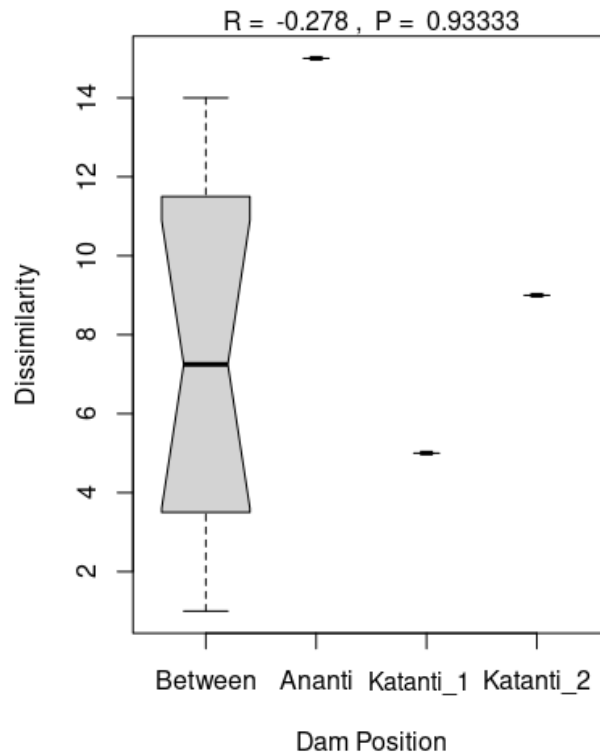




Διάγραμμα 7: Box plots βάσει των αποτελεσμάτων της κλασικής ταξινόμησης. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (A) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και (B) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2).



B)



Διάγραμμα 8: Box plots βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (Α) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και (Β) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάτη, Κατάτη 1, Κατάτη 2).

3.15 Μελέτη επίδρασης της εποχικότητας στην βιοποικιλότητα

Τα δείγματα τα οποία λήφθηκαν κατά την χειμερινή περίοδο (4/10/2021), συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της καλοκαιρινής περιόδου (14/4/2021) (Πιν.18) για την μελέτη της επίδρασης της εποχικότητας στην βιοποικιλότητα. Για τον σκοπό αυτό, έγινε υπολογισμός του α-diversity των δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Πιν.19), καθώς και του β-diversity (Διάγραμμα 9, 10).

Πίνακας 18: Ταχα και αριθμός ατόμων ανά ταχα για κάθε σημείο δειγματοληψίας, βάσει της μοριακής ταξινόμησης για τα καλοκαιρινά δείγματα.

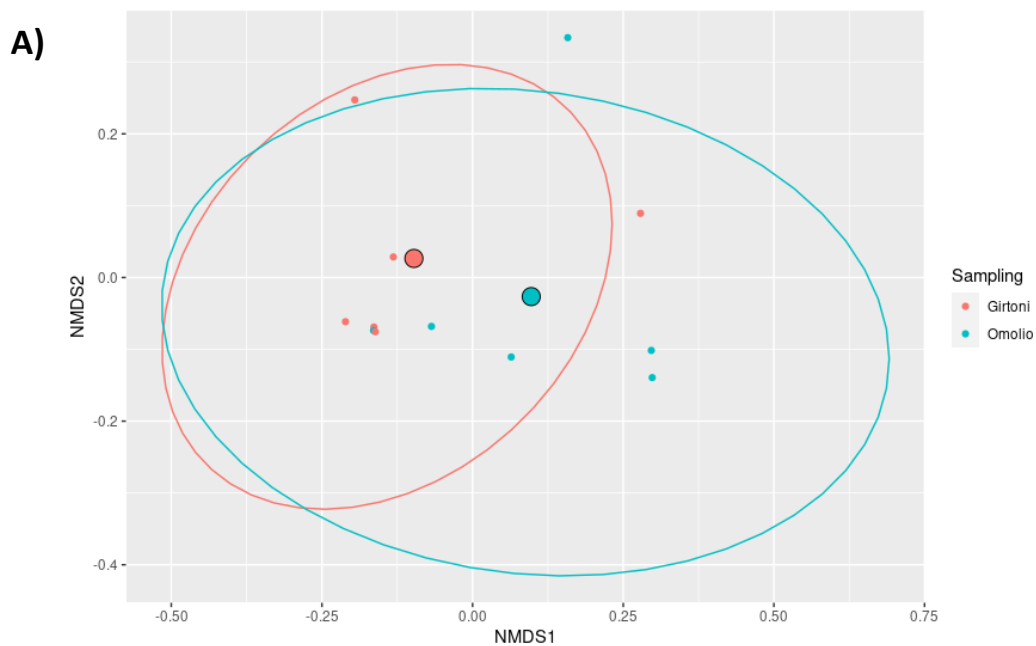
Taxa	Ομόλιο Ανάτη	Ομόλιο Κατάτη 1	Ομόλιο Κατάτη 2	Γυρτώνη Ανάτη	Γυρτώνη Κατάτη 1	Γυρτώνη Κατάτη 2
Arrenuridae	0	178	0	0	0	0

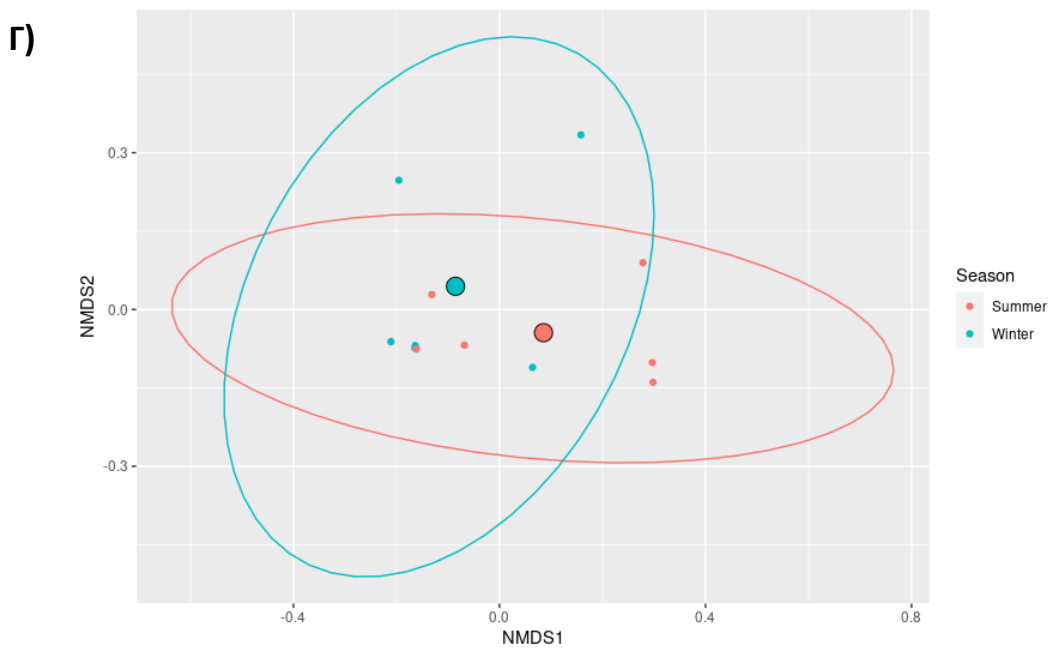
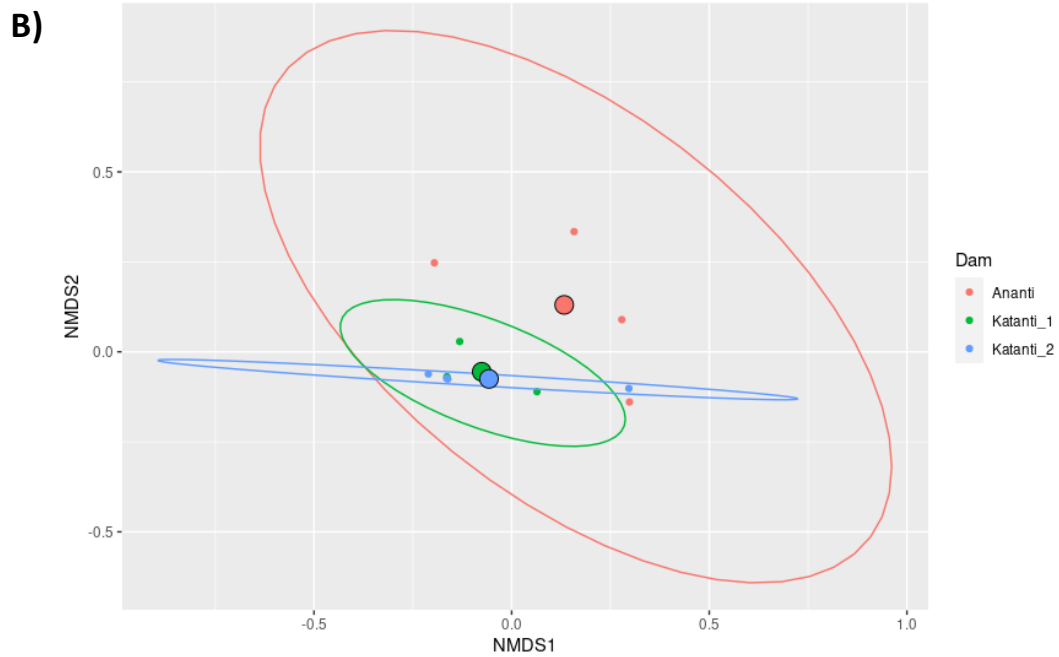
Baetidae	0	1690	0	2577	11319	146
Braconidae	0	0	0	0	0	9
Caenidae	0	0	189	1825	305	71
Carabidae	0	0	0	0	0	200
Ceratopogonidae	0	0	460	719	0	0
Chaoboridae	0	0	292	0	0	0
Chironomidae	12738	32438	13717	13204	40998	32223
Chloropidae	813	657	407	1491	0	0
Culicidae	1246	0	967	839	853	0
Cyprididae	0	97	0	0	0	0
Diptera	0	0	0	474	0	0
Dolichopodidae	0	0	466	0	0	0
Drosophilidae	361	0	432	0	0	0
Empididae	0	0	0	930	0	0
Ephemerellidae	0	74	268	0	0	0
Ephydriidae	0	0	0	1929	3212	0
Gammaridae	0	0	156	0	0	0
Gelechiidae	455	566	513	0	0	0
Heptageniidae	0	0	0	239	0	0
Hydraenidae	0	270	0	0	0	0
Hydroptilidae	0	0	228	0	0	0
Lepidoptera	519	0	261	0	0	0
Loliginidae	0	0	0	0	0	961
Lycaenidae	954	0	919	0	0	0
Micronectidae	0	369	0	0	0	118
Mycetophilidae	0	0	0	0	53	0
Naididae	11766	5373	9989	4651	285	2639
Nymphalidae	258	0	380	0	0	0
Nymphalidae	0	0	288	0	0	0
Phoridae	0	87	0	0	0	93
Pipunculidae	218	0	259	0	0	0
Potamanthidae	0	0	367	3776	0	0
Pterophoridae	1159	0	433	0	0	0

Reduviidae	320	0	0	0	0	0
Sarcophagidae	270	533	0	0	0	0
Saturniidae	0	0	0	0	85	0
Sciaridae	0	0	303	0	0	0
Staphylinidae	0	0	0	0	0	81
Tabanidae	1486	0	773	0	0	89
Tachinidae	388	760	954	0	0	0
Tipulidae	1332	0	1994	2733	0	0
Xyloryctidae	0	0	357	0	0	0

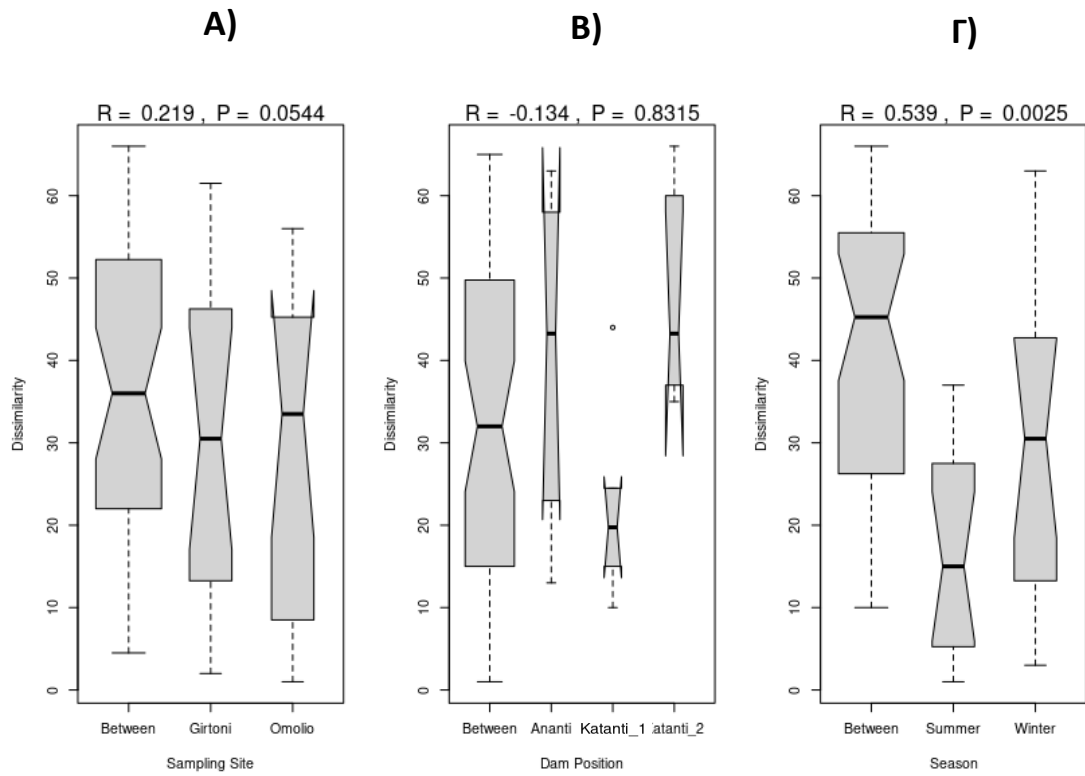
Πίνακας 19: α-diversity μοριακής ταξινόμησης για τα καλοκαιρινά δείγματα.

Περιοχή	Sobs	Shannon	Simpson	invSimpson
Γυρτώνη Ανάντη	13	2.061	0.188	5.307
Γυρτώνη Κατάντη 1	7	0.844	0.559	1.786
Γυρτώνη Κατάντη 2	10	0.507	0.783	1.275
Ομόλιο Ανάντη	16	1.790	0.263	3.789
Ομόλιο Κατάντη 1	11	0.918	0.601	1.663
Ομόλιο Κατάντη 2	24	2.021	0.241	4.143





Διάγραμμα 9: Διαγράμματα NMDS βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης για τα καλοκαιρινά και χειμερινά δείγματα. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (Α) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο), (Β) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάτη, Κατάντη 1, Κατάντη 2) και (Γ) την εποχικότητα.



Διάγραμμα 10: Box plots βάσει των αποτελεσμάτων της μοριακής ταξινόμησης για τα καλοκαιρινά και χειμερινά δείγματα. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε ως προς (A) την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο), (B) την θέση τους σε σχέση με το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2) και (Γ) την εποχικότητα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ποτάμια βρίσκονται ανάμεσα στα πιο επηρεασμένα οικοσυστήματα του πλανήτη, εξαιτίας των ανθρωπογενών πιέσεων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο Πηνειός ποταμός στην Θεσσαλία, ο οποίος δέχεται τεράστιες πιέσεις τόσο από τις αγροτικές δραστηριότητες, όσο και από την χρήση των υδάτων του, κυρίως, για άρδευση μέσω κατασκευής έργων ταμίευσης νερού. Σύμφωνα με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ καθίσταται επιτακτική η ανάγκη προστασίας των υδάτων και της βιοποικιλότητας του, καθώς και η εύρεση τρόπων αποκατάστασης της κακής οικολογικής τους ποιότητας, όπως η καλύτερη διαχείριση των λιπασμάτων (Loukas, 2010).

Για τον σκοπό αυτό, είναι απαραίτητη η εκτίμηση των επιπέδων ποικίλων φυσικοχημικών και βιολογικών παραμέτρων. Στην παρούσα έρευνα, αυτό επιτεύχθηκε με στρατολόγηση κατάλληλων φυσικοχημικών μεθόδων, για τον υπολογισμό του pH, της θερμοκρασίας, κ.ο.κ. των υδάτων και της τεχνικής της βιοπαρακολούθησης, για την μελέτη της ποικιλότητας των κοινοτήτων των βενθικών μακροασπόνδυλων.

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη επίδρασης της εποχικότητας, των φραγμάτων και της αλατότητας στην βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων. Για τον λόγο αυτό, η δειγματοληψία έγινε κατά την καλοκαιρινή και χειμερινή περίοδο, από το ανάντη τμήμα ενός φράγματος στη Γυρτώνη (ΓΑ) και μιας αναβαθμίδας στο Ομόλιο (ΟΑ) και από το κατάντη τμήμα των εμποδίων, σε σημεία κοντά (ΓΚ1, ΟΚ1) και μακρύτερα από αυτό (ΓΚ2, ΟΚ2). Το σημείο δειγματοληψίας Ομόλιο Κατάντη 2 βρίσκεται, μάλιστα, κοντά στις εκβολές του Πηνειού στην θάλασσα, με απόρροια να είναι ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα αλατότητας, όπως μάλιστα επιβεβαιώνεται από τις χημικές μεθόδους (Πιν.2). Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων, ιδιαίτερα έμφαση δόθηκε στα στάδια της ομογενοποίησης και κονιορτοποίησής τους με χρήση υγρού αζώτου, με σκοπό την αύξηση της αντιπροσώπευσης του DNA των βενθικών μακροασπόνδυλων στα περιβαλλοντικά δείγματα. Η απομόνωση του DNA από αυτά, έγινε με το εξειδικευμένο για εδάφη DNeasy PowerSoil Pro Kit της QIAGEN, το οποίο βάσει μιας μελέτης σύγκρισης των Hermans, et al., (2017) με άλλα kit απομόνωσης, φάνηκε να αποφέρει αποτελέσματα υψηλότερης ποιότητας. Αφού, λοιπόν, απομακρύνθηκαν από τα δείγματα οποιοδήποτε ανασταλτικοί παράγοντες της PCR (όπως χουμικά οξέα), το επόμενο βήμα ήταν η ενίσχυση και αλληλούχηση του επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου *COI*, μέσω της πλατφόρμας MiSeq της Illumina.

4.1 Σύγκριση κλασικής & μοριακής ταξινόμησης

Η αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων του ποταμού, προϋπέθετε την ταξινόμηση των βενθικών μακροασπόνδυλων που απαντώνται σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της κλασικής και μοριακής ταξινόμησης (DNA barcoding, eDNA metabarcoding), οι οποίες συγκρίθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Οι δύο μέθοδοι έφτασαν σε διαφορετικό επίπεδο ταξινομικής ανάλυσης. Ειδικότερα, η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων της κλασικής μεθόδου έφτασε σε επίπεδο οικογένειας (Πιν.10) και ενώ αυτά της μοριακής έφτασαν σε επίπεδα γένους και είδους, επιβεβαιώνοντας την καλύτερη ταξινομική ανάλυση των μοριακών μεθόδων (Fernández, et al, 2019), επιλέχθηκε να παρουσιαστούν σε επίπεδο οικογένειας (Πιν.11). Η επιλογή αυτή στηρίχθηκε, κυρίως, στην απουσία κατάλληλων βάσεων δεδομένων με τα είδη των βενθικών μακροασπόνδυλων που απαντώνται στον Ελλαδικό χώρο, με απόρροια αρκετά taxa να μην εντοπίζονται μέσω μοριακών μεθόδων, ενώ άλλα αποτελέσματα να μην συνάδουν με την πραγματική κατανομή τους στον χώρο (Berghe, et al, 2009). Ακόμη, παρ' όλο που το eDNA metabarcoding είναι μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη ειδών σε ένα δείγμα ακόμη και από μικρές ποσότητες DNA τους (Fernández, et al., 2019), δεν κατάφερε να εντοπίσει 23 taxa, τα οποία βρέθηκαν μόνο από την κλασική ταξινόμηση (Διάγραμμα 1). Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, όπως έχει επισημανθεί από in situ μελέτες των Leese, et al. (2020), η χρήση του παγκόσμιου εμπρόσθιου εκκινητή fwH2 σε συνδυασμό με τον ειδικό για τα βενθικά μακροασπόνδυλα ανάστροφο εκκινητή EPTDr2n, κατάφερε να εντοπίσει την πλειοψηφία των βενθικών μακροασπόνδυλων που ανήκαν στο φύλο των *Αρθρόποδων* (97,31%) και σε μικρότερο βαθμό αυτών στο φύλο των *Δακτυλιοσκώληκων* (1,66%) και των *Μαλάκιων* (0,63%). Ως συνέπεια, αποκλείστηκαν αρκετά taxa στόχοι από τα Αρθρόποδα, με παράδειγμα την τάξη των *Trichoptera* και των *Isopoda*, καθώς και από τους *Δακτυλιοσκώληκες* και τα *Μαλάκια*. Το συγκεκριμένο πρόβλημα φαίνεται να βρίσκει εφαρμογή και εδώ, καθώς οι μοριακές μέθοδοι δεν κατάφεραν να εντοπίσουν 15 taxa από το φύλο των *Αρθρόποδων* (*Aranea*, *Calopterygidae*, *Dixidae*, *Dolichopodidae*, *Elmidae*, *Ephemeraeidae*, *Gomphidae*, *Hydracarina*, *Hydropsychidae*, *Leptoceridae*, *Leptophlebiidae*, *Lepidoptera*, *Mesoveliidae*, *Ostracoda*, *Polycentropodidae*) και 7 taxa από το φύλο των *Μαλάκιων* (*Lymnaeidae*, *Neritidae*, *Pupae*, *Valvatidae*, *Melanopsidae*, *Sphaeriidae* *Unionidae*). Επομένως, θα ήταν συνετό σε ανάλογες προσεγγίσεις να χρησιμοποιούνται

περισσότερα του ενός ζεύγους εκκινητές, ώστε να καλυφθεί ένα μεγαλύτερο εύρος taxa (Leese, et al., 2020). Άλλη πιθανή εξήγηση είναι πως κάποια από τα taxa εξαιτίας του εξωσκελετού τους, όπως η οικογένεια *Sphaeriidae*, μπορεί να εναποθέτουν στο περιβάλλον πολύ μικρότερες ποσότητες DNA, οι οποίες ουσιαστικά δεν είναι ανιχνεύσιμες από τις μοριακές μεθόδους (Fernández, et al., 2019). Μια ακόμα πιθανή εξήγηση είναι το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε κατά την δειγματοληψία και το οποίο συμπεριλάμβανε 1,30min λακτίσματος-σάρωσης του κύριου καναλιού του ποταμού και 30sec της παρόχθιας βλάστησης. Ο χρονικός αυτός περιορισμός και σε συνδυασμό με την μικρή ποσότητα δείγματος που συλλέχθηκε, είναι δυνατόν να επηρέασαν τα τελικά αποτελέσματα και την μη ανίχνευση κάποιων taxa (Pansu, et al, 2020).

Συμπερασματικά, η μη ανίχνευση ορισμένων taxa από τις μοριακές μεθόδους, δεν συνεπάγεται απαραίτητα την απουσία αυτών από τα δείγματα. Αντιθέτως, αποδεικνύει την ανάγκη βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων δειγματοληψίας, σχεδιασμού κατάλληλων εκκινητών και βάσεων δεδομένων και συνδυασμού τους με την κλασική ταξινόμηση.

4.1.1 α -diversity

Για την μελέτη των επιπέδων βιοποικιλότητας στα διάφορα σημεία δειγματοληψίας, έγινε υπολογισμός του α -diversity για τις δύο μεθόδους ταξινόμησης, με χρήση των βιοτικών δεικτών Sobs, Shannon, Simpson και inverse Simpson (Πιν.16,17). Με βάση τον δείκτη Sobs, ο οποίος στηρίζεται στην ποικιλότητα των ειδών, βρέθηκε και για τις δύο μεθόδους ταξινόμησης ότι στην περιοχή της Γυρτώνης, το σημείο Κατάντη 1 φέρει τα υψηλότερα επίπεδα βιοποικιλότητας, ενώ το σημείο Ανάντη τα χαμηλότερα. Λαμβάνοντας, συνολικά, υπ' όψη τα taxa που ανιχνεύθηκαν από την κλασική και μοριακή ταξινόμηση (Πιν.10,11), προκύπτει ότι στην Κατάντη 1 περιοχή εντοπίζονται, κυρίως, taxa ανθεκτικά στην ρύπανση και με σχετικά μεγάλο αριθμό ατόμων, όπως είναι οι οικογένειες *Chironomidae*, *Ephydriidae*, *Baetidae* και η υφομοταξία των *Oligochaeta*. Παράλληλα, παρατηρείται μικρότερος αριθμός και μικρότερες συγκεντρώσεις των πιο ευαίσθητα taxa, όπως η οικογένεια των *Physidae*. Στην Ανάντη περιοχή, ο αριθμός των ανθεκτικών ταξινομικών ομάδων και των ατόμων τους, φαίνεται να μειώνεται, ενώ πλέον εντοπίζονται σε υψηλότερους αριθμούς διάφορα ευαίσθητα taxa, όπως η οικογένεια *Hydrophylidae*. Ο αριθμός των ευαίσθητων taxa αυξάνεται στην Κατάντη 2 περιοχή, όπου οι φυσικοχημικές συνθήκες των υδάτων επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα, υποδεικνύοντας έτσι τις αρνητικές επιδράσεις των φραγμάτων στους ποταμούς. Τα παραπάνω ευρήματα συνάδουν με τα αποτελέσματα

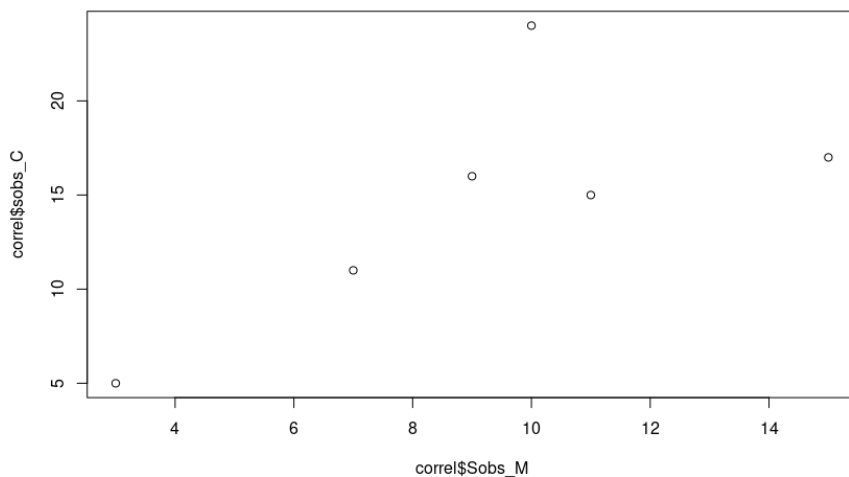
αντίστοιχων μελετών. Ειδικότερα, οι Bredenhand & Samways (2008) και Vaikassas, et al (2013), έδειξαν ότι ευαίσθητα taxa των εντόμων, όπως οι τάξεις των *Ephemeroptera* και *Trichoptera*, δεν εντοπίζονται στις περιοχές αμέσως μετά τα φράγματα, αλλά παρουσιάζονται σε αυξημένο αριθμό στα ανάντη τμήματα. Αντιθέτως, ανθεκτικά στην ρύπανση taxa, όπως η οικογένεια *Chironomidae* και η υφομοταξία των *Oligochaeta* εντοπίζονται σε αφθονία στις περιοχές αμέσως μετά τα φράγματα. Στην παρούσα μελέτη, τα taxa αυτά εντοπίζονται και στις τρεις περιοχές δειγματοληψίας, με τον αριθμό των ατόμων τους να είναι υψηλότερος στην Κατάντη 1 περιοχή. Ο υπολογισμός του α -diversity βάσει των δεικτών Shannon, Simpson και inverse Simpson, έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι παραπάνω δείκτες μετρούν τα επίπεδα βιοποικιλότητας τόσο από την ποικιλότητα των ειδών σε ένα δείγμα, όσο και από την ομαλότητα κατανομής τους. Έτσι, παρ' όλο που με τον δείκτη Sobs η περιοχή Γυρτώνη Κατάντη 1 φαίνεται να φέρει την μεγαλύτερη βιοποικιλότητα, εξαιτίας της άνισης κατανομής των ατόμων μέσα στα διάφορα taxa (π.χ. στην μοριακή ταξινόμηση βρέθηκαν 11522 άτομα στην οικογένεια *Chironomidae* και 217 στην οικογένεια *Baetidae*, Πιν.11), αυτό τελικά απορρίπτεται. Κατά συνέπεια, βάσει των δεικτών Shannon, Simpson και inverse Simpson, για την κλασική ταξινόμηση προκύπτει ότι η Γυρτώνη Κατάντη 2 εμφανίζει την υψηλότερη βιοποικιλότητα και η Γυρτώνη Κατάντη 1 την χαμηλότερη, ενώ για την μοριακή ταξινόμηση, η Γυρτώνη Ανάντη φέρει τα υψηλότερα επίπεδα ποικιλότητας και η Γυρτώνη Κατάντη 2 τα χαμηλότερα.

Παρόμοια μοτίβα κατανομής των διαφόρων ανθεκτικών και ευαίσθητων taxa παρατηρούνται και στην περιοχή του Ομόλιου, με αξιοσημείωτη την περίπτωση του Ομόλιου Κατάντη 2, όπου αυξάνεται η αλατότητα των υδάτων (Πιν.2). Στο σημείο αυτό παρατηρείται αύξηση του αριθμού και της αφθονίας ορισμένων taxa ανθεκτικών στα υψηλά επίπεδα αλατότητας, όπως είναι η οικογένεια *Physidae* και *Chironomidae*, με τα αποτελέσματα να συμφωνούν με αυτά των Jorcin & Nogueira (2008). Βάσει του δείκτη Sobs, για την κλασική ταξινόμηση η πιο ποικίλη περιοχή είναι το Ομόλιο Κατάντη 1 και η λιγότερο το Ομόλιο Κατάντη 2, ενώ για την μοριακή ταξινόμηση το Ομόλιο Ανάντη παρουσιάζει την υψηλότερη βιοποικιλότητα και το Ομόλιο Κατάντη 2 την χαμηλότερη. Για την μοριακή ταξινόμηση τα αποτελέσματα για το α -diversity συνάδουν με αυτά που βρέθηκαν από τους υπόλοιπους βιοτικούς δείκτες, ενώ για την κλασική ταξινόμηση η πιο ποικιλόμορφη περιοχή είναι το Ομόλιο Κατάντη 2 και η λιγότερο το Ομόλιο Κατάντη 1.

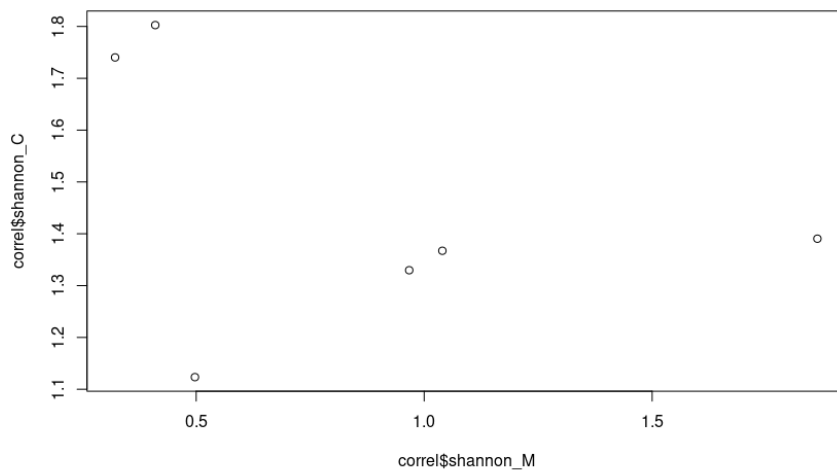
Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων υπολογισμού του α -diversity μεταξύ της κλασικής και μοριακής ταξινόμησης, κατασκευάστηκαν διαγράμματα συσχέτισης (Διάγραμμα 11). Βάσει αυτών οι δύο μέθοδοι φαίνεται να παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση ($r=0,7$) όταν συγκρίνονται ως προς τον δείκτη Sobs και ασθενή συσχέτιση όταν συγκρίνονται ως προς τους δύο άλλους, Shannon ($r=0,37$) και Simpson ($r=0,33$). Αυτό μπορεί να οφείλεται εν μέρη στο γεγονός ότι σε αντίθεση με τον βιοτικό δείκτη Sobs, οι Shannon και Simpson υπολογίζουν τα επίπεδα βιοποικιλότητας βάση τόσο της ποικιλότητας, όσο και της ομαλότητας κατανομής των ειδών.

Τα παραπάνω ευρήματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η κλασική ταξινόμηση κατάφερε να εντοπίσει μεγαλύτερο αριθμό taxa ανά περιοχή δειγματοληψίας συγκριτικά με την μοριακή, υποδεικνύουν την σημαντικότητα συνδυασμού των δύο αυτών προσεγγίσεων σε μελέτες βιοπαρακολούθησης, για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων.

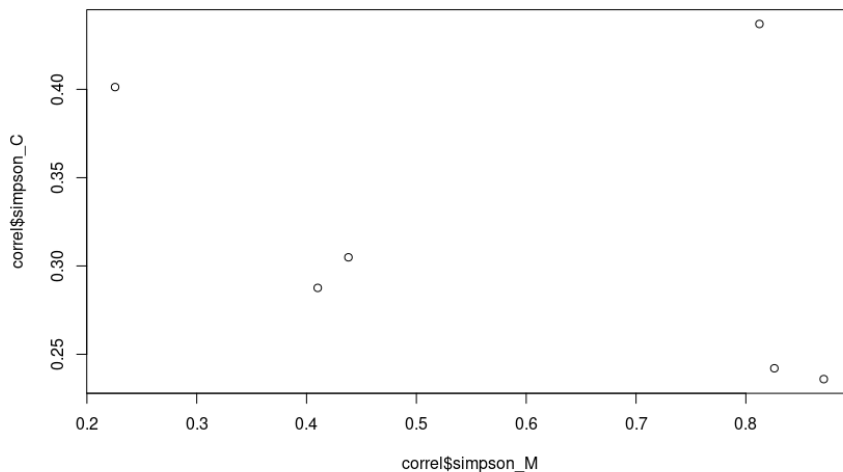
(A) Correlation of species richness between classical and molecular taxonomy $|r|=0.7$



(B) Correlation of Shannon indexes between classical and molecular taxonomy $|r|=0.37$



(Γ) **Correlation of Simpson indexes between classical and molecular taxonomy $|r|=0.33$**



Διάγραμμα 11: Διαγράμματα συσχέτισης της κλασικής και μοριακής ταξινόμησης ως προς τους δείκτες βιοποικιλότητας Sobs (A), Shannon (B) και Simpson (Γ).

4.1.2 β-diversity

Για την μελέτη του βαθμού διαφοροποίησης των δειγμάτων ως προς την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) και την θέση τους ως προς το φράγμα (Ανάντη, Κατάντη 1, Κατάντη 2), υπολογίστηκε ο δείκτης βιοποικιλότητας β-diversity για τις δύο μεθόδους ταξινόμησης ξεχωριστά. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Bray-Curtis, ενώ η απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με κατασκευή 2D διαγραμμάτων NMDS, όπου τα σημεία πιο κοντά στον χώρο φέρουν παρόμοια επίπεδα βιοποικιλότητας (εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές αποστάσεων). Προκειμένου, ωστόσο, να ελεγχθεί εάν τα δείγματα εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις παραμέτρους που συγκρίθηκαν, εφαρμόστηκε το στατιστικό τεστ ANOSIM, με χρήση του δείκτη Jaccard, ενώ η απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με Box plots.

Βάσει των διαγραμμάτων NMDS για την κλασική ταξινόμηση (Διάγραμμα 5), για την περιοχή της Γυρτώνης τα δείγματα που αντιστοιχούν στα σημεία Ανάντη και Κατάντη 2 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα, ενώ οι περιοχές Κατάντη 2 και Κατάντη 1 την μικρότερη. Παρόμοια για το Ομόλιο, τα δείγματα που αντιστοιχούν στα σημεία Ανάντη και Κατάντη 1 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα, ενώ οι περιοχές Ανάντη και Κατάντη 2 την μικρότερη. Από την σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ Γυρτώνης και Ομολίου, προκύπτει ότι οι περιοχές

Γυρτώνη Κατάντη 1 και Ομόλιο Κατάντη 2 έχουν ίδια επίπεδα βιοποικιλότητας. Βάσει των Box plots που προέκυψαν από την σύγκριση των δειγμάτων ως προς την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) (Διάγραμμα 7A), παρατηρούνται μεγαλύτερες αποκλίσεις στην βιοποικιλότητα μεταξύ των σταθμών της Γυρτώνης, συγκριτικά με αυτές του Ομολίου. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη περισσότερων taxa και περισσότερων κοινών ταξινομικών ομάδων μεταξύ των σταθμών του Ομολίου. Ωστόσο, οι διαφορές στην βιοποικιλότητα που παρουσιάζουν τα δείγματα από τις δύο περιοχές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, δεδομένου ότι $p\text{-value}=0,32$. Η σύγκριση ως προς την θέση τους εκατέρωθεν του φράγματος (Διάγραμμα 7B) έδωσε υψηλότερα επίπεδα διαφοροποίησης για τα δείγματα από τις Ανάντη περιοχές, ενώ για άλλη μια φορά τα δείγματα δεν εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην βιοποικιλότητα δεδομένου ότι $p\text{-value}=1$.

Ομοίως, βάσει των διαγραμμάτων NMDS για την μοριακή ταξινόμηση (Διάγραμμα 6), για την περιοχή της Γυρτώνης τα δείγματα που αντιστοιχούν στα σημεία Ανάντη και Κατάντη 2, παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα, ενώ την μικρότερη φέρουν οι περιοχές Κατάντη 2 και Κατάντη 1. Για την περιοχή του Ομολίου, τα δείγματα που αντιστοιχούν στα σημεία Ανάντη και Κατάντη 1 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα, ενώ η μικρότερη παρατηρείται μεταξύ των Κατάντη 1 και Κατάντη 2. Σε αντίθεση με την κλασική ταξινόμηση, η σύγκριση των περιοχών Γυρτώνης και Ομολίου δείχνει μια ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει τόσο της περιοχής συλλογής τους όσο και της θέσης τους ως προς το φράγμα. Συγκεκριμένα, τα δείγματα των περιοχών Γυρτώνη Κατάντη 1, Γυρτώνη Κατάντη 2, Ομόλιο Κατάντη 1 και Ομόλιο Κατάντη 2, φαίνεται να φέρουν παρόμοια επίπεδα βιοποικιλότητας, με τις περιοχές Γυρτώνη Κατάντη 1 και Ομόλιο Κατάντη 2 να παρουσιάζουν τις μικρότερες διαφορές. Όμοια με πριν, βάσει των Box plots που προέκυψαν από την σύγκριση των δειγμάτων ως προς την περιοχή δειγματοληψίας (Γυρτώνη, Ομόλιο) (Διάγραμμα 8A), παρατηρούνται μεγαλύτερες αποκλίσεις στην βιοποικιλότητα μεταξύ των σταθμών της Γυρτώνης, συγκριτικά με αυτές του Ομολίου. Παρ' όλα αυτά, οι διαφορές στην βιοποικιλότητα που παρουσιάζουν τα δείγματα από τις δύο περιοχές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, δεδομένου ότι $p\text{-value}=0,1$. Η σύγκριση ως προς την θέση εκατέρωθεν του φράγματος (Διάγραμμα 8B) έδωσε για άλλη μια φορά υψηλότερα επίπεδα διαφοροποίησης για τα δείγματα από τις Ανάντη περιοχές. Ωστόσο, δεν εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην βιοποικιλότητα δεδομένου ότι $p\text{-value}=0,93333$.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό του β -diversity για τις δύο μεθόδους ταξινόμησης, διαπιστώνουμε ότι αυτά είναι παρόμοια και εξίσου αξιόπιστα. Ωστόσο, η μοριακή ταξινόμηση φαίνεται να είναι πιο πληροφοριακή, δεδομένου ότι επέτρεψε την ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση της περιοχής συλλογής του και της θέσης τους ως προς το φράγμα.

4.2 Επίδραση εποχικότητας στην βιοποικιλότητα

Η εποχικότητα μπορεί να φέρει μεγάλες επιδράσεις στην βιοποικιλότητα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Chi, et al. (2017) η άνοιξη χαρακτηρίζεται από τα μεγαλύτερα επίπεδα βιοποικιλότητας, κυρίως όσον αφορά την ομάδα των εντόμων, με χαρακτηριστικό το παράδειγμα της τάξης των Ephemeroptera. Πράγματι, λοιπόν, μετά από σύγκριση των καλοκαιρινών και χειμερινών δειγμάτων προκύπτει ότι στα πρώτα ο αριθμός των taxa των εντόμων και της αφθονίας τους στις διάφορες περιοχές είναι αρκετά πιο αυξημένος (Πιν.18).

Για την περιοχή της Γυρτώνης, σύμφωνα με τον βιοτικό δείκτη Sobs το σημείο Ανάντη φέρει την υψηλότερη βιοποικιλότητα (Πιν.19). Χαρακτηρίζεται από έναν μεγάλο αριθμό taxa ανθεκτικών στο περιβαλλοντικό στρες, όπως είναι οι διάφορες οικογένειες της τάξης των *Diptera*, της οικογένειας *Chironomidae* και της υφομοταξίας των *Oligochaeta*, και από έναν συγκριτικά μικρότερο αριθμό ευαίσθητων taxa, που ανήκουν κυρίως στην τάξη των *Ephemeroptera*. Στο σημείο Κατάντη 1 η βιοποικιλότητα είναι η μικρότερη και παρατηρείται μείωση του αριθμού των παρατηρηθέντων ευαίσθητων taxa και αύξηση στην αφθονία των ανθεκτικών ταξινομικών ομάδων, με χαρακτηριστικό το παράδειγμα της οικογένειας *Chironomidae* και *Baetidae*. Στο σημείο Κατάντη 2, όπου οι φυσικοχημικές συνθήκες των υδάτων επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα, παρατηρείται το αντίστροφο. Βάσει των βιοτικών δεικτών Shannon, Simpson και inverse Simpson η Ανάντη περιοχή εμφανίζει την υψηλότερη βιοποικιλότητα, ενώ η Κατάντη 2 την χαμηλότερη. Για την περιοχή του Ομολίου παρατηρούνται παρόμοια μοτίβα κατανομής των ευαίσθητων και ανθεκτικών taxa μεταξύ των περιοχών, ενώ όλοι οι δείκτες συμφωνούν στο ότι το σημείο Κατάντη 2 φέρει τα υψηλότερα επίπεδα βιοποικιλότητας και το Κατάντη 1 τα χαμηλότερα.

Συγκρίνοντας τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις δύο εποχές, προκύπτει ότι για την καλοκαιρινή περίοδο οι περιοχές Γυρτώνη Ανάντη και Ομόλιο Κατάντη 2 παρουσιάζουν την υψηλότερη βιοποικιλότητα και για την χειμερινή, οι περιοχές Γυρτώνη Ανάντη και Ομόλιο

Ανάτη. Η σύγκριση των καλοκαιρινών και χειμερινών δειγμάτων ως προς την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) (Διάγραμμα 9Α) δείχνει μια ομαδοποίηση αυτών που αντιστοιχούν στην Γυρτώνη, με αποτέλεσμα οι διαφορές στην βιοποικιλότητα να είναι μικρότερες, απ' ότι μεταξύ των δειγμάτων του Ομολίου. Ομοίως, η σύγκριση με βάση την θέση ως προς το φράγμα (Διάγραμμα 9Β) δείχνει μια ομαδοποίηση αυτών που εντοπίστηκαν στα Κατάτη σημεία, με απόρροια να είναι μικρότερη η διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα στα σημεία αυτά από ότι στα Ανάτη. Τέλος, από την σύγκριση των δειγμάτων ως προς την εποχή δειγματοληψίας τους (Διάγραμμα 9Γ) αυτά της χειμερινής περιόδου παρουσιάζουν την μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα.

Από τα Box plots σύγκρισης των δειγμάτων ως προς την περιοχή συλλογής τους (Γυρτώνη, Ομόλιο) (Διάγραμμα 10Α), προκύπτει ότι αυτή φέρει τάση για στατιστικά σημαντική επίδραση στην βιοποικιλότητα, $p\text{-value}=0,0544$, με τις διαφορές να είναι μεγαλύτερες μεταξύ των σταθμών του Ομολίου συγκριτικά με αυτών της Γυρτώνης. Όταν τα δείγματα συγκρίνονται ως προς την θέση τους στο φράγμα (Διάγραμμα 10Β), αυτά που εντοπίζονται στα Ανάτη σημεία φέρουν μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα μεταξύ τους, συγκριτικά με αυτά των Κατάτη 1 και Κατάτη 2 σημείων. Τα δείγματα της Κατάτη 2 περιοχής εμφανίζουν, μάλιστα, μεγαλύτερες διαφορές στην βιοποικιλότητα σχετικά με αυτά της Κατάτη 1. Ωστόσο, δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, αφού $p\text{-value}=0,8315$. Από την άλλη πλευρά, σημαντική επίδραση στην βιοποικιλότητα φαίνεται να φέρει η εποχικότητα (Διάγραμμα 10Γ), καθώς οι διαφορές ανάμεσα στα καλοκαιρινά και χειμερινά δείγματα είναι στατιστικά σημαντικές, αφού $p\text{-value}=0,0025$. Στα χειμερινά, μάλιστα, δείγματα υπάρχει μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην βιοποικιλότητα μεταξύ των σταθμών, απ' ότι στα καλοκαιρινά.

4.3 Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα υπολογισμού του βιοτικού δείκτη $\alpha\text{-diversity}$ εντόπισαν διαφορές στον αριθμό και σχετική αφθονία των ευαίσθητων και ανθεκτικών στην ρύπανση taxa μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Σημαντικά υποβαθμισμένες βρέθηκαν, μάλιστα, οι περιοχές αμέσως μετά τα εμπόδια, γεγονός που υποδεικνύει την επίδραση της κατασκευής φραγμάτων στην βιοποικιλότητα. Ο υπολογισμός του δείκτη $\beta\text{-diversity}$ δεν εντόπισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην βιοποικιλότητα μεταξύ των δειγμάτων, εκτός όταν αυτά συγκρίθηκαν ως προς την εποχή συλλογής τους. Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στην ταξινομική ανάλυση της κλασικής και μοριακής μεθόδου, ενώ υπέδειξαν την

ανάγκη συνδυασμού τους σε μελέτες βιοπαρακολούθησης, για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbasi, A., Sajid, A., Haq, N., Rahman, S., Misbah, Z. T., Sanober, G., Ashraf, M., Kazi, A. G. (2013). Agricultural Pollution: An Emerging Issue. *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*, 347–387. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8830-9_13
- Anderson, M. P. (2009). Bayesian classification of DNA barcodes. <http://hdl.handle.net/2097/2247>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Antal, P., Arany, A., Bolgár, B., Gézsi, A., Hajós, G., Hullám, G., Marx, P., Millinghoffer, A., Poppe, L., Sárközy, P. (2014). Bioinformatics. Budapest: Typotex Kiadó. doi:10.13140/RG.2.1.4349.0403
- AQUATIC LIFE LAB. (2018). 5.4 Measuring species diversity. <http://www.aquaticlifelab.eu/5-4-measuring-species-diversity/>
- Armendáriz, L., Ocón, C., & Rodrigues Capítulo, A. (2012). Potential responses of oligochaetes (Annelida, Clitellata) to global changes: Experimental fertilization in a lowland stream of Argentina (South America). *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 42(2), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2011.09.005>
- Beck, E. A., Thompson, A. C., Sharbrough, J., Brud, E., Llopart, A. (2015). Gene flow between *Drosophila yakuba* and *Drosophila santomea* in subunit V of cytochrome c oxidase: A potential case of cytonuclear cointrogression. *Evolution*, 69(8), 1973–1986. <https://doi.org/10.1111/evo.12718>
- Bellos, D. and Sawidis, T. (2005). Chemical pollution monitoring of the River Pinios (Thessalia—Greece). *Journal of Environmental Management*, 76(4), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.027>
- Berghe, E.V., Claus, S., et al. (2009). MacroBen integrated database on benthic invertebrates of European continental shelves: a tool for large-scale analysis across Europe. *Marine Ecology Progress Series*, 382, 225–238. <https://doi.org/10.3354/meps07826>
- Birnie-Gauvin, K., Aarestrup, K., Riis, T. M. O., Jepsen, N., Koed, A. (2017). Shining a light on the loss of rheophilic fish habitat in lowland rivers as a forgotten consequence of barriers, and its implications for management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27(6), 1345–1349. <https://doi.org/10.1002/aqc.2795>
- Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M., Creer, S. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms14087>
- Boyer, R. F. (2012). Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques (2nd edition). Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc.

- Bray, J.R., Curtis, J.T. (1957). An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr*, 27:325-349.
<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2307/1942268>
- Bredenhand, E. and Samways, M. J. (2008). Impact of a dam on benthic macroinvertebrates in a small river in a biodiversity hotspot: Cape Floristic Region, South Africa. *Journal of Insect Conservation*, 13(3), 297–307.
<https://doi.org/10.1007/s10841-008-9173-2>
- Britannica. (1998). Animal taxonomy. Encyclopedia Britannica.
<https://www.britannica.com/science/taxonomy/images-videos#/media/1/584695/148663>
- Buttigieg, P.L., Ramette, A. (2014). A Guide to Statistical Analysis in Microbial Ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiol Ecol*, 90: 543–550. <https://mb3is.megx.net/gustame/dissimilarity-based-methods/nmnds>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chi, S., Li, S., Chen, S., Chen, M., Zheng, J., Hu, J. (2017). Temporal variations in macroinvertebrate communities from the tributaries in the Three Gorges Reservoir Catchment, China. *Revista Chilena de Historia Natural*, 90(1).
<https://doi.org/10.1186/s40693-017-0069-y>
- Clark, N. E., Lovell, R., Wheeler, B. W., Higgins, S. L., Depledge, M. H., Norris, K. (2014). Biodiversity, cultural pathways, and human health: a framework. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(4), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.01.009>
- Cooper, C. E., Nicholls, P., Freedman, J. A. (1991). Cytochrome c oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochemistry and Cell Biology*, 69(9), 586–607. <https://doi.org/10.1139/o91-089>
- Corell, J. and Rodríguez-Ezpeleta, N. (2014). Tuning of protocols and marker selection to evaluate the diversity of zooplankton using metabarcoding. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 21(2): 19-39.
https://www.researchgate.net/publication/262235357_Tuning_of_protocols_and_marker_selection_to_evaluate_the_diversity_of_zooplankton_using_metabarcoding
- Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Daly, A., Baetens, J., De Baets, B. (2018). Ecological Diversity: Measuring the Unmeasurable. *Mathematics*, 6(7), 119. <https://doi.org/10.3390/math6070119>
- Deagle BE, Jarman SN, Coissac E, Pompanon F, Taberlet P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol. Lett.* 10: 20140562.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>
- Environmental Protection Agency. (2012). Chapter 3: Elements of biomonitoring. EPA.
<https://archive.epa.gov/water/archive/web/html/ch03main.html>

- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källner, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fedor, P. and Zvarikova, M. (2019). Conservation Ecology. *Encyclopedia of Ecology*, (2nd edition), 1, 337-509. United Kingdom: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.10976-5
- Fernández, S., Rodríguez-Martínez, S., Martínez, J. L., Garcia-Vazquez, E., Ardura, A. (2019). How can eDNA contribute in riverine macroinvertebrate assessment? A metabarcoding approach in the Nalón River (Asturias, Northern Spain). *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.40>
- Franklin, P., Gee, E., Baker, C., Bowie, S. (2018). New Zealand Fish Passage Guidelines. <http://www.niwa.co.nz/fishpassage>
- Gaston, K. J. and Spicer, J. I. (2004). Biodiversity: an introduction (2nd edition). Blackwell Publishing. https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=0Bjp2o5CVnQC&oi=fnd&pg=PT6&dq=biodiversity&ots=Y1_c2TfgNy&sig=Sqx5zYaPePtnDjr-XW9eWCx3L3k&redir_esc=y#v=onepage&q=richness&f=false
- Gill, R. J., Baldock, C. R. K., Brown, M. J. F., Cresswell, J. E., Dicks, L. V., Fountain, M. T., Garratt, M. P. D., Gough, L. A., Heard, M. S., Holland, J. M., Ollerton, J., Stone, G. N., Tang, C. Q., Vanbergen, A. J., Vogler, A. P., Woodward, G., Arce, A., N., Boatman, N. D., Brand-Hardy, R., Breeze, T. D., and Green, M., Hartfield, C. M., O'Connor, R. S., Osborne, J. L., Phillips, J., Sutton, P., Potts, S. G. (2016). Protecting an ecosystem service: approaches to understanding and mitigating threats to wild insect pollinators. *Advances in Ecological Research*, 54, 135-206. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2015.10.007>
- Glen, S. (n.d.). Bray Curtis Dissimilarity. From StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us! <https://www.statisticshowto.com/bray-curtis-dissimilarity/>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. doi: 10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-14998U1.29
- HaRa, J., Mamun, M., An, K.-G. (2019). Ecological River Health Assessments Using Chemical Parameter Model and the Index of Biological Integrity Model. *Water*, 11(8), 1729. <https://doi.org/10.3390/w11081729>
- Harper, L.R., Buxton, A.S., Rees, H.C. *et al.* (2019). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826, 25–41. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Heino, J., Virkkala, R., Toivonen, H. (2009). Climate change and freshwater biodiversity: detected patterns, future trends and adaptations in northern regions. *Biological Reviews*, 84(1), 39–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00060.x>

- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Lear, G. (2018). Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 557–569. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12762>
- Jaccard, P. (1901). Distribution de la flore alpine dans le Bassin des Drouces et dans quelques regions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37(140), 241–272. doi: 10.5169/seals-266440
- Johnson, R. K., Wiederholm, T., Rosenberg, D. M. (eds.). (1993). *Freshwater Biomonitoring Using Individual Organisms, Populations, and Species Assemblages of Benthic Macroinvertebrates*, 40-158 Chapman & Hall. <https://doi.org/10.1002/iroh.19940790404>
- Jorcin, A., & Nogueira, M. (2008). *Benthic macroinvertebrates in the Paranapanema reservoir cascade (southeast Brazil)*. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4 suppl), 1013–1024. doi: 10.1590/s1519-69842008000500009
- Kelly, E., Morris, J., Kincaid, V., Ganem, Y. (2012). Impact of Light Intensity on Habitat Preference of Macroinvertebrates in Carp Creek. https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/95714/kelly_morris_kincaid_ganem_2012.pdf?sequence=1
- Kennen, J. G., Henriksen, J. A., Nieswand, S. P. (2007). Development of the Hydroecological Integrity Assessment Process for Determining Environmental Flows for New Jersey Streams. Virginia: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report. https://www.researchgate.net/publication/266852073_Development_of_the_Hydroecological_Integrity_Assessment_Process_for_Determining_Environmental_Flows_for_New_Jersey_Sstreams
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Ko, N. T., Suter, P., Conallin, J., Rutten, M., Bogaard, T. (2020). Aquatic Macroinvertebrate Community Changes Downstream of the Hydropower Generating Dams in Myanmar- Potential Negative Impacts From Increased Power Generation. *Frontiers in Water*, 2. <https://doi.org/10.3389/frwa.2020.573543>
- Kotov, A. A. and Gololobova, M. A. (2016). Traditional taxonomy: *Quo vadis*. *Integrative Zoology*, 11(6), 490–495. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12215>
- Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. <http://dx.doi.org/10.5772/61964>
- Leese, F., Sander, M., Buchner, D., Elbrecht, V., Haase, P., Zizka, V. M. A. (2020). Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, 3(1), 261–276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Loukas, A. (2010). Surface water quantity and quality assessment in Pinios River, Thessaly, Greece. *Desalination*, 250(1), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.043>

- Madden, T. L., Tatusov, R. L., Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis*, 266(9), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)66011-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)66011-X)
- Mandaville, S. M. (2002). Benthic Macroinvertebrates in Freshwaters-Taxa Tolerance Values, Metrics, and Protocols. Dartmouth: Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax. <http://www.chebucto.ns.ca/science/SWCS/H-1/tolerance.pdf>
- Marcel, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBNET journal*, 17(1). <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez-Goss, M. R. and Arguelles E. (2020). Classical Taxonomy (1st Edition). *Methods in Microalgal Studies*, 15, 145-153. Philippines: Philippine Science Letters and University of the Philippines Los Banos. https://www.researchgate.net/publication/351097930_Classical_Taxonomy
- Metzker, M. L. (2009). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Migiros, G., Bathrellos, G., Skilodimou, H., Karamousalis, T. (2011). Pinios (Peneus) River (Central Greece): Hydrological — Geomorphological elements and changes during the quaternary. *Open Geosciences*, 3(2). <https://doi.org/10.2478/s13533-011-0019-1>
- Mihov, S. and Hristov, I. (2011). River Ecology. *WWF Danube Carpathian Programme*. WWF-DCPO. https://wwfeu.awsassets.panda.org/downloads/riverecology_eng_bt13dec.pdf
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., ... Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514–3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Mouratiadou, I. and Moran, D. (2007). Mapping public participation in the Water Framework Directive: A case study of the Pinios River Basin, Greece. *Ecological Economics*, 62(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.01.009>
- Nicacio, G. and Juen, L. (2015). Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: an assessment of the literature. *Insect Conservation and Diversity*, 8(5), 393–403. <https://doi.org/10.1111/icad.12123>
- Oksanen, J. (2022). Vegan: ecological diversity. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, G. F., Kindt, R., Legendre, P., ... Stier, A., Ter Braak, C. J. F., Weedon, J. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pansu, J., Chapman, M. B., Hose, G. C., Chariton, A. A. (2020). Comparison of an extracellular v. total DNA extraction approach for environmental DNA-based monitoring of sediment biota. *Marine and Freshwater Research*. <https://doi.org/10.1071/MF20269>

- Patra, B. C., Shit, P. K., Bhunia, G. S., Bhattacharya, M. (eds). (2022). *River Health and Ecology in South Asia: Pollution, Restoration, and Conservation* (1st edition). Switzerland: Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83553-8_2
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., ... Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 637-638, 1295–1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Pentinsaari, M., Salmela, H., Mutanen, M., Roslin, T. (2016). Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (*COI*) across the animal tree of life. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep35275>
- Pires, A. C. and Marinoni, L. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2), 339–346. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Piscart, C., Moreteau, J.-C., Beisel, J.-N. (2005). Biodiversity and Structure of Macroinvertebrate Communities Along a Small Permanent Salinity Gradient (Meurthe River, France). *Hydrobiologia*, 551(1), 227–236. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-4463-0>
- Porter, T. M. and Hajibabaei, M. (2020). Putting *COI* Metabarcoding in Context: The Utility of Exact Sequence Variants (ESVs) in Biodiversity Analysis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00248>
- Pruden, M. J., Dietl, G. P., Handley, J. C., Smith, J. A. (2021). Using molluscs to assess ecological quality status of soft-bottom habitats along the Atlantic coastline of the United States. *Ecological Indicators*, 129, 107910. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107910>
- Rennstam Rubbmark, O., Sint, D., Horngacher, N., Traugott, M. (2018). A broadly applicable *COI* primer pair and an efficient single-tube amplicon library preparation protocol for metabarcoding. *Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1002/ECE3.4520>
- Robertson-Bryan, Inc. (2004). pH Requirements of Freshwater Aquatic Life. https://www.waterboards.ca.gov/rwqcb5/water_issues/basin_plans/ph_turbidity/ph_turbidity_04phreq.pdf
- Rodriguez, P. and Reynoldson, T. B. (2011). The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes. [doi:10.1007/978-94-007-1718-3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1718-3)
- Saad Abdelkarim, M. (2020). Biomonitoring and bioassessment of running water quality in developing countries: A case study from Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(4), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.11.003>
- Sakamoto, T., Ortega, J.M. (2021). Taxallnomy: an extension of NCBI Taxonomy that produces a hierarchically complete taxonomic tree. *BMC Bioinformatics* 22, 388. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04304-3>
- Strüder-Kypke, M. C. and Lynn, D. H. (2010). Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity*, 8(1), 131–148. <https://doi.org/10.1080/14772000903507744>

- Swingland, R. I. (2013). Biodiversity, definition of (2nd edition). *Encyclopedia of Biodiversity*, 1, 377-391. Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-384719-5.00009-5
- Szczerbińska, N. and Gałczyńska, M. (2015). Biological methods used to assess surface water quality. *Archives of Polish Fisheries*, 23(4), 185-196. <https://doi.org/10.1515/aopf-2015-0021>
- Tampo, L., Kaboré, I., Alhassan, E. H., Ouéda, A., Bawa, L. M., Djaneye-Boundjou, G. (2021). Benthic Macroinvertebrates as Ecological Indicators: Their Sensitivity to the Water Quality and Human Disturbances in a Tropical River. *Frontiers in Water*, 3. <https://doi.org/10.3389/frwa.2021.662765>
- Timpano, A. J., Schoenholtz, S. H., Soucek, D. J., Zipper, C. E. (2018). Benthic macroinvertebrate community response to salinization in headwater streams in Appalachia USA over multiple years. *Ecological Indicators*, 91, 645–656. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.031>
- Trivedi, S., Aloufi, A.A., Rehman, H., Saggi, S., Gho, S.K. (2016). DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1), 332-337. https://www.researchgate.net/publication/290992772_DNA_barcoding_Tool_for_assessing_species_identification_in_Reptilia
- Vaikasas, S., Palaima, K., & Pliuraite, V. (2013). Influence of hydropower dams on the state of macroinvertebrates assemblages in the Virvyte river, Lithuania. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 21(4), 305–315. <https://doi.org/10.3846/16486897.2013.796956>
- Verdonschot, P. F. M. (2015). Introduction to Annelida and the Class Polychaeta. *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, 509–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00020-6>
- Wages Jr., J.M. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION (2nd edition). *Encyclopedia of Analytical Science*. USA: Elsevier.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L.D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T.L., Miller, E., Bache, S.M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D.P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. doi: 10.21105/joss.01686
- Wright, J.F., Winder, J.M., Gunn, R.J.M., Blackburn, J.H., Symes, K.L. and Clarke, R.T. (2000). Minor local effects of a River Thames power station on the macroinvertebrate fauna. *Regul. Rivers: Res. Mgmt.* 16: 159-174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1646\(200003/04\)16:2<159::AID-RRR575>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1646(200003/04)16:2<159::AID-RRR575>3.0.CO;2-B)
- Young, J. C., Marzano, M., White, R. M., McCracken, D. I., Redpath, S. M., Carss, D. N., ... Watt, A. D. (2010). The emergence of biodiversity conflicts from biodiversity impacts: characteristics and management strategies. *Biodiversity and Conservation*, 19(14), 3973–3990. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9941-7>
- Zhang, P., Seth, A., Fernandes, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies. *Pathobiology of Human Disease*, 4074–4088. doi:10.1016/b978-0-12-386456-7.07707-8 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386456-7.07707-8>

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ειδική Γραμματεία Υδάτων. (2014). Σχέδιο Διαχείρισης των Λεκανών Απορροής Ποταμών του Υδατικού Διαμερίσματος Θεσσαλίας. Αθήνα. http://wfdver.ypeka.gr/wp-content/uploads/2017/04/files/GR08/GR08_SDLAP.pdf

Ζίφα, Α., Μαμούρης, Ζ., Μούτου, Α. (2011). Βιολογία (2^η έκδοση). Βόλος: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.

Καλινδέρης, Ι. (2006). Η υδρονομία στην Ελλάδα στα πλαίσια της κοινοτικής οδηγίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διαχείριση των υδατικών πόρων. Διδακτορική διατριβή. doi:10.12681/eadd/20054

Κάντζαρης, Β. (2003). Χρήση βενθικών μακροασπονδύλων για διαμόρφωση ελληνικού βιοτικού δείκτη εκτίμησης οικολογικής ποιότητας επιφανειακών υδάτων. Διδακτορική διατριβή. doi: 10.12681/eadd/14283

Υπουργείο Περιβάλλοντος & Ενέργειας, Ειδική Γραμματεία Υδάτων. (2017). 1^η Αναθεώρηση του Σχεδίου Διαχείρισης Λεκανών Απορροής Ποταμών του Υδατικού Διαμερίσματος Θεσσαλίας (EL 08). http://wfdver.ypeka.gr/wp-content/uploads/2017/08/EL08_2REV_P13_Proxedia_LAP_v02.pdf

Φίλης, Ι., Γεωργιάδης, Θ., Τζανουδάκης, Δ., Πανταζής-Γεράκης, Α., Τσιμενίδης, Ν., Παπουτσόγλου, Σ. Ε., Αγγελάκης, Α., Διαμαντόπουλος, Ε., Ζερεφός, Χ., Πυργιωτάκης, Ι. Ε. (1996). Το Ελληνικό Περιβάλλον. Αθήνα: Εκδόσεις Σαββάλα.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<https://stroudcenter.org/>

<https://www.genscript.com/gene-news/sanger-sequencing-vs-next-generation-sequencing.html?scr=homenews>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>