



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΙΕΣΕΩΝ**

Ανδρέας Χρίστου

Λεμεσός, Μάιος 2019

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΤΩΝ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΙΕΣΕΩΝ

του

Ανδρέα Χρίστου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δρ. Μάρλεν Βάσκες

Λεμεσός, Μάιος 2019

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ανδρέας Χρίστου, 2019

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτρια μου Δρ. Μάρλεν Βάσκες, για τη ανάθεση της πτυχιακής εργασίας αυτής και για όλη τη βοήθεια κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική συνεργάτρια του Τμήματος Δρ. Παναγιώτα Πισσαρίδου, για την τεράστια βοήθεια που μου παρείχε στο γράψιμο της πτυχιακής και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική συνεργάτρια του Τμήματος Δρ. Κατερίνα Δράκου, για τις πολλές γνώσεις που μου μετέφερε και την τεράστια βοήθεια που μου παρείχε προκειμένου να υλοποιήσω το εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας. Ακολούθως ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο Τμήμα Αναπτύξεως Υδάτων και ειδικότερα την Αθηνά Παπαθεοδούλου, για την πραγματοποίηση των δειγματοληψιών καθώς και την παροχή πληροφοριών. Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω το δίκτυο DNAqua Net για την παροχή της εκπαίδευσης στο βιοπληροφορικό εργαλείο Mothur και τέλος ευχαριστίες στο INRA Science & Impact για την κάλυψη των εξόδων για την αλληλούχιση μέσω της πλατφόρμας Illumina που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι υποχρεωμένο να εφαρμόζει σχέδια διαχείρισης των λεκανών απορροής μέσω της Οδηγίας Πλαίσιο για τα Ύδατα. Σκοπός των σχεδίων αυτών είναι ο χαρακτηρισμός των υδάτινων σωμάτων ως σώματα “καλής κατάστασης”, τόσο οικολογικής όσο και χημικής. Προκειμένου να υπάρχει μια διαρκής και αξιόπιστη εικόνα για την κατάσταση των σωμάτων πρέπει να εφαρμόζονται προγράμματα παρακολούθησης. Τα προγράμματα παρακολούθησης οργανισμών στην Κύπρο, όσον αφορά τα υδάτινα σώματα γλυκού νερού, εφαρμόζονται από το Τμήμα Αναπτύξεως Υδάτων και αφορούν τρία είδη οργανισμών. Οι οργανισμοί αυτοί είναι τα μακρόφυτα, τα μακροασπόνδυλα και τα διάτομα. Η πτυχιακή εργασία αυτή επικεντρώθηκε στα διάτομα, τα οποία είναι μονοκυτταρικά ευκαρυωτικά φύκη που εντοπίζονται σε όλα τα υδάτινα σώματα. Οι πληθυσμοί τους παρουσιάζουν εύκολα μεταβολές ανάλογα με την ποιότητα των υδάτων και αυτό τα καθιστά ως καλούς βιοδείκτες. Το Τμήμα Αναπτύξεως Υδάτων κάνει δειγματοληψίες από 44 σταθμούς και πραγματοποιεί μορφολογική ταυτοποίηση των διατόμων προκειμένου να μπορεί να χαρακτηρίσει την ποιότητα των υδάτων και να συγκρίνει αποτελέσματα από διάφορες χρονιές. Η επιστημονική κοινότητα διαρκώς προσπαθεί να αναπτύσσει τις μεθόδους ταυτοποίηση για μια πιο παραγωγική και γρήγορη ανάλυση βιοδεικτών. Μια από τις μεθόδους αυτές, η μέθοδος της μοριακής ταυτοποίησης, χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή. Αφού έγιναν οι δειγματοληψίες από το αρμόδιο τμήμα, απομονώθηκε το γενετικό υλικό από τα διάτομα και στη συνέχεια έγινε ο πολλαπλασιασμός αυτού μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στα δείγματα αφού εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση για να ελεγχθεί η επιτυχία των προηγούμενων σταδίων, στάλθηκαν σε εργαστήριο στη Γαλλία για να πραγματοποιήσουν τη διαδικασία της αλληλούχισης μέσω της πλατφόρμας Illumina. Τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση επέστρεψαν στη Κύπρο, επιλέχθηκαν τέσσερις σταθμοί σε μια λεκάνη απορροής, και μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης έγινε η επεξεργασία τους. Οι τέσσερις σταθμοί που επιλέχθηκαν βρίσκονται κατά μήκος του ποταμού Μαραθάσας. Μέσω της επεξεργασίας αυτής υπολογίστηκαν τα τελικά αποτελέσματα με τις αλληλουχίες των διατόμων από το κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάστηκαν μέσω διάφορων διαγραμμάτων και παρατηρήθηκαν διάφορες τάσεις που ακολουθούσαν διάφορα ταξινομικά επίπεδα κατά μήκος του ποταμού. Επίσης έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά από

προηγούμενες χρονιές καθώς και υπολογισμός των συντελεστών Chao και Shannon που δίνουν πληροφορίες για τη βιοποικιλότητα και την αφθονία των διατόμων στα δείγματα. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο σταθμός 4 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους υπόλοιπους τρεις σταθμούς τόσο στην ποικιλότητα όσο και στην αφθονία. Δεν μπορεί να γίνει ξεκάθαρο όμως εάν η διαφοροποίηση αυτή παρουσιάζεται λόγω καλύτερης ποιότητας των υδάτων ή υποβάθμιση της. Ενώ στο σταθμό 2 φαίνεται να συσχετίζονται οι μεταβολές συγκεκριμένων ταξινομικών επιπέδων με διάφορους ρυπογόνους παράγοντες. Συνολικά, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για τον προσδιορισμό της βέλτιστης αξιολόγησης της ποιότητας των υδάτων χρησιμοποιώντας σε συνδυασμό τις μοριακές και μορφολογικές μεθοδολογίες.

Λέξεις κλειδιά: διάτομα, βιοδείκτες, μεταγωνιδιωματική, μοριακή ταυτοποίηση, μορφολογική ταυτοποίηση

ABSTRACT

Each Member State of the European Union is required to implement the river basin management plans, through the Water Framework Directive. The purpose of these plans is to designate river basin as good water quality, at both an ecological and a chemical level. In order to have a lasting and reliable picture of the status of the basin, monitoring programs should be implemented. The monitoring programs in Cyprus, regarding fresh water bodies are executed by the Water Development Department and concern three types of organisms. These organisms are the macrophytes, the macro-invertebrates and the diatoms. This project focuses on diatoms, which are monocytic eucaryotic algae and are found in all water ecosystem. Their populations respond rapidly to water quality changes, making them good biomarkers. The Water Development Department takes samples from 44 stations and conducts morphological identification of diatoms for the characterization of water quality. The results are then compared between different years. The scientific community is constantly trying to develop methods of identification and one of these methods has been used in this work. After the collection of the samples by the department, a genetic material isolation from the diatoms was performed. The isolated DNA was then multiplied by the polymerase chain reaction. Positive samples were sent to a laboratory in France to carry out the Illumina MiSeq sequencing. The results were returned to our laboratory, where four stations were selected for further bioinformation analysis. The four stations are located along the Marathasa River. The results have been demonstrated using descriptive statistics. Various trends have been observed following different taxonomic levels along the river. We also attempted compare the results of the molecular analysis 2018 with the results of the morphological analysis from previous years. We have also calculated the chao and Shannon coefficients which give information about the diversity and species richness of the samples. Based on the results, it appears that station 4 shows significant differences compared to the other three stations in both diversity and abundance. However, it is not clear if this differentiation is due to a better quality of water or its degradation. While station 2 seems to be associated with changes in specific taxa levels with various pollutants. Overall, further research is required for the determination of the best assessment of water quality using in coordination the molecular and morphological methodologies.

Keywords: Diatoms, biomarkers, DNA Metabarcoding, morphological identification, molecular identification