

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi kar
Biológiai intézet

A fragmentáció planktonikus pro- és eukarióta egysejtű közösségekre gyakorolt hatásának kísérletes vizsgálata

36. OTDK Biológia Szekció

készítette:

Váczy-Földi Máté

témavezető:

Dr. Horváth Zsófia

osztályvezető, tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Kutatási Hálózat Ökológiai Kutatóközpont Vízi Ökológiai Intézet
Biodiverzitás és Metaközösség-ökológia Kutatócsoport

témavezető:

Dr. Szabó Attila

tudományos munkatárs

Svéd Agrártudományi Egyetem (SLU) Talaj, Víz és Környezetkutató Centrum
Functional Microbial Ecology Group

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Összefoglaló	3
Bevezetés	4
A globális biológiai sokféleség krízise	4
Az élőhelyek méretcsökkenése	4
A fragmentáció	4
Metaközösségek	5
A diszperzió hatásai	6
Kistavak	6
Célkitűzések	8
Anyagok és módszerek	9
Kísérleti elrendezés és a kiindulási közösségek	9
A kísérlet menete	10
Mintavétel	10
DNS izolálás és szekvenálás	10
Bioinformatikai adatfeldolgozás	11
Statisztikai elemzések	11
Eredmények	13
Diszkusszió	17
Köszönetnyilvánítás	19
Irodalom	20

Összefoglaló

A jelenlegi globális biodiverzitás válság egyik fő oka az élőhelyek elvesztése. Ez azonban nemcsak az elérhető élőhelyek számát csökkenti, hanem a megmaradó élőhely-hálózatokat is érinti. Ennek az élőhely-fragmentációnak a biodiverzitásra gyakorolt közvetlen hatása ugyanakkor kevésbé ismert, mivel a legtöbb esetben nem lehetséges az élőhelyek csökkenésétől függetlenül vizsgálni. Kutatócsoportunk egy mezokozmosz kísérletben vizsgálta a fragmentáció hatását az élőhelyek számának változatlansága mellett. Hat élőhely-hálózatot állítottunk össze 5-5 mezokozmoszból, amelyek közt vízcserével szimuláltuk a diszperziót, majd a hálózatok felében ezt megszüntettük (fragmentáció). Dolgozatom célja a fragmentáció hatásának vizsgálata volt egysejtű pro- és eukarióta közösségek biodiverzitás-mintázataira (alfa, béta, gamma) és összetételére. A kísérlet végén az eukarióták esetében a fragmentált metaközösségekben mind a lokális (alfa), mind a regionális (gamma) diverzitás alacsonyabb volt. Baktériumoknál ez nem volt kimutatható, ugyanakkor esetükben is szignifikáns eltéréseket találtunk a közösségek összetételében. Eredményeim megmutatták, hogy az összeköttetések sérülése egy élőhely-hálózatban akár rövid időn belül is jelentős változásokhoz vezethet, és egysejtű eukarióták esetén mind az egyes élőhelyek, mind a hálózatok biodiverzitását negatívan befolyásolja.

Bevezetés

A globális biológiai sokféleség krízise

Napjainkban bolygónk biodiverzitás krízisben szenved. Ez a fajok jelentős mértékű kihalásában is megmutatkozik (Barnosky et al., 2011). A biológiai sokféleségről szóló egyezmény döntéshozó szerve, a Részes Felek Konferenciája 2002-ben elfogadta az úgynevezett 2010-es biodiverzitási célt, amelynek értelmében az egyezményt aláíró országoknak a biológiai sokféleség elvesztésének mértékét jelentősen csökkenteniük kellett volna. Azonban 2010-ben a cél elérését vizsgáló kutatások kimutatták, hogy a biodiverzitás állapotát indikáló mutatók nemhogy javultak ezen időszakban, hanem tovább romlottak, a biodiverzitásra gyakorolt nyomást jelző mutatók pedig növekedtek (Butchart et al., 2010).

Az élőhelyek méretcsökkenése

A biodiverzitás csökkenés egyik fő oka az élőhelyek elvesztése (Pimm, 2008; Hanski 2011), amelynek során az egyes élőhelyek mérete (pl. szárazföldi nagy kiterjedésű élőhelyek esetében), száma (teljes élőhelyek eltűnése), valamint ezek összes, a tájban elérhető mennyisége („habitat amount”) is csökkenhet. Napjainkra a föld lakható részének már több, mint a felét átalakítottuk, mely nagy mennyiségű élőhely elvesztéséhez vezetett (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). A szövetes növények és gerinces állatok jelentős része bennszülött, csak a világ 25 ökológiai forrópontjának valamelyikében fordul elő. Kutatások kimutatták, hogy manapság ezen forrópontok aránya, mely egykor a Föld felszínének 12%-a volt, csupán 1,4%-ra zsugorodott. Az is elmondható, hogy az élőhely csökkenés hatására jelentős mennyiségű faj került a veszélyeztetett IUCN („International Union for Conservation of Nature and Natural Resources”, Természetvédelmi Világszövetség) kategóriába, és így nagy eséllyel kihalással veszélyeztetetté vált (Brooks et al., 2002).

A fragmentáció

A biológiai sokféleség elvesztésének másik fő oka az élőhelyek fragmentációja, amelybe beleértjük egyrészt a nagy kiterjedésű élőhelyek (pl. esőerdők) feldarabolódását, valamint a megmaradó élőhelyek közti kapcsolatok elvesztését, és a megnövekvő térbeli izolációt is (Haddad et al., 2015). Máig vitatott téma, hogy a fragmentáció mennyire és pontosan hogyan hat a biológiai sokféleségre (Fletcher et al., 2018; Fahrig et al., 2019), részben mivel a fragmentációval számos egyéb hatás is együtt jár, részben pedig azért, mert nagyon nehéz a direkt hatását elválasztani az élőhelyek csökkenésétől. Az első szimulációs eredmények szerint a fragmentációnak csak nagyon jelentős élőhely-vesztés esetén volt hatása a kihalásra (Fahrig, 1997). A későbbi vizsgálatok rámutattak arra,

hogy fontos az élőhely fragmentáció és az élőhely méretének csökkenése között különbséget tenni, mivel ha fragmentáció alatt az élőhely másmilyen degradációját, csökkenését is értjük, nem csak a térbeli feldarabolódást, akkor a hatás független vizsgálata problémássá, lehetetlenné válik (Fahrig, 2003). Fahrig (2013) később felállította az élőhely-mennyiség hipotézist (habitat amount hypothesis), amellyel máig tartó vitát indított. Elmélete szerint az élőhelyfoltok esetében a méret és izoláció hatásai egy közös mögöttes folyamat, a mintavételi terület hatásának következményei, így valójában a fajgazdagság kizárólag az elérhető élőhely-mennyiség függvénye. A későbbi kísérletes kutatások azonban cáfolták az élőhely mennyiség hipotézist (Haddad et al., 2017; Damschen et al., 2019). Azt találták, hogy a fajgazdagság-terület kapcsolat („species–area relationship”, SAR) egyenese sokkal meredekebb a fragmentált élőhelyeken a nem fragmentáltakkal összevetve, és több faj veszett el kis területeken, ha az élőhelyfoltok izoláltabbak voltak. Egy másik kísérletben hasonló eredményre jutottak a konnektivitás helyreállítása során, mivel a kolonizáció sokkal gyorsabb volt a folyosókkal összekötött élőhely-foltok esetében, szintén meredekebb fajgazdagság-terület összefüggést eredményezve (Damschen et al., 2019). Ugyanakkor számos esetben nem látunk ilyen egyértelmű összefüggéseket, sőt, Fahrig és munkatársai továbbra is amellett érvelnek, hogy az esetek többségében vagy egyáltalán nincs (Fahrig, 2017) vagy pozitív az összefüggés (Fahrig et al., 2019). A vita továbbra is nagyrészt abból származik, hogy nincsenek igazán megbízható, a fragmentáció egyes aspektusait más hatásoktól függetlenül elválasztó kísérletes és empirikus adatsorok, melyek segítségével ez a hatás igazán jól megérthető lenne, illetve azok a hatások, amelyek egy nagy kiterjedésű, összefüggő erdő fragmentációjakor fellépnek (pl. megnövekvő habitatdiverzitás vagy élőhelyfolt-szám; Fahrig, 2019), nem feltétlenül azonosak a természetes módon szigetszerű élőhelyek (pl. tavak) hálózata esetében. Így arról, hogy a konnektivitás-vesztés és az ezzel járó izoláció hogyan hat az élőhely-hálózatok biodiverzitására, még mindig jórészt feltáratlan.

Metaközösségek

A metaközösségek alatt olyan lokális közösségek összességét értjük, melyeket egymással potenciálisan interakcióban lévő fajok diszperziója kapcsol össze (Wilson, 1992). A metaközösség elmélet olyan folyamatokat ír le, melyek metaközösségi szinten játszódnak le, az egyes élőhelyek kapcsolatai révén. A tudományterület kezdetben négy szélsőséges paradigmára koncentrált (Leibold et al., 2004), amelyeket ma már inkább archetípusokként emlegetnek (Leibold & Chase, 2017). Ezek közül dolgozatom szempontjából a leginkább releváns a folt dinamika (patch dynamics). Ezen megközelítés szerint minden élőhely folt azonos, és képes populációk fenntartására, a lokális faji diverzitás pedig a diszperzió által limitált (Leibold et al., 2004).

A diszperzió hatásai

Modellezés segítségével már kimutatták, hogy a diszperzió keresztül a közösségek összeköttetése nagyban befolyásolja az ökoszisztéma fajszámát és produktivitását. Bizonyítható volt az is, hogy az összeköttetés megszakítása után a lokális és regionális biodiverzitás, valamint az ökoszisztéma folyamatok is megváltoztak (Loreau et al., 2003). Kísérletesen igazolták, hogy diszperzió segítheti a fajok alkalmazkodását a megváltozott környezeti tényezőkhez is (Thompson & Shurin, 2012). Ez azt jelenti, hogy a regionális biodiverzitás csökkentheti a lokális diverzitásra gyakorolt negatív hatásokat, az idézett kísérlet esetében például zooplankton közösségek esetében. Ezt a hatást „mentőhatásnak” (rescue effect) nevezik, amelynek révén a nagy regionális diverzitás kellően összekötött élőhely-hálózatok esetében térbeli biztosításként funkcionál (spatial insurance). A legerősebb hatása a modellek alapján közepes erősségű diszperzió esetében várható (Loreau et al., 2003). Ha a diszperzió túl gyenge (pl. az élőhelyek túlságosan izoláltak), akkor az összeköttetések nem tudják kompenzálni a véletlenszerű kihalások sebességét, és alacsonyabb fajszám várható az egyes élőhelyeken. Túlságosan erős diszperzió szintén alacsony helyi fajszámot eredményez, mivel egy idő után homogenizálódnak az élőhelyek (Mouquet & Loreau, 2003; Thompson et al., 2020).

Élőhely hálózatokban a kapcsolatok megszakadása tulajdonképpen a diszperzió elvesztését jelenti egyes élőhelyek között. Az, hogy mely összeköttetések szakadnak meg, befolyásolja a biodiverzitásra gyakorolt hatást. Szimulációkkal kimutatták, hogy a sok kapcsolattal rendelkező élőhelyek eltávolítására érzékenyebbek voltak a hálózatok, és így a központi kapcsolatok elvesztése jelentősen csökkenti a térbeli biztosítást. A vizsgálatok megmutatták azt is, hogy a random kiindulási kapcsolatokkal rendelkező hálózatok kevésbé érzékenyek a kapcsolatok elvesztésére (Thompson et al., 2015). Ugyanerre jutottak egy hosszú távú adatsor elemzésénél is, amely az első empirikus bizonyítékokat szolgáltatva arról, hogy egy hálózaton belül a több szomszéd elvesztése nagyobb biodiverzitás-csökkenéssel jár (Horváth et al., 2019). A diszperzió a fajok kapcsolati hálózatának stabilitásában is jelentős szerepet játszik, fenntartja azok viszonylagos állandóságát (Thompson és Gonzalez, 2017). Összességében megállapíthatjuk, hogy a konnektivitás fenntartásának konzervációbiológiai szempontból sokrétű és jelentős szerepe van.

Kistavak

A kis víztestek, 5 hektár alatti kistavak globálisan nemcsak számszerűen gyakoriak, hanem regionális (táji) léptékben több édesvízi fajnak is adnak otthon, mint a folyók, patakok vagy tavak (Williams et al., 2004), sőt akár az azonos vízfelületű nagyobb tavak. A nagyobb összefajszám mellett veszélyeztetett fajokból is többet találunk kistavakban, tehát különösen fontos szerepet játszanak ezek védelmében (Biggs et al., 2005).

A kistavak száma jelentősen csökkent az elmúlt évszázadokban. Egy vizsgált területen a kistavak több, mint fele elveszett a vizsgálatot megelőző ~100 évben (Heath & Whitehead, 1992). A

kistavak eltűnésére különösen fontos figyelmet fordítanunk, fent részletezett, biodiverzitáshoz kapcsolódó szerepük miatt. Egy vizsgálat eredménye szerint az egyes kistavak eltűnése a megmaradó tavak közötti biológiai kapcsolatok elvesztéséhez vezet és gyengíti a fennmaradó kistavak közösségeinek változatosságát. A vizsgált területen az elmúlt ötven évben a kistavak 23%-a és ezáltal a vízfelület 61%-a elveszett, valószínűleg a helyi ember populáció és mezőgazdasági kitermelés növekedésének hatására. A fennmaradó kistavak diverzitását lokális (vízmélység) és regionális (földhasználat, tavak gyakorisága, teljes vízzel fedett terület a tájban) faktorok befolyásolták (Rhazi et al., 2011). Egy másik vizsgálatban az élőhelyek 70%-ának eltűnésével feldarabolódó élőhely-hálózatnak közvetlen hatása is volt a lokális és regionális fajszámra (Horváth et al., 2019).

Általánosságban elmondható, hogy az emberi tevékenység, azon belül is a mezőgazdaság, a kistavak elvesztéséhez, a megmaradó élőhely hálózatok fragmentációjához vezet (Heath és Whitehead, 1992; Rhazi et al., 2011; Bouahim et al., 2015; Horváth et al., 2019). A tudomány szempontjából a biodiverzitás megőrzésének fontosságán kívül is előnyös lehet a kistavak megőrzése, mivel azok kiváló modellek lehetnek vizsgálatokhoz és kísérleti manipulációval járó hipotézis vizsgálatokhoz. Ezek a vizsgálatok és kísérletek nemcsak a kis víztestekről tudnak információt szolgáltatni, hanem általános elméletek teszteléséhez is hozzájárulhatnak (De Meester et al., 2005). Ezen élőhelyek még könnyebben manipulálható, szimulálható modelljei lehetnek a mezokozmoszok, amelyeket ma már széles körben használnak nemcsak általános ökológiai elméletek tesztelésére, de metaközösség vizsgálatokra is (Howeth & Leibold, 2013; Thompson et al., 2015; Mausbach & Dzialowski, 2019).

Célkitűzések

A kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatást gyakorol az élőhely-hálózatok fragmentációja a biodiverzitásra önmagában, élőhelyméret-csökkenés nélkül. Vizsgálatunk tárgyául időszakos kis tavak eukarióta és prokarióta planktonközösségeit választottuk. Célunk volt annak felderítése, hogy viszonylag rövid idő (3 hónap) alatt látunk-e változást a közösségek helyi és regionális diverzitás mintázataiban a hálózatban bekövetkező konnektivitás-vesztés hatására.

Anyagok és módszerek

Kísérleti elrendezés és a kiindulási közösségek

A kísérlet során 6 metaközösséget szimuláltunk, egyenként 5-5 élőhellyel, tehát összesen 30 élőhelyünk volt. Az élőhelyek 200 l-ig feltöltött 220 l-es mezokozmoszok voltak (1. ábra). Ezek kialakításához UV-álló műanyag szüretelőkádatat használtunk, amelyeket kívülről lefedtünk szúnyoghálóval, így kiküszöbölve a nagyobb élőlények, falevelek és egyéb más hasonló zavaró szennyezés bekerülését a közösségekbe. A mezokozmoszokat kültéren, az Ökológiai Kutatóközpont Balaton Limnológiai Intézetének udvarán állítottuk fel, térben véletlenszerűen elrendezve (a térbeli kapcsolatot mesterséges diszperzióval szimuláltuk a metaközösségeken belül). A felállítás során odafigyeltünk arra, hogy a mezokozmoszok a lehetőségek szerint leginkább azonos fényviszonyoknak legyenek kitéve.



*1. ábra: Mezokozmoszok a kísérlet folyamán
Fotó: Horváth Zsófia*

A kiindulási közösségek mind a 30 mezokozmoszban azonosak voltak, amelyhez egyenlő mértékben kevertük össze 10 időszakos, eutróf jellegű vizes élőhely (hét fertőzugai szikes tó és három kiskunsági bombatólcsér) plankton közösségeit. Először a mezokozmoszokat feltöltöttük csapvízzel és állni hagytunk, hogy a klór elpárologjon belőle. A tápanyag-koncentrációt úgy állítottuk be, hogy megfeleljen a természetes körülmények között, az inokulumként használt élőhelyeken mérhetőnek (0,7

mg/l összes foszfor, 2,1 mg/l összes nitrogén-koncentrációkkal; Vad et al., 2017; Boros et al., 2017; Póda, 2018).

A kísérlet menete

A kísérlet 2020 nyarán-őszén zajlott. A metaközösségeken belül az összekötött élőhelyek között az egyes élőhely-hálózatokban 1% diszperziót (vízcserét) végeztünk 4 héten keresztül (júl. 7 - aug. 4.). Ez egy áttetsző plexiüvegből készült oszlopos plankton mintavevővel történt, amellyel a mezokozmoszok átkeverése után mindegyikből kivettünk 2,5 l vizet, majd a hálózat 5 tagjából származó mintákat összekeverve újra szétosztottuk a megfelelő mezokozmoszokba (ezzel biztosítva, hogy minden mezokozmosz térfogatának 1%-át, azaz 2 l-t kicseréljük a másik négy mezokozmoszsal). A fragmentációs kezelés kezdetétől 3 közösségnél ezt a diszperziót megszakítottuk, így szimulálva a fragmentációt, 3-nál pedig változatlanul tovább folytattuk kontrollként további 12 hétig (okt. 27.). Ugyanakkor amiatt, hogy a diszperzióval járó zavarás ne okozzon a kezeléseket között mesterséges hatást, a fragmentációs mezokozmoszokat is ugyanúgy felkevertük minden héten. Az egyes diszperziós alkalmak, mintavételek és mezokozmoszok között mindig minden eszközt elmostunk, így elkerülve a keresztszennyezést.

Mintavétel

A mintavételkor a mezokozmoszok vizét összekevertük, majd 1 l vizet vettünk ki a diszperzióhoz is használt plexi mintavevő segítségével. Ezt a vizet egy 100 µm-es plankton hálón átszűrtük, hogy a többsejtű élőlényeket kiszűrjük a vízből. A vízmintákból ezután 10 ml-t leszűrtünk környezeti DNS kivonása céljából 25 mm átmérőjű, 0,1 µm pórusméretű MF-Millipore membránfilteren (Merck). A szűrőkorongokat ezután mintafeldolgozásig -20 °C-on tároltuk.

DNS izolálás és szekvenálás

A környezeti DNS kivonásra szánt mintákat szigorúan steril körülmények között dolgoztam fel. A szűrőkorongokból a DNeasy PowerSoil Kit segítségével végeztem a DNS kivonást, a gyártó útmutatása alapján, az alábbi eltérésekkel: a sejtfeltárást MM301 sejtmalom segítségével végeztem, 2 percen át történő rázatással 30 Hz-en, illetve a C6 oldatból előírt 100 µl helyett 50 µl-t használtam. A kivont DNS-t -20 °C-on tároltam.

Az izolált DNS-ekből ezután a 18S riboszomális RNS-t és 16S riboszomális RNS-t kódoló taxonómiai markergének egyes régióit polimeráz láncreakció segítségével felszaporítottam. A reakcióhoz használt primerek a következők voltak: mikroeukarióták azonosítására az 574°F (CGGTAAYTCCAGCTCYAV) és 1132R (CCGTCAATTHCTTYAART) (Hugerth et al., 2014),

baktériumok azonosítására a 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) (Herlemann et al., 2011), és 805NR (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Apprill et al., 2015) primereket alkalmaztuk.

A PCR reakció az alábbi protokoll szerint történt: a teljes reakcióelegy végtérfogata 20 µl volt, amely tartalmazott 4 µl 5×HF puffert (Thermo Fischer Scientific), 4 µl dinukleotid-trifoszfát (dNTP) keveréket (10 µM), 10 µl RNáz és DNáz mentes DEPC kezelt steril vizet, 0,2 µl-t az egyes primerekből (0,66 µM), 0,2 µl Phusion magas másolási hűségű DNS polimerázt (0,5 U, Thermo Fischer Scientific), 0,4 µl szarvasmarha szérumalbumint (Fermentas) és 1 µl DNS mintát. Eukarióták esetében ettől a fent leírt elegytől annyiban eltértem, hogy 2 illetve 3 µl minta DNS-t adtam a reakcióelegyhez. A reakció hőprofilját a következők szerint állítottam be 18S rRNS génre specifikusan: kezdeti denaturáció 5 perc 98 °C, ezután 25 ciklus 95 °C 30 s, 51 °C 30 s 72 °C 1 perc, és végső extenzió 72 °C 10 perc. A 16 S rRNS génre specifikus amplifikáció esetében az annealáció 55 °C-on zajlott 30 s-ig.

A reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Itt az alábbi protokollt követtem: 5 µl PCR terméket futtattam 1%-os agaróz gélben, melyhez 100 V-ot és 500 mA áramerősséget alkalmaztam 20 percig.

A PCR termékeket a Genomics Core, Research Technology Support Facility, Michigan State University (USA) intézménybe küldtük szekvenálásra, ahol 2×250 bp formátumban MiSeq v2 reagens kit alkalmazásával történt a DNS láncok szekvenciájának meghatározása, Illumina Miseq platformon.

Bioinformatikai adatfeldolgozás

Az amerikai intézményből a DNS szekvenciákat fastq file formájában kaptuk meg. A szekvenciákat ezután a mothur v1.44 (Schloss et al., 2009) programmal dolgoztam fel a MiSeq SOP (Kozich et al., 2013, letöltés ideje 2021.05.15.) protokollt követve, annak néhány módosításával. A „make.contigs” parancsban a deltaq értéket 10-re állítottam. A „pre.cluster” parancsnál 4 különbséget engedtem meg a szekvenciák között, a „split.abund” parancssal eltávolítottam a singleton szekvenciákat a kiméra szűrés után. A „dist.seqs” parancsnál csak 0,1-nél nagyobb távolságokat távolítottam el. A folyamat végeztével újraminutavételezést végeztem a legalacsonyabb szekvenciaszámú minta alapján. Az elemzéseket eukariótákra és baktériumokra külön végeztem el.

Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az R programnyelv (R Core Team, 2021) használatával és egyéb kiegészítő csomagok segítségével végeztem. Az adatok kezelésére, tisztítására és az ábrák készítésére a tidyverse csomagot használtam (Wickham et al., 2019).

Az alfa, Whittaker-féle béta és gamma diverzitás értékeket a mobr (McGlinn et al., 2021) csomaggal számoltam. A diverzitás értékeket az egyes metaközösségek között hasonlítottam össze. Az

értékekhez p értékek is társulnak, mivel a csomag permutációs ANOVA teszteket is végez az eredményeken.

Második lépésként a szignifikáns eredmények esetében (eukarióta alfa és gamma diverzitások) megvizsgáltam, mi okozza a szignifikáns eltéréseket. Ehhez az alfa-diverzitás esetében kevert hatásokat vizsgáló modellt használtam (nlme csomag; Pinheiro et al., 2021). A modellben a diverzitás logaritmus függött a kezeléstől, mint állandó, és a metaközösségtől, mint véletlen hatástól. A gamma-diverzitást pedig fajtelitődési görbék (iNEXT csomag; Hsieh et al., 2020) konfidencia-intervallumai segítségével hasonlítottam össze.

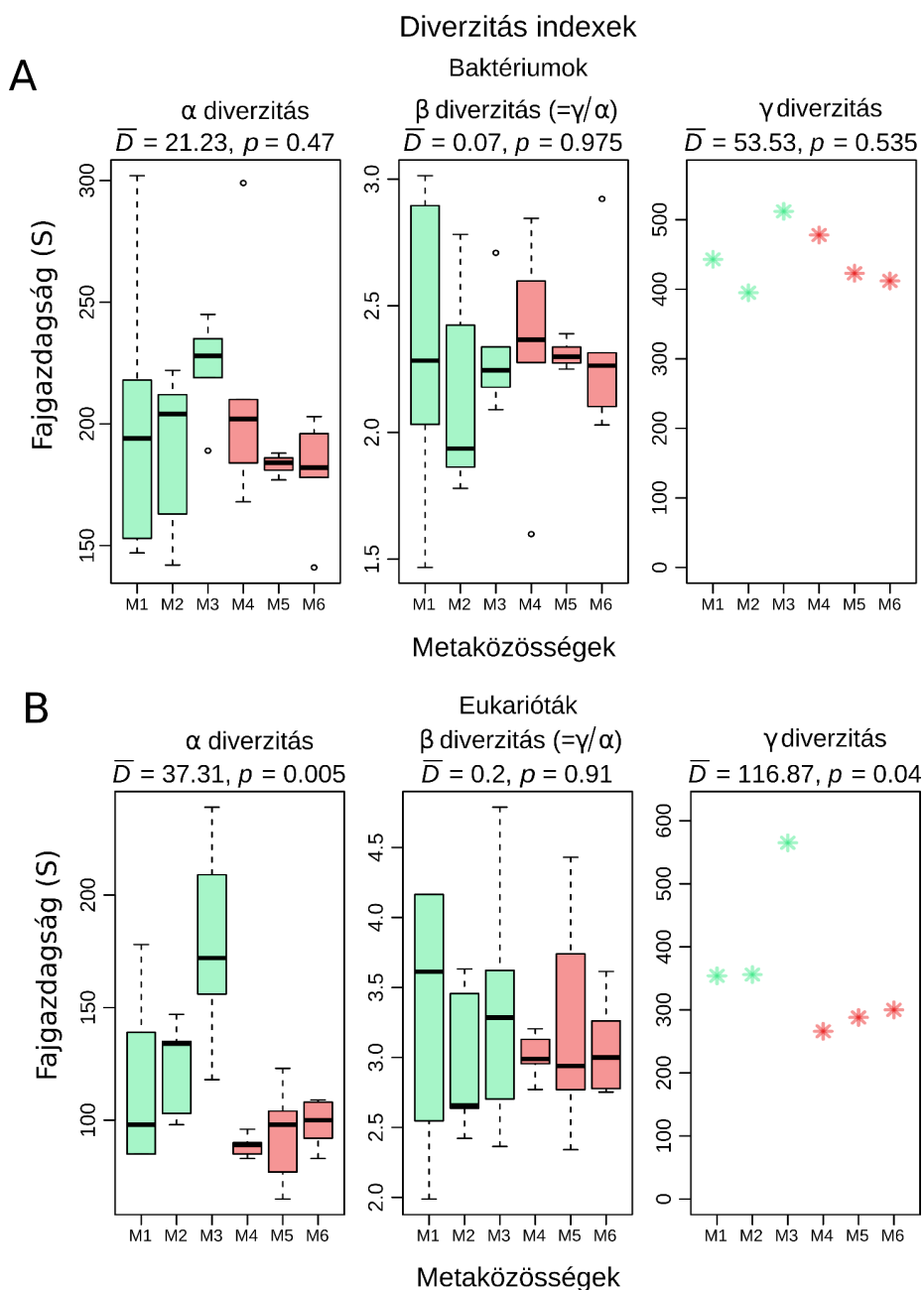
Végül a vegan csomag segítségével (Oksanen et al., 2020) többváltozós elemzéssel vizsgáltam az egyes közösségek eltéréseit és ennek kapcsolatát a kezeléssel. Ehhez először nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) ordinációval kétdimenziós távolságmátrixot készítettem, majd a közösség távolság-alapú közösségmátrixait két módon is teszteltem: egyrészt permutációs elemzéssel (PERMANOVA), másrészt hasonlósági százalékon alapuló teszttel (SIMPER).

A közösségek összetételének eltéréseit adatvizualizációs eszközökkel is vizsgáltam. Itt a relatív abundancia értékek alapján törzs szinten összesítettem a közösségeket a phyloseq csomag felhasználásával (McMurdie & Holmes, 2013)

Eredmények

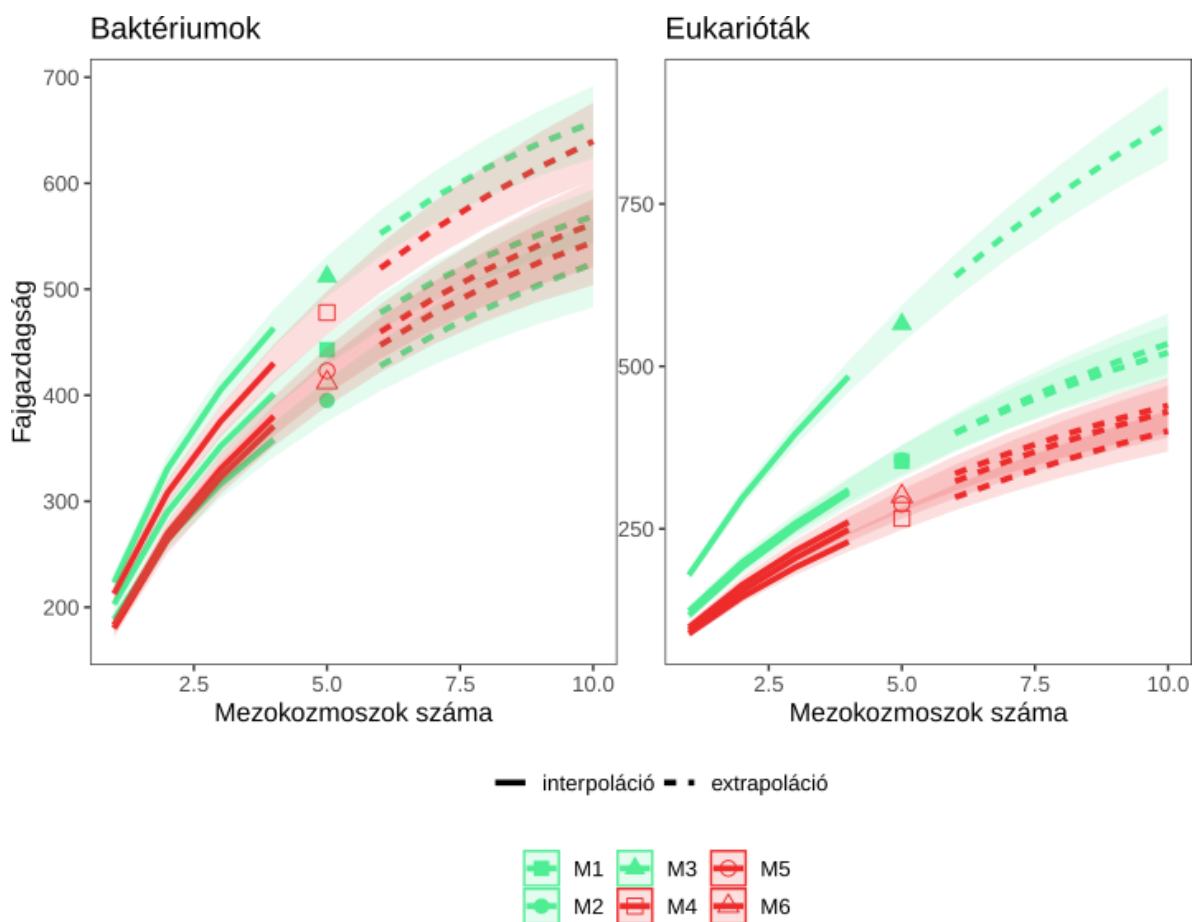
A biodiverzitás indexeket vizsgálva a baktériumok esetében nem volt kimutatható eltérés a fragmentált és összekötött közösségek között (2. ábra), azonban eukariótáknál szignifikáns eltérést találtam az alfa ($p = 0.005$) és gamma ($p = 0.04$) diverzitások esetében is (2. ábra). A béta-diverzitás esetében nem találtam szignifikáns eltéréseket.

Az eukarióták esetében az alfa diverzitás értékekre illesztett kevert hatások modell csak marginálisan szignifikáns eredményt adott a kezelés hatására ($p = 0.057$)



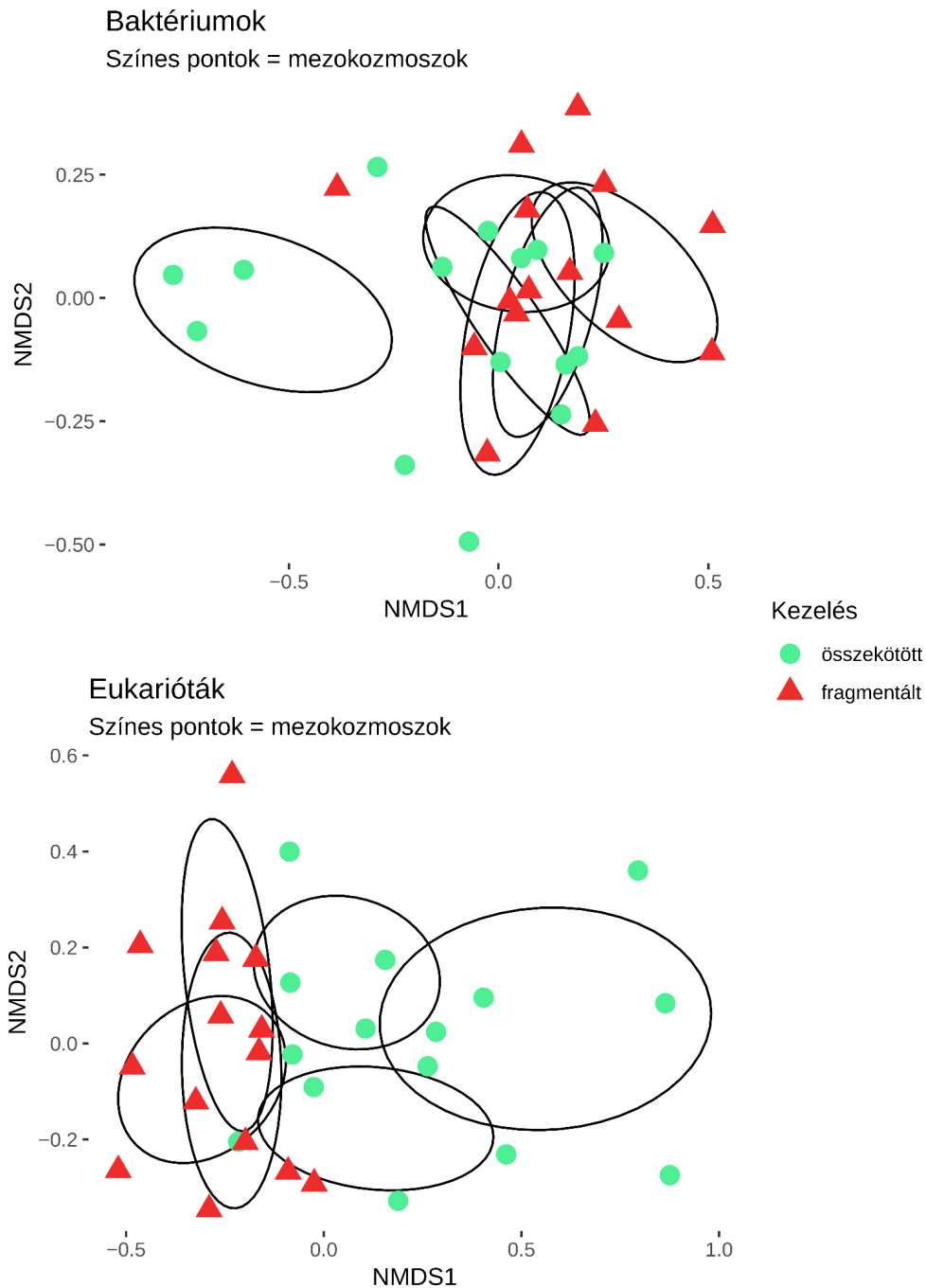
2. ábra: Diverzitás indexek (alfa, béta, gamma diverzitás OTU-számban kifejezve) az egyes metaközösségekben (A: baktériumok, B: eukarióták; zöld:összekötött, piros: fragmentált metaközösségek).

A fajtelítődési görbéken (3. ábra) azt látjuk, hogy a baktériumok esetében itt sem mutatkozik jelentős eltérés, viszont az eukariótáknál az összekötött és a fragmentált metaközösségek konfidencia intervallumai elválnak, és így a két kezelésben kapott gamma-diverzitás értékek különbözőnek tekinthetők.



3. ábra: Fajtelítődési görbék. A folytonos vonalak az interpolált értékeket (metaközösségenként 5 mezokozmosz), a szaggatott vonalak az extrapolált értékeket, a pontok pedig a mért értékeket jelölik. A szimbólumok a metaközösségeket, a színek pedig a kezelést jelölik (piros: fragmentált, zöld: összekötött). A görbék alatt és fölött a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia-intervallumokat a görbékkel azonos (átlátszó) szín jelöli.

A nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) ordinációval (4. ábra) az eukariótáknál jól láthatóan elválnak az összekötött metaközösségek a fragmentáltaktól, míg a baktériumoknál csupán egy összekötött metaközösség válik el egyértelműen a többi közösségtől, ugyanakkor látható itt is egy trend az első NMDS tengely mentén (a fragmentált mezokozmoszok inkább a pozitív régióban találhatóak, míg összekötöttből hozzájuk képest több van a negatív régióban).

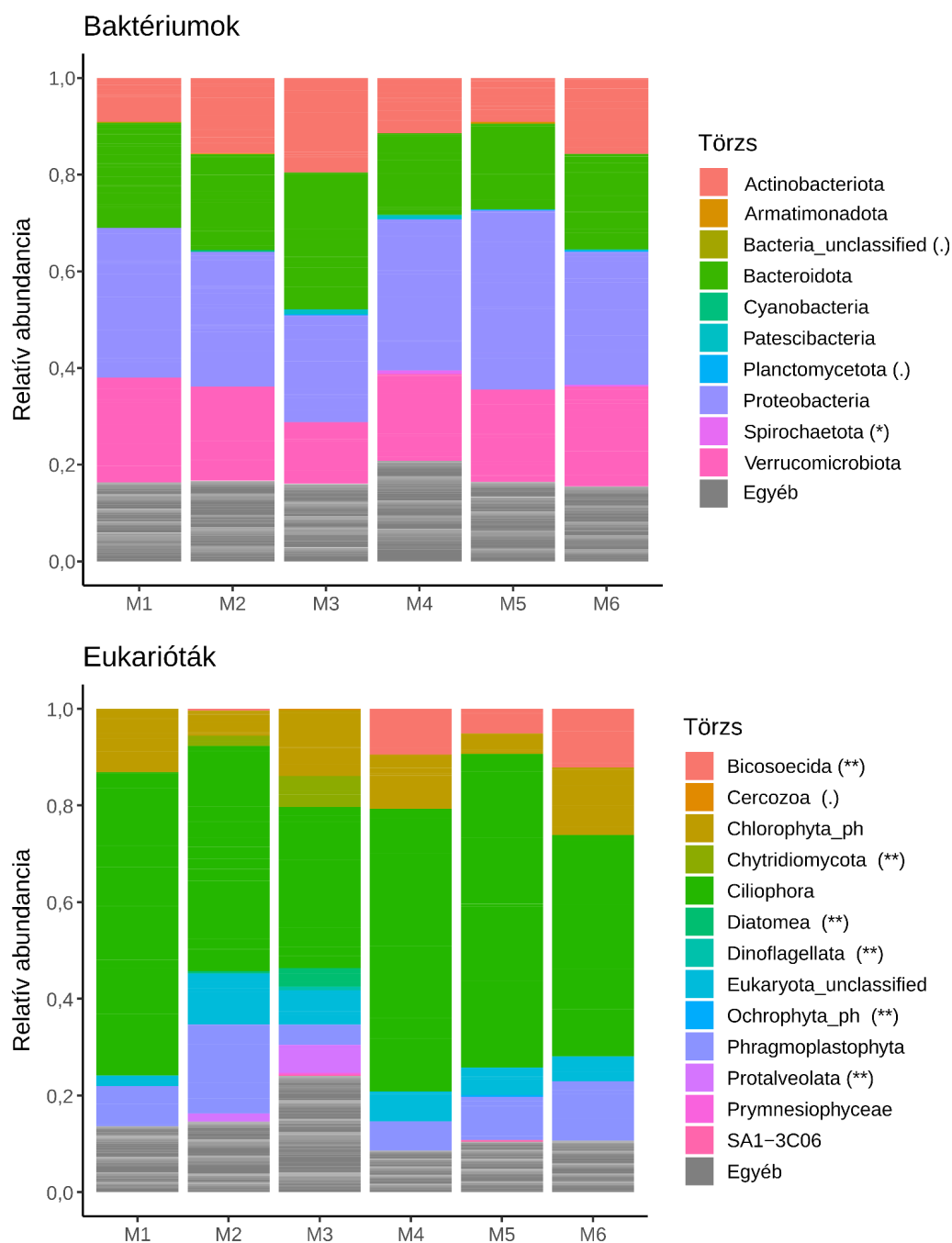


4. ábra: Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményei. A szimbólumok a mezokozmoszokat jelölik (zöld kör: összekötött, piros háromszög: fragmentált). Az ellipszisek az egyes metaközösségekhez tartozó értékek 50%-át fedik le.

A távolságmátrixok permutációs elemzése alapján (PERMANOVA) a baktériumok esetében szignifikáns hatást gyakorolt a kezelés ($p = 0.006$) és a kezelésen belül a metaközösségek is ($p = 0.001$). Az eukariótáknál hasonló eredményeket kaptunk (kezelés: $p = 0.004$, metaközösség: $p = 0.002$)

A 5. ábrán azt láthatjuk, hogy hogyan tért el az egyes metaközösségek összetétele törzsi (phylum) taxonómiai szinten. Az ábra bemutatja a SIMPER elemzések eredményeit is (a kezelések

közi eltérésekhez szignifikánsak hozzájáruló törzsek csillaggal ($p < 0.05$), illetve marginálisan szignifikáns eredmény esetében ($0.05 < p < 0.1$) ponttal jelölve).



5. ábra: Baktérium és eukarióta törzsek átlagos abundanciája az egyes metaközösségekben (M1-M3: összekötött, M4-M6: fragmentált). A SIMPER elemzés alapján a kezelések közti eltérésekhez hozzájáruló törzsek jelölése: ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; . $0.05 < p < 0.1$

Diszkusszió

A kísérletünk során arra kerestük a választ, hogy időszakos kis tavak eukarióta és prokarióta planktonközösségei hogyan reagálnak az élőhely-hálózatok fragmentációjára. Vizsgálatunk kiemelt célja az volt, hogy a fragmentáció hatását önállóan, az élőhelyméret csökkenése nélkül vizsgáljuk. Szerettük volna megtudni, hogy kimutatható-e változás már viszonylag rövid idő (három hónap) alatt. Kérdéseink megválaszolásához mezokozmosz kísérletet végeztünk, ahol metaközösségeket állítottunk fel és így vizsgáltuk az eukarióta és prokarióta planktonközösségeket. Eredményeim megmutatják, hogy mind az eukarióta, mind a baktérium közösségeket befolyásolja az élőhely fragmentáció, mivel az élőhelyek számának változatlansága mellett, a konnektivitás megszüntetésével szignifikáns eltéréseket találtam a közösségek között.

A diverzitás értékekben csak eukariótáknál találtam szignifikáns eltéréseket. Itt az alfa- és gamma-diverzitás jelentősen kisebb volt a fragmentációnak kitett közösségekben. Ugyanakkor például mind az eukarióták, mind a baktériumok esetében volt szignifikáns hatása a kezelésnek. A közösségek összetételén és a hasonlósági százalékon alapuló elemzés is mindkét csoport esetében talált olyan törzseket, melyek szignifikánsan hozzájárulnak a közösségek különbözőségéhez.

Korábban azt tartották, hogy sem a baktériumok, sem az egysejtű eukarióták közösségére nem gyakorol a diszperzió hatást (Baas-Becking & Nicolai, 1934; Finlay, 2002). Ugyanakkor ez nagyrészt annak volt köszönhető, hogy az első ezzel kapcsolatos kutatásokat erősen szélsőséges környezetben végezték (pl. sós tavakban), és azóta már számos vizsgálat kimutatta, hogy akár a legkisebb egysejtűek és baktériumok is mutathatják a diszperzió-limitáció jeleit (Telford et al., 2006; Peay et al., 2010; Adams et al., 2013). Sőt, egysejtű eukarióták és prokarióták esetében is megfigyelhetők biogeográfiai mintázatok (Ramette et al., 2005; Martiny et al., 2006). Az eredményeim is azt mutatják, hogy mind a baktériumok, mind az eukarióták közösségeire hatást gyakorol a diszperzió megszakítása.

A baktérium közösségekben ugyanakkor sokkal kevesebb, kisebb mértékű változást találtam, mint az eukariótákban. Ennek magyarázata lehet az, hogy a baktériumok, egysejtű eukariótáknál kisebb méretük okán, kevésbé diszperzió limitáltak (De Bie et al., 2012), és hatalmas lokális populációméreteiknek köszönhetően kisebb a kihalás esélye is a helyi élőhelyekről (esetünkben a mezokozmoszokból).

A kistavak számos szempontból jelentős szerepet töltenek be a biodiverzitás megőrzésében és a tudomány számára is kiemelten fontosak (Collinson et al., 1995; Biggs et al., 2005; De Meester et al., 2005). Ezért vizsgálatunk az általános ökológiai eredmények mellett fontos relevanciákkal jár ezen élőhelyek számára is. Mivel fennmaradásuk számos tájban komoly veszélynek van kitéve (Heath & Whitehead, 1992; Horváth et al., 2019), így annak hangsúlyozása, hogy az egyes élőhelyek nem csak önmagukban értékesek, hanem hálózataikon belül a konnektivitás védelmére kiemelten figyelni kellene, fontos célt szolgálhat a védelmük során.

Az, hogy a fragmentáció biodiverzitásra gyakorolt hatása még mindig jelentősen vitatott téma (Fletcher et al., 2018; Fahrig et al., 2019), nem segíti a biodiverzitás hatékony globális védelmét. Kísérletünk azáltal, hogy a fragmentációt az élőhelyméret csökkenésétől elkülönítve vizsgálja, fontos része a vita feloldásának, és a fragmentáció pontos hatásmechanizmusának megismerésének, mivel egyértelmű választ szolgáltat arra, hogy a fragmentációval járó konnektivitás-vesztés negatív direkt hatással van a biodiverzitásra, amely független az élőhelyek számától és minőségétől.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Jordán Ferencnek, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy az általa igazgatott intézetben gyakornoki munkát végezhsek. Szeretném kifejezni a köszönetemet mindenkinek, aki a kísérlet lebonyolításában és a laboratóriumi munkákban részt vett, név szerint: Dervalics Anna, Payer Olivér, Szabadkai Zorka, Huynh Ngoc Thu Huong, Ivana Lukić, Nyitrai Kamilla, Fehér Dóra, Burányi Máté, Glatz Kinga, Laskai Csilla, Csiszár Virág, Fierpasz Ádám, Kardos Vivien, Pálffy Károly, Póda Csenge. Köszönetet szeretnék mondani Vad Csabának a kísérlet megtervezésében való részvételéért. Szeretném megköszönni Márton Zsuzsannának a kísérlet munkálataiban való részvételét, és köszönöm neki és Nagy Hajnalkának a laboratóriumi munkák során nyújtott iránymutatásukat, betanítást, és hogy minden, sokszor ismétlődő, kérdésemre türelmesen válaszoltak. Köszönöm Szabó Beátának, hogy a kísérletben való munkája mellett segített elsajátítanom számos laboratóriumi módszert, és a statisztikai elemzésekben is segítséget.

Köszönetet szeretnék mondani Felföldi Tamásnak a kísérlet tervezésében és laboratóriumi munkákban nyújtott segítségével, azért, hogy a laborjában végezhettem a molekuláris munkákat.

Külön köszönöm Szabó Attilának a témavezetését, a molekuláris és bioinformatikai módszereknél nyújtott oktatását és segítségét, illetve az írásban nyújtott támogatását.

Kiemelten szeretném megköszönni Horváth Zsófiának, hogy gyakornoki munkát végezhettem kutatócsoportjánál, majd pedig tudományos diákköri és szakdolgozói helyet is biztosított számomra. Köszönöm neki a munkám során nyújtott folyamatos szakmai támogatását, számos dolog közül külön kiemelve a dolgozat megírásában és az ahhoz szükséges irodalom összegyűjtésében valamint a statisztikai elemzések elvégzésében nyújtott segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani az Éghajlatváltozás Multidisziplináris Nemzeti Laboratórium (NKFIH-471-3/2021) és FK OTKA (NKFI-132095) projektekért, melyek a kísérlet megvalósulásának anyagi költségeihez járultak hozzá.

Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak a dolgozathoz kapcsolódó munka és írás alatt felém mutatott végtelen türelmüket és támogatásukat.

Irodalom

- Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., & Bruns, T. D. (2013). Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *The ISME Journal* 2013 7:7, 7(7), 1262–1273. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.28>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/AME01753>
- Baas-Becking, L. G. M., & Nicolai, E. (1934). On the ecology of a Sphagnum Bog. *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 1(1), 10–45.
- Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B., & Ferrer, E. A. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 2011 471:7336, 471(7336), 51–57. <https://doi.org/10.1038/nature09678>
- Bie, T. De, Meester, L. De, Brendonck, L., Martens, K., Goddeeris, B., Ercken, D., Hampel, H., Denys, L., Vanhecke, L., Gucht, K. Van der, Wichelen, J. Van, Vyverman, W., & Declerck, S. A. J. (2012). Body size and dispersal mode as key traits determining metacommunity structure of aquatic organisms. *Ecology Letters*, 15(7), 740–747. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2012.01794.X>
- Biggs, J., Williams, P., Whitfield, M., Nicolet, P., & Weatherby, A. (2005). 15 years of pond assessment in Britain: results and lessons learned from the work of Pond Conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15(6), 693–714.
- Boros, E., V-Balogh, K., Vörös, L., & Horváth, Z. (2017). Multiple extreme environmental conditions of intermittent soda pans in the Carpathian Basin (Central Europe). *Limnologica*, 62, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.LIMNO.2016.10.003>
- Bouahim, S., Rhazi, L., Ernoul, L., Mathevet, R., Amami, B., Er-Riyahi, S., Muller, S. D., & Grillas, P. (2015). Combining vulnerability analysis and perceptions of ecosystem services in sensitive landscapes: A case from western Moroccan temporary wetlands. *Journal for Nature Conservation*, 27, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2015.05.003>
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. Da, Rylands, A. B., Konstant, W. R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., & Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat Loss and Extinction in the Hotspots of Biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4), 909–923. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1739.2002.00530.X>
- Butchart, S. H. M., Walpole, M., Collen, B., Strien, A. van, Scharlemann, J. P. W., Almond, R. E. A., Baillie, J. E. M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K. E., Carr, G. M., Chanson, J., Chenery, A. M., Csirke, J., Davidson, N. C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., ... Watson, R. (2010). Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science*, 328(5982), 1164–1168. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1187512>
- Collinson, N. H., Biggs, J., Corfield, A., Hodson, M. J., Walker, D., Whitfield, M., & Williams, P. J. (1995). Temporary and permanent ponds: An assessment of the effects of drying out on the conservation value of aquatic macroinvertebrate communities. *Biological Conservation*, 74(2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00021-U](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00021-U)
- Damschen, E. I., Brudvig, L. A., Burt, M. A., Fletcher Jr., R. J., Haddad, N. M., Levey, D. J., Orrock, J. L., Resasco, J., & Tewksbury, J. J. (2019). Ongoing accumulation of plant diversity through habitat connectivity in an 18-year experiment. *Science*, 365(6460), 1478–1480. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAX8992>
- Fahrig, L. (1997). Relative Effects of Habitat Loss and Fragmentation on Population Extinction. *The Journal of Wildlife Management*, 61(3), 603. <https://doi.org/10.2307/3802168>
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Ecolsys.34.011802.132419>, 34, 487–515. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.34.011802.132419>

- Fahrig, L. (2013). Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of Biogeography*, 40(9), 1649–1663. <https://doi.org/10.1111/JBI.12130>
- Fahrig, L. (2017). Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Ecolsys-110316-022612>, 48, 1–23.
- Fahrig, L., Arroyo-Rodríguez, V., Bennett, J. R., Boucher-Lalonde, V., Cazetta, E., Currie, D. J., Eigenbrod, F., Ford, A. T., Harrison, S. P., Jaeger, J. A. G., Koper, N., Martin, A. E., Martin, J. L., Metzger, J. P., Morrison, P., Rhodes, J. R., Saunders, D. A., Simberloff, D., Smith, A. C., ... Watling, J. I. (2019). Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological Conservation*, 230, 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2018.12.026>
- Finlay, B. J. (2002). Global Dispersal of Free-Living Microbial Eukaryote Species. *Science*, 296(5570), 1061–1063. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1070710>
- Fletcher, R. J., Didham, R. K., Banks-Leite, C., Barlow, J., Ewers, R. M., Rosindell, J., Holt, R. D., Gonzalez, A., Pardini, R., Damschen, E. I., Melo, F. P. L., Ries, L., Prevedello, J. A., Tscharntke, T., Laurance, W. F., Lovejoy, T., & Haddad, N. M. (2018). Is habitat fragmentation good for biodiversity? *Biological Conservation*, 226, 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2018.07.022>
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., Lovejoy, T. E., Sexton, J. O., Austin, M. P., Collins, C. D., Cook, W. M., Damschen, E. I., Ewers, R. M., Foster, B. L., Jenkins, C. N., King, A. J., Laurance, W. F., Levey, D. J., Margules, C. R., ... Townshend, J. R. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, 1(2). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.1500052>
- Haddad, N. M., Gonzalez, A., Brudvig, L. A., Burt, M. A., Levey, D. J., & Damschen, E. I. (2017). Experimental evidence does not support the Habitat Amount Hypothesis. *Ecography*, 40(1), 48–55. <https://doi.org/10.1111/ECOG.02535>
- Hanski, I. (2011). Habitat Loss, the Dynamics of Biodiversity, and a Perspective on Conservation. *AMBIO*, 40(3), 248–255. <https://doi.org/10.1007/S13280-011-0147-3>
- Heath, D. J., & Whitehead, A. (1992). A survey of pond loss in Essex, South-east England. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2(3), 267–273. <https://doi.org/10.1002/AQC.3270020306>
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal* 2011 5:10, 5(10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Horváth, Z., Ptačnik, R., Vad, C. F., & Chase, J. M. (2019). Habitat loss over six decades accelerates regional and local biodiversity loss via changing landscape connectance. *Ecology Letters*, 22(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1111/ELE.13260>
- Howeth, J. G., & Leibold, M. A. (2013). Predation inhibits the positive effect of dispersal on intraspecific and interspecific synchrony in pond metacommunities. *Ecology*, 94(10), 2220–2228. <https://doi.org/10.1890/12-2066.1>
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2020). *iNEXT: Interpolation and Extrapolation for Species Diversity*. http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/
- Hugerth, L. W., Muller, E. E. L., Hu, Y. O. O., Lebrun, L. A. M., Roume, H., Lundin, D., Wilmes, P., & Andersson, A. F. (2014). Systematic Design of 18S rRNA Gene Primers for Determining Eukaryotic Diversity in Microbial Consortia. *PLOS ONE*, 9(4), e95567. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095567>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M., & Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept:

- a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7(7), 601–613. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2004.00608.X>
- Leibold, M. A., & Chase, J. M. (2017). *Metacommunity ecology*, volume 59. Princeton University Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/9781400889068>
- Loreau, M., Mouquet, N., & Gonzalez, A. (2003). Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12765–12770. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2235465100>
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V. H., & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 2006 4:2, 4(2), 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>
- Mausbach, W. E., & Dzialowski, A. R. (2019). Dispersal mitigates biologically induced disturbances in heterogeneous metacommunities. *Ecosphere*, 10(3), e02662. <https://doi.org/10.1002/ECS2.2662>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Millennium Ecosystem Assessment (2005). *Ecosystems and human well-being* (Vol. 5). Island press United States of America.
- Mouquet, N., & Loreau, M. (2003). Community Patterns in Source-Sink Metacommunities. *American Naturalist*, 162(5), 544–557. <https://doi.org/10.1086/378857>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package*. <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, 91(12), 3631–3640. <https://doi.org/10.1890/09-2237.1>
- Pimm, S. L. (2008). Biodiversity: Climate Change or Habitat Loss — Which Will Kill More Species? *Current Biology*, 18(3), R117–R119. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.11.055>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2021). *{nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. <https://cran.r-project.org/package=nlme>
- Ramette, A., LiPuma, J. J., & Tiedje, J. M. (2005). Species Abundance and Diversity of Burkholderia cepacia Complex in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1193–1201. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1193-1201.2005>
- Rhazi, L., Grillas, P., Saber, E.-R., Rhazi, M., Brendonck, L., & Waterkeyn, A. (2011). Vegetation of Mediterranean temporary pools: a fading jewel? *Hydrobiologia* 2011 689:1, 689(1), 23–36. <https://doi.org/10.1007/S10750-011-0679-3>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Team R Development Core. (2018). A Language and Environment for Statistical Computing. In *R Foundation for Statistical Computing* (Vol. 2, p. <https://www.R-project.org>). <http://www.r-project.org>
- Telford, R. J., Vandvik, V., & Birks, H. J. B. (2006). Dispersal Limitations Matter for Microbial Morphospecies. *Science*, 312(5776), 1015. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1125669>
- Thompson, P. L., Guzman, L. M., Meester, L. De, Horváth, Z., Ptacnik, R., Vanschoenwinkel, B., Viana, D. S., & Chase, J. M. (2020). A process-based metacommunity framework linking local and regional scale community ecology. *Ecology Letters*, 23(9), 1314–1329. <https://doi.org/10.1111/ELE.13568>

- Thompson, P. L., Rayfield, B., & Gonzalez, A. (2017). Loss of habitat and connectivity erodes species diversity, ecosystem functioning, and stability in metacommunity networks. *Ecography*, 40(1), 98–108. <https://doi.org/10.1111/ECOG.02558>
- Thompson, P. L., & Shurin, J. B. (2012). Regional zooplankton biodiversity provides limited buffering of pond ecosystems against climate change. *Journal of Animal Ecology*, 81(1), 251–259. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2656.2011.01908.X>
- Thompson*, P. L., Rayfield*, B., & Gonzalez, A. (2015). Robustness of the spatial insurance effects of biodiversity to habitat loss. *Evolutionary Ecology Research*, 16(6), 445–460.
- Vad, C. F., Péntek, A. L., Cozma, N. J., Földi, A., Tóth, A., Tóth, B., Böde, N., Móra, A., Ptacnik, R., Ács, É., Zsuga, K., & Horváth, Z. (2017). Wartime scars or reservoirs of biodiversity? The value of bomb crater ponds in aquatic conservation. *Biological Conservation*, 209, 253. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2017.02.025>
- 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., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the {tidyverse}. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Williams, P., Whitfield, M., Biggs, J., Bray, S., Fox, G., Nicolet, P., & Sear, D. (2004). Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern England. *Biological Conservation*, 115(2), 329–341. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00153-8)
- Wilson, D. S. (1992). Complex Interactions in Metacommunities, with Implications for Biodiversity and Higher Levels of Selection. *Ecology*, 73(6), 1984–2000. <https://doi.org/10.2307/1941449>