

37. OTDK Biológia Szekció

A Balaton halállományának jellemzése környezeti DNS mintavételek alapján

Szerző:

Szolnoki Anna

Állatorvostudományi Egyetem, Biológus MSc II.

Témavezetők:

Dr. Erős Tibor

tudományos tanácsadó

HUN-REN Balatoni Limnológiai Kutatóintézet

Dr. Kövér Szilvia

tudományos munkatárs

ÁTE Biológiai Intézet, Zoológiai Tanszék

**HUN
REN**



Balatoni
Limnológiai
Kutatóintézet



Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzés.....	8
3. Anyag és módszer.....	9
3.1 Mintavétel.....	9
3.2 Környezeti DNS kimutatása	11
3.2.1 DNS-kivonás.....	11
3.2.2 Amplifikáció	11
3.2.3 Szekvenálás.....	12
3.3 Statisztikai adatelemzés	13
3.3.1 Diverzitás-becslések	13
3.3.2 Közösségszerkezet-elemzések	14
4. Eredmények.....	16
4. 1 Kimutatott taxonok	16
4.2 Diverzitás-becslések	19
4.3 Közösségszerkezet-elemzések.....	23
5. Diskusszió.....	27
6. Összefoglalás.....	33
7. Abstract.....	34
8. Irodalomjegyzék.....	35
9. Köszönetnyilvánítás	39

1. Bevezetés

A mintavételi folyamat az ökológiai kutatások leglényegesebb része, hiszen a rendelkezésre álló mintákon alapulnak a mért változó(k)ra vonatkozó becslések és ezáltal a vizsgált rendszer állapotáról levont következtetések [1, 2]. Az élőlényközösségek szerkezetét leíró változók (pl. fajgazdagság, fajösszetétel, abundancia) pontos becslése esszenciális mind az alap, mind az alkalmazott kutatások, pl. a tér, -és időbeli változások monitorozása [3] vagy környezetminősítési rendszerek megbízható működtetése során [4]. A mintavétel reprezentativitásának növelése azonban nagyobb idő, eszköz, -és pénzbeli befektetést követelhet meg, illetve logisztikai akadályok gátolhatják, miközben az erre fordítható erőforrások általában jelentősen korlátozottak. A minta reprezentativitásának maximalizálása és az ezzel járó költségek minimalizálása tehát egy komoly és széleskörű optimalizálási probléma [5].

A mintavétel reprezentativitását befolyásolhatják többek közt környezeti tényezők, a közösséget alkotó fajok jellemvonásai (viselkedés, morfológia), illetve a használt mintavételi eszköz sajátosságai. E tekintetben a vizes élőhelyek különösen nagy kihívást jelentenek, hiszen például a víz mélysége, áramlási sebessége és átlátszósága lényegesen korlátozhatják a ténylegesen alkalmazható mintavételi eszköztárat [6]. Európában az édesvízi rendszerek standardizált módszereken alapuló, közösségi szintű, nemzetközi monitorozása 2000-ig nyúlik vissza a Víz Keretirányelv (2000/60/EC) bevezetéséig, amely az ökológiai állapot meghatározására irányul [7]. A víztestek ökológiai állapotának meghatározásában kulcsszereppel bír a halegyüttesek közösségszerkezetének jellemzése [8], azonban ehhez reprezentatív mintavételre, valamint megfelelő elemzési módszerek használatára van szükség.

Halak mintavételezésére számos módszer létezik, de hatékonyságuk nagyban különbözhet élőhelytípustól függően. A leggyakrabban használt eszközök a kopoltyúháló és az elektromos halászgép [8]. A kopoltyúháló megfelelő a mélyebb, pelágikus zónák mintavételezésére, de a sekélyebb és jellemzően strukturáltabb litorális régióban nem használható. Ezzel szemben az elektromos halászgép sekélyebb vizekben alkalmazható könnyedén, viszont a mélység növekedésével, valamint az átlátszóság csökkenésével a mintavételező személy egyre kevésbé támaszkodhat a vizuális ingerekre. További problémát hordoz magában az egyes eszközök faj, -illetve méretszelektivitása. Mivel a kopoltyúhálók passzív mintavételi eszközök, hatékonyságuk nagyban függ a halak aktivitásától [9]. Méretszelektivitásuk bizonyos mértékben a megfelelő szembőség választásával szabályozható.

Különböző szembőségű hálók egyidejű használata bővítheti a mintavételezhető populációt [10], de ez nagyobb mintavételi befektetést követel meg. Az elektromos halászgép, mint aktív mintavételi eszköz, nyílt vízben – illetve körülbelül 1,5 m mélységet meghaladó víztestben, ahol már csónakból történne a mintavétel – kialakításából adódóan igencsak szelektívvé válhat, a bentikus fajok jelenlétét óhatatlanul alábecsüli.

Többféle mintavételi eszköz együttes használata tehát reprezentatívabb eredménnyel szolgálhat kvalitatív (pl. jelenlét-hiány) adatokra nézve, azonban infrastrukturális vagy logisztikai szempontból jóval nagyobb ráfordítást igényelhet. Emellett számításba kell venni a különböző eszközök összehasonlíthatóságát kvantitatív gyűjtésre vonatkozóan. Abundancia vagy biomassza felmérések során a különböző eszközök nagyon eltérő becslést adhatnak különböző fajok esetén [11]. Következésképpen nagy igény mutatkozik egyetlen, széles körben is megbízhatóan használható mintavételi mód iránt. Az optimális mintavételi eljárás meghatározása ezért intenzíven tanulmányozott kérdéskör a halközösségek reprezentatív felmérésének, illetve a monitorozó programok fejlesztésének érdekében [8, 12–15].

A Balaton halállományának tradicionális halászeszközökkel történő (kopolyúháló, elektromos halászgép) tudományos igényű monitorozása már több évtizedes múltra tekint vissza [16–18], azonban a halközösség szerkezetét leíró változók pontos értékének meghatározása továbbra is problémát jelent a tó hatalmas mérete és a gyűjtési eszközök szelektivitása miatt. A gyűjtések időigényességéből fakadóan (pl. a kopolyúhálókat több órás időtartamra kell kihelyezni és őrizni) a vizsgálható helyek száma is erősen korlátozott.

A monitorozás módszertani fejlesztésében ígéretes alternatívának bizonyulhat a közösségek környezeti DNS alapján történő leírása [19, 20]. A módszer az élőlények közvetett detektálásán alapul a környezeti mátrixban (talajban, vízben, levegőben) jelenlévő DNS fragmentumok kimutatása által [21]. Előnyei többek között az idő, -és energiahatékonyság, az érzékenység és a non-invazív jelleg [22–25]. Kisebb ráfordítás mellett tehát azonos vagy nagyobb hatékonyságú mintavételt tesz lehetővé, ráadásul kiküszöbölhető az élőlények fizikai sérüléseinek kockázata (mely veszély fennáll a nem megfelelő szembőség, illetve áramerősség alkalmazásakor). Ebből kifolyólag kezdetektől fogva nagy népszerűségnek örvend a tudományos közösségen belül, hiszen alkalmazása új távlatokat nyithat számos kutatási területen, így az ökológiai vizsgálatokban is. Az első ilyen jellegű felmérések alig több, mint egy évtizede láttak napvilágot és csupán néhány, előre meghatározott célfaj detektálására irányultak [25, 26]. Később, az újgenerációs szekvenálási eljárásoknak [27] köszönhetően

lehetővé vált a magasabb taxonómiai szintű csoportok képviselőinek egyidejű kimutatása is, ami további lendületet adott a módszer alkalmazásának és fejlődésének [28–31]. Ennek ellenére a megbízható felhasználást övező ismeretanyag még nagyon hiányos. Feltárássra vár többek között a különböző élőhelytípusok és élőlénycsoportok esetén mutatott teljesítménye, habár édesvízi környezetben kiegészítő eszközként már bizonyított a hatékonysága [12]. Édesvízi halegyüttesek felmérése során a detektált fajszám jellemzően meghaladja a hagyományos módszerekkel nyert értékeket [32], bár a legtöbb vizsgálatban a környezeti DNS és a hagyományos módszerek esetén is előfordultak olyan fajok, melyek jelenlétét kizárólag az egyik módszer mutatta ki [12, 33]. Ahhoz tehát, hogy önállóan a környezeti DNS adatokra támaszkodni lehessen a szélesebb körű komparatív vizsgálatok és abundanciabecslés során, szükség volna egy standard protokoll meglétére mind a terepi, mind a laboratóriumi eljárás tekintetében.

A nyers adatok megszerzését követően kardinális kérdést jelent a kielemezésük módja, melynek első lépése az adatok standardizálása. A nem detektált, de jelenlévő fajok ugyanis állandó problémát jelentenek: mivel a minták feltételezhetően nem teljesek, de a nem detektált fajok száma ismeretlen, ezért az összehasonlítás csak valamilyen szempontból egyenértékűvé tett mintákkal végezhető el. Erre számos lehetőség kínálkozik és a választást körültekintően kell megtenni, mivel a végeredményt nagyban befolyásolhatja [34]. A biológiai sokféleség tér és időbeli változásainak összehasonlításánál a kutatók pl. azonos méretű mintavételi területre standardizált vagy azonos számú egyedek tartalmazó mintákon alapulva szokták a sokféleséget leíró változók értékét összehasonlítani [35]. Viszonylag újabb megközelítési mód a minta teljességét mérő ún. lefedettség („sample coverage” [36]) alapján történő mintastandardizálás. A lefedettség voltaképpen becslést ad arra vonatkozóan, hogy a teljes közösség egyedeinek mekkora aránya tartozik olyan fajhoz, mely jelen van a mintában. Minél magasabb ez az érték, annál kisebb a nem detektált fajok aránya. Azonos lefedettségű minták összehasonlításakor az egyes mintákban jelen lévő fajok a közösség egyedeinek azonos aránya által képviseltetnek; ilyen módon tehát korrekt összehasonlítás végezhető el [34].

Amennyiben egy vizsgált közösség biodiverzitásának becslése a cél, több különböző mérőszám is rendelkezésre áll, melyek azonban eltérő részinformációkat hordozhatnak. A fajgazdagság, illetve fajszám az egyik legalapvetőbb mutatója a diverzitásnak. A fajszám önmagában azonban nem feltétlenül ajánlatos módja a diverzitás jellemzésének, hiszen erősen függhet a gyűjtött egyedek számától és a közösségben jelenlévő fajok relatív abundanciájától. A relatív abundancia figyelembevétele ettől eltekintve is fontos lehet a diverzitás mértékének

meghatározása során. Olyan ökológiai vizsgálatokkor, melyek esetén számít, hogy az egyes fajok milyen mértékben járulnak hozzá az ökoszisztéma működéséhez (pl. mekkora biomasszával vannak jelen), elengedhetetlen a fajok relatív abundancia adatainak feltárása. Jóllehet, a ritka fajok szerepe nem feltétlenül elhanyagolható, sőt esetenként kulcsfontosságúak lehetnek (pl. csúcsragadozók), illetve a konzervációs vagy gazdasági törekvések fókuszában állhatnak [37]. A relatív abundancia beépítésének érdekében számos diverzitás index került már kidolgozásra, de a hagyományos indexek több olyan tulajdonsággal is bírnak, melyek problémássá tehetik a használatukat [34, 38]. Ellenben a Hill-számok [39] matematikailag egységesített indexcsaládja segítségével áthidalható a hagyományos indexek több jelentős hiányossága. A Hill-számok folytonos módon teszik lehetővé a diverzitás számszerűsítését: egyetlen paraméter, az egyenlet ún. skálaparaméterének változtatásával meghatározható, hogy a számítás során milyen súllyal van figyelembe véve a fajok tömegessége. Ez gyors és egyszerű módja a sokféleség különböző megfontolású jellemzésének, ráadásul az azonos előnnyel bíró Rényi-entrópiával szemben a Hill-számok értékei lineárisan változnak. Az egység ugyanis, amelyben kifejeződnek, az ún. effektív fajszám. A vizsgált közösség effektív fajszáma megfelel egy olyan diverzitású hipotetikus közösség fajszámának, amit a Hill-szám értékével egyenlő számú, azonos tömegességű faj alkot. Ez az effektív fajszám adható meg a ritka fajok változó súlyozású figyelembevételével.

A közösségre jellemző diverzitás azért is nehezen mérhető, mert nagyban függhet a mintamérettől. A fajszámot az egyedszám, illetve a mintavételek számának függvényében ábrázoló görbe jellemzően meredeken emelkedik a mintavétel kezdetén, de a mintaméret növekedésével egyre inkább ellaposodik [35]. Ez a tendencia abból adódik, hogy a jelenlévő fajok egyre nagyobb hányada lesz kimutatva és így egyre kisebb az esélye új fajok detektálásának. Következésképpen különböző közösségek észlelt fajszáma nem csak a tényleges fajszámbeli eltérés vagy a fajok relatív abundanciájának eltérő mintázata, hanem az eltérő lefedettséget eredményező mintaméret miatt is különbözhet [40]. Ebből kifolyólag az érvényes összehasonlítások érdekében meg kell győződni az összehasonlítandó minták elégséges reprezentativitásáról, melynek kézenfekvő módja a telítődési („accumulation”), illetve a ritkítási („rarefaction”) görbék szemrevételezése, kielemezése [35]. Míg a telítődési görbék a ténylegesen detektált fajok teljes számát mutatják, addig a ritkítási görbék egy átlagos (várható) fajszámot rendelnek az egyedszámhoz, illetve a mintavételek számához, attól függően, hogy egyedszám vagy mintavételsszám alapú a vizsgálat. Adott közösség mintavételéből felállított ritkítási görbe tehát tulajdonképpen a mintákból adódó telítődési

görbére vonatkozó becslésnek tekinthető. A ritkítási görbék előnye, hogy felállításukhoz nincs szükség az egyedek, illetve minták gyűjtési sorrendjének ismeretére, továbbá simított jellegük érdemi összehasonlítást tesz lehetővé.

2. Célkitűzés

Vizsgálatunk célja a Balaton halállományának jellemzése környezeti DNS mintavételekre és hagyományos mintavételi eszközökre támaszkodva a tó monitorozási módszertanának fejlesztése érdekében. Fő célunk, hogy megállapítsuk az egyes mintavételi módszerek egymáshoz viszonyított hatékonyságát a közösségszerkezet jellemzéséhez. Ennek részét képezi egy összesített fajlista felállítása és a sokféleséget jellemző mérőszámok számszerűsítése a mintavételi számok függvényében teljes tóra és a tó fő élőhelytípusaira (nyílt víz, partmenti zóna és ezen belül kikötő, partvédő kövezés, nádas) nézve egyaránt. Célunk továbbá a fő élőhelytípusok halállományának összehasonlítása az alkalmazott mintavételi eljárás figyelembevételével. Kutatásunk irányadó kérdései a következők:

- Milyen mértékben tér el a hagyományos mintavétel és a környezeti DNS alapján kapott közösségösszetétel?
- Miként változik a fajsza és egyes diverzitási mérőszámok értéke a mintavételi szám függvényében az egyes élőhelytípusokban és a teljes tó szintjén?
- Milyen hasonlóságok és különbségek vannak a halállomány összetételében az egyes élőhelytípusok között?

3. Anyag és módszer

3.1 Mintavétel

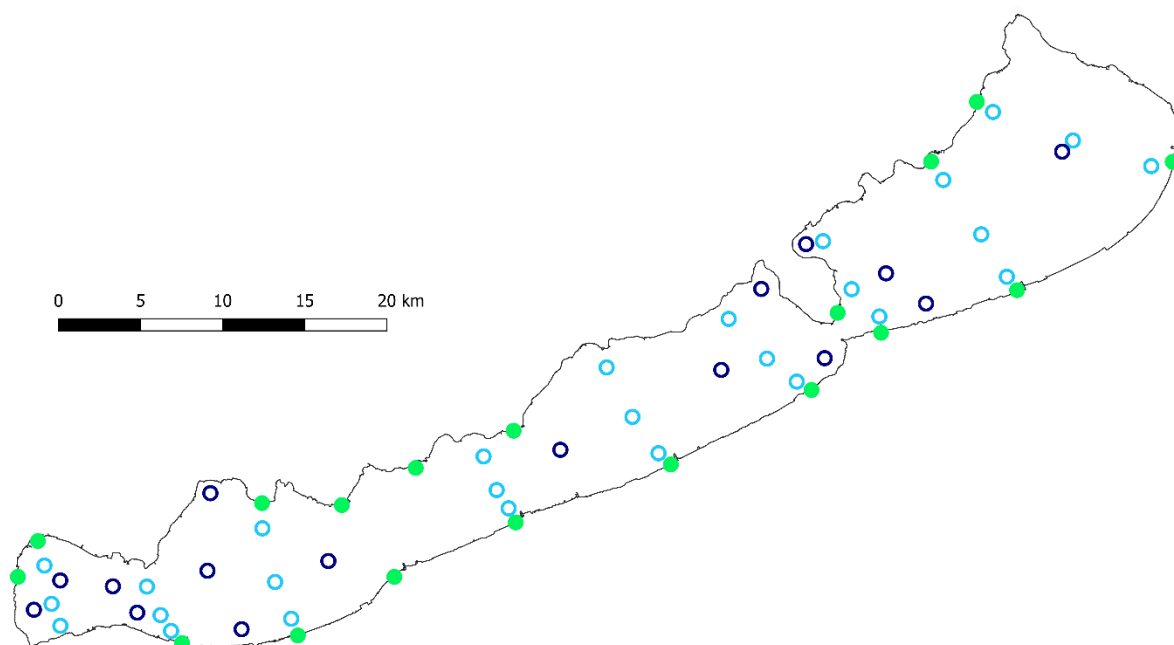
A vizsgálat helyszíne, a Balaton Közép-Európa legnagyobb sekély tava. A tó felülete 596 km², átlagmélysége 3,3 m. Partvonalának nagy része beépített, a természetes nádas mára erősen tagolt és csupán 11 km² összterületű. A hagyományos eszközökkel történő mintavétel az elektromos halászgép esetén 2022. július 11. és július 15. között, illetve a kopoltyúháló esetén 2022. augusztus 29. és szeptember 12. között zajlott.

Elektromos halászgéppel történt a partmenti régió felmérése 18 település szerint kijelölt helyszínen. Minden helyszínen összesen 3 felmérést végeztünk: a kikötő belső, hullámveréstől védett részén, valamint a külső kövezés mentén és a környező nádas belsejében – az élőhely méretétől függően 100-300 m hosszú szakaszokon a Nemzeti Biodiverzitás-monitorozó Rendszer és a Víz Keretirányelv minősítési módszertanának megfelelően [41, 42].

A kopoltyúhálószerű történő felmérés szintén a standard protokoll szerint zajlott [41, 42], a tó 4 medencéjének mindegyikében 4 mintavételi helyszínen [15, 43], a tó halállományának monitorozásánál alkalmazott állandó mintavételi helyszíneken (1. ábra). A protokoll előírásainak megfelelően többpaneles kopoltyúhálókat alkalmaztunk a következők szerint. 1,5 m vízmélységig a CEN (14757/2015) szabványban szereplő, vízfenékre süllyedő bentikus háló („nordic gillnet”, NG) 1,5 m magas változatát, mely 12 db, 5-55 mm közötti szembőségű, egyenként 2,5 m hosszú panelt tartalmaz. A nagyobb méretű (500 g fölötti) halak kimutathatósága érdekében további, nagyobb szembőségű (65-80 mm) kiegészítő hálópanelokat is használtunk. Minden mintavételi ponton legalább 3 db szabványhálót (NG) és 2 db kiegészítő hálót helyeztünk ki. 1,5-3 m közötti vízmélységnél ezenfelül kihelyeztük a szabványháló 3 db 3 m magas, vízfenékre süllyedő bentikus (DHNG) változatát. 3 m-t meghaladó vízmélységnél további 3 db, a szabványháló 1,5 m magas, felszínhez igazodó változatát (FG) alkalmaztuk. Mivel a mintavételi erőfeszítés fajonként igen eltérőnek tekinthető, az összehasonlíthatóság érdekében az elemzést megelőzően standardizáltuk az egyedszám értékeket tekintettel arra is, hogy a mintavételek a teljes vízoszlopra nézve reprezentatívak legyenek [41]. Az 1,5 m-nél sekélyebb mintavételi pontok esetén hálópanelonként 2,5 m hálóhosszra és 1 óra mintavételi időtartamra vetített fogást („catch per unit effort”, CPUE) adtuk meg. 1,5-3 m közti vízmélységnél az előbb leírt standardizálási mód mellett a DHNG fogását vettük alapul. 3 m-nél nagyobb vízmélység esetén a DHNG eredményét kiegészítettük a FG eredményeinek vízmélységgel (m, h) arányos részével:

$$CPUE_{teljes} = CPUE_{DHNG} + CPUE_{FG} \times \frac{h - 3}{1,5}$$

A környezeti DNS kimutatásához szükséges vízmintákat 2022. július 11. és szeptember 26. között gyűjtöttük átlagosan 11,65 l (legalább 8 l, legfeljebb 12 l) mennyiségben, összesen 81 ponton. A partmenti minták az elektromos halászgép mintavételeivel megegyező pontokról származnak. A nyílt vízi minták gyűjtése 9 keresztshelvény mentén zajlott, melyeket a tó hosszában egyenletesen elosztva jelöltünk ki. A keresztshelvények egyenként 3 mintavételi pontot foglalnak magukba: az északi parttól számított 200 m-es távolságnál, tóközépnél, valamint a déli parttól számított 200 m-es távolságnál (1. ábra). A mintavételt csónakból végeztük egy szűrőfejjel ellátott, tartórúdhöz rögzített, eldobható gumicsővel, mely szűrőmembránt tartalmazó műanyag kapszulához csatlakozott (VigiDNA 0,45 µm crossflow szűrőkapszula SPYGEN). A szűrőmembrán szolgált a DNS kitapadási felületként, így a keresztülszivattyúzott víz a mintavételi folyamattal egyidőben került megsűrűsítésre. A mintavétel befejezésekor a kapszulában lévő maradék vizet leengedtük, majd feltöltöttük 80 ml CL1 tartósító puffer folyadékkal (SPYGEN). A mintákat a DNS kivonásig szobahőmérsékleten tároltuk. Minden egyes mintavétel alkalmával teljesen steril, új mintavételi eszközt (szűrőfejet, gumicsövet, membrán, tartórúd bevonó steril műanyag csövet) használtunk a genetikai szennyezés elkerülése érdekében.



1. ábra – A mintavételi pontok elhelyezkedése. ●: partmenti mintavétel (elektromos halászgép és környezeti DNS); ○: nyílt vízi mintavétel (kopolyúháló); ○: nyílt vízi mintavétel (környezeti DNS).

3.2 Környezeti DNS kimutatása

A DNS-kivonás, amplifikáció, szekvenálás és bioinformatikai feldolgozás Pont és mtsai. [44] által leírt eljárás szerint lettek elvégezve a SPYGEN cég laboratóriumában.

3.2.1 DNS-kivonás

A mintaelőkészítés első lépéseként a folyadéktartalmú kapszulák S50 rázókészülékbe (CAT Ingenieurbüro™) lettek helyezve 15 percre, 800 rpm (fordulat/perc) sebesség beállításával. Ezt követően a tartósítófolyadék 50 ml-es csőbe való áttöltése és 15 percen keresztül, 15 000×g sebességen való centrifugálása történt. A felülúszó eltávolításával 15 ml folyadék maradt vissza, mely 33 ml etanol és 1,5 ml nátrium-acetát oldat (3M) hozzáadása után -20 °C-on lett eltárolva legalább egy éjszakára. Ezt újabb, 6 °C-on történő centrifugálás követte, szintén 15 perc hosszan és 15 000×g sebességgel. A felülúszó eltávolítása után a DNeasy Blood & Tissue Extraction Kit (Qiagen) ATL puffere került hozzáadásra 360 µl mennyiségben. A vortexelést követően keletkező felülúszó 2 ml-es csőbe lett pipetázva 20 µl proteináz-K hozzáadásával. Végül 2 órás inkubáció történt 56 °C-on.

A DNS kivonása a NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.) segítségével történt a leírás 6. lépésétől kezdve, a gyártó utasításainak megfelelően. A kimosás 100 µl SE puffer kétszeri hozzáadásával lett elvégezve.

3.2.2 Amplifikáció

A reakcióelegy 25 µl végtérfogatra volt kiegészítve, templátként 3 µl DNS extraktummal és tartalmazott továbbá: 1 U AmpliTaq Gold DNS-polimerázt (Applied Biosystems), 10 mM-os Tris-HCl puffert, 50 mM-os KCl-ot, 2,5 mM-os MgCl₂-ot, 0,2 mM-os dNTP-t, 0,2 µM-os „teleo” primereket (csontoshalak (Teleostei) mitokondriális 12S rRNS régiójának egy rövid szakaszára tervezve) [31], 4 µM-os humán blokkoló primert [23] és 0,2 µg/µl szarvasmarha szérumalbumint (BSA, Roche Diagnostic). A „teleo” primerek rendelkeztek egy nyolc nukleotidból álló, adott PCR replikátumra egyedi (forward és reverse primerek esetén megegyező) jelöléssel az 5' végén, mely lehetővé tette a szekvenciák megfelelő mintához való hozzárendelését.

A DNS felsokszorozása hagyományos PCR útján történt. A kezdeti 10 perces, 95 °C-on zajló denaturálást követő 50 ciklus az alábbi lépésekből állt: 30 másodperc 95 °C-on, 30 másodperc 55 °C-on és 1 perc 72 °C-on. Végül a befejező elongációs lépés 72 °C-on 7 percen át tartott. Minden mintavételi helyszínhez tartozó filtrátum esetén 12 PCR futtatás lett elvégezve.

Az amplifikált mintákon kapilláris elektroforézissel (QIAxcel; Qiagen GmbH) való titrálás, majd a MinElute PCR purifikáló kittel (Qiagen GmbH) való tisztítás és egy ismételt kapilláris elektroforézissel való titrálás lett végrehajtva.

3.2.3 Szekvenálás

A tisztított PCR-termékek egyenlő mértékben lettek egyesítve a mintánként 500 000 olvasat, mint elméleti szekvenálási mélység elérése érdekében. A könyvtárkészítés a MetaFast protokoll alapján, a párosított végű szekvenálás (2×125 bázispár) az Illumina MiSeq szekvenálóval (Illumina) a MiSeq Kit v3 (Illumina) segítségével, a gyártói utasítások szerint történt.

A leolvasások elemzése Valentini és mtsai. [31] által ismertetett módon, az OBITools csomag [45] segítségével zajlott. A forward és reverse olvasatok illesztése az illuminapairedend programmal, a mintákhoz való hozzárendelésük pedig az ngsfilter programmal történt. A teljes adathalmaz felosztása az egyes mintákhoz tartozó különálló adathalmazokra az obisplit programmal történt. A teljesen azonos szekvenciák az obiuniq program segítségével lettek összevonva. A 20 bázispárnál rövidebb, mintánként 10-nél kevesebbszer előforduló, illetve az obiclean program révén „internal” jelöléssel ellátott (nagy valószínűséggel PCR hibát hordozó) szekvenciák elvetésre kerültek. A MOTU-k (szekvenciák) taxonómiai hozzárendelése az ecotag programmal történt. Az illesztésekhez szükséges referenciaként a SPYGEN Duna vízgyűjtő területére készült „DANUBE_2022” és a Nyugat-Európából származó minták felhasználásával összeállított „SPYGEN” elnevezésű adatbázisok, illetve a GenBank adatbázisa szolgált. 98%-nál kisebb hasonlóság esetén a MOTU-k eltávolításra kerültek. Végül a szekvenciák esetleges „tag-jump” [46] miatt előforduló hibás mintához való hozzárendelésének kiküszöbölése végett az összes szekvencia, amelynek előfordulási gyakorisága taxononként és könyvtáranként 0,001 alatti volt, elvetésre került. A nevezéktan Kottelat és Freyhof munkája [47], valamint a FishBase adatbázis [48] alapján került összeállításra.

3.3 Statisztikai adatelemzés

3.3.1 Diverzitás-bebecslések

Az adatokat az R 4.2.2 [49] statisztikai környezetben elemeztük ki. Ritkítási görbéket állítottunk fel az iNext csomag [50] felhasználásával a következők szerint: a lefedettségre standardizált minták [34] alapján meghatároztuk a mintavételi szám változása mellett várható diverzitás profilt, mely 3 nevezetes Hill-számot [39] foglal magában.

A standardizálás során első lépésként a DataInfo funkció használatával bebecsléseket adtunk a mintahalmazok (élőhelytípusok szerint csoportosított minták) lefedettségére vonatkozóan a következő képlet alapján:

$$C = 1 - \frac{f_1}{n} \left[\frac{(n-1)f_1}{(n-1)f_1 + 2f_2} \right]$$

Ahol C a mintalefedettség, f_1 a singleton fajok száma (melyek a mintában egyetlen egyeddel képviseltetnek), f_2 a doubleton fajok száma (melyek a mintában pontosan kettő egyeddel képviseltetnek) és n a minta teljes egyedszáma.

Ezt követően összehasonlítottuk az egyes mintahalmazok becsült lefedettség értékét és meghatároztuk a legkisebb értékű, megfigyelt lefedettséget. Végül az estimateD funkció segítségével minden mintahalmazra lekértük az előző lépésben meghatározott lefedettség eléréséhez szükséges legkisebb mintavételi számot és a hozzá tartozó várható diverzitásértékeket.

A diverzitásértékek megadására szolgáló Hill-számok kiszámítása az alábbi egyenlet szerint történt:

$${}^qD = \left(\sum_{i=1}^S p_i^q \right)^{1/(1-q)}$$

Ahol S a vizsgált közösség fajszáma, p_i az i -edik faj relatív előfordulási gyakorisága a közösséget reprezentáló összes mintából számítva ($p_i = Y_i/U$, ahol Y_i azon minták összege, melyben az i -edik faj előfordul és U a fajok detektált előfordulásának teljes száma a mintahalmazban).

A skálaparaméter, q határozza meg a mintahalmazban való relatív előfordulási gyakoriságok figyelembevételének mértékét. Amikor $q = 0$, akkor az egyes fajok gyakorisága nem befolyásolja az összeget – ekkor a számítás tulajdonképpen a teljes fajszámot adja eredményül. $q = 1$ esetén határértéke van, amely a Shannon-index exponenciálisának feleltethető meg és melyre Shannon diverzitásként fogunk hivatkozni – ekkor az egyes fajok az előfordulási gyakoriságukkal arányosan súlyozottak, ennek megfelelően járulnak hozzá a közösség diverzitásértékéhez. Ha $q = 2$, akkor az eredmény a Simpson-index inverzét adja, melyre Simpson diverzitásként fogunk hivatkozni. Ebben az esetben a gyakori fajok aránylag nagyobb súllyal, míg a ritka fajok aránylag kisebb súllyal vannak figyelembe véve. A gyakoriságok közti különbségek tehát annál jobban számítanak, minél nagyobb értékű a q paraméter. Általánosságban az összefüggés a következőképpen értelmezhető: ha ${}^qD = x$, akkor a vizsgált q -ad rendű diverzitású közösség diverzitása megegyezik egy olyan hipotetikus vagy idealizált közösségével, melyet x egyformán tömeges faj alkot. A Hill-számok éppen ezért effektív fajszámokként vagy fajszám-ekvivalensekként is felfoghatóak. Elemzéseink során olyan diverzitásprofilt állítottunk össze az egyes élőhelytípusokra, illetve a teljes tóra nézve, melyek az előbbieken felsorolt nevezetes Hill-számok mindegyikével jellemzik a halegyüttesek diverzitását. Ily módon megadtuk a közösségeket alkotó összes taxon számát ($q = 0$), a jellegzetes (tipikus) taxonok diverzitását ($q = 1$) és a domináns taxonok diverzitását ($q = 2$) kifejező effektív taxonszámokat.

A közösségeket leíró diverzitásértékeket a mintavételi számok függvényében is megadtuk. Az iNEXT funkcióval kinyerhető minden mintavételi szám mellett a várható Hill-szám érték. Ezen értékeket ritkítási görbék formájában ábrázoltuk, ami lehetővé teszi az eredmény mintavételi befektetéstől való függésének megfigyelését, továbbá a minta reprezentativitásának becslését.

3.3.2 Közösség szerkezet-elemzések

Az egyes élőhelyeken megfigyelt, illetve a különböző mintavételi módszerekkel kimutatható közösség szerkezetet, a fellelhető hasonlóságokat és különbözőségeket a nem-metrikus többdimenziós skálázás („non-metric multidimensional scaling”, NMDS) módszerével [51] jellemeztük. A közösségek összehasonlításához a kompozíciós (jelenlét/hiány) adatoknál a Jaccard indexet, míg a relatív abundancia adatoknál a Bray-Curtis indexet alkalmaztuk [8]. A relatív abundancia adatokat az elemzések megkezdése előtt Hellinger-transzformáltuk az értékek (egyedszám, ill. szekvenciaszám) léptékeinek kiegyenlítéséhez. Az NMDS eredménye annál jobb, minél kisebb az elemzés ún. stresszértéke

(mely az eredeti mátrixban és a redukált ordinációs térben lévő távolságok kapcsolatának tökéletes monotonitástól való eltérésének mértékét fejezi ki). A 0,2 alatti érték általában már elfogadható [1].

Az élőhelytípusok és mintavételi módszerek szerint alkotott mintahalmazok csoportjai közti, közösségszerkezetben fellelhető eltéréseket az ANOSIM statisztikai próbával [51] teszteltük. A próba tesztstatisztikája, az R érték -1 és 1 közötti lehet; 0-hoz közeli R érték a tesztelt csoportok közötti hasonlóságra utal, 0-tól távolabbi érték pedig a különбözősége. A negatív értékek azt jelzik, hogy a különbség nagyobb a csoportokon belül, mint a csoportok között. Pozitív értékek esetén a csoportok közötti különbség nagyobb. Az R érték szignifikanciaszintjét permutáción alapuló teszttel határoztuk meg (9999 futtatás).

Az NMDS és az ANOSIM elemzéseket is a vegan csomag [52] felhasználásával végeztük el.

4. Eredmények

4.1 Kimutatott taxonok

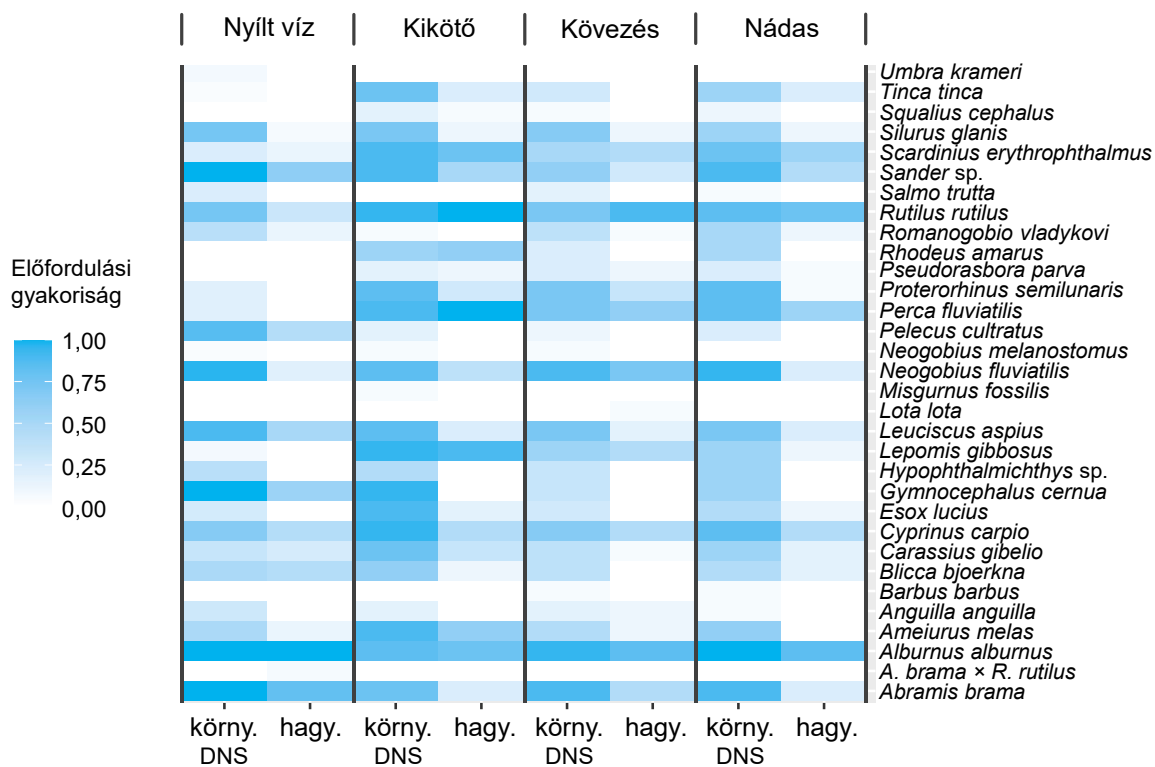
Felméréseink során összesen 20 763 egyedet és 41 265 506 szekvenciaolvasatot gyűjtöttünk a hagyományos, illetve a környezeti DNS mintavételekkel. A teljes tóból a különböző módszerek eredményeit összesítve 32 taxont mutattunk ki: 29 taxont faji szinten meghatározva, 2 taxont genus szinten meghatározva, illetve 1 hibridet.

Módszerek szerinti bontásban 30 taxont mutattunk ki környezeti DNS mintavételekkel, 24 taxont elektromos halászgéppel és 17 taxont kopoltyúhálóval (1. táblázat). A genus szinten meghatározott taxonok a környezeti DNS mintavételek eredményei. A *Sander* genus esetén a faji szintű elkülönítés a szekvenciaadatok alapján nem volt lehetséges. A *Hypophthalmichthys* genus esetén jellemző a fajok közti hibridizáció, azonban mivel a mitokondriális szekvenciaadatok alapján a hibridek azonosítása nem lehetséges, az eredményeket összevontuk.

Az egyes taxonok kimutatásának gyakorisága (vagyis, hogy hányszor fordultak elő a mintavételek során) is eltérőnek adódott az alkalmazott módszerek, valamint az élőhelytípusok között. A közös taxonjegyzék (*Sander* fajok egybevonása a hagyományos módszerek esetén is) adatainak hőtérkép jellegű ábrázolásából (2. ábra) kiolvasható az általános összefüggés, miszerint bármely élőhely esetén jellemzően nagyobb volt a taxonok előfordulási gyakorisága a környezeti DNS mintavételek során, illetve a nyílt vízi mintákra jellemzőek a legnagyobb előfordulási gyakoriság értékek, szemben a partmenti zóna élőhelytípusaival, melyek esetén átlagosan kisebbnek bizonyultak a taxononkénti előfordulási gyakoriság értékek mindkét mintavételi eszköz használatakor. Ezt az élőhelytípusok közötti kontúros eltérést a környezeti DNS mintavételek eredményei adják. Ha csupán a hagyományos eszközök adatait vetjük össze, már nem mutatható ki jelentős eltérés.

1. táblázat – A kimutatott taxonok és abundanciájuk a mintavételi módszerek szerint: környezeti DNS (szekvenciaolvasatok száma), elektromos halászgép és kopoltyúháló (egyedszám).

	Környezeti DNS	Elektromos halászgép	Kopoltyúháló
<i>Abramis brama</i> (dévérkeszeg)	11 190 730	57	591
<i>Abramis brama</i> × <i>Rutilus rutilus</i>	0	0	1
<i>Alburnus alburnus</i> (szélhajtó küsz)	12 864 619	8 221	7 142
<i>Ameiurus melas</i> (fekete törpeharcsa)	2 065 866	1 688	9
<i>Anguilla anguilla</i> (angolna)	1 489	2	0
<i>Barbus barbus</i> (márna)	1 080	0	0
<i>Blicca bjoerkna</i> (karikakeszeg)	221 729	5	79
<i>Carassius gibelio</i> (ezüstkárász)	42 997	41	9
<i>Cyprinus carpio</i> (ponty)	306 559	84	23
<i>Esox lucius</i> (csuka)	83 357	6	0
<i>Gymnocephalus cernua</i> (vágó durbincs)	442 554	0	69
<i>Hypophthalmichthys</i> sp. (busa fajok)	222 712	0	0
<i>Lepomis gibbosus</i> (naphal)	1 658 566	161	0
<i>Leuciscus aspius</i> (balin)	239 027	20	14
<i>Lota lota</i> (menyhal)	0	2	0
<i>Misgurnus fossilis</i> (réti csík)	87	0	0
<i>Neogobius fluviatilis</i> (folyami géb)	3 612 072	108	8
<i>Neogobius melanostomus</i> (feketeszájú géb)	3 085	0	0
<i>Pelecus cultratus</i> (garda)	123 916	0	116
<i>Perca fluviatilis</i> (sügér)	1 168 022	418	0
<i>Proterorhinus semilunaris</i> (tarka géb)	653 571	36	0
<i>Pseudorasbora parva</i> (razbóra)	14 822	13	0
<i>Rhodeus amarus</i> (szivárványos ökle)	201 234	63	0
<i>Romanogobio vladkovi</i> (halványfoltú küllő)	97 607	6	5
<i>Rutilus rutilus</i> (bodorka)	2 249 167	1 226	113
<i>Salmo trutta</i> (sebes pisztráng)	65 433	0	0
<i>Sander</i> sp.	929 646	-	-
<i>Sander lucioperca</i> (süllő)	-	62	109
<i>Sander volgensis</i> (kőszüllő)	-	2	57
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (vörösszárný keszeg)	1 774 955	175	2
<i>Silurus glanis</i> (harcsa)	877 959	8	1
<i>Squalius cephalus</i> (fejes domolykó)	28 720	1	0
<i>Tinca tinca</i> (compó)	123 101	10	0
<i>Umbra krameri</i> (lápi póc)	824	0	0



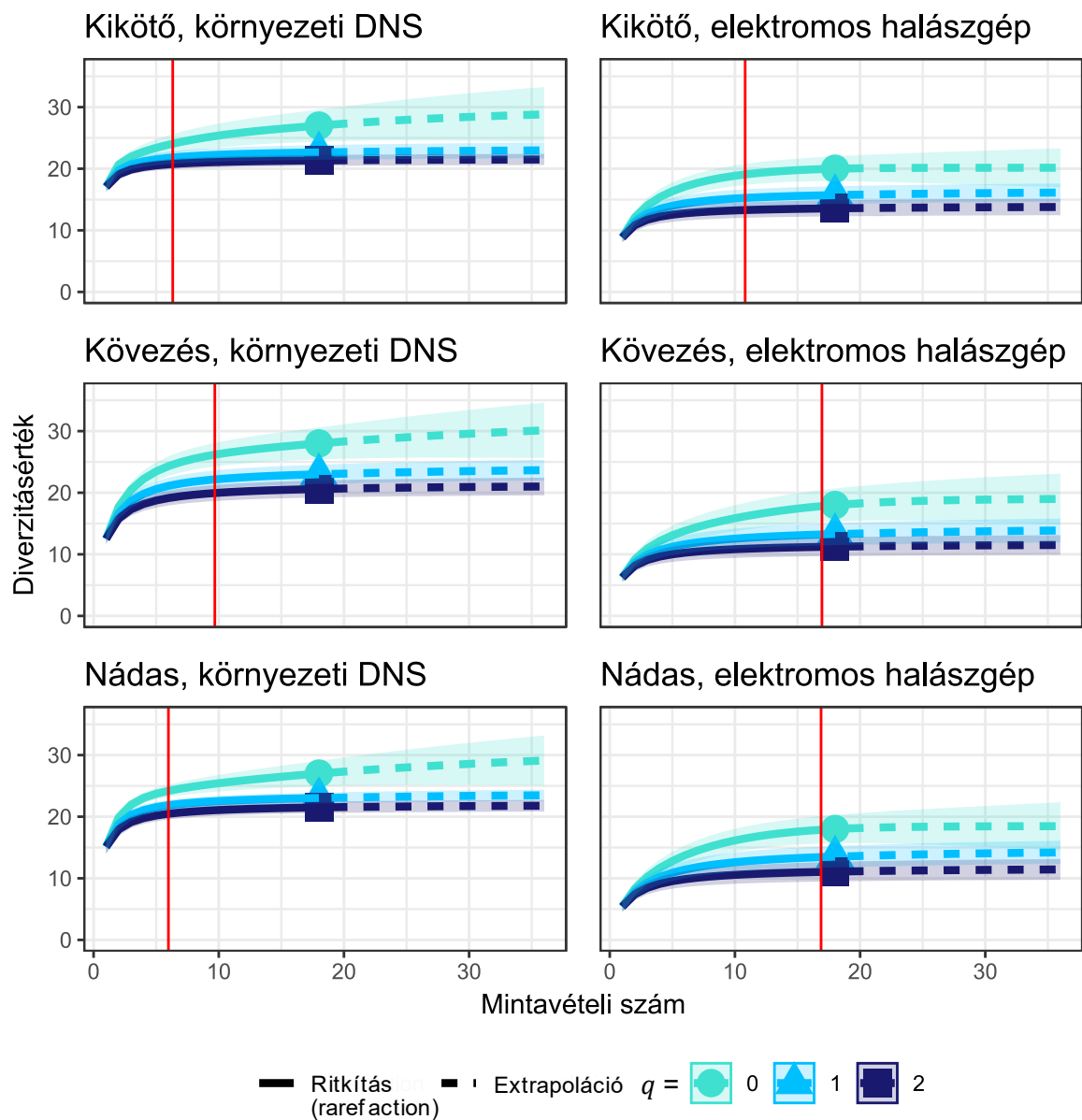
2. ábra – A kimutatott taxonok élőhelytípusokon belüli relatív előfordulási gyakorisága mintavételi módszerek (környezeti DNS, illetve hagyományos eszközök) szerint.

4.2 Diverzitás-becslések

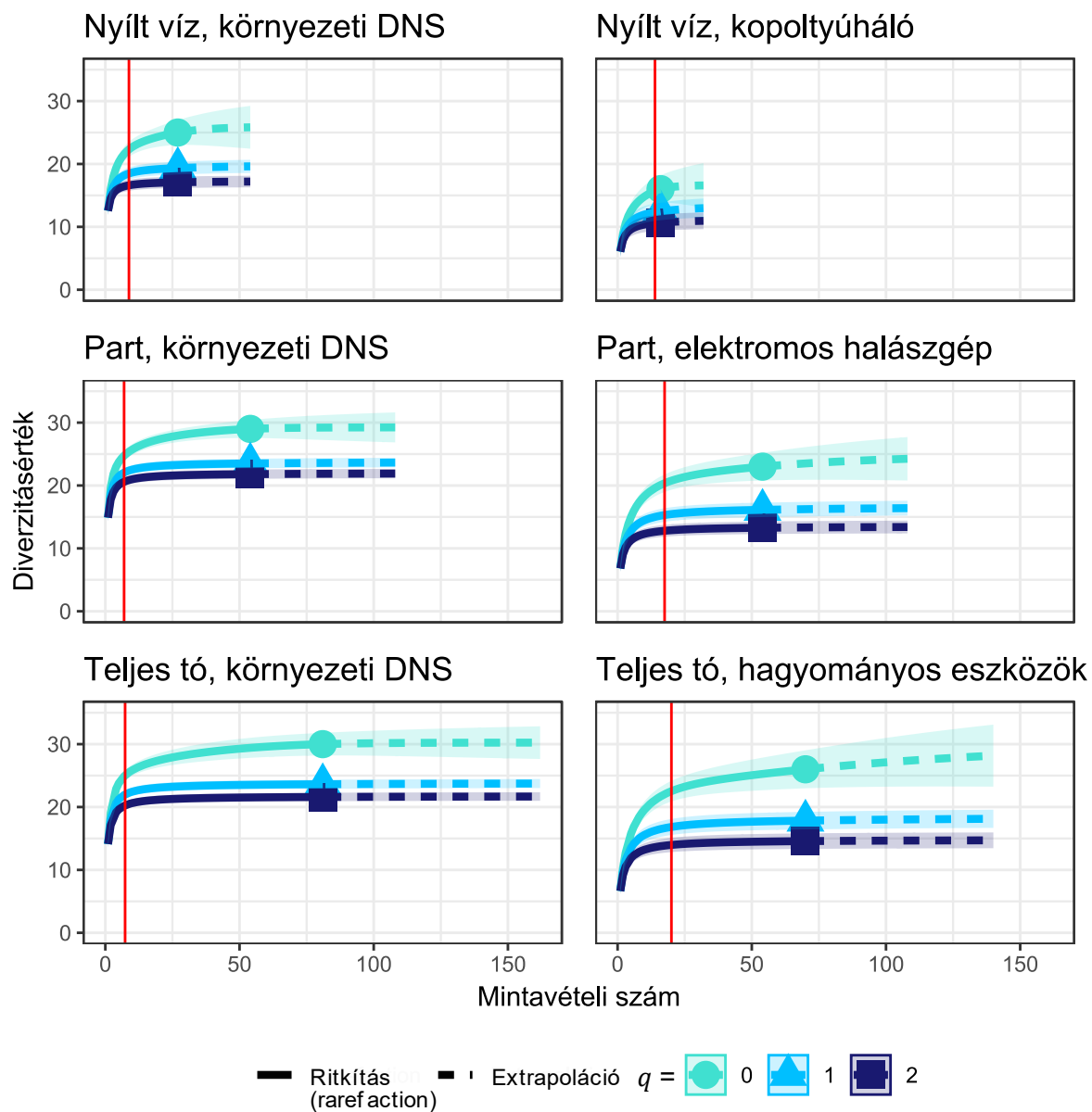
A legkisebb megfigyelt lefedettség érték a partvédő kövezések mentén elektromos halászgéppel gyűjtött mintákhoz tartozott és 97,68%-nak adódott. A standard lefedettség értékét ez alapján 97,5%-nak határoztuk meg és számítottuk ki a mellette várható diverzitásértékeket, valamint az eléréséhez szükséges legkisebb mintavételi számot az egyes mintahalmazok esetén (kikötő, környezeti DNS; kikötő, elektromos halászgép; kövezés, környezeti DNS; kövezés, elektromos halászgép; nádas, környezeti DNS; nádas, elektromos halászgép; összevont partmenti zóna, környezeti DNS; összevont partmenti zóna, elektromos halászgép; nyílt víz, környezeti DNS; nyílt víz, kopolyúháló; teljes tó, környezeti DNS; teljes tó, hagyományos mintavételi eszközök).

A környezeti DNS-el gyűjtött minták esetén kisebb volt az azonos lefedettség eléréséhez szükséges mintavételi szám, mint a hagyományos módszerekkel gyűjtötnél, bármely élőhelytípus eredményeinek mintavételi módszerek szerinti összevetésekor, ugyanakkor nagyobbak voltak a várható diverzitásértékek (2. táblázat). A teljes tó léptékében például várhatóan már 7-8 minta is elegendő 25 taxon kimutatásához, míg hagyományos eszközök esetén legalább 20 mintára volna szükséges 22-23 taxon kimutatásához. Az egyes mintahalmazokban a különböző diverzitásértékek ($q = 0, 1, 2$) azonos lefedettségű eléréséhez szükséges legkisebb mintavételi számokban azonban nem volt eltérés.

A kimutatható diverzitásértékekben való eltérések, továbbá a mintavételi reprezentativitás alakulása a mintavételi számok függvényében áttekinthető formában az egyes mintahalmazokra felállított ritkítási görbéken látható (3. és 4. ábra). Megfigyelhető a fentiekben leírt tendencia, miszerint a környezeti DNS mintavételekkel detektálható diverzitás nagyobb értékű a teljes mintavételi folyamat során és a teljes tó léptékében a görbék gyorsabban közelítenek a telítődési ponthoz. A kimutatható taxonszámban való eltérés a partmenti zóna élőhelyeinek esetében (összevontan és a 3 partmenti élőhelytípust önállóan szemlélve is) 5 körülinek adódott, nyílt vízen ez az eltérés nagyobb volt, 9 taxon. A teljes tó tekintetében volt a legkisebb az eltérés: környezeti DNS mintavétellel a becslések szerint várhatóan 4 taxonnal többet lehet igazolni. A Shannon ($q = 1$) és Simpson ($q = 2$) diverzitást ábrázoló görbék minden esetben a taxonszámot ($q = 0$) mutató görbék alatt futnak, hasonló ívvel. Hasonlóképpen a taxonszámhoz, mindkét diverzitási görbe magasabb értékeket mutat a környezeti DNS, mint a hagyományos módszerek esetében bármely mintaszámnál, minden élőhelyen és léptéken.



3. ábra – A mintavételi számok függvényében a várható diverzitásértékeket ($q = 0, 1, 2$) mutató ritkítási görbék a 3 partmenti élőhelytípusban jelenlét/hiány adatok alapján. A függőleges piros vonalak és a ritkítási görbék metszéspontjánál olvashatóak le a standard (97,5%-os) lefedettség eléréséhez szükséges legkisebb mintavételi számok és a hozzájuk tartozó várható diverzitásértékek.



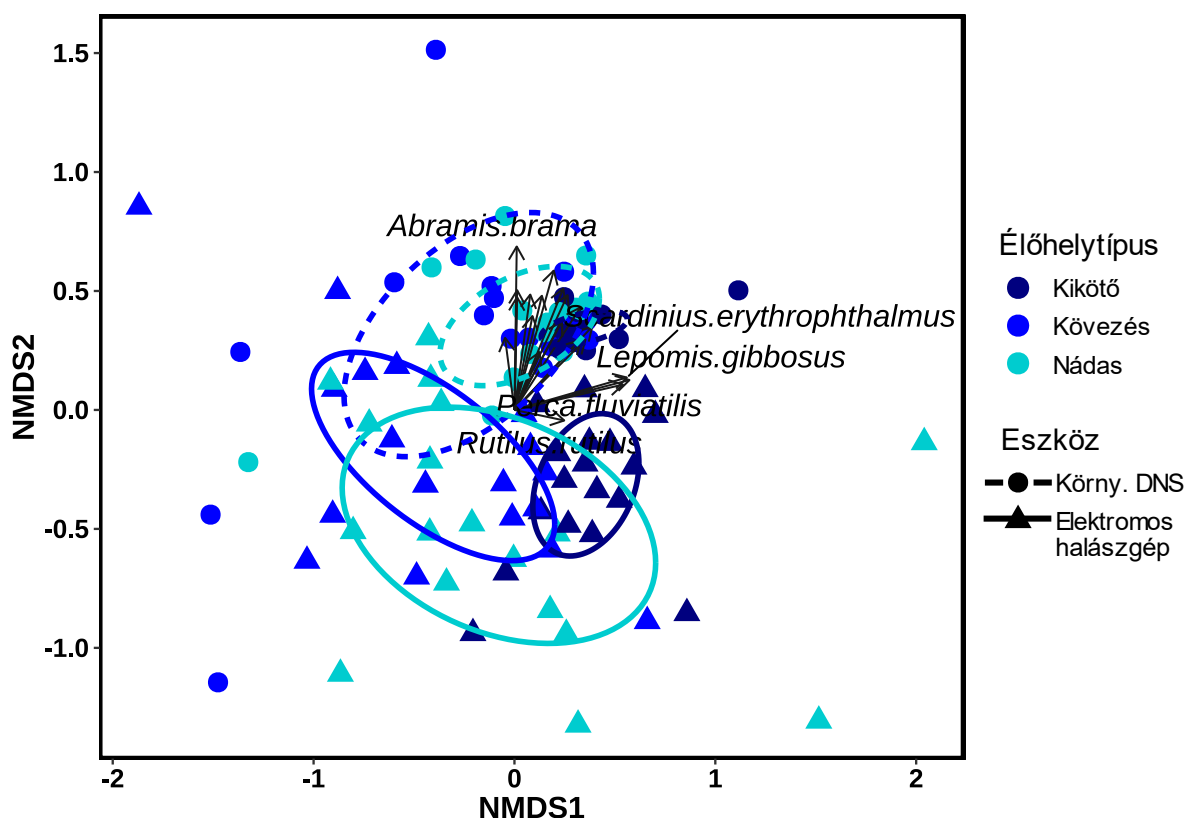
4. ábra – A mintavételi számok függvényében a várható diverzitásértékeket ($q = 0, 1, 2$) mutató ritkítási görbék a partmenti és a nyílt vízi élőhelytípusban, valamint a teljes tóban jelenlét/hiány adatok alapján. A függőleges piros vonalak és a ritkítási görbék metszéspontjánál olvashatóak le a standard (97,5%-os) lefedettség eléréséhez szükséges legkisebb mintavételi számok és a hozzájuk tartozó várható diverzitásértékek. A 3. és 4. ábra skálázása eltérő.

2. táblázat – A standard lefedettség érték elérése melletti diverzitásértékek (qD) várható értékei a nevezetes skálaparaméterek szerint ($q = 0, 1, 2$) 95%-os konfidenciaintervallummal és az eléréshez szükséges legkisebb mintavételi szám az egyes élőhelytípusok és mintavételi módszerek szerinti mintahalmazokban.

	Lefedettség	Mintavételi szám	q	qD	qD (95% K. I.)
Teljes tó, körny. DNS	0,975	7,3654	0	25,0309	24,205–25,8568
			1	21,9872	21,4492–22,5252
			2	20,2503	19,7633–20,7374
Teljes tó, hagyományos eszközök	0,975	20,0534	0	22,523	20,7443–24,3018
			1	16,8329	15,8119–17,854
			2	13,9747	13,0468–14,9026
Nyílt víz, körny. DNS	0,975	8,7995	0	22,3126	20,7755–23,8497
			1	18,4904	17,4178–19,5631
			2	16,6056	15,6589–17,5524
Nyílt víz kopolyúháló	0,975	13,9375	0	15,714	12,0579–19,37
			1	12,3363	10,8548–13,8178
			2	10,6001	9,3636–11,8365
Part, körny. DNS	0,975	6,9896	0	24,7417	23,7676–25,7158
			1	22,0544	21,4123–22,6965
			2	20,5882	20,0215–21,1549
Part, elektromos halászgép	0,975	17,5099	0	20,3597	18,9968–21,7226
			1	15,3042	14,4324–16,1761
			2	12,8014	11,9536–13,6493
Kikötő, körny. DNS	0,975	6,3227	0	24,0521	21,6748–26,4294
			1	21,8211	20,6013–23,041
			2	20,767	19,8111–21,7228
Kikötő, elektromos halászgép	0,975	10,818	0	19,0722	17,1569–20,9876
			1	15,2558	14,147–16,3646
			2	13,2908	12,2363–14,3454
Kövezés, körny. DNS	0,975	9,683	0	26,173	22,729–29,617
			1	22,1557	20,4806–23,8309
			2	19,9478	18,5531–21,3425
Kövezés, elektromos halászgép	0,973	16,9517	0	17,824	10,1032–25,5449
			1	13,2122	11,2824–15,142
			2	11,2072	9,8898–12,5246
Nádas, körny. DNS	0,975	5,9781	0	24,1936	21,499–26,8881
			1	21,8657	20,4269–23,3044
			2	20,4806	19,3984–21,5627
Nádas, elektromos halászgép	0,979	16,8826	0	17,8728	13,3065–22,439
			1	13,4355	11,9169–14,9541
			2	11,0368	9,8608–12,2128

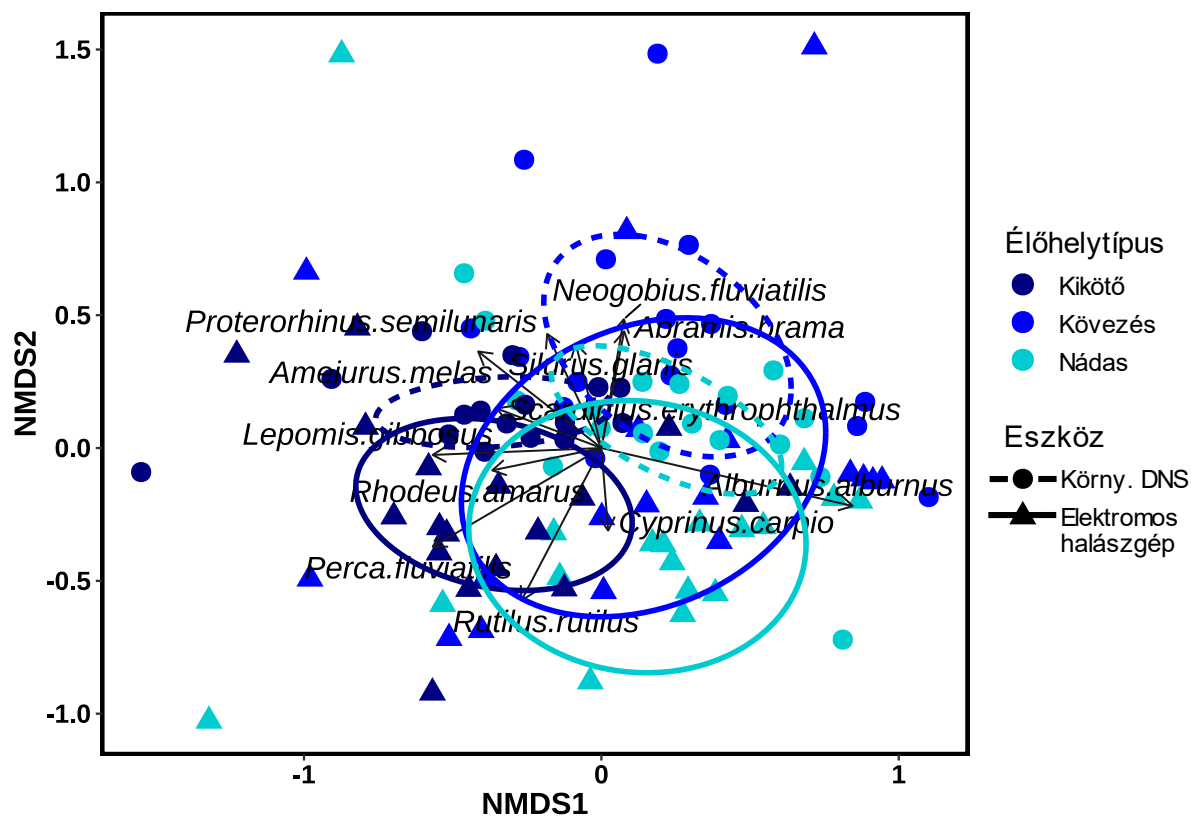
4.3 Közösségszerkezet-elemzések

Az NMDS elemzések minden esetben mutattak bizonyos szintű eltérést a mintavételi módszerek, illetve az élőhelytípusok szerint alkotott mintahalmazok között. A minták közti távolság általában a hagyományos mintavételi eszközök esetén volt nagyobb. Azaz a környezeti DNS minták a kimutatott taxonok és a relatív abundancia értékek tekintetében homogénebbnek bizonyultak, mert ritkábban fordult elő, hogy egy taxon viszonylag kevés helyen fordult elő, illetve, hogy nagyon nagy különbségek adódtak a szekvenciaszámokban. Élőhelytípusok szempontjából a partmenti típusok bontásában a heterogenitás a kikötő, nádas, partvédő kövezés sorrendjében nőtt mindkettő mintavételi eszköz eredményei szerint. Az összefüggés a jelenlét/hiány adatok alapján (5. ábra) végzett elemzésben szembetűnőbb, mint az abundancia alapján (6. ábra) végzettben (előbbinél az alkalmazott módszerek szerinti elkülönülés is egyértelműbb). Az összes kikötői mintát figyelembe véve tehát, azok egymáshoz nagyon hasonlóknak bizonyultak, főleg jelenlét/hiány adatok esetén. Nyílt vízi minták esetén különösen szembeötlő a minták heterogenitásbeli eltérése, viszont éppen az az abundancia adatokból (7.b ábra) kapott eredményekben különülnek el jobban a módszerek, ahol az ellipszisek egyáltalán nem fednek át, szemben a jelenlét/hiány alapján végzett elemzésben (7.a ábra).



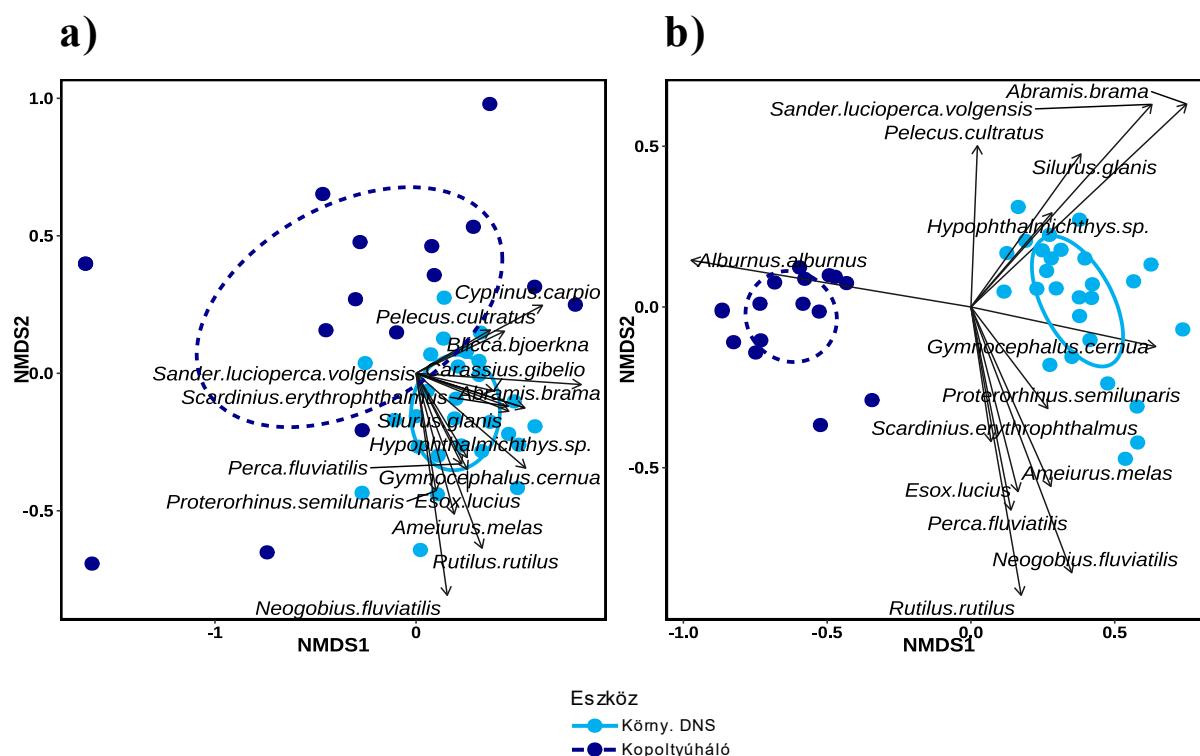
5. ábra – Partmenti közösségek jelenlét/hiány alapú NMDS elemzése.

A partmenti közösségek jelenlét/hiány alapú NMDS elemzéséhez tartozó stressz érték 0,2006. A környezeti DNS mintavételek a kimutatott fajokra nézve rendre homogénebbnek bizonyultak, valamint a kizárólag (illetve jóval gyakrabban) ezzel a módszerrel kimutatott fajok által, mint a dévérkeszeg és a tarka géb, elkülönül az elektromos halászgép eredményeitől. Az ANOSIM próba R értéke 0,2946 ($p < 0,0001$), ami a tesztelt csoportok közötti eltérésre utal.



6. ábra – Partmenti közösségek abundancia alapú NMDS elemzése.

A partmenti közösségek abundancia alapú NMDS elemzéséhez tartozó stressz érték 0,1835. Hasonló mintázat figyelhető meg a minták hasonlóságában, de a homogenitásbeli eltérések kisebb mértékűek. A különböző módszerekkel kapott mintavételek eredményei is jobban átfednek, bár a meglévő elkülönülésért elsősorban itt is a kizárólagosan, illetve jellemzőbb módon a környezeti DNS mintavételekkel kimutatott fajok felelősek. Az ANOSIM próba R értéke 0,2531 ($p < 0,0001$), ami a tesztelt csoportok közötti eltérésre utal.



7. ábra – Nyílt vízi közösségek a) jelenlét/hiány és b) abundancia alapú NMDS elemzése.

A nyílt vízi közösségek jelenlét/hiány alapú NMDS elemzéséhez tartozó stressz érték 0,1713. A kopoltyúhálóval gyűjtött mintákban nem voltak megtalálhatók csak erre a módszerre jellemző, általánosan előforduló fajok, míg a környezeti DNS mintákban a legtöbb faj általánosan előforduló volt. Az ANOSIM próba R értéke 0, 5364 ($p < 0,0001$), ami a tesztelt csoportok közötti nagymértékű eltérésre utal.

A nyílt vízi közösségek abundancia alapú NMDS elemzéséhez tartozó stressz érték 0,0731. A kopoltyúhálóval gyűjtött minták halállományában a kűsz volt domináns faj, míg a környezeti DNS mintákban a többi közösségalkotó faj szerepelt nagyobb relatív abundancia (szekvencia) értékekkel (pl. vágó durbincs, busa fajok hibridje). Az ANOSIM próba R értéke 0,9853 ($p < 0,0001$), ami a tesztelt csoportok közötti közel teljes mértékű eltérésre utal.

5. Diszkusszió

A mintareprezentativitás központi kérdéskör mind az alap, mind az alkalmazott ökológiai kutatások terén, hiszen a cél minden esetben a közösséget leginkább reprezentáló minta gyűjtése. Vizsgálatunkból kiviláglik az élőlényközösségek szerkezeti leírása során kapott eredmény mintavételi eszköztártól való függése. Hagyományos mintavételi eszközök alkalmazásakor minden esetben – élőhelytípusok és a teljes tó szintjén is – alacsonyabb volt a kimutatott, illetve a várható diverzitásérték, mint a környezeti DNS használatakor. A környezeti DNS mintavételek összességében több halfaj jelenlétét mutatták ki a Balatonból, mint akár az elektromos halászgép és a kopoltyúháló együttesen. Ez megerősíti korábbi kutatások eredményeit, melyek a környezeti DNS mintavétel hatékonyságáról tanúskodnak [53–55].

Az azonos lefedettség eléréséhez szükséges becsült mintavételi szám a 3 különböző q skálaparaméterrel végzett számítások során megegyező volt az összes mintahalmazra nézve. Ez szemléletesen azt jelenti, hogy a közösségek teljes taxonkészletének ($q = 0$), tipikus taxonjainak ($q = 1$) és domináns taxonjainak ($q = 2$) azonos lefedettségű kimutatásához is ugyanakkora a legkisebb szükséges mintavételi befektetés. Az összefüggés azt sugallja, hogy a Balaton halállománya nem bővelkedik kifejezetten ritka taxonokban, melyek kimutatása kis előfordulási gyakoriságukból adódóan megnövelt mintavételi számot kívánna meg. Ez a tendencia a ritkítási görbék lefutásából is kikövetkeztethető: a teljes taxonszámra vonatkozó görbe ugyan jól elkülönülő és a Shannon, valamint a Simpson diverzitásra vonatkozó görbék fölött fut, de a meredeksége utóbbiakétól nem tér el látványosan és hasonlóan ellaposodik a mintavételi számok növelésével. Érdekes lehet figyelembe venni, hogy a Shannon és a Simpson diverzitást mutató ritkítási görbék tendenciózan egymáshoz közelebb futnak, ami arra utal, hogy a tipikus és domináns taxonok diverzitása között kisebb a különbség, mint a tipikus és a viszonylag ritka taxonok diverzitása között.

Az egyes élőhelyek kimutatott és várható diverzitásértékei minden esetben a környezeti DNS mintavételekre támaszkodó felmérések által adódtak nagyobbban. A teljes tóból minden módszer eredményét összesítve 32 taxont mutattunk ki, melyek közül csupán 2 olyan, amelyeket kizárólag hagyományos módszerekkel sikerült kimutatnunk. A dévérkeszeg és a bodorka hibridjének egyetlen példánya kopoltyúhálóval végzett mintavétel során került kimutatásra, míg a menyhalnak összesen 2 egyedet gyűjtöttük a partvédő kövezések elektromos halászgéppel végzett felmérése során. A kizárólag hagyományos módszerekkel gyűjtött taxonok száma tehát elmarad a kizárólag környezeti DNS mintavétellel kimutatott 6 taxontól.

Igaz, ezen taxonok közül a márna, a réti csík, a feketeszájú géb, a sebes pisztráng, és a lápi póc előfordulása a Balatonban a 20 évre visszamenő adatsorok alapján csak elvétve jellemző [18]. Ezzel szemben a busa fajok jelenléte a tóban számottevő [18], viszont hagyományos módszerekkel viszonylag kis eséllyel foghatóak foltos eloszlásmintázatuk és egyedeik jellemzően nagy testmérete miatt. A fajok/taxonok jelenlétének igazolásában ezért a környezeti DNS egy igen hatékony eszköznek mutatkozott, ami vélhetően sokat hozzáad a mintavételi reprezentativitás növeléséhez.

A főbb élőhelytípusokra, jelen esetben nyílt vízre és partmenti zónára bontva az eredményeket kitűnik a várható diverzitásértékekben mutatkozó különbség. A fajgazdagabb élőhelyként számontartott partmenti zóna önmagában csaknem teljesen lefedi a teljes tóra várható diverzitásértékeket, míg a nyílt vízi mintavételektől a teljes tóhoz képest közel 10 taxonnal kevesebb várható bármely gyűjtési módszer esetében. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a partmenti zónából kimutatható a Balaton halállományának szinte összes taxonja, illetve, hogy a nyílt vízből kevesebb és feltételezhetően nem csak erre az élőhelyre specifikus taxon mutatható ki. Azonban például a tipikusan nyílt vízi garda a partmenti zónából hagyományos módszerrel nem lett kimutatva. Környezeti DNS mintavételekkel is jóval kevesebb alkalommal és nagyságrendekkel kevesebb szekvenciaolvasattal tudtuk kimutatni, mint nyílt vízből. Ennek ténye érzékelteti a módszer érdemeit: érzékeny, mivel a kis abundanciával jelenlévő taxonokat is kimutatja, valamint az eloszlásmintázatot is jól tükrözi.

A partmenti zóna 3 elkülönített élőhelytípusának a diverzitásában nem állapítható meg figyelemre méltó eltérés. A környezeti DNS mintavételek és a hagyományos módszerek is közel azonos várható diverzitásértékeket eredményeztek az élőhelytípusok összevetésében. A módszerek között azonban itt is fellelhető a teljesítménybeli különbség: környezeti DNS mintavételekkel mindhárom esetben legalább 5 taxonnal több a várható diverzitásérték. Az eltérés a jellemzően zárt, hullámvástól viszonylag védett és ökológiai értelemben egyoldalú kikötők esetén a legkisebb. Ennek oka lehet tehát esetleg a víz kisebb mértékű felkavarodása és/vagy az egyes taxonok kisebb eséllyel való előfordulása. A módszerek hatékonyságában érzékelt legnagyobb eltérés a partvédő kövezésnél teljesült, amelyet magyarázhat a jelentősebb kitettség – erősebb hullámvás, illetve a nádasfoltokkal való közvetlenebb összeköttetés.

Összességében azonban elmondható, hogy nincs nagy különbség a kimutatható taxonok tekintetében ezen élőhelytípusok között; a partmenti zónára jellemző taxonok lényegében bármelyik élőhelytípusban (kikötő, nádas, partmenti kövezés) detektálhatóak. Eltérések sokkal

inkább a relatív abundancia viszonyokból adódhatnak, melyet a közösségszerkezet-elemzések eredményei is sejtetnek.

Az NMDS elemzéssel történő kiértékelés szintén egyértelmű különbséget mutat a jelenlét/hiány adatokra nézve a hagyományos és a környezeti DNS módszerrel nyert minták között. Utóbbiak sokkal kevésbé különböztek egymástól, mivel egyenként is átlagosan nagyobb számú taxont mutattak ki és kevésbé volt jellemző, hogy egy taxon aránylag kevés mintában fordult volna elő. Ezzel szemben a hagyományos eszközökre – különösen a kopolyúhálóra – az egyes mintákkal kimutatott taxonösszetétel heterogenitása teljesült. Részben ebből is következhet, hogy azonos értékű lefedettség eléréséhez a hagyományos eszközök alkalmazásakor jelentősen nagyobb mintavételi számra van szükség az adataink alapján. Az eltérések még hangsúlyosabbá válnak, ha az abundancia alapú elemzéseket szemléljük: a vizsgált mintahalmazok jobban elkülönülnek egymástól, kiváltképp a nyílt vízi minták elemzésekor. Az abundancia adatok ugyanis széles skálán mozognak, különösen a szélhajtó kűsz túlnyomó tömegessége miatt, amelynek mennyiségét a kopolyúháló felülbecsli más módszerekhez képest [8, 15].

Jelen vizsgálatnak nem része a két hagyományos mintavételi módszer egymással való összehasonlítása, mivel főképp környezeti tulajdonságokból kifolyólag korlátozott az egyes élőhelyeken való alkalmazhatóságuk. Egymással való kiváltásuk általában nem oldható meg [8, 56]. Fajszelektív jellegükre mutat rá például Czeglédi és mtsai. munkája [12]. Eredményeik szerint a kimutatott fajkészlet erősebb korrelációban állt bármely hagyományos eszköz és a környezeti DNS metabarkódolás között, mint az elektromos halászgép és a kopolyúháló összehasonlításakor, ami ezen hagyományos eszközök szelektivitásából adódhat. Ez az eredmény egybecseng a mostani eredményeinkből levonható következtetéssel, miszerint a környezeti DNS önállóan hatékonyabb módszer a hagyományos mintavételi eljárásoknál a halközösségek szerkezetének jellemzésében.

Megfontolandó azonban a környezeti DNS szolgáltatja eredmények maradéktalan elfogadása. A módszer ugyanis több hibalehetőséget is magában hordoz a kimutatás terén [57]. Az egyik ilyen lehetséges hibás kimenetel az álpozitív („false positive”) eredmény. A mintába kerülő fragmentumok pontos eredete nem követhető vissza, amiből következik egyrészt a kontamináció fennállásának veszélye (a begyűjtéstől kezdve a teljes laboratóriumi feldolgozás végéig), másrészt a vízmozgásból eredő problémák. A víz általi transzport elméletileg okozhat álpozitív eredményt, ha pl. nyílt vízi faj egyedéből származó fragmentum a partvonalig

sodródik. Ugyanakkor a DNS degradációja feltételezhetően már ezen eseményt megelőzően bekövetkezik olyan mértékben, ami ellehetetleníti a genetikai azonosítást. Eichmiller és mtsai. [58] a Balatonhoz hasonló, turbid és sekély állóvízi környezetben igazolták, hogy a DNS koncentrációja gyorsan változik, a cél faj elterjedésének megfelelően, mivel transzportja 100 méteres távolságon túl nem számottevő. Az általunk végzett felmérések során ugyanakkor (figyelembe véve az esetleges transzport folyamatokat) legalább 500 m volt a legközelebbi minták közötti távolság. A partmenti zóna mintavételi pontjai közti távolságok ugyan jellemzően kisebbek voltak, de a nádas, illetve a mesterséges építmények erősen korlátozzák a partvonal mentén lévő víztömeg mozgását. Továbbá, a mikrobiális lebontó folyamatok feltételezhetően jelentősebb érvényesülése miatt a DNS degradációja is gyorsabb lehet, mint a kisebb biomasszával jellemezhető nyílt vízi környezetben [59]. Ebből kifolyólag nagy biztonsággal állítható, hogy a mintákban előforduló DNS valószínűleg, térbeli torzításoktól mentes előfordulásokat rögzített a Balaton tekintetében. Néhány nap-hét távlatában a DNS fragmentumok exponenciálisan csökkenő koncentrációja figyelhető meg a bomlásból adódóan. A csökkenés mértékét számos környezeti tényező befolyásolhatja, melyek közül a hőmérséklet hatása különösen jelentős és tanulmányozott: magasabb hőmérséklet mellett gyorsabb a degradáció. A környezeti DNS időbeli detektálhatóságát mesterségesen kialakított tavakban vizsgálva, lénai tavak jelenléte az eltávolításukat követő 14. napon csak 5%-os valószínűséggel volt kimutatható, mely a 21. napon már 1%-ra csökkent, pedig a víz hőmérséklete viszonylag alacsony: 8-11 °C közötti volt [60]. Akvárium kísérletek során a detektálható környezeti DNS koncentrációja már 3 nap elteltével is nagyfokú csökkenést mutatott (legalább 70%-kal csökkent 20 °C-on és 80%-kal 30 °C-on [61]), illetve pontyokkal végzett kísérletekben a kezdeti koncentráció 1%-ra való csökkenése 5 °C-on 14 nap alatt bekövetkezett, míg 15 °C-on túl kevesebb, mint 3 nap alatt [62]. A mi vizsgálataink idején a tó víz hőmérséklete 20 °C fölötti volt, így a DNS fragmentumok igen gyors ütemű bomlása feltételezhető. A Balaton vize ugyan – sekély tó lévén – erősen felkavarodó, de az élőhelyek közötti szállítódás inkább a gyors folyású víztestek esetén okozhat félrevezető eredményt. A felkavarodás kisebb léptékben a DNS fragmentumok eloszlására még hatással lehet, élőhelyeken belül homogenizáló módon, így ebből a szempontból akár előnyt is jelenthet.

A mintavétel pontszerűségéből ugyanis szintén származhatnak torzítások – álnegatív („false negative”) eredmények. Habár természetes víztestekre jellemző a detektálást lehetővé tevő megfelelő mértékű elkeveredés, mély tavak esetén felszíni mintákból már nehézséget okozhat a vízoszlop mélyebb rétegeiben tartózkodó fajok észlelése [63]. Hasonló korlátot szab

a módszernek az élőlények DNS emittálásának szezonális aktivitásukat követő változása. Hibernáló élőlények esetén jelentősen lecsökken a detektálhatóság [64]. Fontos azonban azt is hangsúlyozni, hogy az élettani aktivitás a hagyományos mintavételi eszközök hatékonyságát is befolyásolja, tehát a jelenség nem azonosítandó a környezeti DNS-en alapuló mintavétel gyengeségeként. Eredményeink szerint azonban az álnegatív eredmény jelentősége minden bizonnyal rendkívül kicsi volt a sekély Balaton esetében, hiszen a környezeti DNS segítségével a rendkívül ritka taxonokat és a bentikus taxonokat is ki lehetett mutatni. Valójában a bentikus taxonok kimutatásának tekintetében is jobban teljesített a környezeti DNS a hagyományos módszerekhez képest. Emellett a mintavételek az ideális monitorozási időszakban történtek (nyáron-kora ősszel), amikor a halak aktívak, de nem jellemző kifejezett funkcionális vándorlásuk (pl. ívási vagy telelő területekre történő vándorlás).

A környezeti DNS módszer hátránya lehet, hogy viszonylag újkeletű módszer révén, a genetikai alapon történő fajszintű azonosítás jelenleg nem valósítható meg minden taxon esetében. A fajok kimutathatósága többek között függhet a választott markertől, az alkalmazott primer(ek) specificitásától, a rendelkezésre álló referencia adatbázisban tárolt szekvenciaadatoktól és a bioinformatikai analízistől is [57, 65]. Ha a vizsgált közösség egy fajának referencia szekvenciája egy genetikai értelemben túlságosan eltérő állományból került meghatározásra, akkor a mintában jelenlevő szekvencia-olvasatok a bioinformatikai feldolgozás során elvetésre kerülhetnek. Bizonyos taxonok esetén a fajok közötti nagymértékű hasonlóság a fajszintű elkülönítést nehezíti meg. Adatsorunkból erre jó példa a süllő és a kősüllő egybevonása. Ezen fajok genetikai alapú megkülönböztetése a mintáink feldolgozása során nem volt lehetséges, mert a referencia adatbázisban szereplő haplotípusaik 100%-os egyezést mutatnak. A probléma egyik lehetséges oka a mitokondriális DNS marker használata, mivel a hibridizációs, illetve introgressziós folyamatok ebben az esetben különösen nagy eséllyel moshatják el a fajok közti határokat (szemben a nukleáris markerekkel [66, 67]). Ezen fajazonosítási nehézségek azonban a jövőben leküzdhetőek lehetnek a laboratóriumi eljárások finomításával, valamint a referencia adatbázisok bővítésével.

A fősorolt korlátok ellenére a környezeti DNS gyűjtésén alapuló mintavételi módszer ígéretes módja lehet az élőlényközösségek reprezentatív leírásának, jellemzésének, ahogy eredményeink is bizonyítják. Megemlítendő előnyei közé tartozik emellett a gyűjtések könnyű kivitelezhetősége, ennek elsajátítása, ami alkalmassá teszi akár a közösségi tudományban (citizen science) való felhasználásra is [68]. A felméréseink során alkalmazott hagyományos eszközök ezzel szemben komolyabb tapasztalatot követelnek meg. Az elektromos halászgép

használata engedélyhez, valamint halászgép-kezelői bizonyítványhoz kötött. A kopoltyúhálók megfelelő alkalmazása elsősorban gyakorlottságot, szakértelmet igényel, ami a felmérés elvégzésének tervezésekor okozhat logisztikai problémát. A környezeti DNS mintavétele az előbb kiemelt előnyén túl ráadásul a fizikai környezet tágabb határain belül valósítható meg. Végrehajtható növényzettel sűrűn borított víztestekben, valamint a hagyományos eszközökhöz viszonyítva sokkal alacsonyabb vízállás mellett is. Érzékenysége pedig a korlátjai ellenére is kimagasló [69], mely az itt közölt eredményeinkre támaszkodva is kijelenthető.

Adataink és számításaink alapján nagyjából 20 környezeti DNS mintavétel már kellően reprezentatív eredményekkel szolgálna a Balaton halfaunájának jellemzésére nézve, hiszen 97-98%-os lefedettség érték eléréséhez szükséges legkisebb, becsült mintavételi szám egyik mintavételezett közösség esetén sem haladta meg a 10-et. A térben megfelelően elosztott, viszonylag kis számú minta már alkalmas lenne akár a halállomány hosszú távú változásainak nyomon követésére, az évek közötti változások jellemzésére mind a partmenti zónában, mind nyílt vízen. A módszer tehát költséghatékony (viszonylag olcsó és gyorsan kivitelezhető), robusztus, valamint reprezentatív módja lehet a balatoni halállomány hosszú távú monitorozásának, így javasoljuk ezen célból történő használatának bevezetését.

A módszerben rejlő potenciál általános értelemben óriási és bár a monitorozási rendszerekben való alkalmazására vonatkozó, nemzetközileg is egységes, standard eljárási protokoll kidolgozása még nem történt meg, az erre irányuló törekvések abszolút indokoltak. Vizsgálati eredményeink is ezen cél elérésének útján mozdítják előre a kapcsolódó kutatásokat.

6. Összefoglalás

Ökológiai vizsgálatok során az élőlényközösségek szerkezetét jól tükröző minta szükséges a közösségi diverzitás nyomon követéséhez, valamint környezetminősítési rendszerek megfelelő működtetéséhez és környezetgazdálkodási tervek kidolgozásához. A reprezentatív mintavétel megvalósítása azonban nem egyszerű feladat, mert a mintavételek megbízhatóságát számos tényező befolyásolja. Édesvízi halközösségek monitorozásakor az eredmény jelentősen függhet az abiotikus és biotikus jellemzőkön túl az alkalmazott mintavételi eszközök szelektivitásától. A hagyományos eszközök ígéretes kiegészítője, illetve a jövőben akár alternatívája lehet a környezeti DNS mintavételeken alapuló felmérés. Felhasználhatóságát illetően azonban egyelőre hiányos a rendelkezésre álló ismeretanyag, így például hatékonysága nincs meghatározva különböző élőhelytípusok és élőlénycsoportok esetén. Munkánk során összehasonlítottuk a Balaton halfaunájának leírását célzó, hagyományos és környezeti DNS mintavételeken alapuló felmérések eredményeit. Összevetettük az egyes módszerek által kimutatható diverzitási mutatók értékét és a közösségek összetételét (jelenlét/hiány és relatív abundancia adatok alapján) a teljes tó szintjén és élőhelytípusonként. A környezeti DNS mintavételi módszer minden hagyományos módszerrel szemben és minden élőhelytípusban jobban teljesített. Alkalmazása során összességében több taxont mutattunk ki, mint a hagyományos eszközök segítségével. Eredményeink szerint a környezeti DNS mintavételén alapuló felmérés igen hatékony, mivel kis mintavételi számok mellett is lehetővé teszi a közösség reprezentatív jellemzését. A módszer tehát kifejezetten javasolt a Balaton és más tavak halállományának monitorozásához, a közösségösszetétel tér, -és időbeli változásainak leírásához.

7. Abstract

In ecological studies, a sample that reflects the structure of communities is needed in order to monitor community diversity, properly operate environmental rating systems, and develop environmental management plans. However, achieving a representative sample is not a simple task, as it is affected by a number of factors. When monitoring freshwater fish communities, the results can depend significantly on the selectivity of the sampling tools used, in addition to abiotic and biotic characteristics of the environment. Assessments based on environmental DNA sampling may be a promising complement or in the future, even an alternative to conventional tools. However, there is still a lack of knowledge on its applicability, for example, its effectiveness in different habitat types and organism groups has not been determined. In our work, we compared the results of traditional and environmental DNA sampling surveys to characterize the fish fauna of Lake Balaton. We compared the values of species diversity measures and community structure (incidence and abundance based data) detectable by each method at the level of the whole lake and at the level of the main habitat types. The environmental DNA sampling method outperformed all conventional methods in all habitat types. It detected overall more taxa than conventional tools. Our results show that the environmental DNA sampling survey is highly efficient because it allows representative community characterisation even using only a small number of sampling units. The method is therefore highly recommended for the monitoring of fish communities in Lake Balaton and other lakes, and for describing spatial and temporal changes in community composition.

8. Irodalomjegyzék

1. Podani J (1997) Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia, Budapest
2. Cao Y, Williams DD, Larsen DP (2002) Comparison of Ecological Communities: The Problem of Sample Representativeness. *Ecological Monographs* 72:41–56. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(2002\)072\[0041:COECTP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(2002)072[0041:COECTP]2.0.CO;2)
3. Yoccoz NG, Nichols JD, Boulinier T (2001) Monitoring of biological diversity in space and time. *Trends in Ecology & Evolution* 16:446–453. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02205-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02205-4)
4. Cao Y, Hawkins CP, Vinson MR (2003) Measuring and controlling data quality in biological assemblage surveys with special reference to stream benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology* 48:1898–1911. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01123.x>
5. Hughes RM, Peck DV (2008) Acquiring data for large aquatic resource surveys: the art of compromise among science, logistics, and reality. *Journal of the North American Benthological Society* 27:837–859. <https://doi.org/10.1899/08-028.1>
6. Mueller M, Pander J, Knott J, Geist J (2017) Comparison of nine different methods to assess fish communities in lentic flood-plain habitats. *Journal of Fish Biology* 91:144–174. <https://doi.org/10.1111/jfb.13333>
7. Birk S, Bonne W, Borja A, et al (2012) Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* 18:31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>
8. Erős T, Specziár A, Bíró P (2009) Assessing fish assemblages in reed habitats of a large shallow lake—A comparison between gillnetting and electric fishing. *Fisheries Research* 96:70–76. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2008.09.009>
9. Specziár A (2001) A halak mozgási aktivitásának hatása a kopolyúháló mintavételezések eredményeire: a CPUE napszakos és évszakos változásai a Balatonban: [Impacts of the activity of fish on the results of gillnet samplings: diurnal and seasonal changes of the CPUE in Lake Balaton.]. *HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY* 81:459–461
10. Kurkilahti M, Rask M (1996) A comparative study of the usefulness and catchability of multimesh gill nets and gill net series in sampling of perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.). *Fisheries Research* 27:243–260. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(95\)00463-7](https://doi.org/10.1016/0165-7836(95)00463-7)
11. Jackson DA, Harvey HH (1997) Qualitative and quantitative sampling of lake fish communities. *Can J Fish Aquat Sci* 54:2807–2813. <https://doi.org/10.1139/f97-182>
12. Czeglédi I, Sály P, Specziár A, et al (2021) Congruency between two traditional and eDNA-based sampling methods in characterising taxonomic and trait-based structure of fish communities and community-environment relationships in lentic environment. *Ecological Indicators* 129:107952. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107952>
13. Jurvelius J, Kolari I, Leskelä A (2011) Quality and status of fish stocks in lakes: gillnetting, seining, trawling and hydroacoustics as sampling methods. *Hydrobiologia* 660:29–36. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0385-6>
14. Olin M, Malinen T (2003) Comparison of gillnet and trawl in diurnal fish community sampling. *Hydrobiologia* 506:443–449. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008545.33035.c4>
15. Specziár A, Erős T, György ÁI, et al (2009) A comparison between the benthic Nordic gillnet and whole water column gillnet for characterizing fish assemblages in the shallow Lake Balaton. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 45:171–180. <https://doi.org/10.1051/limn/2009016>

16. Bíró P (1997) Temporal variation in Lake Balaton and its fish populations. *Ecology of Freshwater Fish* 6:196–216. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.1997.tb00163.x>
17. Specziár A, Tölg L, Bíró P (2000) A Balaton halfaunájának vizsgálata. *Halászatfejlesztés* 24:115–125
18. Specziár A (2010) A Balaton halfaunája: a halállomány összetétele, az egyes halfajok életkörülményei és a halállomány korszerű hasznosításának feltételrendszere. *Acta Biol Debr Suppl Oecol Hung* 23:7–185
19. Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, et al (2014) Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
20. Cristescu ME, Hebert PDN (2018) Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49:209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306>
21. Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012) Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21:1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
22. Carraro L, Mächler E, Wüthrich R, Altermatt F (2020) Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nat Commun* 11:3585. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>
23. Civade R, Dejean T, Valentini A, et al (2016) Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System | PLOS ONE. *PLOS ONE* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157366>
24. Dejean T, Valentini A, Miquel C, et al (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49:953–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>
25. Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4:423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
26. Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4:150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>
27. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
28. Antognazza CM, Britton RJ, Read DS, et al (2021) Application of eDNA metabarcoding in a fragmented lowland river: Spatial and methodological comparison of fish species composition. *Environmental DNA* 3:458–471. <https://doi.org/10.1002/edn3.136>
29. Blackman RC, Osathanunkul M, Brantschen J, et al (2021) Mapping biodiversity hotspots of fish communities in subtropical streams through environmental DNA. *Sci Rep* 11:10375. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89942-6>
30. Pont D, Valentini A, Rocle M, et al (2021) The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. *Journal of Fish Biology* 98:354–366. <https://doi.org/10.1111/jfb.14176>
31. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25:929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
32. Olds BP, Jerde CL, Renshaw MA, et al (2016) Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution* 6:4214–4226. <https://doi.org/10.1002/ece3.2186>
33. McElroy ME, Dressler TL, Titcomb GC, et al (2020) Calibrating Environmental DNA Metabarcoding to Conventional Surveys for Measuring Fish Species Richness. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8:

34. Roswell M, Dushoff J, Winfree R (2021) A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos* 130:321–338. <https://doi.org/10.1111/oik.07202>
35. Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379–391. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x>
36. Chao A, Jost L (2012) Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* 93:2533–2547. <https://doi.org/10.1890/11-1952.1>
37. Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, et al (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* 84:45–67
38. Chao A, Kubota Y, Zelený D, et al (2020) Quantifying sample completeness and comparing diversities among assemblages. *Ecological Research* 35:292–314. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12102>
39. Hill MO (1973) Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54:427–432. <https://doi.org/10.2307/1934352>
40. Denslow JS (1995) Disturbance and Diversity in Tropical Rain Forests: The Density Effect. *Ecological Applications* 5:962–968. <https://doi.org/10.2307/2269347>
41. Erős T, Szalóky Z, Sály P (2015) Módszertani útmutató a halak élőlénycsoport VKI szerinti gyűjtéséhez és a felszíni vízfolyások halak alapján történő ökológiai állapotminősítéshez. *Ökológiai Kutatóközpont, Tihany* 36:51
42. Sallai Z, Varga I, Erős T (2019) Halközösségek monitorozása Magyarország különböző típusú állóvizeiben és vízfolyásokban (2001-2018). In: Vácz O, Varga I, Bakó B (szerk.) *Gerinces állatok. A Nemzeti Biodiverzitás-monitorozó Rendszer eredményei II. Körös-Maros Nemzeti Park Igazgatóság, Szarvas.* pp 157–179
43. Specziár A, Erős T (2020) Development of a fish-based index for the assessment of the ecological status of Lake Balaton in the absence of present day reference condition. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020002>
44. Pont D, Rocle M, Valentini A, et al (2018) Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci Rep* 8:10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
45. Boyer F, Mercier C, Bonin A, et al (2016) obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16:176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
46. Schnell IB, Sollmann R, Calvignac-Spencer S, et al (2015) iDNA from terrestrial haematophagous leeches as a wildlife surveying and monitoring tool – prospects, pitfalls and avenues to be developed. *Frontiers in Zoology* 12:24. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0115-z>
47. Kottelat M, Freyhof J (2007) *Handbook of european freshwater fishes*. Steven Simpson Books, Switzerland
48. Froese R, Pauly D (2019) *FishBase*. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>, version (12/2019)
49. R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
50. Hsieh TC, Ma KH, Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7:1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
51. Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18:117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>

52. Dixon P (2003) VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14:927–930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>
53. Hänfling B, Lawson Handley L, Read DS, et al (2016) Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology* 25:3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
54. Keck F, Blackman RC, Bossart R, et al (2022) Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology* 31:1820–1835. <https://doi.org/10.1111/mec.16364>
55. Lobo J, Shokralla S, Costa MH, et al (2017) DNA metabarcoding for high-throughput monitoring of estuarine macrobenthic communities. *Sci Rep* 7:15618. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15823-6>
56. Diekmann M, Brämick U, Lemcke R, Mehner T (2005) Habitat-Specific Fishing Revealed Distinct Indicator Species in German Lowland Lake Fish Communities. *Journal of Applied Ecology* 42:901–909
57. Buxton A, Matechou E, Griffin J, et al (2021) Optimising sampling and analysis protocols in environmental DNA studies. *Sci Rep* 11:11637. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91166-7>
58. Eichmiller JJ, Bajer PG, Sorensen PW (2014) The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. *PLoS ONE* 9:e112611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112611>
59. Jo T, Murakami H, Yamamoto S, et al (2019) Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution* 9:1135–1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>
60. Dejean T, Valentini A, Duparc A, et al (2011) Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6:e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
61. Lance R, Klymus K, Richter C, et al (2017) Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *MBI* 8:343–359. <https://doi.org/10.3391/mbi.2017.8.3.08>
62. Eichmiller JJ, Best SE, Sorensen PW (2016) Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environ Sci Technol* 50:1859–1867. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05672>
63. Littlefair JE, Hrenchuk LE, Blanchfield PJ, et al (2021) Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. *Molecular Ecology* 30:3083–3096. <https://doi.org/10.1111/mec.15623>
64. de Souza LS, Godwin JC, Renshaw MA, Larson E (2016) Environmental DNA (eDNA) Detection Probability Is Influenced by Seasonal Activity of Organisms. *PLOS ONE* 11:e0165273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165273>
65. Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
66. Rubinoff D (2006) Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology* 20:1026–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x>
67. Krishnamurthy PK, Francis RA (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers Conserv* 21:1901–1919. <https://doi.org/10.1007/s10531-012-0306-2>
68. Biggs J, Ewald N, Valentini A, et al (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>

69. Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17:e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

9. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, Erős Tibornak, aki töretlenül támogat és segít nagyra becsült szakértelmével. Köszönöm továbbá Kövér Szilvia munkáját, rengeteg jótanácsát és a közös gondolkodásokat. Szeretném ezúton is megköszönni Czeglédi Istvánnak az elemzésekhez szükséges gyorstalpaló leckéket, valamint a kutatócsoport többi tagjának a folytonos bátorítást.