

## Cink monitorozás *Rana esculenta* fajkomplex egyedeinek vizsgálatával

<sup>1</sup>Simon Edina, <sup>2</sup>Braun Mihály, <sup>3</sup>Szabó Krisztián, <sup>1</sup>Molnár Péter, <sup>1</sup>Tóthmérész Béla

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem, Ökológiai Tanszék

4010 Debrecen, Pf. 71., e-mail: edina.simon@gmail.com

<sup>2</sup> Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

4010 Debrecen, Pf. 21.

<sup>3</sup> MTA SZBK Genetikai Intézet Biodiverzitás Csoport

6701 Szeged, Temesvári krt. 62.

**Összefoglalás:** A vizes élőhelyek kiemelt természetvédelmi értéket képviselnek, ezért állapotuk rendszeres vizsgálatot igényel. Cink terhelés kimutatására a *Rana esculenta* komplex egyedeit választottuk, amelyek a vizes élőhelyeken rendszeresen és nagy számban megtalálhatók. Vizsgálatunk célja a békák, mint bio-indikátor szervezetek alkalmazása volt, melyek a vizanalitikai vizsgálatok pillanatnyi állapotot tükröző jellegével ellentétben egy hosszabb periódusról adnak tájékoztatást. Kutatásainkat egymástól 200 km-re lévő területeken, a Miskafoki Holt-Tiszán és a cinkkel erősen terhelt Túr árterületén végeztük. Morfológiai paraméterek (testhossz, testtömeg) alapján közel azonos méretű egyedek szerveiben (máj, bőr, lábfejesont, combcsont, combizom) határoztuk meg a cink koncentrációját. Minden befogott állatról ujjperc mintát vettünk. Eredményeink azt mutatják, hogy a szervek közel azonos mértékben akkumulálták a cinket. A két terület egyedeinek belső szerveiben mért cink koncentrációk nem különböztek szignifikánsan. Az ujjpercek elemzése alapján azonban szignifikáns különbséget tapasztaltunk a két terület között (átlag  $\pm$  SD: Túr  $0.8 \pm 0.13$   $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$ , Miskafoki Holt-Tisza  $0.24 \pm 0.04$   $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$ ). Eredményeink arra utalnak, hogy a Túr folyó vizsgált szakaszán a szennyezettség mértéke nem jelent közvetlen veszélyt a kétélűek számára.

**Kulcsszavak:** cink akkumuláció, kecskebéka, kétélűek, Miskafoki Holt-Tisza, Túr

### Bevezetés

A nehézfémek akkumulációjának vizsgálatára széles körben elterjedtek a különböző gerinctelen csoportok, mint tesztszervezetek: férges (Smit et al. 2002; Spurgeon & Hopkin 1999), vizibolhák (Muysen & Janssen 2002), kagylók (Klerks & Fraleigh 1997) és csigák (Coourdassier et al. 2003). A vizes élőhelyek biomonitoring vizsgálatára a halak (Brown & Chow 1977) és a kétélűek csoportja alkalmazható. Víztől való függésük és méretük alkalmasá teszi őket, hogy különböző szerveik felhasználásával részletes elemtartalom legyen mérhető.

A Túr és árterületét az 1995-ös romániai nehézfém szennyezés során jelentős nehézfém szennyezés érte (Kocsisné, 1996). Vizsgálatainkhoz egy cinkkel terhelt területet (kishódosi határszélvény) és a terhelés alatt nem álló Miskafoki Holt-Tiszát választottuk. Olyan állatcsoportot jelöltünk ki, amelyek kellően nagy számban fordulnak elő az adott területen. Ezek figyelembevételével választottuk ki a *Rana esculenta* fajkomplexet, amely Magyarországon a többi kétélűhöz hasonlóan védett kategóriába tartozik.

Számos ökotoxikológiai vizsgálat használja a kétélűek közül a békákat gyors tesztekben, mint tesztszervezetek, ezért célkitűzésünk az volt, hogy eredeti élőhelyről származó

kifejlett egyedekről származó mintákban határozzuk meg a cink koncentrációt. Nehézfém akkumulációt vizsgáltak a békák valamennyi fejlődési stádiumában: embriókat kezelték kadmiummal (Herkovits et al. 1997; Perez-Coll & Herkovits 1996), ólommal (Perez-Coll & Herkovits 1990) és alumíniummal (Beattie et al. 1992). Az ebihal stádiumot kadmium (James & Little 2003), ólom, króm és higany (Burger & Snodgrass 1998) felhalmozódás vizsgálatára használták fel. Kifejlett nőstény egyedekben cink akkumuláció útját kísérték végig tartós ökotoxikológiai kísérlettel (Naab et al. 2001).

Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a választott fajkomplex felnőtt egyedei alkalmazhatók-e nehézfém terhelés kimutatására, a szervezetben felhalmozódott zink mennyiségének meghatározásával.

### Anyag és módszer

Egymástól 200 km-re lévő területekről, a Túr árterületéről és a Miskafoki Holt-Tiszáról gyűjtöttük be a vizsgált egyedeket 2005 május végén. A Miskafoki Holt-Tisza Ároktő községhez tartozik. Növényzettel csekély mértékben benőtt, vízminősége megfelelő, ezért „szentély” jellegű vizes élőhely (Békési et al. 2001). A mintavétel időpontjában, többszöri terepbejárás után is mindössze 6 egyedet tudtunk begyűjteni erről a területről. Ennek oka feltehetően a magas vízállás volt, ami miatt a békák nem használták ezt a területet szaporodási helyként. A Túr a Felső-Tisza egyik mellékfolyója, mely egyben határfolyó is. A mintavétel a kishódosi határszelvény árterületén történt, ahol 20 egyedet gyűjtöttünk be.

A mintavételezés mindkét helyen merítőhálóval, az összes észlelt egyed befogásával zajlott. Az állatok befogása mindkét területen az árhullám levonulása után visszamaradt, szaporodási helyként használt kisebb-nagyobb tocsogókból történt. A békák kifejlett stádiumának meghatározásához a szakirodalmi meghatározásokat és leírásokat vettük figyelembe (Dely 1967). Az egyedeken morfológiai jellemzőket mértünk (teljes hossz, végtagok hossza, testtömeg stb.), illetve minden békáról a jobb hátsó láb 3. ujjának 1. ujjpercét levágtuk. A csonkolást szikével végeztük, amit minden vágás előtt alkohollal fertőtleníttünk, majd az érintett ujjakat Betadinnal kezeltük (Green 2001). Az eltávolított ujjperceket műanyag Eppendorf csövekben feldolgozásig fagyasztott állapotban tároltuk. Az összegyűjtött békákból 5 egyedet laboratóriumi vizsgálat céljából elhoztunk, amelyeket kloroformos altatás után műanyag dobozban  $-25^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a laboratóriumi feldolgozásig.

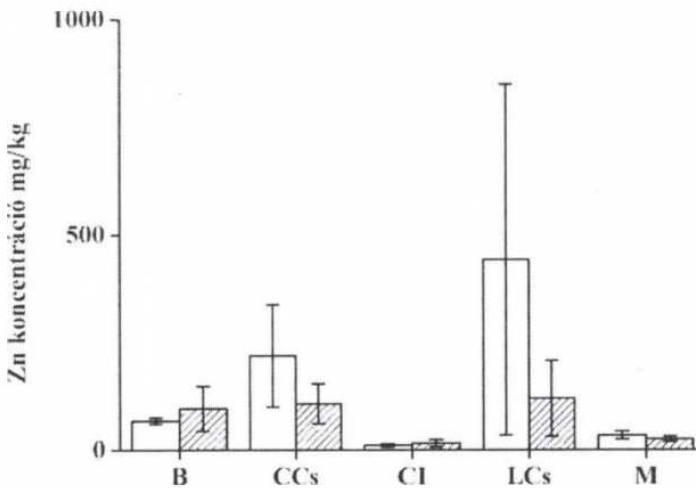
A minta feldolgozás a Debreceni Egyetem Szervetlen Kémiai és Analitikai Tanszék laboratóriumában történt. Miután a fagyasztóból kivett minták hőmérséklete elérte a szobahőmérsékletet, többszöri desztillált vizes öblítést végeztünk. Valamennyi egyed bőrének egy részét, máját, jobb hátsó lábuk combizmát, combcsontját és lábfejsontját kiperarálás után egy éjszakára  $105^{\circ}\text{C}$ -ra szárítószekrénybe helyeztük. A kiválasztott szervekhez viszámerést követően 5 ml 65% (m/m) salétromsavat adtunk, és 4 h keresztül  $80^{\circ}\text{C}$ -on, főzőpohárban ronsoltuk. Ezután az elroncsolt mintákat oldatba vittük és 5 ml végtérfogatra töltöttük fel. Az ujjpercekről 30% (m/m) hidrogén-peroxid oldattal távolítottuk el a kötőszöveti részeket, illetve az inas szerkezetet. Az ujjpercek további kezelése az előzőekben leírt módon történt, a végtérfogat ebben az esetben 2 ml volt.

A szervek cink koncentrációjának meghatározásához szükséges mérést az oldatok tisztes hígításából, illetve az ujjpercek tömény oldatából végeztük UNICAM SP1900 atomabszorpciós spektrofotométerrel 213.9 nm-en, levegő acetilén lángban. Kalibráláshoz 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l Zn koncentrációjú oldatokat használtunk, melyeket 1000 mg/l Zn koncentrációjú Scharlau gyártmányú standard törzsoldatokból készítettünk. A kalcium meghatározást ICP-OES (SPECTROFLAME) SPECTRO gyártmányú készülékkel végeztük. Az ujjpercek elemfeltárásakor mind a cink, mind a kalcium mérésekor impulzus mintabeviteli módszert alkalmaztunk (Braun et al. 1996).

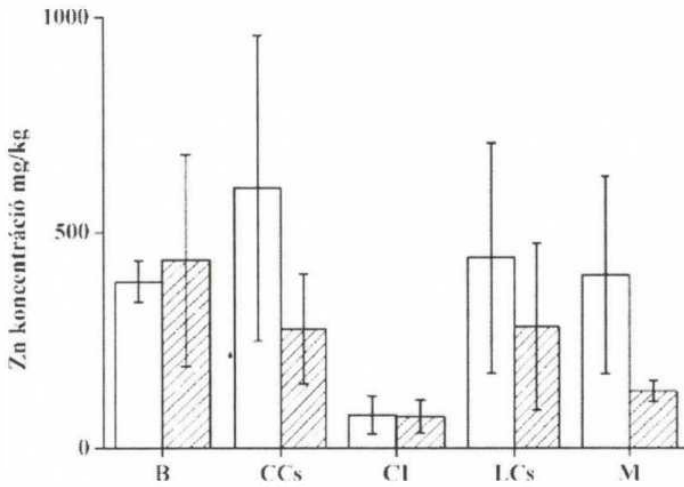
A szervek cink tartalmát nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztel, az ujjpercek cink, és kalcium tartalmát kovariancia-analízissel értékeltük (Dowdy et al. 1983).

### Eredmények

Az elemkoncentrációt nedves (1. ábra), illetve száraztömegre (2. ábra) vonatkoztatva adtuk meg. A Túrnál és a Miskafoki Holt-Tiszánál befogott békák szerveit összehasonlítva a Túr árterületén fogott békák bőrében és combizmában mértünk nagyobb cink koncentrációt. Az összes többi szerv esetében nagyobb cink tartalmat kaptunk a Miskafoki Holt-Tiszáról gyűjtött mintákban. A felhalmozott cink mennyiség Mann-Whitney U-tesztel történő összehasonlításakor, sem a nedves tömegre ( $U=12$ ,  $N=10$ ,  $p=0.917$ ), sem a száraz tömegre ( $U=8$ ,  $N=10$ ,  $p=0.347$ ) vonatkoztatott értékek között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.



**1. ábra.** *Rana esculenta* c. különböző szerveiben mért nedves tömegre vonatkoztatott cink koncentráció átlaga és szórása. Jelölések: üres oszlop – Miskafoki Holt-Tisza, ferden sávzott oszlop – Túr árterülete. B=bőr, CCs=combesont, CI=combizom, LCs=lábfejsont, M=máj.

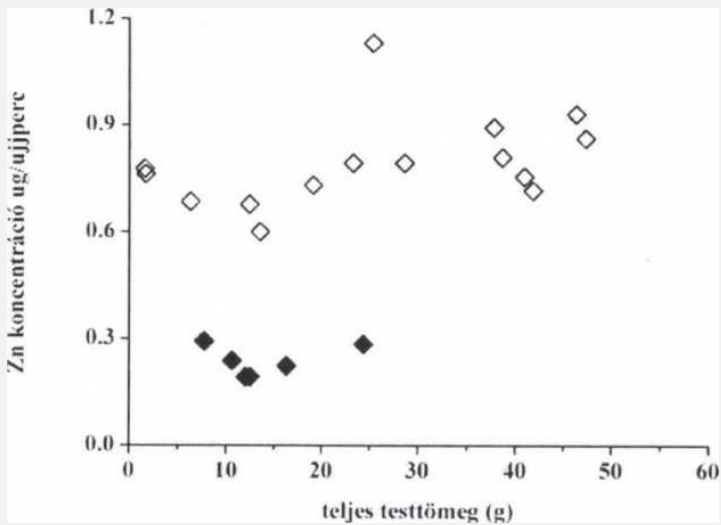


**2. ábra.** *Rana esculenta* c. különböző szerveiben mért száraz tömegre vonatkoztatott cink koncentráció átlaga és szórása. Jelölések: üres oszlop – Miskafoki Holt-Tisza, ferdén sávzott oszlop – Túr árterülete. B=bőr, CCs=combsont, CI=combizom, LCs=lábfejcsont, M=máj

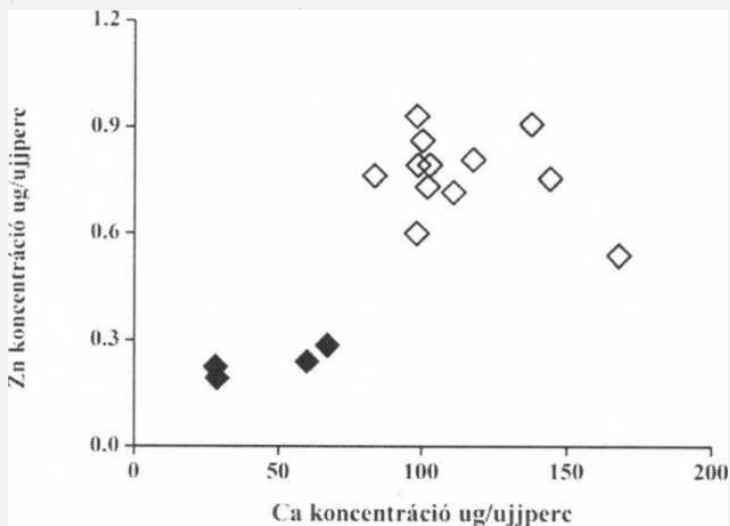
Az ujjpercek alapján történő elemzés tükrözi a két terület cink terhelésében meglévő különbséget, amit kovariancia-analízissel értékeltünk ( $p < 0.05$ ,  $F = 97,318$ ,  $df = 19$ ,  $p < 0.05$ ,  $F = 37,424$ ,  $df = 13$ ). Az ujjpercek, mint reprezentatív mintának az értékelése a teljes testtömeg függvényében (3. ábra), és a mért kalcium koncentráció függvényében (4. ábra) történt. Erre az értékelési módra azért volt szükség, mert az ujjpercek tömege kicsi volt ( $< 0.0005$  g), ezért ez az értékelés megbízhatóbb, mintha száraz tömegre vonatkoztatjuk.

### Értékelés

Vizsgálataink során az általunk kiválasztott két területről begyűjtött egyedek szervei között különbséget nem találtunk, korábbi vizsgálatok eredményeihez hasonlóan (Naab et al. 2001). A bőrben és izomban mért cink koncentrációkat összevetve korábbi vizsgálatokkal, hasonló eredményeket kaptunk (Bowness & Morton 1951, Puky & Oertel 1987). A csontra vonatkozó adatokat összehasonlítva korábbi (Loumbourdis 1998) vizsgálatok értékeivel, kisebb cink koncentrációt kaptunk. Esetünkben a kiválasztott fajkomplex egyedek védett kategóriába tartoznak, aminek következtében korlátozott mintaszámmal tudunk dolgozni, amely a nem szignifikáns eredményt okozhatta, mivel a kis mintaszám megnöveli a statisztikai döntés bizonytalanságát.



3. ábra. *Rana esculenta* c. ujjperceiben mért cink koncentráció ( $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$ ) a teljes testtömeg függvényében. Jelölések: kitöltött szimbólum – Miskafoki Holt-Tisza, üres szimbólum – Túr árterülete.



4. ábra. *Rana esculenta* c. ujjperceinek cink koncentráció ( $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$ ) a mért kalcium koncentráció ( $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$ ) függvényében. Jelölések: kitöltött szimbólum – Miskafoki Holt-Tisza, üres szimbólum – Túr árterülete.

Az ujjperc levágás egy standard módszer az állatok egyedi jelölésére az ökológiai kutatásokban (Funk & et al. 2005). A levágandó ujjpercek kombinációival az egyedek azonosíthatók (May 2004). A módszernek többnyire negatív hatása nincs az állat további életére, viszont a minták kicsi mérete miatt a statisztikai különbségekből levonható következtetések nem mindig helytállóak (Parris & McCarthy 2001). Az ujjpercek cink koncentrációit a békák teljes testtömegének és az ujjpercben mért kalcium koncentráció függvényében fejeztük ki. Mindkét esetben a két terület cink terhelésében különbséget tapasztaltunk.

Számos tanulmány arra utal, hogy a kétéltűeket érintő negatív környezeti hatások okozhatnak végtagi fejlődési rendellenességeket, melyek csökkenthetik az egyedek túlélési esélyeit, ragadozói és menekülési képességeiket (Puky & Fodor 2002). Vizsgálataink során, a szervek kipreparálásakor szemmel látható szervi elváltozásokat nem tapasztaltunk. Korábbi vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a különböző fejlődési stádiumok közül valószínűleg az embrió állapot a legérzékenyebb a nehézfém szennyezésekre (Herkovits et al. 1997). Ezen belül is a leginkább akkumulációra képes stádium a neurola állapot, a korai organogenezis folyamán (Herkovits & Perez-Coll 1993). Ökotoxikológiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a legmérgezőbb fém békák esetében a kadmium, amely embriókban fejlődésben visszamaradott méretet, abnormális fejlődésű farkat, szemet, és csökkent mértékű pigmentáltságot okoz. Bioakkumuláció vizsgálatra a kifejlett egyedek teljesen alkalmasak. Számos tanulmány utal arra, hogy mind az embrionális (Beattie et al. 1992; Herkovits et al. 1997; Perez-Coll et al. 1990, 1996), mind a lárvális állapot (Burger & Snodgrass 1998; James & Little 2003) tekinthető bioindikációs vizsgálatokra alkalmas fejlődési stádiumnak a kétéltűek egyedfejlődése során.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Túr folyó cink terhelése a kétéltűekre sem közvetve, sem közvetlenül nem jelent veszélyt. Módszerünk továbbfejlesztése, toxikológiai vizsgálatokkal kiegészítve a kétéltűek védelmét szolgáló természetvédelmi intézkedésekhez nyújthat segítséget.

\*

Köszönetnyilvánítás – Köszönetünket fejezzük ki a Hortobágyi Nemzeti Park Igazgatóságának, hogy vizsgálataink elvégzését területeiken lehetővé tették. Köszönettel tartozunk Dr. Puky Miklósnak a hazai és külföldi szakirodalom beszerzésében nyújtott segítségéért és értékes tanácsaiért.

## Irodalomjegyzék

- Beattie, R. C., Tyler-Loves, R. & Baxter, M.J. (1992): The effect of pH, aluminium concentration and temperature of embryonic development of the European common frog, *Rana temporaria*. – *Zool. Lond.* **228**: 557–570.
- Békési, I., Boga, T. L., Csiszár, L., Czédli, J., Horváth, Cs., Klingl, B., Nagy, G., Papanek, L., Pálfi, I., Pecze, J., Sajben, A., Solymos, K. & Vörös, B. (2001): Magyarország holtágai. Közlekedési és Vízügyi Minisztérium, Budapest. pp. 106.
- Bowness, J. M. & Morton, R. A. (1951): Distribution of copper and zinc in the eyes of fresh-water fishes and frogs. Occurrence of metals in melanin fractions from eye tissues. – *Biochemical Journal.* **51**: 530–535.
- Braun, M., Posta, J. & Löki, A. (1996): Kis térfogatú minták automatizált impulzus mintabeviteli módszerének kidolgozása atomabszorpciós és ICP atomemissziós spektrométerekhez. – *XXXIX. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Mosonmagyaróvár*, 71–74.
- Brown, J. R. & Chow, L. Y. (1977): Heavy metal concentrations in Ontario fish. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 190–195.
- Burger, J. & Snodgrass, J. (1998): Heavy metals in bullfrogs (*Rana catesbeiana*) tadpoles: effects of depuration before analysis. – *Environ. Toxicol. Chem.* **11**: 2203–2209.
- Coeurdassier, M., De Vauflery, A. & Badot, P. M. (2003): Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**: 102–109.
- Dely, O. Gy. (1967): Kétéltűek. – *Fauna Hungariae*, **20**: 1–80.
- Dowdy, S. & Wearden, S. (1983): *Statistics for Research*. – West Virginia University pp. 363–380.
- Funk, W. C., Donnelly, M. A. & Lips, K. R. (2005): Alternative views of amphibian toe-clipping. – *Nature*. 433:193.
- Green, E. D. (2001): Toe-Clipping of frogs and toads. Amphibian Research and Monitoring Initiative. – [www.nwhc.usgs.gov/research/amph\\_dc/sop\\_toeclip.html](http://www.nwhc.usgs.gov/research/amph_dc/sop_toeclip.html) 2004.
- Herkovits, J. & Perez-Coll, C.S. (1993): Stage-dependent susceptibility of *Bufo arenarum* embryos to cadmium. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**: 608–611.
- Herkovits, J., Cardellini, P., Pavanati, C. & Perez-Coll, C. S. (1997): Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. – *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 312–316.
- James, S. M. & Little, E. E. (2003): The effects of chronic cadmium exposure on american toad (*Bufo americanus*) tadpoles. – *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 377–380.
- Klerks, P. L. & Fraleigh P. C. (1997): Uptake to nickel and zinc by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**: 191–197.
- Kocsis Gáborné (szerk.) (1996): Szervetlen mikroszennyezők okozta terhelések felmérése a Túr folyó magyarországi szakaszán és a Túr belvízrendszeren. A vízi élőlény együttesekben történő nehézfém akkumulációk vizsgálata, különös tekintettel a Szatmár-Bereg Tájvédelmi körzet térségére. Kutatási téma zárójelentése, Nyíregyháza, pp. 1–185.
- Loumbourdis, N. S. (1997): Heavy metal contamination in a lizard, *Agama stellio stellio*, compared in urban, high altitude and agricultural, low altitude areas of North Greece. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**: 945–952.

- May, R. M. (2004): Ethics and amphibians. – *Nature*. 431:404.
- Muysen, B. T. A. & Janssen, C. R. (2002): Accumulation and regulation of zinc *Daphnia magna*: links with homeostasis and toxicity. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 492–496.
- Naab, F., Volcomirsky, M., Burlón, A., Caraballo, M. E., Debray, M., Kesque J. M., Kreiner, A. J., Ozafrán, M. J., Schuff, J. A., Stoliar, P., Vázquez, M. E., Davidson, J. & Fonovich de Schroeder, T. M. (2001): Metabolic alterations without metal accumulation in the ovary of adult *Bufo arenarum* females, observed after long-term exposure to Zn, followed by toxicity to embryos. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 201–207.
- Parris, K. M. & McCarthy, M. A. (2001): Identifying effects of toe-clipping on anuran return rates: the importance of statistical power. – *Amphibia-Reptilia* 22: 275–289.
- Perez-Coll, C. S. & Herkovits, J. (1990): Stage-dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. – *Env. Poll.* 63: 239–245.
- Perez-Coll, C. S. & Herkovits, J. (1996): Stage-dependent uptake of cadmium by *Bufo arenarum* embryos. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56:663–669.
- Puky, M. & Oertel, N. (1987): Schwermetallakkumulation in froschen, die in mit donauwasser gespeisten fischeichen leben. – 26. Arbeitstagung der IAD, Passau/Deutschland, Wissenschaftliche Kurzreferate pp. 56–60.
- Puky, M. & Fodor, A. (2002): Occurrence of amphibian deformities along the Hungarian section of the river Danube, Tisza and Ipoly. – *Internat. Assoc. Danube Res.* 34: 845–852.
- Smit, C. E., Schouten, A. J., Van den Brink, P. J., Esbroek, M. L. P. & Posthuma L. (2002): Effects of zinc contamination on a natural Nematoda community in outdoor soil mesocosms. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 205–216.
- Spurgeon, D. J. & Hopkin, S. P. (1999): Tolerance to zinc in populations of the earthworm *Lumbricus rubellus* from uncontaminated and metal-contaminated ecosystems. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 332–337.



## Zinc monitoring on adults of *Rana esculenta* complex

<sup>1</sup> Edina Simon, <sup>2</sup> Mihály Braun, <sup>3</sup> Krisztián Szabó, <sup>1</sup> Péter Molnár, <sup>1</sup> Béla Tóthmérész

<sup>1</sup> Department of Ecology, University of Debrecen,  
H-4010 Debrecen, P. O. Box 71, Hungary

<sup>2</sup> Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Debrecen,  
H-4010 Debrecen, P. O. Box 21, Hungary

<sup>3</sup> Biological Research Center of Hungarian Academic Institute of Genetics,  
H-6701 Szeged,  
Temesvári Boulevard 62, Hungary

**Abstract:** Concentration of zinc was examined on adults of *Rana esculenta* complex. Frogs were caught from two locations: the Túr river and an oxbow lake, called Miskafoki Holt-Tisza. The Túr river in North-East Hungary was contaminated with heavy metals, especially zinc, resulted in by mining activities. Zinc concentration was measured in the skin, thigh-bone, thigh-muscle, foot-bone, liver and frogs' toes. There were no statistically significant difference in the zinc concentration in the skin, thigh-bone, thigh-muscle, foot-bone, and liver between the studied populations. The zinc concentration was significantly higher in the toes of the frogs in the Túr (mean  $\pm$  SD: Túr  $0.8 \pm 0.13$   $\mu\text{g}/\text{toe}$ , Miskafoki Holt-Tisza  $0.24 \pm 0.04$   $\mu\text{g}/\text{toe}$ ). Our results suggest that the level of zinc concentration is probably not harmful to the frog populations.

**Key-words:** amphibians, zinc accumulation, Túr, Miskafoki Holt-Tisza

