

Cink monitorozás *Rana esculenta* fajkomplex egyedeinek vizsgálatával

¹Simon Edina, ²Braun Mihály, ³Szabó Krisztián, ¹Molnár Péter, ¹Tóthmérész Béla

¹Debreceni Egyetem, Ökológiai Tanszék
4010 Debrecen, Pf. 71., e-mail: edina.simon@gmail.com

²Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
4010 Debrecen, Pf. 21.

³MTA 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 vízanalitikai 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, lábfejsont, 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 ± 0.13 $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$, Miskafoki Holt-Tisza 0.24 ± 0.04 $\mu\text{g}/\text{ujjperc}$). Eredményeink arra utalnak, hogy a Túr folyó vizsgált szakaszán a szennyezettség mértéke nem jelent közvetlen veszélyt a kétéltűek számára.

Kulcsszavak: cink akkumuláció, kecskebéka, kétéltűek, Miskafoki Holt-Tisza, Túr

Bevezetés

A nehézfémek akkumulációjának vizsgálatára széles körben elterjedtek a különböző gerinctelen csoportok, mint tesztszervezetek: férgek (Smit et al. 2002; Spurgeon & Hopkin 1999), vizibolhák (Muyssen & Janssen 2002), kagylók (Klerks & Fraleigh 1997) és csigák (Coourdassier et al. 2003). A vizes élőhelyek biomonitöring vizsgálatára a halak (Brown & Chow 1977) és a kétéltűek csoportja alkalmazható. Vízről 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 kétéltűhöz hasonlóan védett kategóriába tartozik.

Számos ökotoxikológiai vizsgálat használja a kétéltűek 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 nőtény 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 határszélvény árterületén történt, ahol 20 egyedet gyűjtöttünk be.

A mintavételezés mindkét helyen merítőhálójával, 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 morfometriai 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°C -on tároltuk a laboratóriumi feldolgozásig.

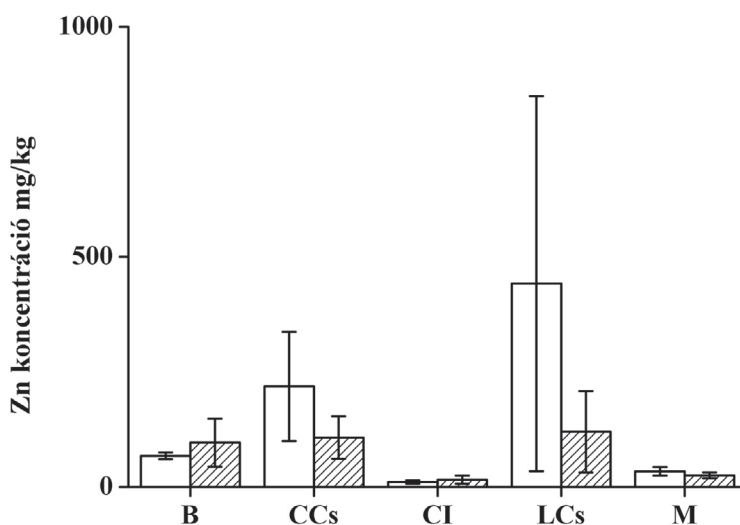
A minta feldolgozás a Debreceni Egyetem Szervetlen Kémiai és Analitikai Tanszék laboratóriumában történt. Miután a fagyasztóból kivett minták hőmérséklete elérte a szobahőmérsékletet, többszöri desztillált vizes öblítést végeztünk. Valamennyi egyed bőrének egy részét, máját, jobb hátsó lábuk combizmát, combcsontját és lábfejsontját kipreparálás után egy éjszakára 105°C -ra szárítószekrénybe helyeztük. A kiválasztott szervekhez viszámerést követően 5 ml 65% (m/m) salétromsavat adtunk, és 4 h keresztül 80°C -on, főzőpohárban roncsoltuk. 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 tízszeres 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).

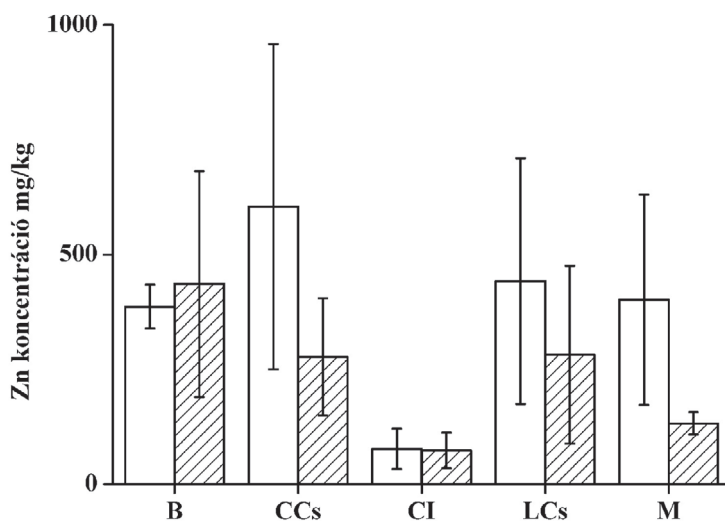
A szervek cink tartalmát nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztel, az ujjpercek cink, és kalcium tartalmát kovariancia-analízissel értékeltük (Dowdy et al. 1983).

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, ferdén sávozott oszlop – Túr árterülete. B=bőr, CCs=combsont, CI=combizom, LCs=lábfejsont, M=máj.

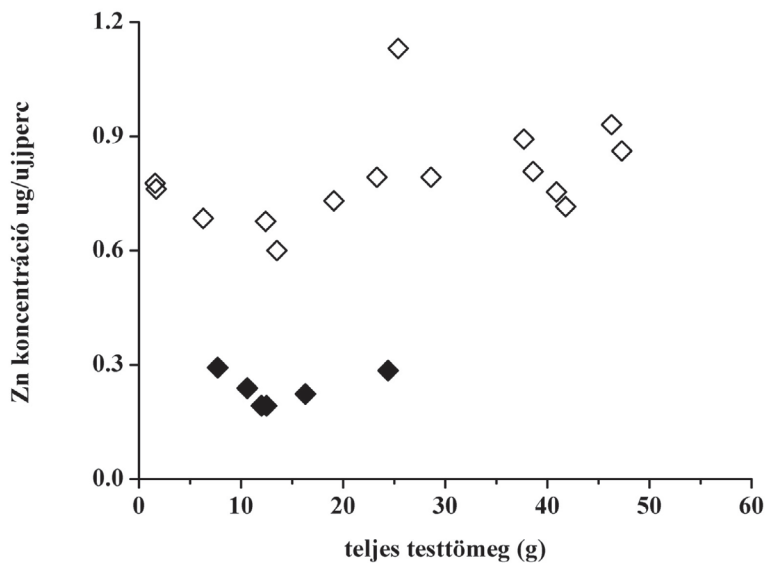


2. ábra. *Rana esculenta* c. különböző szerveiben mért száraz tömegrre vonatkoztatott cink koncentráció átlaga és szórása. Jelölések: üres oszlop – Miskafoki Holt-Tisza, ferdén sávózott oszlop – Túr árterülete. B=bőr, CCs=combsont, CI=combizom, LCs=lábfejsont, M=máj

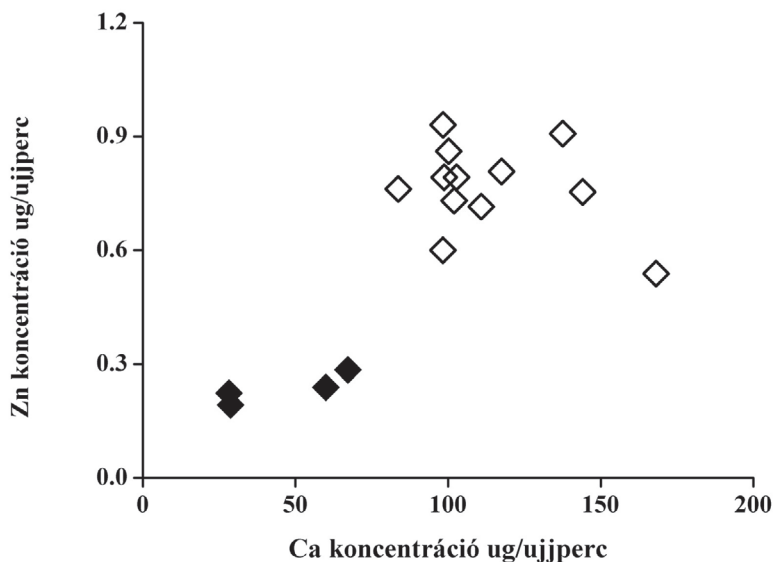
Az ujjpercek alapján történő elemzés tükrözi a két terület cink terhelésében meglévő különbséget, amit kovariancia-analízissel értékeltünk ($p < 0.05$, $F = 97,318$, $df = 19$, $p < 0.05$, $F = 37,424$, $df = 13$). Az ujjpercek, mint reprezentatív mintának az értékelése a teljes testtömeg függvényében (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 tömegrre 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 egyedei 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., Pálfai, 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 2004.
- Herkovits, J. & Perez-Coll, C.S. (1993): Stage-dependent susceptibility of *Bufo arenarum* embryos to cadmium. – *Bull. Environ. 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

¹ Edina Simon, ² Mihály Braun, ³ Krisztián Szabó, ¹ Péter Molnár, ¹ Béla Tóthmérész

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

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

³ 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 ± 0.13 $\mu\text{g}/\text{toe}$, Miskafoki Holt-Tisza 0.24 ± 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