

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Analysis of environmental load based on the elemental contents of individuals

Környezeti terhelés vizsgálata egyedi elemtartalom alapján

Simon Edina

Témavezető

Dr. Tóthmérész Béla

Dr. Braun Mihály



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2010

1. Bevezetés

1. 1. Analitikai módszer fejlesztés a környezetterhelés vizsgálatára

Az indikátor szervezetek alkalmazása környezetterhelést vizsgáló tanulmányokban az elmúlt évtizedben jelentősen megnőtt (Clark, 1993; Dallinger, 1994; Herkovits and Helguero, 1998). A környezetvédelmi kutatásokhoz szükséges környezetkémia analitikai kémiai része jól fejlett és a rendelkezésre álló módszerekkel a kis koncentrációban jelenlévő elemek tanulmányozására is lehetőség van. Mikroanalitikai módszerrel mikrogramm mérettartományba tartozó minták elemanalitikai vizsgálatát lehet elvégezni, amellyel populáció szinten történő elemanalitikai vizsgálatokra van lehetőség. Ezáltal a kis tömegű gerinctelen szervezetek egyedenként elemezhetők, nem szükséges átlagmintával dolgozni. Ugyanakkor a mikroanalitikai módszer másik előnye, hogy gerinceseken akár ujjperc (Simon et al., 2010) vagy madártoll (Vallner et al. 1999) vizsgálatára is alkalmas, amely élő állatokon is elvégezhető, így nem jár az élőlények elpusztításával.

1. 2. Rovarok, mint bioindikátor szervezetek

A rovarok sokféleségük, nagy egyedszámban való megjelenésük miatt fontos szerepet játszanak a szárazföldi környezetben (Zödl & Wittmann, 2003). A gerincteleneket széles körben alkalmazzák bioindikátor szervezetekként környezeti tanulmányokban. (Lindqvist & Block, 1997). Élőhelyük szoros kapcsolatban van a talajjal (Nakamura et al., 2005), és akumulálhatják az élőhelyeiket ért szerves és szerves toxikus komponenseket. Életciklusuk rendszerint rövid és könnyen gyűjthetőek, ezért alkalmasak bioindikátor szervezetnek a környezetszennyezések vizsgálatára (Zödl & Wittmann, 2003).

Különböző módszereket alkalmaznak szárazföldi gerinctelenek gyűjtésére. A kézi gyűjtés a legmegfelelőbb gyűjtési mód az elemanalitikai vizsgálatokhoz, de ez nem kellően hatékony vagy reprezentatív (Leather, 2005). A talajcsapdázás egy egyszerű és széles körben alkalmazott módszer talajlakó rovarok gyűjtésére. Ez a módszer olcsó, könnyű használni, amely nagyszámú és fajgazdag rovar mintákat eredményez. Különböző anyagok alkalmazhatók a csapdában, mint ölüanyag, például: etanol (Nakamura & Taira, 2005) és formalin (van den Berghe, 1992; Eichinger et al., 2007). A leggyakrabban etilén-glikolt

használnak élő anyaggként a csapdában, főként hagyományos fagyálló formájában (Suarez et al., 2000). Az ökológia vizsgálatokban tartósítószerként leggyakrabban etanolt és formalint használnak. Habár, mind a csapdázásra és tartósításra használt anyagok hatékonyságának vizsgálata elég széles, ezen anyagoknak a rovarminták elemösszetételére kifejtett hatása kevésbé kutatott.

1. 3. Békák és varangyok bioindikátor szervezetként való alkalmazása ujjperceik révén

Számos tényező okozza a kétéltű populációk globális szintű csökkenését. Ezek a következők lehetnek: élőhely csökkenés és fragmentáció (Beebee & Griffiths, 2005), ultraibolya sugárzás és szennyezések (Blaustein et al., 2003), klímaváltozás és betegségek (Pounds et al., 2006). A kétéltűek valamennyi fejlődési szakaszukban vízhez kötődnek, ezért különösen érzékenyek lehetnek az élőhelyeiket ért szennyezésekre (Rowe et al., 1998). Jelezhetik a szennyezések közvetlen és közvetett hatásait. A békákat és varangyokat egyre inkább alkalmazzák bioindikátorokként a szennyezések akkumulációját vizsgáló tanulmányokban (Loumbourdis et al., 2007). Ezáltal az elemanalitikai vizsgálatok, különösen a nehézfémek vizsgálata kétéltűekben egyre nagyobb figyelmet kap (Herkovits & Helguero, 1998; Stolyar et al., 2008).

Az ujjperc levágás általánosan alkalmazott módszer egyedek jelölésére, különösen békák és varangyok esetében (McCarthy & Parris, 2004). Ez egy egyszerű, biztonságos módszer, amely genetikai (Noonan & Gaucher, 2006), szövettani vizsgálatokra (Boyle et al., 2004) vagy kétéltűek szkeletokronológiás kormeghatározására (Castanet & Smirina, 1990) alkalmas. Összegezve, az ujjperc levágás olyan módszer, amely nem jár komoly negatív hatással a békák és varangyok további életére (Hartel & Nemes, 2006).

2. Célkitűzések

Kutatásaim céljai a következők voltak:

- (1) Rovar minták elemanalitikai vizsgálatához axiális leképezésű induktív csatolású optikai emissziós spektrométriái módszerfejlesztés ultrahangos porlasztóval (ICP-OES-USN), amely alkalmas rovarok egyedenkénti elemösszetételének vizsgálatára. A módszer fejlesztés során a robosztus plazma paramétereiket, kimutatási határokat,

spektrális zavarásokat vizsgáltuk, illetve standard oldatok mintaként való elemzését és standard addíciós vizsgálatot végeztünk.

- (2) Csapdázó és tartósító folyadék hatásának vizsgálata a rovar minták testtömegére és elemösszetételére.
- (3) Különböző minőségű etilén-glikol hatásának vizsgálata rovarminták testtömegére és elemösszetételére.
- (4) Az ujjperc által reprezentált csontok vizsgálata elemösszetétel alapján.
- (5) Városiasodás hatásának vizsgálata béka ujjpercek elemösszetétele alapján.

3. Anyag és módszer

3.1. ICP-OES-USN módszer mérési körülményeinek optimalálása

Az analitikai módszer kifejlesztése során ICP-OES IRIS Intrepid II XSP Duo típusú, Thermo gyártmányú készüléket és CETAC 4500 AT⁺ típusú ultrahangos porlasztót és deszolváló rendszert használtunk. A készüléken elvégeztük a mérési paraméterek optimalálását, amelyek készülékfüggőek. Kalibráláshoz 0,001; 0,005; 0,01; 0,5; 1,0 mgL⁻¹ multi-elemes kalibrációs oldatot (Merck ICP multielement standard solution IV) használtunk. Az analitiki módszerfejlesztéshez az egyes elemeknek 4 vagy 5 atom vagy ionvonalát használtuk. Egyes alkálifémek esetében (Li, Na és K) egy színkép vonalat használtunk. A kiválasztott színkép vonalak esetében spektrális zavarást nem tapasztaltunk.

A robusztus plazmaparaméter meghatározás Mg II 280,270 nm atom /Mg I 285,213 nm ion vonalának intenzitás hányadosa alapján történt 0,1 mg/l magnézium koncentrációjú oldat mérésével Mermet (1991) ajánlása alapján. A gerjesztési energia beállítása 850, 950, 1150, 1250 és 1350 W között, míg a mintagáz nyomása 15, 20, 25, 30, 35, 40 és 45 psi között volt, és ezek kombinációját randomizálást alkalmazva állítottuk sorrendbe. A kimutatási határokat 10 párhuzamos mérés 3 szigma értékei alapján határoztuk meg, figyelembe véve a Mg II 280,270 nm atom /Mg I 285,213 nm ion vonalak intenzitási hányadosát. A standard addíciós vizsgálat során a bodobács egyedekből készített homogenizátumhoz a vizsgált elemeket ismert mennyiségben adtuk hozzá. Az eredmények értékelésekor a várt és a mért koncentrációkat hasonlítottuk össze. A módszer ellenőrzésére az addíciót mátrix nélkül is elvégeztük, és a standard oldatokat mintaként roncsoltuk és mértük.

3.2. Verőköltő bodobácsok (*Pyrrhocoris apterus*)

Kifejlett verőköltő bodobácsokat kézzel gyűjtöttünk vizsgálatainkhoz 2008 májusában a Debreceni Egyetem Campusán. Összesen 100, 250 és 450 élő egyedet gyűjtöttünk polietilén kémcsövekbe. Az egyes kémcsövek tartalma 10 egyed volt. Fagyasztva ölést alkalmaztunk - 18 °C-on. A mérési körülmények optimalizálásához szükséges kísérletben verőköltő bodobács homogenizátum lett készítve. A további kísérletekben a kontrol minták fagyasztva voltak tárolva a mintafeldolgozásig. A többi minta esetében csapdázó és tartósító anyag hatásának vizsgálatához a következő kezeléseket alkalmaztuk: 2 hetes etilén-glikolos, 1 hónapos etilén-glikolos, 2 hetes etilén glikolos + 2 hetes etanolos és 1 hónapos etilén-glikolos + 1 hónapos etanolos kezelés. Kezelésként 20 egyedet elemeztünk. A különböző minőségű etilén-glikolok hatásának vizsgálatához szintén 2 hetes és 1 hónapos kezeléseket alkalmaztunk.

3.4. Békák és varangyok

A *Rana esculenta* fajkomplex egyedek begyűjtésére 2007-ben került sor. A mintavételi hely a Nagyerdei Békás-tó volt (47°33' N, 21°37' E), Debrecenben. A város középpontjába található élőhely jelentős közlekedési forgalomnak és egyéb antropogén hatásnak van kitéve (termálfürdő befogadó hely). Kézi hálóval 10 egyedet gyűjtöttük. A laboratóriumba szállítást követően kloroformos altatást végeztünk. Valamennyi nagy csontot (skull, spinal, femur, tibiafibula, tarsal bones, metatarsus, humerus és hátsó és mellső ujjak) hidrogén-peroxidba helyeztük, tisztítás céljából. A hidrogén-peroxid elemösszetételre kifejtett hatását a femur csontokon teszteltük. A jobb femur csont a többi csonthoz hasonlóan 5 napig, míg a bal femur 8 napig ázott a hidrogén-peroxidban. Ezt a tisztítási módszert alkalmaztuk az ujjpercek esetében, de itt az áztatás időtartama 2 nap volt.

A *Bufo bufo* ujjpercek mintavételezésére 2007 tavaszán került sor, szaporodási periódusuk idején 3 különböző területről: Garancsi-tó (43°37'N, 18°48'E) (N=21), Naplás-tó (47°30'N, 19°14'E) (N=5) és a Debreceni Nagyerdei Békás-tó (47°33'N, 21°37'E) (N=11). Előbbiek természetközeli, utóbbi városi területnek sorolható be a területek jellemzése alapján. A két természetközeli élőhelyről elpusztult egyedek ujjperceit gyűjtöttük.

A városi területről a kifejlett varangy egyedeket kézi hálóval gyűjtöttük. A csontolást rozsdamentes sebészi szikével végeztük, amit minden vágás előtt alkohollal fertőtleníttünk, majd az érintett ujjakat Green (2001) ajánlásainak megfelelően kezeltük. Az eltávolított

ujjperceket műanyag Eppendorf csövekben feldolgozásig fagyasztott állapotban tároltuk. Az ujjpercekről az előző részben leírt hidrogén-peroxidos tisztítással távolítottuk el a kötőszöveti részeket.

3.6. Mintafeldolgozás

Valamennyi minta esetében a nedves tömeg mérésére azonnal sor került. A mintákat egy éjszakára 105 °C-ra szárítószekrénybe helyeztük, majd visszamérést követően határoztuk meg a száraz tömeget. A nagyobb béka csontok és bodobácsok tömegének méréséhez PRECISA 240A analitikai, míg az ujjpercek tömegméréséhez SATORIUS LE 26P analitikai mikromérleget használtunk. Ezt követően a mintákhoz 2 ml 65% (m/m) salétromsavat adtunk, és 4 h keresztül 80 °C-on, főzőpohárban roncsoltuk, majd az elroncsolt mintákat oldatba vittük és 20 (ujjpercek és bodobács), 50 (bodobács) és 100 (nagy béka csontok) ml végtérfogatra töltöttük fel. A vizsgált csapdázó és tartósító szerek feltárása során meghatározott mennyiségben szárazra pároltuk a mintát, majd salétromsavas roncsolást alkalmaztunk az előbbieken leírtak szerint.

3.6. Adatfeldolgozás

A statisztikai értékeléseket SPSS/PC+ és R programcsomagokkal végeztük. A varianciák homogenitását Levene próbával értékeltük. A különböző területeknek a varangy ujjpercek elemösszetételére kifejtett hatását, valamint az etilén-glikolnak és az etanolnak bodobácsok elemösszetételre kifejtett hatásának elemzésére kanonikus diszkriminancia analízist (CDA) és egyutas ANOVA-t alkalmaztunk. Azokban az esetekben, ahol szignifikáns különbséget tapasztaltunk Tukey összehasonlító tesztet végeztünk. A kecskebéka egyedek csontjainak vizsgálata során lineáris regressziót és *t* próbát alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1. Analitikai módszerfejlesztése rovarminták elemzéséhez

A módszer robusztus plazma körülményeinek meghatározásához a magnézium 280,270 nm-es ion (MgII) és 285,213 nm-es atom (MgI) vonalának intenzitás arányait használtuk fel. A kedvező MgII/MgI >8 tartomány viszonylag tág határok között elérhető. Az elemzésekhez 17 elem 64 színeképvonalát választottuk ki. A színeképvonalak kiválasztásánál az alábbiakat vettük figyelembe: kimutatási határok eltérő MgII/MgI intenzitás arányok mellett, spektrális zavarás. A legkisebb kimutatási határokat a kedvező MgII/MgI >8 tartományban kaptuk, melyek a következők mg L⁻¹-ben kifejezve: Ba: 0,006; Ca: 0,008; Cd: 0,001; Co: 0,004; Cr: 0,002; Cu: 0,003; K: 0,003; Li: 0,002; Mg: 0,001; Mn: 0,001; Na: 0,002; Ni: 0,004; Pb: 0,013; Sr: 0,002 és Zn: 0,003. A kiválasztott színeképvonalak esetében spektrális zavarást nem tapasztaltunk egyik elem esetében sem. A standard oldatok mintaként történő elemzések során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a várt és mért elemkoncentráció között. A standard addíciós vizsgálat során valamennyi elem esetében a standard oldatok visszamérésekor kapott eredmények megegyeztek a várt értékekkel. A standard addíció során szintén nem tapasztaltunk különbséget a homogenizátum és az addíciónált minták elemtartalma között. Eredményeink bizonyítják, hogy zavaró hatásokkal nem kellett számolnunk a mérések során. A módszer alkalmasnak bizonyult kistömegű rovarok egyedenkénti elemzésére, ezáltal lehetőség nyílik a rovarpopulációk elemösszetételbeli variabilitásának vizsgálata.

4.2. Csapdázó és tartósítószer hatásának vizsgálata bodobácsok testtömegére és elemösszetételére

Az elemkoncentrációk vizsgálata során a vonatkoztatási alap a nedves és/vagy száraz tömeg, ezért fontosnak tartottuk a csapdázó és tartósító folyadékok tömegekre kifejtett hatásának vizsgálatát. Eredményeink azt mutatják, hogy a 2 hetes etilén-glikolos kezelés 26 %-os, a 4 hetes pedig 37 %-os nedves tömeg növekedést eredményezett a kontrolhoz képest. A száraz tömegeket elemezve a 4 hetes etilén-glikolos + 4 hetes etanolos kezelés szignifikánsan kisebb száraz tömeget eredményezett a kontrolhoz képest.

Az alábbi elemek kerültek kiértékelésre: Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr és Zn. Összehasonlítva a kezelt egyedek elemösszetételét a kontrol egyedekével, szignifikáns különbséget tapasztaltunk valamennyi elem esetében, kivéve a Mg-ot és Zn-et. Egyes elemek (K) kioldódhatnak, míg mások (Ca, Sr, Mn és Na) feldúsulhatnak a rovar szövetekben.

Eredményeink azt mutatják, hogy az etilén-glikollal csapdázott egyedek elemösszetételét elemanalitikai vizsgálatok során óvatosan kell kezelni, különös tekintettel a makroelemekre (Ca, Na és K). Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a rovarokat bioindikátor szervezetként alkalmazó tanulmányokban az élve fogó csapdázás, illetve az etanol jelentős tömegcsökkentő hatása miatt pedig a fagyasztva tárolás lehet a legmegfelelőbb módszer.

4.3. Különböző minőségű etilén-glikolok hatása bodobácsok testtömegére és elemösszetételére

A mintákban a következő elemeket vizsgáltuk: Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr és Zn. Vizsgálataink során az etilén-glikolos kezelés után szignifikáns nedves és száraz tömeg növekedést tapasztaltunk valamennyi glikolos kezelés során. Az elem koncentrációkat eredeti nedves tömegre, kezelés utáni nedves tömegre, mért és becsült száraz tömegre vonatkoztattam.. Szignifikáns különbséget tapasztalunk valamennyi elem koncentrációjában, amennyiben a vonatkoztatási alap mért száraz tömeg volt. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az elem koncentrációk összehasonlításában, amikor a vonatkoztatási alap az eredeti nedves tömeg és a becsült száraz tömeg volt. Megállapítható, hogy az alkalmazott glikolos kezelések tömegnövekedést eredményeznek, ezáltal torzulnak a gerinctelenek elemanalitikai vizsgálatainak eredményei.

A különböző minőségű glikolokban mért elemkoncentrációk alapján kiszámoltuk a szulfát hamu tartalmukat, amely valamennyi jelenlévő össz szervetlen szennyezőt fejezi ki. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az analitikai és puriss minőségű etilén-glikol elemtartalma a minősítő nyomtatványban megadott értéket nem haladta meg. A különböző minőségű glikolok szulfát hamu tartalma alapján történő összehasonlítása alapján a következő rangsor állítható fel minőségi szempontból: analitikai, puriss, technikai, hagyományos fagyálló. Eredményeink azt mutatják, hogy valamennyi glikol esetében hasonló mértékű tömegnövekedést tapasztaltunk, és a vonatkoztatási alap megváltozása torzítja a bodobácsok elemösszetételére kapott elem koncentrációkat.

4.4. Béka csontváz elemanalitikai vizsgálata

A nagyobb tömegű csontok elemösszetételének vizsgálatakor a következő elemeket értékeltük: Ca, P, Mg, S, Na, Mn, Ba és Zn. A hidrogén-peroxidos tisztítás hatását vizsgálva az elemösszetételre nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az 5 napos és 8 napos kezelések között, kivéve a Mn tartalmat, mely esetében marginálisan szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A csontösszetételben szerepet játszó főelemek (P, Ca, Mg, S és Na) esetében szorosabb, míg a Ba és Zn gyengébb kapcsolatot tapasztaltunk, mely utóbbi elemek kisebb mennyiségben való jelenlétével magyarázható a csontban.

Az ujjpercek elemzésekor a csontok Ca, P, Mg és Zn tartalmát értékeltük, mivel az alkalmazott mérési módszerrel a fentebb említett elemek közül a S ($<0,01 \text{ mg L}^{-1}$), Na ($<0,002 \text{ mg L}^{-1}$), Mn ($<0,001 \text{ mg L}^{-1}$) és Ba ($<0,006 \text{ mg L}^{-1}$) kimutatási határ alatt volt. Az ujjpercek mért elemösszetételét a nagyobb csontokban mért elemösszetétele alapján becsült elemösszetétellel hasonlítottuk össze. A tibia-fibula, metatarsalis csontok, hátsó és mellső végtagok ujjainak elemösszetétel nem különbözött szignifikánsan a mért értékektől.

A kifejlesztett módszer élő állatokon alkalmazható, az ujjperc levágásos módszer egy további módjának lehetőségét jelenti, amely környezeti állapot becslésre alkalmazható a békák, mint bioindikátor szervezetek használatával.

4.5. Városiasodás hatása barna varangy ujjpercek elemösszetételének vizsgálata alapján

A barna varangy ujjpercek elemösszetételét vizsgálatuk városi és természetközeli állapotú területeken. Meggállapítottuk a különböző elemek százalékos arányát, melyek a következők: városi: Ca-20,5 %, P-14,6 %, természetközeli területeken: Ca-30,4 % és 29,6%, P-22,4 % és 21,7 %. A Zn, B és Mn %-os aránya kevesebb volt a főelemekhez képest. Az ujjpercek elemtartalma alapján a városi terület elkülönült a természetközeli területektől. A Ca, P és Mg koncentráció szignifikánsan nagyobb volt a természetközeli területeken, míg a Zn koncentráció a városi területekről származó ujjpercekben volt a legmagasabb.

Habár szemmel látható fiziológiai és morfológiai különbségeket nem tapasztaltunk a különböző élőhelyekről gyűjtött varangy ujjpercek között, eredményeink azt mutatják, hogy az antropogén hatások okozhatnak különbségeket a béka ujjpercek elemösszetételében. Bizonyíték erre, a fő csontalkotó elemek koncentrációja (Ca, P és Mg) kisebb volt a városi

területekről származó ujjpercek esetében. Ezzel ellentétben a Zn koncentrációja szignifikánsan nagyobb volt a városi területről gyűjtött béka ujjpercekben.

A mikrogramm mérettartományban lévő ujjpercek elemösszetétel megbízhatóan mérhető a vizsgált elemek esetében az alkalmazott analitikai módszerrel. Habár szemmel látható fiziológiai különbséket nem tapasztaltunk, a fő csont alkotó elemek mennyisége jelentősen kisebb volt a városi területről gyűjtött ujjpercekben. Eredményeink azt mutatják, hogy az élő békák/varangyok indikátor szervezetekként alkalmasak lehetnek ujjperceik révén környezetterhelésbecslésre.

5. Összefoglalás

A doktori értekezés célja környezeti terhelés kimutatására alkalmazható mikroanalitikai módszerfejlesztés volt, amellyel mikrogramm mérettartományba tartozó élőlények mintáit lehet mérni. A kifejlesztett módszerrel gerinctelenek közül a verőköltő bodobácsokat, gerincesek közül pedig béka és varangy ujjperceket vizsgáltunk. A módszer fejlesztés feltétele volt, hogy alkalmas legyen egyetlen rovar, illetve ujjperc elemösszetételének vizsgálatára. Ezáltal mind a rovarok, mind a békák/varangyok elemösszetételbeli változása populációs szinten vizsgálható legyen környezetterhelést vizsgáló tanulmányokban. Ezek alapján az értekezés főbb tudományos eredményei a következők.

Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriai módszer és ultrahangos porlasztó (ICP-OES-USN) mérési körülményeit optimáltuk rovar minták egyedi elemanalitikai elemzéséhez. Meghatároztuk a készülékre jellemző robusztus plazmaparamétereket, illetve az analitikai módszer fejlesztés során az elemek szinképvonalának érzékenységét, kimutatási határait és spektrális zavarásait vettük figyelembe. A rovarminták elemanalitikai vizsgálataihoz 16 elem 36 szinképvonalát ajánljuk vizsgálataink alapján. A kifejlesztett mikroanalitikai módszer kis tömegű rovarminták egyedenkénti vizsgálatára alkalmas, ezáltal egy új lehetőséget jelent a rovarpopulációk elemtartalmának változására a környezetvédelmi tanulmányokban.

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a csapdázó és tartósító oldat jelentős hatással van a rovarok elemösszetételére. Egyrészt, ezek az oldatok jelentős hatással vannak a rovar minták nedves és/vagy száraz tömegére. Másrészt, a csapdázó oldatként használt hagyományos fagyálló jelentős mennyiségben tartalmaz szerves szennyezőket, amelyek bejuthatnak a rovar szövetekbe, ezáltal torzítva a releváns elemkoncentrációkat.

A különböző minőségű hígítatlan glikolokkal végzett kísérletünkkel bizonyítottuk a csapdázó anyagként használt oldatok tömegnövekedést okozó hatását, amely torzítja a rovarok elemösszetételre kapott eredményeket.

A módszerfejlesztéssel lehetőség van gerincesek közül a béka/varangy csontok elemösszetételbeli vizsgálatára is. A vizsgálatok bizonyítják, hogy a kis tömegű ujjpercek elemösszetétele alapján a vázrendszer egy része reprezentálható.

A városiasodás hatásának vizsgálata során eredményeink azt mutatják, hogy az antropogén hatások okozhatnak különbségeket a ujjpercek elemösszetételében. Igazolja ezt,

hogy a főcsont alkotó elemek koncentrációja alacsonyabb volt a városi területről gyűjtött varangy ujjpercekben.

Az általunk kifejlesztett mikroanalitikai módszer alkalmas kis tömegű gerinctelenek és gerincesek szerveinek vizsgálatára. Eredményeim azt mutatják, hogy gerinctelenek esetében az élvefogó csapdázás és a fagyasztva tárolás a legalkalmasabb módszer a gerincteleneket indikátor szervezetheként alkalmazó kvantitatív analitikai vizsgálatokban. Ugyanakkor a béka/varangy ujjpercek elemösszetételének vizsgálata pedig egy új lehetőséget jelent, amely alkalmazható élő állatokon, ezáltal a környezetminőség becslésében indikátor szervezetekként alkalmazhatók.

Analysis of environmental load based on the elemental contents of individuals

1. Introduction

1.1. Development of analytical method for environmental purposes

The use of indicator organisms as biological indicators in environmental pollution studies began to attract in the past decade (Clark, 1993; Dallinger, 1994; Herkovits and Helguero, 1998). Analytical chemistry is essential for environmental research. Available methods are relatively well developed and they allow the determination of elements in very low concentrations. In population level the elemental analysis may be a new opportunity in studies of environmental pollution. In certain cases the available amount of sample is small, e.g. the weights of invertebrates and the weights of some body parts of vertebrates. Previous studies have usually worked with large amount of material provided by averaging of individual samples. Investigation of elements in population level needs the analysis of individuals. With the use of microanalytical methods it is not necessary to kill vertebrates for the analytical samples. This approach may be useful in sampling body parts of alive animals, e.g. toe bones (Simon et al., 2010) or bird feathers (Eens et al. 1999; Vallner et al. 1999).

1.2. Insects as bioindicator organism

Insects play an important role in most terrestrial environments owing to their great abundance, biomass and diversity (Zödl & Wittmann, 2003). Invertebrates have also been widely used as bioindicators in environmental studies (Lindqvist & Block, 1997). The habitats of ground-living species are in close contact with soils (Nakamura et al., 2005), and these animals may accumulate inorganic and organic toxic compounds. The life cycle of invertebrates is usually short and their collection is easy making them suitable as indicators of concentration of environmental contaminants (Zödl & Wittmann, 2003).

Different methods are used to collect terrestrial invertebrates. Hand collecting is the most appropriate way to collect animals for elemental analysis, but this is not always effective nor representative (Leather, 2005). Pitfall trapping is a simple and widespread method for sampling flightless or ground-living insects. This collection method is inexpensive, easy to use and operate round the-clock, resulting in large, species-rich samples (Clark & Blom, 1992). Various substances have been used as killing agents in the traps, e.g. ethanol solution

(Nakamura & Taira, 2005) and formalin (van den Berghe, 1992; Eichinger et al., 2007). Ethylene glycol is often used, frequently in the form of automobile anti-freeze as an inexpensive filling fluid for traps (Suarez et al., 2000). In ecological studies, the most common preservative solutions are formalin and ethanol for animal fixation. However, the effects of filling fluid on the elemental composition of sampled insect material is less known.

1.3. Frogs and toads as bioindicator organism used their phalanges

Amphibian populations are declining globally which is caused by several factors such as habitat loss and fragmentation (Beebee & Griffiths, 2005), ultraviolet radiation and chemical pollution (Blaustein et al. 2003), climate change (Pounds, 2001) and epidemic disease (Pounds et al., 2006). Pond breeding amphibians are especially sensitive to contaminations because of their complex life cycles (Rowe et al., 1998). Therefore, they may present opportunities for direct and indirect effects of contaminations. Anurans and toads are increasingly used as bioindicators of accumulation of contaminants in pollution studies (Loumbourdis et al., 2007). Elemental analysis, especially that of heavy metals in amphibians began to attract special attention (Herkovits & Helguero, 1998; Stolyar et al., 2008).

Toe clipping is a commonly used standard method to identify individuals, particularly frogs and toads (McCarthy & Parris, 2004). It is simple, safe and applicable for genetics (Noonan & Gaucher, 2006), histological examinations (Boyle et al., 2004) or amphibian skeletochronological age determination (Castanet & Smirina 1990). Toe clipping is an acceptable method, which does not cause any serious negative effects (Hartel & Nemes, 2006).

2. Objectives

In my dissertation, the main aims of studies were the following:

- i. Development of an axial Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) with Ultrasonic Nebulizer (USN) method for the analysis of insect samples which is sensitive enough for measuring individual insects. During the development of the method the following aspects have been considered: the robustness of plasma parameters, the limit of detection, model solution experiment and standard addition.

- ii. Study the effects of trapping and conservation fluids on body mass and elemental contents of insect samples.
- iii. Study the influence of different quality of ethylene glycol as trapping liquid on the body mass and elemental contents of insect samples.
- iv. Study the elemental composition of frog skeleton and gain information about which part of skeleton may be represented by the elemental composition of toe bones.
- v. Study the effects of urbanization on elemental contents of toad toe bones.

3. Material and methods

3. 1. Optimization of USN-ICP-OES

During the method development IRIS Intrepid II XSP Duo type ICP-OES produced by Thermo, equipped with a CETAC 45 000 AT+ ultrasonic nebulization was used. The conditions of measurements have to be optimized since they are instrumental dependent. We used a seven-point calibration procedure (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) using multi-element calibration solution (Merck ICP multi-element standard solution IV). The analysis was performed using four or five atomic or ionic lines of the corresponding elements. In the case of alkaline metals (e.g. Li, Na and K) single lines were used. All of the selected lines were free of spectral interferences in insect and bone matrixes.

To determine the robust plasma parameters the MgII 280.270 nm / MgI 285.213 nm intensity ratios were studied by measuring 0.1 mg L⁻¹ magnesium containing solution based on Mermet (1991) recommendation. The excitation energy was set to 850, 950, 1150, 1250 and 1350 W, while the sample gas pressure to 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 psi. These values were set in certain combinations of a randomized sequence. Standard deviation was determined by 10 parallel measurements of blank solution for determining the limit of detection by means of 3 times standard deviation. Detection limits were determined by four different plasma conditions according to the robustness.

During the standard addition experiment, the studied elements were added to the firebug homogenization in known amounts. We compared to the measured and expected elemental concentrations. To control the method in the model solution experiment standard solutions were digested and handled as sample. Homogenized firebug samples were processed

using normal calibration method. The weight of homogenized firebug was 0.02 g similarly to the average dry body mass of bugs

3. 2. Firebugs (*Pyrrhocoris apterus*)

Adult firebugs were hand collected during their reproductive period in the University of Debrecen Campus, Hungary in May 2008. We collected 100, 250 and 450 iThe live insects were collected into polyethylene tubes in groups of 10 specimens. The firebugs were killed by freezing at -18 C. Control samples were stored in a freezer and the following treatments were used: insect kept in trapping fluid for 2 weeks, and for 1 month, trapping fluid for 2 weeks plus 2 weeks in ethanol, and trapping fluid for 1 month plus ethanol for 1 month. Twenty individuals were analysed in all treatments.

In the experiments four different grade of glycol were tested as trapping fluids: analytical, puriss, technical and common anti-freeze. In our study two weeks period and one month period was used also.

3. 3. Frogs and toads

Rana esculenta speciemens were collected during the summer of 2007. The sampling site was the Frog Pond (Békás tó) in Debrecen City, which is an urban pond with heavy traffic around and other anthropogenic effects (e.g. receiving thermal bath) in the centre of the city (47°33' N, 21°37' E). Ten adult frogs were collected by hand net. On arrival at laboratory, frogs were anaesthetized with chloroform. Each large bone cleaned with hydrogen peroxide for 5 days. Femur was chosen to test the effect of hydrogen peroxide on elemental contents of frogs. Similarly to the other bones, the right femurs were placed into 5 ml 30% (m/m) hydrogen peroxide for 5 days, while the left femurs for 8 days.

The specimens of toad *Bufo bufo* were collected during their reproductive period from three different ponds during spring of 2007. Two of these were rural sites: Garancsi Pond (43°37'N, 18°48'E) and Naplás Pond (47°30'N, 19°14'E). The third sampling site was the Frog Pond which was an urban pond with heavy traffic around the pond and anthropogenic

effects (thermal path and pharmaceutical factory) in the centre of the city Debrecen (47°33'N, 21°37'E).

The adult toads were collected by hand net in the urban sites. In the two rural samples sites toe-bones were cut out from died specimens. The toe-clipping was made by stainless steel, surgical folding knife following Green (2001) recommendations. The removal toes were stored in a freeze in plastic Eppendorf tubes to sample processing. The toes were placed into 2 hydrogen peroxide to 2 days because of using this procedure the toe bone could clean from the fraction of conjunctive tissues.

3.4. Sample preparation

In the cases of all samples the wet body mass were measured immediately. The samples were dried overnight at 105 °C, and the samples were reweighted to determine their dry mass. The large bones of frogs and firebugs were measured with a PRECISA 240A analytical balance while in the cases of phalanges SATORIUS LE 26P micro analytical balance was used. The material was then digested using 2 mL 65% (m/m) nitric acid (Scharlau) in the same container at 80 °C for 4 h. Digested samples were diluted to 20 (frog phalanges and firebugs), 50 (firebugs) and 100 (large frog bones) mL using a 1% (m/m) nitric acid.

3. 5. Statistical analysis

Calculation were performed by the SPSS/PC+ and R software packages. Homogeneity of variances was tested by the Levene test. Canonical corresponding analysis and One–Way ANOVA evaluated the effects of the three sites on elemental composition of toad specimens and the effects of ethylene glycol and ethanol on the body mass and elemental composition of firebugs. In the case of significant Tukey's Multiple Comparison test was used. Linear regression models were used to evaluate the relationships between the element contents and the weight of bones and in the case of standard addition. The measured and estimated elemental contents of phalanges and measured and expected concentration in the model solution experiment were tested with t test in the case of bones of frog.

4. Results and discussion

4. 1. Analytical methods for insect samples

The robust plasma conditions were determined with the 280.270 nm ion (MgII) and 285.213 nm atomic (MgI) / intensity ratios. The positive MgII / MgI > 8 range is relatively broad limits available. Robust plasma conditions resulted small limit of detections in case most of the elements excepting easy ionisable ones. For the analysis 36 lines of 16 elements were selected. The limits of detection were determined by difference Mg II/Mg I intensity ratios. The following limits of detection were found in the Mg II/Mg I > 8 ratios, are given mg L⁻¹: Ba: 0.006, Ca: 0.008, Cd: 0.001, Co: 0.004, Cr: 0.002, Cu: 0.003, K: 0.003, Li: 0.002, Mg: 0.001, Mn: 0.001, Na: 0.002, Ni: 0.004, Pb: 0.013, Sr: 0.002 and Zn: 0.003. Low sample gas flow and at high excitation energy provided robust plasma and resulted low limit of detection. Spectral interferences were not found in the cases of selected lines. In the model solution experiment significant difference was not found between the expected and measured concentrations During the standard addition the investigated elemental concentration were not differ by using the two method. Neither spectral interferences nor matrix effects were detected by the selected lines. The developed method is suitable for the analysis of small weight samples which allows to study elemental composition of individual insects.

4. 2. Effects of trapping and preservation solution on the body mass and elemental composition of firebugs

The elemental concentration usually reported per g wet weight and dry weight. Thus, the effect of trapping and preservation solutions on body mass is an important result. Our results show that insects kept in trapping fluid gained mass with respect to control: 26% for the short trapping and 37% for the long trapping. A significant loss in dry mass only occurred in the long trapping plus long preservation treatment. The following elements were analysed: Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn. We found significant difference in the concentrations of elements among the four treatments in the case of all elements, except magnesium and zinc.

Certain elements (e.g. potassium) leached out of insect tissues, while others (e.g. calcium, strontium, manganese, and sodium) may enrich insect's tissues.

Our results demonstrated that the use of commercial antifreeze as a trapping fluid and the preservation of invertebrates in ethanol may lead to biased elemental concentrations, particularly in macro-elements (calcium, sodium and potassium). Live trapping for collection and frozen fixation for preservation is recommended as a more reliable method if the aim of elemental analysis is the precise measurement of environmental pollutants in insect samples but it should study in the future.

4. 3. Effect of ethylene glycol quality on the body mass and elemental composition of insects

The samples were analyzed for the following elements: Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn. We found that the wet and dry mass increased significantly in all glycol treatment experiments. Concentrations had reference for the initial wet body mass, after treatment wet body mass and dry body mass, respectively. We found significant difference in the concentration of elements among the five treatments when the elemental concentrations had reference to the measured dry mass in the case of all elements. There were no significant differences when the reference bases were the initial wet mass and calculated dry mass except potassium and sodium. The trapping fluids resulted in an increase of the body mass biasing the results of elemental analysis of invertebrates.

Our results showed that different grade of glycol could classify based their sulphate ash contain. The sulphated contain was calculated based on the measured elemental contents. The rank of quality of glycol based on sulphate ash contents was as expected analytical, puriss, technical grade and common anti-freeze. Our results suggested that in the cases of all glycol similar body mass increasing was found, which might bias elemental concentrations. Our result indicated that live trapping could be a more reliable method in the quantitative analytical studies.

4. 4. Frog skeleton elemental analysis

In the large bones, P, Ca, Mg, Mn, Na, S and Zn elements were measured. There was no significant difference between the 5 and 8 days long hydrogen peroxide cleaning for the studied elemental concentrations except the manganese. In the case of manganese content, we found weak significant decrease in the concentration. Our result showed that strong correlation was between the main components of bone (P, Ca, Mg, S and Na) and weights. In the case of Ba and Zn the relatively lower correlation may have resulted from their smaller concentration in bones. In the cases of phalanges, the following elemental contents were analysed: Ca, P, Mg and Zn. Other elements, S ($<0.01 \text{ mg L}^{-1}$), Na ($<0.002 \text{ mg L}^{-1}$), Mn ($<0.001 \text{ mg L}^{-1}$) and Ba ($<0.006 \text{ mg L}^{-1}$) were below detection limits. Measured elemental contents of phalanges were compared to the estimated elemental contents based on large bones to test the usefulness of the method. The measured and the estimated elemental contents of phalanges were not different significantly based on the tibia–fibula, metatarsalis bones, front and hind limb digits.

Our result showed that the elemental analysis based on phalanges adds a further way of use of these bones for environmental quality assessment. Thus, frogs by their phalanges may be useful biological indicators of contamination in the pollution studies.

4. 5. Effects of urbanization on elemental analysis of toe bones of common toad

The percent rates of calcium and phosphorus of the rural and urban sites were the following: urban: Ca-20.5%, P-14.6%, rural: Ca-30.4% and 29.6%, P-22.4% and 21.7%, respectively. The percent rate of zinc and manganese were small in the toe bones. The element concentrations of toe bones the urban and two rural ponds are separated. The concentration of calcium, phosphorus and magnesium was significantly higher in the toe bones from rural sites and the zinc concentration was the highest in the urban sites.

Although, physiological differences and morphological deformities were not found in the toe bones, the concentrations of the main elements in bone were markedly lower in the urban site than in the rural. In spite of the small size of the toe bones the elemental

concentrations may be measured reliably. Thus, frogs by their toe bones may be useful biological indicators for the assessment of contamination in the pollution studies.

5. Summary

The main aim of my dissertation was to develop method for analysis of small amount of animal samples which is suitable for individual analysis of insects and analysis of toe bones of amphibians. Elemental composition of insects and the toe bone of anurans were determined in population level which gives a more detailed study of environmental loads. In my dissertation the main scientific results are the following:

Measured parameters of ICP-OES-USN were optimized for insect sample analysis. The robust plasma parameters were determined based on ratio of Mg II 280.270 nm / Mg I 285.213. Selection of spectral lines was based on intensities, limit of detections and results of model solution and standard addition experiments. Therefore, 36 spectral lines of 16 elements are recommended for analysis of insect samples. In the cases of other lines of elements, their limit of detections and their tolerance of interference were higher. This method is suitable for small weight insect samples and it provides a new opportunity studying variability of elemental contents of insects in population level in environmental studies.

Based on our result trapping and conservation fluids were significant effect on elemental composition of insect samples. These fluids changed the wet and dry body mass therefore they biased the determination of elemental concentrations. On the other hand impurities of the common anti-freeze solution were enriched in insect tissues.

Similar effect on body mass was found, when high and low quality ethylene glycols were used as trapping fluid. The analytical, puriss and technical glycols did not contain measurable impurities.

Micro analytical methods give a new opportunity using anurans as bioindicators. A small toe bones provide appropriate amount of sample estimating elemental composition of bones. Our results showed that elemental composition of toe bones correlated by large part of skeleton .

Anthropogenic activity of urbanized areas has effect on the elemental composition of toad toe bones. Concentration of major elements Ca, P, Mg was higher in the toe bones in rural sites, while concentration of Zn was the highest in urban sites.

The developed method is appropriate for elemental analysis of small weight invertebrates and small body parts of vertebrates. In the cases of invertebrates the live trapping collection and storage under freezing conditions could be a more reliable method for quantitative analytical studies. Analysis of anurans toe bones is a new fault-free method which could apply without serious damage of living frogs. It may open further ways in environmental load assessments.

Irodalom/References

- Beebee, T. C. J., Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125, 271–285.
- Blaustein, A. R., Johnson, P. T. J. (2003). The complexity of deformed of amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, 87–94.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organism*, 60, 141–148.
- Castanet, J., Smirina, E. (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 11, 191–196.
- Clark, W. H., Blom, P. E. (1992). An efficient and inexpensive pitfall trap system. *Entomological News*, 103, 55–59.
- Eens, M., Pinxten, R., Verheyen, R. F., Blust, R. Bervoets, L. (1999). Great and Blue Tits as indicators of heavy metal contamination in Terrestrial Ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 81–85.
- Eichinger, E., Brucker, A., Stemmer, M. (2007). Earthworm expulsion by formalin has severe and lasting side effects on soil biota and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 206–266.
- Hartel, T., Nemes, Sz. (2006). Assessing the effect of toe clipping on Yellow Bellied Toads. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 52, 359–366.
- Herkovits, J., Helguero, L. A. (1998). Copper toxicity and copper–zinc interactions in amphibian embryos. *Science of the Total Environment*, 221, 1–10.
- Leather, S. (2005). Insects sampling in forest ecosystems. Blackwell Publishing. 303 pp.
- Lindqvist, L. and Block, M. (1997). Influence of life history and sex on metal accumulation in two beetle species (Insecta: Coleoptera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 518–522.
- Loumbourdis, N. S., Kostaropoulos, I., Theodoropoulou, B. Kalmanti, D. (2007). Heavy metal accumulation and methallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium. *Environmental Pollution*, 145, 787–792.

- McCarthy, M. A., Parris, K. M. (2004). Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology*, 41, 780–786.
- Mermet, J. M. (1991). Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostic. *Analytical Chimica Acta*, 250, 85–94.
- Nakamura, K., Taira, J. (2005). Distribution of elements in the millipede, *Oxidus gracilis* C L. Koch (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and the relation to environmental habitats. *BioMetals*, 18, 651–658.
- Noonan, B. P., Gaucher, P. (2006). Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog *Dendrobates tinctorius*. *Molecular Ecology*, 15, 4425–4435.
- Pounds, J. A. (2001). Climate and amphibian declines. *Nature*, 410, 639–640.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. C., Consuegra, J. A., Michael, P. L., Fogden, M. P. L., et al. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439, 161–167.
- Rowe, C. L., Kinney, O. M., Congdon, J. D. (1998). Oral deformities in tadpoles of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat. *Copeia*, 1998, 244–246.
- Simon, E., Braun, M., Tóthmérész, B., 2010. Non-destructive method of frog (*Rana esculenta* L.) skeleton elemental analysis used during environmental assessment. *Water, Air and Soil Pollution* 209: 467–471.
- Stolyar, O. B., Loumbourdis, N. S., Falfushinska, H. I., Romanchuk, L. D. (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 107–113.
- Suarez, A. V., Richmond, J. Q., Case, T. J. (2000). Prey selection in horned lizards following the invasion of Argentine Ants in Southern California. *Ecological Applications*, 10, 711–725.
- Vallner, J., Posta J., Szép T., Braun M., Balogh Á., Kiss F. (1999). Sample preparation and determination of the element content from low-weight feather samples *Environmental Toxicology and Chemistry*, 70, 297–304.
- van den Berghe, E. (1992). On pitfall trapping invertebrates. *Entomological News*, 103, 149–156.
- Zödl, B., Wittmann, K. J. (2003). Effects of sampling, preparation and deflection on metal concentrations in selected invertebrates at urban sites. *Chemosphere*, 52, 1095–1110.

Papers of Edina Simon

1. Articles

1. **Simon, E.**, Braun, M. & Tóthmérész, B. (2010): Non-destructive method of frog (*Rana esculenta* L.) skeleton elemental analysis used during environmental assessment. *Water, Air and Soil Pollution* 209: 467-471. IF2009: 1.676.
2. Braun, M., **Simon, E.**, Tóthmérész, B. & Fábíán, I. (2010): How influences the quality of ethylene glycol the body mass and elemental composition of insect samples? *Environmental Science and Technology* – (manuscript). IF2009: 4.630.
3. Braun, M., **Simon, E.**, Tóthmérész, B. & Fábíán I. (2010): Analytical methods for insect samples with optimization of ultrasonic nebulization coupled to axial inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* (manuscript). IF2009: 3.290.
4. **Simon, E.**, Braun, M., Fábíán, I., Vidic, A., Bogyó & Tóthmérész, B. (2010): Elemental concentrations in leaves and foliage dust along an urbanization gradient in Vienna. *Environment International* (manuscript) IF2009: 4.786.
5. Braun, M., **Simon, E.**, Fábíán I. & Tóthmérész, B. (2009): Ethylene glycol-based antifreeze trapping and ethanol preservation in the elemental analysis of insect samples. *Chemosphere* 77: 1447-1452. IF2009: 3.253
6. **Simon, E.**, Puky, M., Braun, M. & Tóthmérész B. (2009): Trace elemental analysis in *Bufo bufo* by toe bone from urban and rural sites in Hungary. *Environmental Monitoring and Assessment* – (under review). IF2009: 1356.
7. **Simon E.**, Braun M., Szabó K., Molnár P. & Tóthmérész B. (2005): Nehézfém monitoring *Rana esculenta* fajkomplex egyedeinek vizsgálatával. *Természetvédelmi Közlemények* 13: 309-318.

2. Poster

1. **Simon E.**, Braun M., Szabó K., Molnár P. & Tóthmérész B. (2005): Nehézfém monitoring *Rana esculenta* fajkomplex egyedeinek vizsgálatával. III. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Eger.