

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Halak nehézfém tartalmának elemzése különböző elemanalitikai
módszerek alkalmazásával**

Thesis of Ph.D. dissertation

**Analysis of the heavy metal content of fish applying different
analytical methods**

Czédli Herta

Témavezető:

Dr. Nagy Sándor Alex



Debreceni Egyetem
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2014

1. BEVEZETÉS

A kémiai környezetterhelés révén a mikroelemek és toxikus nehézfémek felhalmozódása egészségügyi, biológiai és ökológiai jelentőséggel bír (KADÁR 1995, 2001). A nehézfém szennyeződések nem bonthatók le természetes folyamatok révén, a civilizációs eredetű nehézfém terhelés állandó növekedése veszélyezteti az élővilágot (NAGY *et al.* 2000, 2002), a megfelelően kiválasztott tesztélőlényekben a fémfelhalmozódás arányosan változik a terhelés mértékével és idejével (NAGY *et al.* 2000, 2002).

A nehézfém szennyeződések kimutatását célzó vizsgálatok során jól használhatók a halfajok, hiszen jelzik a vízminőség változását (ARDELEAN 2007), továbbá a nehézfémeket szerveikben felhalmozzák, így azok elemzéséből a nehézfémek szervezetbe való bekerülésének útjára is lehet következtetni (SALÁNKI 1978, FAUSCH *et al.* 1990, LASNE *et al.* 2007).

Az alap és alkalmazott tudományok összekapcsolásával, összehangolt interdiszciplináris kutatások keretében a halakban felhalmozódó nehézfémek mérése hozzájárul a vízfolyásokat, víztereket érő szennyeződések következményeinek vizsgálatához, nyomon követéséhez. Indokolt tehát az ökológiai kutatások során alkalmazható nagy érzékenységgű elemanalitikai módszerek fejlesztése, melyek révén a biológiai minták elemi összetevőinek szimultán, széles rendszám tartományban végezhető elemzése megvalósítható.

Munkám során a környezeti nehézfém terhelés kimutatására alkalmazható módszerfejlesztést tűztem ki célul a vizsgálati módszerek (AAS, ED-XRF, PIXE) alkalmazhatóságának, hatékonyságának, teljesítőképességének összehasonlítása, halminták nehézfém tartalmának elemzése szempontjából.

A kutatómunka során vetődött föl a kérdés, hogy egy adott víztér nehézfém szennyezésének időbeli lefolyása rekonstruálható-e a területen élő halak pikkelyeinek utólagos analízisével (a növekvő halpikkelyekbe beépülő nehézfém szennyezők sugárirányú eloszlásából meghatározható-e a szennyezés időbeli lefolyása). A balin (*Aspius aspius L.*) pikkely vizsgálatokhoz az ATOMKI-ban alkalmazott μ -PIXE (Particle Induced X-ray Emission) módszert alkalmaztuk, amely kiválóan alkalmas a pikkelysugár irányú elemeloszlások felvételére. Mivel ezen eloszlások felvétele rendkívül időigényes, előszelektációs méréseket végeztünk röntgen-fluoreszcenciás analízis XRF (X-ray Fluorescence Analysis), valamint kihozott és belső nyalábos PIXE módszerrel. Meghatároztuk az egyes elemekre az alkalmazott módszerekkel elérhető minimális kimutathatósági határokat (MDL), melyek ismeretében le tudtuk vonni a következtetést, hogy melyik elem esetében melyik módszert célszerű előszelektációs mérésekhez alkalmazni. A pikkely elemanalitikai vizsgálata mellett egy makro- és egy mikroelem (kalcium és cink) eloszlás vizsgálatára is sor került PIXE

módszerrel. Ezt követően egy többlépcsős kísérletsorozat keretében laboratóriumi körülmények között ezüstkárászokban akkumulálódott rézkoncentráció vizsgálatát végeztem el PIXE és ED-XRF módszerrel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során a következő elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos célkitűzéseket fogalmaztam meg a halminták nehézfém tartalmának elemzése szempontjából:

1. elemezni a nehézfémek felhalmozódásában tapasztalt különbségeket a cianid és nehézfém szennyezést követően gyűjtött tiszai halfajok esetében AAS módszerrel
2. vizsgálni a nehézfém koncentrációk eltérését AAS módszerrel a Tisza öt különböző térségéből kifogott egyedek vonatkozásában
3. meghatározni a csuka szerveiben felhalmozott nehézfém koncentrációk változását AAS módszerrel az egyed korával való összefüggésben (adult egyed és ivadék vizsgálata)
4. értelmezni a balin halpikkelyben ED-XRF és PIXE módszerrel detektálható kalcium és cink eloszlást
5. elvégezni a balin pikkely elemanalitikai vizsgálatát
6. detektálni a rézakkumulációt etetési kísérletből származó ezüstkárászokban ED-XRF és PIXE módszer segítségével

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Tiszai halfajok nehézfém tartalmának elemzése

A Tiszát 2000-ben ért nehézfém-szennyezéseket (GULYÁS 2002, REGŐSNÉ KNOSKA 2001, SOLDÁN *et al.* 2001, FERENC 2006) követően, a Tisza öt különböző térségéből (Tisza-Szamos, Tisza-Bodrog, Tisza-tó, Tiszaug, Tisza-Maros) kifogott egyedek, balin (*Aspius aspius L.*), csuka (*Esox lucius L.*), harcsa (*Silurus glanis L.*), kűsz (*Alburnus alburnus L.*), süllő (*Sander lucioperca L.*) szöveteinek elemzését

végeztem el. 122 szövetminta (kopoltyú, máj, izom) feldolgozására került sor, melyekben mértük a Cu, Zn, Cd, Pb és Hg mennyiségét. A gyűjtött fajok meghatározása (VUTSKITS 1918, VÁSÁRHELYI 1961, PINTÉR 1989, GYÖRE 1995, HARKA 1997), illetve a minták preparálása után a fagyasztva szárítást, homogenizálást követően a mintaelőkészítésénél az MSZ ISO 1442:2000 (hal) szabvány szerint jártunk el. A minták roncsolását és a fémanalíziseket a Hajdú-Bihari Önkormányzatok Vízmű Zrt. Laboratóriumában végeztem. A feltárás hőmérsékletprogram alapján történt (General Guidelines for Microwave Sample Preparation, 1994.), majd a mérőműszer (Perkin-Elmer 5000 atomabszorpciós spektrofotométer) lineáris mérési tartományának megfelelően (Analytical methods etc., 1976) hígított mintából történt a nehézfémek meghatározása.

3.2. Balin pikkely vizsgálata PIXE módszerrel

A kutatómunka során vetődött föl a kérdés, hogy egy adott víztér nehézfém szennyezésének időbeli lefolyása rekonstruálható-e a területen élő halak pikkelyeinek utólagos analizisével (a növekvő halpikkelyekbe beépülő nehézfém szennyezők sugárirányú eloszlásából meghatározható-e a szennyezés időbeli lefolyása). A balin (*Aspius aspius L.*) pikkely vizsgálatokhoz az ATOMKI-ban alkalmazott μ -PIXE (Particle Induced X-ray Emission) módszert alkalmaztuk, amely kiválóan alkalmas a pikkelysugár irányú elemeloszlások felvételére. Mivel ezen eloszlások felvétele rendkívül időigényes, előszelektációs méréseket végeztünk röntgen-fluoreszcenciás analízis XRF (X-ray Fluorescence Analysis), valamint kihozott és belső nyalábos PIXE módszerrel. Meghatároztuk az egyes elemekre az alkalmazott módszerekkel elérhető minimális kimutathatósági határokat (MDL), melyek ismeretében le tudtuk vonni a következtetést, hogy melyik elem esetében melyik módszert célszerű előszelektációs mérésekhez alkalmazni. A pikkely elemanalitikai vizsgálata mellett egy makro- és egy mikroelem (kalcium és cink) eloszlás vizsgálatára is sor került PIXE módszerrel.

3.3. Rézakkumuláció vizsgálata laboratóriumi kísérletből származó ezüstkárászokban

Együttműködés keretében, a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karának Hallaboratóriumában egy többlépcsős mérésorozat keretében zajlott a kísérlet 2006. 01.30.-2006. 02.27 között. Arra kerestük a választ, hogy a halakban ismert expozíciós idő, és takarmányon át bevitt meghatározott rézmennyiség esetén hogyan változik az akkumulálódott rézkoncentráció. A mérések elvégzése az MTA Atommagkutató Intézetében történt.

A kísérleti alanyként választott faj az ezüstkárász (*Carassius gibelio B.*) volt, amelynek egyedei a Dinnyési Szaporító és Ivadéknevelő Tógazdaságból kerültek beszerzésre. Tekintettel arra, hogy ez a halfaj tipikusan tág tolerancia-intervallummal rendelkezik (LUTZ & NILSON 1994), a kísérlet tervezésekor feltételezhető volt, hogy a nehézfém-terhelést is jobban fogja tolerálni. A kísérlet során ez igazolódott, egyetlen egyed sem pusztult el. Az alkalmazott pisztrángtáp (ALLER SAFIR) energiataralma 17,3 ME MJ/kg (4145 kcal/kg), összetétele a szárazanyagban belül: Nyersfehérjeteralom: 45%, Nyerszsír-tartalom: 20%, Szénhidrát-tartalom: 16%, Hamu-tartalom: 8%, Cellulóz-tartalom: 2%, Foszfor-tartalom: 1%.

A réz bevitele $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ formájában történt a tápba, 1 kg táp 500 mg rezet (500 ppm Cu) tartalmazott. A táp átlagos szemtömege 0,03 g volt. A kristályos rézszulfátot porceláncsészében való szétzúrást követően vízben feloldva szívattuk fel a táppal, majd 35°C-on tömegállandóságig szárítószekrényben szárítottuk. A kísérlet során 16 akváriumban helyeztük el a halakat, mindegyikbe egyet. A kísérleti ciklusok során rögzített testtömeg, testhossz, takarmányfogyasztás, rézfogyasztás értékeket az 5. táblázat mutatja be. A halak etetése naponta egyszer történt, majd az etetést követően 1 óra elteltével, amikor az egyedek már nem táplálkoztak, a maradék táp eltávolításra került az aljzatról, hogy a kioldódás ne befolyásolja mérési eredményeket. A kísérlet 28 napig tartott úgy, hogy hetente négy egyedemet emeltünk ki a kísérletből. A kiemelt egyedeket túlaltatást követően a minta előkészítésig fagyasztószekrényben tároltuk (CZÉDLI *et al.* 2008, 2012). A liofilizálás után a minták őrlése nagyteljesítményű darálóval történt, a porítást dörzsmozsárban végeztem el. Tekintettel a kísérletben felhasznált halak kis méretére, a máj, kopolyú és izom minták preparálására nem került sor, az egyedek porított mintáinak homogenizálása történt. A PIXE (VIS 2001) és XRF (INJUK & GRIEKEN 2001) módszerrel történt vizsgálatokhoz haltablettákat készítettünk (kötőanyagot/adalékanyagot nem használtunk) az MTA Atommagkutató Intézetében. A tablettakészítés során a minta összepréseléséhez 50 kp/cm² nyomást alkalmaztunk. A présedényt minden tabletták elkészítése után etilalkohollal tisztítottuk meg a szennyezések elkerülése végett, továbbá az egyes elkészült tablettákat a mérésig alufóliába csomagolva, szeparáltan tároltuk.

A haltabletták réztartalmát független PIXE (VIS 2001) és ED-XRF (INJUK & GRIEKEN 2001) mérésekkel határoztuk meg. A PIXE méréseket az ATOMKI makro-PIXE mérőberendezésével (KERTÉSZ *et al.* 1999) végeztük 2 MeV protonenergia és 40 nA nyalábáram alkalmazásával. A nyalábátmérő a minta felületén 5 mm volt. A fenti mérőberendezéssel – amelynek kiterjedt alkalmazási körébe a biológiai minták analízise (KERTÉSZ *et al.* 2005) is beletartozik – a magnéziumnál nagyobb rendszámú elemek detektálhatók. Először a tabletták főösszetevő koncentrációit határoztuk meg, majd ezt követően a nyomelem koncentrációkat. Az utóbbi esetben a minta és a röntgendetektor között egy 25 µm vastag alumínium fóliát helyeztünk a

könnyűelemektől származó röntgensugárzás csökkentésére, míg az előbbiben a fóliát eltávolítottuk. A mérési idő a főösszetevők meghatározása esetén 500 s, míg a nyomelemek meghatározása esetén 1500 s volt. Az ED-XRF méréseket az ATOMKI által kifejlesztett mérőberendezéssel végeztük. Ez a műszer egy Oxfordi gyártmányú, XTF6000BR típusú, ródiium céltárgyas röntgensóvel gerjeszti a mintát, a kibocsátott sugárzást egy 2 mm vastag alumínium fóliával megsűrve. A röntgensóvet 30 kV feszültségen, 200 μ A elektronáram mellett üzemeltettük. A minta besugárzott felületének nagysága közelítőleg 25 mm² volt, a mérési idő 6500-11000s között változott. A mintából kibocsátott karakterisztikus röntgensugárzást légköri nyomáson észleltük, amely a mangánál nagyobb rendszámú elemek nagy érzékenységgű analizisét tette lehetővé. A spektrumok kiértékelése az AXIL szoftverrel (SÁNDOR *et al.* 2004) történt, „direkt összehasonlító” üzemmódban, a kalibrációhoz IAEA/V10 biológiai sztenderdet alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Tiszai halfajok nehézfém tartalmának vizsgálata AAS módszerrel

A cianid és nehézfém szennyezést követően gyűjtött tiszai halfajok nehézfém tartalmának vizsgálata során a nehézfémek felhalmozódásában tapasztalt különbségeket elemezve megállapíthatjuk, hogy az akkumuláció legfőbb helye a máj, a kopolyú, a vese és a gonádok (KAPLAN *et al.* 1995, HERMESZ *et al.* 2001, LANGE *et al.* 2002). Az akkumulálódott fémek sorrendje máj> vese> kopolyú> bőr> izom (ADHIKARI *et al.* 2009). A nehézfém koncentrációk értékelése a hatályos 17/1999. (VI.16.) EüM. rendeletben megszabott értékek alapján történt. A réz és cink értékeket az egyéb állati belsőségek, valamint a májra és vesére alkalmazott határértékekkel vetettük egybe (NAGY *et al.* 2002). A Hg esetében nem volt határérték túllépés. A harcsák izomszövetében Tiszaugtól az alvízi szakasz felé haladva azonban a Hg koncentráció növekedése figyelhető meg. Az Pb koncentráció a balin májában (Maros 1,127 mg/kg), csuka (Tisza-tó tározótér 0,54 mg/kg) és a csukaivadék izomszövetében (Tisza-tó tározóterében 0,837 mg/kg), (Tisza Maros torkolat előtt 0,668 mg/kg) haladta meg a határértéket. A kűsz kopolyú mintákban a Felső-Tiszától Szeged felé haladva csökkent az Pb koncentráció (1,111 mg/kg \rightarrow 1,036 mg/kg \rightarrow 0,306 mg/kg). A süllő mintákat a középszakaszon emelkedett koncentráció jellemzi, az Alsó-Tisza szakasz felé haladva kisebb ólomtartalom figyelhető meg. A Cu koncentrációk tekintetében megállapítható, hogy határérték túllépés nem volt érzékelhető, azonban a következő eredmények mutatkoztak: balin májminták esetében emelkedő tendencia figyelhető meg a Felső-Tiszától a Maros felé haladva, addig a csuka májmintákban

mért réz koncentrációja lineárisan csökkenő tendenciát mutatott az alvízi szakasz felé haladva (21,52 mg/kg → 15,27 mg/kg → 10,18 mg/kg). A harcsákból származó májminták esetében Tiszaugtól a felvízi illetve az alvízi szakasz felé haladva emelkedő tendencia mutatkozik. A kűsz májmintákban a legmagasabb értékek a Bodrog torkolat előtti (5,77 mg/kg) és a Tokaj fölötti (3,41 mg/kg) mintavételi helynél adódtak. A mért Cd koncentrációk alapján megállapítható, hogy a Tisza-tavi csukák izomszövetének kadmium koncentrációja a határérték kétszerese, a Marosból származó egyed májában pedig a határérték 3,64-szerese volt. A harcsák esetében a Szamosból (0,212 mg/kg) és a Marosból (0,403 mg/kg) származó egyedek májmintáiban mértük a maximálisan megengedett fémtartalom kétszeres illetve négyszeres értékét. A kűsz kopoltyú minták esetében azt tapasztaltuk, hogy a Maroson vett minta Cd tartalma (0,252 mg/kg) 21-szerese volt a Szamoson vett mintáénak (0,012 mg/kg). A süllő minták esetében a Cd koncentrációk határérték alatt mozogtak.

A nehézfém koncentrációk eltérésének értelmezését a Tisza öt különböző térségéből kifogott halegyedek esetében az egyes mintavételi térségek szerinti értékelések ábrái szemléltetik (11-21. ábra). A halak húsában megengedhető és mért maximális nehézfém koncentráció értékek alakulását a tiszai halmintákban (mg/kg teljes testtömegben) a Függelék 2. ábrája mutatja be. A Szamoson fogott egyedek közül a balin izomszövetében mértünk határértéket meghaladó Hg koncentrációt (0,249 mg/kg), a többi elem koncentrációja a vizsgált mintákban kimutathatósági határ vagy határérték alatt mozgott. A kűsz és a balin kopoltyújában mért emelkedett Hg és Pb koncentrációra magyarázatként szolgál FLEIT szerint, hogy a tiszai szennyezés során érkezett zagyban lévő toxikus nehézfémek biológiai hozzáférhetősége magas, így közvetlen felvétel révén a halakba kopoltyún keresztül is bejuthatott (FLEIT 2001). A Felső-Tisza Szamos előtti szakaszán a nehézfémek koncentrációi nem haladták meg a határértékeket. A Tisza Vásárosnamény fölötti szakaszán a legmagasabb Cd koncentrációt a kűsz izomszövetében mértük, a Zn pedig a balin kopoltyújában közelítette meg a határértéket. A többi mintában a vizsgált nehézfémek koncentrációja a kimutathatósági határérték alatt volt. A Bodrog torkolat előtt a csuka és csukaivadék kopoltyújában mértünk magas Zn koncentrációt (231,1 mg/kg és 171,1 mg/kg), a Cu és Pb koncentrációk a csuka és csukaivadék mintákban határérték alatt voltak. A legmagasabb Cd koncentráció (csukaivadék kopoltyúban 0,005 mg/kg, kűsz májában (~0,049 mg/kg) adódott, a Hg koncentráció maximális értékét csuka izomszövetben mértük (0,176 mg/kg). Tokaj fölött a vizsgált elemek koncentrációi határérték alatt mozogtak, Zn esetében a maximális koncentráció a csuka kopoltyújában volt mérhető (95,4 mg/kg). A Tisza-tó tározó térben a csuka kopoltyújában (184 mg/kg) illetve a csukaivadék kopoltyújában (120,7 mg/kg) mértük a legmagasabb Zn koncentrációt. A Cu, Cd, Hg értékek nem haladták meg a határértéket, az izomszövetben mért Pb értékek a csuka (0,54 mg/kg), a süllő (2,033 mg/kg), és a csukaivadék (0,837 mg/kg)

esetében is meghaladták a határértéket. A Tisza-tavi szakaszon csukaivadék kopolyájában volt mérhető magas Zn koncentráció (109,2 mg/kg), Cu esetében nem tapasztaltunk határérték túllépést, a többi elem koncentrációja kimutathatósági határérték alatt volt. A kiskörei duzzasztó alatt vett süllő és süllő ivadék minták eredményeit összehasonlítva látható, hogy a Zn, Cu, Hg esetében nincs számottevő különbség. A süllő ivadék kopolyájában mértük a legmagasabb Pb tartalmat (0,885 mg/kg). Tiszaug térségében határértéken felüli eredmény adódott a következő mintákban: (csukaivadék kopolya Zn 158,2 mg/kg, máj Hg 0,148 mg/kg) valamint (süllő máj Hg 0,104 mg/kg). A Maros torkolat előtt a Cu és Cd koncentráció határérték alatt volt a mintákban, csukaivadék valamint a kűsz izomban az Pb (0,668 mg/kg) és Hg (0,210 ill. 0,212 mg/kg) koncentráció meghaladta a határértéket. A vizsgált nehézfémek alapján a Maros volt a legszennyezettebb (21. ábra), pedig a 2000. évi szennyezés ezt a folyószakaszt nem érintette. Az Erdély területén zajló aktív ipari tevékenység hatására a Marosban élő halakban detektálható bioakkumulációt későbbi vizsgálatok is igazolták (KOVÁCS & KISS 2010).

Megvizsgáltam a csuka szerveiben felhalmozott nehézfém koncentrációk változását a kifogott egyedek korával összefüggésben. A mért eredmények ólom esetében alátámasztják, hogy a halak szervezetében felhalmozott antropogén eredetű anyagok szintje függ az egyedek méretétől és korától (PHILIPS 1980, BEUMER & BACHER 1982). Életkortól függően a fémmegkötés eltérő a halak esetében. Fiatal egyedek szervezetébe az intenzív táplálkozás miatt nagyobb mennyiségben kerülnek nehézfémek, továbbá a felvételt és az eliminációt nem képesek szabályozni. (PHILIPS 1969).

4.2. Balin pikkely vizsgálata PIXE módszerrel

A balin halpikkely elemanlmitikai vizsgálatát ED-XRF és PIXE módszerrel végeztem. Röntgenfluoreszcenciás analízissel, mintegy „szelektív vizsgálatként”²⁴¹ Am 60 keV-es vonalával, majd pedig szekunder targetes elrendezésben vizsgáltam a pikkelyben felhalmozódott fémtartalmat. Ezt követően PIXE módszerrel kihozott nyalábbal, illetve belső nyalábbal végeztem el a nehézfémek detektálását. Megállapítható, hogy a $Z < 31$ elemek esetén a belső nyalábos PIXE módszer (KERTÉSZ *et al.* 2005) használata célszerű, míg a $Z > 31$ elemek esetén a röntgenfluoreszcenciás analízis egy hatékony előszelektív eljárás. A kihozott nyalábos elrendezés esetében a könnyű elemekhez (P, Ca,) tartozó röntgensúcsok jobban, míg a nehezebb elemekhez tartozó röntgensúcsok (Zn, As, Se, Br, Sr) kevésbé intenzívek (CZÉDLI *et al.* 2011). Makro- és mikroelemeket, átmeneti fémeket, nehézfémeket egyaránt kimutattunk a pikkelyben. A Ti, V, Fe, Cu, Zn, Pb esetében lokális akkumulációk figyelhetők meg a vonal mentén felvett eloszlásgörbéken. Ahol magas Zn koncentráció mérhető, ott a Fe,

Pb, Cu, Ti is nagyobb koncentrációban van jelen. Megállapítható, hogy ezek a csúcserkékek összefüggésbe hozhatók külső mikroszennyező terheléssel. A nehézfémzennyezés ugyanis ritkán jelent egyetlen elemmel való szennyezettséget, a kémiai elemek csoportjai okozzák a környezeti elemek terhelését. A Ca és Zn PIXE módszerrel történt felületi eloszlásának meghatározása során a kalciumeloszlás a kalcifikálódás mértékének megfelelően volt detektálható, a cinkeloszlás és a pikkelynövekedés intenzitásának ismeretében megadható, hogy a detektált fémterhelés időben mikor érte az adott egyedeket (CZÉDLI *et al.* 2014 b).

4.3. Réz akkumuláció vizsgálata etetési kísérletből származó ezüstkárászokban PIXE és ED-XRF módszerrel

A rézakkumuláció vizsgálata etetési kísérletből származó ezüstkárászokban (*Carassius gibelio B.*) ED-XRF (INJUK & GRIEKEN, 2001) és PIXE (VIS 2001) módszerrel került kimutatásra. Ca (25500-60100 ppm), P (14000-23700 ppm), K (9500-12150 ppm) mint fő elemek vannak jelen nagy mennyiségben a mintákban, a S (6500-8400 ppm), Cl (3100-4600 ppm), Fe (110-850 ppm), Zn (150-260 ppm), Sr (100-380) alacsonyabb koncentrációban mutatható ki. Detektálni tudtuk igen alacsony koncentrációkban a mintákban jelenlévő V (4-8 ppm), Cr (2-14 ppm), Mn (5-17 ppm), Cu (5-11 ppm) és Br (40-70 ppm) elemeket.

A réztartalom és rézfogyasztás kapcsolatát elemezve látható, hogy a kísérleti ciklus során a halak által elfogyasztott táplálékkal arányosan nőtt a szervezetükben akkumulálódott réz mennyiség, melyet az ED-XRF és PIXE módszerrel történt mérések egyaránt igazoltak. Az akkumulálódott Cu koncentrációja a halak szervezetében már rövid expozíciós idő (7, 14, 21, 28 nap) alatt is jól kimutatható, mérhető mennyiség (CZÉDLI *et al.* 2008, CZÉDLI *et al.* 2014a).

Új és újszerű tudományos eredmények összefoglalása

A halak nehézfém tartalmának különböző elemanalitikai módszerekkel történt elemzése során kapott új tudományos eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- Igazoltuk csukák vizsgálata során, hogy a szervezetükben felhalmozott ólom mennyisége függ az egyedek méretétől és korától.
- Kimutattuk a halpikkely vizsgálatok esetében, hogy a PIXE módszer érzékenysége csökken a rendszám szerint, az XRF módszeré pedig növekszik.
- Megállapítottuk, hogy a PIXE módszer lehetőséget nyújt a pikkelyek évgyűrűihez kötött elem dúsulások vizsgálata révén a nehézfém szennyezés időbeliségének és mértékének tanulmányozására
- Kimutattuk, hogy $Z < 31$ elemek esetén a belső nyalábos PIXE módszer, $Z > 31$ elemek esetén pedig az XRF analízis hatékony előszelekciós eljárás a pikkelyvizsgálatok során
- Bizonyítottuk, hogy az akkumulálódott réz koncentrációja a halak szervezetében már rövid expozíciós idő alatt is jól kimutatható, mérhető mennyiség
- Kimutattuk, hogy a halak fiziológiai állapotát befolyásoló elemek kalciumra vonatkoztatott relatív koncentrációi jelzik rövid expozíciós idő alatt a vízi környezetben bekövetkező változásokat.
- Elemanalitikai módszereket teszteltünk és optimalizáltunk halakban lévő toxikus nyomelemek detektálása céljából

1. INTRODUCTION

Through chemical environmental load the accumulation of microelements and toxic heavy metals have health, biological and ecological significance (KÁDÁR 1995, 2001). Heavy metal contamination cannot be decomposed via natural processes and the continuous increase of heavy metal load of civilization origin endangers the biosphere (NAGY *et al.* 2000, 2002). In the selected test living creatures metal accumulation increases proportional to the extent and time of load (NAGY *et al.* 2000, 2002).

Fish species can be used well in the course of the studies aiming to prove heavy metal contamination as fish indicate the change in water quality (ARDELEAN 2007). Moreover fish accumulate heavy metals therefore analysing them may reveal the way of heavy metals enter the organization (SALÁNKI 1978, FAUSCH *et al.* 1990, LASNE *et al.* 2007).

Connecting scientific and applied research in the framework of a well established interdisciplinary project the measurement of heavy metals accumulating in fish contributes to trace and understand the consequences of contamination in rivers and other waters. As a result the development of highly sensible element analysis methods applicable in the simultaneous, wide range analysis of the element composition of biological samples.

My primary aim was to develop methods applicable for detecting environmental heavy metal load considering the applicability and efficiency comparison of various methods (AAS, ED-XRF, PIXE) and the heavy metal analysis of fish samples.

The question whether the change of heavy metal contamination in time in a given water area could be reconstructed by the subsequent analysis of the squama of fish living in the area (whether the pattern of the contamination in time could be determined from the radius orientated distribution of heavy metal contaminants incorporated into the growing squama) or not was raised in the course of the research. For the bream (*Aspius aspius L.*) squama investigations the μ -PIXE (Particle Induced X-ray Emission) method used in the Institute for Nuclear Research was applied which is excellent for identifying squama radius orientated element distribution. Since the measurement of such element distribution is time consuming pre-selection measurements were made using X-ray fluorescence analyses and brought out and inner beam PIXE method. Minimum detection limits (MDL) achievable by the methods applied for each element were determined. Based on the results, the optimal measurement methods were selected for each element. Apart from the element analytical investigation of the squama a macro- and a micro-element (calcium and zinc) distribution analyses were also made using the PIXE method. Following these I measured the copper concentration accumulated in Prussian carp was measured in the

framework of a multiple-stage experiment series using the PIXE and ED-XRF methods.

2. AIMS OF THE STUDY

The main objectives of my thesis are the following:

1. to analyse the differences in the bioaccumulation of heavy metals in fish species which were collected from the river Tisza after its heavy metal and cyanide pollution
2. to investigate the differences in the heavy metal content of fish specimens which were collected from five different areas of the Tisza with AAS method
3. to determine the variation of the heavy metal content of the different organs of pike specimens in relation to their age applying AAS method
4. to interpret the zinc and calcium distribution which were detected in bream scales applying ED-XRF and PIXE analytical methods
5. to perform the elemental analysis of bream scales
6. to detect the accumulated copper content of silver crucian specimens applying ED-XRF and PIXE analytical methods following a feeding experiment

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Analysis of the heavy metal content of fish species living in the river Tisza

I analysed the tissue of bream (*Aspius aspius L.*), pike (*Esox lucius L.*), glanis (*Silurus glanis L.*), bleak (*Alburnus alburnus L.*), and pike-perch (*Sander lucioperca L.*) caught in five regions of the Tisza river (Tisza-Szamos, Tisza-Bodrog, Tisza-tó, Tiszaug, Tisza-Maros) following its heavy metal contamination in 2000. The number of analysed tissue samples was 122 (branchia, liver, muscle), Cu, Zn, Cd, Pb and Hg were measured. In the course of samples preparation following the species determination of the already taken samples (VUTSKITS 1918, VÁSÁRHELYI 1961, PINTÉR 1989, GYÖRE 1995, HARKA 1997) and frost drying and homogenising the Hungarian standard, MSZ ISO 1442:2000 was applied. Destruction of the samples and the metal analyses were made in the laboratory of the Hajdú-Bihar Local Governments Waterworks cInc. Exposition was made according to a temperature program (General Guidelines for Microwave Sample Preparation, 1994.) then heavy metal determination was made from the sample diluted according to the linear measurement range (Analytical methods etc., 1976) of the device (Perkin-Elmer 5000 atomabsorption spectrophotometer).

3.2. Analysis of bream scales applying PIXE method

The question whether the change of heavy metal contamination in time in a given water area could be reconstructed by the subsequent analysis of the squama of fish living in the area (whether the pattern of the contamination in time could be determined from the radius orientated distribution of heavy metal contaminants incorporated into the growing squama) or not was raised in the course of the research. For the bream (*Aspius aspius L.*) squama investigations the μ -PIXE (Particle Induced X-ray Emission) method used in the Institute for Nuclear Research was applied which is excellent for identifying squama radius orientated element distribution. Since the measurement of such element distribution is time consuming pre-selection measurements were made using X-ray fluorescence analyses and brought out and inner beam PIXE method. Minimum detection limits (MDL) achievable by the methods applied for each element were determined. Based on the results, the optimal measurement methods were selected for each element. Apart from the element analytical investigation of the squama a macro- and a micro-element (calcium and zinc) distribution analyses were also made using the PIXE method.

3.3. Investigation of the bioaccumulation of copper in silver crucian specimens following feeding experiments

The feeding experiments were performed in the Fish Laboratory at the University of Kaposvár, Hungary. The fish species were kept in 16 fish tanks (one fish in one tank). The length of feeding period was 7 days in tank (4, 8, 11, 13), 14 days in tank (5, 9, 14, 16), 21 days in tank (1, 2, 10, 12) and 28 days in tank (3, 6, 7, 15). Our experimental model species was Prussian carp (*Carassius gibelio* B.) purchased from the Fish farm of Dinnyés. This specie was chosen as a model because of its wide tolerance range thus its rather high immunity for heavy metal loading. This assumption was found to be correct as no animal was lost during the experiment. The feed was special crucian nutrient (ALLER SAFIR) with an energy content of 4145 kcal/kg, while the composition of the dry material was as follows: Raw protein: 45%; Raw fat: 20%; Carbohydrate: 16%; Ash: 8%; Cellulose: 2%; Phosphorous: 1%. The copper was administered and mixed into the feed as $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1 kg of the feed contained 500 mg copper. For a long time well tolerable copper content range for fish is somewhere between 0.001-0.01 mg/l, depending on the physical and chemical characteristics of water and the sensitivity of the fish species. The average copper content of fish is around 0.5 mg/kg (ppm). The feeding frequency of fish was once per day. One hour after feeding – when fish did not eat any more – all remaining feed was removed from the container to prevent that long time dissolution influences the results. Several parameters for each specimen were monitored including starting weight and length, weight increase, copper consumption and feed consumption (the difference between the added and removed dry food). At the end of the feeding period the fish specimens were removed, put down and stored in refrigerator till processing (CZÉDLI 2008, 2012). During the processing of the fish they were dried, powdered and tablets were pressed. The copper content of the fish tablets was determined by PIXE (VIS 2001, STORI *et al* 2013) and ED-XRF (INJUK 2001, MATASIN *et al* 2011) methods independently. PIXE measurements were performed with the macro-PIXE experimental setup (KERTÉSZ *et al* 1999) of ATOMKI applying 2 MeV proton energy and $\sim 40\text{nA}$ beam current. This setup enables the detection of elements above magnesium and had wide range applications – including elemental analysis of biological samples – before (KERTÉSZ *et al* 2005).

The beam spot on the target was 5 mm in diameter. First the concentrations of light matrix elements (above magnesium) were measured and after that the trace element concentrations. The measurement times were 500 and 1500s respectively. During the measurement of trace elements a 25 μm thick aluminium absorber was placed between the target and the X-ray detector while during the measurement of matrix elements absorber wasn't used. The ED-XRF analysis was carried out by the setup which was

developed by ATOMKI (UZONYI 2009). The samples were excited by filtered (2-mm Al filter) primary radiation from an X-ray tube (Oxford Instrument, XTF6000BR) having Rh target. The tube was operated at 30 kV voltage and 200 μ A electron beam current. The sample probing area was approximately 25 mm², the measurement time varied between 6500-11000 s. The characteristic X-rays of elements were detected under atmospheric pressure condition enabling the detection of trace elements above manganese with high sensitivity. The evaluation of the spectra was carried out with the AXIL software (SÁNDOR *et al* 2004) in a Direct Comparison mode using the IAEA/V10 biological standard for calibration.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Analysis of the heavy metal content of fish species living in the river Tisza applying AAS method

Studying the differences in the accumulation of heavy metals experienced in the course of heavy metal content investigation of fish species in the Tisza river taken after the cyanide and heavy metal contamination, it can be stated that the primary fields of accumulation are the liver, the branchiae, the kidney and the gonads (KAPLAN *et al.* 1995, HERMESZ *et al.* 2001, LANGE *et al.* 2002). Order of the accumulated metals are liver > kidney > branchiae > skin > muscle (ADHIKARI *et al.* 2009). Interpretation of the heavy metal concentrations was based on the values determined in the effective Ministry of Health decree 17/1999 (VI. 16.). Copper and zinc values were compared to limit values for other animal harslets and for liver and kidney (NAGY *et al.* 2002). Values did not exceed the limit in the case of Hg. Increase in Hg concentrations in the muscular tissue of glanis, however, can be detected from Tiszaug downstream. Concentration of Pb exceeded the limit values in the liver of bream (Maros, 1.127 mg/kg) and in the muscular tissue of pike (storage area of the Tisza lake, 0.54 mg/kg) and pike brood (storage area of the Tisza lake, 0.837 mg/kg; in the Tisza before the outlet of the Maros). Concentration of Pb decreases from the upper Tisza towards Szeged in the bleak branchiae samples (1.111 mg/kg \rightarrow 1.036 mg/kg \rightarrow 0.306 mg/kg). Increased concentrations characterise pike-perch samples in the central parts of the Tisza while smaller lead content can be observed in the lower parts of the Tisza. Considering Cu concentrations, no overstepping of the limits was found, however, the following values were obtained: increasing values from the Upper Tisza towards the Maros river in the case of bream liver samples. Concentrations of copper in pike liver samples show linear decrease downstream (21.52 mg/kg \rightarrow 15.27 mg/kg \rightarrow 10.18 mg/kg). Increasing tendency was experienced from Tiszaug towards both upstream

and downstream in glanis liver samples. Highest values in the bleak liver samples were found just before the Bodrog inlet (5.77 mg/kg) and above Tokaj (3.41 mg/kg). Based on the measured Cd concentrations, it can be stated that the cadmium concentration of the pike muscular tissues in the Tisza lake are double the limit value while in the liver of the fish from the Maros the Cd concentration was 3.64 times the limit value. Regarding glanis, double and fourfold of the maximum limit value were measured in the liver samples of glanis from the Szamos (0.212 mg/kg) and the Maros (0.403 mg/kg). Cd content of bleak branchiae samples from the Maros were 21fold of that taken from the Szamos (0.012 mg/kg). In the case of pike-perch samples, Cd concentrations were below the limit values.

Interpretation of the differences of heavy metal concentrations in the fish of five different regions of the Tisza are illustrated by the figures of sampling area interpretation (Figures 11-21). Comparison of the limit and measured maximum values in the flesh of fish from the Tisza (mg/kg in the total mass of fish body) are presented in Figure 2 of the attachment. Hg concentration (0.249 mg/kg) above the limit was measured in the muscular tissue of bream caught in the Szamos while the concentration of the rest of the elements in the studied samples was below or around the limit value. According to FLEIT, higher Hg and Pb concentrations can be explained by that the biological availability of toxic heavy metals in the slime arrived during the contamination along the Tisza is high therefore they could enter the fish via their branchiae directly (FLEIT 2001). Heavy metal concentrations in the Upper Tisza above the Szamos inlet did not exceed the limit values. Highest Cd concentration was measured in the muscular tissue of bleak in the Tisza above Vásárosnamény while Zn approached the limit value in the branchiae of bream. In the rest of the samples the concentration of heavy metals stayed below the detection limit. Above the Bodrog inlet high Zn concentrations were measured in the branchiae of pike and pike brood (231.1 mg/kg and 171.1 mg/kg) while Cu and Pb concentrations stayed below the limit in the pike and pike brood samples. Highest Cd concentrations were measured in pike brood branchiae (0.005 mg/kg) and in bleak liver (~0.049 mg/kg). Maximum values of Hg concentration were measured in pike muscular tissue (0.176 mg/kg). Concentrations of the studied elements stayed below the limit above Tokaj and the maximum concentration of Zn was measured in pike branchiae (95.4 mg/kg). Highest Zn concentration in the Tisza lake storage area was measured in pike branchiae (184 mg/kg) and in pike brood branchiae (120.7 mg/kg). Cu, Cd, Hg values did not exceed the limit while Pb values measured in muscular tissues exceeded the limit in the cases of pike (0.54 mg/kg), pike-perch (2.033 mg/kg) and pike brood (0.837 mg/kg). In the section in the Tisza lake high Zn concentration (109.2 mg/kg) was measured in pike brood branchiae. In the case of Cu values did not exceed the limit while the concentration of the rest of the elements was less than the detection limit. Comparing

the pike-perch and pike-perch brood samples taken from below the dam at Kisköre, no significant differences can be observed regarding Zn, Cu and Hg. Highest Pb content (0.885 mg/kg) was measured in pike-perch brood branchiae. Values higher than the limit were obtained around Tiszaug in the following samples: pike brood branchiae (Zn 158.2 mg/kg), liver (Hg 0.148 mg/kg) and pike-perch liver (Hg 0.104 mg/kg). Before the Maros inlet the concentration of Cu and Cd remained below the limit in the samples while Pb (0.668 mg/kg) and Hg (0.210 and 0.212 mg/kg) concentration in pike brood and bleak muscle exceeded the limit. Based on the studied heavy metals the Maros river was the most contaminated (Figure 21) even though the contamination at 2000 did not affect this area. Bioaccumulation detectable in fish living in the Maros due to the effects of active industry in Transylvania was proved by later investigations as well (KOVÁCS & KISS 2010). I compared the concentration of heavy metals accumulated in the organs of pikes to the age of the fish studied. Results support the idea that the level of material of anthropic origin accumulated in fish depends on the size and age of fish (PHILIPS 1980, BEUMER & BACHER 1982). Heavy metal accumulation in fish is different depending on age. Heavy metals get into younger fish due to intensive eating and they cannot control intake and elimination (PHILIPS 1969).

4.2. Analysis of bream scales with PIXE method

Element analysis of bream fish-scale was performed using ED-XRF and PIXE methods. Metal content accumulated in the scale was studied by X-ray fluorescent analyses by the 60 keV gamma ray of ^{241}Am as a “selection analysis” then in secondary target setting as well. Following these the detection of heavy metals was performed using the PIXE method with brought out beam and with inner beam. It was found that in the case of element number $Z < 31$ the application of the inner beam PIXE method (KERTÉSZ *et al.* 2005) is practical while in the case of element number $Z > 31$ the X-ray fluorescent analysis is the more effective pre-selection method. In the case of brought out beam setting, X-ray peaks associated with lighter elements (P, Ca) are more while peaks associated with heavier elements (Zn, As, Se, Br, Sr) are less intense (CZÉDLI *et al.* 2011). Macroelements, microelements, transitional metals and heavy metals have been detected in the fish-scale. Local accumulations can be observed in the distribution curves taken along the line in the case of Ti, V, Fe, Cu, Zn, Pb. In case Zn concentration is high, Fe, Pb, Cu and Ti are present also in higher concentration. These maximum values can be associated to outer micro-pollutant load. Heavy metal contamination seldom means contamination with only one element, mostly a group of chemical elements are responsible for the pollution. In the course of the determination of the surface distribution of Ca and Zn using the PIXE method calcium distribution was detected corresponding to the grade of calcification therefore based on the Zn

distribution and fish-scale growth intensity the time at which the detected metal load affected the fish can be given (CZÉDLI *et al* 2014b).

4.3. Investigation of the bioaccumulation of copper in silver crucian specimens following feeding experiments applying PIXE and ED-XRF methods

Copper accumulation measurements in Prussian carps (*Carassius gibelio B.*) from feeding experiments were made using the ED-XRF (INJUK & GRIEKEN, 2001) and PIXE (VIS 2001) methods. Ca (25500-60100 ppm), P (14000-23700 ppm), K (9500-12150 ppm) are present in the samples in large quantity as major elements while S (6500-8400 ppm), Cl (3100-4600 ppm), Fe (110-850 ppm), Zn (150-260 ppm), Sr (100-380) can be detected in lower concentrations. It was also possible to detect V (4-8 ppm), Cr (2-14 ppm), Mn (5-17 ppm), Cu (5-11 ppm) és Br (40-70 ppm) present in the samples in very low concentrations. Analysing the connection between copper content and copper consumption it is clear that the amount of copper accumulated in the fish increased together with the amount of consumed food during the experiment. This was proved by both the ED-XRF and PIXE measurements. Concentration of the accumulated Cu in the fish was possible to be detected in a short period of exposition time (7, 14, 21, 28 days) (CZÉDLI *et al.* 2008). Our experiments proved that PIXE and ED-XRF methods are capable of the quantitative analysis of different metals (V, Cr, Mn, Cu, Br) at trace level in the body of fish. It was possible to detect the accumulation of Cu in the fish after a short period of exposition time (7-28 days). Our results show that the average copper concentration in the body of fish increases with the amount of consumed copper by them. Consequently fish is a promising candidate for the monitoring of heavy metals in water (CZÉDLI *et al* 2014a).

Summary of the new scientific results

- We verified by the analysis of pike specimens that the amount of accumulated lead in their body depends on their size and age
- Analyzing fish scale targets we concluded that the sensitivity of PIXE method is decreasing while the sensitivity of XRF method is increasing with the increase of the atomic number
- We concluded that micro-PIXE method enables the investigation of the extent and time dependence of the pollution by the analysis of the lateral distribution of polluting metals in fish scales
- We proved that PIXE under vacuum conditions (for $Z \leq 31$) and XRF (for $Z > 31$) are effective methods for the pre-selection of fish scales for further more thorough analysis
- We proved that the accumulated copper content in the body of fish can be detected and quantitatively analyzed already after a short exposure time
- We proved that the concentration of those elements which have an influence on the physiological state of fish, relative to calcium is an effective indicator of the changes in water environment already after a short exposure time
- We tested and optimized analytical methods for the detection of toxic elements in fish at trace level

FELHASZNÁLT IRODALOM / REFERENCES

- ADHIKARI, S., GHOSH L., GIRI, B.S., AYYAPPAN, S. (2009): Distributions of metals in the food web of fishponds of Kolleru Lake, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 72, Issue 4, May 2009, 1242-1248.
- ARDELEAN, G., WILHELM, S. (2007): A színesfém-kitermelés hatása a halfaunára a Lápos folyó medencéjében. *Agrártud. Közl. Pisces Hungarici I. I.* Magyar Haltani Konferencia (Supplement kötet): 6-8.
- BEUMER, J. P., BACHER, G.J. (1982): Species of anguilla as indicators of mercury in the coastal rivers and lakes Victoria, Australia. *J. Fish Biol.*, 21: 87-94.
- CZÉDLI, H., KÓPICZ, B., HAN CZ, Cs., SZIKSZAI, Z. (2008): Effect of copper exposition in Silver Crucian (*Carassius auratus* L.) determined by PIXE analytical method. *Acta Pericomonologica rerum ambientum Debrecina*, Tomus 3. Debrecen 2008. 139-144.
- CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2011): Elemanalitikai módszerek összehasonlítása halak nehézfém-tartalmának kimutathatósága szempontjából. Miskolci Egyetem, *Multidiszciplináris tudományok*, 1. kötet, 1. szám, 349-356.
- CZÉDLI, H., JOLÁNKAI, G., HAN CZ, Cs., NAGY, S. A. (2012): PIXE Monitored Laboratory Feeding Test for Bioaccumulation of Copper *Journal of environmental science and engineering A* Vol.1:(No.6) pp. 802-807.
- CZÉDLI, H., SZÍKI G. Á. (2012): Nehézfém-felvétel időbeli alakulásának vizsgálata PIXE módszerrel. *Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban 2012 konferencia előadásai*. Szerkesztette: Pokorádi László. Debreceni Akadémiai Bizottság Műszaki Szakbizottsága, Debrecen 2012. ISBN 978-963-7064-28-9, 315-322.
- CZÉDLI, H., CSEDREKI, L., SZÍKI, G. Á., JOLÁNKAI, G., PATAKI, B., HAN CZ, Cs., ANTAL, L., NAGY, S. A. (2014a): Investigation of the Bioaccumulation of Copper in Fish- *Fresenius Environmental Bulletin* 23:(6) Paper F-2013-769: in press.
- CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á., NAGY, S. A. (2014b): Examination of Heavy Metal Accumulation in Fish Scale Samples of *Aspius aspius* L. by Micro-PIXE Analytical Method – *Journal of Animal and Veterinary Advances* 13: 372-376.
- FAUSCH, K. D., LYONS, J., KARR, J. R., ANGERMEIER, P. L. (1990): Fish communities as indicators of environmental degradation. p. 123-144. In: ADAMA, S. M. (ed.): *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society, Symposium 8, Bethesda, Maryland.
- FERENC, L. (2006): Lessons learned from the cyanide and heavy metal accidental water pollution in the Tisa river basin in the year 2000. p. 43-50. In: DURA GY., KAMBOUROVA V., SIMEONOVA F. (eds.): *Management of Intentional and Accidental Water Pollution*. Springer Netherlands.
- FLEIT, E. (2001): Nehézfém mintázatok a tiszai csuka (*Esox lucius* L.) állományban. – *Halászat* 94/3: 119-124.

- GULYÁS, P. (2002): A Szamos és a Tisza folyók romániai eredetű cianidszennyezése által okozott környezeti és természeti károk felmérésének eredményei. – *Acta biologica debrecina: Supplementum oecologica hungarica* 11/2: 37-66.
- GYÖRE, K. (1995): Magyarország természetes vízi halai. Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest, pp. 339.
- HARKA, Á. (1997): Halaink. Képes határozó és elterjedési útmutató. Budapest.
- HERMESZ, E., ABRAHAM, M., NEMCSOK, J. (2001): Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. *Comp. Biochemistry Physiology, Part C*, 128: 457- 465.
- INJUK, J., VAN GRIEKEN, R., (2001): X-ray fluorescence, In: *Non-destructive elemental analysis*, Zeev Alfassi B., (Ed.), Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom, 151-178.
- KAPLAN, L. A. E., VAN CLEEF, K., WIRGIN, I., CRIVELLO, J.F. (1995): A comparison of RT-PCR and Northern Blot Analysis in Quantifying Metallothionein mRNA Levels in Killifish Exposed to Waterborne Cadmium. *Marine Environmental Research*, 39: 137-141.
- KÁDÁR, I. (1995): Környezet és természetvédelmi kutatások: A talaj-növény-állat-ember tápláléklánc szennyeződése kémiai elemekkel Magyarországon. Budapest: A Környezet- és Területfejlesztési Minisztérium és az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete kiadványa, pp.388.
- KÁDÁR, I. (1995): A talaj-növény-állat-ember tápláléklánc szennyeződése kémiai elemekkel Magyarországon. Akaprint. KTM, MTA TAKI, Budapest. 9, 373, 388.
- KÁDÁR, I. (2001): A tápláléklánc szennyeződése nehézfémekkel, mikroelemekkel. *Magyar Tudomány*. 5: 566-575.
- KERTÉSZ, Zs., BORBÉLY-KISS, I. and HUNYADI, I. (1999) Study of aerosols collected in a speleotherapeutic cave situated below Budapest, Hungary. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 150, 384-391.
- KERTÉSZ, Zs., SZIKSZAI, Z., UZONYI, I., SIMON, A., KISS, Á. Z. (2005): Development of a bio-PIXE setup at the Debrecen scanning proton microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 231: 106-111.
- KOVÁCS, E., KISS, T. (2010): Nehézfém bioakkumuláció marosi halakban: Potenciális környezeti veszélyforrás a Maros mentén élőkre? – *Hidrológiai közlöny* 90/5: 51-54.
- LANGE, A., AUSSEIL, O., SEGNER, H. (2002): Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 131, 231-243.
- LASNE, E., BERGEROT, B., LEK, S., LAFFAILLE, P. (2007): Fish zonation and indicator species for the evaluation of the ecological status of rivers: example of the Loire Basin (France). – *River Research and Applications* 23/8: 877-890.

- MATASIN, Z., ORESCANIN, V., JUKIC, V.V., NEJEDLI, S., MATASIN, M. and GAJGER, I.T. (2011): Heavy Metals in Mud, Water and Cultivated Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Bighead Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Croatia, *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10(8), 1069-1072.
- NAGY, S. A., DÉVAI, GY., CZÉGÉNY, I. (2000): Javaslat egy új mutató, a veszélyeztetettség állapot (perniciozítás) bevezetésére a vízminősítésben és a halászatbiológiában – *Halászatfejlesztés* 24: 184-191.
- NAGY, S. A., CZÉGÉNY, I., CZÉDLI, H., DÉVAI, GY. (2002): Adatok a tiszai halfajok nehézfém-tartalmának felméréséhez – *Halászatfejlesztés* 27: 55-62..
- PHILLIPS, A. M. JR. (1969): Nutrition, digestion and energy utilization. *Fish Physiology* Vol. I. Excretion, Ionic regulation and metabolism. (Eds. Hoar, W. S. & Randall, D.J.) 391-432. New York: Accademic Press.
- PHILLIPS, D. J. H. (1980): Quantitative aquatic biological indicators. *Applied Science Publishers*, London.
- PINTÉR, K. (1989): Magyarország halai. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp.202
- REGŐSNÉ, KNOSKA J. (2001): A cianid-kiömlést okozó bányaszerencsétlenségek és a környezeti felelősségvállalás kérdése. Műszaki információ.- *Környezetvédelem* 3-4: 3-5.
- SALÁNKI, J., VARANKA, I. (1978): Réz- és ólomkomponensek aktivitása édesvízi kagylókban. *Anna. Biol. Tihany* 43: 21-27.
- SÁNDOR, Zs., ONCSIK, B. M., CZUCZI, M., CSENGERI, I. and GRESITS, I. (2004) Comparison of different quantitative X-ray fluorescence methods using reference standard materials. *Academic and Applied Research in Military Science* 3(3), 333-337.
- SOLDÁN, P., PAVONIC, M., BOUCEK, J., KOKES J. (2001): Baia Mare accident--brief ecotoxicological report of Czech experts. – *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 255-261.
- STORI, E.M. ROCHA, M.L.C.F., DIAS, J.F., DOS SANTOS, C.E.I., DE SOUZA, C.T., AMARAL, L. and DIAS, D.F. (2013) Elemental characterization of injuries in fish liver, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/>
- UZONYI, I. and PINTYE, Z. (2009) Report on the development of an XRF set-up with X-ray tube excitation. ATOMKI Annual Report. <http://www.atomki.hu/ar2009/ar2009.pdf>
- VÁSÁRHELYI, I. (1961): Magyarország halai írásban és képekben. *Borsodi Szemle Könyvtára*, Miskolc, pp. 135.
- VIS, R. D. (2001): Charged particle-induced X-ray emission, In: *Non-destructive elemental analysis*, Zeev B. Alfassi (Ed.) Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom, 233-275.
- VUTSKITS, GY. (1918): Pisces. In: *Fauna Regni Hungariae*. Budapest, pp.42.

TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG JEGYZÉKE

Az értekezés témakörében, impakt faktoralal rendelkező folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke:

H. CZÉDLI, L. CSEDREKI, Á. G. SZÍKI, G. JOLÁNKAI, B. PATAKI, Cs. HANCZ, L. ANTAL, S. A. NAGY (2014a): Investigation of the Bioaccumulation of Copper in Fish-*Fresenius Environmental Bulletin* 23:(6) Paper F-2013-769: in press. **IF: 0,641**

H. CZÉDLI, Á. G. SZÍKI, S. A. NAGY (2014 b): Examination of Heavy Metal Accumulation in Fish Scale Samples of *Aspius aspius* L. by Micro-PIXE Analytical Method – *Journal of Animal and Veterinary Advances* 13: 372-376 **IF: 0,365**

Az értekezés témakörében impakt faktoralal nem rendelkező, lektorált folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke:

NAGY, S.A., CZÉGÉNY, I., CZÉDLI, H., DÉVAI, GY. (2002): Adatok a tiszai halfajok nehézfém-tartalmának felméréséhez. *Halászatfejlesztés* 27: 55-62.

NAGY, S. A., DÉVAI, GY., CZÉGÉNY, I., CZÉDLI, H., SOÓS, N. (2003): Adatok a Tisza vízrendszerében élő halfajok nehézfém-tartalmának felméréséhez, hosszszelvényben végzett mintagyűjtés alapján *Hidrológiai közlöny* 83: 105-107.

H. CZÉDLI, B. KÓPICZ, Cs. HANCZ, Z. SZIKSZAI (2008): Effect of copper exposition in Silver Crucian (*Carassius auratus* L.) determined by PIXE analytical method. *Acta Pericemonologica rerum ambientum Debrecina*, Tomus 3. Debrecen 2008. 139-144.

CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2011): Elemanalitikai módszerek összehasonlítása halak nehézfém-tartalmának kimutathatósága szempontjából. Miskolci Egyetem, Multidiszciplináris tudományok, 1. kötet, 1. szám, 349-356.

H. CZÉDLI, - G. JOLÁNKAI, - Cs. HANCZ, - A. S. NAGY (2012): PIXE Monitored Laboratory Feeding Test for Bioaccumulation of Copper *Journal of environmental science and engineering* A Vol.1:(No.6) pp. 802-807.

CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2012): Nehézfém-felvétel időbeli alakulásának vizsgálata PIXE módszerrel. *Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban 2012 konferencia előadásai*. Szerkesztette: Pokorádi László. Debreceni Akadémiai Bizottság Műszaki Szakbizottsága, Debrecen 2012. ISBN 978-963-7064-28-9, 315-322.

Az értekezés témakörében elhangzott előadások jegyzéke:

- CZÉDLI, H., KÓPICZ, B., HANCZ, Cs.(2008): Réz-expozíció vizsgálata ezüstkárászokban PIXE módszerrel. IV. Kárpát-medencei környezettudományi konferencia 2008. márc. 28-29. Debrecen.
- CZÉDLI, H., SZIKSZAI, Z., HANCZ, Cs. (2010): Takarmányon át felvett réz-akkumuláció vizsgálata ezüstkárászokban PIXE módszerrel. VI. Kárpát-medencei környezettudományi konferencia 2010.ápr.22-24. Nyíregyháza.
- CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2011): Elemanalitikai módszerek összehasonlítása halak nehézfém-tartalmának kimutathatósága szempontjából. Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban, 2011. május 18. Miskolc.
- CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2011): Vízminőség a mérnöki gyakorlatban- antropogén eredetű nehézfémterhelés, bioakkumuláció monitorozás elemanalitikai módszerekkel. XVII. Épületgépészeti, Gépészeti és Építőipari Szakmai Napok, szakkiállítás és nemzetközi tudományos konferencia. 2011.okt.13-14. Debrecen
- CZÉDLI, H., SZÍKI, G. Á. (2012): Nehézfém-felvétel időbeli alakulásának vizsgálata PIXE módszerrel. Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban, 2012. május 10. Szolnok.

Egyéb megjelent publikációk jegyzéke:

- B. PATAKI, G. JOLÁNKAI, I. ZSUFFA, H. CZÉDLI (2013): Integrating riparian wetlands into river basin management – towards an ecohydrological approach. Understanding Freshwater Quality Problems in a Changing World Proceedings of H04, IAHS-IAPSO-IASPEI Assembly, Gothenburg, Sweden, July 2013 (IAHS Publ. 361, 2013) 353-360.
- MOLNÁR, A., CZÉDLI, H., BRAUN, M. (2012): Közúti járműforgalom és nehézfém terhelés : közlekedési eredetű nehézfémek urbánökológiai hatásainak vizsgálata Debrecen forgalmi csomópontjaiban. Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban 2012 konferencia előadásai. Szerkesztette: Pokorádi László. Debreceni Akadémiai Bizottság Műszaki Szakbizottsága, Debrecen 2012. ISBN 978-963-7064-28-9, 629-638.
- MOLNÁR, A., PATAKI, B., CZÉDLI, H., BRAUN, M. (2013): A közúti közlekedésből származó nehézfémek hatásainak vizsgálata Debrecen forgalmi csomópontjaiban. Fiatal Műszakiak Tudományos Ülészaka XVIII. Kolozsvár, 2013. márc. 21-22.