

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Antropogén eredetű környezetterhelés
tesztelése és szoftveres módszerek fejlesztése**

Málik-Roffa Hajnalka

Témavezető neve: Dr. Mizser Szabolcs
adjunktus



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023

Bevezetés

Az ökoszisztémákra gyakorolt antropogén hatások sokrétűek és következményeik nehezen értelmezhetők a biodiverzitásra. Az egyes tényezők hatását stresszfaktoron belül lehetetlen elkülöníteni [Hilborn és Stearns, 1982; Underwood, 1997].

A globális antropogén tevékenységek, mint például a mezőgazdaság, az erdőgazdálkodás és az urbanizáció mind jelentős változásokhoz vezetnek a környezetben [Kerr és Currie, 1995]. A környezeti paraméterek megváltozása nyomást gyakorol az ott élő szervezetekre, módosítva viselkedési paramétereiket: aktivitást, felfedezőkézséget, merészséget vagy akár fenológiát, kondíciót, mindemellett a termékenységre is hatással lehet [Wong, 2015; Cote és mtsai., 2010]. Az ökológiai vizsgálatoknál a terepi mintavételezés mellett fontos szerepük van a helyesen megválasztott laboratóriumi vizsgálatok, illetve a statisztikai módszereknek. A jól számszerűsített laboratóriumi vizsgálatok alapvető információt adhatnak az állatok viselkedéséről az ökológiai, etológiai és ökotoxikológiai kutatásokban. Az ilyen típusú vizsgálatok megkövetelik a tanulmányozott állatok ismeretét, megfigyelését és nyomon követését jól ellenőrzött és meghatározott szintereken [Panadeiro és mtsai., 2021]. Számos tudományágban, mint a viselkedés- és az evolúciós ökológia, illetve az etológia a kulcskérdés az, hogyan lehet számszerűsíteni a vizsgált organizmusok aktivitását és/vagy mozgását. A mozgás is döntő paraméter, és gyakran használnak proxyt az emberrel összefüggő stresszorok, vegyszerek és gyógyszerek hatásának értékelésére [Seehausen és mtsai., 1997]. Az ízeltlábúak mozgása tanulmányozásának egyik elterjedt módja a mesterséges laboratóriumi vizsgálati arénák, ahol rövid időn át tartó videofelvételeket készítenek az egyedek mozgásáról, majd a videók segítségével történik a kiértékelés [Zaller és mtsai., 2015]. Ma már több szoftver kínál megoldást az ökológiai problémák és feladatok modellezésére és feldolgozására. Az algoritmusok fejlődésével ezek a szoftverek is fejlődnek és újak jelennek meg [Málik-Roffa és mtsai., 2023].

A technika fejlődésének nemcsak kedvező hatásait érezhetjük, hanem környezeti terheléssel járó folyamatokat is

tapasztalhatunk főleg a városi területekre koncentrálódva [Cachada és mtsai., 2013]. A szárazföldi élőlények életkörülményeit súlyosan befolyásolhatják az élőhelyükön bekövetkező legkisebb változások is. Az egyik legelterjedtebb stressztényező a talajban a túlzott toxikus elemkoncentráció [Sharma és mtsai., 2018]. A talajban fellelhető elemek egy csoportja (pl. fémek) potenciális koncentrációfüggő kockázatot jelent a környezetre. A szakirodalom gyakran potenciálisan mérgezőként említi ezeket az elemeket [Antoniadis és mtsai., 2019; Xiao és mtsai., 2022].

A környezeti stressztényezők hatásai az egyedek mikroelem összetételében és koncentrációiban jól láthatóak, valamint a morfológiai paramétereikben és testi szimmetriájukban a változások vizsgálhatóak [Palmer és Strobeck, 1992; Jones és Hopkin, 1998; Ribera és mtsai., 2001; Witzel, 2000; Weller és Ganzhorn, 2004; Skalski és mtsai., 2010; Godet és mtsai., 2011; Simon és mtsai., 2016]. Ezért nagyon hatékonyak bizonyulnak az emberi tevékenységek hatásainak monitorozására. Nagy denzitása és könnyű gyűjthetősége miatt a csapdázott egyedekből kiválasztott *Silpha tristis* faj alkalmas lehet hasonló vizsgálatokra. Ebben a kérdéskörben még igen kevés irodalmi forrás áll rendelkezésünkre.

Célkitűzés

A kutatásaim célja megismerni az antropogén eredetű környezetterhelések hatását terepi vizsgálatok és szakirodalmi adatok elemzésével, figyelmet fordítva a morfológiai változásokra és a mikroelem-összetételre. Emellett kiemelten fontos cél volt egy olyan könnyen kezelhető, operációs rendszertől független mozgásdetektáló program létrehozása, mely a legújabb algoritmusok által alkalmas lehet a viselkedéselemzéseknél használt vizsgálatok számszerűsítésére, és segít csökkenteni az emberi tényezők okozta hibalehetőségeket. Igen fontos, hogy ez a program a gyakorlatban jól használható és bárki számára könnyen hozzáférhető legyen. Céлом volt az is, hogy a program nyílt forráskódú legyen, amely akár nagyfokú átprogramozásra vagy fejlesztésre egyaránt lehetőséget ad külső programozók számára is, megnövelve így a program további fejlesztési lehetőségét.

*Környezetterhelés hatásainak tesztelése *Silpha tristis* egyedek mikroelem-összetételére és morfológiájára*

Környezetterhelés hatásainak vizsgálata volt az egyik kiemelt cél, amelyet mikroelem-összetétel vizsgálattal és testi szimmetria adatokkal elemeztünk és értékeltünk ki. Az alumínium, bór, bárium, kalcium, réz, vas, kálium, magnézium, mangán, nátrium, foszfor, kén, stroncium és cink koncentrációk elemzése egyedenként történt. Ezen kívül FA (fluktuáló aszimmetria) analízist is végeztünk a bilaterális szervek paramétereinek mérésével.

Földigilisztafajokban felhalmozódó fémek metaanalízise

Hiteles áttekintést szerettünk volna nyerni különböző kontroll és szennyezett mintavételi területekről gyűjtött földigilisztafajok fémakkumulációjáról, mivel a földigiliszták túlzott talajelem-koncentrációra adott válaszaik könnyen tanulmányozhatóak. Azonban a publikált eredmények a fémek egyedekben történő felhalmozódásáról ellentmondások. Szerettük volna, ha arzén, kadmium, króm, réz, nikkel, ólom és cink teljes testkoncentrációira

vonatkozó publikált adatok, szennyezett és nem szennyezett (kontroll) talajokból gyűjtött egyedekben metaanalízisek segítségével kiértékelésre kerülnek. Ezen kívül felmértük a talaj pH-értékének és az expozíciós időnek, mint a fémfelhalmozódást potenciálisan befolyásoló tényezőnek a szerepét is [Tözsér és mtsai., 2022].

Ízeltlábúak mozgását nyomon követő szoftver tervezése és megírása

Az etológiában és az evolúciós ökológiában kulcskérdés az, hogyan lehet számszerűsíteni a vizsgált organizmusok aktivitását/mozgását, melyek fontos paraméterek. Gyakran használnak proxyt az emberrel összefüggő stresszorok, vegyszerek és gyógyszerek hatásának értékelésére [Seehausen és mtsai., 1997]. Ezért ezek nagyon precíz és pontos módszerek a mozgásmérésre alkalmazott noninvazív technikákkal [Dell és mtsai., 2014]. Az ízeltlábúak mozgása tanulmányozásának egyik elterjedt módja a mesterséges laboratóriumi vizsgálati arénák rövid időn át felvett videofelvételek segítségével [Zaller, 2015].

Az összetett, képkockánkénti elemzésekre képes videókészítő termékek és nagy teljesítményű személyi számítógépek elérhetősége egyre inkább megvalósíthatóvá teszi az állatok mozgásának rögzítését és mérését [Richard és Margaret, 1988]. A cél egy olyan szoftver létrehozása volt, amely rendkívül nagy pontosságú, könnyen kezelhető még programozói ismeretek nélkül is, csökkentve ezáltal az emberi erőforrás igényt is. Fontos szempont volt, hogy a videó minősége minél kisebb részben befolyásolja az elemzés kimenetelét, így a felvétel körülményei és eszközei igen változatosak is lehessenek.

Anyag és módszer

Terepi mintavétel

A minták Debrecen egyik külvárosi részéről, a Lovász-zugi területéről – ahol korábban tavak voltak – származnak. Az 1930-as évektől az 1950-es évekig a vizsgált terület másodlagos biológiai tisztító egységként működött. A tisztítóművek fejlesztése a 2000-es évek elejétől a tőrendszer felszámolását eredményezte. Ennek következtében rekultivációs lépések indultak az elemekkel (elsősorban fémekkel) szennyezett szennyvizet célzóan. Kezdetben a homokot egy távoli homokbányából szállították. A két (iszap és homok) komponens összekeverése nélkül változó vastagságban terítették a simított iszapfelületre. A terület felszíne enyhén egyenetlen maradt a simítások ellenére is. Ennek következtében az időszakos vízborítás gyakorisága és időtartama eltérő lett a vizsgált terület egyes részein; az északi résztől a déli rész felé csökken. 2013 szeptemberében egy kármentesítési eljárás során a *Salix viminalis* (kosárkötőfű) 5800 egyedét ültették el 20 cm-es gyökerező dugványként 5 × 8 m-es eloszlásban, elsősorban az elemek stabilizálása céljából [Tőzsér és mtsai., 2018]. A vizsgálatban résztvevő egyedek ezen területről származnak. A terület 3 részre különíthető el. Az 1. terület a szennyezett, a 2. és a 3. számmal jelzett területek pedig mérsékelt és enyhén szennyezettek.

A *Silpha tristis* egyedeket élvefogó csapdával gyűjtöttük áprilisban és októberben. Az egyedeket a gyűjtést követően zárható polietilén tasakba helyeztük, majd ezt követően fagyasztva, -15 °C-on tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig. Minden mintavételi helyen 20 db csapdát használtunk, amelyeket minden harmadik napon ürítettünk. A begyűjtött egyedeket *Silpha* nemzetség szinten különítettük el, majd a vizsgálatok megkezdése előtt kerültek faji szintű meghatározásra. A fajokat standard kulcsok segítségével azonosítottuk [Boros és mtsai., 1961].

A metaanalízishez szükséges szakirodalmi áttekintés és adatgyűjtés

A metaanalízishez a Web of Science 1975 és 2022 közötti időszakra vonatkozó adatbázisaiban végzett szakirodalmi kereséssel gyűjtöttük össze a szükséges adatokat. A keresés során a következő kifejezéseket használtuk: TOPIC = (earthworm) AND TOPIC = (metal) AND TOPIC = (accumulation). Az összes érintett publikáció megtalálásához áttekintettük az eredményül kapott közlemények irodalomjegyzéke is. A publikációkat megfelelőnek ítéltük a metaanalízishez abban az esetben, ha azok tartalmazták az átlagos koncentrációkat (mg/kg^{-1} , szárazanyag) szórásaikkal és mintanagyságukkal egy vagy több releváns fémelemre (arzén, kadmium, króm, réz, nikkel, ólom, cink) földigilisztafajok egész testében, szennyezett és a kontroll területéről gyűjtve, ez utóbbit nem tekintettünk szennyezettnek [Tózsér és mtsai., 2022].

Morfometriai vizsgálati módszerek

A morfometriai vizsgálatok érdekében szükség volt az egyed részeinek digitalizálására. Első lépésként fényképeket készítettünk, erre Olympus C-7070 digitális kamerát használtunk, Olympus SZX7 sztereomikroszkópra szerelve. A fotódokumentáció során kalibrációs tárgylemezt használtunk. A boncolás során a fém eszközöket mellőztük a későbbi toxikus elem vizsgálatok miatt. A műveletek során az egyedeket nedvesen tartottuk, hogy a száradás miatt ne változzanak az eredeti testi paraméterei. A metrikus bélyegek fotódokumentációja az egyedek testéről leválasztva történt, hogy növeljük a mérési pontosságot. A méréseket háromszoros ismétléssel végeztük a Winimag 1.0 program alkalmazásával.

Silpha tristis egyedek morfometriai vizsgálata

A *Silpha tristis* egyedek metrikus paramétereit még a mikroelem összetétel meghatározása előtt mértük. Először a pronotum szélességét és a test hosszát határoztuk meg. Az egyedek stabilitását üveggyöngyökkel értük el. A testhossz és a pronotum mérése után eltávolítottuk a lábakat a pontosabb mérés érdekében. A lábakon minden esetben a femur és a tibia került mérésre. A lábak után az antennák is eltávolításra kerültek. A jobb és bal oldali antennákon

kerültek mérésre az antennomerek bal oldalon és jobb oldalon. Ezeket a méréseket követően az elytrumon kerültek mérésre a kijelölt pontok szintén jobb és bal oldalon. Legvégül a hártás szárny került elválasztásra, a szárnyakat kalibrációs tárgylemezre helyeztük és egy csepp desztilláltvíz segítségével szétterítettük a fotó elkészítéséhez, majd mértük a radiuson és a subcostán felvett mérési pontokat.

*Mikroelem összetétel analízis a *Silpha tristis* egyedek laboratóriumi feltárásával*

A minták feltárását Braun és mtsai. [2009, 2012], Simon és mtsai. [2011, 2017], valamint Papp és mtsai. [2019] korábbi publikációi nyomán végeztük. A *Silpha tristis* egyedeket szárítószekrényben szárítottuk 105 °C-on 24 órán keresztül (tömegállandóságig). Ezután atmoszférikus nyomáson történő roncsolást alkalmaztunk 2 ml 65 % (m/m)-os salétromsav és 0,5 ml hidrogén-peroxid hozzáadásával 100 °C-on. Az egyedek esetében egyedenkénti roncsolás történt, míg a ledarált, homogenizált avarmintákból és talajmintákból 0,2 g mennyiséget használtunk fel. A mikroelem koncentrációk meghatározását ICP-OES Agilent 5110 készülékkel végeztük el.

*A bioakkumulációs faktor (BAF) számítása *Silpha tristis* egyedeknél*

A BAF értékek meghatározásának számításának menete a következő: $BAF = C_{\text{egyed}} / C_{\text{talaj}}$, ahol C_{egyed} a *S. tristis*-ben kimutatott fémkoncentráció (mg/kg⁻¹, szárazanyag), C_{talaj} pedig a talajból kimutatott fémkoncentráció (mg/kg, szárazanyag) [Li et mtsai., 2007; Rezvani és Zaefarian, 2011; Arnot és Gobas, 2006; Avgin, 2010]. Ha a számítás eredményeként kapott érték nagyobb, mint 1 az élő szervezetben az adott környezeti elemből, akkor akkumuláció történt, ha pedig az az érték kisebb, mint 1, akkor nem beszélhetünk akkumulációról.

*Fluktuáló aszimmetria (FA) analízis a *Silpha tristis* egyedek morfológiai paraméterei alapján*

Az aszimmetria irányítottságát vizsgáltuk, amely az egyes bélyegekre számított aszimmetria értékek (J-B) átlagának a nullától való eltéréseivel határozható meg. A morfológiai változók

különbségében nincs jelen a direkcionális aszimmetria, az értékek normál eloszlást követnek ($p < 0,05$). Az FA analízist Palmer [1994] munkája alapján végeztük. A Palmer-féle index értékét a jobb és bal oldali bélyegek mintacsoportonkénti (mintavételi területek és ivar) átlagértékeivel számítjuk ki $FA = ([J-B]) / ((J+B) / 2)$. A mintavételi területek, valamint a hímek és a nőtények közötti különbségeket az FA mértéke alapján varianciaanalízissel teszteltük.

A metaanalízisbe vont szakirodalmi adatok statisztikai értékelése

A metaanalízishez a torzítatlan standardizált átlagkülönbséget (Hedges' g) számítottuk a szennyezett - nem szennyezett összehasonlítások közös hatásméretéként.

A földigiliszta fajok hatásának becslésére a véletlenszerű hatások modelljét használtuk, amely kiküszöböli a közös hatás méretének korlátait a kísérleti körülmények, a tervezés és az egyedi vizsgálatok során alkalmazott módszerek nagy eltérései alapján [Borenstein és mtsai., 2009]. A véletlen hatású modellek fő előnye, hogy valószínűbb, mint a fix hatású modelleké; a hatásméret eloszlását a tanulmányok közötti valós különbségeknek mutatják, ahelyett, hogy a mintavételi hibát feltételeznék a hatásméret-változások egyetlen okaként [Borenstein és mtsai., 2009]. Az egyes vizsgálatokhoz több hatásméretet is számoltunk, ezért a véletlen-hatás modellekben egy véletlenszerű hatást alkalmaztunk beágyazó tényezőként. Az átlagos hatásméretet statisztikailag szignifikánsnak tekintettük abban az esetben, ha a 95 %-os bootstrap konfidenciaintervallum (CI; 999 iteráció) nem tartalmazott nullát.

BugTracker fejlesztésének redményei

A BugTracker azért hoztuk létre, hogy a létező megoldásoknál újabb nyomkövetési algoritmust használva, egy meghatározott viselkedési paraméter tesztelésére legyen optimalizálva, ezzel megkönnyíteni a mérési és kiértékelési folyamatot, illetve megnövelni az ismételhetőséget. A CSRT (diszkriminatív korrelációs szűrő csatornával és térbeli megbízhatósággal) algoritmust használja a program, amit így kevésbé befolyásolja a fényerő és a fényviszonyok közötti különbségek a vizsgálni kívánt területen [Málik-Roffa és mtsai., 2023]. Használata nem igényel programozási ismereteket. A

BugTracker a GNU General Public License v3.0 alatt érhető el, a GitHubon telepítési és használati útmutatóval: <https://github.com/Roffagalaxis/Bugtracker> (letöltve: 2023. március 29.).

Új tudományos eredmények

A Silpha tristis egyedek esetében végzett mikroelem-összetétel analízis eredményei

1. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mintavételi területek szignifikánsan elkülönülnek egymástól ($p < 0,001$). Bebizonyítottuk, hogy az 1. területen valóban a legnagyobb mértékű a mikroelem-koncentráció. Jelentősebb eltérést kizárólag az 1. területről származó hím egyedek B, Ca és Sr mikroelemeinek esetében tapasztaltunk.
2. A Cu-nél a 2. területről származó hím egyedeknél található szignifikánsabb különbség. A K, S és P elemek vizsgálata esetén a 3. terület hím egyedeit kivéve minden mintavételi terület mindkét ivaránál rendkívüli eltéréseket tapasztaltunk. A Mn és Zn elemek esetén az 1. terület hím és a 3. terület nőstény példányainál tapasztaltunk eltéréseket.
3. A Mg-nál az 1. terület mindkét ivarhoz tartozó, illetve a 3. terület nőstény egyedeinél találhatók szignifikánsabb különbségek. Szignifikáns különbség tapasztalható Na elem esetén a 2. területhez tartozó hím és 3. terület nőstény példányainál. Az Al, Ba és Fe elemek tekintetében nem találtunk jelentősebb eltérést az egyedek közt egyik területen sem.

A Silpha tristis egyedek esetében végzett morfológiai vizsgálatok eredményei

4. Az FA vizsgálatba vont bélyegek szimmetria-viszonyában szignifikáns különbségek figyelhetők meg az 1. mintavételi területen a többihez képest. A csápok, illetve az első és harmadik tibia (lábszár) paramétereinél szignifikáns eltérések tapasztalhatóak a nőstény egyedek között az 1. terület tekintetében. A többi paraméternél nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

A metaanalízishez szükséges szakirodalmi áttekintés és adatgyűjtés eredményei

5. Az egyes fémek (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb és Zn) felhalmozódása szignifikánsan magasabb volt a szennyezett talajból származó földigilisztákban, mint a kontroll területéről származókban. Az egyes fémek felhalmozódását értékelve a talaj pH-jának szignifikáns hatását csak egy esetben tapasztaltuk.
6. Az elemzések eredményei azt mutatták, hogy a réz akkumulációs intenzitása jelentősen nőtt a talaj pH-értékeinek növekedésével. A földigiliszták Pb-felhalmozódási sebessége az idő előrehaladtával jelentősen csökkent, szignifikánsan alacsonyabb testkoncentrációt mutatva az expozíció időtartamával.

A szoftver eredményei

7. Új, könnyen használható és operációs rendszer független BugTracker nevű szoftver létrejött.
8. A szoftverek nyomon követési összehasonlításában kiemelkedően teljesített.
9. GitHubon elérhető a telepítési, valamint használati útmutató angol nyelven: **<https://github.com/Roffagalaxis/Bugtracker>**.



Nyilvántartási szám: DEENK/364/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Málík-Roffa Hajnalka
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10082907

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Málík-Roffa, H.**, Tózsér, D., Tóthmész, B., Magura, T.: BugTracker: Software for Tracking and Measuring Arthropod Activity.
Diversity. 15 (7), 1-10, 2023. EISSN: 1424-2818.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/d15070846>
IF: 2.4 (2022)
2. Tózsér, D., Mizser, S., Karaffa, K., **Málík-Roffa, H.**, Magura, T.: A meta-analysis-based evaluation of metallic element accumulation in earthworms.
Environ. Int. 169, 1-9, 2022. ISSN: 0160-4120.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107546>
IF: 11.8

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 14,2

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
14,2**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.31.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Anthropogenic environmental stress testing and
development of software methods**

Málik-Roffa Hajnalka

Supervisor: Dr. Mizser Szabolcs



UNIVERSITY OF DEBRECEN
JUHÁSZ-NAGY PÁL DOCTORAL SCHOOL
Debrecen, 2023

Introduction

The anthropogenic impacts on the ecosystems are multifaceted and their consequences on biodiversity are difficult to interpret. It is impossible to separate the effects of individual factors within a stress factor [Hilborn and Stearns, 1982; Underwood, 1997].

Global anthropogenic activities such as agriculture, forestry, and urbanization all lead to significant changes in the environment [Kerr and Currie, 1995]. Changes in environmental parameters exert pressure on the organisms living there, modifying their behavioral parameters: activity, exploratory behavior, boldness or even phenology, condition, and can also affect fertility [Wong, 2015; Cote et al., 2010]. In ecological studies, in addition to field sampling, correctly chosen laboratory tests and statistical methods play an important role. Well-quantified laboratory tests can provide basic information about animal behavior in ecological, ethological, and ecotoxicological research. These types of studies require knowledge of the studied animals, observation and tracking in well-controlled and defined scenes [Panadeiro et al., 2021]. In many disciplines such as behavioral and evolutionary ecology and ethology, the key question is how to quantify the activity and/or movement of the studied organisms. Movement is a crucial parameter and is often used as a proxy to evaluate the effects of human-related stressors, chemicals, and drugs [Seehausen et al., 1997]. One common way to study arthropod movement is through artificial laboratory test arenas where short-term video recordings are made of individual movements, followed by evaluation with the help of videos [Zaller et al., 2015]. Today, several software solutions offer solutions for modeling and processing ecological problems and tasks. With the development of algorithms, these software also evolve and new ones appear [Málik-Roffa et al., 2023].

The development of technology not only has beneficial effects, but we can also experience processes associated with environmental stress, especially concentrated in urban areas [Cachada

et al., 2013]. The smallest changes in their habitat can severely affect the living conditions of terrestrial organisms. One of the most common stress factors in the soil is excessive toxic element concentration [Sharma et al., 2018]. A group of elements found in the soil (e.g., metallic elements) represents a potential concentration-dependent risk to the environment. These elements are often referred to as potentially toxic in the literature [Antoniadis et al., 2019; Xiao et al., 2022].

The effects of environmental stress factors are clearly visible in the microelement composition and concentrations of individuals, and changes in their morphometric parameters and body symmetry can be examined [Palmer and Strobeck, 1992; Jones and Hopkin, 1998; Ribera et al., 2001; Witzel, 2000; Weller and Ganzhorn, 2004; Skalski et al., 2010; Godet et al., 2011; Simon et al., 2016]. Therefore, they prove to be very effective for monitoring the effects of human activities. Due to its high density and easy collectability, the *Silpha tristis* species selected from trapped individuals may be suitable for similar studies. There is still very little literature available on this topic.

Objectives

The aim of my research is to understand the effects of anthropogenic environmental stress through field studies and analysis of scientific literature, with attention to morphometric changes and microelement composition. In addition, a key goal was to create an easy-to-use, operating system-independent motion detection program that could be suitable for quantifying the tests used in behavior analysis with the latest algorithms and help reduce the possibility of human error. It is very important that this program to be practical and easily accessible to everyone. It was also my goal for the program to be open source, which allows for a high degree of reprogramming or development by external programmers, thus increasing the further development potential of the program.

*Testing the effects of environmental stress on the microelement composition and morphometry of *Silpha tristis* individuals*

One of the highlighted goals was to study the effects of environmental stress, which we analyzed and evaluated with microelement composition testing and body symmetry data. The analysis of aluminum, boron, barium, calcium, copper, iron, potassium, magnesium, manganese, sodium, phosphorus, sulfur, strontium and zinc concentrations was done individually. In addition, we performed FA (fluctuating asymmetry) analysis by measuring the parameters of bilateral organs.

Meta-analysis of metallic elements accumulated in earthworm species

We wanted to gain a credible overview of the metal accumulation in different earthworm species collected from various control and polluted sampling areas, as the responses of earthworms to excessive soil element concentration are easy to study. However, published results on metal element accumulation in individuals are contradictory. We wanted published data on total body concentrations of arsenic, cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc in individuals collected from polluted and non-polluted (control) soils to be evaluated using meta-analyses. In addition, we assessed the role of

soil pH value and exposure time as factors potentially influencing metal accumulation [Tózsér et al., 2022].

Designing and writing software for tracking arthropod movement

In ethology and evolutionary ecology, a key question is how to quantify the activity/movement of studied organisms, which are important parameters. Proxies are often used to evaluate the effects of human-related stressors, chemicals, and drugs [Seehausen et al., 1997]. Therefore, these are very precise and accurate methods with non-invasive techniques applied for movement measurement [Dell et al., 2014]. One common way to study arthropod movement is through artificial laboratory test arenas with short-term video recordings [Zaller, 2015].

The availability of video-making products capable of complex frame-by-frame analysis and high-performance personal computers increasingly makes it possible to record and measure animal movements [Richard and Margaret, 1988]. The goal was to create software that is extremely accurate, easy to use even without programming knowledge thereby reducing human resource requirements as well. An important consideration was that the quality of the video should minimally influence the outcome of the analysis so that recording conditions and equipment can be very diverse.

Materials and Methods

Field Sampling

The samples come from a suburban area of Debrecen, the Lovász-zugi area, where there were lakes before. From the 1930s to the 1950s, the examined area functioned as a secondary biological treatment unit. The development of sewage treatment plants from the early 2000s resulted in the elimination of the lake system. As a result, reclamation steps were initiated targeting the elements (mainly metal) contaminated wastewater. Initially, sand was transported from a distant sand mine. The two components (sludge and sand) were spread on the smoothed sludge surface without mixing at varying thicknesses. Despite the smoothing, the surface of the area remained slightly uneven. As a result, the frequency and duration of periodic water coverage varied in different parts of the examined area; decreasing from north to south. In September 2013, during a remediation procedure, 5800 individuals of *Salix viminalis* (basket willow) were planted as 20 cm rooted cuttings in a 5 × 8 m distribution, primarily for the stabilization of elements [Tózsér et al., 2018].

The individuals participating in the study come from this area. The area can be divided into three parts. Area 1 is polluted, areas 2 and 3 are moderately and mildly polluted. *Silpha tristis* individuals were collected with live traps in April and October. After collection, individuals were placed in sealable polyethylene bags and then stored frozen at -15 °C until the start of the tests. We used 20 traps at each sampling site, which we emptied every third day. The collected individuals were separated at the genus *Silpha* level and were determined at species level before starting the tests. Species were identified using standard keys [Boros et al., 1961].

Literature Review and Data Collection for Meta-analysis

The necessary data for the meta-analysis were collected through a literature search in the Web of Science databases for the period between 1975 and 2022. During the search, we used the following expressions: TOPIC = (earthworm) AND TOPIC = (metal) AND TOPIC = (accumulation). To find all relevant publications, we also reviewed the bibliographies of the resulting publications.

Publications were considered suitable for meta-analysis if they contained average concentrations (mg/kg^{-1} , dry matter) with their variances and sample sizes for one or more relevant metal elements (arsenic, cadmium, chromium, copper, nickel, lead, zinc) in whole bodies of earthworm species collected from polluted and control areas, the latter not considered polluted [Tózsér et al., 2022].

Morphometric Examination Methods

For the morphometric examinations, it was necessary to digitize parts of the individual. As a first step, we took photographs using an Olympus C-7070 digital camera mounted on an Olympus SZX7 stereomicroscope. During photo documentation, we used a calibration slide. During dissection, we avoided metal tools due to later toxic element examinations. During operations, individuals were kept wet to prevent changes in their original body parameters due to drying. Photo documentation of metric stamps was done separately from the individuals' bodies to increase measurement accuracy. Measurements were performed with triple repetition using the Winimag 1.0 program.

*Morphometric Examination of *Silpha tristis* Individuals*

The metric parameters of *Silpha tristis* individuals were measured before determining the microelement composition. First, we determined the width of the pronotum and the length of the body. The stability of individuals was achieved with glass beads. After measuring body length and pronotum, we removed the legs for more accurate measurement. On the legs, in all cases, femur and tibia were measured. After the legs, the antennae were also removed. On both right and left antennae, antennomeres were measured on both sides. After these measurements, points were measured on the elytrum also on both sides. Finally, the membranous wing was separated; wings were placed on a calibration slide and spread with a drop of distilled water for photo taking, then measurement points were taken on radius and subcosta.

Microelement Composition Analysis of Silpha tristis Individuals in Laboratory

The digestion of the samples was carried out based on the previous publications of Braun et al. [2009, 2012], Simon et al. [2011, 2017], and Papp et al. [2019]. *Silpha tristis* individuals were dried in a drying cabinet at 105 °C for 24 hours (until constant weight). Then we applied digestion at atmospheric pressure with the addition of 2 ml of 65% (m/m) nitric acid and 0.5 ml of hydrogen peroxide at 100 °C. In the case of individuals, digestion was carried out individually, while for ground, homogenized litter samples and soil samples, we used a quantity of 0.2 g. The determination of microelement concentrations was performed with an ICP-OES Agilent 5110 device.

Calculation of Bioaccumulation Factor (BAF) in Silpha tristis Individuals

The calculation of BAF values is as follows: $BAF = C_{\text{individual}} / C_{\text{soil}}$, where $C_{\text{individual}}$ is the metal concentration detected in *S. tristis* (mg/kg^{-1} , dry matter), and C_{soil} is the metal concentration detected from the soil (mg/kg^{-1} , dry matter) [Li et al., 2007; Rezvani and Zaefarian, 2011; Arnot and Gobas, 2006; Avgin, 2010]. If the value obtained from the calculation is greater than 1 for a given environmental element in the organism, then accumulation has occurred, if the value is less than 1, we cannot speak of accumulation.

Fluctuating Asymmetry (FA) Analysis Based on Morphometric Parameters of Silpha tristis Individuals

We examined the directionality of asymmetry, which can be determined by the deviation from zero of the average asymmetry values (J-B) calculated for each stamp. There is no directional asymmetry present in the difference of morphometric variables, the values follow a normal distribution ($p < 0.05$). The FA analysis was performed based on the work of Palmer [1994]. The value of the Palmer index is calculated with the average values of the right and left stamps for each sample group (sampling areas and sex) using the formula $FA = ([J-B]) / ((J+B) / 2)$. We tested the differences between sampling areas, as well as between males and females, based on the degree of FA using variance analysis.

Statistical evaluation of the literature data included in the meta-analysis

For the meta-analysis, we calculated the unbiased standardized mean difference (Hedges' g) as a common effect size for the comparisons between contaminated and non-contaminated. To estimate the effect of earthworm species, we used a random effects model, which eliminates the limitations of the common effect size based on large variations in experimental conditions, design, and methods used in individual studies [Borenstein et al., 2009]. The main advantage of random effects models is that they are more likely than fixed effects models; they show the distribution of effect sizes as real differences between studies, rather than assuming sampling error as the only cause of effect size changes [Borenstein et al., 2009]. We calculated multiple effect sizes for each study, so in random-effects models we applied a random effect as an embedding factor. The average effect size was considered statistically significant if the 95% bootstrap confidence interval (CI; 999 iterations) did not contain zero.

Results of BugTracker development

BugTracker was developed to use a newer tracking algorithm than existing solutions, and to be optimized for testing a specific behavioral parameter, which can simplify the measurement and evaluation process and increase repeatability. It uses the CSRT (Discriminative Correlation Filter with Channel and Spatial Reliability) algorithm; thus, it is less influenced by the differences in brightness and lighting conditions in the studied area [Málik-Roffa et al., 2023]. Its use does not require programming knowledge. BugTracker is available under the GNU General Public License v3.0, with installation and usage guide available on GitHub: [<https://github.com/Roffagalaxis/Bugtracker>] (downloaded: March 29, 2023).

New scientific results

*Results of the microelement composition analysis for *Silpha tristis* individuals*

1. Based on the results, it can be said that the sampling areas significantly differ from each other ($p < 0.001$). We have proven that the highest level of microelement concentration is indeed on area 1. Significant differences were only observed for the B, Ca, and Sr microelements of male individuals from area 1.
2. For Cu, a more significant difference was found in male individuals from area 2. In the case of K, S, and P elements, we observed extreme differences in both sexes of all sampling areas except for male individuals from area 3. For Mn and Zn elements, differences were observed in male individuals from area 1 and female individuals from area 3.
3. For Mg, more significant differences can be found in individuals of both sexes from area 1 and female individuals from area 3. A significant difference can be observed for Na element in male individuals belonging to area 2 and female individuals from area 3. For Al, Ba, and Fe elements, no significant differences were found among individuals in any of the areas.

*Results of morphometric examinations for *Silpha tristis* individuals*

4. Significant differences can be observed in the symmetry relations of the stamps included in the FA examination on area 1 compared to others. Significant differences can be observed in the parameters of antennae and first and third tibia (shank) among female individuals in area 1. No significant changes were observed for other parameters.

Results of literature review and data collection necessary for meta-analysis

5. The accumulation of individual metal elements (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn) was significantly higher in earthworms from contaminated soil than those from control areas. Evaluating the accumulation of individual metal elements, we only observed a significant effect of soil pH in one case.
6. The results of the analyses showed that the intensity of copper accumulation significantly increased with increasing soil pH values. The Pb accumulation rate of earthworms significantly decreased over time, showing significantly lower body concentration with the duration of exposure.

Software results

7. The creation of a new, easy-to-use software called BugTracker that is independent of the operating system.
8. It performed outstandingly in software tracking comparisons.
9. Installation and usage guide is available in English on GitHub: [<https://github.com/Roffagalaxis/Bugtracker>].



Registry number: DEENK/364/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Hajnalka Málik-Roffa
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences
MTMT ID: 10082907

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Málik-Roffa, H.**, Tózsér, D., Tóthmérés, B., Magura, T.: BugTracker: Software for Tracking and Measuring Arthropod Activity.
Diversity. 15 (7), 1-10, 2023. EISSN: 1424-2818.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/d15070846>
IF: 2.4 (2022)
2. Tózsér, D., Mizser, S., Karaffa, K., **Málik-Roffa, H.**, Magura, T.: A meta-analysis-based evaluation of metallic element accumulation in earthworms.
Environ. Int. 169, 1-9, 2022. ISSN: 0160-4120.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107546>
IF: 11.8

Total IF of journals (all publications): 14,2

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 14,2

The Candidate's publication data submitted to the IDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

31 July, 2023



Málik-Roffa Hajnalka publikációi

Publications of Málik-Roffa Hajnalka

*Impakt faktorral rendelkező, angol nyelvű közlemények /
Papers with impact factor in English*

Málik-Roffa, H., Tőzsér, D., Tóthmérész, B., Magura, T. :
BugTracker: Software for Tracking and Measuring Arthropod
Activity.

Diversity, 15.(7), 1-10, 2023.EISSN:1424-2818.

Doi:<http://dx.doi.org/10.3390/d15070846>

IF:2.4 (2022)

Tőzsér, D., Mizser, S., Karaffa, K., **Málik-Roffa, H.**, Magura,
T.: A meta-analysis-based evaluation
of metallic element accumulation in earthworms.

Environ. Int. 169, 1-9, 2022. ISSN: 0160-4120.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107546>

IF: 11.8

Irodalomjegyzék / References

- Antoniadis, S.M. Shaheen, E. Levizou, M. Shahid, N.K. Niazi, M. Vithanage, Y.S. Ok, N. Bolan, J. Rinklebe A critical prospective analysis of the potential toxicity of trace element regulation limits in soils worldwide: are they protective concerning health risk assessment? - A review *Soil Sediment Contam.*, 127 pp. 819-847. (2019)
- Borenstein M. , Hedges LV. , Higgins JPT., Rothstein HR. (szerk.) , *Introduction to meta-analysis, Statistics and Data Science*Wiley (2009)
- Boros I.,Dudich E.,Kotlán S. és Soós L.,Magyarország állatvilága *Fauna Hungariae*, 1. Füzet *Holyvaalakúak I. és Staphylinoida I.* Budapest, Akadémia Kiadó (1961).
- Cachada A., A C Dias A C, Pato P., Mieiro C., Rocha-Santos T., Pereira M.E., Ferreira E.S., Duarte A. Major inputs and mobility of potentially toxic elements contamination in urban areas, *Environ Monit Assess.* Jan;185(1):279-94. (2013)
- Dell, A. I. et al. Automated image-based tracking and its application in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 29, 417–428 (2014)
- Dell, A.I.; Bender, J.A.; Branson, K.; Couzin, I.D.; de Polavieja, G.G.; Noldus, L.P.J.J.; Pérez-Escudero, A.; Perona, P.; Straw, A.D.; Wikelski, M.; et al. Automated image-based tracking and its application in ecology. *Trends Ecol. Evol.*, 29, 417–428. (2014)
- Godet, J.P., Demuynck, S., Waterlot, C., Lemièrre, S., Souty-Grosset, C., Scheifler, R., Douay, F., Leprêtre & A., Pruvot, C.: Growth and metal accumulation in *Porcellio scaber* exposed to poplar litter from Cd-, Pb-, and Zn-contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental* (2011)
- Hilborn R., Stearns S.C. On inference in ecology and evolutionary biology: the problem of multiple causes *Acta Biotheoretica*, 31, pp. 145-164 (1982)

- Jones, D.T. & Hopkin, S.P. Reduced survival and body size in terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environmental Pollution* 90: 215–233.(1998)
- Kerr, J.T.; Currie, D.J. Effects of human activity on global extinction risk. *Conservation. Biology*, 9, 1528–1538. (1995)
- Málik-Roffa H., Tőzsér D., Tóthmérész B. Magura T. BugTracker: Software for Tracking and Measuring Arthropod Activity (2023)
- Málik-Roffa H., Tőzsér D., Tóthmérész B. Magura T. BugTracker: Software for Tracking and Measuring Arthropod Activity (2023)
- Palmer, A.R Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In Markow TA (ed) *Developmental instability: its originals and evolutionary implications*. Kluwer, Netherlands, pp 335-364.(1994)
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distribution and power of statistical test. *Acta Zoologica Fennica* 191:57-72.(1992)
- Panadeiro, V.; Rodriguez, A.; Henry, J.; Wlodkowic, D.; Andersson, M. A review of 28 free animal-tracking software applications: Current features and limitations. *Lab. Anim.*,50, 246–254 (2021)
- Ribiera, I., Doledec, S., Downie, I.S. & Foster, G.N. Effect of land disturbance and stress on species traits of ground beetle assemblages. *Ecology* 82: 1112–1129. (2001)
- Richard, F.O.; Margaret, C.T. Monitoring animals' movements using digitized video images. *Behav. Res. Meth. Instr.* 20, 485–490. (1988)
- Seehausen, O.; Alphen, J.J.M.; Witte, F. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* , 277, 1808–1811. (1997)
- Seehausen, O.; Alphen, J.J.M.; Witte, F. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* , 277, 1808–1811. (1997)
- Sharma S, Nagpal A.K., Kaur I. Heavy metal contamination in soil, food crops and associated health risks for residents of Ropar

- wetland, Punjab, India and its environs *Food Chem.*, 255 ,pp. 15-22. (2018)
- Simon, E., Harangi, S., Baranyai, E., Braun, M., Fábrián, I., Mizser, Sz., Nagy, L. & Tóthmérész, B.: Distribution of toxic elements between biotic and abiotic components of terrestrial ecosystem along an urbanization gradient: Soil, leaf litter and ground beetles. *Ecological Indicators* 60: 258–264.(2016)
- Skalski, T., Stone, D., Kramarz, P. & Lakowski, R. Ground beetle community responses to heavy metal stress. *Baltic Journal of Coleopterology* 10: 1–12 (2010)
- Tőzsér D., Gyomfajok fémakkumulációjának vizsgálata szennyezett területen *Természetvédelmi Közlemények* 24, 196-207 (2018)
- Tőzsér, D., Mizser, S., Karaffa, K., Málík-Roffa, H., Magura, T.: A meta-analysis-based evaluation of metallic element accumulation in earthworms *Environ. Int.* 169 1-9, (2022)
- Underwood A.J. *Ecological Experiments: their logical design and interpretation using analysis of variance*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1997)
- Weller, B. & Ganzhorn, J.U. Carabid beetle community composition, body size, and fluctuating asymmetry along an urban-rural gradient. *Basic and Applied Ecology* 5: 193–201. (2004)
- Wong, BBM. Candolin, U. Behavioral responses to changing environments. *Behavioral Ecology* 26 , 665–673. (2015)
- Xiao R. , Ali A., Xu Y., Abdelrahman H. , Li R. , Y. Lin, Bolan N. , Shaheen S.M. , Rinklebe J. , Zhang Z. Earthworms as candidates for remediation of potentially toxic elements contaminated soils and mitigating the environmental and human health risks: A review *Soil Sediment Contam.*, 158, Article 106924. (2022)
- Zaller, J.G.; Kerschbaumer, G.; Rizzoli, R.; Tiefenbacher, A.; Gruber, E.; Schedl, H. Monitoring arthropods in protected grasslands: Comparing pitfall trapping, quadrat sampling and video monitoring. *Web Ecol*, 15, 15–23. (2015)

Zaller, J.G.; Kerschbaumer, G.; Rizzoli, R.; Tiefenbacher, A.; Gruber, E.; Schedl, H. Monitoring arthropods in protected grasslands: Comparing pitfall trapping, quadrat sampling and video monitoring. *Web Ecol*, 15, 15–23. (2015)