

GlyphoganClassic hatása erdei béka (*Ranadalmatina*) ebihalak túlélésére csúcsragadozók jelenlétében

TDK dolgozat

Biológia mesterszak,

Ökológia, Evolúció- és Konzervációbiológia szakirány

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Készítette:

GÁL ZOLTÁN

Témavezető:

Hettyey Attila, PhD, tudományosfőmunkatárs

Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport

MTA ATK NÖVI

Herman Ottó út 15, 1022 Budapest



Budapest, 2014

Tartalomjegyzék:

Összefoglaló	3
1. Bevezetés	4
<u>1.1. Téma ismertetése</u>	<u>4</u>
<u>1.2. Célkitűzés</u>	<u>6</u>
2. Anyag és módszer.....	7
<u>2.1. Előkészületek.....</u>	<u>7</u>
<u>2.2. A mezokozmoszok beállítása</u>	<u>8</u>
<u>2.3. A kísérlet lebonyolítása</u>	<u>9</u>
<u>2.4. Statisztikai elemzés.....</u>	<u>11</u>
3. Eredmények.....	12
<u>3.1. Túlélés</u>	<u>12</u>
<u>3.2. Sérülés.....</u>	<u>13</u>
4. Diskusszió.....	14
Köszönetnyilvánítás	17
Szerzői hozzájárulás	17
Irodalomjegyzék.....	18

Összefoglaló

A GlyphoganClassic egy széles körben használt gyomirtó szer, ami mérgező lehet ebihalakra nézve, ugyanakkor korábbi vizsgálatok szerint hasonló morfológiai elváltozásokat okozhat, mint egyes ragadozók jelenléte. Ezen indukált fenotípusok ebihalak túlélésére gyakorolt hatása jórészt ismeretlen. Vizsgálatomban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a szer miként hat erdei béka (*Ranadalmatina*) ebihalak túlélésére ragadozók jelenlétében. Az ebihalakat glifozát hatóanyagú gyomirtóes ketrecbe zárt ragadozók (*Lissotritonvulgaris*, *Aeshnacyanea*) jelenlétében / hiányában neveltem. Húsz nap elteltével lefotóztam az ebihalakat, majd a különböző kezelésekből származó ebihalak keverékét tiszta vizet vagy szerttartalmazó mezokozmoszokban szabadon úszó ragadozók mellé helyeztem. Egy nappal később a fotók alapján beazonosítottam az életben maradt egyedet. Eredményeim szerint azon ebihalak, amelyek nevelési környezetében volt ragadozó, nagyobb arányban éltek túl szabadon úszó ragadozók mellett, mint a naív ebihalak. A gyomirtószernem hatott az ebihalak túlélésére, bár a szert tartalmazó vízben nevelkedett ebihalakat nagyobb arányban sebesítették meg a ragadozók. Eredményeim nem támogatják azt a feltételezést, hogy a szer-indukált fenotípusos válasz védelmet jelent az ebihalak számára, ugyanakkor alátámasztják azt az általánosabb hipotézist, miszerint a természetbe kijutatott szennyező anyagok közvetlen hatásaik mellett közvetetten is befolyásolhatják az élőlények túlélési esélyeit.

1. Bevezetés

1. Téma ismertetése

A biodiverzitás csökkenése világméretű probléma. Nagy kihívást jelent az ökológusok számára a fajok kihalásának okait megismerni (MAY, R.M. 2010). A biodiverzitáscsökkenéséhez hozzájárultak a fajok százainak dokumentált populációméret-csökkenése és több tucat faj végelegesnek tűnő eltűnte is (BLAUSTEIN, A.R.-KIESECKER, J.M. 2002; STUART, S.N. et al. 2004). A kételtűek pusztulásának fő oka az élőhelyek leromlása és megszűnése. Szerepet játszanak ugyanakkor visszaszorulásukban a növekvő UV sugárzás, a ragadozók, a paraziták elszaporodása, a betegségek terjedése, és a növényvédő szerek alkalmazása is (DAVIDSON C. et al. 2001). A mezőgazdaságban alkalmazott peszticidek hatékonyan védik meg a terményt a kártevőkkel szemben, alkalmazásuk a mezőgazdaságban jól tanulmányozott. Kevésbé ismert ugyanakkor a növényvédő szerek nem célzott élőlényekre gyakorolt hatása (JONES, D.K. et al. 2010). A szerek hatását gyakran rövid távú toxikológiai labor kísérletekben, illetve hosszú távú terepi, vagy mezokozmoszkísérletekben vizsgálják (JONES, D.K. et al. 2010).

A mezőgazdaságban a világon a legszélesebb körben alkalmazott gyomirtószerek glifozát tartalmúak. Ilyen a kutatásban használt Glyphogan Classic is (Amerikában a 'Roundup'-a megfelelője). A glifozát gátolja a növényekben az esszenciális aminosavak termelését, így a fehérje szintézist és a növények növekedését. A glifozátban önmagában képtelen áthatolni a növényi kutikulán, ezért egy hordozó anyag hozzáadásával segítik elő a glifozát bejutását a növényi sejtekbe (RELYEA, R.A. 2005a; MANN, R.M. et al. 2009). Erre a célra leggyakrabban alkalmazott felületaktív anyag a polietoxilált-zsír-amin (POEA). Ez a felületaktív anyag erősen mérgező hatású több vízi élőlényre, így a kételtűek lárváira nézve is (RELYEA, R.A. 2006). A növényvédő szer közvetlenül a talajra fújva, vagy az eső által a növényekről lemosódva beoldódik a felszíni vizekbe és a talajba. A felszíni vizek és a talajvíz mozgásával végül beszivárog a környező tavakba. A glifozát koncentrációját a vízben sok környezeti tényező befolyásolhatja, mint például a vízmélység, a vízhőmérséklet, a pH, a tavat körülvevő vegetáció, és a talaj minősége (RELYEA, R.A. 2012; GIESY, J. P. et al. 2000; JONES, D.K. et al. 2010). A természetes állóvizekben előforduló legmagasabb glifozát-koncentrációk Észak-Amerikában 1,7-5,2 mg saválló (a.e.)/L-nek feleltek

meg (EDWARDS, W. M. et al. 1980; TOMPSON, D. G. et al. 2004; RELYEA, R. A. 2012). A glifozát viszonylag lassan lebomló vegyület, felezési ideje 8-120 nap a környezeti feltételektől függően (BAROLO D. 1993).

Korábbi tanulmányok megállapították, hogy a glifozát alapú POEA tartalmú gyomirtó halálos lehet a kétéltűekre (LC50: 48-h=1,5-15,5 mg hatóanyag (AI)/L; EDINGTON, A. N. et al. 2004). RELYEA, R. A. (2005b) vizsgálata szerint, hat kétéltű fajt vizsgálva az LC50 érték 0,55 – 2,52 mg AI/L közé esett, bizonyítva ezzel, hogy egyes fajokra kisebb koncentrációban is veszélyt jelenthet a szer. A glifozát mellett a POEA is felelős a mérgezésért. Azonos koncentrációban jelenlevő POEA, glifozát közül a POEA nagyobb mortalitást gyakorol a vízi szervezetekre (TSUI, M. T.-CHU, L. M. 2003).

A glifozát hatóanyagú gyomirtószubletális koncentrációban képes befolyásolni az ebihalak fejlődési sebességét, korai metamorfózist okozhat, elősegítheti morfológiai elváltozások megjelenését a száj, a fej, a szem, és a farok tájékán (HOWE, C. M. et al. 2004; CAUBLE, K.-WAGNER, R. S. 2005). A szer krónikus jelenléte hermafroditizmust okozhat a kétéltűekben (HOWE, C. M. et al. 2004; CAUBLE, K.-WAGNER, R. S. 2005). Ezengyomirtó szer hatására oxidatív stressz tüneteit mutathatják az ebihalak (COSTA, M. J. et al. 2008) és megváltozhat az ebihalak aktivitási periódusa is (RELYEA, R. A.-MILLS, N. 2001).

A laboratóriumi körülmények között folytatott peszticid-hatással foglalkozó kutatások gyakran pontosan képesek becsülni a szer természetes körülmények közötti mérgező hatását. A mezokozmosz kísérletekben ugyanakkor a környezeti hatások és azok interakciói is érvényesülhetnek. Számos biotikus és abiotikus tényező befolyásolhatja a szer hatását, például a ragadozók jelenléte, az inter- és intraspecifikus kompetíció, vagy az UV sugárzás. A víz kémiai és fizikai tulajdonságai, hőmérséklete, pH változása, oxigén koncentráció mennyisége is befolyásolják a glifozát káros hatását. Például a glifozát erősebben hat az ebihalakra magasabb pH-n (RELYEA, R. A. 2010), nagyobb ebihal denzitáson (JONES, D. K. et al. 2011) és ragadozószag jelenlétében (RELYEA, R. A. 2005b). Újabb kutatások megállapították, hogy a mezokozmoszban nevelt ebihalakra nézve a szer kevésbé káros, mint a laboratóriumban tartott fajtársaikra. Erre a meglepő eredményre a szer rétegződése adhat választ. A hőmérséklet rétegződésével megegyezően szlik el a szer a mezokozmoszokban, így az ebihalak mélyebbre úszva elkerülhetik a felső, melegebb vízrétegekben magas koncentrációban jelenlevő glifozátot (RELYEA, R. A. 2012).

Az ebihalak morfológiájában ragadozók hatására változások alakulhatnak ki. Például szitakötők jelenlétében az ebihalak magasabb farokvitorlát, és vastagabb farokizomzatot növesztenek, amimegnövekedett túlélési esélyt jelenthet nagyszitakötők lárváinak jelenlétében (MCCOLLUM, S.A.-VANBUSKIRK, J.1996). RELYEA, R.A.2012-es vizsgálata szerint bizonyos növényirtó szerek által indukált fenotípusos változás nagyon hasonlít a szitakötőlárvák által indukált morfológiai változáshoz, aglifoziát hatóanyagú gyomirtó szeres a szitakötőlárvák együttes jelenléte pedig additívan hatott, tehát a két különböző környezet hatása összeadódott, nagyobb mértékben csökkentették az ebihalak túlélését, mint külön-külön.

2.Célkitűzés

Kísérletemet erdei béka (*Ranadalmatina*) ebihalakon végeztem. Korábbi tanulmányokban a glifozátnak az állatok életmenet-változóira kifejtett közvetlen hatását már vizsgálták Amerikában élő kételtűfajok esetében (pl. RELYEA, R.A. 2012), de a gyomirtószerek jelenlétében a fenotípusban bekövetkező változások hatását a túlélésre még nem tesztelték szabadon úszó ragadozók jelenlétében. Az előzőekből következően jelen vizsgálatom fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljam szabadon úszó ragadozók jelenlétében a túlélésbeli különbséget a gyomirtó szer-indukáltade ragadozókra nézve naiv fenotípusés a mind a szerre, mind a ragadozókra nézve naiv fenotípusú egyedek között. Az erdei béka ebihalak glifozát tartalmú gyomirtó szerreadott válaszreakcióját ugyanakkor korábban nem vizsgálták, az még ismeretlen a tudomány számára. Két különböző táplálkozási stratégiájú ragadozó fajt használtam a vizsgálatban annak eldöntésére, hogy a szer jelenlétében melyik ragadozó típus jelent nagyobb veszélyt az ebihalakra, illetve hogy a szer által indukált fenotípus túlélésre kifejtett hatása függhet-e a ragadozók táplálkozási stratégiájától. Ragadozónak használtam pettyes gőtét (*Lissotriton vulgaris*), ami aktívan keresi táplálékát és azt egyben fogyasztja el, valamint asebes acsaszitakötő lárváját (*Aeshnacyanea*), ami passzívan, mozdulatlanul várja a táplálékot, és azt feldarabolva fogyasztja el. Munkahipotézisemet RELYEA, R.A.(2012) eredményei alapján fogalmaztam meg: mivel a glifozát hasonló morfológiai elváltozásokat okoz, mint a ragadozók jelenléte, az ebihalak glifozát-indukált fenotípusanöveli a túlélés valószínűségét szabadon úszó ragadozók jelenlétében.

2. Anyag és módszer

1 Előkészületek

A kísérletimezokozmoszokat 90 literes malteros ládákban rendeztük be, melyeket a vízszint állandó szinten tartására túlfolyókkal láttunk el és amelyeket az esetlegesen a ládák falából kioldódó káros anyagok eltávolítása céljából alaposan kimostunk és kiáztattunk.

A ragadozók ketrecben tartásához a ketreceket PVC csövekből készítettük el. Az 11 cm átmérőjű, 18 cm-es csődarabok egyik végére egy 2 cm-es PVC gyűrűt ragasztottunk, melynek mindkét felét bevontuk szúnyoghálóval. A kettős szúnyogháló megakadályozta a ragadozókat abban, hogy megsebesítsék a ketrechez közel merészkedő ebihalakat, ugyanakkor lehetővé tette a vízi ragadozó-préda kapcsolatokban rendkívül fontos kémiai jelek szabad áramlását. A ketrecek másik végét 20 cm²-es szúnyogháló darabokkal fedtük le, amiket két gumigyűrűvel rögzítettünk, így könnyen le lehetett venni a szúnyoghálót a ragadozók etetésénél. A ragadozóketreceket műanyag bevonatú dróttal rögzítettük a mezokozmoszok oldalához (1. ábra).



1. ábra. Ragadozó ketrec

A mezokozmoszok biztonságos lefedése érdekében plexi lemezekből keretet készítettünk, amelyekre szúnyogháló réteget ragasztottunk. A fedelek könnyen levehető és visszahelyezhetőek voltak, ugyanakkor megakadályozták, hogy kételtűek, vagy ragadozók a kísérlet megkezdését követően megtelepedjenek a mezokozmoszokban.

A petecsomókat kora tavasszal a Pilis hegység egyik kisvízéből (Papréti felső tó) gyűjtöttük. A petecsomókat 18 °C hőmérsékleten csomónként külön tartottuk a ragadozó begyűjtéséig. A gőtéket csapadék segítségével gyűjtöttük be három tóból (Ilona

tó, Mélymocsár, Nagykovácsi tó). A fogságba esett hím gőtéket használtam fel a kísérletemhez, a nőstényeket visszaengedtük, hogy lehetővé tegyük esetükben a peterakást és így minimalizáljuk az érintett populációkat ért zavarás káros hatásait. A gőtecsapdákat 1 literes ecetes PET palackokból készítettük. A palackok tetejét levágtuk, és fordítva helyeztük vissza az aljukba. Az így készített, varsa működési elvű, csapdákat fapálcával átszűrva helyeztük ki a tavakban (2. ábra), ügyelve arra, hogy maradjon levegő a palackban, hogy a csapdába esett gőté ne fulladjanak meg. A szitakötőlárvákat egy bajnaikerti tóból gyűjtöttük, ezeket térszűrők segítségével, illetve kézzel fogtuk.



2. ábra. Gőte csapda

A ragadozókat a kísérlet indulása előtt heti 3 alkalommal tubifex-szel etettük. A gőtéket a származási helyüktől függően csoportosan tartottuk, míg a szitakötő lárvákat egyesével, hogy elkerüljük az esetleges kannibalizmust.

2.A mezokozmoszok beállítása

A mezokozmoszokat a kísérlet indítása előtt háromhétrel töltöttük fel ládánként 65 liter csapvízzel (3. ábra). Feltöltés után két nappal 40 g Pilisben gyűjtött bükkfa (*Fagussilvatica*) levelet helyeztünk a ládába (4. ábra). A levelek az ebihalaknak búvóhelyet, valamint az ebihalak táplálékul szolgáló algabevonatnak növekedési felületet nyújtottak. A levelekkel együtt szúnyoghálón átszűrve, a Nagykovácsi tóból hozott vízből 1-1 litert öntöttünk minden mezokozmoszba. A zoo- és fitoplankonttartalmazó tóvizet a természetközeli természet közeli környezet megteremtése céljából



3. ábra. Mezőkozmoszok elhelyezése



4. ábra. Mezőkozmoszok

adtuk a mezőkozmoszokhoz, valamint azért, hogy egy természetes, önfenntartó közösség jöjjön létre, ami ellátja az ebihalakat kellő mennyiségű táplálékkal, ugyanakkor gondoskodik vízcsere nélkül is a jó vízminőség fenntartásáról.

3. A kísérlet lebonyolítása

A kísérlet két nappal az ebihalak kikelése után indult, amikor az ebihalak elúsztak, ez az a fejlődési stádium, amikor elkezdnek aktívan táplálékot keresni. A 0. napon a különböző petecsomókból származó ebihalakat összekevertük, és véletlenszerűen 16 ebihalat helyeztünk minden egyes mezőkozmoszba. A ragadozókat is ezen a napon helyeztük be a dobozokba. A kísérletben 6 különböző kezelést alkalmaztam:

1. tiszta víz, ragadozó nélkül (kontroll),
2. tiszta víz, ketrecben tartott pettyes göte (*Lissostriton vulgaris*),
3. tiszta víz, ketrecben tartott szitakötőlárva (*Aeshnacyanea*),
4. glifozátot tartalmazó víz, ragadozó nélkül,
5. glifozátot tartalmazó víz, ketrecben tartott pettyes göte (*Lissostriton vulgaris*),
6. glifozátot tartalmazó víz, ketrecben tartott szitakötő lárva (*Aeshnacyanea*).

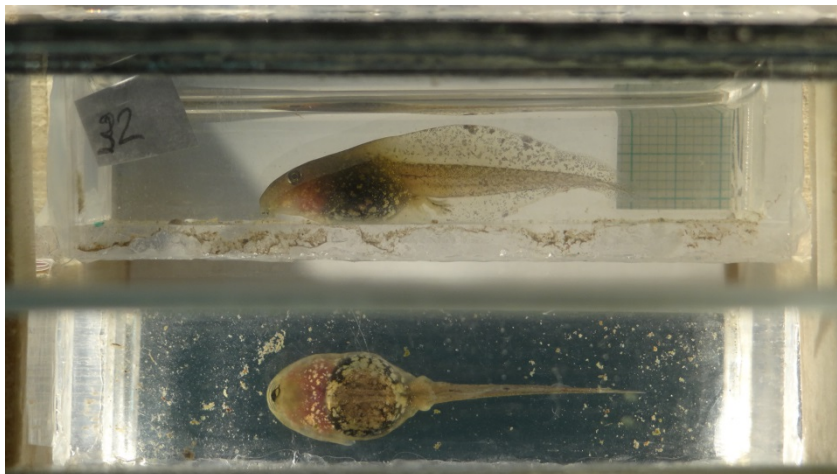
A kezeléseket 14-szer ismételtük, ami összesen 84 dobozt eredményezett. A dobozonkénti 16 ebihal összesen 1344 db a kísérletben résztvevő ebihalat eredményezett.

A kísérletben a glifozát koncentrációját egy ~~előkísérlet~~előkísérlet eredményei alapján 6,5 mg a.e/L-re állítottuk be oly módon, hogy a kísérlet megkezdése előtt egy nappal 11 ml Glyphogan Classic szert öntöttünk minden mezőkozmoszba. Az ~~előkísérletben~~előkísérletben ennél a koncentrációnál mérhető morfológiai változást tapasztaltunk, de az ebihalak mortalitása nem volt jelentős. Ez a koncentráció többszöröse a Magyarországon természetben megtalálható mennyiséghez

képest. Aketrecekben tartott ragadozókat 3 naponta etettük alkalmanként 150mg ebihallal (ami eleinte két kisebb, később egy nagyobb ebihalnak felelt meg). Az etetésekhez levágott végű Pasteur-pipettákat használtunk, amelyekkel könnyedén behelyeztük az ebihalakat a ketrecben tartott ragadozókhöz. A tápláléknak szánt ebihalakat viszonylag nagy denzitáson, kis táplálékmennyiség mellett, hűvös helyen tartottuk, hogy így lassítsuk növekedésüket. A tápláléknak szánt ebihalakat turmixolt spenóttal etettük.

Az ebihalaknevelése 20 napig tartott. Ez alatta 12. napon az összes dobozban Mettler Toledo műszerrel mértük a pH-t, amely 7,2 érték körül ingadozott. A kísérlet teljes időtartama alatt 5 db automatikus HOBO hőmérővel regisztráltuk a vízhőmérsékletet, ami a mérések szerint napszak és időjárás függvényében 15 és 21 °C között ingadozott.

A 20 nap elteltével az életben maradt ebihalakat elaltattam 0,02 m/m %-os MS-222 vegyszerrel, majd lefotóztam őket. A fotózáshoz egy speciális állványt használtam, ami tükrök segítségével lehetővé tette, hogy az ebihalak oldalról és alulról egyszerre láthatóak legyenek a képen (5. ábra).



5. ábra. Egy az egyedek beazonosításához készült ebihal-fotó.

Az ebihalak egyedi színmintázatának köszönhetően a fotók lehetővé tették az ebihalak egyedszintű beazonosítását.

A nevelési környezetben lévő ebihalak túlélésének vizsgálatára, hat féle predációs tesztet végeztem.

1. tiszta víz, ragadozó nélkül (kontroll),
2. tiszta víz, ketrecben tartott pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*),
3. tiszta víz, ketrecben tartott szitakötőlárva (*Aeshnacyanea*),
4. glifozátot tartalmazó víz, ragadozó nélkül,
5. glifozátot tartalmazó víz, ketrecben tartott pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*),

6. glifozátot tartalmazó víz, ketrechen tartott szitakötő lárva (*Aeshnacyanea*).

A tesztek 90 literes dobozokban, 65 liter vízben végeztem. A tesztek 10 ismétléssel végeztem, ami összesen 60 dobozt jelentett. A teszt mezokozmoszokat a nevelési ládákkal megegyezően állítottam be a predációs teszt elindítása előtt 9 nappal.

A megjelölt ebihalakat glifozátmentes (0 mg a.e./L glifozát koncentráció) és 6,5 mg a.e./L glifozát koncentráció mellett háromféle ragadozó kezelés (ragadozó nélkül, *Lissotriton vulgaris*, *Aeshnacyanea*) kombinációjában teszteltem 10 ismétléssel. A nevelési kezeléseken, ketrechen tartott ragadozók, a predációs tesztekben szabadon mozoghattak a ládáknál, így a velük együtt behelyezett ebihalakhoz is hozzáfértek. A lefotózott ebihalakból véletlenül, nevelési környezetként két darabot választottam ki és tettem be egy predációs tesztbe, amikben 12 ebihal volt a kezdeti létszám. Ez összesen 720 db ebihalat jelentett. Ügyeltem arra, hogy a kiválasztott ebihalak ne kerüljenek össze a nevelési környezetükből származó ragadozóval. A predációs tesztek megkezdése előtt, vagyis a szabadon úszó ragadozók behelyezése előtt egy napot vártam, hogy az ebihalak kipihenhessék az altatás és fotózás okozta stresszt és hozzá szokhassanak az új (de nem újszerű!) környezethez. A szabadon úszó ragadozók behelyezése után 24 órával kivettük a ragadozókat és újabb fotózás segítségével beazonosítottam a túlélő ebihalakat. A kísérlet befejezése után a ragadozókat és az életben maradt ebihalakat visszavittük származási helyükre, és szabadon engedték őket.

4 Statisztikai elemzés

Az eredményeim kiértékeléséhez az R statisztikai programot használtam. Az adataim feldolgozásához Általánosított Lineáris Kevert Modelleket alkalmaztam (GZLMM). Független változó az ebihalak túlélése/elpusztulása, illetve megsebesülése/sértetlenége volt. Faktorként vittem be a modellbe a nevelésben és a tesztben szereplő dobozokban a glifozát meglétét (faktor a)/hiányát (faktor b) és a ragadozó kezelést (faktor c,d). A kezelési és a teszt dobozok számát random faktorként kezeltem. Binomiális hibaeloszlást feltételeztünk és logit link funkciót használtunk. A sok túlélő és viszonylag kevés elfogyasztott/sérült ebihal miatt az elemzéseket elvégeztük quasi-poisson és negatív binomiális hibaeloszlás feltételezésével is, de az eredmények egyik esetben sem különböztek minőségileg az itt bemutatottaktól. A modelleket mindkét változó esetében két adatsoron futattam le. Az egyik adatsor az összes teszt dobozadatait tartalmazta, a

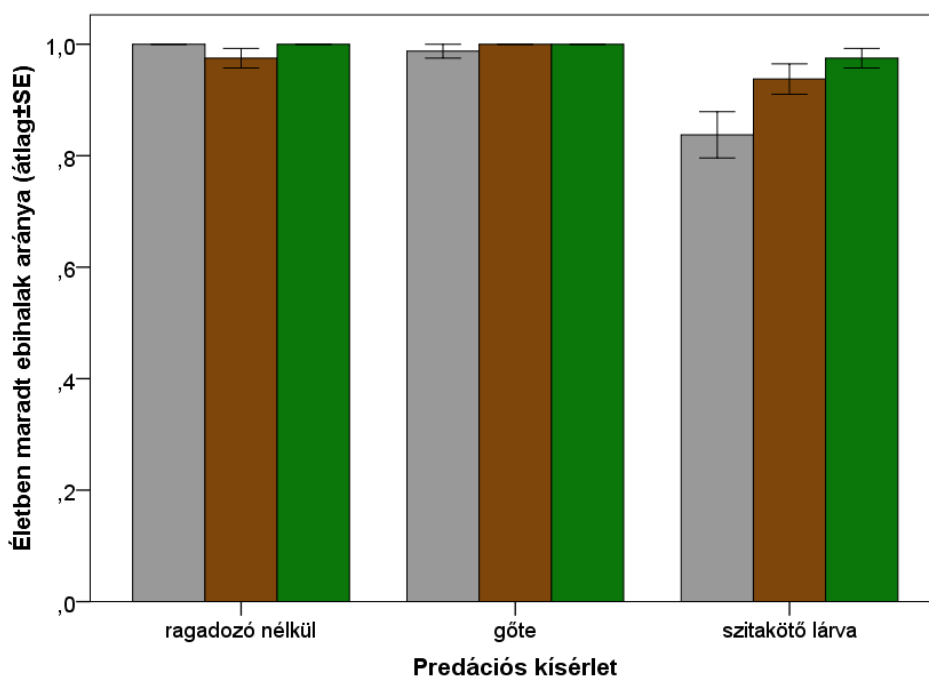
másik, szűkített adatsor csak azokat a dobozokat, amikben volt mortalitás, vagy sebesülés és szitakötőlárva volt a ragadozó. A szűkített adatsoron azért végeztük el az elemzést, mert sok kísérleti dobozban az összes ebihal sértetlen maradt, ugyanakkor csak a szitakötőlárvák jelenlétében tapasztaltunk jelentősebb predációt.

3. Eredmények

1. Túlélés

Az összes dobozra nézve az ebihalak túlélését szignifikánsan befolyásolta a nevelési környezetben lévő ragadozó típusa (GZLMM; $\text{Chi}^2=7,073$; $P=0,029$). Az ebihalak túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt szabadon úszó szitakötő lárva jelenlétében ($\text{Chi}^2=14,645$; $P<0,001$), mint götte mellett vagy ragadozó hiányában ($\text{Chi}^2=14,645$; $P<0,001$). A glifozát hatóanyagú gyomirtó szerkrónikus jelenléte a nevelési környezetben és akut jelenléte a teszt mezokozmoszokban, nem befolyásolta az ebihalak túlélését (krónikus $\text{Chi}^2=1,276$; $P=0,259$; akut $\text{Chi}^2=0,028$; $P=0,867$). A páros interakciók hatásai nem voltak szignifikánsak ($\text{Chi}^2=7,763$; minden $P>0,1$).

Szabadon úszó szitakötőlárvák jelenlétében volt számottevő mortalitás (18 ebihal/240 ebihal), amire hatással volt a nevelési környezetben lévő ragadozó típusa (faktor c: $\text{Chi}^2=9,705$; $P=0,008$), míg a nevelési és a teszt környezetben a gyomirtó szermegegléte/hiánya és az interakcióknak nem volt számottevő hatása (faktor a: $\text{Chi}^2=1,601$; $P=0,206$; faktor b: $\text{Chi}^2=0,602$; $P=0,438$; interakciók: $\text{Chi}^2=6,484$; minden $P>0,09$). A szitakötőlárvával nevelkedett ebihalak túlélése volt a legmagasabb, a ragadozó nélkül nevelkedett ebihalak túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt ($\text{Chi}^2=8,836$; $P=0,003$; 6. ábra). A göttel nevelkedett ebihalak túlélése szabadon úszó szitakötő jelenlétében szignifikánsan különbözött a kontrol ebihalaktól ($\text{Chi}^2=4,21$; $P>0,04$) és szignifikánsan nem különbözött a szitakötővel nevelkedett ebihalaktól ($\text{Chi}^2=1,584$; $P=0,208$).



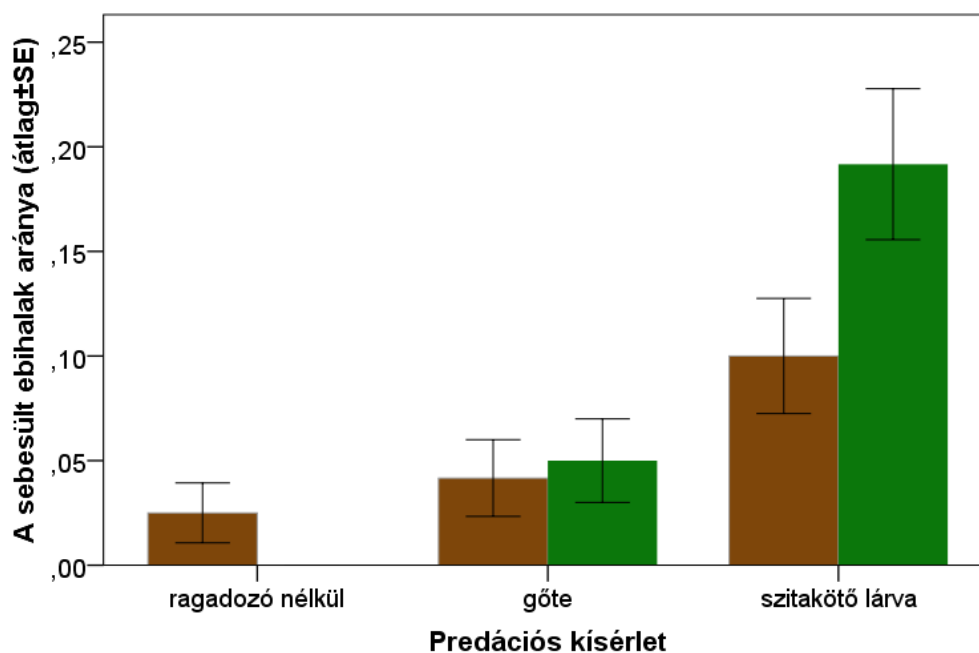
6.ábra. Az életben maradt ebihalak átlagos aránya (\pm SE) a szabadon úszó ragadozókkal végzett predációs testben.

A színek a nevelési környezetben található ragadozó típusát jelölik: ■ :ragadozó nélkül; ■ gőte; ■ :szitakötőlárvá).

2. Sérülés

Az összes dobozban a szitakötőlárvák gyakrabban sebesítették meg az ebihalakat, mint a gőté (Chi²=26,493; P<0,001). A többi faktor nem befolyásolta szignifikánsan az ebihalak megsebesülésének valószínűségét (faktor a: Chi²=1,806;P=0,179; faktor b: Chi²=0,009; P=0,927; faktor c:Chi²=0,326;P=0,861). A nevelési környezetben a glifozát kezelés és a test mezokozmoszok ragadozó kezelésének interakciója szignifikáns volt (Chi²=8,493 P=0,037). Tehát aglifozátotartalmazó mezokozmoszokban nevelkedett ebihalak nagyobb arányban sérültek meg szitakötőlárvák jelenlétében, mint a tiszta vízben nevelkedett ebihalak (7. ábra).A különböző ragadozók mellett nevelkedett ebihalak páronkénti összehasonlításában nem tapasztaltam szignifikáns különbséget (Chi²=2,313; P=0,128).

A szűkített adatsor dobozaiban a glifozát megléte/hiánya a nevelési közegben marginálisnem-szignifikáns hatást mutatott (P=0,055).



7. ábra. A nevelési környezetben jelenlevő glifozát hatása az ebihalak sérülési gyakoriságára. A színek a Glifozát jelenlétét vagy hiányát jelölik a nevelési környezetben (■:glifozát nélkül ■:glifozát jelenléte)

4. Diskusszió

A kísérletem azt mutatta, hogy a nevelési környezetben krónikusan jelenlevő glifozát nem befolyásolja az ebihalak túlélését ragadozókkal szemben. A szer akut jelenléte a teszt mezokozmoszokban sem gyakorolt hatást az újonnan a szerbe került ebihalakon. Az idős ebihalak lehet, hogy kevésbé reagálnak a szer hirtelen megjelenésére. Korábbi eredmények magasabb mortalitásról számolnak be a nevelési periódus közben, mint amit nekem sikerült megfigyelnem a kísérletem folyamán (RELYEA, R.A.2005b; RELYEA, R. A2012). 20 nap alatt egy ebihal sem pusztult el. Korábbi kutatásokkal ellentétben a szer gyenge mérgező hatását figyeltem meg (HOWE,C. M. et al. 2004; RELYEA, R.A. 2005b). A szer hatásának erősségét befolyásolhatja számos biotikus és abiotikus környezeti hatás. Eltérő eredményeket kaphattam különböző környezeti tényezők, és az európai erdei béka (*Ranadalmatina*) fajkülönbözősége miatt.

A glifozát hatóanyagú gyomirtó szerjelenlétében nevelkedett ebihalakat gyakrabban sebesítette meg szitakötő lárva, ami értelmezhető oly módon, hogy a szer károsan hat az ebihalakra, hiszen a sérülés nyilván rátermettség-költséggel jár. A sérülések mintázatát

ugyanakkor értelmezhetjük úgy is, hogy a szitakötőlárva-támadásnak kitettebihalak nagyobb arányban voltak képesek elmenekülni, ha glifozát-tartalmú nevelési közegből származtak (30 megtámadott ebihalból 23 menekült meg), mint ha glifozát-mentes környezetben nevelkedtek (24 megtámadott ebihalból csak 13 menekült meg). Utóbbi értelmezés szerint a gyomirtó szer nevelési környezetben való jelenléte és az általa indukált fenotípusos változások természetes körülmények között, vagyis ragadozók jelenlétében, előnyösek lehetnek az ebihalak túlélésére nézve. Meg kell ugyanakkor jegyeznem, hogy a ragadozómentes mezokozmoszokban is előfordultak sérülések. Ezeket a sérüléseket az ebihalak a megfogáskor, vagy a mezokozmoszokba való áthelyezéskor szerezhették, de az ebihalak egymásnak is okozhatták őket. A sérülések jelentőségének és a szer túlélésre kifejtett hatásainak értelmezéséhez így további vizsgálatokra van szükség.

Vizsgálati eredményeim alátámasztják azt a feltételezést, hogy a nevelési környezetben jelenlévő ragadozókra adott fenotípusos válasz növeli az ebihalak túlélését ugyanolyan ragadozókkal szemben (SMITH, D. C.-VANBUSKIRK, J. 1995; MCCOLLUM, S. A.-VANBUSKIRK, J. 1996; VAN BUSKIRK, J. 2000). Az ebihalak farkvitorlája szitakötők jelenlétében általában magasabb lesz, teste pedig rövidebb (VAN BUSKIRK, J. et al. 1997; RELYEA, R.A. 2001; RELYEA, R.A. 2004), aminek hatására a ragadozók gyakrabban támadják az ebihalak farkát, így ritkábban ejtenek halálos sebet az ebihalakon (VAN BUSKIRK, J. et al. 2003). Átalakuláskor a fark felszívódik, így a sebesült ebihalak metamorfként nem szenvednek hátrányt az ilyen sérülésektől. A szitakötővel nevelkedett ebihalak testalakjuk megváltoztatásán kívül lecsökkentik aktivitásukat is (VAN BUSKIRK, J.-MCCOLLUM S. A. 2000), így elkerülve az esetleges találkozást a lesből támadó szitakötő lárvával. A gótek jelenlétében nevelkedett ebihalak esetében gyakran gyengébb viselkedésbeli választ találtak, aminek köszönhetően hamarabb érhetnek el olyan testméretet, ami védeltséget jelent ezekkel a ragadozókkal szemben szemben (VAN BUSKIRK, J. 2001).

Vizsgálatom predációs kísérleti részében a vártnál kevesebb ebihalat fogyasztottak a ragadozók. A kísérletet a szokatlanul hosszú tél miatt késve tudtam csak megkezdeni, ugyanakkor a gótek nászidőszaka lerövidült, így a kísérlet vége felé már kezdték elhagyni a vizet, feltételezésünk szerint részben erre vezethető vissza, hogy olyan kevés ebihalat fogyasztottak el a predációs kísérletben. Másrészt pedig arra, hogy a predációs kísérlettel túl sokáig vártam és így az ebihalak már túl nagyok lettek. (egy korábbi kísérlet eredményére hagyatkoztam, ami arra utalt, hogy a gótek képesek a

nagyméretű ebihalakat is gond nélkül elfogyasztani (HETTYEY, A. et al. 2011). A kísérlet alatt több gótén is megfigyeltem, hogy átalakultak szárazföldi életmódra. Az idő előrehalad tán kívül feltehetően az is hozzájárult a góték megváltozott viselkedéséhez, hogy érzékelték, hogy a mezokozmoszban nincs jelen nőstény egyed, így nem képesek szaporodni, nincs miért a vízben maradni. A predációs tesztben tapasztalt magas túlélés további oka az lehetett, hogy a nevelési időszak alatt tapasztalt meleg idő hatására az ebihalak gyorsan nőttek, így a ragadozós teszt idejére a góték képtelenek voltak elkapni és elfogyasztani az ebihalakat. A szitakötő lárváknak is problémát okozhatott az ebihalak megnövekedett mérete és ereje. A tesztelt 20 szitakötő lárvából csak 8 táplálkozott és 5 volt képes egynél több ebihalat elfogyasztani. A nagyméretű ebihal elfogyasztásával a ragadozó megfelelő táplálék mennyiséghez jutott. A mezokozmoszokban mért hőmérséklet és pH nem volt sem olyan magas, sem olyan alacsony, hogy magyarázhattavolna a ragadozók alacsony predációs sikerét. (EDGINGTON, A. N. et al. 2004).

Az általam használt glifozát-koncentráció magasabb volt amerikai kutatók hasonló vizsgálataiban alkalmazott koncentrációinál (pl. RELYEA, R.A. 2012). A Glyphogan Classic az európai megfelelője az amerikai Roundup Original MAX-nak. Az Európai Unió szigorúbb szabályozás miatt az európai szerben kevesebb a kétéltűekre nézve erősen mérgező hatású POEA. Az általam használt szernek ugyanakkor ismertek az összetevői és azok pontos arányai, míg az amerikai termékeknek nem ismert a tényleges összetétele, ezért feltételezhetjük, hogy az amerikai gyomirtó szerektöbb POEA-t tartalmaznak. Magyarországon gyűjtött adatok szerint a glifozát koncentráció természetes vizekben 0,00012-0,001 mg a.e./L között változik (MÖRTL, M. et al. 2012). Ebben a tanulmányban azonban avízmintákat októberben vették. Magyarországon a gyomirtó szereket elsősorban vetés előtt, tavasszal szórják ki, így a kétéltűek korai, vízhez kötött fejlődési szakaszában jóval magasabb koncentrációban is jelen lehet a szer természetes vizekben. Hogy milyen koncentrációt érhet el a glifozát és a POEA természetes vizekben az ebihalak fejlődési szakaszának idejében, feltétlenül további vizsgálatot érdemel.

A közeljövőben tervezem a kísérlet megismétlését. A nevelési időtartamot lecsökkentve tervezem megelőzni, hogy az ebihalak túlzottan megnövekedjenek, valamint hogy a góték idő előtt el akarják hagyni a vizet. Így remélem elérem, hogy nagyobb arányban fogyasszák a ragadozók az ebihalakat, és így elemzéseim, a nagyobb mintaszámoknak köszönhetően, nagyobb erejűek legyenek. Emellett mintavételezni

fogunk természetes vizekből, hogy felderítsük, milyen koncentrációkban van jelen a gyomirtószerkét összetevője az ebihalak fejlődése alatt.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom HettyeyAttilának, hogy ez a kutatás létrejöhetett, a kutatócsoportom összes tagjának, különösen Mikó Zsanettnak, és Ujszegi Jánosnak, hogy segítettek az előkészületekben, és a kísérlet alatti munkafolyamatokban. Továbbá köszönöm laboraszisztenseinknek Wízl Virágnak, és Koska Dánielnek a terepi munkák, és az egész kísérlet alatti munkájukat.

Különös köszönettel tartozom Josh Van Buskirknak, hogy hasznos tanácsaival ellátott a kísérlet tervezésekor.

A Kutatásaink a Magyar Tudományos Akadémia 'Lendület' programjának támogatásával valósultak meg (MTA, LP2012-24/2012; www.mta.hu).

Szerzői hozzájárulás

- Teszteltem a Glyphogan Classic vegyszer hatását erdei béka ebihalak túlélésére nézve.
- A kísérlet előkészítését, a mezokozmoszok beállítását Mikó Zsanettel és Ujszegi Jánossal közösen végeztem el, a munkafolyamatokban egyenlő arányban vettünk részt.
- A nevelési periódusban az állatok elhelyezését, a ragadozók etetését önállóan végeztem, míg a teszt fázisban az állatok fotózását munkaigényessége miatt HettyeyAttila segítségével, az állatok beazonosítását önállóan végeztem el.
- A kísérletem eredményei szerint a Glyphogan Classic nincs közvetlen hatással az ebihalak túlélésére; az elemzésre használt statisztikai programot témavezetőm segítségével sajátítottam el, az adatok kiértékelését és a dolgozat megírását önállóan, de témavezetőm segítségével végeztem.

Irodalomjegyzék

- BAROLO D. 1993: Reregistration eligibility decision for glyphosate. - *EPA 738-R- 93-014.Reregistration Report. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.*
- BLAUSTEIN A.R. - KIESECKER J.M. 2002: Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. - *EcolLett*, 5: 597-608.
- CAUBLE K. - WAGNER R.S. 2005: Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. - *Bull Environ ContamTox*, 75: 429-435.
- COSTA M.J.-MONTEIRO D.A.-OLIVEIRA-NETO A.L.-RANTIN F.T.-KALININ A.L. 2008: Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. - *Ecotoxicology*, 17: 153-163.
- DAVIDSON C.-SHAFFER H.B.-JENNINGS M.R. 2001: Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypothesis. - *EcolAppl*, 11: 464-479.
- EDGINTON A.N.-SHERIDAN P.M.-STEPHENSON G.R.-THOMPSON D.G.-BOERMANS H.J. 2004: Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. - *Environ ToxicolChem*, 23: 815-822.
- EDWARDS W.M.-TRIPLETT G.B. JR.-KRAMER R.M. 1980: A watershed study of glyphosate transport in runoff. - *J Environ Qual*, 9: 661-665.
- GIESY J.P.-DOBSON S.-SOLOMON K.R. 2000: Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev Environ ContamToxicol*, 167: 35-120.
- HETTYEY A. _VINCZE K. _ZSARNÓCZAI S.-HOI H.-LAURILA A. 2011: Costs and benefits of defences induced by predators differing in dangerousness. - *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 1007-1019.
- HOWE C.M.-BERRILL M.-PAULI B.D.-HELBING C.C.-WERRY K.-VELDHOEN N. 2004: Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. - *Environ ToxicolChem*, 23: 1928-1938.
- JONES D.K.-HAMMOND J.I.-RELYEA R.A. 2010: Roundup® and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification. - *Environ ToxicolChem*, 29: 2016- 2025.

- JONES D.K.-HAMMOND J.I.-RELYEA R.A. 2011: Roundup[®] and amphibians: competitive stress can make the herbicide Roundup[®] more deadly to larval amphibians. - *Environ ToxicolChem*, 30: 446-454.
- MANN R.M.-HYNE R.V.-CHOUNG C.B.-WILSON S.P. 2009: Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. - *Environ Poll*, 157: 2903-2927.
- MAY R.M. 2010: Ecological science and tomorrow's world.- *Phil Trans R Soc B*, 365: 41-47.
- MCCOLLUM S.A.-VAN BUSKIRK J.1996:Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*.- *Evolution* 50:583-593.
- MÖRTL M.-NÉMETH GY.-JURACSEK J.-DARVAS B.-KAMP L.-RUBIO F.-SZÉKÁCS A. 2012: Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. - *MicrochemJ*, 107: 143-151
- RELYEA R.A. 2001: Morphological and behavioural plasticity of larval anurans in response to different predators. - *Ecology*, 82:1947-1955.
- RELYEA R.A.-MILLS N. 2001: Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to Gray Treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). - *Proc Nat Acad Sci*, 98: 2491-2496.
- RELYEA R.A. 2004: Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. - *Ecological Society of America*, 85:172-179.
- RELYEA R.A. 2005a: The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. - *Ecol Appl*, 15:618-627
- RELYEA R.A. 2005b: The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. - *Arch Environ Contam Toxicol*, 48: 351-357.
- RELYEA R.A.-HOVERMAN J. 2006: Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. - *Ecol Lett*, 9: 1157-1171.
- RELYEA R.A. 2010: Multiple stressors and indirect food web effects of contaminants on herpetofauna. - In: *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. - SPARLING D.W.-LINDER G.-BISHOP C.A.-KREST S.K.-*Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, Pensacola, FL pp.476-482.
- RELYEA R.A. 2012: New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. - *Ecol Appl*, 22: 634-647.

- SMITH D.C.-VAN BUSKIRK, J.1995:Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. -*Am. Nat.* 145:211-233.
- STUART S.N.-CHANSON J.S.-COX N.A.-YOUNG B.E.-RODRIGUES A.S.L.-FISCHMAN D.L.-WALLER R.W. 2004: STATUS AND TRENDS OF AMPHIBIAN DECLINES AND EXTINCTIONS WORLDWIDE. - *Science*, 306: 1783-1786.
- THOMPSON D.G.-WOJTASZEK B.F.-STAZNIK B.-CHARTRAND D.T.-STEPHENSON G.R. 2004: Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision[®] herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. - *Environ Toxicol Chem*, 23: 843-849.
- TSUI M.T.-CHU L.M. 2003: Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. - *Chemosphere*, 52: 1189-1197.
- VAN BUSKIRK, J. 2000:The cost of an inducible defense in anuran larvae. - *Ecology*, 81:2813–2821.
- VAN BURSKRIK J.-MCCOLLUM S.A.2000:Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behavior influence mortality risk from predation. - *Journal of Evolutionary Biology*, 13:336-347.
- VAN BUSKIRK J. 2001:Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. - *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 482-489
- VAN BURSKRIK J.-ANDERWALD P.-LÜPOLD S.-REINHARDT L.-SCHULER H. 2003: The lure effect, Tadpole Tail Shape, and the Target of Dragonfly Strikes.- *Journal of Herpetology*, 37:420-424.