

Egy glifozátalapú gyomirtó ökotoxikológiai hatásai kétéltűlárványokra és ragadozóikra

Doktori értekezés

Készítette:
Mikó Zsanett

Témavezető:

Dr. Hettyey Attila
tudományos főmunkatárs

ELTE Biológia Doktori Iskola
Vezető: **Prof. Erdei Anna**

Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia doktori program
Programvezető: Prof. Török János

Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport,
Növényvédelmi Intézet, Agrártudományi Kutatóközpont,
Magyar Tudományos Akadémia



Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Előszó.....	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. Glifozát.....	7
2. Célkitűzés, kísérleti megközelítés és predikciók.....	10
2.1. Barna varangy ebihalak glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenységeinek korfüggése.....	10
2.2. Glifozátalapú gyomirtó hatása hazai kisvizek két gyakori ragadozófajára.....	10
2.3. Glifozáttartalmú gyomirtó hatása erdei béka ebihalak viselkedésére.....	11
2.4. Glifozátalapú gyomirtó összetevőinek hatása erdei béka és barna varangy ebihalakra.....	11
2.5. Az ismételhetőség vizsgálata az ökotoxikológiai kísérleteinkben.....	12
2.6. Glifozátalapú gyomirtó és ragadozók együttes hatása laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban.....	12
3. Anyagok és módszerek.....	14
3.1. A vizsgált fajok.....	14
3.2. Az alkalmazott gyomirtó.....	16
3.3. Az állatok begyűjtése és tartása.....	17
3.4. Kísérleti elrendezések.....	18
4. A vizsgálatok részletes bemutatása.....	22
4.1. Barna varangy ebihalak glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenységeinek korfüggése.....	22
4.1.1. Módszerek.....	23
4.1.2. Statisztikai elemzés.....	23
4.1.3. Eredmények.....	24
4.1.4. Értékelés.....	29
4.2. Glifozátalapú gyomirtó hatása hazai kisvizek két gyakori ragadozófajára.....	32
4.2.1. Módszerek.....	32
4.2.2. Statisztikai elemzés.....	36
4.2.3. Eredmények.....	37
4.2.4. Értékelés.....	42
4.3. Glifozáttartalmú gyomirtó hatása erdei béka ebihalak viselkedésére.....	47
4.3.1. Módszerek.....	47
4.3.2. Statisztikai elemzés.....	48
4.3.3. Eredmények.....	49
4.3.4. Értékelés.....	52
4.4. Glifozátalapú gyomirtó összetevőinek hatása erdei béka és barna varangy ebihalakra.....	56
4.4.1. Módszerek.....	56
4.4.2. Statisztikai elemzés.....	57
4.4.3. Eredmények.....	58
4.4.4. Értékelés.....	61
4.5. Az ismételhetőség vizsgálata az ökotoxikológiai kísérleteinkben.....	64
4.5.1. Módszerek.....	64
4.5.2. Statisztikai elemzés.....	66

4.5.3. Eredmények	67
4.5.4. Értékelés	68
<i>4.6. Glifozátalapú gyomirtó és ragadozók együttes hatása laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban.....</i>	<i>71</i>
4.6.1. Módszerek.....	71
4.6.2. Statisztikai elemzés.....	74
4.6.3. Eredmények	75
4.6.4. Értékelés	81
5. Összefoglaló következtetések.....	86
6. Köszönetnyilvánítás	89
7. Irodalomjegyzék.....	90
8. Saját közlemények listája	113
9. Összefoglaló	114
10. Summary	115
11. Függelék.....	116

Előszó

Jelen doktori disszertáció négyévnyi (2013–2017) kutatás és adatfeldolgozás eredménye. A disszertáció ugyan egy nagy téma köré épül, az egyes kísérletek azonban egymástól erősen eltérő aspektusból vizsgálják egy glifozátalapú gyomirtó hatásait. Emiatt dolgozatomban némileg eltér a megszokott formai felosztástól. A *Bevezetés* két részből áll, ezután következik egy egységes *Célkitűzés, kísérleti megközelítés és predikciók* fejezet, majd az *Anyagok és módszerek* fejezet a vizsgálatokban alkalmazott módszerek rövid leírását tartalmazza. A módszerleírások azért nem az egyes alfejezetekben szerepelnek külön-külön, mert amennyire lehetséges, szerettem volna megőrizni a hagyományos típusú (nem tézises disszertációk) szerkezeti felépítését. Az egyes kísérleteket ezek után külön alfejezetekben tárgyalom, melyek egy rövid bevezető, egy részletesebb módszertani, egy eredményeket bemutató, végül egy értékelő részt tartalmaznak. Így a szorosan összetartozó részek közel kerülnek egymáshoz, ami véleményem szerint követhetőbbé és könnyebben érthetővé teszi a disszertációt, mintha az eredményeket egy egységes *Eredmények és Értékelés* fejezetbe foglaltam volna össze. A vizsgálatok nem időrendi sorrendben követik egymást, hanem a specifikusabb kérdéseket vizsgáló kísérletektől halad az általánosabb, inkább módszertani problémákkal foglalkozóak felé. A dolgozatot egy egységes *Összefoglaló következtetések, az Irodalomjegyzék, a magyar és angol nyelvű Összefoglaló, valamint egy rövid Függelék* zárja.

Mivel a kísérleteket azok mérete és összetettsége miatt nem egyedül végeztem, a disszertációban végig többes szám első személyt használok. Az 1. táblázatban összefoglalom, hogy mely vizsgálatok mely fázisaiban kik és milyen mértékű hozzájárulással vettek részt.

1. táblázat. A disszertáció szerzője és a közleményekben szereplő szerzőtársak hozzájárulása a vizsgálatokhoz. A sorrend a hozzájárulás mértékét jelzi. BV - Bókony Veronika, GZ - Gál Zoltán, HA - Hettyey Attila, HH - Horváth Henrik, IZ - Imrei Zoltán, JL - Jókai Levente, KD - Koska Dániel, MZs - Mikó Zsanett, NG - Nagy Gergely, ST - Sendula Tímea, SzM - Szederkényi Márk, UJ - Ujszegi János, WV - Wizl Virág.

Vizsgálat	Barna varangy ebihalak gyomirtóra mutatott érzékenységének korfüggése	Glifozátalapú gyomirtó hatása hazai kisvizek két gyakori ragadozófajára	Glifozátalapú gyomirtó hatása erdei béka ebihalak viselkedésére	A gyomirtó összetevőinek hatása erdei béka és barna varangy ebihalakra	Ökotoxikológiai kísérletek ismételhetősége	Glifozátalapú gyomirtó és ragadozók együttes hatása laboratóriumi és szabadföldi kísérleti környezetben
Kutatástervezés	HA, MZs	UJ, HA, GZ, MZs	HA, MZs, UJ, GZ	MZs, HA	HA, MZs	MZs, HA, UJ, GZ
Adatgyűjtés, kísérlet kivitelezése	MZs, SzM, JL, NG, UJ	UJ, GZ, KD, SzM, MZs	MZs, KD, WV, UJ, GZ, SzM, HA	MZs, ST, SzM	MZs, KD, WV, UJ, GZ, SzM, JL, NG, HA	MZs, KD, WV, UJ, GZ, SzM, HA, HH
Kiértékelés, statisztika	MZs, HA, BV	UJ, HA	MZs, HA	MZs, HA, BV	MZs, HA, BV	HA, MZs
Kézirat megírása	MZs, HA, UJ	UJ, HA, MZs, GZ	MZs, HA, UJ, GZ	MZs, HA	MZs, HA, UJ, GZ	MZs, HA, UJ, GZ, IZ

1. Bevezetés

A kétéltűeket manapság az egyik legveszélyeztetettebb gerinces csoportnak tekintik (Stuart et al. 2004; Wake és Vredenburg 2008), mivel a fajok több mint 40%-át kihalás fenyegeti (IUCN 2016). A pusztulás okai megegyeznek a globális diverzitáscsökkenés háttérében álló folyamatokkal, vagyis az élőhelyvesztés, a klímaváltozás, a növekvő UV sugárzás, az idegenhonos ragadozók megjelenése, az élelmiszerként való hasznosítás, a betegségek és a környezetszennyezés mind-mind szerepet játszanak benne (Sparling et al. 2001; Davidson et al. 2002; Alford 2010; Hayes et al. 2010; Hof et al. 2011).

Peszticidek alkalmazásával hatékonyan növelhető a mezőgazdasági termelés, melynek előnyei jól dokumentáltak (Jones et al. 2010). Évente több millió tonna peszticid kerül kiszórásra világszerte (Pimentel 2009), amelyből jelentős mennyiség juthat ki az agrárterületekről az eső, a szél vagy a nem megfelelő alkalmazás miatt (Pereira et al. 2009), veszélyeztetve a mezőgazdasági területek környezetében élő fajokat is (Giesy et al. 2000; Lehman és Williams 2010).

Bár a mezőgazdasági területeken a peszticidszennyezés a populációméret-csökkenés egyértelmű okának tűnhet, mégis számos tényező miatt nehéz közvetlenül a peszticidekhez kapcsolni a kétéltűek pusztulását (Lehman és Williams 2010). Az agrárterületeken a nagymértékű vegyszerkijuttatás általában más stressztényezőkkel együtt fordul elő, mint például a szárazföldi élőhelyek méretének csökkenése és a megváltozott vízviszonyok (Beja és Alcazar 2003). További nehézség, hogy populációméret-csökkenés olyan területeken is előfordul, ahol egyáltalán nem alkalmaznak peszticideket (Lehman és Williams 2010). Ennek ellenére néhány esetben mégis sikerült kétséget kizáróan bizonyítani az összefüggést a peszticidhasználat és a mezőgazdasági területeken élő kétéltűpopulációk károsodása között (Hayes et al. 2002, 2003; McDaniel et al. 2008).

A természetben a xenobiotikumok általában szubletális koncentrációban fordulnak elő (pl. Peruzzo et al. 2008; Struger et al. 2008; Battaglin et al. 2009), ennek azonban szintén súlyos következményei lehetnek az ott élő szervezetekre (Bridges 1999; Lajmanovich et al. 2003, 2011; Griffis-Kyle 2007; Paganelli et al. 2010). Ráadásul a peszticidek hatásait felerősíthetik más biotikus vagy abiotikus stresszfaktorok (Relyea és Mills 2001; Sih et al. 2004), emiatt a peszticidszennyezés komoly hatással lehet az egyedekre, az ökológiai mintázatokra és folyamatokra, ezeken keresztül pedig a fajok perzisztenciájára és az ökoszisztémák stabilitására és rezilienciájára (Relyea 2005a).

Habár vannak taxonok, amik érzékenyebbek bizonyos szennyeződésekre (Suter 2007), a kétéltűek is kifejezetten alkalmasak a különböző vegyszerek élőlényekre gyakorolt hatásainak vizsgálatára. Vékony, nagymértékben áteresztő bőrük van, héj nélküli petéik és komplex életciklusuk, ami miatt mind a vízi, mind a szárazföldi környezetben meglehetősen sebezhetőek (Linder et al. 2010). Ezen kívül, a kétéltűek rendkívül változatos víztestekben képesek szaporodni, ezért a peték és az ebihalak sok olyan peszticidnek lehetnek kitéve, ami be tud kerülni a természetes vizekbe. Mindezek ellenére a kétéltűek hosszú ideig alulreprezentáltak maradtak a xenobiotikumokkal kapcsolatos ökotoxikológiai vizsgálatok terén (Adams és Rowland 2003; Köhler és Triebkorn 2013; Johnson et al. 2017). A más taxonok vizsgálatából származó eredmények viszont nem feltétlenül alkalmasak a különböző életfázisban lévő kétéltűekre gyakorolt hatások becslésére (Relyea 2003a, 2004a; Linder et al. 2010).

A különböző xenobiotikumok kétéltűekre kifejtett hatásait vizsgáló kísérletek nagy részét laboratóriumi körülmények között végzik, míg a természetesebb körülmények között, például szabadföldi mezokozmoszokban végzett vizsgálatok sokkal ritkábbak (Boone és James 2005). Bár gyakran a laboratóriumi vizsgálatokban is ökológiailag releváns koncentrációkat alkalmaznak, a kapott eredmények nem feltétlenül tükrözik a természetesebb körülmények között megfigyelt hatásokat (Boone és Bridges 2003a). Ennek egyik oka, hogy a természetben megtalálható tényleges koncentrációkat számos faktor befolyásolhatja, például a növények felvehetik ezeket az anyagokat, vagy azok megkötődhetnek az üledékben is (Goldsborough és Brown 1993; Bromilow et al. 2006; Katagi 2006). Az is előfordulhat, hogy a természetes környezetben lévő biotikus és abiotikus stresszfaktorok közötti interakciók elfedik a peszticidek hatásait (Egea-Serrano et al. 2012).

A xenobiotikumokra mutatott érzékenység nem egy állandó, fajra jellemző érték, hanem nagymértékben változhat különböző külső és belső faktorok hatására (Rattner és Heath 2003). Az érzékenység a környezet számos kémiai és fizikai tulajdonságától függhet, többek között a hőmérséklettől (Boone és Bridges 1999), a pH-tól (Chen et al. 2004) és az UV sugárzástól (Blaustein et al. 2003). Biológiai stresszfaktorok, úgymint ragadozók (Relyea 2003a), versenytársak (Jones et al. 2011) és paraziták jelenléte (Christin et al. 2003) szintén megváltoztathatják a peszticidek toxicitását. A vegyszerekkel történt korábbi érintkezés ugyancsak hatással lehet az érzékenységre (Cothran et al. 2013; Hua et al. 2013, 2015). Mindezek miatt lehetséges, hogy a laboratóriumi tesztek alul- vagy túlbecsülik a xenobiotikumok kétéltűekre kifejtett hatásait (Boone és Bridges 2003a; Thompson et al. 2004;

Egea-Serrano et al. 2012). Ezért lényeges összehasonlítani a xenobiotikumok hatásait a különböző kísérleti környezetekben (Skelly 2002, de lásd Chalcraft et al. 2005).

Bár az utóbbi időben ismereteink a peszticidek kétéltűekre gyakorolt hatásairól jelentősen bővültek, még mindig sok olyan általánosan használt peszticid létezik, melyek kétéltűekre kifejtett esetleges hatásait alig, vagy egyáltalán nem vizsgálták (Hayes et al. 2006). Emiatt szükség lenne a tesztelés során felhasznált peszticidek és a vizsgált fajok számának növelésére, ami nemcsak a xenobiotikumok nem-célszervezetekre kifejtett hatásainak megértését segítené, hanem a kétéltűpopulációk védelméhez és megőrzéséhez is hozzájárulna (Lehman és Williams 2010).

1.1. Glifozát

A glifozát hatóanyagú gyomirtó szerek a legnagyobb mennyiségben alkalmazott herbicidek közé tartoznak világszerte (Relyea 2005b; Grube et al. 2011), és Magyarországon is több mint 1200 tonna glifozát (hatóanyag) került forgalomba 2014-ben (NÉBIH 2014). Emiatt a glifozát egyike a három leggyakrabban kimutatott emberi eredetű kemikáliának az édesvízi ökoszisztémákban (Ludvigsen és Lede 2001; Pérez et al. 2011; Villeneuve et al. 2011; Mörtl et al. 2013).

A glifozátalapú szerek széles hatásspektrumú gyomirtók, melyek általában két fő komponensből állnak: a glifozátból, és valamilyen felületaktív anyagból (Giesy et al. 2000; Mann et al. 2009). A glifozát (N-(foszfometil)-glicin) gyenge szerves sav, a glicin aminoszfonsav típusú analógja, melynek elsődleges bomlásterméke az amino-metil-foszfonsav (AMPA; Pérez et al. 2011). Növényekben a sikimisav út egyik fő enzimjét, az 5-enol-piruvil-sikiminsav-3-foszfát-szintáz (EPSPS) működését gátolja oly módon, hogy a foszfoenol-piruvát (PEP) analójként annak helyére kötődik be. Ez az anyagcsereút-gátlás a fenil-alanin, a tirozin és a triptofán szintézisét akadályozza, mely esszenciális aminosavak hiánya rövid időn belül a növény pusztulásához vezet (Giesy et al. 2000; Székács és Darvas 2012). A glifozátkoncentrációt általában mg hatóanyag (*active ingredient*, a.i.) / literben, vagy mg sav-egyenérték (*acid equivalent*, a.e.) / literben fejezik ki (1 mg a.i./l = 0,75 mg a.e./l; Relyea 2006), míg a gyomirtóban lévő többi összetevő többnyire üzleti titoknak minősül, és mennyiségük gyakran nem is kerül feltüntetésre a csomagoláson (Relyea 2011).

Mivel a glifozát felvétele legtöbbször a levél kutikuláján keresztül történik, amin anionos jellege miatt nehezen jut át (Mann et al. 2009), az abszorpció hatékonyságának fokozása érdekében, és hogy be tudjon kerülni a mélyebb szövetekbe, a forgalomban lévő

készítmények általában tartalmaznak valamilyen felületaktív anyagot. Az egyik leggyakrabban alkalmazott felületaktív anyag a polietoxilált faggyúamin (*polyethoxylated tallow amine*; POEA). A POEA-t, vagy hasonló felületaktív anyagot tartalmazó glifozátalapú szerek használata kizárólag szárazföldön engedélyezett, mivel ott hatásuk az élőlényekre elméletileg elhanyagolható, míg vízi környezetbe jutva súlyosan károsíthatják az élővilágot (Giesy et al. 2000; Tsui és Chu 2003; Székács és Darvas 2012; Mörtl et al. 2013).

Az ökotoxikológiai felmérések alapján a természetes vizekre becsült legmagasabb koncentrációk glifozátalapú szerek esetén 1,4 és 7,6 mg a.e./l közé (Mann és Bidwell 1999; Relyea 2012; Wagner et al. 2013), míg a ténylegesen mért koncentrációk 0,1 µg/l és 5,2 mg a.e./l közé esnek (Edwards et al. 1980; Thompson et al. 2004; Battaglin et al. 2005). Magyarországról viszonylag kevés adattal rendelkezünk a vizek glifozát-szennyezettségét illetően, Békés megyében 540 és 980 ng/l közötti, míg Pest és Komárom-Esztergom megyében 2,36 és 15 µg/l közötti értékeket találtak felszíni és talajvizekben (Székács et al. 2014a; Székács et al. 2014b; Bókonyi et al. 2018). Az értékek nagymértékben függenek az élőhelyi sajátosságoktól és az agrárterületek távolságától (Mann és Bidwell 1999; Giesy et al. 2000; Pérez et al. 2011; Relyea 2012; Wagner et al. 2013), ennek ellenére az említett koncentrációk megközelítik, esetenként túl is lépik a legtöbb észak-amerikai és ausztrál kételtű esetében megállapított LC₅₀/LD₅₀ értékeket (Mann és Bidwell 1999; Relyea és Jones 2009; Relyea 2012).

Noha a glifozát önmagában is káros lehet a nem-célszervezetekre, úgy tűnik a felületaktív anyag az, ami a veszélyesebb összetevő a vízi szervezetekre nézve (Folmar et al. 1979; Perkins et al. 2000; Tsui és Chu 2003; Edginton et al. 2004b; Pérez et al. 2011), annak ellenére, hogy ezeket általában inert összetevőként kezelik (Moore et al. 2012). A felületaktív anyagok elsősorban a kopoltyú légzőhámját roncsolva fejtik ki káros hatásukat (Edginton et al. 2004b). A glifozát ugyanakkor csökkenti a fitoplankton-biomassza mennyiségét, ami pedig csökkenti a vízben az oldott oxigéntartalmat (Relyea 2012), tovább károsítva a kopoltyúval lélegző állatokat.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a glifozátalapú gyomirtók kételtűekre nézve toxikusak (Mann és Bidwell 1999; Lajmanovich et al. 2003; Relyea 2005b), szubletális koncentrációban pedig ezek a gyomirtók (különösen ahol a felületaktív anyag a POEA) lassíthatják a fejlődést (Howe et al. 2004; Cauble és Wagner 2005) és csökkenthetik az átalakuláskori testtömeget (Howe et al. 2004; Cauble és Wagner 2005; Williams és Semlitsch 2010). Ezen kívül fejlődési rendellenességeket (Lajmanovich et al. 2003; Howe et al. 2004; Jayawardena et al. 2010) és interszexualitást (hermafroditizmus) okozhatnak (Howe et al.

2004). Oxidatív stressz-tüneteket is kiválthatnak (Costa et al. 2008; Güngördü 2013), valamint a viselkedésre (Wojtaszek et al. 2004; Katzenberger et al. 2014; Moore et al. 2015) és a testalakra (Relyea 2012) is hathatnak.

2015. március 20-án az Egészségügyi Világszervezet (*World Health Organization*, WHO) Nemzetközi Rákkutatási Ügynöksége (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) a glifozátot a 2A, azaz emberben valószínűleg rákkeltő kategóriába sorolta. Ugyanakkor az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (*European Food Safety Authority*, EFSA) egy nem sokkal később kiadott jelentésében a glifozát továbbra is „embernél valószínűleg nem karcinogén”-ként szerepelt. Ennek egyik oka, hogy míg az IARC értékelése veszélyalapú, addig az EFSA-é kockázatalapú. A kockázatalapú értékelés ugyan nem zárja ki a lehetséges veszélyeket, viszont realisztikus forgatókönyvek alapján becsli azok megjelenési valószínűségét. Továbbá az EFSA jelentésében csak a fő hatóanyag, a glifozát hatásait vizsgálták, az IARC-ében azonban a gyakorlati szempontból fontos gyomirtó készítményeket is. Ezenkívül az IARC tudományos publikációkban megjelent adatokat használt fel, ezzel szemben az EFSA hozzáfért az ipari kutatók nyilvánosan nem hozzáférhető eredményeihez is (Székács és Darvas 2018). A jelentések eltérő eredményei számos vitát generáltak, végül 2016. november 30-án a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) az Európai Bizottság 2016/1313 végrehajtási rendeletére hivatkozva visszavonta a polietoxilált faggyúamint tartalmazó glifozát készítmények engedélyét. Az EFSA ugyanis megállapította, hogy ez a típusú segédanyag jelentősen növelheti a készítmény alkalmazásának egészségügyi kockázatait. Magát a glifozátot, mint hatóanyagot, azonban nem tiltották be, 2017. november 27-én újabb öt évvel meghosszabbították a glifozáttartalmú gyomirtók Európai Unión belüli használati engedélyét. Bár az általunk vizsgált gyomirtó-összetételt (Glyphogan® Classic, GC) hazánkban már nem lehet alkalmazni, hasonló szerek az Európai Unió kívül továbbra is kereskedelmi forgalomban vannak, ezért az ilyen típusú vegyszerek vizsgálata továbbra is indokolt. Főleg a genetikailag módosított, glifozát-rezisztens vetőmagok térnyerése miatt, mivel az ilyen növényekkel bevetett területeken évente többször is nagy mennyiségben kiszórásra kerülhet a gyomirtó. Továbbá, kisebb mértékben ugyan, de a felületaktív anyagot nem tartalmazó glifozátalapú szerek is károsíthatják a nem-célszervezeteket (Pérez-Iglesias et al. 2016; Rissoli et al. 2016; Bach et al. 2016, 2018), így ezek a hatások továbbra is veszélyt jelenthetnek a magyarországi élővilágra.

2. Célkitűzés, kísérleti megközelítés és predikciók

2.1. Barna varangy ebihalak glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenységének korfüggése

Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy barna varangy ebihalaknál hogyan változik a glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenység a fejlődés során. Ezen kívül arra is kíváncsiak voltunk, hogy az érzékeny periódusnál hosszabb ideig tartó gyomirtó-kitettség jobban károsítja-e az állatokat. Ezért az ebihalakat háromféle GC-koncentrációnak tettük ki, a lárvális fejlődésük 1., 2., 3., 4. vagy 5. szakaszában, vagy végig az egész kísérlet alatt. A GC egyedekre kifejtett hatását a túlélés, az átalakulásig eltelt idő és az átalakuláskori testtömeg mérésén keresztül becsültük. Korábbi vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy a fiatalabb egyedek érzékenyebbek a GC-re (Jones et al. 2010), az érzékenység csökken a lárvális fejlődés előrehaladtával (Howe et al. 2004; Jones et al. 2010), és azok az ebihalak károsodnak leginkább, akik teljes lárvális fejlődésük során ki vannak téve a GC-nek (Bridges 2000).

2.2. Glifozátalapú gyomirtó hatása hazai kisméretű két gyakori ragadozófajára

Ebben a vizsgálatban a GC tartósan magas koncentrációjának hatásait vizsgáltuk időszakos kisméretű két csúcsragadozófajára. Modellfajként Közép-Európában gyakori, taxonómiaiilag, fiziológiailag és ökológiailag egymástól távol álló ragadozókat választottunk: a sebes acsa lárváját, ami egy „ül és vár” stratégiát követő gerinctelen ragadozó, és a pettyes göte kifejlett egyedeit, amik aktívan kereső gerinces ragadozók. Az alkalmazott glifozátkoncentráció 6,5 mg a.e./l volt, ami közel van a várható legmagasabb, természetben is előforduló koncentrációhoz (Mann és Bidwell 1999; Relyea 2012; Wagner et al. 2013), így maximalizáltuk az esetleges hatások detektálhatóságát. A GC egyedekre kifejtett hatását a túlélés, a testtömeg, az aktivitás és a predációs aktivitás mérésén keresztül becsültük. Hogy megvizsgáljuk a GC krónikus és akut hatásait standardizált és természeteshez közelebbi körülmények között is, a vizsgálatot laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban egyaránt elvégeztük. Feltételeztük, hogy a GC nem befolyásolja jelentősen és közvetlenül a vizsgált fajok egyedeit, ugyanakkor közvetett módon, táplálkozási aktivitásukra kifejtett hatásán keresztül hatással lehet a táplálékhálózatra.

2.3. Glifozáttartalmú gyomirtó hatása erdei béka ebihalak viselkedésére

Kísérletünk célja a GC és ragadozók kétéltűlárvák viselkedésére együttesen kifejtett hatásainak vizsgálata volt. A GC kezelést ragadozó jelenlétével vagy hiányával kombináltuk, így vizsgálva, hogy egy további stressztényező hozzáadása fokozza-e a GC ebihalakra kifejtett hatását (Relyea 2003a, 2005b; Sih et al. 2004). Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a GC hasonló válaszokat indukál-e, mint a ragadozó jelenlétére adott válasz (Semlitsch et al. 1995; Bridges 1999), valamint, hogy a GC gátolja-e a ragadozó jelenlétére adott viselkedési válaszokat (Mandrillon és Saglio 2007a). Hogy ezt elérjük, a GC három koncentrációjával kezeltünk erdei béka ebihalakat (0; 2 és 6,5 mg a.e./l glifozát), ketrebe zárt ragadozó jelenlétében vagy hiányában (ragadozó nélkül, sebes acsa lárva, vagy felnőtt hím pettyes göte jelenlétében). A korábbi vizsgálatok általában laboratóriumi körülmények között zajlottak és csak kevés információ áll rendelkezésre a GC természetesebb körülmények között kifejtett hatásairól. A kísérletet épp ezért szabadföldi mezokozmoszokban végeztük el, ami az erősen leegyszerűsített laboratóriumi körülményekhez képest jobban modellezi a természetes élőhelyek összetettségét (Relyea és Hoverman 2006, 2008; Winkler és Van Buskirk 2012). Ráadásul lehetővé teszi, hogy többféle viselkedési változót vizsgáljunk, mint a laboratóriumban. A vizsgálatban négy viselkedési változót vizsgáltunk: az aktivitást, a rejtőzködést, a térbeli ragadozóelkerülést, és a függőleges elhelyezkedést. Feltételeztük, hogy az ebihalak ragadozó jelenlétében csökkentik aktivitásukat, többet rejtőzködnek és a ragadozóketrectől lehetőleg távol helyezkednek el, ahogyan azt korábbi, lárvális kétéltűeken végzett vizsgálatokban tapasztalták (Laurila et al. 1997; Schoeppner és Relyea 2008). GC jelenlétében szintén csökkent aktivitást és növekvő rejtőzködést vártunk (Semlitsch et al. 1995; Bridges 1999; Moore et al. 2015), valamint feltételeztük, hogy az ebihalak inkább a láda alján tartózkodnak, hogy elkerüljék a hőretegződés miatt kialakuló magasabb felszínközeli koncentrációt (Jones et al. 2010). Végül azt is feltételeztük, hogy a ragadozó-jelenlét növeli a GC viselkedésre gyakorolt hatását közepes koncentráción (Relyea 2005b), viszont magas koncentráción a szer már csökkenti a ragadozóra adott válaszok intenzitását a ragadozófelismerés gátlása miatt (Moore et al. 2015).

2.4. Glifozátalapú gyomirtó összetevőinek hatása erdei béka és barna varangy ebihalakra

Kísérletünkben meg szeretnénk vizsgálni, hogy valóban a felületaktív anyag felelős-e a GC toxicitásának jelentős részéért, valamint hogy a ragadozó jelenléte befolyásolja-e a

komponensek letális hatását. Ehhez barna varangy és erdei béka ebihalakat neveltünk négy glifozátkoncentráción (0; 1; 2 és 4 mg a.e./l), négy felületaktív anyag-koncentráción (0; 0,44; 0,88 és 1,74 ml/l POEA), illetve a kettő kombinációján, szitakötőlárváktól származó szemiokemikáliák jelenlétében vagy hiányában. A kezelések hatását az elpusztult egyedek számának meghatározásával, valamint a túlélők testtömegének mérésével becsültük. Feltételeztük, hogy mindkét komponens károsan hat az egyedekre, de a felületaktív anyag lesz az, ami nagyobb mértékben csökkenti a túlélést és a testtömeget (Howe et al. 2004; Moore et al. 2012; Lanctôt et al. 2014). A legnagyobb hatást a két komponens együttes jelenlétében vártuk, ezen kívül feltételeztük, hogy a ragadozó-szemiokemikália tovább növeli a GC-komponensek negatív hatásait (Relyea 2005b).

2.5. Az ismételhetőség vizsgálata az ökotoxikológiai kísérleteinkben

Kísérletünkben meghatároztuk a GC LC₅₀ értékeit két farkatlan kételtű fajnál, az erdei békánál és a barna varangynál. Megvizsgáltuk azt is, hogy egy további stressztényező hozzáadása befolyásolja-e a standard toxicitási teszt kimenetelét, vagyis, hogy a predációs kockázat (szitakötőlárváktól származó szemiokemikáliák) növeli-e a GC toxicitását. Végül, hogy megállapíthassuk, hogy az egyetlen kísérlet alapján becsült LC₅₀ értékek mennyire megbízhatóak és pontosak, a kísérleteket egy héttel később megismételtük, az erdei béka esetében azonos, a barna varangy esetében kismértékben módosított kísérleti elrendezés mellett. Feltételeztük, hogy a GC mindkét fajnál csökkenti a túlélést, különösen a magasabb koncentráción, a ragadozó-szemiokemikália növeli az ebihalak érzékenységét a GC-vel szemben, valamint hogy a kísérleti elrendezésben megjelenő különbségek hatással lesznek a GC toxicitására.

2.6. Glifozátalapú gyomirtó és ragadozók együttes hatása laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban

Kísérletünkben a fő cél az ökotoxikológiai teszteknel alkalmazott vizsgálati környezetek eredményeket befolyásoló hatásainak vizsgálata volt. Ennek teszteléséhez erdei béka ebihalakat neveltünk három glifozátkoncentráción (0; 2 és 6,5 mg a.e./l), szitakötőlárva jelenlétében vagy hiányában, laboratóriumban vagy szabadföldi mezokozmoszokban. A különböző stresszorok ebihalakra kifejtett hatását a túlélés, a viselkedés, a testalak és a testtömeg mérésén keresztül becsültük. A korábbi vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy a

GC életmenet-változókra kifejtett hatásai jelentősen különbözni fognak a két vizsgálati környezet között (Skelly 2002; Winkler és Van Buskirk 2012).

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgált fajok

3.1.1. Barna varangy (*Bufo bufo*; Linnaeus, 1758)

A barna varangy szinte egész Európában előfordul, megtalálható Nyugat-Ázsia egyes részein, valamint Észak-Afrikában. Magyarország területén szinte mindenütt megtalálható, ahol szaporodáshoz megfelelő vizet talál. Széles elterjedési területén belül, jó alkalmazkodóképessége miatt igen változatos élőhelyeken fordul elő, nemcsak a síkságokon, hanem a domb- és hegyvidékeken is (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület 2018a). Elsősorban erdőtársulásokhoz kötődik, a fenyő, a kevert és a lombhullató erdőkben egyaránt megtalálható, de előfordul ligetekben, bozótosokban, parkokban és kertekben is, főleg azokon a nedves helyeken, ahol sűrű a növényzet. A nagy kiterjedésű nyílt területeket általában elkerüli, de az erdős tájak közelében megtelepedik a mezőkön, mezőgazdasági területeken, tisztásokon, emberi településeken, gyümölcsösökben, szőlőkben stb. is (AmphibiaWeb 2018a). Főként tavakban és holtágakban szaporodik, de nagyobb pocsolyákba, keréknyomokba, lassú folyású csatornába is petézik. Erős szaporodóhely-hűség jellemzi, az ivarérett állatok akár 2 km-t is megtesznek, hogy visszatérjenek ugyanahhoz a vízhez, ahol kifejlődtek. A szaporodási időszak általában március közepétől április elejéig tart (Péchy és Haraszthy 1997). A nőstények a petéket kétsoros, 5-7 méter hosszú zsinórban rakják le. Az akár 7000-10000 petét is tartalmazó petezsinórt vízinnövények, vízben álló bokrok, ágak, kövek köré tekerik. Az embrionális fejlődés általában 2-3 hétig tart, a kikelő állatok néhány napig még a zsinórhoz rögzülnek. Az ebihalak fekete színűek, hasoldaluk szürkésfekete, farkuk tompán lekerekített, teljes hosszúságuk 30-35 mm. A barna varangy szívre ható (kardiotonikus) glikozidokat, bufadienolodokat termel. Erősen mérgező vegyületek, mivel a membránokban található Na^+/K^+ -ATP-ázok antagonistáiként fokozzák a szívizom-kontrakciót (Daly 1995). Ezek a toxinok kis mennyiségben a frissen átalakult állatokban is megtalálhatóak, viszont az ebihalakban nagy mennyiségben fordulnak elő, mivel az ebihalak képesek *de novo* szintetizálni ezeket a vegyületeket (Bókony et al. 2016). Az ebihalak természetes körülmények között 1,5-2,5 hónapig fejlődnek, a frissen átalakult, 7-12 mm-es kis varangyok eleinte elsősorban nappal aktívak és a víz közelében maradnak, később aktív időszakuk egyre inkább az éjjeli órákra tolódik és a víztől egyre távolabb keresnek menedéket és táplálékot (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület 2018a).

3.1.2. Erdei béka (*Rana dalmatina*; Bonaparte, 1840)

Az erdei béka Közép- és Dél-Európában honos, emellett Kis-Ázsia nyugati területein is megtalálható, az Ibériai-félszigetről azonban hiányzik (AmphibiaWeb 2018b). Magyarországon a faj gyakorinak számít, a számára alkalmas élőhelyeken az egész ország területén jelen van. A lombos erdők jellegzetes faja, hazánkban a tölgy- és bükkerdőkben, és a környező nedves réteken fordul elő, kedveli az ártéri erdőket (Péchy és Haraszthy 1997). A hegységekben 1000 méternél ritkán hatol magasabbra. Párási időszaka jellemzően hosszabb, mint a többi korán szaporodó békaké, általában március elejétől (megfelelő időjárás esetén február végétől) április közepéig tart (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület 2018b). Peterakó helyei elég változatosak, megtalálhatóak köztük az állandó és időszakos erdei tavak, de a pocsolyák és keréknyomok is. A nőstények 450-1800 petét raknak le gömbölyded csomókba, melyeket vizinövényekhez, vagy elsüllyedt ágakhoz rögzítenek (AmphibiaWeb 2018b). Az ebihalak a petékből 5-8 nap elteltével kelnek ki, ami után pár napig még a szikzacskóból táplálkoznak. Ezután pedig főleg algákat, növényi részeket fogyasztanak, de az elpusztult fajtársak tetemét is megeszik. A nagyjából 60 mm hosszúságúra megnövő ebihalak barnásfekete színűek, hasuk gyöngyházfehér, testükön aranyszínű foltokkal. Farokvitorlájuk magas, sokszor a hát hátsó kétharmadánál kezdődik, színe azonos a test színével, de jellemzően sötéten foltozott, különösen a vitorla felső része (Péchy és Haraszthy 1997). Ragadozó jelenlétében az ebihalak morfológiája megváltozik (Lardner 2000), aktivitásukat jelentősen csökkentik és búvóhelyhasználatuk is megnő (Hettyey et al. 2011). Az ebihalak 2-4 hónapig fejlődnek, az átalakult, 12-20 mm-es kisbékák május végén, júniusban hagyják el a vizet (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület 2018b).

3.1.3. Pettyes götte (*Lissotriton vulgaris*; Linnaeus, 1758)

A pettyes götte Európa legnagyobb részén megtalálható (kivéve Dél-Franciaország, a Pireneusok és az Appennini-félsziget déli része), valamint Kis-Ázsia nyugati részén és a Kaukázusban is, elterjedési területe Ázsiában egészen az Altáj-hegységig nyúlik. Hazánkban középhegységi erdőkben és nyíltabb alföldi tájakon egyaránt előfordul, az egyik leggyakoribb götőfaj (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület 2018c). A kifejlett gőték életük nagy részét a szárazföldön töltik, csak a szaporodási időszakban (február vége - június eleje) térnek vissza a vízbe. A sekélyebb, dús növényzetű vizeket részesítik előnyben, szaporodnak tavakban, mocsarakban, patakokban, ártereken, keréknyomokban, kubikgödörökben, csatornáknakban, mesterséges víztározókban és kerti tavakban is (Péchy és Haraszthy 1997). Az

ivarérett hímek színezete és morfológiája a nászidőszakban a nőstényekétől eltér, ivari kétalakúság figyelhető meg. A hímek díszesebbek, fejükön sötét hosszanti csíkok figyelhetőek meg. A háti és oldalsó részek barnás, szürkésbarnás, sárgásbarnás vagy olajszürke színűek, hasuk színe a világossárgától a narancssárgáig terjed, rajta sötét pöttyökkel vagy foltokkal. A nőstényektől eltérően a hímeknek jól fejlett háttarajuk és hátsó lábaikon úszókarójuk van, a farokvitorla alsó részén, a farok alatt égszínkék vagy gyöngyházszerű sáv jelenik meg, a kloáka megduzzad. Ezenkívül a hím hátát és hasát nagy, sötét foltok borítják, amelyek a nőstényeken kisebbek vagy teljesen hiányoznak (AmphibiaWeb 2018c). A felnőtt állatok a szárazföldön férgekkel, meztelen csigákkal és ízeltlábúakkal táplálkoznak, a vízben pedig gerincteleneket, békapetéket, kisebb ebihalakat fogyasztanak, aktívan keresve táplálékukat (Péchy és Haraszthy 1997).

3.1.4. Sebes acsa (*Aeshna cyanea*; Müller, 1764)

A sebes acsa az egyik legelterjedtebb európai szitakötőfaj, Skandinávia északi és a Balkán déli részéről azonban hiányzik. Magyarországon jellemzően a dombvidékek és a középhegységek erdős területein fordul elő, az erdei tavak, árnyékolt vízü árkok, lassú folyású patakok és állandó vízü kisvizek környékén. Párázás után a nőstény a petéket mohapárnákba, a nedves talajra, korhadó fákba vagy növényekre rakja. A peték telelés után, tavasszal kelnek ki, a lárvák két évig fejlődnek (Ambrus 2018). A lárvák teste megnyúlt, hengeres, maximum 38-50 mm hosszú (Butler 1998). Nagy összetett szemük van, a fej alsó részén pedig jellegzetes szájszervük, a fogóálarc helyezkedik el. Előtoruk (*prothorax*) jól elkülönül az összenőtt közép- és utótortól (*mezo- és metathorax*), ahonnan a páros szárnylemezek erednek. A potroh végén található a lárvák légzőszervének, a végbélkopoltyúnak az öt tüskéből álló zárószerkezete, az úgynevezett anális háromszög (*anal pyramid*). Zsákmányukra (vízi rovarok, halivadékok, ebihalak) többnyire vízínövények alámerült hajtásaira vagy gyökereire kapaszkodva, helytülő „ül és vár” stratégiát követve vadásznak (Kriská 2013).

3.2. Az alkalmazott gyomirtó

A dolgozatban szereplő összes vizsgálathoz a Glyphogan[®] Classic (GC; Monsanto Europe S.A., Brüsszel, Belgium) nevű gyomirtót használtuk, mely 41,5 m/m% (360 g/l) glifozátot – izopropil-amin só formájában – és 15,5 m/m% POEA-t tartalmaz. Azért ezt a márkát választottuk, mivel ez a termék egyike azon kevés glifozátalapú gyomirtónak, ahol az összetevők között feltüntették a felületaktív anyag fajtáját. Továbbá, a szert széles körben

használták nemcsak a mezőgazdasági területeken (szántóföld, erdészeti kultúrák, legelő és gyepterületek, szőlő- és gyümölcsültetvények), hanem mezőgazdaságilag nem művelt helyeken is, például kiskertekben, utak mentén, vízzel nem borított árkokban és csatornában, árokpartokon, ipari létesítmények területén, vasúti pályatesteknél, stb. (ADAMA Hungary 2016). A glifozáthalapú gyomirtók jelentős részénél csak a tartalmazott glifozát mennyisége ismert, így az ezzel foglalkozó irodalomban bevett gyakorlat, hogy a koncentrációkat mindig az ismert komponensre, vagyis a glifozátra adják meg. Ezért a kísérletek leírásánál (a komponensvizsgálatot kivéve) mi is ebben a formában adtuk meg az általunk alkalmazott koncentrációkat. Vizsgálatainkban az alkalmazott koncentrációk 0,009 és 6,5 mg a.e./l közé esnek, melyeket egyrészt ökotoxikológiai felmérések (Edwards et al. 1980; Thompson et al. 2004; Battaglin et al. 2005), másrészt korábbi kísérletek alapján választottuk ki (Relyea és Jones 2009; Jones et al. 2011; Relyea 2012).

3.3. Az állatok begyűjtése és tartása

A kísérletekhez használt egyedeket peteként gyűjtöttük be, összesen négy tóból (a pontos gyűjtési helyeket lásd a kísérletek leírásánál). Minden esetben frissen lerakott petecsomókból, illetve zsinórokból gyűjtöttünk, amiket a Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézetének (MTA ATK NÖVI) Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk (47° 32' 52" É, 18° 56' 07" K). A petéket laboratóriumban, családonként külön keltettük 20 °C-on, 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. Az erdei békákat 10 literes dobozokban neveltük, melyekben 3 liter, a barna varangyokat pedig 3 literes dobozokban, melyekben 1 liter mesterséges lágy víz (*reconstituted soft water*; RSW; APHA 1985) volt. Két nappal azután, hogy az ebihalak elérték a szabadon úszó állapotot (Gosner (1960) szerinti 25-ös fejlettségi állapot, lásd Függelék 11.1. ábra), véletlenszerűen kiválasztottunk a kísérletekhez szükséges számú, egészségesnek tűnő ebihalat és megkezdtuk a vizsgálatokat.

A ragadozókezelésekhez használt sebes acsa lárvákat és felnőtt hím pettyes gőtéket akvarista hálóval, illetve műanyag tölcsercsapdával gyűjtöttük be, és szintén az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk. A kísérletek kezdetéig a ragadozókat laboratóriumban tartottuk, a szitakötőlárvákat egyesével, 300 ml-es poharakban, melyekben 200 ml RSW és kapaszkodóul egy hurkapálca volt, a gőtéket pedig négyesével, 5 literes dobozokban tartottuk, melyek 1,5 liter RSW-t tartalmaztak. A ragadozókat a vizsgálatok kezdete előtt vörös szúnyoglárvával (*Chironomus* sp.) *ad libitum* etettük kétnaponta. Azért ezeket a fajokat választottuk, mert tipikus ragadozói az általunk használt kétéltűlárváknak, és

vizsgálataink eredményei szerint nem érzékenyek az általunk használt glifozátalapú szerre (Ujszegi et al. 2015, 2016; lásd 4.2. alfejezet), így feltételezhettük, hogy a ragadozó × GC kezeléseknél a GC magára a ragadozóra nem, vagy csak kevésbé fog hatni.

A ragadozók érzékenységének vizsgálatához a szitakötőlárvákat a kísérlet kezdetéig egyesével, műanyag poharakban, 300 ml RSW-ben, a gőtéket négyes, vagy ötös csoportokban, műanyag dobozokban (23 cm × 19 cm × 12 cm), 1,5 liternyi RSW-ben tartottuk 19 °C-on, és 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. Az állatokat csövájó férgekkel (*Tubifex tubifex*) *ad libitum* etettük. A ragadozók kísérlet alatti etetéséhez és a predációs aktivitás teszteléséhez frissen lerakott erdei béka petecsomókat is gyűjtöttünk két tóból. A petecsomókat elkülönítve neveltük 10 literes dobozokban, melyekben 5 liter RSW volt, 19 °C és 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. Kelés után az ebihalakat áthelyeztük nagy műanyag dobozokba (37 cm × 27 cm × 15,5 cm), 10 liter RSW-be, és a kísérletek végéig 15 °C-on és 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett neveltük őket tovább. Ezeket az állatokat azért tartottuk hűvösben és nagy denzitáson, hogy lassítsuk a növekedésüket, így megfelelő méretűek maradjanak a predációs tesztig. Az ebihalakat előfőzött, aprított spenóttal etettük és kétszer egy héten vizet cseréltünk rajtuk. Az így nevelt ebihalak nem voltak kitéve sem ragadozóknak, sem a GC-nek mielőtt a kísérletben felhasználtuk volna őket.

3.4. Kísérleti elrendezések

3.4.1. Laboratórium

A laboratóriumban az erdei béka ebihalakat egy, a barna varangy ebihalakat pedig két kísérlet kivételével (lásd 3.4.1. táblázat) egyesével neveltük, 2, illetve 1,2 literes műanyag dobozokban, randomizált blokk elrendezésben (3.4.1. kép). Az állatokon egy kísérlet kivételével háromnaponta, vagy heti három alkalommal vizet cseréltünk, mindig visszaállítva az eredeti GC-koncentrációkat. A vízcserék során külön-külön hálókat használtunk a különböző GC-koncentrációkhoz és a ragadozókezelésekhez, hogy megakadályozzuk a kezelések közötti átszennyeződést. Az ebihalakat a vízcserék után előfőzött, aprított spenóttal etettük. A ragadozókezelésekhez a sebes aca lárvaít használtunk, melyeket egyesével tartottunk és kétnaponta 2-2 naiv, a vizsgálatban használtakkal azonos fajú ebihallal etettünk. Kezeléskor a ragadozó mellől vett vízből minden szemiokemikáliát kapó kísérleti dobozba meghatározott mennyiséget öntöttünk, míg a kontrollkezelés ugyanannyi RSW-t kapott.



3.4.1. kép. Egy futó kísérlet a laboratóriumban (Fotó: Urszán Tamás).

A ragadozók érzékenységének vizsgálatához az állatokat egyesével, 3 literes, átlátszó műanyag dobozokban (23 cm × 19 cm × 12 cm) neveltük, randomizált blokk elrendezésben. Mindegyik dobozba került egy kis műanyag cserép és egy fapálca, mely búvóhelyet és kapaszkodót biztosított az állatok számára. A kísérlet alatt 12 : 12 órás fény : sötét ciklust alkalmaztunk, az átlagos hőmérséklet 17,6 °C volt (min.: 16,5 °C; max.: 18,6 °C; Onset HOBO automata hőmérséklet-loggerekkel mérve). A tartódobozokat a kísérlet kezdetén kezeléstől függően 2 liter GC-t tartalmazó RSW-vel, vagy 2 liter tiszta RSW-vel töltöttük fel. Heti két alkalommal cseréltünk vizet, megtartva az eredeti GC-koncentrációt. Vízcserékor a két ragadozófajhoz és a GC kezelésekhöz külön-külön hálókat használtunk, hogy megakadályozzuk a kontrollcsoport beszennyeződését és a ragadozók kémiai anyagainak keveredését. A ragadozókat kétnaponta etettük két naiv erdei béka ebihallal (összesen 230 mg) és 150 mg csővájó féreggel.

3.4.1. táblázat. A disszertációban szereplő laboratóriumi vizsgálatok kísérleti elrendezése. A sorszámok a kísérleteket részletező alfejezeteket jelöli.

Kísérlet	Faj	Ebihal / doboz	Vízmenyiség (l)	Vízcseré	Hőmérséklet	Fény : sötét ciklus
4.1. Korfüggés	Barna varangy	1 db / 1,2 liter	0,7	3 naponta	18 °C	12 : 12 óra
4.2. Ragadozóérzékenység	Pettyes göte	1 db / 3 liter	2	Heti 2×	17,6 °C	12 : 12 óra
	Sebes acsa	1 db / 3 liter	2	Heti 2×	17,6 °C	12 : 12 óra
4.4. Komponens	Erdei béka	10 db / 5 liter	4	Soha	19 °C	13,5 : 10,5 óra
	Barna varangy	10 db / 5 liter	4	Soha	19 °C	14 : 10 óra
4.5. Ismételtetés	Erdei béka	1 db / 2 liter	1,4	3 naponta	16 °C	12 : 12 óra
	Erdei béka	1 db / 2 liter	1,4	3 naponta	16 °C	12 : 12 óra
	Barna varangy	1 db / 1,2 liter	0,7	3 naponta	18 °C	12 : 12 óra
	Barna varangy	14 db / 11 liter	10	Soha	18 °C	12 : 12 óra
4.6. Kísérleti környezet	Erdei béka	1 db / 2 liter	1,4	Heti 3×	16 °C	12 : 12 óra

3.4.2. Mezokozmosz

Az ebihalakon végzett szabadföldi mezokozmosz kísérletekhez 90 literes ládákat használtunk (42 cm × 72 cm × 30 cm), melyekre szúnyoghálóval lefedett túlfolyót fűrtünk, hogy nagy esők alkalmával a többletvíz nehogya kimossa az állatokat. A ládákat két héttel a vizsgálatok kezdete előtt töltöttük fel 65 liter csapvízzel, és szúnyoghálóval fedtük le, hogy megakadályozzuk a makrogerinctelenek általi kolonizációt (3.4.2. kép). Két nappal később, amikor a klór már távozott a vízből, mindegyikhez 40 g szárított bükklevelet (*Fagus sylvatica*) és 1-1 liter tóvizet (Békás-tó; 47° 34' 35" É, 18° 52' 06" K) adtunk, hogy elősegítsük a baktériumok, a fito- és zooplankton növekedését, létrehozva ezzel egy önfenntartó ökoszisztémát, ami búvóhelyet, táplálékot és természetközeli körülményeket biztosít az ebihalak számára. Három véletlenszerűen kiválasztott mezokozmoszba automata hőmérséklet-loggereket (HOBO) helyeztünk, melyek a kísérlet alatt rögzítették a vízhőmérsékleti adatokat. Ha a kísérletben ragadozókezelés is szerepelt, akkor minden ládába egy-egy ragadozóketrecet is elhelyeztünk, ami egy két végén szúnyoghálóval lezárt, átlátszatlan műanyag henger (átmérő: 11 cm; hosszúság: 21,5 cm) volt. Ez lehetővé tette az ebihalak számára, hogy érzékeljék a ragadozók jelenlétét, viszont a predátorok nem férhettek hozzá a kísérleti állatokhoz. A ragadozókat egy nappal a kísérlet kezdete előtt helyeztük a ketrecekbe, a kontrollcsoporthoz tartozó ládák ketrecei üresen maradtak. A ragadozókat heti három alkalommal etettük két-két naiv ebihallal. Hogy megakadályozzuk a táplálék ebihalak kísérleti ebihalak mellé való bekerülését, etetéskor a ketreceket kivettük a ládákból. Hogy a zavarás mértéke egyforma legyen az összes lánál, etetéskor az üres ketreceket is kiemeltük a vízből.



3.4.2. kép. Szabadföldi mezokozmosz kísérlet az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepén (Fotó: Gál Zoltán).

A ragadozók érzékenységét vizsgáló kísérlethez ugyanolyan műanyag ládákat használtunk, mint az ebihalas kísérletekben. Ezeket három héttel a vizsgálat kezdete előtt töltöttük fel, szintén 65 liter csapvízzel és feltöltés után azonnal lefedtük őket szúnyoghálóval. Egy nappal később minden ládához hozzáadtunk 1 liter tóvizet és 40 g szárított bükk levelet. Három véletlenszerűen kiválasztott mezokozmoszba automata hőmérséklet-loggereket helyeztünk. Hogy kiülőhelyet biztosítsunk az állatok számára, egy-egy kis műanyag létrát helyeztünk a ládába, úgy, hogy a tetejük pont elérje a vízfelszínt. A ragadozókat kétnaponta etettük két kisméretű erdei béka ebihallal (~ 150 mg) és körülbelül 200 mg csővájó féreggel. Mivel ebben a kísérletben az ebihalak csak rövid ideig voltak a ládában, minden ládába három nagy mocsárcsigát (*Lymnaea stagnalis*) is helyeztünk, hogy meggátoljuk a perifiton túlzott növekedését. A kísérlethez használt csigákat egy mesterséges csatornából gyűjtöttük Bugyi közelében (47° 12' 46" É, 19° 08' 56" K). Hasonló mezokozmoszokat korábban már sikerrel alkalmaztak kétélűtüeket és gerinctelen ragadozókat vizsgáló kísérletekben (Hettyey et al. 2011; Van Buskirk 2012).

Az egyes kísérletekben alkalmazott módszerek további részleteit, a gyűjtések pontos helyét, az egyedszámokat, a használt koncentrációkat, és a mért változókat a következő, vizsgálatokat részletesen ismertető fejezet tartalmazza.

4. A vizsgálatok részletes bemutatása

4.1. *Barna varangy ebihalak glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenységének korfüggése*

Az élőlények bizonyos mértékben képesek inaktiválni, vagy lebontani a xenobiotikumokat, azonban ebben is megfigyelhetők egyedek közötti eltérések. Ezeket általában a detoxifikáló enzimek aktivitás-, vagy expresszióbeli különbségei okozzák (Van Straalen 1993). A citokróm P450 és a glutation-S-transzferázok fontos detoxifikáló enzimek, melyek számos élőlényben megtalálhatóak, és sok káros szubsztrát metabolizálására képesek (Nelson 1998; Pearson 2005). Viszont ezen enzimek kifejeződése az egyedfejlődés során változik, ami megváltozott peszticid-érzékenységhöz vezethet a kor előrehaladtával. Ezt patkányoknál sikerült igazolni (Sheets 2000; Anand et al. 2006; Timchalk et al. 2006), ellenben az érzékenységbeli mintázat változásai más gerinces csoportoknál, így a kétélűeknél is, sokkal kevésbé ismertek. Ez azért meglepő, mert ha ez a jelenség széles körben elterjedt az állatvilágban, akkor a csupán egyetlen életkorban mért érzékenység nem általánosítható a teljes élethosszra. Emiatt alapvető fontosságú lenne számításba venni az érzékenység korfüggését a kétélűeken végzett ökotoxikológiai vizsgálatokban.

Az általános nézet szerint az élőlények fiatalon a legérzékenyebbek a peszticidekre, ez az egyik oka annak, hogy legtöbbször embriókat és lárvákat használnak az ökotoxikológiai vizsgálatokban (Linder et al. 2010). Valóban, számos vizsgálat kimutatta, hogy az ebihalak érzékenyebbek, mint a peték, vagy a felnőtt egyedek (Harris et al. 2000; Greulich és Pflugmacher 2003). Azonban kétélűeknél az érzékenység változásának finomabb időskálán mutatott mintázatáról, valamint a különböző hosszúságú peszticid-kitettség hatásairól igen keveset tudunk (Harris et al. 2000; Jones et al. 2010). A vizsgálatok alacsony száma miatt, és mert ezek ellentmondásos eredményeket hoztak (Howe et al. 1998; Fort et al. 2004), nem lehet általános következtetéseket levonni erről a fontos jelenségről.

Hogy megvizsgáljuk, hogyan változik a barna varangy ebihalak glifozátalapú gyomirtóval szembeni érzékenysége a fejlődés során, kísérletünkben háromféle GC-koncentrációval kezeltük az állatokat lárvális fejlődésük öt különböző szakaszában. Továbbá, arra is kíváncsiak voltunk, hogy a feltételezett érzékeny periódusnál hosszabb ideig tartó GC-kitettség jobban károsítja-e az állatokat, ezért a vizsgált egyedek egy csoportja az egész kísérlet alatt kapott GC kezelést.

4.1.1. Módszerek

A kísérlethez 70-70 petét gyűjtöttünk 12 frissen lerakott barna varangy petezsinórból a Békástóból (47° 34' 35" É, 18° 52' 06" K). A vizsgálat kezdete előtt az állatokat a 3.3. alfejezetben leírtak szerint tartottuk. A kísérlet kezdetén véletlenszerűen kiválasztottunk 52 egészségesnek látszó ebihalat minden családból, és egyesével 1,2 literes dobozokba helyeztük őket, melyekben 0,7 liter RSW volt. Az ebihalakat 18 °C-on és 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett neveltük. Az állatokon minden harmadik nap vizet cseréltünk, visszaállítva a kiindulási koncentrációkat. A kísérlet kezdetén, és később minden vízcseré alkalmával 0; 1,11 vagy 2,22 ml GC-t adtunk 200 liter RSW-hez, hogy a dobozokban elérjük a kívánt 0, 2 és 4 mg a.e./l glifozátkoncentrációkat, és ezzel a vízzel cseréltünk vizet. Az általunk használt koncentrációk megfeleltethetőek a tiszta, és a szennyezett élőhelyeken előforduló vegyszerkoncentrációknak (Edwards et al. 1980; Thompson et al. 2004; Battaglin et al. 2005; Relyea és Jones 2009; Jones et al. 2011; Relyea 2012). Az ebihalakat minden vízcseré után *ad libitum* etettük előfőzött, aprított spenóttal. A vizsgálat során a kezelt ebihalak vagy az egész kísérlet alatt ki voltak téve a GC-nek, vagy pedig csak a fejlődésük 1., 2., 3., 4., vagy 5. szakaszában. A kezelési időszak 9 napig tartott, ez előtt és után az ebihalakat tiszta RSW-ben neveltük. Egy további kezelésben az ebihalakat végig tiszta RSW-ben neveltük (kontrollcsoport). Minden kezelés × család kombinációt négy alkalommal ismételtünk, ami összesen 624 kísérleti egységet eredményezett.

Az átalakuláshoz közeledve minden nevelési dobozt naponta kétszer ellenőriztünk. Mikor egy ebihal elérte a 42-es fejlődési állapotot (mellső lábak előbújása), feljegyeztük az addig eltelt napok számát, megmértük az egyed tömegét és vagy szabadon engedték a befogás helyén, vagy, 65 állat esetében, metanolban konzerváltuk őket későbbi mérlegmennyiség és mérgezősszététel meghatározás céljából (ennek eredményeit lásd Bókony et al. 2017). Azért az átalakulásig eltelt időt és a testtömeget mértük az egyedeken, mert e két életmenet-változó fontos rátermettség-jelző bélyeg kétélűeknél (Smith 1987; Semlitsch et al. 1988; Altwegg és Reyer 2003). A nagyobb átalakuláskori testtömeg például a jobb ugrási- és állóképesség révén növelheti a rátermettséget (John-Adler és Morin 1990), továbbá csökkentheti az éhhalál és a kiszáradás kockázatát (Wells 2007).

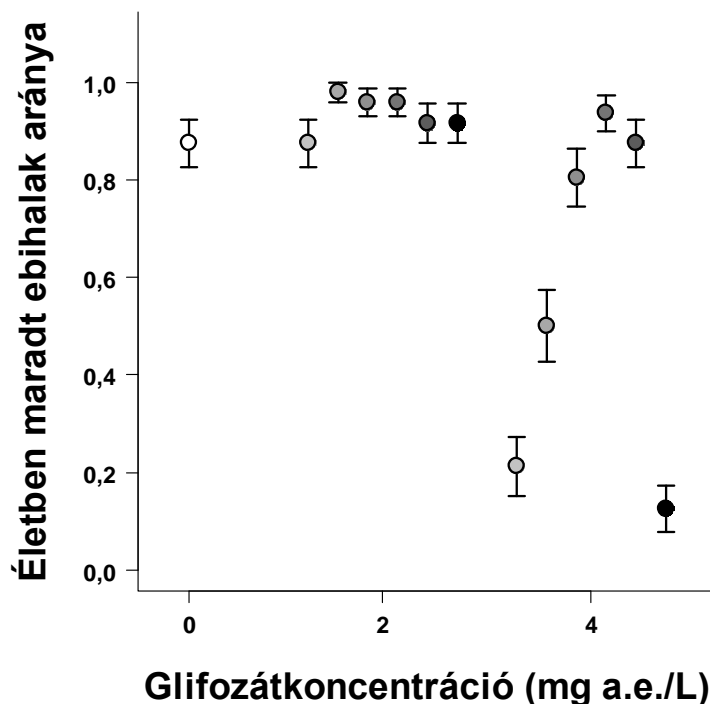
4.1.2. Statisztikai elemzés

A túlélés elemzéséhez általánosított lineáris kevert modellt (*generalized linear mixed-effect model*; GZLMM) használtunk binomiális eloszlással és logit link függvényvel. A számítási problémák kiküszöbölése érdekében a 'bobyqa' optimalizációs funkciót alkalmaztuk. A

modellben az átalakuláskori túlélést függő változóként, a GC-koncentrációt és a kezelési időtartamot független változóként vittük be a modellbe. A random faktor a blokkba ágyazott család volt (Zuur et al. 2009). A kezelések hatásainak becslése *likelihood ratio* teszteken alapult. Az átalakuláskori testtömeg és az átalakulásig eltelt idő vizsgálatához lineáris kevert modellt (*linear mixed-effect model*; LMM) használtunk. A 42-es fejlődési állapotban mért testtömeg, illetve a 42-es fejlődési állapot eléréséig eltelt napok száma volt a függő változó, a GC-koncentráció és a kezelési időtartam a független változó, és a blokkba ágyazott család a random faktor. Mivel a kísérleti elrendezésben nem volt meg minden kezeléskombináció (a kontrollcsoportnál, ami a 0 mg a.e./l-nek kitett csoport, nincs értelme kezelési időtartamról beszélni, ezért csak egyetlen ilyen csoportunk volt), ezért az adatokat nem tudtuk egyetlen elemzésben elemezni. Ehelyett tervezett összehasonlításokat végeztünk lineáris kontrasztok segítségével. Az ismételt tesztelésből adódóan megnövekedett valószínűségű elsőfajú hiba elkerülése érdekében *false discovery rate* (FDR) módszerrel korrigált *P* értékeket számítottunk. Az analízisekhez az R programcsomag (verzió: 3.0.2) ‘lme4’ és ‘nlme’ csomagjainak ‘glmer’ és ‘lme’ funkcióit, a *post hoc* tesztekhez pedig a ‘multcomp’ csomag ‘glht’ funkcióját használtuk (R Core Team 2016).

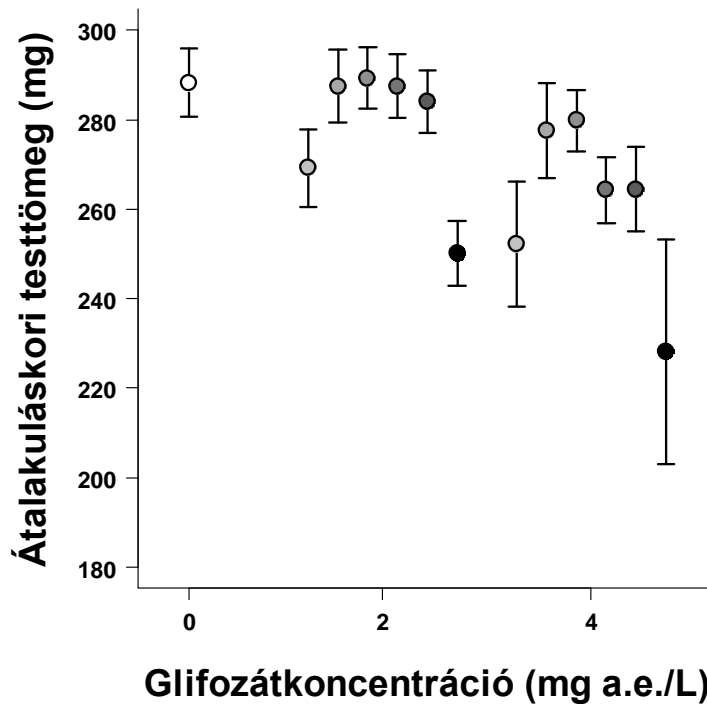
4.1.3. Eredmények

Az alacsonyabb koncentráció nem befolyásolta az ebihalak túlélését, magasabb koncentráción viszont az első és második periódusban kezelt ebihalak túlélése alacsonyabb volt a kontrolléhoz képest (kontroll: 87,5% túlélő; magas konc. az első periódus alatt: 22,9% túlélő; magas konc. a második periódus alatt: 50% túlélő; magas konc. az egész kísérlet alatt: 12,5% túlélő; 4.1.1. táblázat, 4.1.1. ábra). Továbbá, a magasabb koncentrációnak végig kitett állatok túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az időszakosan kezelt csoportoké, kivéve az első kilenc napban kezeltet, akiknek hasonlóan alacsony volt a túlélésük (4.1.3. táblázat, 4.1.1. ábra).



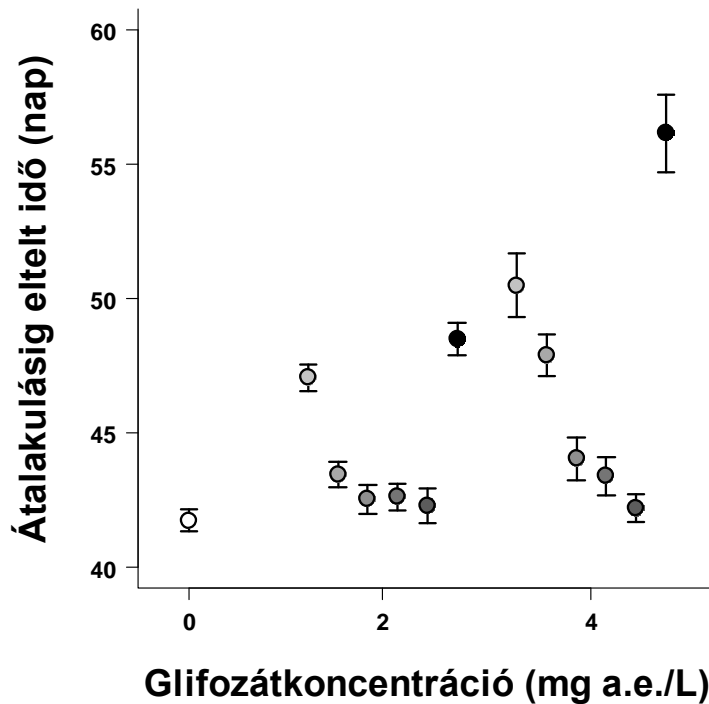
4.1.1. ábra. A különböző GC kezelések és azok időzítésének hatása az ebihalak túlélésére (○: nem kezelt, ●: a lárvális fejlődés 1., 2., 3., 4., vagy 5. szakaszában kezelt, ●: az egész kísérlet alatt kezelt). Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

Az átalakuláskori testtömeg alacsonyabb volt a végig kezelt csoportoknál, mint a kontrollcsoportnál, mindkét koncentráció esetében (kontroll: 288,29 mg; alacsony konc. az egész kísérlet alatt: 250,14 mg; magas konc. az egész kísérlet alatt: 228,17 mg; 4.1.1. táblázat, 4.1.2. ábra). A kontrollhoz képest szintén kisebb volt a testtömeg az első, negyedik és ötödik periódusban magasabb koncentrációnak kitett ebihalaknál (magas konc. az első periódus alatt: 252,2 mg; magas konc. a negyedik periódus alatt: 264,25 mg; magas konc. az ötödik periódus alatt: 264,45 mg; 4.1.2. táblázat, 4.1.2. ábra). Az egész kísérlet alatt GC-nek kitett ebihalak testtömege nem különbözött az első periódusban kezeltékétől, de szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a későbbi periódusokban kezelt ebihalaké (4.1.3. táblázat, 4.1.2. ábra).



4.1.2. ábra. A különböző GC kezelések és azok időzítésének hatása az ebihalak testtömegére (○: nem kezelt, ●: a lárvális fejlődés 1., 2., 3., 4., vagy 5. szakaszában kezelt, ●: az egész kísérlet alatt kezelt). Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

Az átalakulásig eltelt idő a végig GC-vel kezelt csoportoknál hosszabb volt a kontrollcsoportéhoz képest: az alacsonyabb koncentrációnál kb. 6 nappal (14%), a magasabb koncentráción kb. 14 nappal (33%; 4.1.1. táblázat, 4.1.3. ábra). Az alacsonyabb koncentráción csak időlegesen kezelt csoportoknál csak az első periódusban GC-nek kitett egyedek fejlődtek lassabban, mint a kontroll, míg magasabb koncentrációnál csak az utolsó periódusban kezelték nem különböztek a nem kezelt csoporttól (4.1.2. táblázat, 4.1.3. ábra). A végig kezelt ebihalak mindkét koncentráción lassabban fejlődtek, mint a csak időlegesen kitett csoportok (4.1.3. táblázat, 4.1.3. ábra).



4.1.3. ábra. A különböző GC kezelések és azok időzítésének hatása az ebihalak fejlődésére (○: nem kezelt, ●: a lárvális fejlődés 1., 2., 3., 4., vagy 5. szakaszában kezelt, ●: az egész kísérlet alatt kezelt). Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

4.1.1. táblázat. Az ebihalak vizsgált életmenet-változóin végzett, a kontrollcsoport (GC-vel nem kezelt) és a GC-vel az egész kísérlet alatt kezelt csoportok közti tervezett összehasonlítások eredményei. A feltüntetett *P*-értékek FDR-korrigáltak.

	Túlélés				Átalakuláskori testtömeg				Átalakulásig eltelt idő			
	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>
Kontroll vs.:												
Végig GC-vel kezelt:												
Alacsony koncentráció	0,48	0,69	0,69	0,49	-37,26	10,27	-3,63	< 0,001	6,75	0,71	9,57	< 0,001
Magas koncentráció	-4,37	0,67	-6,57	< 0,001	-68,62	21,03	-3,26	0,002	14,68	1,45	10,14	< 0,001
Végig GC-vel kezelt, alacsony koncentráció vs.:												
Magas koncentráció:	-4,85	0,73	-6,69	< 0,001	-31,36	20,93	-1,49	0,13	7,95	1,44	5,50	< 0,001

4.1.2. táblázat. Az ebihalak vizsgált életmenet-változóián végzett, a kontrollcsoport (GC-vel nem kezelt) és a GC-vel az egyedfejlődés során rövid ideig kezelt csoportok közti tervezett összehasonlítások eredményei. A feltüntetett *P*-értékek FDR-korrigáltak.

	Túlélés				Átalakuláskori testtömeg				Átalakulásig eltelt idő			
	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>
Kontroll vs.:												
A fejlődés 1. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	-2,76*10 ⁻⁷	0,63	< -0,001	> 0,99	-18,09	10,38	-1,74	0,41	5,03	0,71	7,06	< 0,001
Magas koncentráció	-3,67	0,61	-6,04	< 0,001	-37,72	16,86	-2,24	0,04	9,29	1,16	8,02	< 0,001
A fejlődés 2. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	1,97	1,1	1,78	0,24	-0,75	10,09	-0,07	0,94	1,57	0,69	2,26	0,06
Magas koncentráció	-2,18	0,55	-3,95	< 0,001	-15,8	12,25	-1,29	0,25	6,66	0,84	7,92	< 0,001
A fejlődés 3. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	1,29	0,85	1,51	0,24	1,22	10,16	0,12	0,94	0,58	0,69	0,83	0,41
Magas koncentráció	-0,59	0,59	-0,99	0,40	-10,11	10,71	-0,94	0,35	2,73	0,73	3,71	< 0,001
A fejlődés 4. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	1,24	0,85	1,46	0,24	-1,58	10,16	-0,16	0,94	0,99	0,69	1,43	0,26
Magas koncentráció	0,77	0,75	1,03	0,40	-24,84	10,25	-2,42	0,04	1,54	0,7	2,19	0,04
A fejlődés 5. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	0,43	0,69	0,62	0,67	-4,05	10,27	-0,39	0,94	0,66	0,71	0,94	0,41
Magas koncentráció	-2,97*10 ⁻⁷	0,63	< -0,001	> 0,99	-24,56	10,38	-2,37	0,04	0,28	0,71	0,39	0,69

4.1.3. táblázat. Az ebihalak vizsgált életmenet-változóián végzett, a GC-vel az egész kísérlet alatt és az egyedfejlődés során rövid ideig kezelt csoportok közti tervezett összehasonlítások eredményei. A feltüntetett *P*-értékek FDR-korrigáltak.

	Túlélés				Átalakuláskori testtömeg				Átalakulásig eltelt idő			
	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>	β	SE	z-érték	<i>P</i>
Végig GC-vel kezelt vs.:												
A fejlődés 1. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	0,47	0,69	0,69	0,62	-19,17	10,26	-1,87	0,06	1,72	0,70	2,45	0,01
Magas koncentráció	-0,7	0,59	-1,18	0,24	-30,9	24,8	-1,25	0,21	5,39	1,71	3,16	0,002
A fejlődés 2. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	-1,49	1,14	-1,31	0,62	-36,51	9,97	-3,66	< 0,001	5,19	0,68	7,59	< 0,001
Magas koncentráció	-2,19	0,56	-3,91	< 0,001	-52,82	21,91	-2,41	0,04	8,01	1,51	5,32	< 0,001
A fejlődés 3. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	-0,81	0,89	-0,89	0,62	-38,48	10,02	-3,84	< 0,001	6,17	0,69	8,99	< 0,001
Magas koncentráció	-3,79	0,62	-6,09	< 0,001	-58,51	21,22	-2,76	0,03	11,95	1,46	8,18	< 0,001
A fejlődés 4. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	-0,76	0,89	-0,85	0,62	-35,69	10,02	-3,56	< 0,001	5,76	0,69	8,38	< 0,001
Magas koncentráció	-5,15	0,78	-6,59	< 0,001	-43,78	20,89	-2,09	0,04	13,14	1,44	9,15	< 0,001
A fejlődés 5. szakaszában kezelt:												
Alacsony koncentráció	0,05	0,75	0,06	0,95	-33,21	10,12	-3,28	0,001	6,09	0,69	8,77	< 0,001
Magas koncentráció	-4,38	0,67	-6,57	< 0,001	-44,06	20,97	-2,1	0,04	14,39	1,44	9,98	< 0,001

4.1.4. Értékelés

Eredményeink szerint a fiatalabb barna varangy ebihalak érzékenyebbek a glifozátalapú gyomirtóra, mint idősebb társaik, amit jól mutatnak a magasabb GC-koncentrációnál kapott értékek, de ez a különbség részben az alacsonyabb koncentrációnál is kimutatható volt. Továbbá, azok az ebihalak, amik lárvális fejlődésük nagy részében ki voltak téve a GC-nek, lassabban növekedtek, mint azok, akik csak a fejlődés korai szakaszában lettek kezelve, azonban ez a hatás sem a testtömegnél, sem a túlélésnél nem volt megfigyelhető.

Kételtűek esetében kevésbé ismert a peszticidtolerancia változása az ontogenezis során (Harris et al. 2000; Bridges 2000; Boone és Bridges 2003b; Greulich és Pflugmacher 2003; Boone et al. 2013). A glifozátalapú gyomirtókkal kapcsolatban ennél is kevesebbet tudunk, míg az egész lárvális fejlődést lefedő vizsgálatok teljesen hiányoznak. Edginton és munkatársai (2004b) négy kételtűfaj (*Xenopus laevis*, *Anaxyrus americanus*, *Rana clamitans* és *Rana pipiens*) embrióinak és fiatal ebihalainak túlélését vizsgálták egy glifozátalapú gyomirtó (Vision[®]) jelenlétében. Az embriókat teljes fejlődésük alatt, a frissen kikelt ebihalakat (Gosner szerinti 25-ös fejlettségi állapot) pedig 4 napig kezelték a gyomirtóval és megállapították, hogy a fiatal ebihalak érzékenyebbek a szerre, mint az embriók. Howe és munkatársai (2004) az *A. americanus*, a *Rana sylvatica*, a *R. pipiens* és a *R. clamitans* ebihalak érzékenységét vizsgálták egy glifozátalapú gyomirtóval (Roundup Original[®]) szemben két fejlődési állapotban, és magasabb halálozási arányt találtak a fiatal ebihalaknál, mint a frissen kikelteknél. Jones és munkatársai (2010) szintén egy glifozátalapú gyomirtóra (Roundup Original[®] MAX) mutatott érzékenység korfüggését vizsgálták, három lárvális állapotban *R. sylvatica* és *A. americanus* ebihalaknál, ők a fiatalabb ebihalaknál mutattak ki magasabb mortalitást. Végül Hanlon és Parris (2014) *Hyla versicolor* ebihalakat tett ki kétféle peszticidnek három fejlődési állapotban, és alacsonyabb túlélést talált a fiatalon rovarirtóval kezelt ebihalaknál. A glifozátalapú gyomirtó (Roundup PRO[®] Concentrate) esetében viszont nem mutattak ki hasonló hatást, valószínűleg mivel az alkalmazott koncentráció túl alacsony volt (2 mg a.e./l, melyen mi sem mutattunk ki szignifikáns túlélés-csökkenést), de szerepet játszhatott a faj eltérő érzékenysége vagy az eltérő kísérleti környezet is. Kísérletünkben kimutattuk, hogy a korai fejlődési állapotban lévő ebihalak a legérzékenyebbek, és hogy az érzékenység fokozatosan csökken a kor előrehaladtával. Ezért az irodalmi és saját adataink alapján úgy tűnik, hogy a glifozátalapú gyomirtókra mutatott érzékenység alacsony az embrionális fejlődés alatt, valószínűleg a peteburkok által nyújtott védelem miatt, kikelés után növekszik, a fiatal ebihalaknál tetőzik, majd ahogy az állat idősebb lesz, újra lecsökken.

A túlélésnél megfigyelt korfüggés mellett alacsonyabb átalakuláskori testtömeget találtunk a végig kezelt csoportoknál mindkét koncentráció esetében, a magasabb koncentrációnak kitett ebihalaknál pedig az első, negyedik és ötödik periódusban is. A GC szintén negatívan hatott a fejlődési sebességre: azok az ebihalak, amik fejlődésük korai szakaszában voltak kitéve a GC-nek, lassabban fejlődtek, mint azok az egyedek, amik egy későbbi periódusban lettek kezelve. Ráadásul a végig kezelt csoportokban volt a legkisebb a tömeg és tartott legtovább a fejlődés. A glifozátalapú gyomirtók testtömegre kifejtett negatív hatását korábbi vizsgálatokban is megfigyelték (Relyea 2004a; Cauble és Wagner 2005; Mikó et al. 2015) és Jones és munkatársai (2010) csökkenő erősségű hatást mutattak ki későbbi kitétség esetén. Azonban, ez az első vizsgálat, ahol sikerült bizonyítani a gyomirtó fejlődésre gyakorolt, életkortól függő negatív hatását. Eredményeink összhangban vannak a korábbi vizsgálatokkal, ahol megfigyelték, hogy a glifozátalapú szerek megnövelik az átalakulásig eltelt időt, ha az ebihalak fejlődésük korai szakaszában lettek kezelve (Howe et al. 2004; Williams és Semlitsch 2010; Jayawardena et al. 2011; Navarro-Martín et al. 2014), viszont egy másik vizsgálatban, mikor az állatok későn találtak a szerrel, nem sikerült hatást kimutatni (Gahl et al. 2011). Azoknál az ebihalaknál, amik időszakos víztestben nevelkednek, a meghosszabbodott fejlődési idő végzetes lehet, főleg a szárazabb években. Továbbá, a kisebb átalakuláskori testtömeg megnövelheti a predációs kockázatot, csökkentheti a hosszú távú túlélési esélyt és csökkent szaporodási sikerhez is vezethet (Smith 1987; Semlitsch et al. 1988; Altwegg és Reyer 2003; Vonesh 2005). Következésképp, súlyos hatásai lehetnek a kétéltűekre a korai fejlődési állapotban bekövetkező gyomirtókitétségnek még akkor is, ha az egyedek többsége túléli az akut fázist és sikeresen átalakul.

A mérgező anyagokra mutatott érzékenység korfüggésének egyik oka lehet a detoxifikációban részt vevő szervek (bőr, kopolyú, máj, kiválasztó rendszer) és az immunrendszer fejlődése. Például, néhány vizsgálat szerint kétéltűeknél a glutation-S-transzferáz enzim aktivitása nő a lárvális fejlődés előrehaladtával, ami arra utal, hogy a későbbi fejlődési állapotban lévő állatok hatékonyabban képesek semlegesíteni a xenobiotikumok reaktív metabolitjainak mérgező hatásait (Aceto et al. 1993; Bucciarelli et al. 1999). A kétéltűek immunrendszerének fejlődését *X. laevis* ebihalaknál vizsgálták, ahol a csecsemőmirigy és a lép nagyjából a hátsó lábak kialakulásának kezdetével egy időben válnak limfoiddá (Rollins-Smith 1998; Robert és Ohta 2009). Ebből következően a fiatal ebihalak immunrendszere kevésbé ellenálló a fejlettebb állatokéhoz képest. Ez feltehetőleg nagyobb betegségek iránti fogékonysághoz is vezet (Hsu és Du Pasquier 1984; Langhammer et al. 2014), valamint kevésbé hatékony detoxifikációt tesz lehetővé a fiatal ebihalaknál. Mindezek

mellett a peszticidek negatívan befolyásolhatják a detoxifikáló enzimek hatékonyságát és károsíthatják az immunrendszert is (Christin et al. 2004; Lajmanovich et al. 2011). Emiatt további vizsgálatok szükségesek, hogy feltárjuk az ebihalak életkorfüggő érzékenységváltozásának hátterében álló okokat.

Az általunk kimutatott érzékenységbeli változás azért is jelentős, mivel a hatósági szabályozás szempontjából fontos engedélyeztetési szabványokban idősebb ebihalakon végzett vizsgálatokat írnak elő. A Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) protokollja (OECD 2009) szerint a *X. laevis* ebihalakat az 51. fejlődési állapottól, az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) szabványában (USEPA 1996) pedig a *Rana catesbeiana* ebihalakat a VI. fejlődési állapottól kell a vegyszerekkel kezelni. Az előbbi nagyjából a Gosner szerinti 29-30-as, utóbbi pedig a 31-es fejlettségi állapotnak feleltethető meg, vagyis ezek a tesztek eredményeink alapján alulbecsülhetik a peszticidek ökotoxikológiai hatásait.

Összességében megállapítható, hogy eredményeink fontosak a korábbi kételtűeken végzett ökotoxikológiai vizsgálatok értelmezésének, a jövőbeli toxicitás tesztek tervezésének és a peszticidek mezőgazdasági alkalmazásának szempontjából egyaránt. A korábbi vizsgálatokban megjelenő ellentmondásos eredményekre részben magyarázatot adhat az érzékenységben megjelenő korfüggés. Továbbá, mikor toxikológiai vizsgálatokat tervezünk és végzünk kételtűeken, a tesztállatok korát körültekintően kell megválasztani, mivel előfordulhat, hogy a kísérletben használt peszticidnek az általunk választott korban nincs kimutatható hatása, míg nagyon hasonló koncentrációban nagymértékben befolyásolhatja az egyedeket, ha azok csupán néhány nappal idősebbek, vagy fiatalabbak. Egy további következtetés, ami levonható ebből a vizsgálatból az az, hogy a peszticidek kijuttatásának ideje kritikus lehet a kételtűek fennmaradása szempontjából az intenzíven művelt mezőgazdasági területek és kertészetek közelében. Mivel a fiatal ebihalak különösen érzékenyek a szennyezésekre, szemben a későbbi állapotokkal, ezért ha ezt figyelembe véve a szaporodó helyeken el lehetne kerülni a fiatal állatok találkozását a szerrel, az nagy jelentőségű lenne a kételtűvédelem szempontjából. Például, ha a peszticidhasználat előtt a szert alkalmazók röviden ellenőriznék az alkalmazási terület közelében lévő víztesteket és azok környékét (különösen a védett területek környékén), és ha a peték nagy része kikelés előtt áll, vagy sok a fiatal ebihal, későbbre tolnák a gyomirtó kijuttatását, az nem jelentene jelentős plusz terhet a gazdáknak, viszont nagyban segítené a peszticidek káros hatásainak minimalizálását.

4.2. Glifozátalapú gyomirtó hatása hazai kisvizek két gyakori ragadozófajára

Az időszakos kisvizek helyi biodiverzitási forró pontokként (*hotspot*) szolgálhatnak, melyek sok veszélyeztetett vagy ritka fajnak adnak otthont (Williams et al. 2004; Scheffer et al. 2006). Ezek az efemer vízi élőhelyek általában kicsik és sekélyek, gyakran közvetlenül a művelt területek mellett találhatóak, így a glifozátkoncentráció itt magasabb lehet, mint a szélesebb pufferzónával rendelkező nagy víztestekben (Mann és Bidwell 1999; Battaglin et al. 2009; Relyea 2012; Wagner et al. 2013). Mivel a halak gyakran hiányoznak ezekből a vizekből, a csúcsragadozók leggyakrabban az ízeltlábúak (különösen szitakötők, poloskák, pókok és bogarak) és a farkos kétéltűek (gőték és szalamandrák) közül kerülnek ki. Ezek a generalista ragadozók prédafajok széles skáláját fogyasztják, a zooplanktontól a kétéltűlárvákig (Relyea 2005a; Relyea et al. 2005; Johnson et al. 2013), jelentősen hozzájárulva az ökológiai egyensúly fenntartásához ezekben a közösségekben (Terborgh et al. 2001; Schmitz et al. 2004; Relyea 2005a). Képesek meggátolni a prédafaj túlszaporodását, így gátolva a túltelepülést (Terborgh et al. 2001), és elősegíthetik egymással versengő fajok koegzisztenciáját is (Courchamp et al. 1999). Fontos szerepük ellenére azonban ökotoxikológiai vizsgálatok ritkán foglalkoznak ezekkel a ragadozókkal, a szitakötők érzékenységét általában rovarirtókkal, ritkábban nehézfémekkel szemben vizsgálják (Rohr és Crumrine 2005; Tollett et al. 2009; Relyea és Edwards 2010), míg a felnőtt farkos kétéltűekkel kapcsolatosan csupán egy ökotoxikológiai témájú vizsgálatot ismerünk (Wagner et al. 2013). Ezért kísérletünkben a GC hatásait vizsgáltuk időszakos kisvizek két jellegzetes csúcsragadozófajára, a sebes acsa lárvájára, és a pettyes götte kifejlett egyedeire laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban. A GC ragadozókra kifejtett esetleges hatásait a túlélés, testtömeg, viselkedés és a predációs aktivitás mérésén keresztül becsültük.

4.2.1. Módszerek

A mezokozmosz kísérlethez 36 sebes acsa lárvát gyűjtöttünk (lárvaállapot F-1 és F-2; lásd Függelék 11.1. kép) egy Bajnához közeli kis tóból (47° 38' 41" É, 18° 36' 41" K) és 36 felnőtt hím pettyes gőtét három populációból (6 egyed: 47° 44' 20" É, 19° 00' 42" K; 8 egyed: 47° 44' 21" É, 19° 00' 42" K; 22 egyed: 47° 38' 40" É, 18° 46' 31" K). A befogott állatokat az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk. A kísérlet kezdetéig a ragadozókat a 3.3. alfejezetben leírt módon tartottuk. A ragadozók kísérlet alatti etetéséhez és a predációs aktivitás teszteléséhez 10 frissen lerakott erdei béka petecsomót is gyűjtöttünk egy

Visegrádi hegységben elhelyezkedő tóból (47° 44' 21" É, 19° 00' 42" K), melyeket a 3.3. alfejezetben leírtak szerint keltettünk és neveltünk.

A vizsgálathoz 72 db mezokozmoszt használtunk, melyeket a 3.4.2. alfejezetben leírtak szerint állítottunk be. Hogy a GC kezelésnél elérjük a kívánt 6,5 mg a.e./l-es kezdeti glifozátkoncentrációt, a vegyszerből 1,174 ml-nyit öntöttünk a gyomirtókezeléshez tartozó ládába. A kontroll mezokozmoszokba ugyanennyi állott csapvizet öntöttünk. A kezeléskombinációkat 18-szor ismételtük. A mezokozmoszok térbeli blokkokban voltak elhelyezve úgy, hogy mindegyik blokkban mindegyik kezelés megtalálható volt, de ezek helyzete a blokkon belül random volt. Két nappal a GC beadása után megmértük a ragadozók tömegét egy analitikai mérleg segítségével, majd randomizált sorrendben behelyeztük őket a mezokozmoszokba. A ragadozókat kétnaponta etettük 2 kisméretű naiv erdei béka ebihallal és körülbelül 200 mg csővájó féreggel.

Tizenhat nappal a kísérlet kezdete után 9:00 és 18:00 között óránként egyszer megfigyeltük a ragadozók viselkedését. Az első megfigyelést fél órával a tetők leszedése után kezdtük el, és a ládák végig fedetlenek voltak a 9 órás megfigyelési periódus alatt. A 30 másodperces megfigyelés alatt három viselkedési változót jegyeztünk fel: láthatóság, aktivitás és függőleges elhelyezkedés. Egy ragadozót akkor tekintettünk láthatónak, ha a fejét nem takarta levél, és akkor aktívnak, ha valamelyik testrésze mozgott. Emellett feljegyeztük, hogy az állat a vízoszlop alsó, felső, vagy középső harmadában tartózkodik-e. Az állatok függőleges elhelyezkedését azért vizsgáltuk, mivel korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a glifozátalapú gyomirtók rétegződhetnek a víztestben a hőrétegződés mentén (Jones et al. 2010, 2011), és kíváncsiak voltunk, hogy ez befolyásolja-e a viselkedést. Ha a ragadozó nem volt látható, inaktívnak és a doboz alján tartózkodónak tekintettük. A viselkedésvizsgálat napján a víz hőmérséklet 18 °C és 22 °C között, a pH pedig 7,2 és 7,3 között volt, amit 10 mezokozmoszban mértünk ki egy Mettler Toledo MX300 X-mate^{Pro} (Mettler Toledo, Magyarország) segítségével.

Tizennyolc nappal a kísérlet kezdete után begyűjtöttük a ragadozókat, lemértük a tömegüket, és GC kezelésenként két csoportra osztottuk őket. Az egyik csoport tiszta vízbe, a másik 6,5 mg a.e./l-es koncentrációjú GC oldatba került át (4.2.1. táblázat) úgy, hogy a csoportok között az egyedek nagyjából azonos tömegűek voltak (Kruskal–Wallis tesztek alapján; sebes acsa: $n = 29$; $\text{Chi}^2 = 2,914$; $\text{df} = 3$; $P = 0,41$; pettyes göte: $n = 27$; $\text{Chi}^2 = 0,464$; $\text{df} = 3$; $P = 0,93$). Az állatok új mezokozmoszokba kerültek, melyeket a fentivel megegyező módon állítottunk be. Egynapos akklimatizáció után minden ragadozó 8 kisméretű erdei béka ebihalat kapott (~80 mg/db). 24 órával később a ragadozót eltávolítottuk a ládából, és

megszámoltuk az életben maradt ebihalakat. A predációs aktivitást azért teszteltük tiszta és GC-s vízben is, mert a szer az ebihalakban is okozhat fenotípusos változásokat (Wojtaszek et al. 2004; Relyea 2012). Ezzel a módszerrel nemcsak a GC ebihalakra gyakorolt hatásait tudtuk kiszűrni, de vizsgálhattuk a ragadozók predációs hatékonyságára kifejtett akut hatásokat is. A kísérlet lezárása után a ragadozókat és a megmaradt ebihalakat a gyűjtési helyeken szabadon engedték.

4.2.1. táblázat. A szabadföldi mezokozmosz kísérlet felépítése a csoportonkénti egyedszámokat is feltüntetve. A predációs tesztben résztvevő állatok száma azért kevesebb, mert néhány sebes acsa lárva elpusztult, néhány pettyes gőte pedig elszökött a kísérlet során.

Nevelési környezet (krónikus kitettség)	Egyedszám	Predációs aktivitás tesztelése (akut kitettség)	Egyedszám
Sebes acsa + tiszta víz	18	tiszta víz	7
	18	GC	7
Sebes acsa + GC	18	tiszta víz	8
	18	GC	7
Pettyes gőte + tiszta víz	18	tiszta víz	7
	18	GC	6
Pettyes gőte + GC	18	tiszta víz	7
	18	GC	7
Időtartam: 17 nap		1 nap	

Egy évvel később, a laboratóriumi kísérlethez 32 sebes acsa lárvét (főleg F-2 lárvaállapot) és 32 felnőtt hím pettyes gőtét gyűjtöttünk négy Visegrádi hegységben elhelyezkedő erdei tóból (szitakötőlárva: 47° 44' 21" É, 19° 0' 42" K; gőte hímek: 11 egyed: 47° 42' 27" É, 19° 02' 24" K, 17 egyed: 47° 42' 47" É, 19° 02' 25" K és 4 egyed: 47° 42' 40" É, 19° 02' 44" K), és az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk őket. A kísérlet kezdetéig a ragadozókat a 3.3. alfejezetben leírtak szerint tartottuk. A vizsgálathoz 200-200 petét is gyűjtöttünk 10 frissen lerakott erdei béka petecsomóból egy (már említett) Pilisjászfalu közelében lévő tóból. A petéket és a kikelő ebihalakat a mezokozmoszban végzett kísérlettel azonos módon tartottuk, az ebihalak így itt is naivak voltak mind a ragadozó, mind a GC tekintetében. Az ebihalakat előfőzött, aprított spenóttal etettük, és kétszer egy héten vizet cseréltünk rajtuk.

A kísérlet kezdetén lemértük a ragadozókat, és randomizáltan beosztottuk őket a GC-, vagy a kontrollkezelésbe, majd egyesével behelyeztük őket átlátszó, 3 literes műanyag dobozokba, randomizált blokk elrendezésben. A ragadozókat a 3.4.1. alfejezetben leírtak szerint neveltük. A vizsgálat kezdetén, és az azt követő vízcserék alkalmával is, hogy megkapjuk a 6,5 mg a.e./l glifozátkoncentrációt, 1,19 ml tömény GC-t adtunk 66 liter RSW-

hez, és ebből mértünk be 2 liternyit minden GC kezeléssel dobozba, míg a kontrolldobozok 2 liter tiszta RSW-t kaptak. A kezeléseket mindkét ragadozó esetében 16-szor ismételtük, ami összességében 64 kísérleti egységet eredményezett.

16 nappal a kísérlet kezdete után, 10:00 és 18:00 között, óránként megfigyeltük a ragadozók viselkedését. Az állatokat akkor tekintettük aktívnak, ha bármelyik testrészük mozgott, és inaktívnak, ha teljesen mozdulatlanok voltak.

Hogy teszteljük a GC akut és krónikus hatásait a predációs aktivitásra, 19 nappal a kísérlet kezdete után begyűjtöttük a ragadozókat, megmértük a tömegüket, és random módon beosztottuk őket a két kezelési csoportba: vagy tiszta RSW-be, vagy GC-t tartalmazó RSW-be kerültek (6,5 mg a.e./l; 4.2.2. táblázat). A négy csoportnál a csoportok között az egyedek tömege nem különbözött szignifikánsan (ANOVA; sebes acsa: $F_{3;28} = 0,92$; $P = 0,45$; pettyes göte: $F_{3;26} = 1,237$; $P = 0,32$; 4.2.2. és 4.2.3. táblázat). Egynapos akklimatizáció után, a szitakötőlárvát tartalmazó dobozokba 10, a gőtéket tartalmazó dobozokba 5 kisméretű erdei béka ebihalat tettünk (~100 mg/db). 4 órával később megszámláltuk az életben maradt ebihalakat, és lezártuk a kísérletet. A predációs aktivitást itt is teszteltük tiszta és GC-s vízben is, hogy a laboratóriumban is megvizsgálhassuk a GC táplálékkeresési viselkedésre kifejtett akut és krónikus hatásait. Egy kontrollkezelésből származó göte még a tesztelés előtt elhagyta a vizet, egy szitakötő pedig éppen vedlett, ezért ezt a két egyedet kizártuk a vizsgálatból. A kísérlet lezárása után a ragadozókat és a megmaradt ebihalakat a gyűjtési helyeken szabadon engedték.

A glifozátkoncentráció folyadékkromatográfiás meghatározásához a 4.6. alfejezetben ismertetett kísérlet során vett vízmintákat használtuk.

4.2.2. táblázat. A laboratóriumi kísérlet felépítése a csoportonkénti egyedszámokat is feltüntetve. A „pettyes göte + tiszta víz” csoportban egy egyed elpusztult, egyet pedig ki kellett zárunk, emiatt kisebb az egyedszám. Egy szitakötőlárvát pedig vedlés miatt nem tudtunk tesztelni a „sebes acsa + tiszta víz” csoportban.

Nevelési környezet (krónikus kitettség)	Predációs aktivitás tesztelése (akut kitettség)	Egyedszám
Sebes acsa + tiszta víz	tiszta víz	7
	GC	8
Sebes acsa + GC	tiszta víz	8
	GC	8
Pettyes göte + tiszta víz	tiszta víz	7
	GC	7
Pettyes göte + GC	tiszta víz	8
	GC	8
Időtartam: 18 nap	4 óra	

4.2.3. táblázat. A ragadozók átlagos súlya és a hozzá tartozó szórás kezelési csoportonként. A négyféle kezelési csoport a következő: 1. nincs krónikus GC kitétség + nincs akut kitétség, 2. nincs krónikus GC kitétség + akut kitétség, 3. krónikus kitétség + nincs akut kitétség, 4. krónikus kitétség + akut kitétség.

Fajok	Kezelési csoport	Átlagos súly (g)	Szórás
Sebes acsa	1	0,60	0,12
	2	0,59	0,12
	3	0,63	0,15
	4	0,70	0,20
Pettyes göte	1	1,24	0,17
	2	1,08	0,23
	3	1,26	0,24
	4	1,10	0,27

4.2.2. Statisztikai elemzés

A mezokozmoszban végzett kísérletnél a testtömeg elemzéséhez LMM-et használtunk. Az elemzésből egy gőtét ki kellett zárunk, mert hibásan vettük fel a tömegadatot. A viselkedési adatok elemzéséhez először kiszámoltuk minden dobozra a 8 megfigyelés átlagát mindhárom változóra. A függőleges elhelyezkedést négyzetgyök transzformáltuk, hogy biztosítsuk a véletlen hiba normál eloszlását, és hogy elkerüljük a varianciák heterogenitásából adódó problémákat. A láthatóság és az aktivitás korreláltak egymással (Spearman-féle rangkorreláció; $r = 0,34$; $n = 56$; $P = 0,01$), ezért az aktivitást kivettük az elemzésből. A láthatóságot és a függőleges elhelyezkedést általános lineáris modellekkel (*general linear model*; GLM) elemeztük külön-külön. A predációs aktivitást általánosított lineáris modellel (*generalized linear model*; GZLM) elemeztük, Poisson eloszlással és log link függvényvel. A kezdeti modellen, mely a kettős interakciókat is tartalmazta, visszafelé irányuló lépésenkénti (*backward stepwise*) modellegyszerűsítést végeztünk (a legmagasabb P -értékkel rendelkező tényezőket fokozatosan kivettük a modelltől, mindaddig, míg már csak szignifikáns tényezők maradtak a modellben; Grafen és Hails 2002), hogy elkerüljük a nem szignifikáns tényezők megtartásából fakadó problémákat (Engqvist 2005). A szelekció során kivett változókhoz tartozó értékeket úgy kaptuk meg, hogy egyesével visszahelyeztük azokat a végső modellbe. Mindegyik próba kétoldali (*two-tailed*) volt. Az elemzésekhez az IBM SPSS Statistics 17.0-s statisztikai programot használtuk.

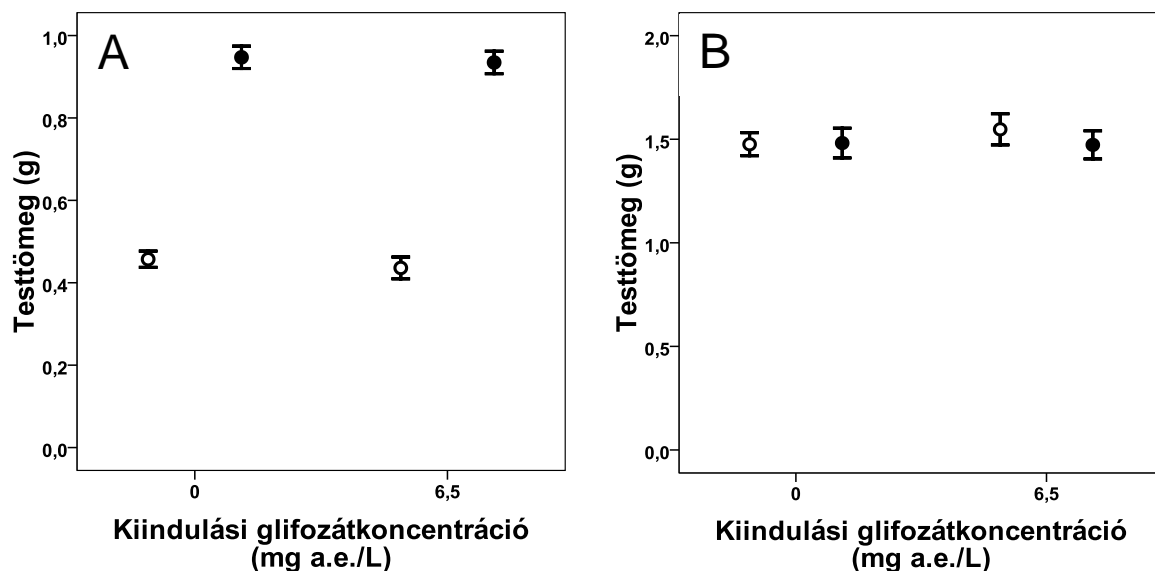
A laboratóriumi vizsgálatban a két faj adatait külön elemeztük. A testtömeg elemzéséhez lineáris kevert modelleket használtunk. Az aktivitás elemzéséhez először kiszámoltuk minden dobozra a 8 megfigyelés átlagát, és ezután ezeket az értékeket elemeztük általános lineáris modellek segítségével. A predációs aktivitást góték esetében GLM-mel, míg szitakötőknél

GZLM-mel elemeztük, kvázibinomiális eloszlással és log link függvénnyel. A varianciák homogenitását Levene-tesztek, a modellreziduálisok normalitását diagnosztikus ábrák segítségével ellenőriztük. Itt is *backward stepwise* modellszelekciót alkalmaztunk, és ebben az esetben is egyesével visszahelyeztük a kivett változókat a végső modellbe, hogy megkapjuk a hozzájuk tartozó értékeket. A statisztikai elemzésekhez az IBM SPSS Statistics 17.0 és az R (verzió: 3.2.2) programcsomagokat használtuk.

4.2.3. Eredmények

A tizenhét napos mezokozmosz kísérlet végére hét szitakötőlárva pusztult el a 36 egyedből; négy a kontrollkezelésben, három pedig a GC-vel kezelt csoportból. A pettyes gőténél nem figyeltünk meg pusztulást, de hét egyed kiszökött a kísérleti dobozokból; négy egyed a tiszta vizet, három pedig a GC-s vizet tartalmazó ládákból.

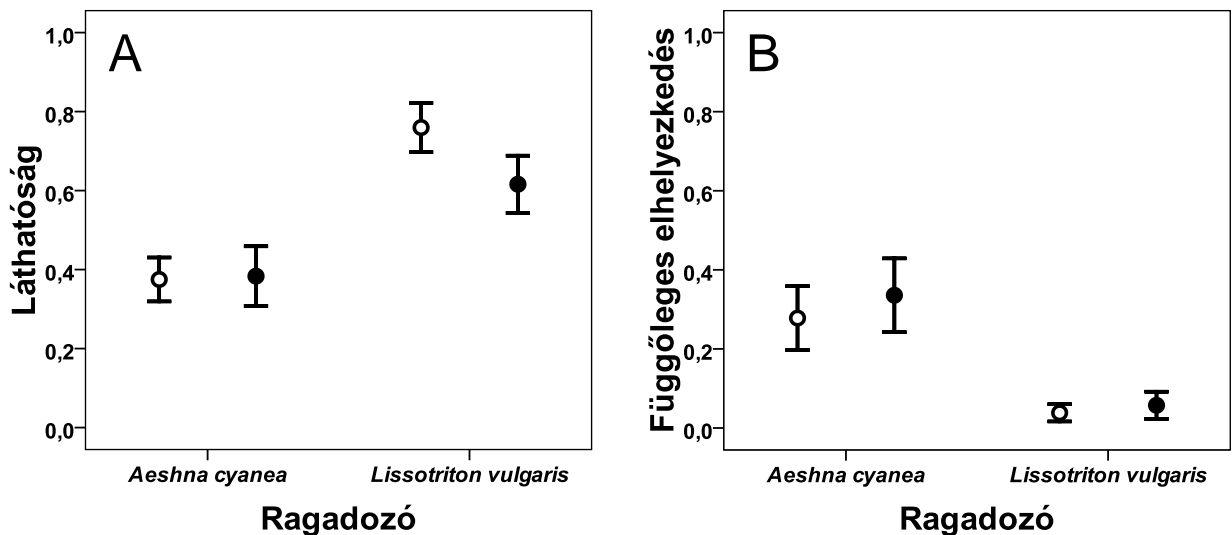
A GC jelenléte nem befolyásolta egyik ragadozó testtömegét sem a kísérlet alatt (LMM; sebes acsa: $F_{1;54} = 0,49$; $P = 0,49$; pettyes göte: $F_{1;52} = 0,08$; $P = 0,78$). A szitakötőlárvák tömege megkétszereződött, de ez a tömegnövekedés független volt a GC-től. A pettyes góték tömege nem változott számottevően a kísérlet alatt, és a GC sem volt rá hatással. A GC kezelés és a kísérlet alatt bekövetkezett testtömegváltozás közötti interakció egyik fajnál sem hatott szignifikánsan a kísérlet utáni testtömegre (sebes acsa: $P = 0,87$; pettyes göte: $P = 0,4$; 4.2.1. ábra, 4.2.4. táblázat).



4.2.1. ábra. Sebes acsa lárvák (A) és pettyes göte hímek (B) testtömege a krónikus GC kezelés előtt (○), illetve után (●). Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

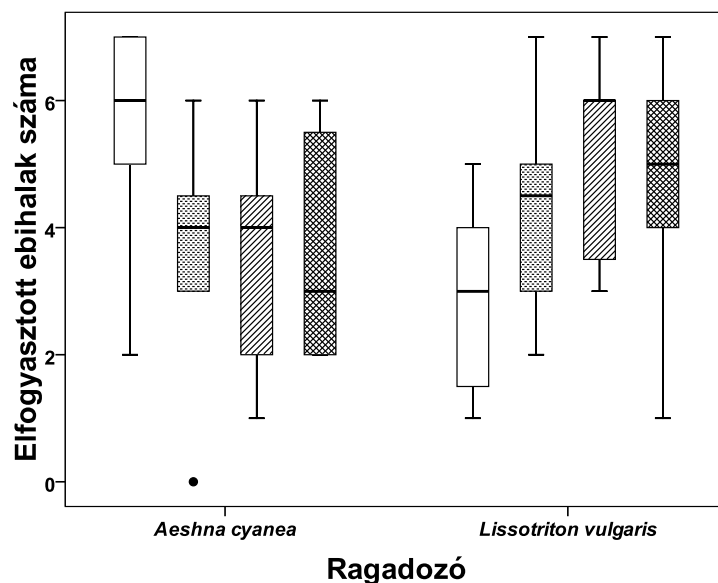
A GC jelenléte nem befolyásolta sem a szitakötőlárvák, sem a góték viselkedését; sem a láthatóság (GLM; sebes acsa: $F_{1;27} = 0,01$; $P = 0,93$; pettyes göte: $F_{1;25} = 2,23$; $P = 0,15$), sem

a függőleges elhelyezkedés nem változott szignifikánsan (GLM; sebes acsa: $F_{1;27} = 0,59$; $P = 0,45$; pettyes göte: $F_{1;25} < 0,001$; $P = 0,99$). A testtömegnek szintén nem volt hatása a viselkedésre egyik faj esetében sem (sebes acsa: láthatóság: $P = 0,81$; függőleges elhelyezkedés: $P = 0,64$; pettyes göte: láthatóság: $P = 0,97$; függőleges elhelyezkedés: $P = 0,08$), és a tömeg és a GC közti interakciók sem voltak szignifikánsak (4.2.2. ábra, 4.2.4. táblázat).



4.2.2. ábra. A láthatóság (A) és a függőleges elhelyezkedés (B) a két ragadozófajnál, GC hiányában (○), illetve jelenlétében (●). A viselkedési változókat a 8 megfigyelési alkalom adatainak átlagolásával kaptuk. Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

A predációs teszteknel sem az akut, sem a krónikus kitettség nem befolyásolta szignifikánsan az elfogyasztott ebihalak számát (GZLM; sebes acsa: krónikus kitettség: $\chi^2 = 1,05$; $P = 0,31$; akut kitettség: $\chi^2 = 1,05$; $P = 0,31$; pettyes göte: krónikus kitettség: $\chi^2 = 2,79$; $P = 0,09$; akut kitettség: $\chi^2 = 0,59$; $P = 0,44$; 4.2.3. ábra). A ragadozók tömege sem befolyásolta a fogyasztást (sebes acsa: $\chi^2 = 0,13$; $P = 0,72$; pettyes göte: $\chi^2 = 1,15$; $P = 0,28$), és egyik interakció sem volt szignifikáns (4.2.4. táblázat).



4.2.3. ábra. A sebes acsa lárvák és a felnőtt hím pettyes gőté által elfogyasztott ebihalak átlagos száma a predációs teszt során. A különböző színezés a különböző kezeléseket mutatja: 1 (fehér): nincs krónikus kitétség + nincs akut kitétség; 2 (pöttyös): nincs krónikus kitétség + akut kitétség; 3 (csíkos): krónikus kitétség + nincs akut kitétség; 4 (négyzetácsos): krónikus kitétség + akut kitétség (a vízszintes vonal a mediánt jelöli, a doboz az interkvartilis terjedelmet, a „bajusz” a minimum illetve a maximum értékeket, a pontok pedig a kilógó értékeket szemléltetik).

A laboratóriumban az összes ragadozó életben maradt a kísérlet végéig, egy gőte kivételével, ami a kontrollkezelésben beszorult a búvóhelyül szolgáló cserép egyik nyílásába és elpusztult.

A GC jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a testtömeget egyik ragadozófajnál sem (LMM; sebes acsa: $F_{1;49,9} = 1,54$; $P = 0,22$; pettyes gőte: $F_{1;57,0} = 0,15$; $P = 0,67$; 4.2.4. ábra). A GC kezeléstől függetlenül, a tizennyolc napos kísérlet alatt a szitakötőlárvák nagyjából megduplázták a súlyukat ($F_{1;50,3} = 83,88$; $P < 0,001$), míg a gőté tömege nagyjából 8,6%-kal csökkent a kísérlet végére ($F_{1;57,9} = 5,67$; $P = 0,021$). A tömegváltozás és a kitétség közötti interakció egyik fajnál sem volt szignifikáns (mindkét fajnál $P > 0,39$).

4.2.4. táblázat. A szabadföldi mezokozmoszokban végzett kísérlet eredményei. A testtömeg elemzéséhez LMM-et, a viselkedési adatok elemzéséhez GLM-et, a predációs aktivitáshoz pedig GZLM-et használtunk.

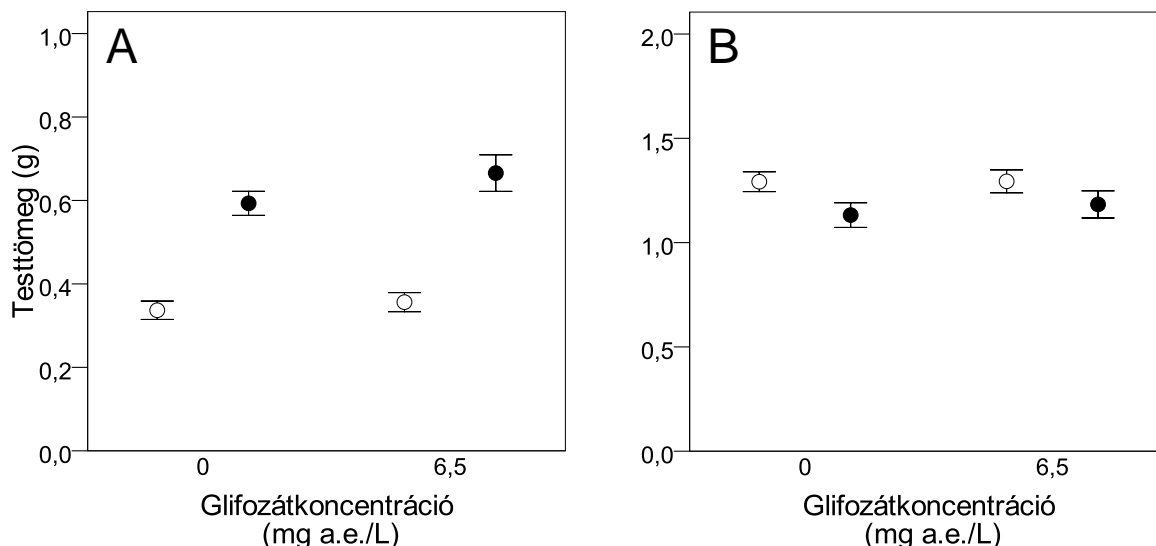
Faj	Változó	Hatás	<i>F</i>	<i>df</i>	h^2 (CI) ^a	<i>P</i>	LR Chi ²	<i>df</i>	Exp(B) (CI) ^b	<i>P</i>
Sebes acsa	Testtömeg	Krónikus kitettség	0,485	1; 54	0,009 (0–0,112)	0,49				
		EU	386,52	1; 55	0,876 (0,808–0,909)	< 0,001				
		Krónikus kitettség × EU	0,029	1; 53	0,0005 (0–0,022)	0,87				
	Láthatóság	Krónikus kitettség	0,008	1; 27	0,0003 (0–0,012)	0,93				
		Testtömeg	0,059	1; 27	0,0022 (0–0,080)	0,81				
		Krónikus kitettség × testtömeg	0,090	1; 25	0,0024 (0–0,086)	0,77				
	Függőleges elhelyezkedés	Krónikus kitettség	0,586	1; 27	0,0214 (0–0,204)	0,45				
		Testtömeg	0,223	1; 27	0,0081 (0–0,165)	0,64				
		Krónikus kitettség × testtömeg	0,714	1; 25	0,0276 (0–0,226)	0,41				
	Predációs aktivitás	Krónikus kitettség					1,046	1	1,21 (0,839–1,747)	0,31
		Akut kitettség					1,046	1	1,21 (0,839–1,747)	0,31
		Testtömeg					0,127	1	1,40 (0,218–8,988)	0,72
		Krónikus kitettség × akut kitettség					1,863	1	1,67 (0,801–3,474)	0,17
		Akut kitettség × testtömeg					0,238	1	0,38 (0,008–18,393)	0,63
Krónikus kitettség × testtömeg						0,909	1	6,02 (0,151–239,574) ^c	0,34	
Pettyes göte	Testtömeg	Krónikus kitettség	0,082	1; 52	0,0016 (0–0,619)	0,78				
		EU	0,078	1; 52	0,0015 (0–0,059)	0,78				
		Krónikus kitettség × EU	0,727	1; 50	0,0145 (0–0,133)	0,40				
	Láthatóság	Krónikus kitettség	2,226	1; 25	0,0819 (0–0,310)	0,15				
		Testtömeg	0,002	1; 25	0,0001 (0–0,003)	0,97				
		Krónikus kitettség × testtömeg	0,064	1; 23	0,0028 (0–0,099)	0,80				
	Függőleges elhelyezkedés	Krónikus kitettség	< 0,001	1; 25	0,0000 (0–0)	0,99				
		Testtömeg	3,333	1; 25	0,1175 (0–0,352)	0,08				
		Krónikus kitettség × testtömeg	0,178	1; 23	0,0077 (0–0,178)	0,68				
	Predációs aktivitás	Krónikus kitettség					2,798	1	0,73 (0,501–1,059)	0,09
		Akut kitettség					0,593	1	0,87 (0,599–1,250)	0,44
		Testtömeg					1,152	1	1,49 (0,722–3,053)	0,28
		Krónikus kitettség × akut kitettség					1,542	1	0,62 (0,293–1,319)	0,21
		Akut kitettség × testtömeg					2,909	1	3,72 (0,804–17,181)	0,09
Krónikus kitettség × testtömeg						0,879	1	0,49 (0,112–2,173)	0,35	

^a Hatásnagyság (konfidenciaintervallum).

^b Esélyhányados (konfidenciaintervallum).

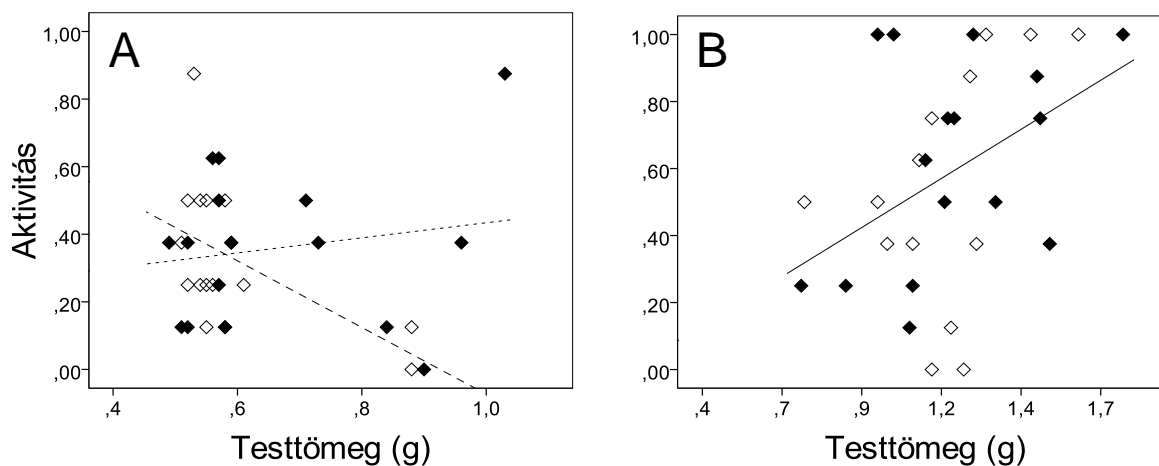
^c A magas esélyhányadost és a széles konfidenciaintervallumot egy egyed okozta, ami vedlés miatt nem evett a predációs teszt alatt.

EU = testtömegváltozás a krónikus kitettség előtt és után mért adatok alapján.



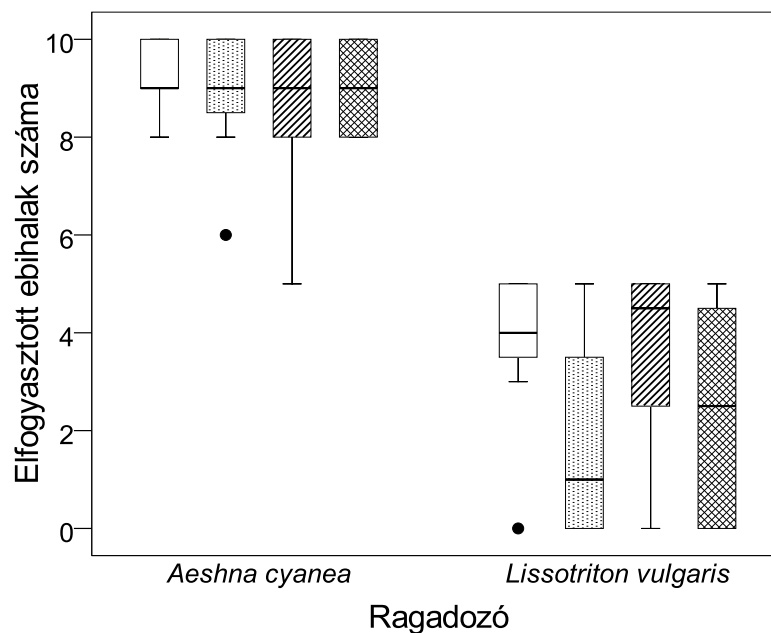
4.2.4. ábra. Sebes acsa lárvák (A) és pettyes götte hímek (B) testtömege a 18 napos krónikus GC kezelés előtt (○), illetve után (●). Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

A GC szitakötőlárvák aktivitására kifejtett hatása sem volt szignifikáns (GLM; $F_{1;28} = 3,79$; $P = 0,06$; 4.2.5. ábra), továbbá, a testtömeg sem befolyásolta az aktivitást ($F_{1;28} = 1,78$; $P = 0,19$). A GC kezelés és a testtömeg közti interakció azonban szignifikáns volt ($F_{1;28} = 4,46$; $P = 0,04$): a kisebb egyedek 5,7-szer gyakrabban mozogtak a kontrollkezelésben, mint a nagyobb állatok, de a GC kezelésnél ez az összefüggés nem volt megfigyelhető. A góték aktivitására a GC szintén nem volt hatással ($F_{1;27} = 0,45$; $P = 0,51$), de a testtömeggel itt szignifikánsan összefüggött a viselkedés: a nehezebb egyedek 1,35-ször aktívabbak voltak, mint a könnyebbek ($F_{1;28} = 5,94$; $P = 0,021$). A GC és a testtömeg közti interakció a góték esetében nem volt szignifikáns ($F_{1;26} = 0,24$; $P = 0,63$).



4.2.5. ábra. Sebes acsa lárvák (A) és pettyes götte hímek (B) aktivitása a kísérlet 16. napján (◇: kontroll, ◆: GC kezelés). A kontrollkezelésben a nagyobb tömeggel rendelkező szitakötőlárvák kevésbé voltak aktívak, mint könnyebb társaik (szaggatott vonal), de ez az összefüggés a GC-vel kezelt állatoknál nem volt kimutatható (pontozott vonal). Gótéknél a nehezebb egyedek mindig aktívabbak voltak, függetlenül a kezeléstől (folytonos vonal).

A predációs aktivitás vizsgálatában a teszt alatt elfogyasztott ebihalak száma nem függött szignifikánsan sem a krónikus, sem az akut GC kitettségtől (sebes acsa: GZLM; krónikus kitettség: $t = -0,58$; $P = 0,57$; akut kitettség: $t = 0,01$; $P = 0,99$; pettyes gőte: GLM; krónikus kitettség: $F_{1;27} = 0,02$; $P = 0,88$; akut kitettség: $F_{1;27} = 1,60$; $P = 0,22$; 4.2.6. ábra). Gőtéknél az elfogyasztott ebihalak száma függött a testtömegtől (GLM; $F_{1;28} = 12,68$; $P = 0,001$), viszont szitakötőlárváknál a testtömegnek nem volt hatása a predációs aktivitásra (GZLM; $t = 0,22$; $P = 0,83$), továbbá, az interakciók sem bizonyultak szignifikánsnak egyik fajnál sem (minden $P > 0,40$).



4.2.6. ábra. A sebes acsa lárvák és a felnőtt hím pettyes gőték által elfogyasztott ebihalak átlagos száma a predációs teszt során. A különböző színezés a különböző kezeléseket mutatja: 1 (fehér): nincs krónikus kitettség + nincs akut kitettség; 2 (pöttyös): nincs krónikus kitettség + akut kitettség; 3 (csíkos): krónikus kitettség + nincs akut kitettség; 4 (négyzetrácsos): krónikus kitettség + akut kitettség (a vízszintes vonal a mediánt jelöli, a doboz az interkvartilis terjedelmet, a „bajusz” a minimum illetve a maximum értékeket, a pontok pedig a kilógó értékeket szemléltetik). A gyomirtó a predációs aktivitást egyik ragadozónál sem befolyásolta. A gőtéknél látható hatást a méretfüggő táplálékkeresési aktivitás okozta.

4.2.4. Értékelés

A mezokozmosz kísérletben a gyomirtókezelés semmilyen hatással sem volt az általunk vizsgált életmenet-változókra sem a sebes acsa lárváknál, sem a felnőtt hím pettyes gőtéknél: a tizenhét napos kísérlet alatt a túlélés, a testtömeg és a viselkedés nem különbözött szignifikánsan a kontroll és a kezelt csoportok között. A predációs aktivitásnál szintén nem találtunk szignifikáns hatást sem az akut, sem a krónikus gyomirtókitettség esetében. Vagyis megállapítható, hogy a GC jelenléte nem növeli meg a mortalitást egyik fajnál sem, továbbá, nem vált ki menekülési (vízelhagyási) viselkedést gőtéknél. A laboratóriumi kísérletünk eredményei szintén azt mutatják, hogy a gyomirtó még magas koncentrációban (6,5 mg a.e./l),

krónikus kitettség mellett sem hatott a vizsgált ragadozókra. Ez összhangban van a szabadföldön végzett mezokozmosz-kísérlet eredményeivel, ami jelentősen megerősíti a kapott eredmények megbízhatóságát, hiszen a vizsgálatok eredményeit nagyban befolyásolhatja a választott kísérleti környezet (Mikó et al. 2015).

A korábbi vizsgálatok többsége nem mutatott ki megnövekedett mortalitást szitakötő lárváknál sem glifozátalapú gyomirtó, sem egyéb szennyező anyag (Relyea 2005a; Rohr és Crumrine 2005; Relyea és Hoverman 2008; Tollett et al. 2009) jelenlétében, ami megerősíti a feltételezést, miszerint az egyenlőtlen szárnyú szitakötők nemcsak a glifozátalapú szerekekkel szemben toleránsak, hanem másféle szennyező anyagokra sem érzékenyek (de lásd Janssens és Stoks 2017). A GC hatásai hasonlóan enyhék voltak gőtéknél, mint a szitakötőlárváknál. Bár egy másik glifozátalapú gyomirtónál (Roundup Original[®] MAX) mutattak ki letális hatásokat (2–3 mg a.e./l glifozát) ebihalakra, lárvális gőtékre és szalamandrákra (Relyea és Jones 2009), mi egyik vizsgálati környezetben sem figyeltünk meg megnövekedett mortalitást ivarérett gőtéknél, még magas koncentráción sem. Ez összhangban van a korábbi, felnőtt állatokon végzett vizsgálatokkal (Relyea et al. 2005; Wagner és Lötters 2013). Edginton és munkatársai (2004b) feltételezik, hogy a glifozátalapú gyomirtóban lévő felületaktív anyagok (például a POEA) károsíthatják a lárvális kétéltűek kopolyúját, ugyanakkor úgy tűnik, ez az anyag nincs hatással a tüdővel lélegző felnőttekre. A bőrlégzés szintén fontos szerepet játszik felnőtt gőtéknél (Feder és Burggren 1985), de az eredmények alapján ezt szintén nem befolyásolja a GC, vagy a tüdőlegzés képes kompenzálni a károsodásokat. Az, hogy a gőté a gyomirtó jelenlétében nem hagyták el gyorsabban a vizet és szöktek ki, arra utal, hogy a szernek nincsenek súlyos fiziológiai hatásai.

A mezokozmoszokban a GC jelenléte egyik ragadozófajnál sem befolyásolta szignifikánsan a testtömeget sem akut, sem krónikus kitettség mellett. A 18 napos laboratóriumi vizsgálatunk alatt a szitakötőlárvák nagyjából megduplázták a súlyukat, de ez független volt a GC-től. A gőté esetében a kismértékű súlyvesztés, amit a krónikus kezelés időtartama alatt figyeltünk meg, szintén független volt a GC kezeléstől. Ennek valószínűleg a természetellenes laborkörülmények miatt kialakult stressz volt az oka, esetleg a mezokozmoszokhoz képest kevesebb vagy rosszabb minőségű táplálék, mivel ott a zooplankton további táplálékforrásként szolgálhatott. Szitakötőlárváknál nem tudunk olyan vizsgálatról, ahol az állatok testtömeg-változását mérték volna glifozátalapú gyomirtó jelenlétében. Felnőtt farkos kétéltűeknél egyetlen ilyen kísérletet ismerünk (Relyea et al. 2005), abban a vizsgálatban sem találtak szignifikáns hatást *Notophthalmus viridescens*-nél. Az, hogy a GC nem befolyásolta a ragadozók testtömegét, utalhat arra, hogy a szer által

indukált detoxifikáció nem jár nagy költséggel a vizsgált fajoknál, vagy legalábbis a hatás nem válik mérhetővé a kísérlet 2,5 hetes időtartama alatt.

A GC jelenléte a mezokozmoszokban nem befolyásolta egyik általunk vizsgált viselkedési változót sem a szitakötőknél, sem a gőtéknél. Korábbi vizsgálatok szerint természetes vizekben, vagy nagyobb mezokozmoszokban (Jones et al. 2010) a felsőbb, melegebb vízrétegekben magasabb lehet a glifozátkoncentráció. Azonban úgy tűnik a GC nem rétegződött a mi kísérleti egységeinkben (3,81 mg a.e./l glifozát; 3,69 mg a.e./l glifozát; és 3,74 mg a.e./l glifozát; alulról felfelé, két héttel a kezdés után), amit talán a mezokozmoszok viszonylag kis mérete okozhatott. Az, hogy a GC nem befolyásolta az állatok viselkedését, talán amiatt van, hogy egyik ragadozóra sincs közvetlen hatással a szer, emiatt nem is próbálták meg elkerülni (Relyea 2005a; Relyea et al. 2005). Azonban az is lehetséges, hogy ezek a fajok nem képesek érzékelni a glifozátalapú gyomirtót (Wagner és Lötters 2013), vagy képesek érzékelni és adott esetben el is kerülnék (Gertzog et al. 2011), de a dobozokban nem volt lényeges koncentrációkülönbség a vízrétegek között. Vizsgálatunk eredményei nem engednek arra következtetni, hogy melyik mechanizmus okozta a viselkedésre gyakorolt hatás hiányát.

A predációs tesztben szintén nem találtunk szignifikáns különbséget a mezokozmoszokban a GC-vel kezelt és a kontrollcsoportok között, egyik fajnál sem, sem akut, sem krónikus kitétség mellett. A predációs hatékonyságot ritkán vizsgálták szitakötőlárvánknál és kételtűeknél (Relyea 2005a). Az egyetlen általunk ismert ilyen jellegű kísérletben két rovarirtó (malation és karbaril) hatását vizsgálták *N. viridescens*-nél, de ott sem találtak szignifikáns hatást (Relyea és Edwards 2010). A glifozátalapú gyomirtó hatással lehetett a teszteléshez használt ebihalakra (Bridges 1999; Relyea 2012), de mivel úgy tűnt, az ebihalak sem előnyt nem élveztek, sem hátrányt nem szenvedtek az akut kitétség miatt, ezt a magyarázatot nem tartjuk valószínűnek. Mindazonáltal, mivel a tesztben alacsony volt a mintaszám (6, 7, vagy 8 állat az akut tesztben), és emiatt az interakciós hatásokat csak alacsony megbízhatósággal tudtuk vizsgálni, nem állíthatjuk teljes bizonyossággal, hogy a GC nem befolyásolja a predációs aktivitást. Különösen mivel két interakció esetében (krónikus kitétség × sebes acsa testtömeg; akut kitétség × pettyes göte testtömeg) magas értéket vettek fel az esélyhányadosok (*odds ratio*). Hangsúlyozzuk azonban, hogy minden ebből levont következtetés igen spekulatív lenne, mivel a konfidenciaintervallumok meglehetősen szélesek. Ha létezik is bármilyen hatás, az feltehetően nem nagy, különösen mivel nem figyeltünk meg testtömegváltozást a GC jelenlétében.

A laboratóriumban szitakötőlárvaik esetében csak az aktivitásra volt némi hatása a GC és a testtömeg közötti interakciónak: a nehezebb egyedek kevésbé voltak aktívak, mint könnyebb társaik, de csak a kontrollcsoportban, valamint a nehezebb egyedek aktívabbak voltak a GC jelenlétében, mint a kontrollkezelésben. Janssens és Stoks (2012) kimutatták, hogy az aktivitás és a ragadozó által indukált viselkedési változások sérülnek *Enallagma cyathigerum* lárvaiknál glifozátalapú gyomirtó (Roundup®) hatására, de ez a hatás is kismértékű, és nem vezet megnövekedett mortalitáshoz szabadon úszó ragadozók jelenlétében. Lehetséges, hogy kísérletünkben a megfigyelt aktivitásnövekedés a nagyméretű szitakötőlárvaiknál annak volt a jele, hogy a lárvaik el akarták hagyni a gyomirtóval szennyezett vizet, de ez a feltételezés spekuláció marad, igazolásához további vizsgálatok szükségesek. Azt, hogy nem találtunk erős GC okozta hatásokat a sebes acsa lárvaik viselkedésében, tovább erősíti az a megfigyelés, hogy a GC a predációs aktivitásra sem volt hatással sem az akut, sem a krónikus kitétség alatt. Götéknél sem találtunk aktivitásra, vagy predációs aktivitásra kifejtett hatásokat. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a peszticidek befolyásolhatják a farkatlan kétéltűlárvaik aktivitását és viselkedését (Bridges 1999; Moore et al. 2015), ugyanakkor felnőtt *N. viridescens*-nél nem volt meg ez a hatás (Relyea és Edwards 2010). Kísérletünkben a testtömeg pozitívan befolyásolta mind az aktivitást, mind a predációs aktivitást. Ennek oka az lehet, hogy a nagyobb állatok több táplálékot igényelnek, és könnyebben elkapják a nagyobb méretű prédát is, mint pl. az ebihalakat, ugyanakkor kevésbé sebezhetőek ragadozókkal szemben, mint kisebb társaik (Wilbur 1988; Urban 2007).

Ez a ragadozók által mutatott glifozátalapú gyomirtóval szembeni „érzékletlenség” súlyos negatív következményekkel járhat a szennyezett területeken élő ebihalakra. Mivel a peszticidszennyezés miatt az ebihalak túlélése, növekedése és fejlődése már eleve károsodott, fiziológiai állapotuk pedig leromlott (Lajmanovich et al. 2003, 2011), az ebihalak populációi további súlyos veszteségeket szenvedhetnek a ragadozók támadásai következtében, mivel rájuk nem hat a gyomirtó. Ez a hatás mérséklődhet, mikor az ebihaldenzitás lecsökken, és a generalista ragadozók, mint amilyenek a götéik és a szitakötőlárvaik, más, nagyobb számban jelenlévő préda-taxonra, például felemáslábú rákokra (Folmar et al. 1979) vagy zooplanktonra (Relyea 2005a) váltanak. Ezenkívül az ebihalak glifozátalapú gyomirtóra adott morfológiai és viselkedési válaszai hasonlíthatnak a ragadozók által indukált válaszokra (Relyea 2012), és ezek valószínűleg valamelyest védelmet nyújtanak a ragadozókkal szemben. Mindazonáltal, az ebihalak és számos más prédataxon populációi, a glifozátalapú gyomirtó direkt hatásain kívül további hátrányt szenvedhetnek a ragadozók inszenzitivitása következtében.

Összességében, az általunk vizsgált gyomirtó-összetételnek a szabadföldi mezokozmoszokban nem volt mérhető hatása a túlélésre, testtömegre, viselkedésre, vagy predációs aktivitásra sem szitakötőlárvánánál, sem gőtéknél. Ez az eredmény meglepő, mivel a ragadozókat nagyon magas, 6,5 mg a.e./l-es kezdeti glifozátkoncentrációnak tettük ki. Annak ellenére, hogy ez a koncentráció lecsökkent a kísérlet végére (a kéthetes mintában a koncentráció ~3,75 mg/l glifozát volt), még mindig magasnak számít a korábbi vizsgálatok fényében (Relyea 2005a; Relyea et al. 2005; Relyea és Hoverman 2008; Relyea és Jones 2009), és közel van a természetben megfigyelt legmagasabb koncentrációhoz is (Relyea 2012; Wagner et al. 2013). A laboratóriumban az egyetlen megfigyelhető hatás az enyhe aktivitásnövekedés volt a nagy méretű szitakötőlárvánánál, míg gőtéknél ez sem volt észlelhető. Ezek az eredmények megerősítik a szabadföldi mezokozmosz vizsgálat eredményeit, ráadásul a laboratóriumi vizsgálatban kimutattuk, hogy a gyomirtónak akkor sincs súlyos hatása a vizsgált ragadozókra, ha a szer folyamatosan magas koncentrációban van jelen, és nem tűnik el degradáció, kiülepedés vagy adszorpció hatására. A GC-ben lévő felületaktív anyag alacsonyabb koncentrációja hozzájárulhatott ahhoz, hogy nem találtunk szignifikáns hatásokat. Mivel azonban a korábbi vizsgálatokban használt glifozátalapú gyomirtók pontos összetétele bizalmas információ, ami miatt a bennük lévő felületaktív anyagok fajtája és koncentrációja nem minden esetben publikus, ez a feltételezés sajnos nagyon nehezen tesztelhető. Továbbá, a mi vizsgálataink csak 17, illetve 18 napig tartottak, emiatt nincs információnk az esetleges hosszútávú hatásokról, melyeket a gyomirtó okozhat a vizsgált ragadozófajoknál. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a glifozát genotoxikus hatású lehet halaknál (Cavalcante et al. 2008), és teratogén kétélűtűknél (Paganelli et al. 2010). Ezenkívül, lehetséges, hogy a gőték érzékenyebbek a gyomirtóra lárvális korban (Relyea 2005b; Relyea és Jones 2009; Pérez et al. 2011), mint kifejlett állapotban, és nem csak a vízben, de a szárazföldi életük során is ki lehetnek téve peszticideknek (Brühl et al. 2011). Emiatt további vizsgálatok szükségesek, hogy felderítsük a különböző taxonok, és életkorok érzékenységbeli különbségeit. Emellett a peszticidek a prédafajok abundanciájára is hatással lehetnek indirekt trofikus kaszkádokon keresztül (Relyea 2005a). Bár vizsgálatunk azt mutatja, hogy az általunk vizsgált ragadozókra nincs közvetlen hatással a vizsgált glifozátalapú gyomirtó, és emiatt továbbra is be tudják tölteni *top-down* regulációs szerepüket a szennyezett vizekben, további vizsgálatok szükségesek, hogy megvizsgáljuk a gyomirtó hosszútávú hatásait, és hogy a kezeléseink hatására később megjelennek-e negatív hatások.

4.3. Glifozáttartalmú gyomirtó hatása erdei béka ebihalak viselkedésére

A vízi xenobiotikumok a viselkedés számos aspektusát befolyásolhatják halaknál és kétéltűeknél. Hathatnak a táplálékkereső (Pavlov et al. 1992; Semlitsch et al. 1995), a ragadozóelkerülő (Bridges 1999; Scholz és Gutzeit 2000) és a szaporodási viselkedésre (De Silva & Samayawardhena 2005), abnormális mozgást okozhatnak (Levin et al. 2004; Denoël et al. 2013), valamint képesek kiváltani a xenobiotikumok magas koncentrációjú területeinek preferenciáját vagy elkerülését (Tierney et al. 2007; Yu et al. 2014).

A vízi toxikológiai viselkedési vizsgálatokban a leggyakrabban használt gerinces modellállatok a halak (Melvin és Wilson 2013). Azonban a különböző peszticidek lárvális kétéltűek viselkedésére kifejtett hatásainak vizsgálata hasonlóan indokolt lenne, mivel nagymértékben áteresztő bőruk van, egyszerűen tarthatóak és megfigyelhetőek, és viselkedésük könnyen számszerűsíthető (Bridges 1999; Wojtaszek et al. 2004; Denoël et al. 2013). Továbbá, mivel sok kétéltű használ kis pocsolyákat, időszakos tavakat és árkokat szaporodási helyként, nagyon valószínű, hogy ki lesznek téve peszticideknek, akár magas koncentrációban is, mivel ezek a víztestek gyakran a mezőgazdasági területek közelében helyezkednek el (Bridges 1997).

Kísérletünkben a GC és ragadozók jelenlétének együttes hatásait vizsgáltuk erdei béka ebihalak viselkedésére. Arra kerestük a választ, hogy a GC hasonló válaszokat indukál-e, mint a ragadozó jelenlétére adott válasz, hogy a ragadozóktól származó szemiokemikáliák, mint további stressztényező, befolyásolja-e a GC hatását, valamint, hogy a GC gátolja-e a ragadozó jelenlétére adott viselkedési válaszokat.

4.3.1. Módszerek

A kísérlethez 350 petét gyűjtöttünk 10 frissen lerakott erdei béka petecsomóból egy Budapeستől kb. 20 km-re ÉNy-ra elhelyezkedő erdei tóból (47° 44' 20" É, 19° 00' 43" K). A tó a Duna-Ipoly Nemzeti Park területén található, így minden valószínűség szerint GC-től mentes volt. A ragadozókezelésekhez 24 szitakötőlárvát és 24 felnőtt hím pettyes gőtét gyűjtöttünk két tóból, melyek közel estek a békapetéek gyűjtési helyéhez (47° 38' 41" É, 18° 36' 42" K és 47° 44' 22" É, 19° 00' 42" K). A kísérlet kezdetéig a petéket és a ragadozókat a 3.3. alfejezetben leírtak szerint neveltük, a kísérletet két nappal az ebihalak elűzése után (elérték a 25-ös fejlettségi állapotot Gosner szerint) kezdtük.

A vizsgálathoz használt mezokozmoszokat a 3.4.2. alfejezetben leírtak szerint állítottunk be. Hogy elérjük a kívánt 0; 2 és 6,5 mg/l-es glifozátkoncentrációt, a GC-ből 0; 0,361 és 1,174

ml-t öntöttünk a 65 liter állott csapvizet tartalmazó mezokozmoszokba egy nappal a kísérlet kezdete előtt. A kilencféle kezelést (három GC-koncentráció × három ragadozókezelés) nyolcszor ismételtük, ami összesen 72 kísérleti egységet eredményezett, randomizált blokk elrendezésben. A kísérlet kezdetén a különböző családokból származó ebihalakat összekevertük és minden dézsába 16 véletlenszerűen kiválasztott, egészségesnek tűnő ebihal került.

Az ebihalak viselkedését a kísérlet kezdetétől számított 21. napon figyeltük meg, amikor az állatok a 36-39-es fejlődési állapotban (Gosner 1960) voltak. A fejlettségi állapotot a viselkedésvizsgálat után egy nappal, ládánként 8 ebihalról készített fotó alapján becsültük. Minden kísérleti egységet nyolc alkalommal látogattunk meg (10:25 és 18:25 között, azonos útvonal mentén). Feljegyeztük az aktív ebihalak számát (a látható ebihalak közül az úszó, vagy táplálkozó egyedek), a látható ebihalak számát (a levélréteg fölött tartózkodó ebihalak száma), a ragadozóketrechez közeli ebihalak számát (a ketrechez közelebbi harmadban lévő ebihalak száma; hasonló módszert sikeresen alkalmaztak korábbi vizsgálatokban, pl. Laurila et al. 1998; Relyea 2001; Hettyey et al. 2015) és a vízoszlopon belüli függőleges elhelyezkedésüket (a felső harmadban lévő ebihalak száma). A megfigyeléseket végző személy „vak” volt, vagyis nem tudta melyik ládában milyen kezelést kaptak az állatok. A viselkedés megfigyelése alatt a hőmérséklet 15,6 °C és 23 °C között változott. Az ebihalakat átalakulásig neveltük, utána a kisbékákat a gyűjtési helyen szabadon engedték.

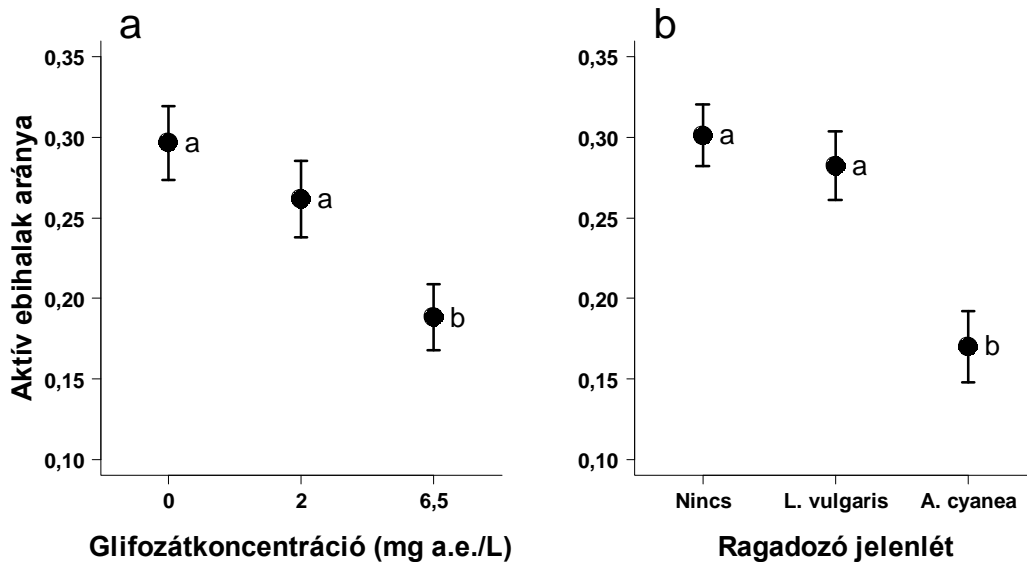
4.3.2. Statisztikai elemzés

Egy mezokozmoszt ki kellett zárunk az analízisből, mert a benne lévő ragadozó (göte) elpusztult még a viselkedésvizsgálat előtt. Az ebihalak pusztulása végig alacsony volt: az 1152 ebihalból összesen 29 pusztult el az egész kísérlet alatt. A rejtőzködés (túlélő ebihalak száma mínusz látható ebihalak száma) és a függőleges elhelyezkedés elemzéséhez a nyolc megfigyelést ládánként átlagoltuk és elosztottuk az adott dobozban jelenlévő ebihalak számával. A mortalitás pontos meghatározásához egy nappal a viselkedés megfigyelése után ládánként kifogtuk és megszámoltuk az élő egyedeket. Az aktivitás és a térbeli ragadozóelkerülés esetében a nyolc megfigyelést kísérleti egységenként átlagoltuk és a látható ebihalak számával elosztottuk. Hogy közelítsük a normál eloszlást és a csoportok homogenitását, arkuszszinusz-transzformációt végeztünk mind a négy vizsgált változón (Sokal és Rohlf 1995). A GC-koncentrációk és a ragadozókezelések hatásait LMM segítségével elemeztük, ahol az aktivitás, a rejtőzködés, a térbeli ragadozóelkerülés vagy a függőleges elhelyezkedés volt a függő változó, a GC-koncentráció és a ragadozókezelés a

független változó, a blokk pedig a random faktor. A modellbe bevittük a kettes interakciókat, és *backward stepwise* modellszelekciót végeztünk, hogy elkerüljük a nem szignifikáns elemek modellben tartása miatti problémákat. A nem szignifikáns változók P értékeit úgy kaptuk meg, hogy egyesével visszahelyettesítettük őket a végső modellbe. *Post hoc* tesztként Tukey-teszteket (*Tukey's honest significant difference*; Tukey's HSD) végeztünk. Egy másik kísérletben (lásd 4.6. alfejezet) az aktivitás és a függőleges elhelyezkedés adataiból származó eredmények egy része szintén bemutatásra kerül, de abban a vizsgálatban a cél a kísérleti környezet esetleges befolyásoló hatásainak meghatározása volt. Emiatt a viselkedési adatok közül csak a fent említett két változó összehasonlítása volt lehetséges (mivel a laboratóriumban a másik két viselkedési változó nem értelmezhető, továbbá, abban a környezetben csak egyféle ragadozót használtunk), ráadásul ott a viselkedés csak egyike volt a mért változóinknak. Az elemzésekhez az R programcsomag (verzió: 3.0.2) 'nlme' csomagjának 'lme' funkcióját, valamint a 'multcomp' csomag 'glht' funkcióját használtuk.

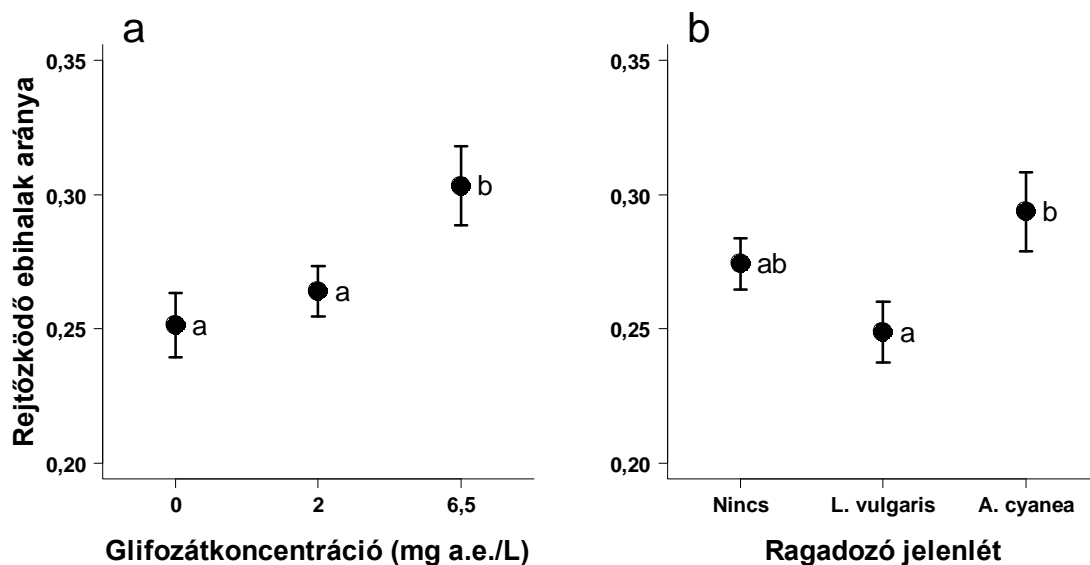
4.3.3. Eredmények

Az aktív ebihalak arányát mind a GC-, mind a ragadozókezelések szignifikánsan befolyásolták, a két változó interakciója nem volt szignifikáns (4.3.1. táblázat). A magas GC-koncentrációnak kitett ebihalak szignifikánsan csökkentették az aktivitásukat a nem kezelt csoporthoz képest (Tukey's HSD: $P < 0,001$), viszont az alacsonyabb koncentráción nem tapasztaltunk szignifikáns változást ($P = 0,41$; 4.3.1.a ábra). A kontrollcsoporttal összevetve a szitakötőlárvák jelenléte szintén csökkentette az aktivitást ($P < 0,001$), ellenben a góték jelenlétének nem volt szignifikáns hatása ($P = 0,82$; 4.3.1.b ábra).



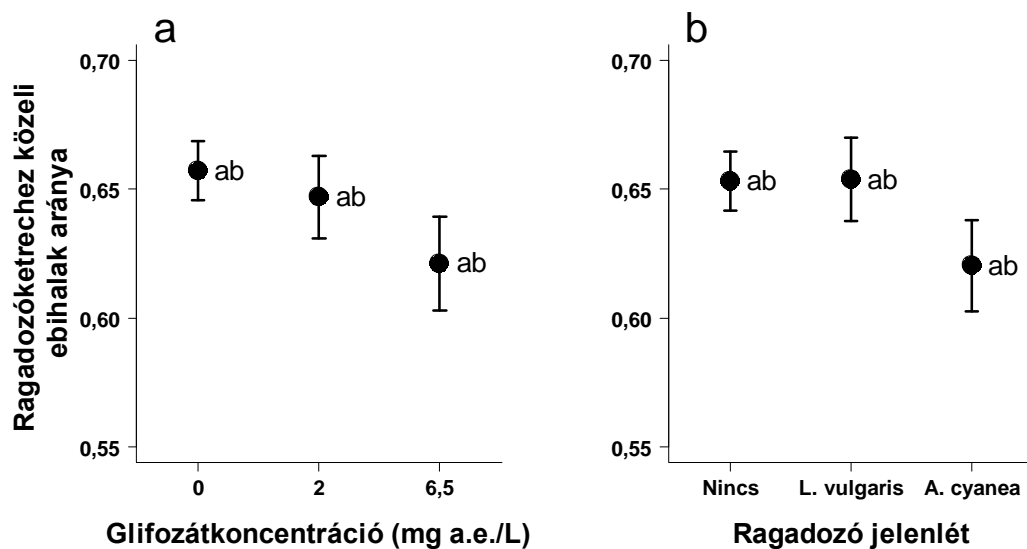
4.3.1. ábra. A három GC-koncentráció (a) és a ragadozó jelenlétének hatása (b) az ebihalak aktivitására. A pontok melletti eltérő betűk a *post hoc* tesztek alapján kapott hasonlóságokat és különbségeket jelzik. Az ábrázolt adatok arkuszszinusz-transzformáltak, az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

A rejtőzködő viselkedést szintén befolyásolta a GC jelenléte és a ragadozókezelés, de a kettő közti interakció nem (4.3.1. táblázat). A magas GC-koncentráción több ebihal bújt el, mint a nem kezelt csoportban (Tukey's HSD: $P = 0,005$), azonban az alacsony koncentráción ez nem volt megfigyelhető ($P = 0,75$; 4.3.2.a ábra). Góték jelenlétében kevésbé rejtőztek el az állatok, mint szitakötő jelenlétében ($P = 0,014$), azonban a rejtőzködő ebihalak aránya a ragadozó nélküli csoportban nem különbözött szignifikánsan egyik ragadozóval együtt nevelt csoportétól sem (nincs ragadozó vs. góte: $P = 0,25$; nincs ragadozó vs. szitakötőlárva: $P = 0,48$; 4.3.2.b ábra).

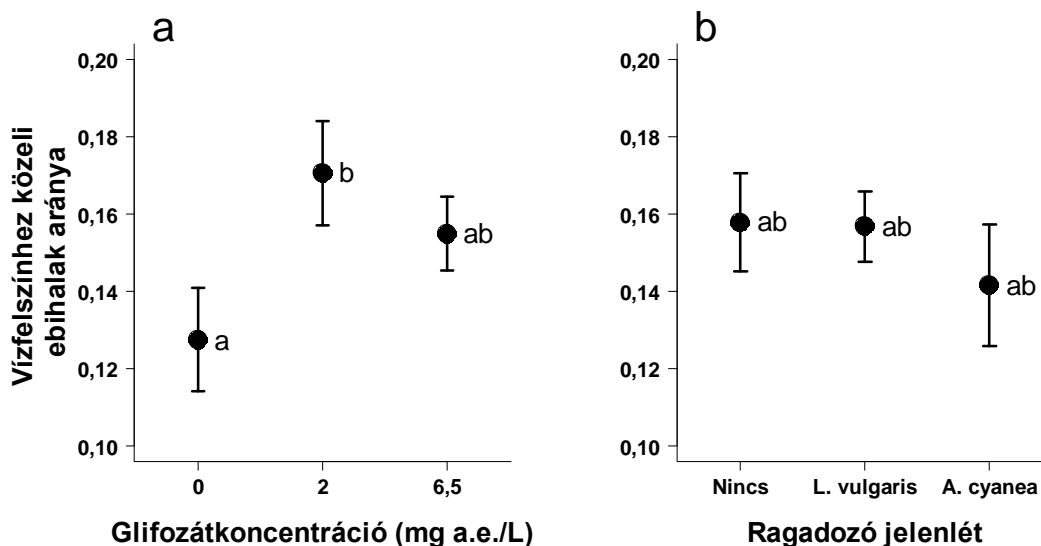


4.3.2. ábra. A három GC-koncentráció (a) és a ragadozó jelenlétének hatása (b) az ebihalak rejtőzködő viselkedésére. A pontok melletti eltérő betűk a *post hoc* tesztek alapján kapott hasonlóságokat és különbségeket jelzik. Az ábrázolt adatok arkuszszinusz-transzformáltak, az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

Térbeli ragadozóelkerülés nem volt kimutatható sem a ragadozók, sem a GC jelenlétében, és a két változó interakciója sem volt szignifikáns (4.3.1. táblázat, 4.3.3. ábra). Ugyanakkor a GC kezelés befolyásolta az ebihalak függőleges elhelyezkedését a nem kezelttekkel szemben (4.3.1. táblázat): az alacsony koncentráción ez a hatás szignifikáns volt (Tukey's HSD: $P = 0,02$), a magas koncentráción viszont nem (Tukey's HSD, kontrollhoz hasonlítva: $P = 0,26$; 4.3.4.a ábra). Ragadozó jelenléte nem befolyásolta a függőleges elhelyezkedést sem önmagában, sem a GC kezelésekkel interakcióban (4.3.1. táblázat, 4.3.4.b ábra).



4.3.3. ábra. A három GC-koncentráció (a) és a ragadozó jelenlétének hatása (b) az ebihalak térbeli ragadozóelkerülésére. A pontok melletti eltérő betűk a *post hoc* tesztek alapján kapott hasonlóságokat és különbségeket jelzik. Az ábrázolt adatok arkuszszinusz-transzformáltak, az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.



4.3.4. ábra. A három GC-koncentráció (a) és a ragadozó jelenlétének hatása (b) az ebihalak vízoszlopon belüli elhelyezkedésére. A pontok melletti eltérő betűk a *post hoc* tesztek alapján kapott hasonlóságokat és különbségeket jelzik. Az ábrázolt adatok arkuszszinusz-transzformáltak, az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

4.3.1. táblázat. Az ebihalak viselkedésváltozóián végzett LMM elemzés eredményei. A szignifikáns *P*-értékeket vastaggal szedve kiemeltem, a végső modell csak a szignifikáns hatásokat tartalmazta. A nem szignifikáns tényezők értékeit a végső modellbe egyesével történő visszahelyezéssel kaptuk meg.

Viselkedési változó	Független változó	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Aktivitás	GC	2; 60	8,53	< 0,001
	Ragadozó	2; 60	14,49	< 0,001
	GC × Ragadozó	4; 56	1,21	0,32
Rejtőzködés	GC	2; 60	5,37	0,007
	Ragadozó	2; 60	3,96	0,024
	GC × Ragadozó	4; 56	1,86	0,13
Térbeli ragadozóelkerülés	GC	2; 62	1,37	0,26
	Ragadozó	2; 62	1,56	0,22
	GC × Ragadozó	4; 56	1,18	0,33
Függőleges elhelyezkedés	GC	2; 62	3,62	0,033
	Ragadozó	2; 60	0,51	0,6
	GC × Ragadozó	4; 56	0,66	0,62

4.3.4. Értékelés

Eredményeink szerint a vizsgált glifozátalapú gyomirtó az erdei béka ebihalak viselkedésének számos aspektusát képes befolyásolni. Magas GC-koncentráción az ebihalak csökkentették aktivitásukat, és többet rejtőzködtek a levelek között, míg az alacsony koncentráción felfelé mozdultak a vízoszlopban. Ezek közül a viselkedési változások közül néhány hasonlít azokra, amiket a farkatlan kétéltűlárva ragadozó jelenlétében mutatnak. Kísérletünkben valóban megfigyeltünk aktivitás-csökkenést szitakötőlárva jelenlétében, viszont a nagyobb arányú rejtőzést és a térbeli ragadozóelkerülést nem sikerült kimutatni. Az ebihalak nem reagáltak szignifikáns viselkedésváltozással a göték jelenlétére sem. Végül, a gyomirtó jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az ebihalak ragadozó jelenlétére adott válaszát.

A legtöbb vizsgálatban, ahol a különböző peszticidek kétéltűek viselkedésére kifejtett hatását vizsgálták, rovarirtót használtak (Bridges 1997, 1999; Brunelli et al. 2009; Relyea és Edwards 2010; Denoël et al. 2013), a glifozátalapú gyomirtó hatására kialakuló viselkedésváltozásokról meglepően keveset tudunk. Wojtaszek és munkatársai (2004) megfigyelték, hogy 7,15 és 14,3 mg a.e./l-es glifozátkoncentráció (Vision®) beadása után pár órával néhány *R. clamitans* és *R. pipiens* ebihal egyáltalán nem, vagy csak késve mutatott ragadozóelkerülési viselkedést, azonban ez a hatás statisztikailag nem volt szignifikáns. Korábban megfigyeltük, hogy a GC különböző módon hat az erdei béka ebihalak viselkedésére a vizsgálati környezet függvényében: a laboratóriumban növelte az ebihalak aktivitását és az állatok többet tartózkodtak a dobozok alján, míg a mezokozmoszokban pont

ellentétes irányú hatásokat figyeltünk meg (Mikó et al. 2015). Moore és munkatársai (2015) leírták, hogy a *R. sylvatica* ebihalak csökkentették aktivitásukat, ha krónikusan ki voltak téve egy glifozátalapú gyomirtónak (Roundup WeatherMax[®]; 0,5 mg a.e./l-es glifozátkoncentráción), de 12 órás kitettség után nem találtak megváltozott viselkedést. Vizsgálatunkban alacsonyabb aktivitást és megnövekedett rejtőzést figyeltünk meg a gyomirtó jelenlétében, ami megfelel a korábbi vizsgálatoknak.

Ebihalak esetében a csökkent aktivitás és megnövekedett rejtőzködés valószínűleg egy általános stresszválasz részei, mivel megjelennek ragadozók jelenlétében (Laurila et al. 1997; Schoeppner és Relyea 2008), de gyomirtók, rovarirtók és gombaölők hatására is (Relyea és Mills 2001; Teplitsky et al. 2005; Mandrillon és Saglio 2007b). Ez hasonló fiziológiás háttérre, vagy adaptív értékre utal a glifozátalapú gyomirtó okozta és a ragadozó által indukált viselkedésváltozás esetében. A ragadozók által kiváltott viselkedési válaszok ebihalaknál a kortikoszteron-szint megváltozásával áll összefüggésben (Fraker et al. 2009; Middlemis Maher et al. 2013). Lehetséges, hogy a peszticidekre adott válaszoknak is hasonló hormonális háttere van, de a glifozátalapú gyomirtók által okozott viselkedésváltozás mögött álló élettani mechanizmusok egyelőre nem ismertek. Elképzelhető továbbá, hogy a glifozátalapú gyomirtó miatt kialakuló aktivitás-csökkenéssel egy időben az egyedek rátermettsége növekedhet az által, hogy csökkentik a táplálkozással és légzéssel aktívan felvett gyomirtó mennyiségét, és több idejük marad detoxifikálásra. Ezzel párhuzamosan pedig a környezetben lévő gyomirtó tovább degradálódik, bomlik. Ezek az elméletek azonban nagymértékben spekulatívak, bizonyításuk további vizsgálatokat igényel.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a glifozátalapú gyomirtók hatásait számos biotikus és abiotikus faktor befolyásolhatja (Chen et al. 2004; Edgington et al. 2004b; Jones et al. 2011; Mikó et al. 2015, 2017a). A ragadozó jelenlét gyomirtóra gyakorolt hatását vizsgáló kísérletek azonban ellentmondásos eredményekre jutottak; például laboratóriumi körülmények között Relyea (2005b) kimutatta, hogy a ragadozó-szemiokemikália kezelés felerősítheti a gyomirtó (Roundup[®]) letális hatását, azonban szabadföldi mezokozmoszokban, ragadozók jelenlétében a gyomirtó (Roundup Original[®] MAX) kevésbé volt toxikus (Relyea 2012). A glifozátalapú gyomirtó (Roundup PowerMAX[®]) viselkedésre gyakorolt hatásait vizsgálva Katzenberger és munkatársai (2014) megfigyelték, hogy az ebihalak úszási sebessége növekedett, ha a gyomirtó mellett ragadozó-szemiokemikáliát is kaptak. Moore és munkatársai (2015) kimutatták, hogy ragadozó-szemiokemikália jelenlétében az ebihalak csökkentették aktivitásukat, azonban ha ezzel egy időben gyomirtóval (Roundup WeatherMax[®]) is lettek kezelve, aktivitásuk visszatért a kiindulási szintre. Ezzel szemben kísérletünkben nem

találtunk szignifikáns interakciós hatást a ragadozó-szemiokemikália és a GC között. Lehetséges, hogy a gyomirtóra adott viselkedési válasz változik a korrallal; egy másik vizsgálatban kimutattunk enyhe változásokat a GC-vel kezelt ebihalak viselkedésében a fejlődés során, de csak alacsony hőmérsékleten (Holly 2016). Emiatt további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy meghatározhassuk, hogyan befolyásolja a ragadozó-jelenlét a glifozátalapú gyomirtó hatásait.

Elképzelhető, hogy a glifozátalapú gyomirtó képes meggátolni a ragadozók jelenlétének érzékelését a ragadozókból származó kémiai anyagok inaktiválásával, a szaglórendszer károsításán, vagy az ebihalak tanulási képességének csökkentésén keresztül. Mandrillon és Saglio (2007a, 2007b) kimutatták, hogy Armitrol (nem szelektív triazol gyomirtó) szubletális koncentrációinak jelenléte képes ebihalaknál meggátolni a ragadozók kémiai érzékelését. Moore és munkatársai (2015) szintén megfigyelték, hogy az ebihalak nem reagálnak sérült társaik szagára, ha glifozátalapú gyomirtó volt a vízben (Roundup WeatherMax[®]; 0,5 mg a.e./l-es koncentrációban). Kísérletünkben mi nem észleltünk hasonló hatásokat a GC esetében. Ennek oka talán az lehet, hogy a korábbi vizsgálatokban az ebihalak csak időnként beadagolt ragadozó-szemiokemikáliát kaptak, nálunk viszont a ragadozó azonos víztérben volt az ebihalakkal az egész kísérlet során. Így a ragadozók által kibocsátott kémiai anyagok elég ideig és elég nagy koncentrációban lehetnek jelen a vízben ahhoz, hogy lehetővé tegyék a ragadozók érzékelését a gyomirtó jelenlétében is. Habár a vizuális érzékelés szintén hozzájárulhat az ebihalak ragadozófelismeréséhez, jelentőségük általában csekély (Kiesecker et al. 1996; Takahara et al. 2012; Hettyey et al. 2012). Ráadásul kísérletünkben a ragadozóketrec fala nem volt átlátszó, alján pedig dupla szúnyogháló réteg volt, ami nagymértékben csökkentette a ragadozó láthatóságát. Emiatt elképzelhető, de nem valószínű, hogy a vizuális jelek hiánya miatt nem találtunk összefüggést a ragadozó-szemiokemikália és a gyomirtó jelenléte között.

Az, hogy az ebihalak a szitakötőlárvák jelenlétében megváltoztatták a viselkedésüket, de nem reagáltak a gőtékre, részben magyarázható a két faj eltérő táplálkozási stratégiájával (Hettyey et al. 2010). A szitakötőlárvák „ül és vár” stratégiát követő ragadozók, amik ellen a csökkent aktivitás és a megnövekedett rejtőzködés hatékony lehet. A gőték azonban aktívan keresik a prédát, ami esetében ezek a védekezési módok csak kismértékben nyújtanak védelmet. Továbbá, a viselkedés megfigyelésekor az ebihalak már elég nagyok voltak, ami csökkenti a táplálékméret-limitált ragadozók, így a gőték, sikerességét (Wilbur et al. 1983; Urban 2007). Emiatt feltehetőleg a nagyobb ebihalak nem tekintik veszélyforrásnak a gőtéket

és többé nem reagálnak rájuk, míg a szitakötőlárva a nagyméretű ebihalak számára is veszélyt jelentenek (Caldwell et al. 1980).

Mikor a GC alacsony koncentrációban volt jelen, az ebihalak a felszín közelébe húzódtak. A glifozátalapú gyomirtók rétegződhetnek a vízoszlopban, felfelé növekvő koncentrációban (Jones et al. 2010, 2011), míg az aljzaton a levelek és egyéb növényi maradványok a mezokozmoszok és természetes vizek alján megköthetik a szert (Tsui és Chu 2004), ami magasabb koncentrációhoz vezethet közvetlenül az aljzat fölött. Továbbá, Rodriguez-Gil és munkatársai (2016) azt találták, hogy a POEA, ami általánosan használt felületaktív anyag, és toxikusabb lehet, mint maga a glifozát (Moore et al. 2012), mikrokozmoszban hozzákötődhet a felülethez és az üledékhez. Kísérleti tartályainkban mi nem mutattunk ki gyomirtó-rétegződést (Mikó et al. 2015). A kifejtett békák képesek lehetnek a gyomirtó jelenlétének érzékelésére (Takahashi 2007), azonban ebihalak hasonló képességét eddig nem írtak le. Viszont, ha a gyomirtó valóban felhalmozódott az aljzaton összegyűlő leveleken, és azt az ebihalak úgy próbálták meg elkerülni, hogy feljebb húzódtak a víztérben, kérdés, hogy a magasabb koncentráción miért nem figyeltünk meg hasonló viselkedést. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázásához, hogy a glifozátalapú gyomirtók természetes vizekben hogyan oszlanak el térben és hogy a gyomirtóval szennyezett vizekben van-e jelentősége az ebihalak függőleges elhelyezkedésének.

Összességében megállapítható, hogy a vizsgált glifozátalapú gyomirtó befolyásolhatja az ebihalak viselkedését, és ezen viselkedési változások hasonlíthatnak a ragadozók által kiváltott válaszokra. Ez az eredmény összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy az ebihalak a stresszre univerzális módon változó viselkedéssel reagálnak, valószínűleg azonos fiziológiai mechanizmus alapján, mely jórészt független a kiváltó környezeti stresszfaktortól. Az is lehetséges azonban, hogy a megfigyelt viselkedésváltozások a gyomirtó közvetlen toxicitásának eredményei. Várakozásainkkal ellentétben a ragadozó jelenléte, mint további stresszfaktor, nem növelte a gyomirtó által kiváltott viselkedési válasz intenzitását, ugyanakkor a ragadozóérzékelés működőképes maradt még a magas GC-koncentráción is. Vizsgálatunk betekintést ad a glifozátalapú gyomirtók viselkedésre kifejtett hatásaiba, valamint alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a viselkedési válaszok vizsgálata érzékeny és így eredményes módszere lehet az ökotoxikológiának.

4.4. Glifozátalapú gyomirtó összetevőinek hatása erdei béka és barna varangy ebihalakra

Szinte mindegyik szárazföldi felhasználásra előállított glifozátkészítmény tartalmaz valamilyen felületaktív anyagot. Ezek elsősorban nedvesítőanyagként szolgálnak, segítik a herbicidek egységes eloszlását a levelek felületén, és hozzájárulnak a glifozát kutikulán keresztüli penetrációjához (Bradberry et al. 2004).

A legszélesebb körben használt felületaktív anyagok a két, polioxietilén (C_2H_4O) csoporthoz kapcsolt nitrogénatomot és egy hosszúláncú alkilcsoportot tartalmazó tercier aminok (POEA). A hidrofób alkilcsoport faggyúból származik, ami állati eredetű zsírok keverékéből áll, amely kétharmad sztearint és palmitint és egyharmad oleint tartalmaz. Az alkilcsoportok lánc hosszúsága és telítési szintje változhat, csakúgy, mint a polioxietilén-csoportok lánc hosszúsága is, így a POEA valójában nem egyetlen vegyület, hanem egy felületaktívanyag-csoport, melynek koncentrációja glifozátkészítményekben <1%-tól 21%-ig terjedhet (Bradberry et al. 2004).

Mivel a glifozátalapú gyomirtók több komponensből álló készítmények, a toxicitásukkal kapcsolatos fő kérdés, hogy káros hatásukat önmagában a hatóanyag, a glifozát, vagy segédanyagaik, különösen a felületaktív anyagok okozzák-e. Korábbi kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a POEA a károsabb összetevő a vízi szervezetekre nézve (Folmar et al. 1979; Tsui és Chu 2003; Brausch és Smith 2007; Brausch et al. 2007; Frontera et al. 2011; Guilherme et al. 2012), azonban kételtűeknél viszonylag kevés, nem közvetett bizonyítékon alapuló vizsgálat született ebben a témában (Howe et al. 2004; Moore et al. 2012; Lanctôt et al. 2014). Ezért kísérletünkben erdei béka és barna varangy ebihalakat neveltünk négy glifozátkoncentráció, négy felületaktív anyag-koncentráció, illetve a kettő kombinációjának jelenlétében, hogy megvizsgáljuk melyik komponens és milyen mértékben felelős a GC toxicitásáért. Továbbá, hogy megállapíthassuk, hogy a ragadozó jelenléte befolyásolja-e a gyomirtó összetevőinek letális hatását, a vizsgálatban az állatok egy részét szitakötőlárváktól származó kémiai anyagoknak is kitettük.

4.4.1. Módszerek

A kísérlethez az erdei béka és a barna varangy petéket tíz nap különbséggel gyűjtöttük 10-10 frissen lerakott petecsomóból illetve -zsinórból, a Békás-tóból ($47^{\circ} 34' 35''$ É, $18^{\circ} 52' 06''$ K), családonként 20-20 darabot, és az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk őket. A ragadozókezelésekhez 8 sebes aca lárva gyűjtöttünk a kutatócsoportunk által telephelyünkön létesített mesterséges tóból ($47^{\circ} 33' 04''$ É, $18^{\circ} 55' 36''$ K). Az állatokat a

kísérlet kezdetéig a 3.3. alfejezetben leírtak szerint neveltük. A vizsgálatokat két nappal azután kezdtük, hogy az ebihalak elúsztak (vagyis elérték a Gosner szerinti 25-ös fejlettségi állapotot).

Az erdei békán végzett vizsgálatban 10-10 (minden családból egy) véletlenszerűen kiválasztott ebihalat neveltünk 5 literes dobozokban, melyekben 4 liter RSW volt, 19 °C-on, 13,5 : 10,5 órás fény : sötét ciklus mellett. A vizsgálatban az állatokat 0; 1; 2 és 4 mg a.e./l-es glifozát, vagy 0; 0,44; 0,88 és 1,74 ml/l-es POEA koncentrációnak, vagy a kettő kombinációinak (1 mg a.e./l glifozát + 0,44 ml/l POEA; 2 mg a.e./l glifozát + 0,88 ml/l POEA; 4 mg a.e./l glifozát + 1,74 ml/l POEA) tettük ki. A POEA-koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy megfeleljenek a GC-ben lévő, glifozáthoz viszonyított mennyiségeknek (Howe et al. 2004). Az állatokon a kísérlet során nem cseréltünk vizet, de *ad libitum* etettük őket előfőzött, aprított spenóttal. A kísérleti állatok felét ragadozó-szemiokemikáliáknak is kitettük. Ehhez hat sebes acsa lárvát használtunk, melyeket egyesével, 500 ml-es poharakban, 400 ml RSW-ben tartottuk és kétnaponta 2-2 naiv fajtárs ebihallal etettünk. A kezeléshez naponta négy ragadozót tartalmazó pohárból származó vizet öntöttünk össze, és minden ragadozókezelésbe beosztott kísérleti dobozba 20 ml-nyit öntöttünk belőle. A többi kísérleti dobozba azonos mennyiségű RSW-t adagoltunk. Minden kezeléskombinációt hatszor ismételtünk, ami összesen 120 kísérleti egységet eredményezett. A vizsgálat során minden nap feljegyeztük az aznap elpusztult egyedek számát és el is távolítottuk őket a dobozokból (az állatot akkor tekintettük halottnak, ha többszöri megbökés után sem adott életjelet). Négy nap elteltével a kísérletet lezártuk, az életben maradt ebihalak tömegét lemértük, majd a befogás helyén szabadon engedték őket.

Két nappal az első kísérlet lezárása után a vizsgálatot barna varangy ebihalakon is elvégeztük, az erdei békáéval megegyező módon (kivéve, hogy ebben az esetben a fény : sötét ciklus 14 : 10 órás volt, mert ekkorra a természetben is hosszabbodtak a nappalok).

4.4.2. Statisztikai elemzés

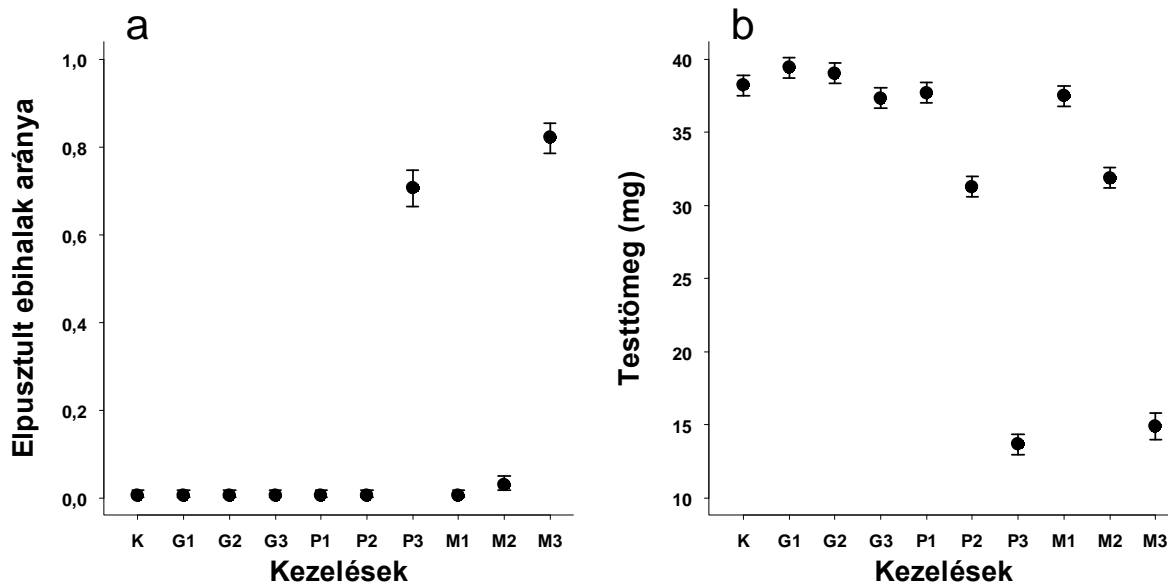
A túlélés elemzéséhez Firth-féle logisztikus regressziót használtunk (*Firth logistic regression*), mivel az adatok majdnem teljes szeparációt mutattak (az illesztett valószínűségi értékek elérték a 0-t vagy az 1-et). A modellben a túlélés volt a függő változó, a kezelések és a blokk a független változók. A testtömeg vizsgálatához LMM-et használtunk, ahol a kísérlet végén mért testtömeg egy egyedre vonatkoztatott átlaga volt a függő változó, a kezelés a független változó, és a blokk a random faktor. A túlélő egyedek számát kovariánsként vittük be a modellbe. Mivel a kísérleti elrendezésben nem minden kezeléskombináció volt jelen (a

komponensek koncentrációi nem voltak egymástól függetlenek), az adatokat nem tudtuk egyetlen elemzésben elemezni. Tervezett összehasonlításokat végeztünk lineáris kontrasztok segítségével, az ismételt tesztelés miatt pedig FDR-korrigált P értékeket számoltunk. Mivel a ragadozó jelenlétének egyik esetben sem volt szignifikáns hatása (minden $P > 0,72$), ezt a változót kivettük a végső elemzésekből. A vizsgálatban az LC_{50} értékeket is meghatároztuk fajonként és kezelésenként külön-külön (a glifozátra nem lehetett meghatározni, mivel ott alig volt pusztulás), amihez GZLM-et használtunk, binomiális eloszlással és probit link függvényel. Mivel az adatok egy része erdei békánál is majdnem teljes szeparációt mutatott, Bayes-féle általánosított lineáris modelleket használtunk (Gelman et al. 2008). Az LC_{50} értékek kiszámításához a 'MASS' csomag 'dose.p' funkcióját használtuk. A 95%-os konfidenciaintervallumokat a következő képlettel számoltuk ki: $\exp(LC_{50} \text{ érték} \pm 1,96 \times \text{az } LC_{50} \text{ érték standard hibája})$; Hackshaw 2009). Az elemzésekhez az R programcsomag (verzió: 3.0.2) 'brglm' és 'nlme' csomagjainak 'brglm' és 'lme' funkcióit, a post hoc tesztekhez pedig a 'multcomp' csomag 'glht' funkcióját használtuk. Az LC_{50} értékek meghatározásához az R programcsomag 'arm' csomagjainak 'glm' és 'bayesglm' funkcióit használtuk.

4.4.3. Eredmények

Az erdei béka ebihalak túlélését csak a legmagasabb koncentrációjú POEA-t tartalmazó kezelések befolyásolták, sem a felületaktív anyag többi koncentrációjánál, sem a glifozát bármely koncentrációja esetében nem találtunk szignifikáns hatást (4.4.1. táblázat, 4.4.1.a ábra). Magas koncentráción a POEA-val és glifozáttal is kezelt állatok túlélése szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak a POEA-nak kitett állatoké (lineáris kontrasztok; FDR korrigált $P = 0,014$; 4.4.1.a ábra). A POEA-ra becsült LC_{50} érték csak a POEA jelenlétében $1,56 \pm 0,028$ ml/l (átlag \pm SE; 95% CI: 1,48; 1,65) volt, míg mindkét komponens jelenléte esetén $1,39 \pm 0,028$ ml/l (95% CI: 1,32; 1,48) volt.

A testtömeg esetében szintén csak a POEA-t tartalmazó kezeléseknél kaptunk szignifikáns hatást, de itt már közepes koncentrációnál is jelentős, kb. 18,2%-kal kisebb tömeget mértünk a kontroll ebihalakhoz képest, míg ez a tömegcsökkenés kb. 64,3%-os volt a magas POEA koncentráción (4.4.1.b ábra). A glifozát jelenléte a testtömeg esetében nem növelte meg a felületaktív anyag hatását (lineáris kontrasztok; közepes koncentráció: FDR korrigált $P = 0,4$; magas koncentráció: FDR korrigált $P = 0,4$; 4.4.1. táblázat, 4.4.1.b ábra).



4.4.1. ábra. A különböző kezelések hatása erdei béka ebihalak túlélésére (a) és testtömegére (b). K: kontroll, G1: 1 mg a.e./l glifozát, G2: 2 mg a.e./l glifozát, G3: 4 mg a.e./l glifozát, P1: 0,44 ml/l POEA, P2: 0,88 ml/l POEA, P3: 1,74 ml/l POEA, M1: 1 mg/l glifozát + 0,44 ml/l POEA, M2: 2 mg/l glifozát + 0,88 ml/l POEA, M3: 4 mg/l glifozát + 1,74 ml/l POEA. Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

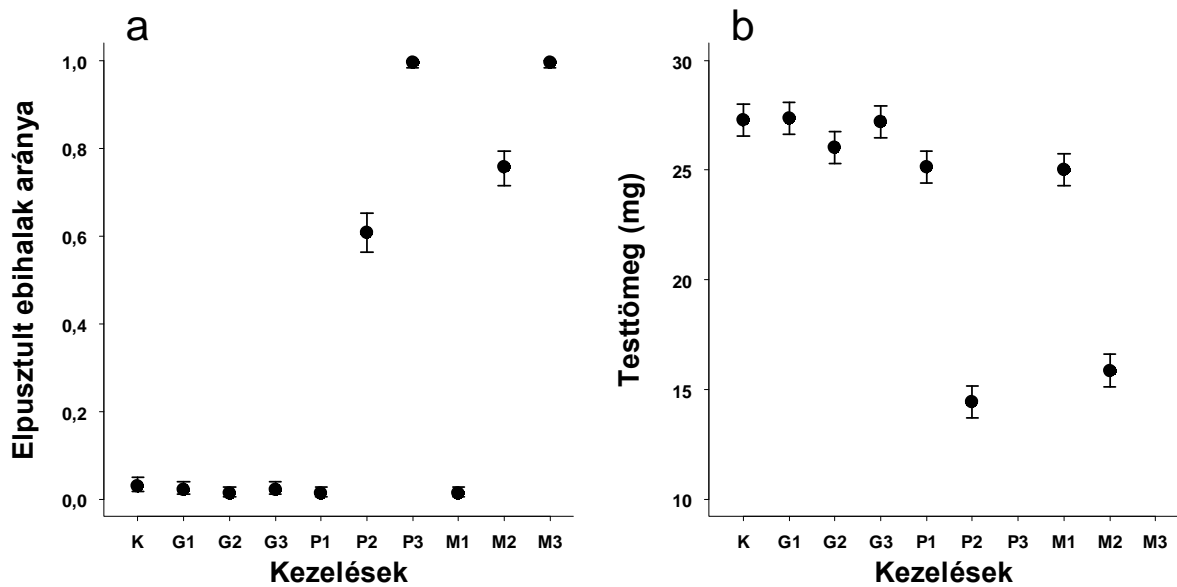
4.4.1. táblázat. Az erdei béka ebihalak vizsgált életmenet-változóin végzett, a kontrollcsoport és kezelt csoportok közti tervezett összehasonlítások eredményeinek összefoglaló táblázata. A feltüntetett P-értékek FDR-korrigáltak.

	Túlélés				Testtömeg			
	β	SE	z-érték	P	β	SE	z-érték	P
Kontroll vs.:								
Csak glifozáttal kezelt:								
Alacsony koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	1,19	0,93	1,28	0,36
Közepes koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	0,82	0,93	0,88	0,48
Magas koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	-0,89	0,93	-0,96	0,48
Csak POEA-val kezelt:								
Alacsony koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	-0,53	0,93	-0,57	0,57
Közepes koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	-6,95	0,93	-7,47	< 0,001
Magas koncentráció	6,7	1,4	-6,57	< 0,001	-19,45	1,66	-11,69	< 0,001
Glifozát + POEA-val kezelt:								
Alacsony koncentráció	< 0,001	1,95	< 0,001	> 0,99	-0,74	0,93	-0,79	0,48
Közepes koncentráció	1,97	1,48	1,34	0,55	-6,17	0,93	-6,62	< 0,001
Magas koncentráció:	7,64	1,42	5,39	< 0,001	-18,25	1,74	-10,49	< 0,001

A barna varangy esetében már a közepes POEA-koncentrációt tartalmazó kezelések is 60,7%-kal csökkentették a túlélést (4.4.2. táblázat), a legmagasabb koncentráción pedig az összes ebihal elpusztult a kísérlet végére (4.4.2.a ábra). Az erdei békához hasonlóan itt is megfigyeltük a glifozát letalitásnövelő hatását közepes koncentráción (lineáris kontrasztok; FDR korrigált $P = 0,028$; 4.4.2.a ábra). A magasabb koncentráción a kombinált kezeléskor is 100%-os volt a halálozás. A POEA-ra becsült LC_{50} érték $0,82 \pm 0,028$ ml/l (95% CI: 0,77;

0,87) volt csak a POEA jelenlétében, és $0,75 \pm 0,029$ ml/l (95% CI: 0,71; 0,79) mindkét komponens jelenlétében.

A testtömegnél a legmagasabb POEA-koncentrációjú kezeléseket adatok hiányában nem tudtuk elemezni, de közepes koncentráción szignifikáns, 47,1%-os tömegcsökkenést találtunk (4.4.2. táblázat). A glifozát itt sem növelte ezt a hatást (lineáris kontrasztok; közepes koncentráció: FDR-korrigált $P = 0,17$; 4.4.2.b ábra).



4.4.2. ábra. A különböző kezelések hatása barna varangy ebihalak túlélésére (a) és testtömegére (b). K: kontroll, G1: 1 mg a.e./l glifozát, G2: 2 mg a.e./l glifozát, G3: 4 mg a.e./l glifozát, P1: 0,44 ml/l POEA, P2: 0,88 ml/l POEA, P3: 1,74 ml/l POEA, M1: 1 mg/l glifozát + 0,44 ml/l POEA, M2: 2 mg/l glifozát + 0,88 ml/l POEA, M3: 4 mg/l glifozát + 1,74 ml/l POEA. Az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek.

4.4.2. táblázat. A barna varangy ebihalak vizsgált életmenet-változóián végzett, a kontrollcsoport és a kezelt csoportok közti tervezett összehasonlítások eredményeinek összefoglaló táblázata. A feltüntetett P -értékek FDR-korrigáltak.

	Túlélés				Testtömeg			
	β	SE	z-érték	P	β	SE	z-érték	P
Kontroll vs.:								
Csak glifozáttal kezelt:								
Alacsony koncentráció	-0,35	0,84	-0,41	0,68	0,06	1,03	0,06	0,96
Közepes koncentráció	-0,86	0,99	-0,87	0,49	-1,26	1,03	-1,22	0,31
Magas koncentráció	-0,35	0,84	-0,41	0,68	-0,09	1,03	-0,09	0,96
Csak POEA-val kezelt:								
Alacsony koncentráció	-0,86	0,99	-0,87	0,49	-2,17	1,03	-2,09	0,06
Közepes koncentráció	3,95	0,58	6,86	< 0,001	-12,87	1,03	-12,47	< 0,001
Magas koncentráció	8,99	1,52	5,91	< 0,001	NA	NA	NA	NA
Glifozát + POEA-val kezelt:								
Alacsony koncentráció	-0,86	0,99	-0,87	0,49	-2,27	1,03	-2,19	0,06
Közepes koncentráció	4,65	0,59	7,95	< 0,001	-11,43	1,06	-10,83	< 0,001
Magas koncentráció	8,99	1,52	5,91	< 0,001	NA	NA	NA	NA

4.4.4. Értékelés

Eredményeink azt mutatják, hogy a GC két vizsgált komponense közül a POEA az, amelyik elsősorban felelős a gyomirtó káros hatásaiért. Kísérletünkben azoknál a kezelési csoportoknál kaptunk szignifikáns eredményeket, ahol a felületaktív anyag jelen volt. A túlélést erdei békánál csak a magas POEA-koncentráció, míg barna varangynál már a közepes koncentráció is csökkentette, a testtömeget pedig mindkét fajnál mind a közepes, mind a magas koncentráció szignifikánsan befolyásolta. Az ebihalak túlélését vizsgálva azt találtuk, hogy a glifozát jelenléte mindkét fajnál kismértékben növelte a felületaktív anyag toxicitását, a testtömeg esetében azonban nem volt megfigyelhető ez a hatás. A ragadozó-szemiokemikáliák jelenléte kísérletünkben nem befolyásolta egyik komponens ebihalakra kifejtett hatását sem.

Viszonylag kevés olyan vizsgálat van, ahol a glifozátalapú gyomirtók egyes komponenseinek kételtűekre gyakorolt hatásait tesztelték, ráadásul ezek egy részében vagy csak a hatóanyag, vagyis a glifozát (Mann és Bidwell 1999; Hedberg és Wallin 2010; Rissoli et al. 2016), vagy csak a felületaktív anyag (Perkins et al. 2000; Edginton et al. 2004a) hatását hasonlították a forgalomban lévő szerekéhez, vagy különböző felületaktív anyagokat tartalmazó gyomirtókat hasonlítottak össze egymással (Fuentes et al. 2011; Lajmanovich et al. 2011; Edge et al. 2014). Howe és munkatársai (2004) hat különböző glifozátalapú gyomirtó (Roundup Original[®], Roundup Transorb[®], Roundup[®] Biactive, Touchdown[®], Glyphos AU[®] és Glyphos BIO[®]), valamint a glifozát (izopropil-amin só formában) és a POEA hatásait vizsgálták *R. clamitans* ebihalakon. A legmagasabb mortalitást a felületaktív anyag és a POEA-t tartalmazó gyomirtók jelenlétében figyelték meg, míg a POEA-t nem tartalmazó gyomirtók és csak a glifozát jelenlétében csak nagyon magas koncentrációknál (17,5 mg a.e./l fölött) tapasztaltak pusztulást. Moore és munkatársai (2012) öt észak-amerikai békafaj (*R. catesbeiana*, *R. clamitans*, *R. pipiens*, *Anaxyrus fowleri* és *Hyla chrysoscelis*) ebihalait kezelték egy glifozátalapú gyomirtóval (Roundup[®]) és annak két fő összetevőjével, a glifozáttal és a POEA-val, és megállapították, hogy gyakorlatilag 100%-ban a felületaktív anyag felelős a gyomirtó toxicitásáért (a glifozát és a POEA között nem találtak interakciós hatást). Lanctôt és munkatársai (2014) *R. sylvatica* ebihalakat teszteltek két időpontban (25-ös fejlettségi állapotban és két héttel később) két glifozátalapú gyomirtóval (Roundup WeatherMax[®] és Vision[®]), glifozáttal és POEA-val, ezen kívül pedig POEA-val az egész kísérlet alatt. Hasonlóan a két előző vizsgálatához, ők is a felületaktív anyagnál figyelték meg a legnagyobb pusztulást krónikus kitétség mellett, míg az akut kezeléseknél egyik esetben sem találtak szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest (a glifozát és a POEA közötti

interakciós hatást nem vizsgálták). Vizsgálatunk eredményei összhangban vannak a korábbi kísérletekben találtakkal, miszerint a glifozátalapú gyomirtók toxikus hatása jórészt a POEA számlájára írható. Kísérletünk azonban kimutatta, hogy a glifozát, ha kismértékben is, de növelheti a POEA-hoz köthető letalitást. A kísérletünk alapján becsült LC_{50} értékek POEA-ra az erdei béka és a barna varangy ebihalak esetében 0,75 és 1,56 mg/l közé estek, ami szintén összhangban van a korábbi vizsgálatokkal (LC_{50} (96 óra) = 1,1 mg/l, Howe et al. 2004; LC_{50} (96 óra) = 0,68–1,32 mg/l, Moore et al. 2012).

A túlélésre gyakorolt hatás mellett a testtömeg esetében is csökkenést tapasztaltunk a közepes és magas POEA-koncentrációval kezelt csoportoknál mindkét általunk vizsgált faj esetében. Ezt a testtömegre kifejtett negatív hatást korábbi, POEA-t tartalmazó glifozátalapú gyomirtók vizsgálatánál is megfigyelték (Relyea 2004a; Cauble és Wagner 2005; Mikó et al. 2015). A felületaktív anyagot külön is tesztelő kísérletek közül azonban csak egynél vizsgálták az állatok tömegét (Lancôt et al. 2014), ott fiatal (31-es fejlettségi állapotú) ebihalaknál enyhe tömegnövekedést tapasztaltak, az idősebb állatok tömege viszont már nem különbözött szignifikánsan a kontrollokétól. Mi nem találunk hasonló tömegnövekedést, viszont mi az állatok tömegét rögtön a négy napig tartó kezelések után mértük meg, Lancôt-ék azonban először csak a második vegyszeres kezelés után mérték testtömeget, a fiatal (25-ös fejlettségi állapotú) ebihalaknál nem. Így elképzelhető, hogy ugyan a fiatal állatok testtömegét károsan befolyásolta a szer, azonban az életben maradt egyedek a kezelések megszűnésével képesek voltak kompenzálni ezt a negatív hatást. Azt pedig, hogy az idősebb állatok kevésbé érzékenyek a glifozátalapú gyomirtóra (és így feltételezhetően a felületaktív anyagra is) egy másik kísérletünkben sikerült igazolni (Mikó et al. 2017b).

Bár korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a glifozátalapú gyomirtók káros hatásait biotikus és abiotikus faktorok egyaránt befolyásolhatják (Sparling 2003; Chen et al. 2004; Edginton et al. 2004b; Wojtaszek et al. 2004; Jones et al. 2011; Mikó et al. 2015), a ragadozó jelenlét okozta plusz stresszel kapcsolatos kísérletek eredményei nem egyértelműek (Relyea 2005b, 2012). Kísérletünkben a ragadozó-szemiokemikáliák nem befolyásolták a komponensek hatását. Elképzelhető, hogy a vizsgálat rövidege miatt nem volt detektálható a ragadozók hatása, mivel azok a korábbi kísérletek, ahol ilyen jellegű szignifikáns hatást mutattak ki, hosszabb ideig, legalább 16 napig tartottak (Relyea és Mills 2001; Relyea 2003a, 2004b, 2005b). Ezt alátámasztják azok a megfigyelések, melyek szerint a ragadozók által kibocsátott kémiai anyagok beadása után az ebihalak rögtön reagálnak viselkedésük megváltoztatásával (Relyea 2003b; Orizaola et al. 2012; Van Buskirk et al. 2014), míg a morfológiai válaszok kialakulása lassabb folyamat (Van Buskirk és Arioli 2002; Relyea

2003b; Orizaola et al. 2012). Annak eldöntéséhez, hogy ragadozók jelenléte milyen mértékben és milyen körülmények között befolyásolja a glifozátalapú gyomirtók hatásait további vizsgálatok lesznek szükségesek.

Vizsgálatunk összességében megerősíti a korábbi kísérletek eredményeit, melyek szerint a POEA-tartalmú gyomirtókban kétéltűlárvákra nézve a felületaktív anyag a toxicitásért felelős összetevő. A glifozátalapú gyomirtó-készítmények között a toxicitásbeli különbségek egy része valószínűleg a bennük lévő POEA mennyiségétől függ, de elképzelhető, hogy más felületaktívanyag-fajták még károsabbak a kétéltűekre nézve (Perkins et al. 2000; Howe et al. 2004; Fuentes et al. 2011; Lanctôt et al. 2014). Sajnos a gyártók nem minden országban kötelesek a termékek pontos összetételét feltüntetni, ami növeli a gyomirtók használatával kapcsolatos bizonytalanságot és a potenciális kártétel mértékét. Emiatt további vizsgálatok szükségesek a gyomirtó-készítményekben használt felületaktív anyagok típusának és ezek környezetre gyakorolt hatásainak meghatározásához. Továbbá, a peszticidek engedélyezésekor a hatóanyag toxicitásának vizsgálata mellett figyelembe kellene venni a különböző herbicid-készítményekben lévő segédanyagok toxicitását is.

4.5. Az ismételhetőség vizsgálata az ökotoxikológiai kísérleteinkben

A körülmények standardizálásának szükségessége az egyik klasszikus alapelv az empirikus kutatásban. Általa olyan technikai és eljárásbeli standardokat hozunk létre és alkalmazunk, melyek szigorúan szabályozzák a kísérleti körülményeket, sok esetben még a vizsgálatban felhasznált állatokat is, minimalizálják a varianciát és kontrollálnak a véletlen hatásokra, melyek elfedhetik az egyébként meglévő hatásokat. A standardizáció növeli a vizsgálatok pontosságát és precizitását (Paylor 2009; Richter et al. 2009; van der Staay et al. 2010), segít feltárni az ok-okozati összefüggéseket (Bailoo et al. 2014), elősegíti a különböző kísérletek eredményeinek összehasonlíthatóságát (Beynen et al. 2001), és lehetővé teszi a felhasznált egyedek számának csökkentését (Festing 2004a, 2004b; Howard et al. 2009). A toxikológiai tesztekénél különösen fontos, hogy a kapott eredmények megismételhetőek legyenek. Azonban felmerül a kérdés, hogy az ilyen szigorúan szabályozott kísérletekből származó eredmények ökológiailag mennyire relevánsak (Calow és Forbes 2003; Eggen et al. 2004; Breitholtz et al. 2006). Ugyanis a szigorú standardizáció nagymértékben csökkentheti az eredmények általánosíthatóságát, és így előfordulhat, hogy a levont következtetések csak az adott kísérleti körülményekre vonatkozóan érvényesek (Calow 1992).

Vizsgálatunkban az egyetlen kísérlet alapján becsült LC_{50} értékek megbízhatóságát teszteltük erdei béka és barna varangy ebihalaknál GC esetében. Emellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy a szitakötőlárváktól származó szemiokemikáliák növelik-e a GC toxicitását, és hogy a kísérleti elrendezés módosítása befolyásolja-e az eredményeinket.

4.5.1. Módszerek

Vizsgálatunkat az erdei béka és a barna varangy ebihalain végeztük. Az erdei békán végzett kísérlethez 2013-ban 20-20 petét gyűjtöttünk 10 frissen lerakott erdei béka petecsomóból egy Visegrádi hegységben elhelyezkedő tóból (47° 42' 48" É, 19° 02' 25" K; tszfm: 314 m) és az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk őket. Az állatokat a kísérlet kezdetéig a 3.3. alfejezetnél leírtak szerint neveltük. Két nappal azután, hogy az ebihalak elúsztak (elérték a 25-ös fejlettségi állapotot Gosner szerint), a különböző családokból származó állatokat összekevertük, és elindítottuk a vizsgálatot.

A kísérletben 112 véletlenszerűen kiválasztott ebihalat neveltünk egyesével, 2 literes dobozokban, melyekben 1,4 liter RSW volt, 16 °C-on, 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. A vizsgálatban 0; 0,009; 0,03; 0,24; 1; 2 és 6,5 mg a.e./l-es, mértani sorozat szerint növekvő glifozátkoncentrációt használtunk. Vizet háromnaponta cseréltünk, megtartva az eredeti

koncentrációkat. Az ebihalakat minden vízcsere után előfőzött, aprított spenóttal etettük *ad libitum* mennyiségben. A kísérleti állatok felét ragadozó-szemiokemikáliáknak is kitettük. Ehhez hat sebes acsa lárvát használtunk, melyeket egyesével, 3 literes dobozokban, 2 liter RSW-ben tartottunk és kétnaponta 2-2 (összesen kb. 150 mg) naiv erdei béka ebihallal etettünk. A kezeléshez naponta három ragadozót tartalmazó dobozból származó vizet öntöttük össze, amiből minden kezelést kapó kísérleti dobozba 13,5 ml-nyit öntöttünk. A ragadozó-szemiokemikáliát nem kapó dobozokba azonos mennyiségű RSW-t adagoltunk. Minden kezeléskombinációt nyolcszor ismételtünk, ami összesen 112 kísérleti egységet eredményezett. Öt nappal a vizsgálat kezdete után lezártuk a kísérletet, feljegyeztük az életben maradt egyedek számát, a túlélőket pedig szabadon engedték a befogás helyén.

Egy héttel az első vizsgálat után a kísérletet újonnan gyűjtött ebihalakkal megismételtük. Ehhez egy másik, magasabban fekvő, Visegrádi hegységben elhelyezkedő tóból (47° 44' 20" É, 19° 00' 43" K; tszfm: 483 m) gyűjtöttünk 10 frissen lerakott erdei béka petecsomóból, csomónként 35 petét. A kísérleti körülmények azonosak voltak az egy héttel korábbival, viszont itt csak 3 GC-koncentrációt használtunk (0; 2 és 6,5 mg a.e./l glifozát; az első kísérlet eredményei alapján) a ragadozó-szemiokemikáliával kombinálva. Két nappal a kelés után a családokat összekevertük, és a kezeléseknél 40-40 ebihalat, összesen 240 állatot tettünk ki. Itt is öt nap után jegyeztük fel a túlélő ebihalak számát, az életben maradt egyedeket pedig szabadon engedték a gyűjtés helyén.

A barna varangyokon végzett kísérlethez 2014-ben 10 frissen lerakott petezsinórból, zsinóronként 125 petét gyűjtöttünk egy Piliscsabához közeli tóból (47° 37' 25" É, 18° 48' 27" K; tszfm: 244 m) és az MTA ATK NÖVI Juliannamajori Kísérleti Telepére szállítottuk őket. Az állatokat a kísérlet kezdetéig itt is a 3.3. alfejezetben leírtak szerint neveltük. Két nappal azután, hogy az ebihalak elérték a szabadon úszó állapotot, a különböző családokból származó állatokat összekevertük, és a kísérleti dobozokba 14-14 véletlenszerűen kiválasztott, egészségesnek tűnő ebihalat helyeztünk. Az állatokat 11 literes, 10 liter RSW-t tartalmazó dobozokban tartottuk 18 °C-on, 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. Az állatokat 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 vagy 8 mg a.e./l-es glifozátkoncentrációknak tettük ki, ami eltért az erdei békánál használttól. Ragadozókezelést is alkalmaztunk, amihez hat, egyesével, 3 literes dobozban tartott sebes acsa lárvát használtunk. A ragadozókat 2-2 (összesen kb. 100 mg) naiv barna varangy ebihallal etettük kétnaponta. A kezeléshez itt is naponta három ragadozót tartalmazó dobozból származó vizet öntöttük össze, amiből minden ragadozó-szemiokemikáliát kapó kísérleti dobozba 20 ml-nyit öntöttünk, míg a ragadozó-szemiokemikáliát nem kapó ebihalak ugyanennyi RSW-t kaptak. Minden kezeléskombinációt négyszer ismételtünk, így összesen

72 kísérleti egységünk volt (összesen 1008 ebihal: $14 \times 9 \times 2 \times 4$). A kísérlet alatt vizet nem cseréltünk, a kísérlet kezdetén az állatokat előfőzött, aprított spenóttal, *ad libitum* mennyiségben etettük. Öt nappal a vizsgálat kezdete után lezártuk a kísérletet, feljegyeztük az életben maradt egyedek számát, a túlélőket pedig a befogás helyén szabadon engedték.

A kísérlet megismétléséhez 20-20 petét gyűjtöttünk 12 frissen lerakott barna varangy petezsinórból, egy Nagykovácsiban elhelyezkedő hűvösebb tóból ($47^{\circ} 34' 35''$ É, $18^{\circ} 52' 06''$ K; tszfm: 344 m). Az állatokat a kísérlet kezdetéig az előző kísérlettel azonos módon tartottuk. Két nappal a 25-ös fejlettségi állapot elérése után minden családból véletlenszerűen kiválasztottunk 12 ebihalat, és egyesével helyeztük el őket 1,2 literes dobozokban, melyekben 700 ml RSW volt, így összesen 144 kísérleti egységünk volt. A hőmérséklet és a világítás megegyezett az előző kísérletnél alkalmazottal. Az állatokat 0; 2 vagy 4 mg a.e./l-es glifozátkoncentrációnak tettük ki, és mivel az egy héttel korábbi kísérletben nem találtunk szignifikáns hatást a ragadozókezelés tekintetében, így azt kihagytuk ebből a vizsgálatból. Az ebihalakon három nap után vizet cseréltünk, visszaállítva az eredeti GC koncentrációkat, és előfőzött, aprított spenóttal megettük őket *ad libitum* mennyiségben. Öt nappal a vizsgálat kezdete után lezártuk a kísérletet, megszámláltuk az életben maradt egyedeket, a túlélőket pedig a gyűjtési helyen szabadon engedték.

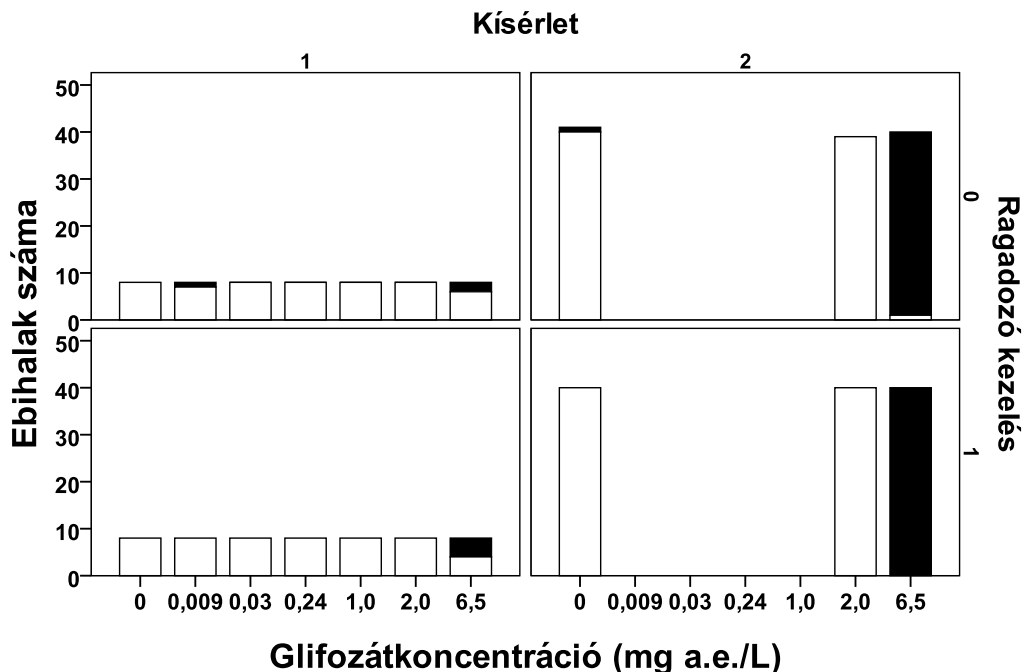
Mivel az első erdei békás kísérletben vett vízmintából visszamért glifozátkoncentráció nem különbözött jelentősen a névleges koncentrációtól (a tényleges koncentráció 1,73 mg a.e./l volt), továbbá, mivel minden kísérletben azonos módon mértük ki és adagoltuk be az állatoknak a GC-t, feltételeztük, hogy a GC kezelések során a koncentrációk igen hasonlóak voltak egymáshoz.

4.5.2. Statisztikai elemzés

Az LC_{50} értékek meghatározásához GZLM-et használtunk, binomiális eloszlással és probit link függvényvel. Mivel két esetben az adatok majdnem teljes szeparációt mutattak, Bayes-féle általánosított lineáris modelleket alkalmaztunk. A P értékek meghatározásához a 'car' csomag 'Anova' funkcióját, az LC_{50} értékekhez kiszámításához a 'MASS' csomag 'dose.p' funkcióját használtuk. A 95%-os konfidenciaintervallumokat az előző, 7. fejezetben leírt kísérletben is használt képlettel számoltuk ki. Az analízisekhez az R programcsomag (verzió: 3.0.2) 'arm' csomagjainak 'glm' és 'bayesglm' funkcióit használtuk.

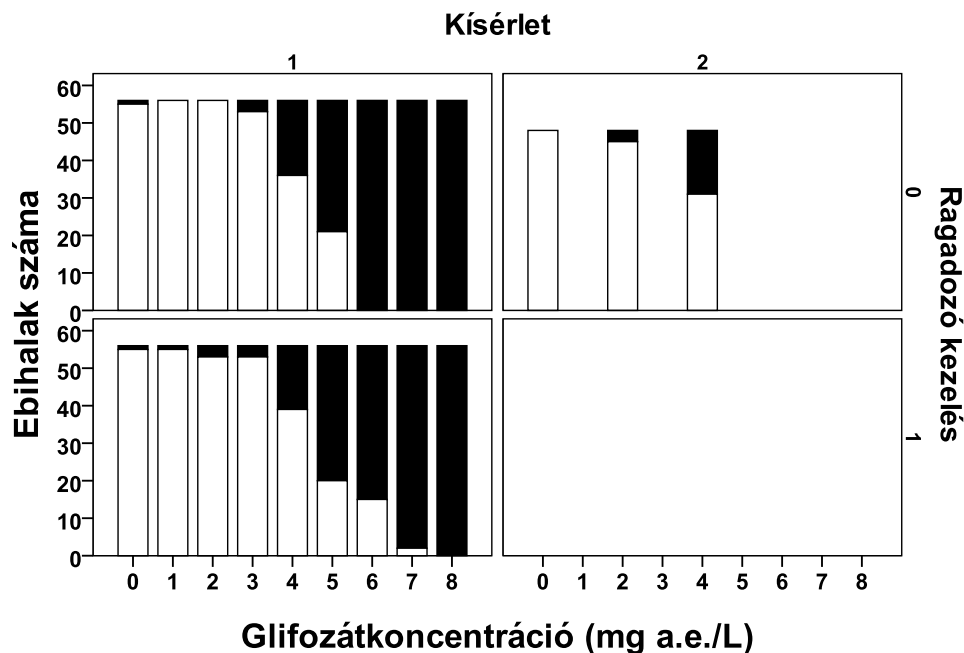
4.5.3. Eredmények

Az erdei béka esetében az első kísérletben szinte az összes ebihal életben maradt: a 112 egyedből csupán 7 állat pusztult el a kísérlet végére: egy ebihal a 0,009 mg a.e./l-es (ragadozókezelés nélküli), és hat ebihal a 6,5 mg a.e./l-es glifozátkoncentráción, utóbbiak közül négy esetben volt ragadozókezelés, két esetben pedig nem. Az alacsony halálozás miatt adatainkra nem tudunk görbét illeszteni. Mivel azonban a második kísérletben alkalmazott koncentrációkat ennek a vizsgálatnak az eredményei alapján szerettük volna kiválasztani, az abban használt koncentrációkat az ábrázolt halálozási adatok alapján becsültük (kb. 6,5 mg a.e./l a ragadozó kezelés nélküli, és kb. 7,4 mg a.e./l a ragadozó kezeléssel csoportban; 4.5.1. ábra). A második kísérletben a 6,5 mg a.e./l-es glifozátkoncentráción az ebihalak 99%-a elpusztult az első három nap során. A becsült LC₅₀ értékek ebben az esetben 4,00 ± 0,11 (95% CI: 3,26; 4,92) mg a.e./l ragadozó-szemiokemikália kezelés nélkül, és 3,54 ± 0,11 (95% CI: 2,86; 4,39) mg a.e./l ragadozó-szemiokemikália kezeléssel (4.5.1. ábra). Mivel a ragadozó jelenléte egyik kísérletben sem befolyásolta szignifikánsan az ebihalak túlélését (első kísérlet: GZLM; $\chi^2 = 1,08$; $P = 0,3$; második kísérlet: Bayes-féle GZLM; $\chi^2 = 0,94$; $P = 0,33$), a második tesztre összevont LC₅₀ értéket is számoltunk (3,96 ± 0,1 mg a.e./l; 95% CI: 3,24; 4,83).



4.5.1. ábra. Az életben maradt (fehér) és az elpusztult (fekete) erdei béka ebihalak száma az első és második kísérletben, ragadozó-szemiokemikália jelenlétében, illetve hiányában. A két kísérlet között egy hét telt el. A második kísérletben alkalmazott GC-koncentrációk az első teszt eredményei alapján lettek kiválasztva.

A barna varangy esetében az első kísérletben az összes ebihal elpusztult 5 mg a.e. glifozát/l-es koncentráció fölött a ragadozókezelés nélküli, és 8 mg a.e./l-es koncentráción a ragadozó-szemiokemikáliával kezelt csoportokban. Az 1 és 2 mg a.e. glifozát/l-es ragadozókezelés nélküli csoportoknál egyáltalán nem volt pusztulás. A becsült LC₅₀ érték ragadozó-szemiokemikália hiányában 4,25 ± 0,03 (95% CI: 4,03; 4,48) mg a.e./l volt, míg ragadozó-szemiokemikália jelenlétében 4,46 ± 0,03 (95% CI: 4,24; 4,69) mg a.e./l-nek adódott (4.5.2. ábra). A ragadozó jelenléte itt sem befolyásolta szignifikánsan a túlélést (GZLM; $\chi^2 = 1,72$; $P = 0,19$); az összesített LC₅₀ érték 4,36 ± 0,02 (95% CI: 4,19; 4,52) mg a.e./l volt. A második kísérletben, ahol az állatok nem kaptak ragadozókezelést, a gyomirtóra számolt LC₅₀ érték 4,41 ± 0,07 (95% CI: 3,84; 5,07) mg a.e./l volt (4.5.2. ábra).



4.5.2. ábra. Az életben maradt (fehér) és az elpusztult (fekete) barna varangy ebihalak száma az első és második kísérletben, ragadozó-szemiokemikália jelenlétében, illetve hiányában. A két kísérlet között egy hét telt el. A második tesztben nem használtunk ragadozókezelést, a jobb alsó ábrarész ezért maradt üresen. A második kísérletben alkalmazott GC-koncentrációk az első teszt eredményei alapján lettek kiválasztva.

4.5.4. Értékelés

Eredményeink szerint az erdei béka és a barna varangy ebihalak esetében a becsült LC₅₀ értékek a GC vonatkozásában 3,54 és 4,46 mg a.e./l közötti értékeknek adódtak. Ez azt jelenti, hogy a gyomirtó közepesen toxikus az általunk vizsgált fajokra (az LC₅₀ értékek 1 és 10 mg a.i./l közé esnek, ami megfelel 0,75 és 7,5 mg a.e./l-nek; Giesy et al. 2000; Relyea 2011). Ez összhangban van a korábbi vizsgálatokkal, melyekben a glifozátalapú, POEA-t tartalmazó gyomirtók közepesen, vagy erősen toxikusnak bizonyultak kételtűekre nézve (pl. LC₅₀ (48

óra) = 2,93–11,63 mg a.e./l, Mann és Bidwell 1999; LC₅₀ (48 óra) = 1,31 mg a.e./l, Lajmanovich et al. 2003; LC₅₀ (16 nap) = 0,41–1,89 mg a.e./l, Relyea 2005b). Ezek a vizsgálatok azonban eltértek egymástól a vizsgált faj, a kezeléshossz, vagy az alkalmazott gyomirtó-összetétel tekintetében, melyek mind hozzájárulhattak a kísérletekben megmutatkozó különbségekhez. De az eltérő kísérleti környezetek és véletlen hatások szintén fontos szerepet játszhattak a különbségek kialakulásában (Mann és Bidwell 1999; Howe et al. 2004; Moore et al. 2012; Edge et al. 2014; Mikó et al. 2015).

A gyomirtók toxicitását számos biotikus és abiotikus faktor befolyásolhatja (Sparling 2003). Például, a glifozátalapú gyomirtók letalitását fokozhatja a magas pH (Chen et al. 2004; Edginton et al. 2004b; Wojtaszek et al. 2004), vagy az egyedek közötti versengés intenzitása (Jones et al. 2011), de az alkalmazott kísérleti környezet egyéb tulajdonságai is nagymértékben befolyásolhatják azt (Mikó et al. 2015). A predációs veszély okozta stressz szintén hatással lehet a szennyező anyagok toxicitására, azonban a kevés rendelkezésre álló vizsgálat ellentmondásos eredményekre jutott e tekintetben. Laboratóriumi körülmények között Relyea (2005b) megnövekedett pusztulást tapasztalt glifozátalapú gyomirtó (Roundup®) esetén, ha az egyedek ragadozó-szemiokemikáliát is kaptak, míg szabadföldi mezokozmosz körülmények között a ragadozók jelenléte csökkentette a gyomirtó (Roundup Original® MAX) ebihalakra kifejtett letális hatását (Relyea 2012). Ezzel szemben a ragadozójelenléttel kapcsolatban mi nem találtunk szignifikáns, a gyomirtó toxicitását befolyásoló hatást sem ebben, sem korábbi vizsgálatainkban (Mikó et al. 2015, 2017c). Azt, hogy a predációs veszély nem befolyásolta az ebihalak gyomirtó érzékenységét, elméletileg okozhatta az alkalmazott ragadozó-szemiokemikália túlságosan kicsi töménysége. Azonban hasonló koncentrációban a ragadozó-szemiokemikália már képes ragadozóelkerülő reakciót kiváltani (jelen vizsgálat: 10,63 és 10,5 mg ebihal/l/hét; Relyea 2012: 7,36 mg ebihal/l/hét), vagyis kísérletünkben az ebihalak nagy valószínűséggel érzékelték a ragadozók jelenlétét. Ezért további vizsgálatok szükségesek annak meghatározásához, hogy a ragadozójelenlét mikor képes felerősíteni, vagy gyengíteni a gyomirtó toxicitását.

Vizsgálatunk alátámasztja a feltételezést, miszerint a peszticidtoleranciában megjelenő különbségek egy faj különböző populációinál is előfordulhatnak (Brausch és Smith 2009; Coors et al. 2009). Elképzelhető, hogy az erdei békánál általunk megfigyelt két kísérlet közötti különbséget is a populációk gyomirtó érzékenységének eltérése okozta (lásd Semlitsch et al. 2000; Cothran et al. 2013; Hua et al. 2015). Mivel a populációk közötti érzékenységbeli különbségek figyelembevétele alapvető fontosságú lenne a kétélűeken végzett

ökotoxikológiai vizsgálatok értelmezésben és tervezésében, további alapos vizsgálatok szükségesek, hogy megbecsülhessük ezeknek az eltéréseknek a mértékét.

Vizsgálatunkban a barna varangy esetében a becsült LC_{50} értékek robusztusnak tűntek, mivel a két kísérlet nagyjából azonos eredményt hozott, a kísérleti körülmények jelentős különbsége ellenére is. Bár csak egyszer ismételtük meg a kísérletet, a kapott eredmények megerősítik a feltételezésünket, hogy ennél a fajnál az általunk becsült toxicitási értékek megbízhatóak. Erdei békánál azonban a kapott eredmények különböztek a két kísérlet között, annak ellenére, hogy a kísérleti körülmények szinte azonosak voltak. Ezért, ebben az esetben a standardizáció nem szüntette meg az eredmények közötti variációt, és ez az eltérés figyelmeztet a becsült LC_{50} értékek bizonytalanságára.

A másik fontos következtetés, ami jelen vizsgálat alapján levonható, az az, hogy csak megismételt vizsgálatból lehet megbízhatóan következtetni a toxicitásra és bármilyen más kísérletesen vizsgált jelenségre vonatkozóan. A minél jobb ismételhetőség az egyik legfőbb kritériuma a toxikológiai teszteknek (Staveley és Wentsel 2016). Azonban az ökotoxikológiai cikkek többsége általában csak egy kísérlet eredményeit mutatja be. A kutatók nemcsak saját kísérleteiket nem ismétlik meg az eredmények robusztusságának tesztelése céljából, más kutatók is ritkán ismétlik meg a már közölt vizsgálatokat (Harris és Sumpter 2015; Staveley és Wentsel 2016). Ennek oka egyrészt, hogy sokszor nehéz egy másik kutatócsoport által végzett kísérletet megismételni a publikált adatok alapján (Harris et al. 2014). Továbbá az is jól ismert jelenség, hogy a már megjelent vizsgálatokat megismétlő kísérleteket kisebb valószínűséggel közlik le a tudományos folyóiratok, mint az „új” eredményeket tartalmazó cikkeket (Staveley és Wentsel 2016). Ez egy bonyolult kérdéskör, melyre néhány kutató megkísérelt megoldást találni (Klimisch et al. 1997; Ågerstrand et al. 2014; Harris et al. 2014), a mi vizsgálatunkból sajnos nem vonható le semmiféle következtetés erre vonatkozóan. Azonban a kísérletek megismétlését nem lenne szabad értelmetlen és a korábbi vizsgálatok eredetietlen másolásának tekinteni, hanem a tudományos munka nélkülözhetetlen részeként kellene értékelni és ennek megfelelően is kellene azt fogadni és támogatni (Open Science Collaboration 2015).

4.6. Glifozátalapú gyomirtó és ragadozók együttes hatása laboratóriumban és szabadföldi mezokozmoszokban

A laboratóriumi körülmények között végzett toxikológiai tesztek előnyei közé tartozik a hatékonyság, a nagyfokú precizitás, és hogy képesek kontrollálni a potenciálisan zavaró változókra (Versteeg et al. 1999; Chalcraft et al. 2005). Azonban a laboratóriumi tesztek alul- vagy túlbecsülhetik a xenobiotikumok kétéltűekre kifejtett hatásait (Boone és Bridges 2003a; Thompson et al. 2004; Egea-Serrano et al. 2012).

Az egyik módja, hogy teszteljük, hogy a laboratóriumi tesztek ökológiailag releváns eredményeket hoznak-e, ha összehasonlítjuk a peszticidek hatásait különböző kísérleti környezetek között (Skelly 2002). Meglepő módon kevés ilyen vizsgálat született, és azok is főleg a túlélésre koncentrálnak (Bernal et al. 2009a, 2009b; Johnson et al. 2013, de lásd Saura-Mas et al. 2002; Edge et al. 2013; Lanctôt et al. 2014). Ezért az általunk végzett kísérletben célunk a kétéltűeken végzett ökotoxikológiai tesztekénél alkalmazott vizsgálati környezetek eredményeket befolyásoló hatásainak vizsgálata volt. Kísérletünkben erdei béka ebihalak túlélését, viselkedését, testalakját és átalakuláskori testtömegét hasonlítottuk össze standard laboratóriumi és szabadföldi mezokozmosz körülmények között GC és ragadozószemiokemikália jelenlétében, illetve hiányában.

4.6.1. Módszerek

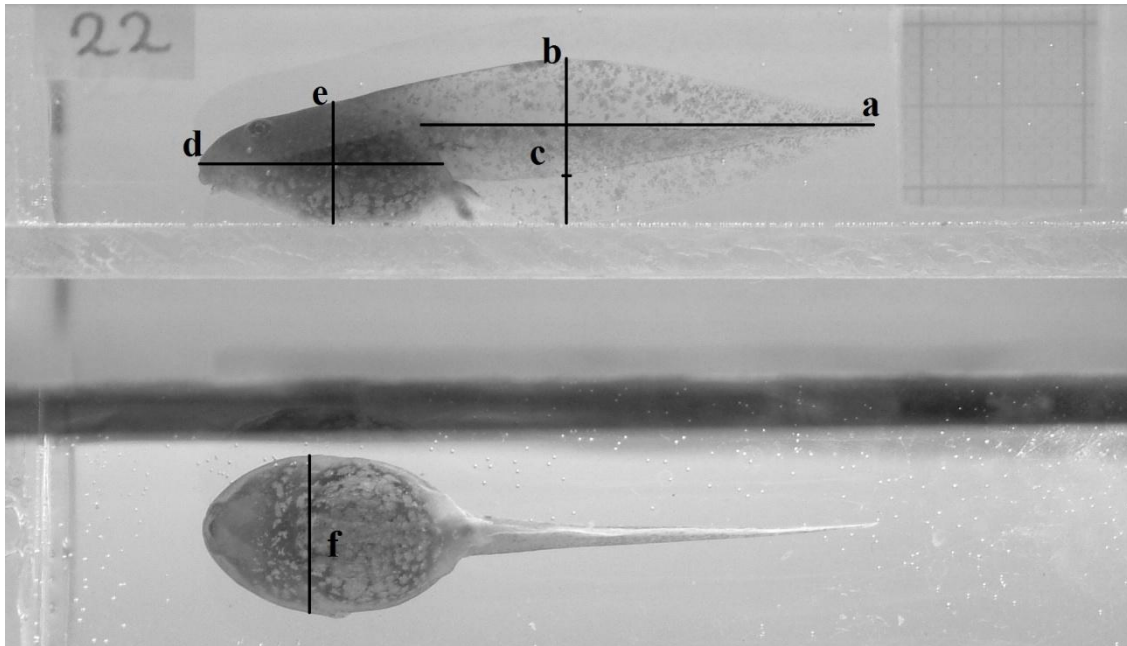
A kísérlethez 30 sebes acsa lárvát gyűjtöttünk be két tóból (47° 38' 41" É, 18° 36' 42" K, valamint 47° 44' 22" É, 19° 00' 42" K) és tíz frissen lerakott erdei béka petecsomót egy harmadikból (47° 44' 20" É, 19° 00' 43" K). A kísérlet kezdetéig az állatokat a 3.3. alfejezetben leírtak szerint tartottuk. A vizsgálat kezdetén az erdei béka családokat összekevertük, a kísérleti egységekbe ezt követően választottuk ki véletlenszerűen az egészségesnek tűnő ebihalakat.

A laboratóriumi kísérletben az állatokat egyesével, 2 literes dobozokban neveltük, 1,4 liter RSW-ben, 16°C-on, 12 : 12 órás fény : sötét ciklus mellett. Hogy megkapjuk a kívánt 0; 2 és 6,5 mg a.e./l-es glifozátkoncentrációkat, 0; 1,11 vagy 3,61 ml-nyi GC-t adtunk 200 liter RSW-hez, és ezzel cseréltük le az állatok vizét. A dobozokon háromnaponta cseréltünk vizet, megtartva a kiindulási GC-koncentrációkat. Vízcsere után az ebihalakat előfőzött, aprított spenóttal etettük, *ad libitum* mennyiségben. Minden kezelést 40 egyeddel ismételtük, így összesen 240 kísérleti egységünk volt. A ragadozókezeléshez használt 6 ragadozót egyesével, 3 literes dobozokban (2 liter RSW) tartottuk és kétnaponta 2-2 (összesen kb. 150 mg) naiv

erdei béka ebihallal etettük. A kezeléshez egyszerre három ragadozót tartalmazó dobozból származó vizet használtunk, amit összeöntöttük, és abból minden kezelést kapó kísérleti dobozba 13,5 ml-nyit öntöttünk. A beadott mennyiséget úgy számoltuk ki, hogy nagyjából megegyezzen a szabadföldi mezokozmoszokban lévő ragadozó-szemiokemikália mennyiségével (6,9 mg ragadozó-szemiokemikália/hét/l tartóvíz). A ragadozó-szemiokemikáliát nem kapó állatok azonos mennyiségű RSW-t kaptak.

A szabadföldi mezokozmosz kísérlethez a ládákat a 3.4.2. alfejezetben leírtak szerint állítottuk fel randomizált blokk elrendezésben. Az állatokat 16-osával tartottuk. A hatféle kezelést (2 ragadozó \times 3 GC) nyolcszor ismételtük, ami összesen 48 kísérleti egységet eredményezett. Hogy elérjük a laboratóriumival megegyező glifozátkoncentrációkat, a GC-ből 0; 0,361 és 1,174 ml-t öntöttünk a ládába egy nappal a kísérlet kezdete előtt. Hogy a természetes bomlás ellenére a kísérlet végéig fenntartsuk ezeket a koncentrációkat, a 28. napon a GC-vel kezelt dobozokba beöntöttük a kiinduláskor hozzáadott GC mennyiség felét. A mezokozmoszokban a ragadozók az ebihalakkal azonos víztérben helyezkedtek el, a ragadozókezelés részletes leírását a 3.4.2. alfejezet tartalmazza.

Mikor az ebihalak elérték a 36-os fejlődési állapotot (kint a kísérlet kezdetétől számított 21. napon; a laboratóriumban a kontrollcsoportnál a 39., a gyomirtóval kezelt csoportoknál az 53. napon), egy napon keresztül, összesen nyolc alkalommal (óránként) megfigyeltük a viselkedésüket. Feljegyeztük az aktív ebihalak számát és az állatok vízoszlopon belüli függőleges elhelyezkedését a szabadföldi mezokozmoszokban és a laboratóriumban. Kint felírtuk a látható ebihalak számát is, mivel itt az ebihalak el tudtak rejtőzni a levelek alá. Egy nappal a viselkedésvizsgálat után hálóval kifogtuk az ebihalakat a ládákból, 0,05 m/m% MS-222-vel (trikain metánszulfonát, Sigma-Aldrich) elaltattuk őket, megmértük a tömegüket, majd egyesével lefotóztuk őket későbbi morfológiai mérések céljából. Miután az ebihalak felébredtek az altatásból, visszahelyeztük őket az eredeti dobozaikba. A morfológiai méréseket (farokhossz, farokmagasság, farokizomszélesség, testhossz, testmagasság és testszélesség; 4.6.1. ábra) az ImageJ (National Institutes of Health, USA) nevű program segítségével végeztük el.



4.6.1. ábra. Az ebihalakon mért testalakváltozók: farokhossz (a), farokmagasság (b), farokizomszélesség (c), testhossz (d), testmagasság (e), testszélesség (f).

Mikor az ebihalak megközelítették az átalakulás kezdetét, naponta ellenőriztük a kísérleti dobozokat kint és bent. Ha egy egyed elérte a 42-es fejlettségi állapotot (melső lábak előbújása), feljegyeztük az átalakulásig eltelt időt, megmértük a tömegét, majd átraktuk egy 1,2 literes, átluggatott tetővel lezárt dobozba (a mezokozmoszokban nevelkedetteket is egyesével), melyekben 100 ml RSW volt. Hogy megakadályozzuk, hogy a kisbékák a vízbe füljanak, a dobozokat kissé megdöntöttük. Az átalakulás befejeztével az állatokat a gyűjtési helyen szabadon engedték.

Mivel korábbi vizsgálatok szerint a glifozátalapú gyomirtók a hőrétegződés mentén rétegződhetnek a vízben (Sudo et al. 2004; Ma et al. 2008), valamint a pH is jelentősen befolyásolhatja a hatását (Edginton et al. 2004b), ezt a két tényezőt is vizsgáltuk. A dobozokban a víz pH-ját két alkalommal (15. és 30. nap), kint hat ragadozó nélküli mezokozmoszban, három mélységben (kb. 5, 15 és 20 cm), a laboratóriumban nyolc ragadozókezelést nem kapó dobozban, két mélységben mértük Mettler Toledo MX300 X-mate^{Pro} segítségével. A GC rétegződésének vizsgálatához vízmintákat vettünk az előbb említett dobozokból és mélységekből. A laboratóriumban a magasabb koncentrációt tartalmazó dobozokból nem tudtunk mintát venni, mert a halálozás itt 100%-os volt és a mintavétel időpontjában az állatok már nem éltek. Az azonos alkalommal, azonos kezeléssel és mélységből származó mintákat összeöntöttük, és az így keletkező 16 db 1 literes mintát elemzésig műanyag flakonokban, sötétben, 2 °C-on tartottuk, hogy meggátoljuk a bomlást (Tomlin 2006). A mintákat hat héttel később elemezték a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági

Hivatal, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóságának miskolci Növényvédőszermaradék-analitikai laboratóriumában, folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (*liquid chromatography-mass spectrometry*; LC-MS) segítségével.

4.6.2. Statisztikai elemzés

A laboratóriumban a 6,5 mg a.e./l-es glifozátkoncentráción az összes ebihal elpusztult még a viselkedésvizsgálat előtt. Emiatt ezekről a kezelési csoportokról csak túlélési adatokat tudtunk gyűjteni, az átalakuláskori testtömeget, a fejlődési sebességet, a testalakot és az ebihalak viselkedését csak a 0 és 2 mg a.e./l-es glifozátkoncentrációval kezelt állatoknál tudtuk elemezni. Ezen kívül az elemzésből ki kellett zárunk két mezokozmoszt, mivel az etetésre használt ebihalak beszöktek a kísérleti ebihalak közé.

A túlélési adatok binomiális eloszlást mutattak a laboratóriumban (az egyesével tartott ebihalak elpusztultak vagy éltek), és kvázi-folytonos eloszlásúak voltak a mezokozmoszokban (az értékek 0 és 16 között változtak). Következésképp, hogy össze tudjuk hasonlítani a túlélési adatokat a két vizsgálati környezetben, azonos eloszlásúvá kellett tennünk ezeket. Emiatt a laboratóriumból származó adatokat összevontuk ún. pszeudo-blokkokba, ezután pedig közelítő túlélési arányokat számoltunk mind a kinti, mind a benti adatokból. A pszeudo-blokkok öt-öt szomszédos blokkból álltak, ahol közel azonosak voltak a környezeti viszonyok és a mikroklíma. Az elemzéshez GZLMM-et használtunk, Poisson eloszlással. Azért nem binomiális eloszlást alkalmazunk, mert így a modellilleszkedés jobbnak bizonyult. A modellben a túlélés volt a függő változó, a GC kezelés (0; 2 vagy 6,5 mg a.e./l glifozát), a ragadozókezelés (nincs vs. szitakötőlárva) és a vizsgálati környezet (labor vs. mezokozmosz), valamint ezek interakciói a független változók. A random faktor a laboratóriumi adatok esetében a pszeudo-blokk, a mezokozmoszokból származó adatoknál pedig a blokk volt. A kezelések hatásainak becslése *likelihood ratio* teszteken alapul.

Az átalakuláskori testtömeg elemzéséhez LMM-et használtunk, ahol a 42-es fejlődési állapotban mért testtömeg volt a függő változó, a GC kezelés (0 vagy 2 mg a.e./l glifozát), a ragadozókezelés és a vizsgálati környezet a független változók, a blokkba vagy pszeudo-blokkba ágyazott dobozazonosítók pedig a random faktor. Az átalakulásig eltelt idő elemzéséhez szintén hasonló pszeudo-blokkokat hoztunk létre a laboratóriumi adatokból: kiszámoltuk az átalakulásig eltelt napok számának mediánját minden kezeléskombinációra a pszeudo-blokkokon belül, és ezeket hasonlítottuk össze kezelések között, valamint a mezokozmoszokból származó mediánokkal. Itt is LMM-et használtunk, ahol az átalakulásig

eltelt napok számának mediánja volt a függő változó, a GC kezelés, a ragadozókezelés és a vizsgálati környezet a független változók, és a blokk a random faktor.

A testalakváltozók elemzésénél először lineáris regresszió-analízist végeztünk a testalakváltozókon és a négyzetgyök-transzformált testtömeg adatokon. Az így kapott modellreziduálisok dobozonkénti átlagát (a laboratóriumban az egy pszeudo-blokkban lévő, azonos kezeléshez tartozó állatok adatainak reziduálisait átlagoltuk) többváltozós általános lineáris modellel (*multivariate general linear models*, MGLM) elemeztük, ahol a GC kezelés, a ragadozókezelés, a vizsgálati környezet és a blokk voltak a független változók. 29 rendellenesen fejlődött állatot kizártunk az elemzésből (9 egyed a kontrollkezelésből; 17 egyed a nincs ragadozó + 2 mg glifozát kezelésből; 1 egyed a ragadozó + nincs glifozát kezelésből; 2 egyed a ragadozó + 2 mg glifozát kezelésből), mivel nem minden változót tudtunk lemérni a róluk készült fotókon, és az elemzés célja az egészségesnek tűnő ebihalak közti esetleges különbségek kimutatása volt.

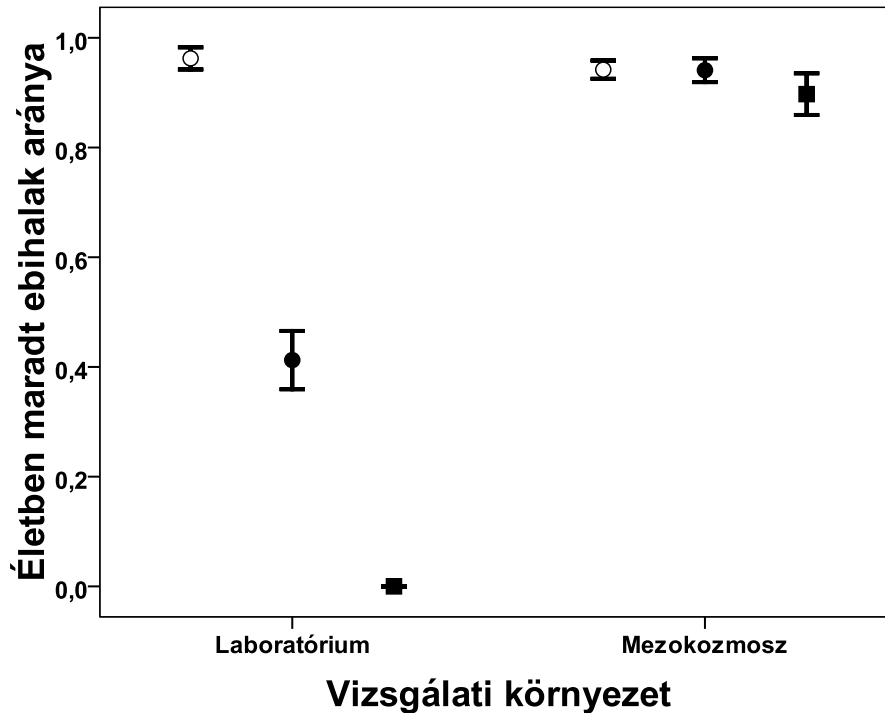
A viselkedés elemzéséhez minden kísérleti egységnél átlagoltuk a nyolc megfigyelésből származó adatokat, és a modellreziduálisok normalitásának növelése érdekében log-transzformáltuk őket. Ebben az esetben is MGLM-et használtunk, ahol az ebihalak aktivitása és a függőleges elhelyezkedés voltak a függő változók, a GC kezelés, a ragadozókezelés, a vizsgálati környezet és a blokk pedig a független változók.

A kettős interakciókat is tartalmazó kezdeti modellen *backward stepwise* modellegyszerűsítést hajtottunk végre. A kivett változókra vonatkozó statisztikákat ebben az esetben is a végső modellbe való egyenkénti visszahelyezéssel kaptuk meg. A túlélés elemzéséhez az R program (verzió: 2.15.2) 'lme4' csomagjának 'lmer' funkcióját használtuk. Minden más elemzéshez az IBM SPSS Statistics 20.0.3-as statisztikai programot használtuk.

4.6.3. Eredmények

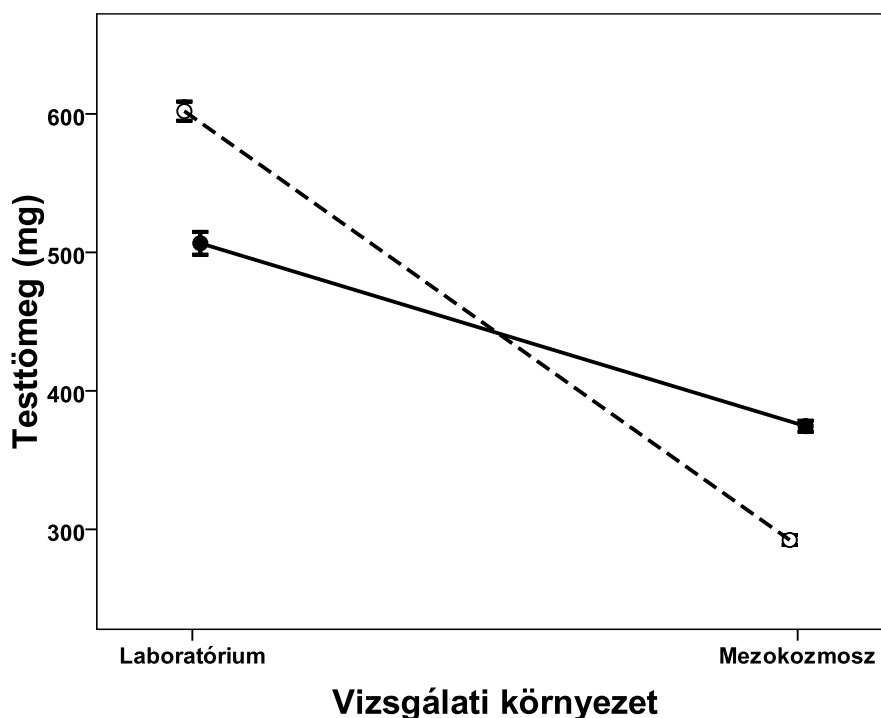
Az ebihalak túlélését szignifikánsan befolyásolta mind a GC kezelés, mind a vizsgálati környezet (GZLMM; GC: $\chi^2 = 64,84$; $P < 0,001$; környezet: $\chi^2 = 36,71$; $P < 0,001$), valamint a kettő közötti interakció is ($\chi^2 = 251,5$; $P < 0,001$). A GC jelenléte nagymértékben csökkentette az ebihalak túlélését a laboratóriumban, azonban a kinti mezokozmoszokban szinte elhanyagolható volt ez a hatás (laboratórium: $\chi^2 = 214,61$; $P < 0,001$; szabadföldi mezokozmosz: $\chi^2 = 0,18$; $P = 0,91$; a két kísérleti környezetből származó adatokon végzett különálló elemzések alapján; 4.6.2. ábra). A ragadozó jelenléte nem volt hatással a túlélésre sem önmagában ($\chi^2 < 0,001$; $P = 0,98$), sem pedig a GC-vel vagy a környezettel interakcióban

(ragadozó × GC: $\chi^2 = 0,77$; $P = 0,86$; ragadozó × környezet: $\chi^2 = 0,12$; $P = 0,94$; 4.6.1. táblázat).



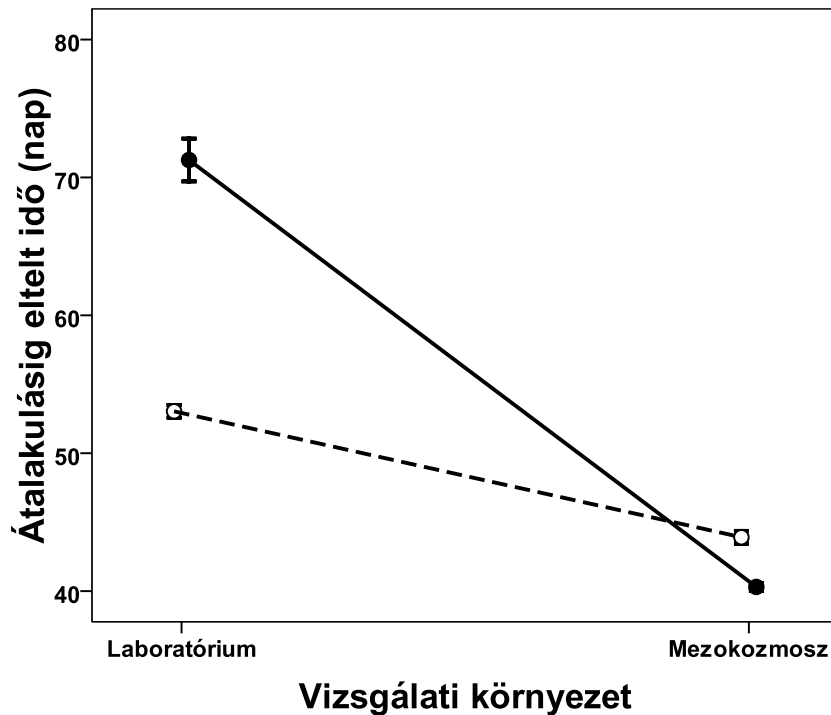
4.6.2. ábra. Az ebihalak túlélése a laboratóriumban és a szabadföldi mezőközmoszokban 0 (○), 2 (●) és 6,5 mg a.e./l-es (■) glifozátkoncentráción (az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

Az átalakuláskori testtömeg nagyobb volt a laboratóriumban, mint a szabadföldi mezőközmoszokban (LMM; $F_{1;168,5} = 939,84$; $P < 0,001$; 4.6.3. ábra). A GC kezelés hatása önmagában nem volt szignifikáns ($F_{1;168,5} = 0,66$; $P = 0,42$), de a vizsgálati környezettel interakcióban befolyásolta a testtömeget ($F_{1;168} = 156,37$; $P < 0,001$). A GC-nek kitett ebihalak tömege a laboratóriumban 15,23%-kal csökkent, míg a szabadföldi mezőközmoszokban 28,12%-kal nőtt (4.6.3. ábra). A testtömeg 2,68%-kal nagyobb volt ragadozók jelenlétében ($F_{1;65,7} = 9,52$; $P = 0,003$), azonban a ragadozókezelést tartalmazó interakciók nem voltak szignifikánsak (ragadozó × környezet: $F_{1;141} = 0,002$; $P = 0,97$; ragadozó × GC: $F_{1;62,2} = 1,85$; $P = 0,18$; 4.6.1. táblázat).



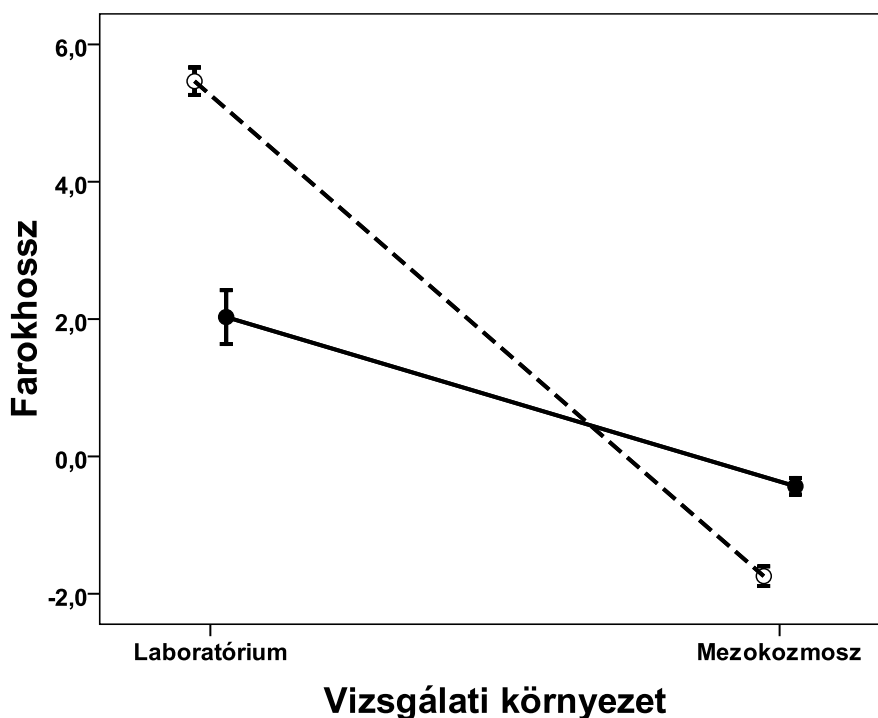
4.6.3. ábra. Az egyedek átalakuláskori testtömege a laboratóriumban és a szabadföldi mezőkozmoszokban 0 (○) és 2 mg a.e./l-es (●) glifozátkoncentráción (az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

Az átalakulásig eltelt idő hosszabb volt a laboratóriumban, mint a szabadföldi mezőkozmoszokban, és a GC jelenléte önmagában is szignifikánsan befolyásolta a fejlődés hosszát (környezet: $F_{1;14,1} = 178,2$; $P < 0,001$; GC: $F_{1;44,4} = 107,9$; $P < 0,001$; 4.6.4. ábra). Emellett a vizsgálati környezet és a GC kezelések közti interakció is szignifikáns volt: a GC-nek kitett ebihalak 7,26%-kal hamarabb érték el a 42-es fejlettségi állapotot a mezőkozmoszokban a kontrollhoz képest, a laboratóriumban viszont a fejlődésük 30,82%-kal lassabb volt ($F_{1;44,4} = 224$; $P < 0,001$). A ragadozó jelenléte 3%-kal csökkentette a fejlődési idő hosszát ($F_{1;44,2} = 6,88$; $P = 0,012$), ugyanakkor a ragadozókezeléseket tartalmazó interakciók itt sem voltak szignifikánsak (ragadozó \times környezet: $F_{1;43,2} = 2,76$; $P = 0,104$; ragadozó \times GC: $F_{1;43,5} = 1,62$; $P = 0,21$; 4.6.1. táblázat).



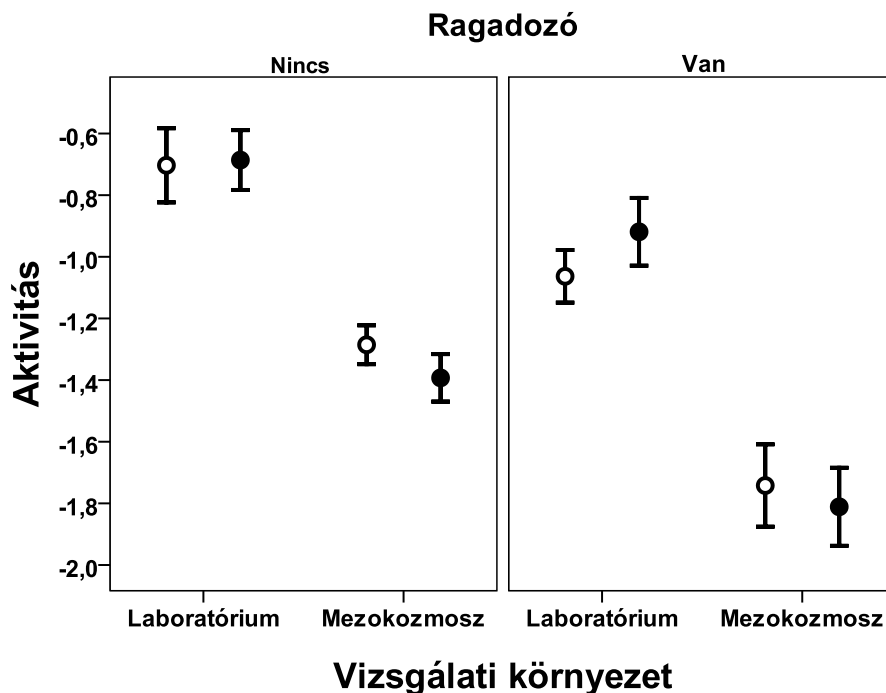
4.6.4. ábra. Az átalakulásig eltelt idő a laboratóriumban és a szabadföldi mezőkozmoszokban 0 (○) és 2 mg a.e./l-es (●) glifozátkoncentráción (az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

Az ebihalak testalakját szignifikánsan befolyásolta a GC kezelés (MGLM; GC: Wilk's $\lambda = 0,64$; $F_{6;53} = 4,91$; $P < 0,001$) és a vizsgálati környezet (Wilk's $\lambda = 0,03$, $F_{6;53} = 257,66$; $P < 0,001$), valamint e két változó közötti interakció (Wilk's $\lambda = 0,21$; $F_{6;53} = 33,93$; $P < 0,001$; 4.6.5. ábra). A ragadozó jelenléte szintén hatással volt az ebihalak testalakjára (Wilk's $\lambda = 0,12$; $F_{6;53} = 64,75$; $P < 0,001$), de ez a hatás különbözött a vizsgálati környezetek között (ragadozó \times környezet: Wilk's $\lambda = 0,76$; $F_{6;53} = 2,84$; $P = 0,018$). A GC és a ragadozó jelenlét közötti interakció nem volt szignifikáns (Wilk's $\lambda = 0,94$; $F_{6;52} = 0,55$; $P = 0,77$; 4.6.1. táblázat), és a testalak nem különbözött szignifikánsan a blokkok között (Wilk's $\lambda = 0,17$; $F_{84;223,8} = 1$; $P = 0,48$). (Az egyváltozós elemzések eredményeit lásd a Függelékben)



4.6.5. ábra. Az ebihalak farokhossza a laboratóriumban és a szabadföldi mezokozmoszokban 0 (○) és 2 mg a.e./l-es (●) glifozátkoncentráción. Az ábrán a testtömegre korrigált farokhossz látszik (az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

Az ebihalak viselkedése függött a vizsgálati környezettől és a ragadozókezeléstől, azonban a GC önmagában nem befolyásolta szignifikánsan az állatokat (környezet: Wilk's $\lambda = 0,23$; $F_{2;46} = 77,74$; $P < 0,001$; ragadozó: Wilk's $\lambda = 0,69$; $F_{2;46} = 10,17$; $P < 0,001$; GC: Wilk's $\lambda = 0,92$; $F_{2;46} = 2,15$; $P = 0,13$). A vizsgálati környezet és a GC, valamint a vizsgálati környezet és a ragadozókezelések közötti interakciók szignifikánsak voltak (környezet \times GC: Wilk's $\lambda = 0,86$; $F_{2;46} = 3,9$; $P = 0,027$; környezet \times ragadozó: Wilk's $\lambda = 0,87$; $F_{2;46} = 3,56$; $P = 0,036$; 4.6.1. táblázat, 4.6.6. ábra). Az ebihalak viselkedése nem különbözött a blokkok között, és a GC- és ragadozókezelés közötti interakció sem volt szignifikáns (blokk: Wilk's $\lambda = 0,51$; $F_{28;64} = 0,92$; $P = 0,58$; ragadozó \times GC: Wilk's $\lambda = 0,94$; $F_{2;45} = 1,37$; $P = 0,26$). (Az egyváltozós elemzések eredményeit lásd a Függelékben)



4.6.6. ábra. Az ebihalak aktivitása szitakötőlárva hiányában illetve jelenlétében a két vizsgálati környezetben 0 (○) és 2 mg a.e./l-es (●) glifozát koncentráción. Az adatok log-transzformáltak (az ábrán átlagok és a hozzájuk tartozó standard hibák szerepelnek).

4.6.1. táblázat. Az ebihalak életmenet-változóin végzett elemzések összefoglaló táblázata (*P*-értékek feltüntetve).

	Környezet	GC	Ragadozó	Környezet × GC	Környezet × Ragadozó	GC × Ragadozó
Túlélés	< 0,001	< 0,001	N.S.	< 0,001	N.S.	N.S.
Átalakuláskori testtömeg	< 0,001	N.S.	0,003	< 0,001	N.S.	N.S.
Testalak	< 0,001	< 0,001	0,003	< 0,001	0,018	N.S.
Átalakulásig eltelt idő	< 0,001	< 0,001	0,012	< 0,001	N.S.	N.S.
Viselkedés	< 0,001	N.S.	< 0,001	0,027	0,036	N.S.

A vízhőmérséklet a kísérlet alatt 13,7 °C és 17,2 °C között ingadozott a laboratóriumban, és 12,7 °C és 27,2 °C között a mezoközösségekben. A víz pH-ja 7,59 és 8,28 között változott a mezoközösségekben, és 7,05 és 7,54 között a laboratóriumban, a GC kezeléstől függetlenül. A vízminták kémiai elemzése nem mutatott konzisztens glifozát koncentráció rétegződést a mélység függvényében sem a mezoközösségekben, sem a laboratóriumban, azonban a koncentráció lecsökkent a beadás után, aminek pontos okát nem ismerjük (4.6.2. táblázat).

4.6.2. táblázat. A két mintavételi alkalommal (15. és 30. nap) vett vízmintákból meghatározott glifozátkoncentrációk (mg a.e./l) a laboratóriumban és a szabadföldi mezokozmoszokban.

	Laboratórium		Mezokozmosz
Nominális koncentráció	2	2	6,5
Első mintavétel:			
Alsó 5 cm	2,44	0,98	3,81
Vízoszlop közepe (kb. 15 cm)	-	0,90	3,79
Felső 5 cm	1,02	2,55	3,69
Második mintavétel:			
Alsó 5 cm	1,09	1,99	5,11
Vízoszlop közepe (kb. 15 cm)	-	0,99	4,57
Felső 5 cm	1,08	2,00	4,66

4.6.4. Értékelés

Az ebihalak összes általunk vizsgált életmenet-változója különbözött a laboratóriumi és a mezokozmosz kísérletben. Az állatoknak a laboratóriumban alacsonyabb volt a túlélési rátájuk, nagyobb volt a testtömegük és lassabban fejlődtek. De ami még fontosabb, hogy úgy tűnik a vizsgált glifozátalapú gyomirtónak eltérő irányú hatásai voltak a vizsgálati környezettől függően. A laboratóriumban a gyomirtó jelenléte negatívan hatott a túlélésre, csökkentette az átalakuláskori testtömeget és növelte az átalakulásig eltelt időt, míg a mezokozmoszokban nem volt hatással a túlélésre, viszont növelte az átalakuláskori testtömeget és csökkentette az átalakulásig eltelt időt. A gyomirtó testalakra és viselkedésre kifejtett hatása szintén ellentétes volt a két vizsgálati környezetnél.

A korábbi vizsgálatok, melyek a xenobiotikumok ökotoxikológiai hatásait hasonlították össze különböző vizsgálati környezetekben, ellentmondásos eredményeket kaptak (Saura-Mas et al. 2002; Bernal et al. 2009a, 2009b; Edge et al. 2013; Johnson et al. 2013). A laboratóriumi kísérleteknek megvan az az előnyük, hogy az ott lévő környezeti tényezőket általában egyszerűbb standardizálni, nagy mintaszám érhető el, és a kísérleti kezelések magas precizitással állíthatók be. Ezzel ellentétben a szabadföldi mezokozmoszok jobban tükrözhetik a természetes körülményeket, mint például az ingadozó hőmérsékletet, a limitáló táplálékmennyiséget, a széles táplálékspektrumot, és az indirekt közösszabályozó hatások jelenlétét (Relyea és Hoverman 2006, 2008; Winkler és Van Buskirk 2012). Az ökológiai vonatkozású mezokozmosz kísérletek eredményei gyakran eltérnek a laboratóriumban kapottaktól (Skelly és Kiesecker 2001; Skelly 2002; Winkler és Van Buskirk 2012). Az eltérések oka lehet, hogy a vizsgálatot nem ugyanazon a fajon végzik, vagy az egyedek nem egy populációból származnak (Bridges és Semlitsch 2000), hogy a táplálék elérhetősége nem azonos, interspecifikus versengés lép fel (Bridges és Semlitsch 2000; Boone és Semlitsch

2001; Skelly és Kiesecker 2001), hogy a gyomirtó különböző mértékű foto- és biodegradáció megy keresztül (Feng et al. 1990), vagy rétegződik (Sudo et al. 2004), esetleg az aljzaton megkötődik vagy semlegesítődik (Katagi 2006). Akárhogy is, ha a laboratóriumban és a mezokozmoszokban végzett kísérletek ennyire eltérő eredményeket adnak, mint ebben a vizsgálatban is, felmerül a kérdés, hogy a standard laboratóriumi tesztek vajon mindig helyesen becslik-e a természetben várt hatásokat (Boone és James 2005).

A laboratóriumban megfigyelt megnövekedett mortalitás összhangban van a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Bernal et al. 2009a, 2009b; Relyea 2012, de lásd Relyea 2005a, 2005c; Jones et al. 2010, 2011). A glifozát jól kötődik a lebegő és kitapadt üledékhez (Giesy et al. 2000; Relyea 2005c), bizonyos mikroorganizmusok is képesek lebontani (Feng et al. 1990; Goldsborough és Brown 1993; Giesy et al. 2000; Wang et al. 2005; Katagi 2006), valamint a növények is megköthetik (Gottrup et al. 1976). Ezek a tényezők mind hozzájárulhattak a kint tapasztalt koncentráció-csökkenéshez. Továbbá, a legnagyobb pusztulást a laboratóriumban az első három napban figyeltük meg, ami egy olyan időintervallum, ahol már elképzelhető a gyomirtó adszorpciója, ami megakadályozhatta hasonló jelenség kialakulását a mezokozmoszokban. Ezen kívül a gyomirtó feltételezett rétegződése miatt létrejöhetnek alacsonyabb koncentrációjú részek a viszonylag nagy kinti ládáknak, viszont a laboratóriumban használt kis dobozokban ennek kicsi a valószínűsége (Relyea 2012). Ezt a magyarázatot cáfolja az általunk gyűjtött vízminták elemzésének eredménye. Mindazonáltal a kisebb stressz, amit a természeteshez közelebbi körülmények okozhattak, szintén hozzájárulhatott az alacsonyabb mortalitáshoz a szabadföldi mezokozmoszokban, míg a magasabb koncentráción megfigyelt tömeges pusztulás a laboratóriumban részben a gyomirtó hatásához hozzáadódó környezet indukálta stressznek is tulajdonítható (Sih et al. 2004; Relyea 2005b).

A metamorfok nagyobbak voltak bent, mint kint, ami valószínűleg az eltérő kompetíciós és táplálék hozzáférhetőségi viszonyoknak volt köszönhető a kétféle vizsgálati környezetben. A laboratóriumban az egyesével tartott állatokat *ad libitum* etettük, míg a mezokozmoszokban az ebihalak csoportosan voltak tartva és kívülről nem kaptak táplálékot, ami egy idő után limitálónak válhatott. Azonban még lényegesebb, hogy a gyomirtó eltérő módon befolyásolta a testtömeget a két vizsgálati környezetben. Feltételeztük, hogy a GC-vel kezelt csoportnál csökkenni fog a tömeg mindkét vizsgálati környezetben, a káros fiziológiai hatások és a detoxifikáció megnövekedett költségei miatt (Relyea 2004a; Cauble és Wagner 2005). A laboratóriumban valóban megjelent ez a negatív hatás, meglepő módon azonban a szabadföldi mezokozmoszokban a gyomirtó pozitívan befolyásolta a testtömeget (Jones et al. 2011).

Mivel a mezokozmoszokban a mortalitásra nem hatott a gyomirtó jelenléte, nem volt denzitásbeli csökkenés, ami magyarázná a vizsgálatban megfigyelt mintázatot. Lehetséges viszont, hogy a gyomirtónak környezetfüggő direkt vagy indirekt pozitív hatása van az ebihalak növekedésére. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a glifozátalapú gyomirtók pozitívan hathatnak a perifiton növekedésére (Relyea 2005a; Jones et al. 2011), ami az ebihalak elsődleges táplálékforrása (Duellman és Trueb 1994; Alford 2000), így a megnövekedett táplálékmennyiség nagyobb testtömeghez vezethetett a gyomirtóval kezelt mezokozmoszokban. Ugyancsak elképzelhető, hogy a gyomirtó csökkentette az egysejtű *Prototheca* algák számát, ami farkatlan kétéltű lárváknál gátolja a növekedést (Griffiths et al. 1993). A glifozátalapú gyomirtó növekedésre gyakorolt pozitív hatásának hátterében meghúzódó mechanizmusok igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

A kétféle környezetben megjelenő fejlődési különbségek valószínűleg a laborban adott *ad libitum* táplálékmennyiség és a szabadföldi mezokozmoszokban kialakult forráskompetíció következményei. A környezetek közötti hőmérséklet-különbség szintén hozzájárulhatott a laboratóriumban mért lassabb fejlődési sebességhez, mivel ott átlagosan alacsonyabb volt a hőmérséklet. Ugyanakkor, míg a gyomirtó lassította a fejlődést a laboratóriumban, addig felgyorsította azt a szabadföldi mezokozmoszokban. A Wilbur-Collins modell (Wilbur és Collins 1973) és későbbi módosításai (Hensley 1993; Harris 2000) azt jósolják, hogy kedvező körülmények között az ebihalak fejlődése lelassul, így az állatok nagyobb átalakuláskori testtömeget érhetnek el. A túlélés és a testtömeg adatokat tekintve, alacsony koncentrációban, a laboratóriumban a gyomirtó károsan hatott az ebihalakra és a mezokozmoszokban sem járt előnnyel az állatok számára. Emiatt az eredményeink nincsenek összhangban az elméleti feltételezéssel: a laboratóriumban nem gyorsult fel az ebihalak fejlődése a gyomirtóval kezelt csoportnál, ellenben a szabadföldi mezokozmoszokban igen. Feltételezzük, hogy a laboratóriumban a gyomirtóval kezelt csoportoknál megjelentek fiziológiai kényszerek vagy detoxifikációval járó költségek, amikhez hozzáadódott a természetestől nagyon különböző laborkörülményekből fakadó stressz (pl. napfény hiánya, fajtársak és térbeli heterogenitás hiánya, viszonylag alacsony és állandó hőmérséklet), és ez vezetett a lassabb fejlődéshez (Relyea 2004a; Cauble és Wagner 2005). Mindazonáltal annak okát, ami a mezokozmoszban nevelkedett, gyomirtóval kezelt ebihalaknál a gyorsabb fejlődést eredményezte, nem ismerjük.

Kísérletünkben a gyomirtó morfológiai változásokat is okozott az ebihalaknál. Relyea (2012) volt az első, aki leírta ezt a jelenséget lárvális kétéltűeknél. Egy szabadföldi mezokozmosz kísérletben megfigyelte, hogy a glifozátalapú gyomirtóval (Roundup Original®

MAX) kezelt ebihalak hasonló módon változtatták meg a testalakjukat, mint ragadozó jelenlétében. Eredményeink alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, miszerint a glifozátalapú gyomirtók képesek befolyásolni az ebihalak testalakját, azonban a legtöbb morfológiai változás ellentétes irányú volt a laboratóriumban és a mezokozmoszokban. Továbbá, a farokhossz és a testszélesség a gyomirtó hatására ugyanolyan irányban változott, mint ragadozó jelenlétében, míg a többi mért testalakváltozó nem. A gyomirtó jelenlétére adott morfológiai válaszok háttérben álló okok egyelőre nem ismertek, de lehetséges, hogy ugyanazok a stresszhormonok érintettek, mint ragadozó jelenlétében (Glennemeier és Denver 2002; Middlemis Maher et al. 2013). Az, hogy a testalak különbözik a laboratóriumban és a mezokozmoszokban nevelt ebihalak között, megegyezik a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Winkler és Van Buskirk 2012), de kísérletünk nem teszi lehetővé, hogy messzemenő következtetéseket vonjunk le ezzel kapcsolatban.

Az ebihalak viselkedése is eltért a vizsgálati környezetek és a ragadozókezelések között, ráadásul a gyomirtó jelenléte módosította ezeket a válaszokat. Az ebihalak kevésbé voltak aktívak a mezokozmoszban, mint a laboratóriumban, és kint az állatok főleg az aljzat közelében tartózkodtak. A ragadozó jelenléte mindkét vizsgálati környezetben hasonló módon csökkentette az aktivitást, de az ebihalak függőleges elhelyezkedésére csak a laboratóriumban hatott, mivel a mezokozmoszokban az ebihalak az összes kezelésnél a vízszlop alsó felében mozogtak. A gyomirtónak környezetfüggő hatása volt a mért viselkedési változókra: jelenlétében az ebihalak aktívabbak voltak és a dobozok aljára húzódtak a laboratóriumban, míg a mezokozmoszoknál pont fordítva. Wojtaszek és munkatársai (2004) glifozátalapú gyomirtó (Vision[®]) hatását nézték ebihalak viselkedésére, és megfigyelték, hogy az ebihalak időlegesen lebénultak és abnormális ragadozóelkerülő viselkedést mutattak a gyomirtó alacsony koncentrációjának beadása utáni órákban. Vizsgálatunkban nem volt lehetőség ilyen rövidtávú válaszok megfigyelésére, hiszen mi krónikus viselkedésváltozásokkal foglalkoztunk.

Összességében, vizsgálatunk a korábbiaknál teljesebb képet ad a vizsgált glifozátalapú gyomirtó és a vizsgálati környezet-típusok interakciós hatásairól erdei béka ebihalak és metamorfok számos életmenet változójára. Meglepő módon nemcsak a hatások nagysága, hanem azok iránya is nagymértékben függött a kísérleti környezettől. Míg a gyomirtó túlélésre kifejtett negatív hatását a laboratóriumban, vagy annak hiányát a szabadföldi mezokozmoszokban számos tényezővel lehet magyarázni, az átalakulásig eltelt idő, a testtömeg, a testalak és a viselkedés eltérő irányú változásainak okait nem ismerjük. Mindazonáltal a laboratóriumi és a kinti eredmények közötti markáns különbségek azt

sugallják, hogy kételtűeknél a standard laboratóriumi ökotoxikológiai vizsgálatok nem minden esetben becslik pontosan a természetes környezetben megjelenő populációs vagy közösségi hatásokat. Sajnos mivel nagyon kevés hasonló vizsgálat született eddig, nem lehet megállapítani mennyire általános ez a jelenség. Továbbá, azt sem lehet egyelőre pontosan meghatározni, hogy milyen kérdések milyen vizsgálati környezetet igényelnek, és hogy a környezeti tényezők mely tulajdonságai növelik leginkább az eredmények precizitását. Következésképp, további vizsgálatok szükségesek, és, mint annyi más ökológiai vizsgálat esetén, az ökotoxikológiai tesztek esetében is mérlegelnünk kell, hogy melyik kísérleti környezet a legmegfelelőbb kérdéseink megválaszolására, és meg kell vizsgálni a teszt alkalmazhatóságát és eredményeik általánosíthatóságát (Joron és Brakefield 2003; Bezemer és Mills 2003; Winkler és Van Buskirk 2012).

5. Összefoglaló következtetések

A fent bemutatott vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a vizsgált glifozátalapú gyomirtó károsan hathat az erdei béka és a barna varangy ebihalak túlélésére, testtömegére és fejlődési sebességére, valamint erdei békánál képes befolyásolni az állatok viselkedését és testalakját is (hasonló eredményekért lásd Howe et al. 2004; Relyea 2004a; Mann et al. 2009; Relyea és Jones 2009; Relyea 2011).

Kimutattuk, hogy a kétéltűlárvák gyomirtóval szembeni érzékenysége erősen korfüggő, így kétéltűeknél az ökotoxikológiai kísérletekben használt állatok korának figyelembevétele elengedhetetlen, hiszen nagymértékben befolyásolhatja az eredményeket (Howe et al. 2004; Edginton et al. 2004b; Jones et al. 2010). A fiatalabb barna varangy ebihalak minden mért életmenet-tulajdonságára nagyobb hatással volt a GC, mint idősebb társaikéira, és minél későbbi fejlődési állapotban találtak először az ebihalak a szerrel, az annál kevésbé hatott rájuk. Továbbá, azok az ebihalak, amik hosszán ki voltak téve a GC-nek, lassabban fejlődtek, mint azok, amelyek csak a fejlődésük kezdetén lettek kezelve. A túlélés és a testtömeg tekintetében ugyanakkor nem találtunk ehhez hasonló különbséget a kezelés időtartamának függvényében. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a kétéltűek védelme szempontjából fontos lenne, ha a gyomirtók kijuttatása az ebihal-fejlődés kezdeti állapotai után történne, hiszen úgy az ebihalak nemcsak rövidebb ideig lennének kitéve a szer káros hatásainak, de a kezdeti érzékeny időszakban sem találkozoznának a gyomirtóval.

Ezzel szemben az ebihalak általunk vizsgált ragadozói ellenállónak bizonyultak a GC-vel szemben, hiszen vizsgálatukkor nem találtunk szignifikáns hatásokat sem a túlélés, sem a testtömeg, sem pedig a viselkedés tekintetében. Ez összhangban áll a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Relyea et al. 2005; Rohr és Crumrine 2005; Tollett et al. 2009; Relyea és Edwards 2010; Wagner és Lötters 2013), és arra enged következtetni, hogy a sebes acsa lárvája és a pettyes göte a glifozátalapú gyomirtóval szennyezett vízben is képes betölteni ökológiai szerepét. Azonban kísérleteink viszonylag rövid ideig tartottak, emiatt további vizsgálatok szükségesek, hogy megbecsülhessük a gyomirtó ragadozókra kifejtett hosszútávú hatásait.

A GC hasonló módon változtatta meg az ebihalak viselkedését és testalakját, mint amit bizonyos ragadozók jelenlétében figyelhetünk meg. Ez a hasonlóság közös élettani háttérre utalhat, és elképzelhető, hogy ugyanazon általános stresszreakció különböző

megnyilvánulásai (Middlemis Maher et al. 2013). Mivel azonban az élettani háttérmechanizmus nem ismert, további vizsgálatok szükségesek a jelenség értelmezéséhez.

Azt is sikerült igazolnunk, hogy a GC toxicitását nagyrészt a felületaktív anyag okozza (hasonló eredményekért lásd Howe et al. 2004; Moore et al. 2012; Lanctôt et al. 2014), ráadásul a glifozát és a POEA egymást erősítő hatását is sikerült kimutatnunk, amit kételtűeknél korábban nem írtak le.

Ezen kívül további fontos kísérletbefolyásoló tényező lehet a használt kísérleti elrendezés, sőt maga a vizsgálati környezet is. Eredményeink szerint az erdei békák GC-re mutatott érzékenysége különbözött a laboratóriumban végzett kísérletek között, míg barna varangynál a kapott LC₅₀ értékek közel azonosak voltak. Ez rávilágít arra, hogy a kételtűfajok különböző populációinak peszticidérzékenysége nagymértékben különbözhet egymástól (Semlitsch et al. 2000; Cothran et al. 2013). A vizsgálati környezet szintén nagyban befolyásolta eredményeinket: a GC ellentétes irányú hatást fejtett ki az ebihalak testtömegére, fejlődési sebességére és testalakjára a kétféle vizsgálati környezetben, valamint a szabadban végzett mezokozmosz kísérletben a gyomirtó sokkal kevésbé volt letális, mint a laboratóriumban. Emellett a két vizsgálati környezetben kapott eredmények összehasonlítása arra utal, hogy a standard laboratóriumi körülmények között végzett tesztek eredményei eltérhetnek a valóságos, vagy azt közelítő körülmények között végzett kísérletek eredményeitől. Mivel azonban nem sok hasonló vizsgálat áll rendelkezésünkre (Saura-Mas et al. 2002; Bernal et al. 2009a, 2009b; Edge et al. 2013; Johnson et al. 2013), további vizsgálatok szükségesek, hogy meghatározzassuk, hogy a jelenség mennyire általános érvényű, és hogy melyek azok a környezeti tényezők, amik leginkább befolyásolják a kísérletek kimenetelét.

A jelen értekezésben bemutatott vizsgálatokban több aspektusból vizsgáltuk a glifozátalapú gyomirtók lárvális kételtűekre kifejtett hatásait, valamint az ezen hatásokat befolyásoló tényezőket. Eredményeink számos vizsgált kérdésünkre választ adtak, ugyanakkor vizsgálataink azt is egyértelművé tették, hogy a vizsgált glifozátalapú gyomirtó ebihalakra gyakorolt hatásai sokszor a várakozásokkal ellentétesek és igen összetettek is lehetnek, ugyanakkor külső és belső tényezők egyaránt nagymértékben módosíthatják ezeket. Mivel vizsgálataink az ökotoxikológia területére esnek, kísérleteinkben alapvetően az emberi eredetű, környezetbe kikerülő vegyületek élőlényekre gyakorolt közvetlen vagy közvetett, rövid- és középtávú mérgező hatásait vizsgáltuk, de emellett igyekeztünk mindig valami új, az általános ökológia számára is releváns és érdekes kérdést is beleszőni a tesztekbe. Ily módon bízunk benne, hogy nemcsak az ökotoxikológia szűkebb tudományterületén alkotók számára

szolgálhatunk hasznos információkkal, hanem más kutatók is találnak benne számukra értékes és használható részeket.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hettyey Attilának, aki az elmúlt évek során végig támogatott, és segítette szakmai fejlődésemet. A tudományterület iránti elhivatottsága és lelkesedése példaértékű, remélem egyszer én is ilyen kiváló kutatóvá válhatok.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Török Jánosnak, volt témavezetőmnek, akire mindig számíthattam, bármilyen ügyes-bajos dologgal is fordultam hozzá segítségért.

Köszönet jár Bókony Veronikának a statisztikai kérdésekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és Josh Van Buskirknek a kísérletek tervezésekor adott hasznos tanácsaiért és ötleteiért. Köszönöm szakdolgozóinknak, Holly Dórának, Ujszegi Jánosnak és Gál Zoltánnak, valamint a Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport többi jelenlegi és volt tagjainak a terepi gyűjtések és a kísérletek alatt nyújtott rengeteg segítséget.

Köszönet asszisztenseinknek, Sendula Tímeának, Széplaki Szilviának, Wizl Virágnak, Horváth Henriknek, Jókai Leventének, Katona Patriknak, Koska Dánielnek, Nagy Gergelynek, Pillió Zsoltnak és Szederkényi Márknak, akik nélkül a kísérletek nem valósulhattak volna meg.

Köszönöm Urszán Tamás Jánosnak a disszertációval kapcsolatos hasznos tanácsokat és észrevételeket. Hálával tartozom szüleimnek, testvéremnek, Nikolettának, és barátaimnak a rengeteg biztatásért és támogatásért.

Köszönöm a Közép-Duna-völgyi Környezetvédelmi és Természetvédelmi Felügyelőségnek (2015 áprilisától Pest Megyei Kormányhivatal), az Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságnak és az MTA ATK NÖVI Etikai Bizottságának, hogy kutatásaimhoz megadták az engedélyeket (KTVF: 10350–2/2012, KTVF: 5192-7/2013, KTF: 603-3/2014, KTF: 603-4/2014, PE/KTF/3596-6/2016, PE/KTF/3596-7/2016, PE/KTF/3596-8/2016). Köszönöm a Pilisi Parkerdő Zrt. munkatársainak, hogy hozzájárultak erdészeti útjaik használatához.

A dolgozatban tárgyalt kutatásokat a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programja (MTA, LP2012-24/2012), a Magyar Tudományos Akadémia FiKut Programja (Mv-59/2013) és egy FP7 Marie Curie Career Integration Grant (PCIG13-GA-2013-631722) támogatta.

7. Irodalomjegyzék

- Aceto A, Dragani B, Sacchetta P, Bucciarelli T, Angelucci S, Miranda M, Poma A, Amicarelli F, Federici G, di Ilio C. 1993. Developmental aspects of *Bufo bufo* embryo glutathione transferases. *Mechanisms of Ageing and Development* **68**: 59–70.
- ADAMA Hungary. 2016. Glyphogan Classic. Available from <http://www.adama.com/magyarorszag/hu/products/herbicides/glyphogan-classic.html> (Letöltés időpontja: 2018. február 28.).
- Adams WJ, Rowland CD. 2003. Aquatic toxicology test methods. In: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. J. Burton, and J. J. Cairns (eds.) *Handbook of ecotoxicology*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, pp: 19–43.
- Ågerstrand M, Küster A, Bachmann J, Breitholtz M, Ebert I, Rechenberg B, Ruden C. 2011. Reporting and evaluation criteria as means towards a transparent use of ecotoxicity data for environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental Pollution* **159**: 2487–2492.
- Alford RA. 2000. Ecology: Resource use, competition, and predation. In: R. W. McDiarmid and R. Altig (eds.) *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, Chicago, pp: 240–278.
- Alford RA. 2010. Declines and the global status of amphibians. In: D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, and S. K. Krest (eds.) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis; SETAC, Boca Raton, Fla, pp: 13–45.
- Altwegg R, Reyer H-U. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* **57**: 872–882.
- Ambrus A. 2018. Sebes acsa - *Aeshna cyanea*. Available from <https://www.izeltlabuak.hu/faj/sebes-acsa> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- AmphibiaWeb. 2018a. AmphibiaWeb 2012 *Bufo bufo*: Common Toad. Available from <http://amphibiaweb.org/species/127> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- AmphibiaWeb. 2018b. AmphibiaWeb 2012 *Rana dalmatina*: Agile Frog. Available from <http://amphibiaweb.org/species/5016> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- AmphibiaWeb. 2018c. AmphibiaWeb 1999 *Lissotriton vulgaris*: Smooth Newt. Available from <http://amphibiaweb.org/species/4303> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).

- Anand SS, Kim K-B, Padilla S, Muralidhara S, Kim HJ, Fisher JW, Bruckner JV. 2006. Ontogeny of hepatic and plasma metabolism of deltamethrin in vitro: role in age-dependent acute neurotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition* **34**: 389–397.
- APHA. 1985. Standard methods for the examination of wastewater, 16th ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Bach NC, Marino DJG, Natale GS, Somoza GM. 2018. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere* **202**: 289–297.
- Bach NC, Natale GS, Somoza GM, Ronco AE. 2016. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research International* **23**: 23959–23971.
- Bailoo JD, Reichlin TS, Würbel H. 2014. Refinement of experimental design and conduct in laboratory animal research. *ILAR journal* **55**: 383–391.
- Battaglin WA, Kolpin DW, Scribner EA, Kuivila KM, Sandstrom MW. 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. *Journal of the American Water Resources Association* **41**: 323–332.
- Battaglin WA, Rice KC, Focazio MJ, Salmons S, Barry RX. 2009. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005-2006. *Environmental Monitoring and Assessment* **155**: 281–307.
- Beja P, Alcazar R. 2003. Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biological Conservation* **114**: 317–326.
- Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. 2009a. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs 1. Laboratory acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **72**: 961–965.
- Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. 2009b. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval and juvenile colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **72**: 966–973.

- Beynen AC, Gärtner K, van Zutphen LFM. 2001. Standardization of animal experimentation. In L. F. M. van van Zutphen, V. Baumans, and A. C. Beynen (eds.) Principles of laboratory animal science, revised ed. Elsevier, Amsterdam; New York, pp: 103–110.
- Bezemer TM, Mills NJ. 2003. Clutch size decisions of a gregarious parasitoid under laboratory and field conditions. *Animal Behaviour* **66**: 1119–1128.
- Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* **9**: 123–140.
- Bókony V, Mikó Zs, Móricz ÁM, Krüzselyi D, Hettyey A. 2017. Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**: 20170493.
- Bókony V, Móricz ÁM, Tóth Z, Gál Z, Kurali A, Mikó Zs, Pásztor K, Szederkényi M, Tóth Z, Ujszegi J, Üveges B, Krüzselyi D, Capon RJ, Hoi H, Hettyey A. 2016. Variation in chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo*, tadpoles: the role of environmental factors. *Journal of Chemical Ecology* **42**: 329–338.
- Bókony V, Üveges B, Ujhegyi N, Verebélyi V, Nemesházi E, Csíkvári O, Hettyey A. 2018. Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. *The Science of the Total Environment* **634**: 1335–1345.
- Boone MD, Bridges CM. 1999. The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: 1482–1484.
- Boone MD, Bridges CM. 2003a. Effects of pesticides on amphibian populations. In R. D. Semlitsch (ed.) *Amphibian conservation*. Smithsonian Books, Washington, D.C, pp: 152–167
- Boone MD, Bridges CM. 2003b. Effects of carbaryl on green frog (*Rana clamitans*) tadpoles: timing of exposure versus multiple exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 2695–2702.
- Boone MD, Hammond SA, Veldhoen N, Youngquist M, Helbing CC. 2013. Specific time of exposure during tadpole development influences biological effects of the insecticide carbaryl in green frogs (*Lithobates clamitans*). *Aquatic Toxicology* **130–131**: 139–148.
- Boone MD, James SM. 2005. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* **2**: 231–257.

- Boone MD, Semlitsch RD. 2001. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology* **15**: 228–238.
- Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA. 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews* **23**: 159–167.
- Brausch JM, Beall B, Smith PN. 2007. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **78**: 510–514.
- Brausch JM, Smith PN. 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**: 217–221.
- Brausch JM, Smith PN. 2009. Mechanisms of resistance and cross-resistance to agrochemicals in the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca). *Aquatic Toxicology* **92**: 140–145.
- Breitholtz M, Rudén C, Hansson SO, Bengtsson BE. 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **63**: 324–335.
- Bridges CM, Semlitsch RD. 2000. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology* **14**: 1490–1499.
- Bridges CM. 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 1935–1939.
- Bridges CM. 1999. Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. *Journal of Herpetology* **33**: 303–306.
- Bridges CM. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**: 91–96.
- Bromilow RH, de Carvalho RF, Evans AA, Nicholls PH. 2006. Behavior of pesticides in sediment/water systems in outdoor mesocosms. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **41**: 1–16.
- Brühl CA, Pieper S, Weber B. 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**: 2465–2472.

- Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonacci A, Tripepi S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* **91**: 135–142.
- Bucciarelli T, Sacchetta P, Pennelli A, Cornelio L, Romagnoli R, Melino S, Petruzzelli R, Di Ilio C. 1999. Characterization of toad liver glutathione transferase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1431**: 189–198.
- Butler SG. 1998. The larvae of the European Aeshnidae (Anisoptera). *Odonatologica* **27**: 1–23.
- Caldwell JP, Thorp JH, Jervey TO. 1980. Predator-prey relationships among larval dragonflies, salamanders, and frogs. *Oecologia* **46**: 285–289.
- Calow P, Forbes VE. 2003. Does ecotoxicology inform ecological risk assessment? *Environmental Science & Technology* **37**: 146–51.
- Calow P. 1992. The Three Rs of Ecotoxicology. *Functional Ecology* **6**: 617–619.
- Cauble K, Wagner RS. 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **75**: 429–435.
- Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH. 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* **655**: 41–46.
- Chalcraft DR, Binckley CA, Resetarits WJ. 2005. Experimental venue and estimation of interaction strength: Comment. *Ecology* **86**: 1061–1067.
- Chen CY, Hathaway KM, Folt CL. 2004. Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 823–831.
- Christin MS, Gendron AD, Brousseau P, Ménard L, Marcogliese DJ, Cyr D, Ruby S, Fournier M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 1127–1133.
- Christin MS, Ménard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese DJ, Rollins-Smith L, Fournier M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology* **67**: 33–43.
- Coors A, Vanoverbeke J, De Bie T, De Meester L. 2009. Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* **95**: 71–79.

- Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology* **17**: 153–163.
- Cothran RD, Brown JM, Relyea RA. 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications* **6**: 832–841.
- Courchamp F, Langlais M, Sugihara G. 1999. Cats protecting birds: modelling the mesopredator release effect. *Journal of Animal Ecology* **68**: 282–292.
- Daly JW. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9–13.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* **16**: 1588–1601.
- De Silva PMCS, Samayawardhena LA. 2005. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* **58**: 1293–1299.
- Denoël M, Libon S, Kestemont P, Brasseur C, Focant J-F, De Pauw E. 2013. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere* **90**: 945–951.
- Duellman WE, Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Edge C, Gahl M, Thompson D, Hao C, Houlihan J. 2014. Variation in amphibian response to two formulations of glyphosate-based herbicides. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**: 2628–2632.
- Edge CB, Gahl MK, Thompson DG, Houlihan JE. 2013. Laboratory and field exposure of two species of juvenile amphibians to a glyphosate-based herbicide and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The Science of the Total Environment* **444**: 145–152.
- Edginton AN, Sheridan PM, Boermans HJ, Thompson DG, Holt JD, Stephenson GR. 2004a. A comparison of two factorial designs, a complete 3 x 3 factorial and a central composite rotatable design, for use in binomial response experiments in aquatic toxicology. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**: 216–223.
- Edginton AN, Sheridan PM, Stephenson GR, Thompson DG, Boermans HJ. 2004b. Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 815–822.

- Edwards WM, Triplett GB, Kramer RM. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal of Environment Quality* **9**: 661–665.
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* **2**: 1382–1397.
- Eggen RI, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, Schweigert N. 2004. Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* **38**: 58–64.
- Engqvist L. 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. *Animal Behaviour* **70**: 967–971.
- Feder ME, Burggren WW. 1985. Cutaneous gas exchange in vertebrates: design, patterns, control and implications. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **60**: 1–45.
- Feng JC, Thompson DG, Reynolds PE. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 1110–1118.
- Festing MFW. 2004a. Refinement and reduction through the control of variation. *Alternatives to Laboratory Animals* **32 Suppl 1A**: 259–263.
- Festing MFW. 2004b. The choice of animal model and reduction. *Alternatives to Laboratory Animals* **32 Suppl 2**: 59–64.
- Folmar LC, Sanders HO, Julin AM. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **8**: 269–278.
- Fort DJ, Guiney PD, Weeks JA, Thomas JH, Rogers RL, Noll AM, Spaulding CD. 2004. Effect of methoxychlor on various life stages of *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences* **81**: 454–466.
- Fraker ME, Hu F, Cuddapah V, McCollum SA, Relyea RA, Hempel J, Denver RJ. 2009. Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior* **55**: 520–529.
- Frontera JL, Vatnick I, Chaulet A, Rodríguez EM. 2011. Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 590–598.

- Fuentes L, Moore LJ, Rodgers JH, Bowerman WW, Yarrow GK, Chao WY. 2011. Comparative toxicity of two glyphosate formulations (original formulation of Roundup® and Roundup WeatherMAX®) to six North American larval anurans. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**: 2756–2761.
- Gahl MK, Pauli BD, Houlihan JE. 2011. Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Ecological Applications* **21**: 2521–2529.
- Gelman A, Jakulin A, Pittau MG, Su Y-S. 2008. A weakly informative default prior distribution for logistic and other regression models. *The Annals of Applied Statistics* **2**: 1360–1383.
- Gertzog BJ, Kaplan LJ, Nichols D, Smith GR, Rettig JE. 2011. Avoidance of three herbicide formulations by Eastern Red-Backed Salamanders (*Plethodon cinereus*). *Herpetological Conservation and Biology* **6**: 237–241.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **167**: 35–120.
- Glennemeier KA, Denver RJ. 2002. Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and Comparative Endocrinology* **127**: 16–25.
- Goldsborough LG, Brown DJ. 1993. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: 1139–1147.
- Goretti E, Ceccagnoli D, La Porta G, Di Giovanni MV. 2001. Larval development of *Aeshna cyanea* (Müller, 1764) (Odonata: Aeshnidae) in Central Italy. *Hydrobiologia* **457**: 149–154.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183–190.
- Gottrup O, O’Sullivan PA, Schraa RJ, Vanden WH. 1976. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canada thistle and leafy spurge. *Weed Research* **16**: 197–201.
- Grafen A, Hails R. 2002. *Modern statistics for the life sciences*. Oxford University Press, Oxford; New York.
- Greulich K, Pflugmacher S. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* **65**: 329–336.

- Griffis-Kyle KL. 2007. Sublethal effects of nitrite on eastern tiger salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) and wood frog (*Rana sylvatica*) embryos and larvae: implications for field populations. *Aquatic Ecology* **41**: 119–127.
- Griffiths RA, Denton J, Wong AL-C. 1993. The effect of food level on competition in tadpoles: interference mediated by protothecan algae? *The Journal of Animal Ecology* **62**: 274–279.
- Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. 2011. Pesticides industry sales and usage. US EPA, Washington, DC.
- Guilherme S, Santos MA, Barroso C, Gaivão I, Pacheco M. 2012. Differential genotoxicity of Roundup(®) formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* **21**: 1381–1390.
- Güngördü A. 2013. Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* **140–141**: 220–228.
- Hackshaw A. 2009. Statistical formulae for calculating some 95% confidence intervals. *A Concise Guide to Clinical Trials*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp: 205–207.
- Hanlon SM, Parris MJ. 2014. The interactive effects of chytrid fungus, pesticides, and exposure timing on gray treefrog (*Hyla versicolor*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**: 216–222.
- Harris CA, Scott AP, Johnson AC, Panter GH, Sheahan D, Roberts M, Sumpter JP. 2014. Principles of sound ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 48: 3100–3111.
- Harris CA, Sumpter JP. 2015. Could the quality of published ecotoxicological research be better? *Environmental Science & Technology* **49**: 9495–9496.
- Harris ML, Chora L, Bishop CA, Bogart JP. 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **64**: 263–270.
- Harris RN. 2000. The anuran tadpole: Evolution and maintenance. In R. W. McDiarmid and R. Altig (eds.) *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, Chicago, pp: 279–294.
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. 2002. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* **419**: 895–896.

- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives* **114 Suppl 1**: 40–50.
- Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology* **213**: 921–933.
- Hayes TB, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* **111**: 568–575.
- Hedberg D, Wallin M. 2010. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* **24**: 795–802.
- Hensley FR. 1993. Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. *Ecology* **74**: 2405–2412.
- Hettyey A, Rölli F, Thürlimann N, Zürcher A-C, Van Buskirk J. 2012. Visual cues contribute to predator detection in anuran larvae. *Biological Journal of the Linnean Society* **106**: 820–827.
- Hettyey A, Tóth Z, Thonhauser KE, Frommen JG, Penn DJ, Van Buskirk J. 2015. The relative importance of prey-borne and predator-borne chemical cues for inducible antipredator responses in tadpoles. *Oecologia* **179**: 699–710.
- 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.
- Hettyey A, Zsarnóczai S, Vincze K, Hoi H, Laurila A. 2010. Interactions between the information content of different chemical cues affect induced defences in tadpoles. *Oikos* **119**: 1814–1822.
- Hof C, Araújo MB, Jetz W, Rahbek C. 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* **480**: 516–519.
- Holly D. 2016. Egy glifozát-alapú gyomirtó hatása barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalak viselkedésére. BSc szakdolgozat. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Biológiai Intézet, Budapest.

- Howard B, Hudson M, Preziosi R. 2009. More is less: reducing animal use by raising awareness of the principles of efficient study design and analysis. *Alternatives to Laboratory Animals* **37**: 33–42.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 1928–1938.
- Howe GE, Gillis R, Mowbray RC. 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 519–525.
- Hsu E, Du Pasquier L. 1984. Ontogeny of the immune system in *Xenopus*. *Differentiation* **28**: 109–115.
- Hua J, Jones DK, Mattes BM, Cothran RD, Relyea RA, Hoverman JT. 2015. Evolved pesticide tolerance in amphibians: Predicting mechanisms based on pesticide novelty and mode of action. *Environmental Pollution* **206**: 56–63.
- Hua J, Morehouse NI, Relyea R. 2013. Pesticide tolerance in amphibians: induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evolutionary Applications* **6**: 1028–1040.
- IUCN. 2016. The IUCN Red list of threatened species Version 2016-2. Available from <http://www.iucnredlist.org> (Letöltés időpontja: 2016. szeptember 12.).
- Janssens L, Stoks R. 2012. How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral antipredator traits and escape swimming. *Aquatic Toxicology* **110–111**: 91–98.
- Janssens L, Stoks R. 2017. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. *Aquatic Toxicology* **193**: 210–216.
- Jayawardena UA, Navaratne AN, Amerasinghe PH, Rajakaruna RS. 2011. Acute and chronic toxicity of four commonly used agricultural pesticides on the Asian common toad, *Bufo melanostictus* Schneider. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* **39**: 267–276.
- Jayawardena UA, Rajakaruna RS, Navaratne AN, Amerasinghe PH. 2010. Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. *International Journal of Agriculture and Biology* **12**: 641–648.
- John-Adler HB, Morin PJ. 1990. Effects of larval density on jumping ability and stamina in newly metamorphosed *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* **1990**: 856–860.

- Johnson LA, Welch B, Whitfield SM. 2013. Interactive effects of pesticide mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**: 2379–2386.
- Johnson MS, Aubee C, Salice CJ, Leigh KB, Liu E, Pott U, Pillard D. 2017. A review of ecological risk assessment methods for amphibians: Comparative assessment of testing methodologies and available data. *Integrated Environmental Assessment and Management* **13**: 601–613.
- Jones DK, Hammond JI, Relyea RA. 2010. Roundup® and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**: 2016–2025.
- Jones DK, Hammond JI, Relyea RA. 2011. Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**: 446–454.
- Joron M, Brakefield PM. 2003. Captivity masks inbreeding effects on male mating success in butterflies. *Nature* **424**: 191–194.
- Katagi T. 2006. Behavior of pesticides in water-sediment systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **187**: 133–251.
- Katzenberger M, Hammond J, Duarte H, Tejedo M, Calabuig C, Relyea RA. 2014. Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PloS One* **9**: e98265.
- Kiesecker JM, Chivers DP, Blaustein AR. 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Animal Behaviour* **52**: 1237–1245.
- Klimisch, HJ, Andreae M, Tillmann U. 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **25**: 1–5.
- Köhler H-R, Triebkorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* **341**: 759–765.
- Kriska G. 2013. *Freshwater invertebrates in Central Europe: a field guide*. Springer, Wien; New York.
- Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Cabagna MC. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **60**: 681–689.

- Lajmanovich RC, Sandoval MT, Peltzer PM. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **70**: 612–618.
- Lancôt C, Navarro-Martín L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli BD, Trudeau VL. 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* **154**: 291–303.
- Langhammer PF, Burrowes PA, Lips KR, Bryant AB, Collins JP. 2014. Susceptibility to the amphibian chytrid fungus varies with ontogeny in the direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Journal of Wildlife Diseases* **50**: 438–446.
- Lardner B. 2000. Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos* **88**: 169–180.
- Laurila A, Kujasalo J, Ranta E. 1997. Different antipredator behaviour in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **40**: 329–336.
- Laurila A, Kujasalo J, Ranta E. 1998. Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Oikos* **83**: 307–317.
- Lehman CM, Williams BK. 2010. Effects of current-use pesticides on amphibians. In: D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, and S. K. Krest (eds.) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis; SETAC, Boca Raton, Fla, pp: 167–202.
- Levin ED, Swain HA, Donerly S, Linney E. 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicology and Teratology* **26**: 719–723.
- Linder G, Lehman CM, Bidwell JR. 2010. Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell. In: D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, and S. K. Krest (eds.) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis; SETAC, Boca Raton, Fla, pp: 69–103.
- Ludvigsen GH, Lede O. 2001. Results from “JOVÅ” the agricultural and environmental monitoring program of pesticides in Norway 1995 - 1999. *Fresenius Environmental Bulletin* **10**: 470–474.
- Ma S, Kassinos SC, Kassinos DF, Akylas E. 2008. Modeling the impact of water withdrawal schemes on the transport of pesticides in the Kouris Dam (Cyprus). *Global NEST Journal* **10**: 2225–2233.

- Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület. 2018a. Magyarország kételtűi és hüllői: Barna varangy. Available from <http://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/barna-varangy> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület. 2018b. Magyarország kételtűi és hüllői: Erdei béka. Available from <http://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/erdei-beka> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület. 2018c. Magyarország kételtűi és hüllői: Pettyes göte. Available from <http://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/pettyes-gote> (Letöltés időpontja: 2018. január 29.).
- Mandrillon A-L, Saglio P. 2007a. Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*). *Chemoecology* **17**: 31–36.
- Mandrillon A-L, Saglio P. 2007b. Waterborne amitrole affects the predator-prey relationship between common frog tadpoles (*Rana temporaria*) and larval spotted salamander (*Salamandra salamandra*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**: 233–240.
- Mann RM, Bidwell JR. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **36**: 193–199.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* **157**: 2903–2927.
- McDaniel TV, Martin PA, Struger J, Sherry J, Marvin CH, McMaster ME, Clarence S, Tetreault G. 2008. Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology* **88**: 230–242.
- Melvin SD, Wilson SP. 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere* **93**: 2217–2223.
- Middlemis Maher J, Werner EE, Denver RJ. 2013. Stress hormones mediate predator-induced phenotypic plasticity in amphibian tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20123075.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Hettyey A. 2017a. Standardize or diversify experimental conditions in ecotoxicology? A case study on herbicide toxicity to larvae of two Anuran Amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **73**: 562–569.

- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Hettyey A. 2017c. Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **140**: 96–102.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Imrei Z, Hettyey A. 2015. Choice of experimental venue matters in ecotoxicology studies: Comparison of a laboratory-based and an outdoor mesocosm experiment. *Aquatic Toxicology* **167**: 20–30.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Hettyey A. 2017b. Age-dependent changes in sensitivity to a pesticide in tadpoles of the common toad (*Bufo bufo*). *Aquatic Toxicology* **187**: 48–54.
- Moore H, Chivers DP, Ferrari MCO. 2015. Sub-lethal effects of RoundupTM on tadpole anti-predator responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **111**: 281–285.
- Moore LJ, Fuentes L, Rodgers JH, Bowerman WW, Yarrow GK, Chao WY, Bridges WC. 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **78**: 128–133.
- Mörtl M, Németh G, Juracsek J, Darvas B, Kamp L, Rubio F, Székács A. 2013. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchemical Journal* **107**: 143–151.
- Navarro-Martín L, Lanctôt C, Jackman P, Park BJ, Doe K, Pauli BD, Trudeau VL. 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquatic Toxicology* **154**: 278–290.
- NÉBIH. 2014. 2014. évi szerforgalmi jelentés. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Budapest, Hungary.
- Nelson DR. 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **121**: 15–22.
- OECD. 2009. Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay. OECD. Available from https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-231-amphibian-metamorphosis-assay_9789264076242-en (Letöltés időpontja: 2019. február 1.).
- Open Science Collaboration. 2015. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science* **349**: aac4716.
- Orizaola G, Dahl E, Laurila A. 2012. Reversibility of predator-induced plasticity and its effect at a life-history switch point. *Oikos* **121**: 44–52.
- Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL, Carrasco AE. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology* **23**: 1586–1595.

- Pavlov DD, Chuiko GM, Gerassimov YV, Tonkopiyy VD. 1992. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **103**: 563–568.
- Paylor R. 2009. Questioning standardization in science. *Nature Methods* **6**: 253–254.
- Pearson WR. 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp: 186–204.
- Péchy T, Haraszthy L. 1997. Magyarország kételtűi és hullói. Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, Budapest, Hungary.
- Pereira JL, Antunes SC, Castro BB, Marques CR, Gonçalves AMM, Gonçalves F, Pereira R. 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* **18**: 455–463.
- Pérez GL, Solange M, Mir L. 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: A. Kortekamp (ed.) *Herbicides and Environment*. InTech, pp: 343–368.
- Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, de Oliveira C, Natale GS. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research International* **23**: 9852–9861.
- Perkins PJ, Boermans HJ, Stephenson GR. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay- *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 940–945.
- Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* **156**: 61–66.
- Pimentel D. 2009. Pesticides and pest control. In: R. Peshin and A. K. Dhawan (eds.) *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp: 83–87.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <http://www.R-project.org/> (Letöltés időpontja: 2016. október 12.).
- Rattner BA, Heath AG. 2003. Environmental factors affecting contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. J. Burton, and J. J.

- Cairns (eds.) Handbook of ecotoxicology, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, pp: 679–699.
- Relyea RA, Edwards K. 2010. What doesn't kill you makes you sluggish: How sublethal pesticides alter predator–prey interactions. *Copeia* **2010**: 558–567.
- Relyea RA, Hoverman J. 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* **9**: 1157–1171.
- Relyea RA, Hoverman JT. 2008. Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities. *Oikos* **117**: 1647–1658.
- Relyea RA, Jones DK. 2009. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**: 2004–2008.
- Relyea RA, Mills N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2491–2496.
- Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications* **15**: 1125–1134.
- Relyea RA. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* **82**: 523–540.
- Relyea RA. 2003a. Predator cues and pesticides: a double danger for amphibians. *Ecological Applications* **13**: 1515–1521.
- Relyea RA. 2003b. Predators come and predators go: The reversibility of predator-induced traits. *Ecology* **84**: 1840–1848.
- Relyea RA. 2004a. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 1737–1742.
- Relyea RA. 2004b. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 1080–1084.
- Relyea RA. 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* **15**: 618–627.
- Relyea RA. 2005b. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **48**: 351–357.
- Relyea RA. 2005c. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* **15**: 1118–1124.

- Relyea RA. 2006. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities: response. *Ecological Applications* **16**: 2027–2034.
- Relyea RA. 2011. Amphibians are not ready for Roundup®. In: J. E. Elliott, C. A. Bishop, and C. A. Morrissey (eds.) *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*. Springer New York, New York, NY, pp: 267–300.
- Relyea RA. 2012. New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications* **22**: 634–647.
- Richter SH, Garner JP, Würbel H. 2009. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nature Methods* **6**: 257–261.
- Rissoli RZ, Abdalla FC, Costa MJ, Rantin FT, McKenzie DJ, Kalinin AL. 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original(®) and Roundup Transorb(®) on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* **156**: 37–44.
- Robert J, Ohta Y. 2009. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* **238**: 1249–1270.
- Rodriguez-Gil JL, Lissemore L, Solomon K, Hanson M. 2016. Dissipation of a commercial mixture of polyoxyethylene amine surfactants in aquatic outdoor microcosms: Effect of water depth and sediment organic carbon. *The Science of the Total Environment* **550**: 449–458.
- Rohr JR, Crumrine PW. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* **15**: 1135–1147.
- Rollins-Smith LA. 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews* **166**: 221–230.
- Saura-Mas S, Boone MD, Bridges CM. 2002. Evaluation of direct effects of an insecticide on Gray treefrogs: laboratory and field trials. *Journal of Herpetology* **36**: 715–719.
- Scheffer M, van Geest GJ, Zimmer K, Jeppesen E, Søndergaard M, Butler MG, Hanson MA, Declerck S, De Meester L. 2006. Small habitat size and isolation can promote species richness: second-order effects on biodiversity in shallow lakes and ponds. *Oikos* **112**: 227–231.
- Schmitz OJ, Krivan V, Ovadia O. 2004. Trophic cascades: the primacy of trait-mediated indirect interactions: Primacy of trait-mediated indirect interactions. *Ecology Letters* **7**: 153–163.

- Schoeppner NM, Relyea RA. 2008. Detecting small environmental differences: risk-response curves for predator-induced behavior and morphology. *Oecologia* **154**: 743–754.
- Scholz S, Gutzeit HO. 2000. 17-alpha-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* **50**: 363–373.
- Semlitsch RD, Bridges CM, Welch AM. 2000. Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. *Oecologia* **125**: 179–185.
- Semlitsch RD, Foglia M, Mueller A, Steiner I, Fioramonti E, Fent K. 1995. Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behavior of tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**: 1419–1423.
- Semlitsch RD, Scott DE, Pechmann JHK. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* **69**: 184–192.
- Sheets LP. 2000. A consideration of age-dependent differences in susceptibility to organophosphorus and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* **21**: 57–63.
- Sih A, Bell AM, Kerby JL. 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 274–276.
- Skelly DK, Kiesecker JM. 2001. Venue and outcome in ecological experiments: manipulations of larval anurans. *Oikos* **94**: 198–208.
- Skelly DK. 2002. Experimental venue and estimation of interaction strength. *Ecology* **83**: 2097–2101.
- Smith DC. 1987. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* **68**: 344–350.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd ed. W.H. Freeman, New York.
- Sparling DW, Fellers GM, McConnell LL. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1591–1595.
- Sparling DW. 2003. A review of the role of contaminants in amphibian declines. In: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. J. Burton, and J. J. Cairns (eds.) *Handbook of ecotoxicology*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, pp: 1099–1128.
- Staveley J, Wentsel R. 2016. The Challenge: How can we improve the quality of ecotoxicology research to increase relevance and use in regulatory decision making? *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**: 14–16.

- Struger J, Thompson D, Staznik B, Martin P, McDaniel T, Marvin C. 2008. Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **80**: 378–384.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**: 1783–1786.
- Sudo M, Kawachi T, Hida Y, Kunimatsu T. 2004. Spatial distribution and seasonal changes of pesticides in Lake Biwa, Japan. *Limnology* **5**: 77–86.
- Suter GW. 2007. Testing. In G. W. Suter (ed.) *Ecological risk assessment*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, pp: 321–345.
- Székács A, Darvas B. 2012. Forty years with glyphosate. In M. N. Hasaneen (ed.) *Herbicides - Properties, synthesis and control of weeds*. InTech, pp: 247–284.
- Székács A, Darvas B. 2018. Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science* **6**: 1–35.
- Székács I, Fejes Á, Klátyik S, Takács E, Patkó D, Pomóthy J, Mörtl M, Horváth R, Madarász E, Darvas B, Székács A. 2014a. Environmental and toxicological impacts of glyphosate with its formulating adjuvant. *International Journal of Biological Veterinary Agricultural and Food Engineering* **8**: 212–218.
- Székács A, Mörtl M, Fekete G, Fejes Á, Darvas B, Dombos M, Szécsy O, Anton A. 2014b. Monitoring and biological evaluation of surface water and soil micropollutants in Hungary. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences* **9**: 47–60.
- Takahara T, Kohmatsu Y, Maruyama A, Doi H, Yamanaka H, Yamaoka R. 2012. Inducible defense behavior of an anuran tadpole: cue-detection range and cue types used against predator. *Behavioral Ecology* **23**: 863–868.
- Takahashi M. 2007. Oviposition site selection: pesticide avoidance by gray treefrogs. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 1476–1480.
- Teplitsky C, Piha H, Laurila A, Merilä J. 2005. Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Science & Technology* **39**: 6079–6085.
- Terborgh J, Lopez L, Nuñez P, Rao M, Shahabuddin G, Orihuela G, Riveros M, Ascanio R, Adler GH, Lambert TD, Balbas L. 2001. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science* **294**: 1923–1926.
- Thompson DG, Wojtaszek BF, Staznik B, Chartrand DT, Stephenson GR. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native

- amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 843–849.
- Tierney KB, Singh CR, Ross PS, Kennedy CJ. 2007. Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquatic Toxicology* **81**: 55–64.
- Timchalk C, Poet TS, Kousba AA. 2006. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology* **220**: 13–25.
- Tollett VD, Benvenuti EL, Deer LA, Rice TM. 2009. Differential toxicity to Cd, Pb, and Cu in dragonfly larvae (Insecta: Odonata). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **56**: 77–84.
- Tomlin CDS. 2006. *The pesticide manual: a world compendium*, 14th ed. British Crop Protection Council, Hampshire, UK, pp: 545–548.
- Tsui MTK, Chu LM. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* **52**: 1189–1197.
- Tsui MTK, Chu LM. 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**: 316–323.
- Ujszegi J, Gál Z, Mikó Zs, Hettyey A. 2015. No observable effect of a glyphosate-based herbicide on two top predators of temporal water bodies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **34**: 307–313.
- Ujszegi J, Gál Z, Mikó Zs, Hettyey A. 2016. No effect of a glyphosate-based herbicide on larval dragonflies (*Aeshna cyanea*) and adult newts (*Lissotriton vulgaris*) in a laboratory-based experiment. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **62**: 355–367.
- Urban MC. 2007. The growth-predation risk trade-off under a growing gape-limited predation threat. *Ecology* **88**: 2587–2597.
- USEPA. 1996. Tadpole/Sediment Subchronic Toxicity Test. OPPTS 850.1800, EPA 712-C-96-132. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington D.C.
- Van Buskirk J, Arioli M. 2002. Dosage response of an induced defense: How sensitive are tadpoles to predation risk? *Ecology* **83**: 1580.

- Van Buskirk J, Krügel A, Kunz J, Miss F, Stamm A. 2014. The rate of degradation of chemical cues indicating predation risk: An experiment and review. *Ethology* **120**: 942–949.
- Van Buskirk J. 2012. A protocol for mesocosm experiments. University of Zurich. Available from <http://www.ieu.uzh.ch/research/ecology/change/labprotocols.html> (Letöltés időpontja: 2012. november 8.).
- van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. 2010. The standardization-generalization dilemma: a way out. *Genes, Brain, and Behavior* **9**: 849–855.
- Van Straalen NM. 1993. Biodiversity of ecotoxicological responses in animals. *Netherlands Journal of Zoology* **44**: 112–129.
- Versteeg DJ, Belanger SE, Carr GJ. 1999. Understanding single-species and model ecosystem sensitivity: Data-based comparison. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: 1329–1346.
- Villeneuve A, Larroudé S, Humbert JF. 2011. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: Impact on microbial communities. In: M. Stoytcheva (ed.) *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. InTech, pp: 285–312.
- Vonesh JR. 2005. Sequential predator effects across three life stages of the African tree frog, *Hyperolius spinigularis*. *Oecologia* **143**: 280–290.
- Wagner N, Lötters S. 2013. Effects of water contamination on site selection by amphibians: experiences from an arena approach with European frogs and newts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **65**: 98–104.
- Wagner N, Reichenbecher W, Teichmann H, Tappeser B, Lötters S. 2013. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**: 1688–1700.
- Wake DB, Vredenburg VT. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105 Suppl 1**: 11466–11473.
- Wang N, Besser JM, Buckler DR, Honegger JL, Ingersoll CG, Johnson BT, Kurtzweil ML, Macgregor J, McKee MJ. 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere* **59**: 545–551.
- Wells KD. 2007. Complex life cycles and the ecology of amphibian metamorphosis. In K. D. Wells *The ecology & behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, pp: 599–644.

- Wilbur HM, Collins JP. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science* **182**: 1305–1314.
- Wilbur HM, Morin PJ, Harris RN. 1983. Salamander predation and the structure of experimental communities: Anuran responses. *Ecology* **64**: 1423–1429.
- Wilbur HM. 1988. Interactions between growing predators and growing prey. In B. Ebenman and L. Persson (eds.) *Size-Structured Populations*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp: 157–172.
- Williams BK, Semlitsch RD. 2010. Larval responses of three midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 819–827.
- Williams P, Whitfield M, Biggs J, Bray S, Fox G, Nicolet P, Sear D. 2004. Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern England. *Biological Conservation* **115**: 329–341.
- Winkler JD, Van Buskirk J. 2012. Influence of experimental venue on phenotype: multiple traits reveal multiple answers. *Functional Ecology* **26**: 513–521.
- Wojtaszek BF, Staznik B, Chartrand DT, Stephenson GR, Thompson DG. 2004. Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 832–842.
- Yu S, Weir SM, Cobb GP, Maul JD. 2014. The effects of pesticide exposure on ultraviolet-B radiation avoidance behavior in tadpoles. *The Science of the Total Environment* **481**: 75–80.
- Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer New York, New York, NY.

8. Saját közlemények listája

Az értekezés alapját képező folyóirat-közlemények

- Mikó Zs, Ujszegi J, Hettyey A 2017. Age-dependent changes in sensitivity to a pesticide in tadpoles of the common toad (*Bufo bufo*). *Aquatic Toxicology*, 187: 48-54.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Hettyey A 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140: 96-102.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Hettyey A 2017. Standardize or diversify experimental conditions in ecotoxicology? A case study on herbicide toxicity to larvae of two Anuran Amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73: 562-569.
- Ujszegi J, Gál Z, Mikó Zs, Hettyey A 2016. No effect of a glyphosate-based herbicide on larval dragonflies (*Aeshna cyanea*) and adult newts (*Lissotriton vulgaris*) in a laboratory-based experiment. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 62: 355-367.
- Mikó Zs, Ujszegi J, Gál Z, Imrei Z, Hettyey A 2015. Choice of experimental venue matters in ecotoxicology studies: Comparison of a laboratory-based and an outdoor mesocosm experiment. *Aquatic Toxicology*, 167: 20-30.
- Ujszegi J, Gál Z, Mikó Zs, Hettyey A 2015. No observable effect of a glyphosate-based herbicide on two top predators of temporal water bodies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34: 307-313.

Egyéb publikációk

- Bókony V, Mikó Zs, Móricz ÁM, Krüzselyi D, Hettyey A 2017. Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20170493.
- Bókony V, Móricz ÁM, Tóth Z, Gál Z, Kurali A, Mikó Zs, Pásztor K, Szederkényi M, Tóth Z, Ujszegi J, Üveges B, Krüzselyi D, Capon RJ, Hoi H, Hettyey A 2016. Variation in chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo*, tadpoles: the role of environmental factors. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 329-338.
- Bókony V, Mikó Zs, Szép E, Ujszegi J, Tóth Z, Hettyey A 2014. Új lendület a Növényvédelmi Intézetben. *Növényvédelem*, 50: 496-500.

9. Összefoglaló

A peszticidek alkalmazása hatékony és széles körben elterjedt módja a mezőgazdasági termelékenység javításának, de ezek a vegyi anyagok a kártevő fajok mellett hathatnak a kezelés által nem-céltott szervezetekre is. Ezért a peszticidek nem-célszervezetekre gyakorolt hatásának megértése alapvető fontosságú a nemkívánatos káros hatások és végső soron a biodiverzitás csökkenésének megakadályozása érdekében. A glifozátalapú gyomirtók a leggyakrabban használt peszticidek közé tartoznak világszerte. Mivel a glifozát felvételének elsősorban a levelek kutikuláján keresztül kell megtörténnie, többnyire felületaktív anyagokkal együtt alkalmazzák, hogy elősegítsék az abszorpciót. Korábbi vizsgálatok szerint a glifozát, és még inkább a felületaktív anyagok, károsan hathatnak a nem-célszervezetekre.

Kísérleteinkben egy glifozátalapú gyomirtó (Glyphogan® Classic, GC) hatásait vizsgáltuk két farkatlan kétéltű faj (erdei béka és barna varangy) lárváin. Megvizsgáltuk, hogy a különböző kísérleti körülmények jelentősen befolyásolhatják-e az ökotoxikológiai vizsgálatok eredményeit, hogy a GC-re való érzékenység milyen irányban és mértékben változik a fejlődés során, valamint hogy a GC és összetevői – ragadozó jelenlétével vagy hiányával kombinálva – hogyan hatnak a fontos életmenet-változókra, úgymint a növekedésre, a testtömegre, a viselkedésre, a testalakra és a túlélésre. Ezeken kívül két, az időszakos víztestekben gyakori ragadozófajnál (pettyes göte és sebes acsa) is vizsgáltuk a GC károsító hatásait, hogy következtethessünk arra, hogy gyomirtóval szennyezett élőhelyeken is be tudják-e tölteni közösség szabályozó szerepüket.

Megállapítottuk, hogy a GC közepesen toxikus az általunk vizsgált ebihalakra, és szubletális koncentrációkban hatással lehet az állatok testtömegére, fejlődési sebességére, viselkedésére és testalakjára egyaránt, különösen, ha fejlődésük korai szakaszában kerülnek kapcsolatba a szerrel. Eredményeink továbbá megerősítik, hogy a GC toxicitását elsősorban a POEA felületaktív anyag okozza. Azt is kimutattuk, hogy nem csupán a hatás nagysága, de annak iránya is függhet a kísérleti környezettől, a peszticidek hatását befolyásolhatják további stressztényezők, valamint hogy a populációk érzékenysége között is jelentős különbségek lehetnek. A vizsgált ragadozók a kétéltűlárváknál ellenállóbbnak mutatkoztak a GC-vel szemben.

Összességében megállapítható, hogy a glifozátalapú herbicideknek változatos és sokszor váratlan közvetlen és közvetett hatásai lehetnek nem-célszervezetekre.

10. Summary

The application of pesticides is an effective and widespread way of improving productivity in agriculture, but these chemicals not only affect pest species, but may harm non-target organisms as well. Understanding consequences of pesticide use for non-target organisms is of fundamental importance for averting unwanted adverse effects and, ultimately, biodiversity loss. One of the most commonly used pesticides in the world, are glyphosate-based herbicides. Because uptake of glyphosate has to take place through the cuticle of leaves, it is usually administered along with surfactants to enhance absorption efficiency. Previous studies suggested that glyphosate, and even more so the surfactants can be toxic to non-target organisms.

In a series of experiments we investigated effects of a glyphosate-based herbicide (Glyphogan® Classic, GC) on larvae of two anuran amphibian species (agile frog and common toad). We assessed the influence of experimental conditions on the outcome of ecotoxicology studies, evaluated age-dependent changes in sensitivity to the herbicide, and examined impacts of the GC and its components in combination with predation threat on important life-history traits, such as growth, body mass, behaviour, morphology and, ultimately, survival. To examine if the top-down regulatory potential of predators may be weakened by the GC, we investigated effects of the pesticide on two common predators of temporary ponds (southern hawkler larvae and adult smooth newts).

We found that the GC is moderately toxic to these amphibians, and at sublethal concentrations it can affect the body mass, developmental time, behaviour, and morphology of tadpoles, especially if exposed early on during ontogeny. Furthermore, our results confirm that the toxicity of the GC is mainly due to the surfactant POEA. Moreover, we found that not only the magnitude, but also the direction of effects due to GC-exposure depended markedly on the experimental venue, and the effects of pesticides can be significantly influenced by additional stress factors, all also depending on the studied population. The predators we studied appeared to be far more resistant to the GC than the investigated anuran larvae.

These studies draw attention to the fact that glyphosate-based herbicides can have varied and often unexpected direct and indirect effects on non-target organisms.

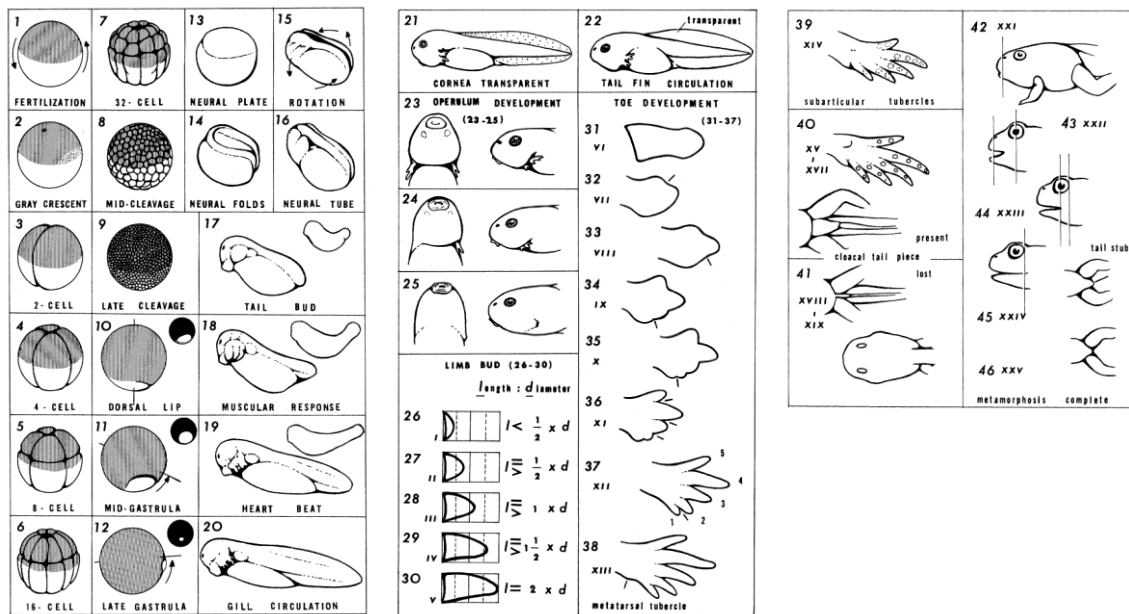
11. Függelék

11.1. táblázat. A 4.6. alfejezetben leírt kísérlet morfológiai változóin végzett MGLM elemzések eredményei.

	Többváltozós teszt				„Tests of between-subjects effects”			
	<i>df</i>	Wilk's λ	<i>F</i>	<i>P</i>	Függő változó	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Környezet	6; 53	0,033	257,66	<0,001	Farokhossz	1; 58	448,15	<0,001
					Farokmagasság	1; 58	71,7	<0,001
					Farokizomszélesség	1; 58	656,41	<0,001
					Testhossz	1; 58	796,76	<0,001
					Testmagasság	1; 58	0,85	0,36
					Testszélesség	1; 58	129,39	<0,001
GC	6; 53	0,64	4,91	<0,001	Farokhossz	1; 58	21,85	<0,001
					Farokmagasság	1; 58	2,57	0,11
					Farokizomszélesség	1; 58	0,78	0,38
					Testhossz	1; 58	1,95	0,17
					Testmagasság	1; 58	5,68	0,02
					Testszélesség	1; 58	3,17	0,08
Ragadozó	6; 53	0,12	64,75	<0,001	Farokhossz	1; 58	5,54	0,02
					Farokmagasság	1; 58	195,24	<0,001
					Farokizomszélesség	1; 58	28,26	<0,001
					Testhossz	1; 58	24,2	<0,001
					Testmagasság	1; 58	0,07	0,8
					Testszélesség	1; 58	15,77	<0,001
Környezet × GC	6; 53	0,21	33,93	<0,001	Farokhossz	1; 58	107,1	<0,001
					Farokmagasság	1; 58	0,82	0,37
					Farokizomszélesség	1; 58	36,29	<0,001
					Testhossz	1; 58	27,22	<0,001
					Testmagasság	1; 58	9,13	0,004
					Testszélesség	1; 58	30,98	<0,001
Környezet × Ragadozó	6; 53	0,76	2,84	0,018	Farokhossz	1; 58	2,33	0,13
					Farokmagasság	1; 58	1,4	0,24
					Farokizomszélesség	1; 58	6,09	0,02
					Testhossz	1; 58	1,45	0,23
					Testmagasság	1; 58	6,87	0,01
					Testszélesség	1; 58	0,19	0,66
GC × Ragadozó	6; 52	0,94	0,55	0,77	Farokhossz	1; 57	0,04	0,84
					Farokmagasság	1; 57	0,38	0,54
					Farokizomszélesség	1; 57	0,17	0,68
					Testhossz	1; 57	1,46	0,23
					Testmagasság	1; 57	1,29	0,26
					Testszélesség	1; 57	0,01	0,93

11.2. táblázat. A 4.6. alfejezetben leírt kísérlet viselkedési változóihoz végzett MGLM elemzések eredményei.

	Többváltozós teszt				„Tests of between-subjects effects”			
	df	Wilk's λ	F	P	Függő változó	df	F	P
Környezet	2; 46	0,23	77,74	<0,001	Aktivitás	1; 47	76,38	<0,001
					Függőleges elhelyezkedés	1; 47	141,14	<0,001
GC	2; 46	0,92	2,15	0,13	Aktivitás	1; 47	0,05	0,82
					Függőleges elhelyezkedés	1; 47	3,26	0,08
Ragadozó	2; 46	0,69	10,17	<0,001	Aktivitás	1; 47	20,03	<0,001
					Függőleges elhelyezkedés	1; 47	1,13	0,29
Környezet × GC	2; 46	0,86	3,9	0,027	Aktivitás	1; 47	1,71	0,19
					Függőleges elhelyezkedés	1; 47	3,02	0,09
Környezet × Ragadozó	2; 46	0,87	3,56	0,036	Aktivitás	1; 47	0,1	0,75
					Függőleges elhelyezkedés	1; 47	5,34	0,025
GC × Ragadozó	2; 45	0,94	1,37	0,26	Aktivitás	1; 46	0,02	0,91
					Függőleges elhelyezkedés	1; 46	2,46	0,12



11.1. ábra. A barna varangy Gosner szerinti fejlődési állapotai (Gosner, 1960).



11.1. kép. Balról jobbra: a sebes acsa F-3, F-2 és F-1-es lárvája (az egyes lárvális állapotokhoz tartozó morfológiai jellemzőket lásd Goretti et al. 2001; Fotó: Andy és Helen Holt).

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Mikó Zsanett

MTMT-azonosító: 10043271

A doktori értekezés címe és alcíme: Egy glifozátalapú gyomirtó ökotoxikológiai hatásai kétéltűlárvákra és ragadozóikra

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2019.048

A doktori iskola neve: ELTE Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia doktori program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Hettyey Attila, PhD

A témavezető munkahelye: Növényvédelmi Intézet, Agrártudományi Kutatóközpont, MTA

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

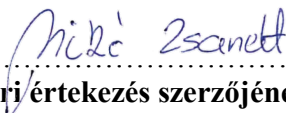
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2019. 03. 05.


.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet