

Diplomamunka

Verebélyi Viktória 2020

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

Ökológiai Tanszék

**TERBUTILAZIN ÖKOTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATA KÉT HAZAI
KÉTÉLTŰ FAJON**

Készítette: Verebélyi Viktória

Témavezető: Dr. Bókony Veronika, tudományos főmunkatárs

Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,

Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Kosztolányi András,

egyetemi docens, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4	<i>5.2. Metamorfózis adatok.....</i>	20
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5	<i>5.3. Viselkedés adatok.....</i>	23
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	11	<i>5.4. Ivararány.....</i>	27
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12	<i>5.5. Lép adatok.....</i>	29
<i>4.1. A vizsgált fajok.....</i>	12	6. DISZKUSSZIÓ.....	33
<i>4.2. Terepi begyűjtés.....</i>	12	<i>6.1. Metamorfózis adatok.....</i>	33
<i>4.3. A kísérlet menete.....</i>	13	<i>6.2. Viselkedés.....</i>	35
<i>4.4. Adatelemzés.....</i>	18	<i>6.3. Ivararány.....</i>	33
<i>4.4.1. Metamorfózis adatok.....</i>	19	<i>6.4. Lép.....</i>	36
<i>4.4.2. Viselkedés adatok.....</i>	19	<i>6.5. Konklúziók.....</i>	36
<i>4.4.3. Ivararány.....</i>	19	7. ÖSSZEFOGLALÓ.....	37
<i>4.4.4. Lép adatok.....</i>	19	8. ABSRACT.....	39
5. EREDMÉNYEK.....	20	9. IRODALOMJEGYZÉK.....	41
<i>5.1. Mortalitás.....</i>	20	10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS... 	43

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATK: Agrártudományi Kutatóközpont

GLMM: általánosított lineáris kevert modell

LC-MS: folyadékkromatográfia – tömegspektrometria

LME modell: lineáris kevert modell

MS 222: Tricaine methanesulfonate, halak és kétélűek altatására, illetve eutanáziájára használt szer

RSW (reconstituted soft water): reverz-oszmózis módszerrel szűrt víz hozzáadott sókkal

2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

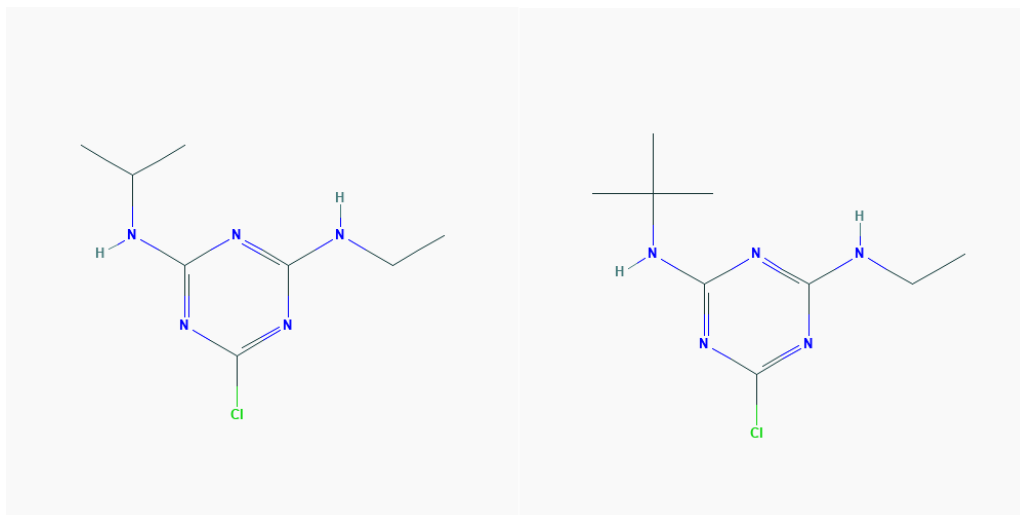
A szennyezőanyagok kockázatainak felmérése természetvédelmi és humán-egészségügyi szempontból is fontos feladat, mert ezek a vegyületek a természetes közegbe, vizekbe, talajba, levegőbe kerülve negatívan befolyásolhatják az ökoszisztémát, illetve visszahathatnak az emberre is. Az ökotoxikológiai kutatások során az ilyen, ökológiai rendszerekbe kerülő toxikus anyagok hatásait vizsgáljuk. Megkülönböztetünk letális, illetve az általában alacsonyabb szennyezőanyag koncentrációval összefüggő szubletális hatásokat. Előbbi az egyedek pusztulásából kifolyólag jelentősen és egyértelműen befolyásolja a populációk fennmaradását, míg a szubletális hatások ezzel szemben nehezebben detektálhatóak, ennek ellenére ugyanúgy okozhatnak olyan hosszú távú, visszafordíthatatlan változásokat, amelyek a populációk állományainak csökkenéséhez és eltűnéséhez vezethetnek (Collins et al., 2009).

Fontos, hogy az ökotoxikológiai kutatásokban a kételtűek ne legyenek alulreprezentálva, ugyanis számos olyan tulajdonsággal bírnak, amelyek megkülönböztetik őket a többi gerinces csoporttól. Életmenetükből kifolyólag ki vannak téve a vízben és a szárazföldön előforduló szennyezőanyagoknak egyaránt, emellett kültakarójuk nagyobb permeabilitása miatt is (bőrlégzés) érzékenyebbek a madaraknál vagy emlősöknél (Collins et al., 2009). Kételtűeknél a vízhez kötött embrionális és lárvális életszakasz kiemelten érzékeny, mind a szomatikus, mind a gonadális fejlődés szempontjából (Fiorentino et al., 2001.; Heatwole et al., 2009). A kételtű fajok 70%-a folyamatos állománycsökkenést mutat, ezen fajoknak a 40%-a pedig közvetlenül kihalással fenyegetett (IUCN Red list, 2019; Hayes et al, 2010). Ennek egyik kiemelt előidézője az antropogén eredetű anyagok okozta környezetszennyezés (Collins et al., 2009; Hayes et al, 2010; Orton és Tyler 2015).

Az intenzív mezőgazdasági tevékenység jelentős forrása lehet a környezetszennyező vegyületeknek, ráadásul folyamatosan jelennek meg új hatóanyagok és hatóanyag kombinációk, amelyek hatásairól kevés információ áll rendelkezésre. A Föld szárazföldi területeinek körülbelül 40%-át teszik ki különböző típusú agrárterületek (Foley et al, 2011), és ez az arány növekvő tendenciát mutat (Köhler és Triebkorn, 2013). A Központi Statisztikai Hivatal felmérése szerint Magyarország 79%-a (7 millió 356 ezer hektár) volt termőterület 2018-ban, ennek jelentős részét (5,3 millió hektár) képezik a mezőgazdasági területek (Központi Statisztikai Hivatal, 2018), amelyek az ország egész területének körülbelül 44%-át teszik ki (Eurostat, 2015). A mezőgazdasági növényvédő

szerek nemcsak a kártevőkre, hanem más, nem célszervezetekre is károsak lehetnek. Becslések szerint a peszticidek átlagosan 35-50%-a a talajra kerül közvetlenül a felhasználást követően (Chopra et al., 2010). Emellett több vizsgálat is megállapította, hogy növényvédő szerek szél által szállítva, a felhasználási helyszíntől nagy távolságokra is képesek eljutni (van Dijk és Guicherit, 1999) és negatívan befolyásolni az ott élő állatokat (Davidson és Knapp, 2007). Legtöbbjük viszonylag perzisztens, azaz a környezetben hosszú ideig megmaradnak, és bioakkumulációra is képesek, tehát felhalmozódhatnak a táplálékláncokban, és az egyre magasabb táplálkozási szinteken található egyedekben egyre nagyobb koncentrációt érhetnek el, valamint interakcióba kerülhetnek más stresszorokkal is (Chopra et al., 2010.; Köhler és Triebskorn, 2013; Relyea és Hoverman, 2006).

A terbutilazint az atrazin (1. ábra) hatóanyag tartalmú gyomirtó szerek helyettesítésére használják, főleg kukorica és napraforgó kétszikű gyomnövényei ellen (Pethő et al., 2015). Mindkét vegyület a triazinok közé tartozó talaj- és levélherbicid (Almádi et al., 2011). Mind az atrazin, mind a terbutilazin kifejezetten vízveszélyes anyag és bioakkumulációs képessége is ismert (Pethő et al., 2015; European Chemicals Agency, 2019). Számos kutatás támasztja alá, hogy az atrazin endokrin diszruptorként hat különböző élőlényekre, köztük az emberre is, azaz a hormonrendszer működését befolyásolja és ezen keresztül számos káros szubletális hatása lehetnek (Rohr, 2018, Rohr és McCoy, 2010, Orton és Tyler, 2014, Pathak, és Dikshit, 2011). Az atrazin tartalmú szerek használatát az Európai Unió 2004-ben tiltotta be, hazánkban 2007-ig voltak használatban, mert „a mezőgazdaság számára nélkülözhetetlen” kategóriába tartoztak az Unióhoz való csatlakozás idején (vagyis nem volt megoldott a helyettesítésük) (Pethő et al., 2015). Betiltása ellenére, mivel az atrazin rendkívül perzisztens, ma is előfordulhat a talajokban és vizekben (Pethő et al., 2015).



1. ábra: Balra az atrazin (6-Chlor-N-ethyl-N'-isopropyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin), jobbra a terbutilazin (6E)-4-Chlor-6-(ethylimino)-N-(2-methyl-2-propanyl)-1,6-dihydro-1,3,5-triazin-2-amin) szerkezeti képlete (forrás: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

A terbutilazin gyakran megtalálható a felszíni vizekben, általában alacsony koncentrációban (európai folyókban átlagosan 9 ng/L) (Loos et al., 2009), de a növényvédő szerek alkalmazása után, a lemosódás következtében a koncentráció ennek több mint 50-szeresét, 0,5 µg/L-t is elérheti (Antić et al., 2015; Wittmer et al., 2010), különösen a kétéltűek által kedvelt sekély kisvizekben (Bókony et al., 2018). A terbutilazin veszélyességét fokozza, hogy biodetoxifikációja a talajban nehézkes, nagyon kevés, mindössze 3-4 mikroba törzs képes lebontani a terbutilazint, és a maradékanyagok ezután is toxikusak maradnak (Háhn et al., 2017).

Az atrazint számos ökotoxikológiai tanulmányban vizsgálták, halakra és kétéltűekre gyakorolt káros hatásai jól ismertek: befolyásolhatja a növekedést és fejlődést, hiperaktivitást és megváltozott ragadozó elkerülő viselkedést válthat ki, nőstény-túlsúlyos ivararányhoz vezethet, valamint negatívan befolyásolhatja az immunrendszer működését (Rohr és McCoy, 2010; Van Der Kraak, 2014; Köhler és Triebkorn, 2013). Egy szalamandra faj (*Ambystoma tigrinum*) esetén, az alacsony koncentrációt (0,075 mg/L atrazin) tartalmazó kezelési csoportban az állatok később alakultak át, a magasabb koncentráción (0,25 mg/L atrazin) pedig kisebb testméretűek és alacsonyabb tömegűek voltak. Ugyanebben a vizsgálatban azt is megfigyelték, hogy az egyedek plazma tiroxin hormonszintje szignifikánsabban magasabb, a kortikoszteron hormonszintje alacsonyabb volt mindkét koncentráción (Larson et al., 1998). Ezek a fejlődési idő lerövidítésével

hozhatóak összefüggésbe, ugyanis kétéltűeknél ez a két hormon a metamorfózis fő irányítója (Hayes, 1997; Rohr és McCoy, 2010; Van Der Kraak, 2014). Egy afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett vizsgálatban az atrazin teljes feminizációt okozott, miután a lárvális periódus alatt 0,0025 mg/L atrazinnak tették ki az állatokat. A demaszkulinizáció kevésbé kifejezett másodlagos nemi jellegekben, csökkent tesztoszteron szintben és alacsony fertilitásban nyilvánult meg (Hayes et al., 2010). Hasonló hatást figyeltek meg egy másik békafaj (*Acris blanchardi*) esetén, ahol ökológiailag releváns (0,0001, 0,001 és 0,01 mg/L) atrazin koncentrációkat alkalmaztak. A kontroll csoporthoz képest több, mint 50%-kal kevesebb hím volt az atrazinos kezelési csoportban (Hoskins és Boone, 2018). Az atrazin hiperaktivitást kiváltó hatását több ízben is kimutatták. Egy levelibéka faj (*Osteopilus septentrionalis*) esetén, a 178 mg/L atrazinnak kitett lárvák nagyobb aktivitást mutattak a kontroll csoporthoz képest, és ez az aktivitás ragadozó (szitakötő lárva) szag jelenlétében sem csökkent (Ehram et al. 2016), ami arra utal, hogy az atrazinnal kezelt csoportban lévő egyedek képtelenek voltak a ragadozó kémiai jeleinek felismerésére és/vagy elkerülésére, ami nagyobb predációs kockázattal jár (Skelly 1994). Egy szalamandra fajnál (*Ambystoma barbouri*) is leírták a megnövekedett aktivitást a kísérlet 40 és 400 mg/L atrazint tartalmazó kezeléseseinél, illetve ugyanezen csoportok esetén az állatok vízviszatartó képessége is csökkent 8 hónappal a kezelés után (Rohr és Palmer 2005). Az atrazin hatására történő lokomotoros aktivitás növekedés hátterében hasonló fiziológiai folyamatok állhatnak, mint emlősök esetében; a vegyület kompetítorként léphet fel a gamma-aminovajsav gátló neurotranszmitterrel szemben (Rohr és McCoy, 2010) és így hatást gyakorolhat a központi idegrendszer dopaminerg idegpályáira, amelyek a motoros működések szabályozásáért felelnek.

Az atrazin alacsony koncentrációinak immunszuppresszív hatását több laborkísérletben is kimutatták Ranidae családba tartozó békákon (Rohr et al., 2008). Egy tanulmány, amelyben természetben előforduló koncentrációkat alkalmaztak, kimutatta, hogy a korai lárva stádiumban 6 napig atrazinnak kitett ebihalak fogékonyabbak a világszerte nagy kétéltű pusztulást okozó *Batrachochytrium dendrobatidis* gombafajra, és emiatt a mortalitási esélyük is megkétszereződik (Rohr et al., 2013). Egy másik, terepi vizsgálatban azt tapasztalták, hogy a parazitákkal való fertőzöttség legjobb prediktora a vizekben található atrazin (és bomlástermékének) koncentrációja volt (Rohr et al., 2008). Ráadásul az atrazin közvetve is növelheti a parazitákkal való fertőzöttséget azáltal, hogy elpusztítja az édesvizek fitoplanktonjait, így a fény mélyebbre tud hatolni és perifiton

növekedést eredményez, ez pedig tápláléka a paraziták köztigazdáinak, a csigáknak (Rohr et al., 2008). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a peszticidek számos ponton befolyásolhatják az ökológiai rendszereket, és ezek a közvetlen, illetve közvetett hatások egymást erősítve okozhatják a kétéltű populációk csökkenését (Köhler és Triebkorn, 2013).

A kétéltűek és más változó testhőmérsékletű gerinces állatok immunrendszerének legfőbb szerve a lép, amelynek mérete információt adhat az immunrendszer állapotáról (Hadidi et al., 2008; Steinel és Bolnick, 2017). Egy kísérlet során, melyben egy bizonyos baktérium ellen rezisztens szívárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) vonalakat hoztak létre, felfigyeltek arra, hogy a rezisztens egyedek lépe nagyobb volt a baktériumra érzékeny állatokéhoz képest. Ezután a rezisztensnek és érzékenynek jelölt vonalakból kialakítottak kis, közepes és nagy léppel rendelkező csoportokat, megfertőzték őket a baktériummal és vizsgálták a túlélést. Ahogy várható volt, a nagyobb léppel rendelkező egyedek túlélése magasabb volt (Hadidi et al., 2008). Egy vizsgálat során, amelyben az atrazin viszonylag magas koncentrációinak (1,5– 13,5 mg/L) tettek ki halakat, azt találták, hogy lépméretük csökkent (Rohr és McCoy, 2010). A lép mérete mellett annak pigmentáltsága is fontos mutatója a kétéltűek és halak immunfunkcióinak (Steinel és Bolnick, 2017). Ezen fajok lépében az ún. melanomakrofágok sötét színű pigmentált foltokat alkotnak (2. ábra). Ezek a sejtcsoportok valószínűleg az emlősök limfoid szöveteiben megtalálható csíracentrumokkal azonos szerepet töltenek be, azok „primitív” előfutárának tekinthetőek, tehát az adaptív humorális immunválasz kialakításában lehet szerepük (Agius és Roberts, 2003). A melanomakrofágok melanint termelnek, amely pigmentnek fontos szerepe van a szabadgyökök megkötésében és neutralizálásában halak esetében (Pérez-Iglesias et al., 2016). A melanomakrofág csoportok számának és aggregációjának fokozódását többször megfigyelték fertőzések kialakulását követően, de reagálhatnak a megváltozott fiziológiai vagy környezeti tényezőkre is (Van Der Kraak, 2014, Pérez-Iglesias et al., 2016). Egy összetett tanulmányban két békafaj (*Lithobates palustris* és *Lithobates calamitans*) ebihalait tették ki 0,117 mg/L atrazinnak egy mezokozmosz kísérlet keretein belül négy héten át, és azt tapasztalták, hogy a máj melanomakrofágjainak száma csökkent az *L. palustris* esetén, míg a *L. calamitans* fajra nem volt hatással. Ugyanebben a tanulmányban a terepen végzett vizsgálatok alkalmával szintén a melanomakrofágok aggregációjának csökkenését állapították meg az atrazinnal szennyezett vizekből begyűjtött *Rana pipiens* faj egyedeinél (Rohr et al., 2008). Egy másik

vizsgálatban egy dél-amerikai békafaj (*Leptodactylus latinasus*) egyedeinek adtak be egy gyakran használt gyomirtószer hatóanyagot, a glifozátot, és mind a három koncentráción (100, 1000, és 10,000 µg/g) a melanomakrofág sejtek melanint tartalmazó pigmentált részeinek növekedését tapasztalták 48 óra eltelte után (Pérez-Iglesias et al., 2016).

Az atrazinnal szemben, a terbutilazinnal kapcsolatos ökotoxikológiai vizsgálatok száma alacsony. A Scopus adatbázisában 350, a Web of Science adatbázisában 216 találatot kapunk az atrazine AND ecotoxicolog* kulcsszavas keresésre, míg a keresést terbuthylazine AND ecotoxicolog* szavakkal megismételve (2020. 04.10.), mindössze 25, illetve 18 cikket jelenítenek meg az adatbázisok. Ha ezt a keresést az atrazine AND amphibian*, és a terbuthylazine AND amphibian* kulcsszóval végezzük el, akkor atrazin esetén 187, illetve 244, terbutilazin esetén mindössze 2 találatot kapunk mindkét adatbázis esetén (2020. 04.10.). Ezek a számok jól illusztrálják, hogy az atrazin jól ismert káros hatásaival szemben a terbutilazinnal aggasztóan kevés a publikált ismeret. Néhány, halakon végzett tanulmány megerősíti, hogy a terbutilazin, az atrazinhoz hasonlóan, negatívan hat a növekedésre, fejlődésre, illetve a viselkedésre. Egy 30 napos toxicitás teszt kereteiben, amelyet ponty (*Cyprinus carpio*) lárvákon végeztek el, ökológiailag releváns koncentrációkkal (0,0009, 0,16, 0,52, 0,82 mg/L terbutilazin), a két legmagasabb koncentrációnak kitett lárvák esetén kimutatták, hogy mind a testhossz, mind a testtömeg alacsonyabb volt a kontroll csoport egyedeihez képest (Štěpánová et al., 2012). Egy másik, zebradánió (*Danio rerio*) végzett kísérletben azt találták, hogy a terbutilazinnak kitett lárvák szignifikánsan nagyobb arányban mutattak abnormális úszási viselkedést, bár meglehetősen magas koncentrációkat (3,2, 6,5, 9,7, 13 és 16,2 mg/L) alkalmaztak (Pérez et al., 2013). Az egyetlen általam ismert tanulmányban, amelyben kétélűek kapcsán toxikológiai szempontból vizsgálták a terbutilazin hatásait, azt találták, hogy a terbutilazin szignifikánsan befolyásolta az epitheliális transzportot kioperált *Rana esculenta* bőr darabok esetén, a nátrium ionok beáramlását fokozta, míg a kiáramlásra nem volt hatással (Cassano et al., 2005). Tudomásom szerint eddig egyetlen tudományos publikáció sem foglalkozott *in vivo* a terbutilazin kétélűekre gyakorolt ökotoxikológiai hatásaival.

Az *in vivo* kísérletekben ökotoxikológiai szempontból különösen fontosak az ún. apikális végpontok, amelyek a szervezet vagy akár a populáció egészére gyakorolt hatásokat mérik. Ezek a tulajdonságok plasztikusak, tehát az állatok képesek reagálni a környezetre ezek változtatásával és trade off-ot kialakítani, például rövidebb idő alatt, de alacsonyabb testtömegnél érni el a metamorfózist a szennyezett víz elhagyása érdekében

(Heatwole et al., 2009). Az exogén anyagok okozta testtömeg csökkenés (Rohr és McCoy, 2010) kihat a kétéltűek szaporodási képességére és túlélésére egyaránt, például a nagyobb testtömeggel átalakult egyedek nagyobb eséllyel élnek túl a téli hibernációt (Vági, 2014; Üveges et al., 2016). A hiperaktivitás egyértelműen növeli a predáció kockázatát (Skelly, 1994). Az ivararány eltolódása, illetve a gonádok rendellenességei szintén fontos jelzői a reprodukív potenciál sérülésének (Orton és Tyler, 2015), a lép mérete és pigmentáltsága pedig az immunrendszer állapotának mutatói (Hadidi et al., 2008; Steinel és Bolnick, 2017). Ezeket a tulajdonságokat tehát fitnessz-befolyásoló szerepük miatt a terbutilazin esetében is fontos lenne vizsgálni.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk a terbutilazin gyomirtó szer ökotoxikológiai vizsgálata volt barna varangyok (*Bufo bufo*) és erdei békák (*Rana dalmatina*) esetében. A szubletális hatások detektálásához számos olyan tulajdonságot vizsgáltunk, amelyek az állatok rátermettségének szempontjából fontosak a természetben: az átalakulásig eltelt időt, az átalakuláskori testtömeget, az állatok viselkedését és ivararányát, valamint a lép állapotát. Predikciónk szerint a terbutilazin hasonló szubletális hatásokat idézhet elő kétéltűeknél, mint a hozzá szerkezetileg nagyon hasonló atrazin, vagyis rövidítheti/hosszabbíthatja az egyedfejlődés sebességét, csökkent testtömeget eredményezhet, hiperaktivitást okozhat, illetve csökkentheti az immunfunkciókat.

Ezeknek a tulajdonságoknak a vizsgálatára olyan kísérletet terveztünk, amelyben különböző populációkból származó állatokat teljes lárvális fejlődésük során terbutilazint tartalmazó, vagy nem tartalmazó vízben tartottunk, a terbutilazinnak két (egy alacsonyabb és egy magasabb), természetben is előforduló koncentrációját alkalmazva, hogy a természetes környezetre leginkább jellemző szennyezettség hatásait minél pontosabban modellezhessük. Az állatok fejlődését és egészségi állapotát a kezelés végét követően több hónapig követtük nyomon, hogy az esetlegesen hosszabb távon megmaradó hatásokat is vizsgálhassuk.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A vizsgált fajok

Két vizsgált fajunk, az erdei béka (*Rana dalmatina*) és a barna varangy (*Bufo bufo*), Magyarország szinte teljes területén jelen van (Agasyan et al., 2009; Kaya et al. 2009). Mind az erdei béka, mind a barna varangy potenciálisan veszélyeztetett gyomirtó szer használat szempontjából, ugyanis bármely víztest közelében képesek megtelepedni, amelynek közelében legalább egy kevés fás vegetáció található, illetve gyakran mérsékelt antropogén környezetben is megtaláljuk őket (Agasyan et al., 2009; Kaya et al. 2009), így agrárterületek közvetlen közelében is. A szennyezett élőhelyeken az egymást követő generációk ki lehetnek téve az ártalmas vegyületek, ugyanis a kétélűekre jellemző a szaporodóhely-hűség (Semlitsch, 2008). Az ivarérett egyedek ugyanarra a területre térnek vissza szaporodni, ahol átalakultak. A felnőtt barna varangyok 79-96%-a, a juvenilis egyedek 81%-a visszatér eredeti szaporodóhelyére (Reading et al, 1991). Egy másik vizsgálatban a *Rana sylvatica* faj esetén 100%-os helyhűséget figyeltek meg (Berven és Grudzien, 1990). Minden kétélű faj védett Magyarországon, így a két választott faj is. A barna varangy és az erdei béka is gyakorinak számít hazánk területén (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, 2019), az egész elterjedésüket tekintve mindkét faj a „nem fenyegetett” kategóriába tartozik, a barna varangy populációi stabilnak mondhatóak, az erdei békák esetén az aktuális populáció trend a csökkenő besorolást kapta (IUCN Red list, 2019).

4.2. Terepi begyűjtés

A peték begyűjtése erdei békák esetében 2018. március 13. és 16. között, barna varangyok esetében 2018. április 9-én történt az adott faj által szaporodóhelyként használt helyszínekről. A rendszeres terepi ellenőrzésekkel biztosítani tudtuk, hogy minden esetben frissen lerakott (egy napnál nem régebbi) petéket gyűjthessünk. Összesen hat befogási helyszínünk volt, fajonként 3-3 tó. Az erdei békák esetén a kiválasztott három víztest a Szárazfarkas-tó (47°44'4,12"N, 18°49'7,04"E), a Kerek-tó (47°38'41,22"N, 18°46'31,59"E) és a pilisvörösvári horgásztórendszer (47°36'40,02"N, 18°55'9,45"E) volt, varangyok esetén pedig a nagykovácsi Békás-tó (47°34'34,72"N, 18°52'8,06"E), a Garancsi-tó (47°37'25,38"N, 18°48'26,18"E), és a pesthidegkúti horgásztó (47°34'9,38"N,

18°57'17,09"E). Minden víztestből, amely a helyszínek közötti távolságok miatt egy-egy populációnak felel meg, összesen nyolc, véletlenszerűen kiválasztott petecsomóból vagy petezsinórból (azaz 8-8 családtól) gyűjtöttünk petéket, tehát nem az egész petecsomót, illetve petezsinórt gyűjtöttük be. A petéket közvetlenül a begyűjtés után az ATK Növényvédelmi Intézet julianna-majori laboratóriumába szállítottuk.

4.3. A kísérlet menete

Amíg a peteburok elhagyása nem történt meg, az embriókat 19 °C-on tartottuk, családonként egy-egy külön műanyag dobozban. A peték és később az ebihalak tartására RSW-t (reconstituted soft water) használtunk, ami olyan, reverz-ozmózis szűrőn megtisztított, UV-fénnyel fertőtlenített lágy víz, melyhez literenként a következő sókat adtuk hozzá: 48 mg NaHCO₃, 30 mg CaSO₄ × 2 H₂O, 61 mg MgSO₄ × 7 H₂O, 2 mg KCl. A laboratóriumban a természetes fotoperiódust követő fényviszonyokat állítottunk be.

Amikor az ebihalak elérték a szabadon úszó lárvastádiumot, vagyis a 25. fejlődési stádiumot (Gosner, 1960), minden családból 12 egyedet véletlenszerűen kiválasztva, egyenként helyeztük el őket 2 literes dobozokban, amelyek 1 liter RSW-t tartalmaztak, valamint inentől számítva 20 °C-ra állítottuk a laboratórium hőmérsékletét. A kísérletbe be nem vont ebihalakat visszaszállítottuk és szabadon engedték eredeti élőhelyükön. Összesen 576 ebihallal indult a kísérlet (3 kezelési csoport × 3 populáció × 8 család × 4 egyed családonként × 2 faj). A dobozok véletlen blokkos elrendezés szerint lettek elhelyezve a laborban. A vizet egy héten kétszer cseréltük, ugyanekkor az állatoknak ad libitum aprított spenótot is adtunk (emberi fogyasztásra szánt, fagyasztott spenót).

Az egyedeket 3 kezelési csoportba osztottuk be, amelyek a következők voltak: az alacsony koncentráció 0,003 µg/L terbutilazint tartalmazott, amely az európai folyókban mért medián (0,002 µg/L,) és átlag (0,009 µg/L) érték között helyezkedik el (Loos et al., 2009). A magas koncentráció 0,3 µg/L terbutilazint tartalmazott, amelyet kutatócsoportunk 2017-ben, hazai kételtű szaporodóhelyeken végzett vízkémiai vizsgálatai alapján állítottunk be (Bókony et al., 2018); ez a koncentráció nagyságrendileg hasonló a kisméretű patakokban mért átlaghoz (0,1 µg/L) (Lorenz et al., 2017) és a folyókban mért maximumokhoz (0,2-0,57 µg/L) (Loos et al., 2009). A kontroll kezelés literenként 1 µL/L etanolt tartalmazott, ugyanis a terbutilazin vízben való feloldásához etanolra volt szükség (tehát a terbutilazinos kezelések is tartalmazták ezt az etanol koncentrációt). Korábbi kísérletünk eredményei szerint ez a csekély mennyiségű alkohol nem befolyásolja az

ebihalak fejlődését (Verebélyi, 2017). A kísérlet során minden vízcsere alkalmával megújítottuk a kezeléseket. A koncentrációk ellenőrzéshez mindhárom kezelésből három héten át egy-egy mintát vettünk, majd egy akkreditált analitikai laboratórium folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (LC-MS) módszerrel meghatározta a minták pontos koncentrációit (SynTech Research Hungary Kft). Mindkét terbutilazinos kezelésben a nominális koncentráció közelében alakult a mért koncentráció (0,0031-0,0039, illetve 0,288-0,405 µg/L között), a kontroll kezelésben pedig nem volt detektálható a terbutilazin (<2 ng/L).

Az ebihalak viselkedését heti négy alkalommal figyeltük meg, erdei békáknál öt hétig, a rövidebb fejlődési idejű varangyoknál pedig négy héten át. Egy megfigyelési napon kétszer jegyeztük fel minden egyes ebihal viselkedését, az első megfigyelési kör reggel, a második délután zajlott. Minden megfigyelési körben ugyanabban a sorrendben figyeltük meg az egyedeket, a dobozok véletlen blokkos elrendezését követve. Egy konkrét megfigyelés egyedenként pár másodpercig tartott, az egyedeket a dobozok fölé tartott teleszkópos tükörrel figyeltük meg, ügyelve arra, hogy ne riasszuk meg az állatokat. A viselkedést 3 kategóriába soroltuk: táplálkozás (ennek során az ebihalak nem végeznek helyváltoztató mozgást, de a farkuk mozog), úszás, és mozdulatlanság (abban az esetben, ha az egyed semmilyen aktivitást nem mutatott a megfigyelés alatt).

Amint észleltük az adott fajban az első egyednél az átalakulás megkezdését (42. fejlődési stádium, a mellső végtagok megjelenése, [Gosner, 1960]), a viselkedés megfigyeléseket abbahagytuk. A metamorfózist megkezdett állatokat áthelyeztük egyesével 0,1 liter RSW-t tartalmazó, enyhén megdöntött dobozba, hogy az átalakulás során elhagyhassák a vizet. Az átalakulás megkezdésekor mértük az állatok testtömegét (\pm 0,1 mg), illetve feljegyeztük a lárvális fejlődés idejét, azaz a kísérlet kezdete óta (a 25. lárvastádium elérése óta) az átalakulás megkezdéséig eltelt napok számát.

Az átalakult egyedeket (46. fejlődési stádium, a fark teljes visszaszívása, [Gosner, 1960]) egyesével, nedvesített papírt és búvóhelyként egy tojástartó karton darabot tartalmazó, fedett dobozokba helyeztük, és néhány hónapos korukig neveltük őket. Az állatok heti kétszer kaptak élelmet ad libitum, eleinte terrárium állatok számára tenyésztett ugróvillásokat, majd 2-3 mm-es tücsköket, amelyeket meghintettünk vitaminokat, ásványi anyagokat és aminosavakat tartalmazó készítményekkel (Reptiland 76280, Promotor 43, 3:1 arányban). Az állatokat addig neveltük, amíg a gonádok fejlettsége elérte azt a szintet, amelyenél a két ivar már nagy bizonyossággal elkülöníthető (3-4 ábra), azaz amíg az

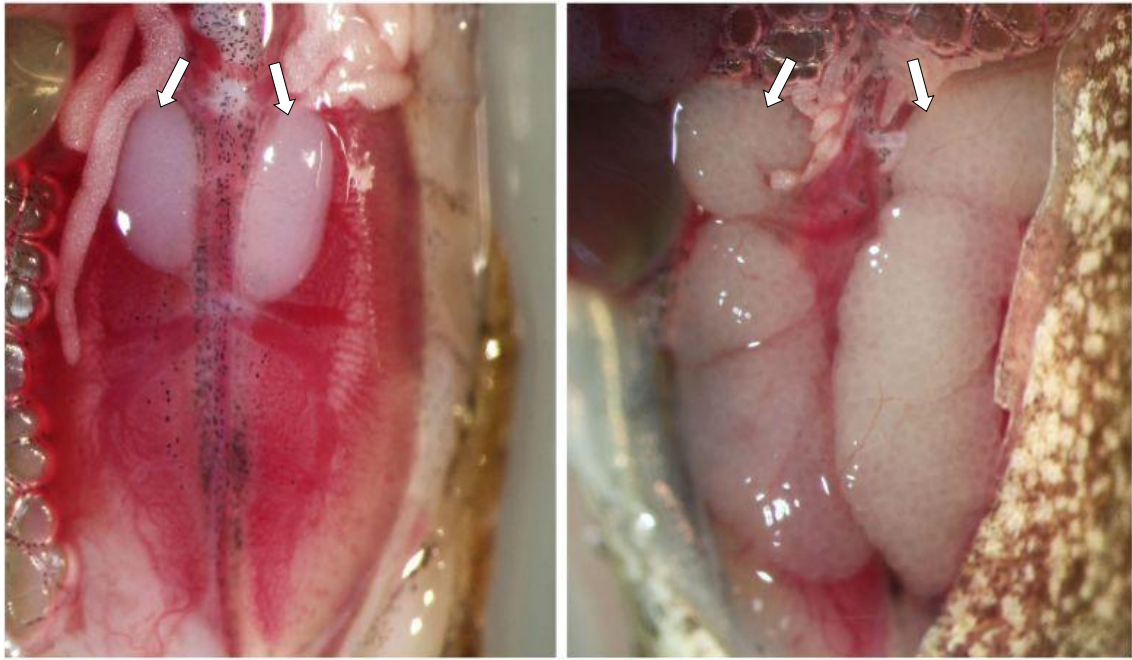
ivaréretlen egyedek fenotípusos szexálása lehetővé nem vált. Ez a két fajnál eltérő időben következik be; a *Rana* genusban a metamorfózis utáni 4. héten, míg *Bufo* genusban ehhez képest további 3,5 héttel később (Ogielska és Kotusz, 2004). Amíg az adott családban a legkésőbb átalakult állat el nem érte ezt a kort, addig nem kezdtük meg az adott család egyedeinek boncolását. Ezért az erdei békákat 1,5-3 hónapig, a barna varangyokat 3,5-4,5 hónapig neveltük metamorfózisuk után.

A boncoláshoz humánus módon túllattuk az állatokat 6,6 g/L MS-222-t tartalmazó vízfürdőben, amelybe azonos koncentrációban dinátrium-foszfátot adagoltunk, hogy az altató pH-ja semleges legyen, és ne irritálja az állatok bőrét. Ezután felboncoltuk őket és sztereomikroszkóp segítségével (Olympus SZX12) a lépről fotókat készítettünk (a mikroszkóphoz csatlakoztatott Canon EOS 60D típusú fényképezőgéppel) 45×-ös nagyításban. Dokumentáltuk, hogy tapasztalható-e polysplenia (többlépűség, 2. ábra) az adott egyednél, valamint feljegyeztük az állatok ivarát (3-4. ábra). A boncolás során az emésztőtraktust a gyomor kezdetétől a kloákáig kivágtuk, majd lemértük, hogy az esetlegesen a bélben található táplálék tömegével korrigálni tudjuk a boncoláskori testtömeget, amelyet közvetlenül az eutanázia előtt mértünk le (± 0.01 g).

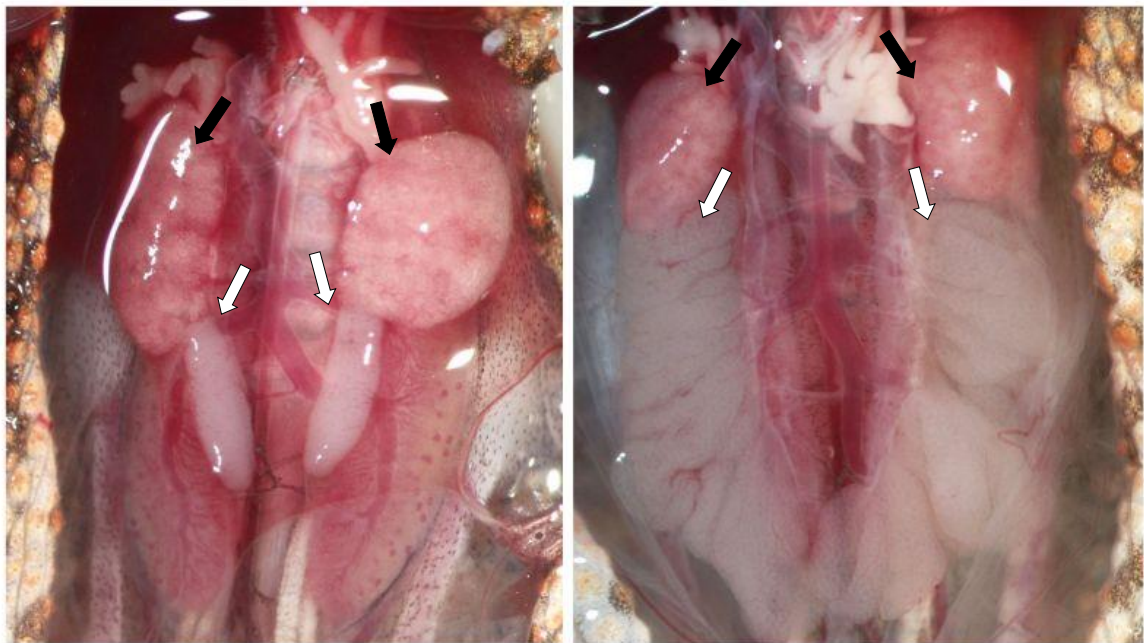
A lépről készített képeket JPEG formátumban elmentettük, majd az ImageJ szoftver (Schneider et al., 2012) segítségével lemértem a lép területét ("freehand selections" eszköz), illetve azt, hogy a lép felületének hány százalékát borítják pigmentált foltok ("threshold" eszköz), kihagyva azokat az egyedeket, amelyeknél polysplenia vagy gyenge képminőség miatt a mérés nem volt egyértelmű. A pixelben mért értékeket lefotózott mm-papír segítségével számoltam át mm² értékre. A módszer érvényességének alátámasztására vizsgáltuk a mérés személyen belüli ismételhetőségét, ezért a JPEG formátum mellett egy veszteség mentes formátumban (Canon Raw) is lemértem ugyanazon 37 állat lépméretét és pigmentáltságát, majd a két mérés értékeit összevetve kiszámítottuk az osztályon belüli korrelációs együtthatót (ICC) és annak 95%-os konfidencia intervallumát (KI). Ez alapján mindkét változó esetén magas ismételhetőséget kaptunk (lépméret: ICC = 0,989, 95% KI: 0,978 – 0,994, $F_{36,37} = 173$, $p < 0,001$; lép pigmentáció: ICC = 0,856, 95% KI: 0,739 – 0,923, $F_{36,37} = 12,9$, $p < 0,001$).



2. ábra: Lép; balra normál lép (*Bufo bufo*) (fehér nyíl), jobbra polysplenia (fehér nyíl) (*Rana dalmatina*). A sötét, amorf alakú foltok melanomakrofág csoportok (fekete nyilak) (fotó: Verebélyi Viktória)



3. ábra: Erdei béka ivarok; balra a hím (fehér nyilak: bab alakú, szürkésfehér herék a vesén), jobbra a nőstény (fehér nyilak; a petefészkek eltakarják a vesét) (fotó: Verebélyi Viktória)



4. ábra: Barna varangy ivarok; balra a hím (fehér nyilak; hosszúkas alakú, szürkésfehér herék), jobbra a nőstény (fehér nyilak; a petefészkek) (fotó: Verebélyi Viktória). Mind a herék, mind a petefészkek elülső végén található egy sárgás-rózsaszínes, petefészkekre emlékeztető szerkezetű szerv, a Bidder-szerv (fekete nyilak), amely a varangyfélékre jellemző, ismeretlen funkciójú szerv

4.4. Adatelemzés

A két faj adatait külön elemeztem, az R 3.4.1 szoftver (R Core Team, 2018) segítségével. Mivel a kísérlet során az elpusztult egyedek száma igen alacsony volt, valamint a polysplenia előfordulási gyakorisága is alacsonyan alakult, ezt a két változót Fisher-féle egzakt teszttel vizsgáltam. A szubletális hatásokat lineáris kevert (LME) és általánosított lineáris kevert (GLMM) modellekkel elemeztem. A kevert modellekre azért volt szükség, mert az egy helyszínről (egy populációból), és azon belül egy petecsomóból/petezsínorból (azaz azonos szülőktől) származó egyedek egymástól nem független adatpontok. Ezért a modellekben a származási hely és a család egymásba ágyazott random faktorként szerepelt. Az LME modelleknél, a családok közötti jelentős szórás különbségek miatt, minden célváltozó esetén a „varIdent” függvény segítségével lehetővé tettem, hogy a modell az eltérő szórásokat figyelembe vegye. A GLMM modellek (logisztikus regresszió) esetén megvizsgáltam a diszperziós paramétert, amely minden esetben 1-hez közeli értéket adott, ezért binomiális hibaeloszlást alkalmaztam a modellekben. A lineáris modellekhez az R program „nlme” könyvtárának „lme” függvényét, valamint „MASS” könyvtárának „glmmPQL” függvényét használtam.

4.4.1. Metamorfózis adatok

Függő változóim az átalakuláskori testtömeg (mg) és a fejlődési idő (átalakulásig eltelt napok száma) voltak. Magyarázó változó volt a kezelés (3 csoport), valamint zavaró tényező lévén fix hatásként a hőmérséklet. Bár a laboratóriumban állandó volt a hőmérséklet, az egyes dobozok közötti kismértékű különbségek befolyásolhatták a fejlődést és növekedést, és ezért a lárvális fejlődés ideje alatt többször mértük a víz hőmérsékletét ($\pm 0,1$ °C). Hogy ne zavarjuk az ebihalakat, és a mérőműszerrel ne szennyezzük keresztbe a különböző kezeléseket kapó egyedek tartóvizét, a mérést az ebihalak dobozai közé helyezett, vízzel teli poharakban végeztük el. Minden egymás melletti 6 dobozhoz (melyek két sorban helyezkedtek el a polcon) egy-egy félliteres pohár tartozott, amelyben erdei békák esetén 4-szer, barna varangyok esetén 3-szor mértük meg a hőmérsékletet (a két faj eltérő hosszúságú lárvafejlődési ideje miatt). Az elemzésben minden ebihalhoz a hozzá tartozó pohárban mért hőmérsékletek átlagát használtam.

4.4.2. Viselkedés adatok

A lárvális viselkedés elemzéséhez két bináris (igen/nem) változót hoztam létre. Az aktivitás változóban az ebihalak minden mozgása, beleértve az úszást és a táplálkozást is igent kapott, a mozdulatlanság nemet. A táplálkozás változó esetén csak a táplálkozási viselkedés kapott igent, az úszás és mozdulatlanság pedig nemet. Az aktivitást és táplálkozási viselkedést is binomiális GLMM modellel elemeztem. Mivel a viselkedést befolyásolhatja a megfigyelő személye, az eltérő fényviszonyok (laboron belül, az egymás fölötti polcok között), a hőmérséklet, az állatok napi ritmusa (reggeli vagy délutáni kör), a legutóbbi vízcserétől (és friss táplálék beadásától) eltelt napok száma, és az állatok kora (az első viselkedés megfigyelés napja óta eltelt napok számaként megadva), ezért ezek a változók fix hatásként szerepeltek a modellekben. Mivel egy ebihalhoz több viselkedés leolvasás is tartozott, az egyed azonosítóját is random faktorként vettem be a modellekbe, a helyszín és azon belül a család random faktorba ágyazva.

4.4.3. Ivararány

Logisztikus regressziós (GLMM) modellel teszteltem, hogy a kezelési csoportokon belüli ivararány szignifikánsan eltér-e a kontroll csoport és a terbutilazinos csoportok között. Független változó az ivar (nőstény, hím) volt, magyarázó változók pedig a kezelés, az állatok boncolási kora (az átalakulás óta eltelt napok száma) és boncolási testtömege voltak. A boncolási testtömeget úgy kaptam meg, hogy az állatok boncolás előtt mért testtömegéből kivontam a kivágott béltraktus tömegét. Erre azért volt szükség, mert a boncolást megelőző néhány napos éheztetés ellenére az állatok gyomrában, illetve belében előfordult különböző mennyiségű táplálék.

4.4.4. Lép adatok

A lép méretét és pigmentáltságát LME modellekkel elemeztem, magyarázó változó volt a kezelés, az ivar, az állatok boncolási kora és testtömege. A polysplenia alacsony előfordulási gyakorisága miatt ezt a változót Fisher-féle egzakt teszttel hasonlítottam össze a kezelési csoportok között.

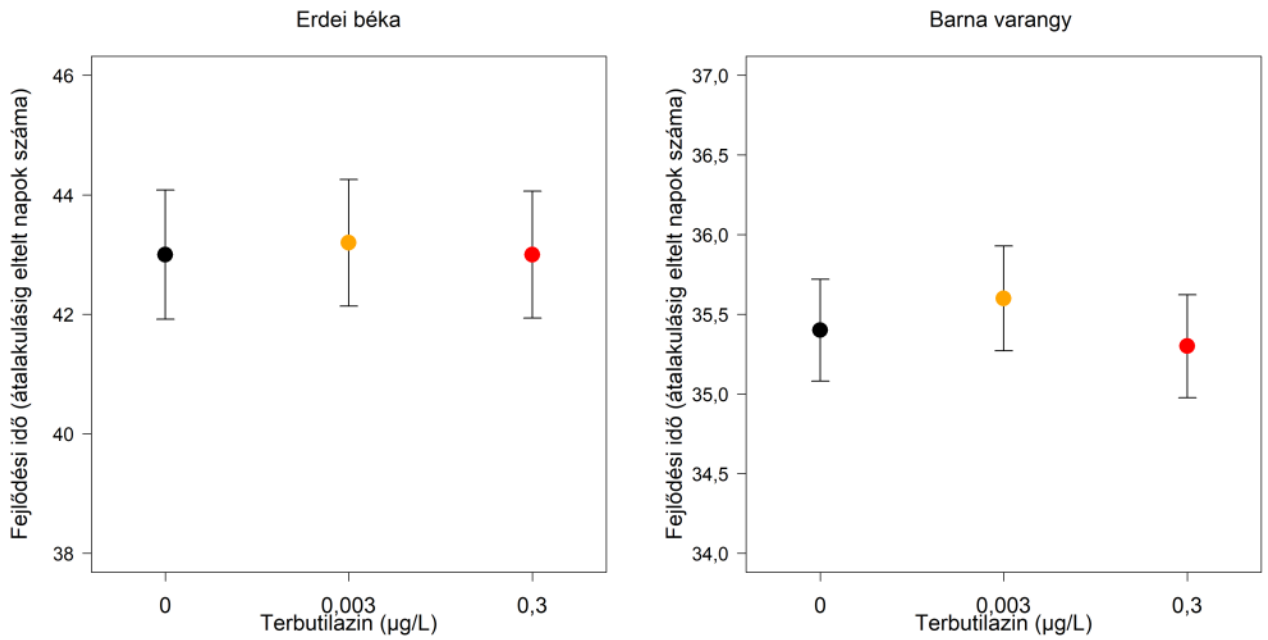
5. EREDMÉNYEK

5.1. Mortalitás

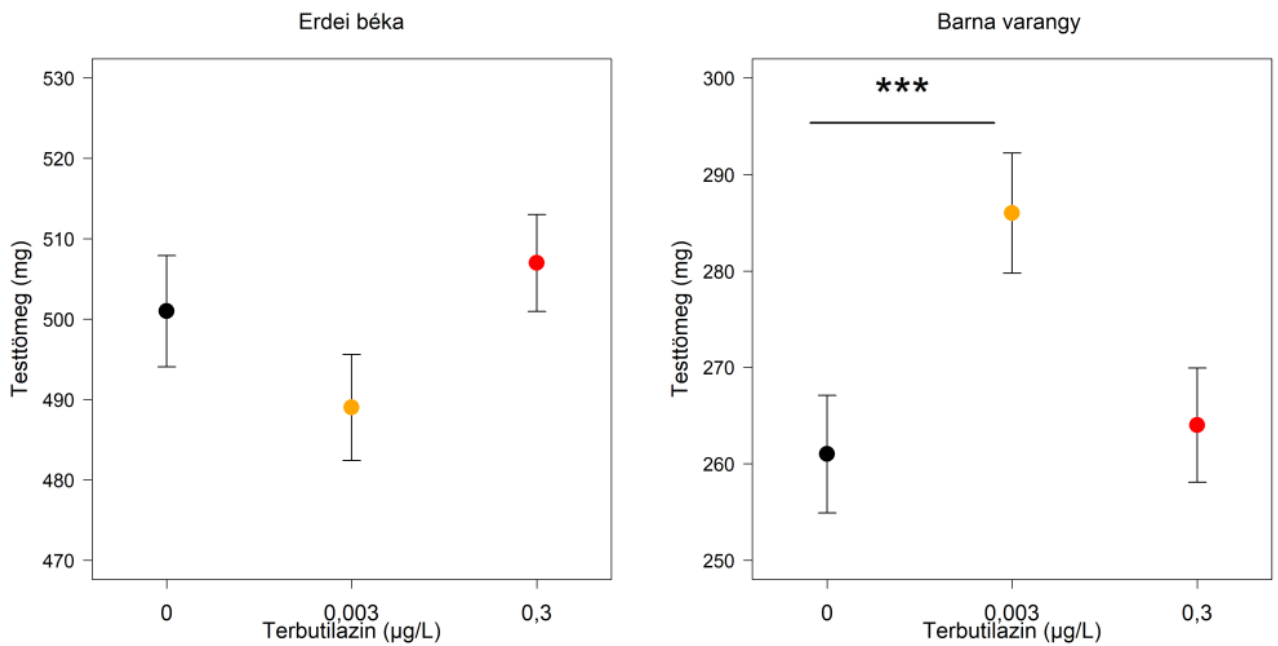
A kísérlet teljes ideje alatt alacsony volt a mortalitás, az induláskori 576 állatból 534 maradt életben a boncolásig. Az elpusztult egyedek száma egyik fajnál sem függött a kezelésektől (Fisher-féle egzakt próba, erdei béka: $p = 0,102$, barna varangy: $p = 0,780$). A kontroll csoportban az egyedek 8,9 %-a, az alacsonyabb koncentrációt tartalmazó kezelési csoportban 6,8 %, a magasabb koncentráció esetén 4,2 % pusztult el. A pusztulások ismeretlen okból, túlnyomórészt a kezelés befejezése után (a metamorfózis alatt vagy azután) következtek be.

5.2. Metamorfózis adatok

A fejlődési időt a terbutilazin egyik faj esetén sem befolyásolta szignifikánsan, sem az alacsony, sem a magas koncentráción (1-2. táblázat, 5. ábra). Erdei békáknál a terbutilazin nem hatott szignifikánsan az átalakuláskori testtömegre (3. táblázat). Ellenben a barna varangyoknál az alacsony koncentrációjú terbutilazin szignifikánsan növelte az állatok testtömegét (4. táblázat, 6. ábra), átlagosan 25 mg-mal (9,58 %-kal) a kontroll csoporthoz képest; a magasabb koncentrációnak azonban nem volt szignifikáns hatása. A hőmérséklet, mint zavaró tényező szignifikáns hatással bírt, a magasabb hőmérséklet mindkét faj esetén rövidítette a fejlődési időt, és ez az erdei békák esetében alacsonyabb testtömeggel is járt együtt az átalakuláskor (1-4. táblázat).



5. ábra: A fejlődési idő átlagának modell által becsült értékei a három kezelési csoportban (a bajusz a becslés standard hibáját jelöli).



6. ábra: Az átlagos testtömeg modell által becsült értékei a három kezelési csoportban (a bajusz a becslés standard hibáját jelöli) (***) ($p < 0,001$).

1. táblázat: A fejlődési idő (napok) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli 0°C hőmérséklet esetén, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	77,40	3,84	258	20,17	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	0,20	0,38	258	0,51	0,607
Terbutilazin 0,3 µg/L	0,08	0,38	258	0,21	0,833
Hőmérséklet (°C)	-1,87	0,20	258	-9,38	<0,001

2. táblázat: A fejlődési idő (napok) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangynál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli 0°C hőmérséklet esetén, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	56,85	7,30	257	7,79	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	0,20	0,23	257	0,87	0,386
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,10	0,22	257	-0,44	0,657
Hőmérséklet (°C)	-1,16	0,39	257	-2,95	0,003

3. táblázat: Az átalakuláskori testtömeg (mg) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli 0°C hőmérséklet esetén, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	1078,71	76,28	256	14,14	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	-12,61	7,55	256	-1,67	0,096
Terbutilazin 0,3 µg/L	5,11	6,98	256	0,73	0,465
Hőmérséklet (°C)	-31,35	4,11	256	-7,63	<0,001

4. táblázat: Az átalakuláskori testtömeg (mg) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangynál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli 0°C hőmérséklet esetén, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	422,52	156,85	256	2,69	0,008
Terbutilazin 0,003 µg/L	25,96	5,15	256	5,04	<0,001
Terbutilazin 0,3 µg/L	3,73	4,78	256	0,78	0,435
Hőmérséklet (°C)	-8,76	8,47	256	-1,03	0,302

5.3. Viselkedés adatok

Az erdei békák esetén a 0,3 µg/L terbutilazint tartalmazó kezelés szignifikánsan, 11 %-ról 8,6 %-ra csökkentette a mozgással töltött időt (5. táblázat), barna varangyoknál a lárvák aktivitására nem volt szignifikáns hatással a terbutilazin (6. táblázat). Az alacsony koncentráció esetén nem tapasztaltunk ilyen hatásokat, illetve a táplálkozási viselkedésben sem voltak szignifikáns különbségek a kezelési csoportok között egyik faj esetén sem (7-8. táblázat).

A zavaró tényezők (5-8. táblázat) közül a megfigyelők hatása mindig szignifikánsan eltért egymástól, emellett erdei békák esetén a hőmérséklet pozitívan hatott az állatok aktivitására. Ellenben a felső polcokon kisebb aktivitást mutattak. Barna varangyoknál a napszak, a vízcseré után eltelt idő és az állatok kora befolyásolta az aktivitást; délután illetve a vízcseré utáni 2. illetve 3. napon aktívabbak voltak az egyedek, ezen kívül az idő előrehaladtával csökkent a varangy ebihalak aktivitása. Erdei békáknál a hőmérséklet, az állatok kora pozitívan, a későbbi napszak és a felső polcok helyzete negatívan hatott a táplálkozási viselkedésre. A barna varangyok a délutáni napszakban és a vízcseré utáni 2. és 3. napon mutattak fokozottabb táplálkozási viselkedést, míg az idősebb állatok az idejük kisebb részét töltötték táplálkozással.

5. táblázat: Aktivitással (úszással vagy táplálkozással) töltött idő arányának általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-4,92	1,35	5434	-3,64	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	0,00	0,11	257	0,04	0,968
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,31	0,12	257	-2,60	0,010
Hőmérséklet (°C)	0,19	0,07	257	2,67	0,008
Megfigyelő B	0,34	0,11	5434	3,03	0,002
Megfigyelő C	-0,62	0,16	5434	-3,94	<0,001
Megfigyelő D	-0,09	0,13	5434	-0,67	0,504
Polc 2	-0,34	0,14	257	-2,50	0,013
Polc 3	-0,38	0,15	257	-2,57	0,011
Polc 4	-0,72	0,15	257	-4,95	<0,001
Polc 5	-0,49	0,14	257	-3,48	0,001
Kör: délután	-0,14	0,11	5434	-1,29	0,197
Vízcsere óta eltelt napok száma: 2	-0,07	0,10	5434	-0,71	0,479
Kor (eltelt napok száma)	-0,02	0,01	5434	-1,49	0,135

6. táblázat: Aktivitással (úszással vagy táplálkozással) töltött idő arányának általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangynál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-3,80	5,67	4310	-0,67	0,503
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,16	0,09	257	-1,72	0,087
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,03	0,09	257	-0,30	0,765
Hőmérséklet (°C)	0,16	0,31	257	0,53	0,598
Megfigyelő B	0,02	0,11	4310	0,14	0,887
Megfigyelő C	0,30	0,18	4310	1,71	0,088
Megfigyelő D	0,63	0,16	4310	3,99	<0,001
Polc 2	0,02	0,11	257	0,22	0,829
Polc 3	-0,04	0,15	257	-0,28	0,780
Polc 4	-0,07	0,18	257	-0,42	0,677
Polc 5	-0,07	0,22	257	-0,32	0,747
Kör: délután	0,27	0,11	4310	2,43	0,015
Vízcsere óta eltelt napok száma: 2	1,78	0,14	4310	12,30	<0,001
Vízcsere óta eltelt napok száma: 3	1,77	0,13	4310	13,54	<0,001
Kor (eltelt napok száma)	-0,14	0,02	4310	-6,54	<0,001

7. táblázat: Táplálkozással töltött idő arányának általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békánál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

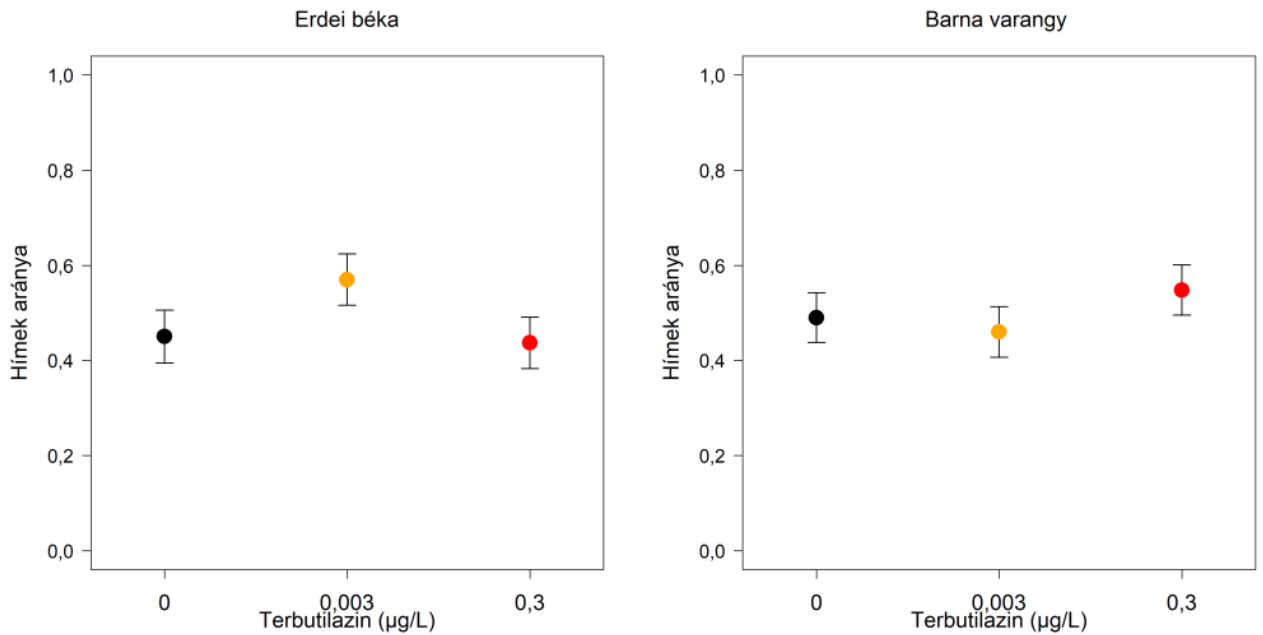
<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-8,86	1,96	5434	-4,51	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	0,01	0,15	257	0,06	0,951
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,24	0,15	257	-1,58	0,116
Hőmérséklet (°C)	0,34	0,11	257	3,17	0,002
Megfigyelő B	0,41	0,13	5434	3,18	0,002
Megfigyelő C	-1,16	0,22	5434	-5,26	<0,001
Megfigyelő D	-0,23	0,17	5434	-1,30	0,193
Polc 2	-0,24	0,18	257	-1,34	0,183
Polc 3	-0,39	0,20	257	-1,95	0,053
Polc 4	-0,59	0,19	257	-3,08	0,002
Polc 5	-0,43	0,19	257	-2,27	0,024
Kör: délután	-0,13	0,13	5434	-1,01	0,314
Vízcsere óta eltelt napok száma: 2	0,00	0,13	5434	-0,01	0,993
Kor (eltelt napok száma)	0,07	0,02	5434	3,91	<0,001

8. táblázat: Táplálkozással töltött idő arányának általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangynál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-2,02	5,57	4310	-0,36	0,717
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,06	0,09	257	-0,67	0,504
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,13	0,09	257	-1,45	0,149
Hőmérséklet (°C)	0,03	0,30	257	0,11	0,914
Megfigyelő B	-0,11	0,13	4310	-0,86	0,389
Megfigyelő C	0,27	0,22	4310	1,25	0,212
Megfigyelő D	0,65	0,18	4310	3,55	<0,001
Polc 2	0,02	0,11	257	0,20	0,843
Polc 3	0,08	0,14	257	0,56	0,579
Polc 4	0,15	0,17	257	0,86	0,389
Polc 5	0,08	0,22	257	0,37	0,708
Kör: délután	0,11	0,13	4310	0,82	0,411
Vízcsere óta eltelt napok száma: 2	1,47	0,17	4310	8,79	<0,001
Vízcsere óta eltelt napok száma: 3	1,37	0,15	4310	9,05	<0,001
Kor (eltelt napok száma)	-0,11	0,02	4310	-4,75	<0,001

5.4. Ivararány

A boncolás során az állatok nagy részének meg tudtuk állapítani a fenotípusos ivarát. A külső jegyek alapján nem egészséges, fejlődésben visszamaradott egyedeket, amelyek ivarának megállapítása bizonytalan volt, kihagytuk az elemzésből (a kontroll és a 0,003 µg/L terbutilazinos kezelésben 1-1 barna varangy, a 0,3 µg/L terbutilazinos kezelésben 1 erdei béka ivara volt bizonytalan). A kezelés nem volt szignifikáns hatással az ivararányra egyik faj esetében sem (9-10. táblázat). Varangyok esetén 1:1-hez közeli volt az ivararány minden kezelési csoportban (7. ábra). Azonban az erdei békáknál azt a nem szignifikáns (p-érték = 0,125) tendenciát tapasztaltuk, hogy az alacsony koncentrációjú terbutilazin kezelés növelte a hímek arányát: 57%-ra a kontroll csoport 44,6%-ához képest (7. ábra).



7. ábra: A hímek arányának modell által becsült értékei a kezelési csoportok között (a bajsz az becslés standard hibáját jelöli)

9. táblázat: Az ivararány (hímek aránya) általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

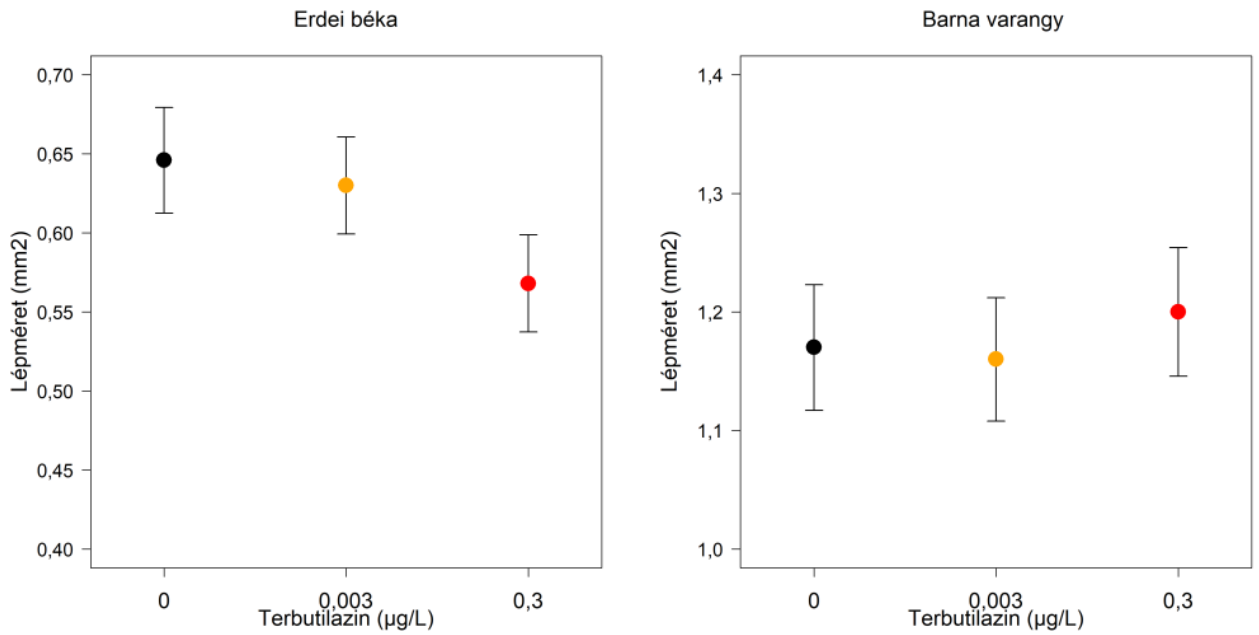
<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-0,69	1,02	229	-0,67	0,501
Terbutilazin 0,003 µg/L	0,48	0,31	229	1,54	0,125
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,05	0,31	229	-0,18	0,861
Boncolási kor (eltelt napok száma)	0,02	0,03	229	0,57	0,567
Testtömeg (g)	-0,47	0,92	229	-0,51	0,612

10. táblázat: Az ivararány (hímek aránya) általánosított (binomiális) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangynál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg, logit skálán)

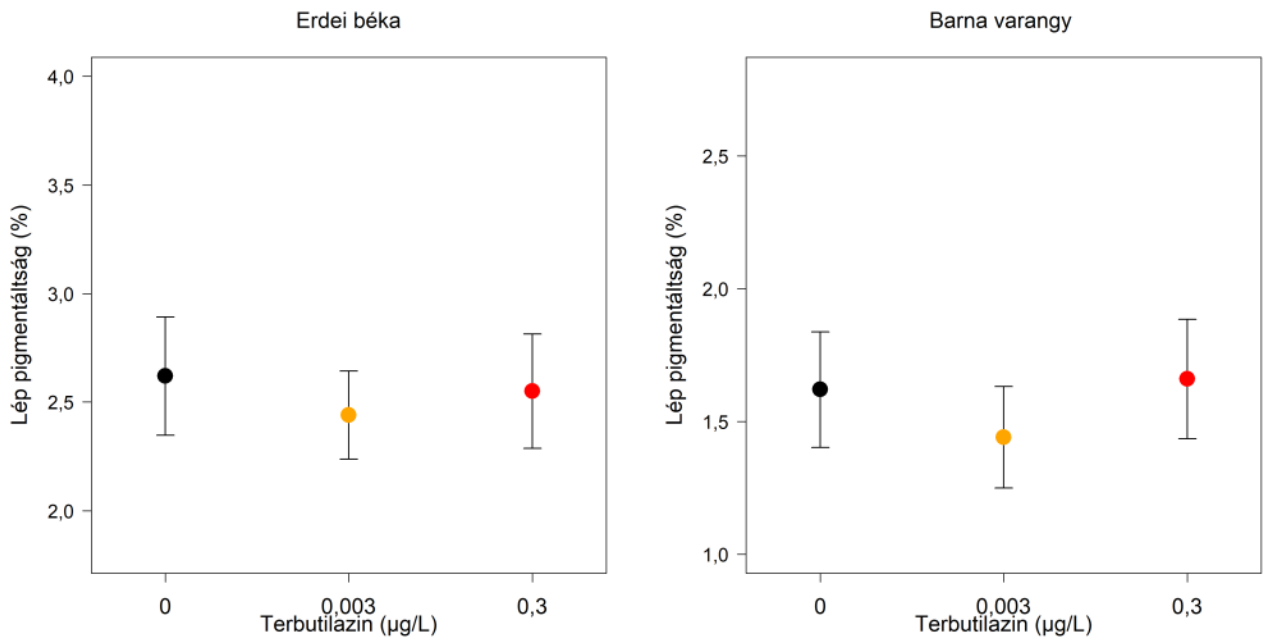
<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	0,47	2,02	244	0,23	0,818
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,12	0,30	244	-0,40	0,688
Terbutilazin 0,3 µg/L	0,23	0,30	244	0,78	0,436
Boncolási kor (eltelt napok száma)	-0,01	0,02	244	-0,44	0,659
Testtömeg (g)	0,15	0,20	244	0,75	0,451

5.5. Lép adatok

Erdei békáknál a magas koncentrációjú terbutilazin kezelés marginálisan nem szignifikánsan (p érték = 0,076), 12,1 %-kal csökkentette a lépméretet (11.táblázat, 8.ábra), azonban a lép pigmentáltságát egyik kezelés sem befolyásolta szignifikánsan (13.táblázat, 9. ábra). Barna varangyoknál a lép mérete és pigmentáltsága nem függött össze a kezelésekkel (12 és 14. táblázat, 8-9. ábra). Míg erdei békák esetén a lépméretre egyetlen zavaró tényező sem hatott szignifikánsan, addig barna varangyoknál az állatok boncoláskori testtömege és a kora is pozitívan befolyásolta azt (11-12. táblázat). A lép pigmentáltsága mindkét faj esetén csökkent az idősebb egyedéknél (13-14. táblázat). A polysplenia előfordulási gyakorisága (15. táblázat) egyik fajnál sem függött a kezelésektől (Fisher-féle egzakt próba, erdei béka: $p = 0,145$, barna varangy: $p = 0,573$).



8. ábra: Az átlagos lépméret modell által becsült értékei a három kezelési csoportban (a bajusz az becslés standard hibáját jelöli).



9. ábra: A lép átlagos pigmentáltságának modell által becsült értékei a három kezelési csoportban (a bajusz az becslés standard hibáját jelöli).

11. táblázat: A lépméret (mm²) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	0,41	0,14	75	2,87	0,005
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,02	0,04	75	-0,35	0,725
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,08	0,04	75	-1,80	0,076
Boncolási kor (eltelt napok száma)	0,00	0,00	75	1,11	0,269
Testtömeg (g)	-0,05	0,13	75	-0,38	0,707

12. táblázat: A lépméret (mm²) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangyoknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	-0,51	0,27	239	-1,86	0,064
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,01	0,03	239	-0,41	0,681
Terbutilazin 0,3 µg/L	0,03	0,03	239	0,82	0,414
Boncolási kor (eltelt napok száma)	0,01	0,00	239	3,97	<0,001
Testtömeg (g)	0,14	0,02	239	6,16	<0,001

13. táblázat: A lép pigmentáltság (%) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései erdei békáknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	7,82	0,91	71	8,56	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,18	0,26	71	-0,70	0,484
Terbutilazin 0,3 µg/L	-0,07	0,31	71	-0,21	0,834
Boncolási kor (eltelt napok száma)	-0,08	0,02	71	-3,05	0,003
Testtömeg (g)	-0,16	0,80	71	-0,20	0,844

14. táblázat: A lép pigmentáltság (%) lineáris kevert modelljének paraméterbecslései barna varangyoknál (az „intercept” paraméter a kontroll csoport átlagát becsli az összes többi magyarázó változó első vagy nulla értéke mellett, a többi paraméter az intercept-től való eltérést adja meg)

<i>Paraméterek</i>	<i>Becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p-érték</i>
Intercept (főátlag)	6,06	1,48	213	4,09	<0,001
Terbutilazin 0,003 µg/L	-0,18	0,18	213	-1,00	0,317
Terbutilazin 0,3 µg/L	0,04	0,21	213	0,18	0,855
Boncolási kor (eltelt napok száma)	-0,04	0,01	213	-2,88	0,004
Testtömeg (g)	0,09	0,13	213	0,67	0,505

15. táblázat: A polysplenia előfordulási gyakorisága (egyedszám) a kezelési csoportokban

<i>Faj</i>	<i>Kezelés</i>	<i>Polysplenia</i>	
		<i>Igen</i>	<i>nem</i>
Erdei béka	Kontroll	4	29
	Terbutilazin 0,003 µg/L	2	40
	Terbutilazin 0,3 µg/L	7	31
Barna varangy	Kontroll	3	76
	Terbutilazin 0,003 µg/L	1	84
	Terbutilazin 0,3 µg/L	3	81

6. DISZKUSSZIÓ

A terbutilazin gyomirtó hatóanyag kísérletünkben nem okozott számottevő mortalitást sem az erdei békák, sem a barna varangyok esetén. Ez megegyezik korábbi, más élőlénycsoportokra vonatkozó irodalmi adatokkal, melyek szerint a mg/L alatti, ökológiailag releváns koncentrációk nem indukálnak letális hatásokat terbutilazin (Štěpánová et al., 2012) és atrazin esetén sem (Kerby és Storfer, 2009; Rohr és McCoy, 2010). Ugyanakkor kísérletünkben számos szubletális hatást figyeltünk meg.

6.1. *Metamorfózis adatok*

Vizsgálatunk során nem tapasztaltunk különbségeket a terbutilazin hatására a metamorfózishoz szükséges idő tekintetében, egyik faj esetén sem. Ez az eredmény megegyezik több atrazinnal kapcsolatos tanulmány eredményével (Hayes et al. 2006; van der Kraak et al., 2014), azonban számos más vizsgálatban kimutattak eltéréseket a fejlődési időben atrazin hatására különböző kétéltű- és halfajokban (Rohr és McCoy, 2010). Az atrazin a vizsgálatok egy részében növelte, más részében csökkentette a fejlődés sebességét (Rohr és McCoy, 2009), feltehetőleg a fajok eltérő életmenet stratégiái miatt. A lárvastádium mind az erdei béka, mind a barna varangy esetében viszonylag rövid (erdei békáknál a metamorfózishoz szükséges napok számának mediánja 43, barna varangyoknál 35 nap volt), ezek a fajok tehát relatíve gyors fejlődésre vannak szelektálva, emiatt elképzelhető, hogy kevésbé hajlamosak a fejlődési idő megváltoztatásával reagálni a környezeti ártalmakra.

Bár az atrazinnal kapcsolatos tanulmányok nagy része testtömeg csökkenést írt le kétéltűek és halak esetén is (Rohr és McCoy 2010; van der Kaak et al., 2014), az erdei békáknál nem tapasztaltunk testtömegváltozást a terbutilazin hatására, és a magasabb koncentráció esetében a barna varangyoknál sem. Az utóbbi fajnál azonban mintegy 10%-kal nőtt a testtömeg a metamorfózis kezdetén az alacsony koncentráció hatására. Ez az eredmény azt jelenti, hogy nem-lineáris dózisfüggést mutat a terbutilazin hatása ebben az esetben. A kétéltűeknél a metamorfózis ideje és egy adott kemikália mennyisége közti nem lineáris kapcsolat egy gyakori jelenség, amit a metamorfózis komplexitásával magyaráznak, amely során rengeteg folyamat zajlik párhuzamosan (detoxifikáció, növekedés, hormonszint változás, új szervek kifejlődése, Rohr és McCoy 2009). Brodeur és társai (2013) hasonló nem lineáris jelenséget írtak le az atrazinnal kapcsolatban, ahol

Rhinella arenarum (amely szintén a Bufonidae családba tartozik) ebihalakat tettek ki az atrazin több koncentrációjának (0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/L). Azt tapasztalták, hogy a legalacsonyabb (0,1 µg/L), illetve a két legmagasabb koncentráció (100, 1000 µg/L) nem volt hatással a testtömegre és a testhosszra, viszont a közepes koncentrációk (1, 10 µg/L) szignifikánsan növelték mindkét testméret paramétert. Emellett a két magasabb koncentráción ezek a tulajdonságok már csökkenő tendenciát mutattak a kontroll csoporthoz képest, habár nem szignifikáns mértékben (Brodeur et al., 2013). Ebben a vizsgálatban ugyanezt a mintázatot figyelték meg a metamorfózishoz szükséges időben is, tehát a nagyobb tömeg a tovább tartó fejlődés eredménye lehetett. A szerzők hipotézise szerint az atrazin, hormon-moduláns vegyületeként való viselkedése miatt, komplex módon avatkozhatott bele a tiroid és glükokortikoid hormonok működésébe, amely az egyedfejlődést és a metamorfózist is szabályozza. A varangyok alacsony koncentráción tapasztalt testtömeg növekedése mögött is állhatnak hasonlóan összetett folyamatok (hormonrendszerrel kapcsolatos hatások), tehát lehetséges, hogy azért nem tapasztaltunk különbséget a testtömegben a magas koncentráción, mert ezzel a mennyiséggel a szer átlépte azt a szintet, ahol már negatív hatásokat váltott ki, és ez ellensúlyozhatta az alacsony koncentráció pozitív hatásait.

Vizsgálatunkban azonban a hosszabb fejlődési idő nem okozhatta a nagyobb testtömeget, mert a fejlődési időben nem kaptunk szignifikáns eltérést. Az sem valószínű, hogy a táplálékfelvételi rátát növelte volna a terbutilazin, mivel a viselkedés vizsgálatok alapján nem tapasztaltuk a táplálkozási viselkedés megnövekedett arányát, vagyis nem a több elfogyasztott táplálék járult hozzá a nagyobb testtömeghez. Egy lehetséges magyarázat a testtömeg növekedésére a bélhossz plaszticitása, vagyis az, hogy az ebihalak emésztőtraktusának hossza változhatott meg a terbutilazin hatására. Több tanulmány megállapította, hogy az ebihalak az életmenetük, morfológiájuk és viselkedésük mellett a bélhosszukat is képesek változtatni az aktuális környezetnek megfelelően (Relyea és Auld, 2004). Például rossz minőségű élelemforrás vagy erősebb táplálék-kompetíció esetén az emésztőtraktus nagyobb, hosszabb lesz, amely a tápanyagok hatékonyabb felszívódását teszi lehetővé (Relyea és Auld, 2004). Lehetséges, hogy a terbutilazinnak az atrazinhoz hasonló endokrin diszruptor hatásai vannak, így befolyásolhatta a hormonrendszert, amelyen keresztül hathatott a bél fejlődésére és növekedésére. Elképzelhető tehát, hogy kísérletünkben az alacsonyabb terbutilazin koncentráció növelte a varangy ebihalak bélhosszát, ezáltal hatékonyabb emésztést és nagyobb növekedési rátát tett lehetővé, így a

fejlődési idő és a táplálkozási ráta megváltoztatása nélkül is nagyobb testtömeget érhetnek el az ebihalak az átalakulásig. Ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

6.2. Viselkedés

Az erdei békáknál a terbutilazin magas koncentrációja csökkentette a mozgással töltött időt, az alacsony koncentrációnak nem volt hatása az ebihalakra. Hasonló eredményt kaptak egy tanulmányban, amelyben hal lárvákat (*Salvelinus namaycush*, *Oncorhynchus kisutch*) tettek ki rövidebb ideig (1-4 nap), de magasabb koncentrációjú (3,3-16,2 mg/L) terbutilazinnak; a lárvák úszási mozgása sérült és kisebb aktivitást mutattak (Pérez et al., 2012). Azok az ebihalak, amelyek apátiát mutatnak, keresgélés hiányában hátrányba kerülhetnek a táplálékért folyó kompetícióban, ez pedig csökkent növekedéshez és fejlődéshez is vezethet. Továbbá olyan esetekben, amikor a ragadozók elkerüléséhez nem rejtőzködés, hanem aktív mozgás szükséges, a csökkent aktivitás növelheti a predációs kockázatot, ha az állatok nem reagálnak megfelelően a ragadozó jelenlétére. Kísérletünkben ilyen következmények nem voltak, mivel az ebihalak versenytársak és ragadozók nélkül nevelkedtek, de természetes körülmények között a terbutilazin aktivitáscsökkentő hatása káros lehet.

6.3. Ivararány

Az alacsony koncentrációjú terbutilazinos kezelés erdei békáknál a hímek irányába eltolt ivararányt okozott, bár ez az eredmény nem adódott szignifikánsnak. Az alacsony koncentrációjú kezelésben 57% volt a hímek aránya, míg a kontroll csoportban 44,6%. Ez egy biológiailag jelentős különbség, azonban az arányok statisztikai elemzéséhez igen nagy mintaszámok szükségesek: a jelen különbséget 80%-os statisztikai erővel csoportonként 254 egyed vizsgálatával lehetett volna detektálni, ami körülbelül két és félszerese annak a mintaszámnak, amit a kísérletünkben biztosítani tudtunk ("power.prop.test" R függvény). Az általunk talált maszkulinizációs tendencia ellentmond azoknak a korábbi vizsgálatoknak, amelyek az atrazin feminizáló hatását figyelték meg (Rohr és McCoy, 2010). Ez az eredmény további vizsgálatokat tesz szükségessé a terbutilazin, mint alacsony koncentrációban potenciális endokrin diszruptorként viselkedő vegyület hatásainak detektálására, az ivararány és a populációk életképességének összefüggése miatt.

6.4. Lép

A lépén mért változók (lép méret és pigmentáltság, valamint polysplenia) egyikében sem tapasztaltunk eltéréseket az alkalmazott terbutilazin koncentrációk hatására egyik faj esetén sem. Azonban erdei békáknál a magas koncentrációjú terbutilazin kezelés marginálisan nem szignifikáns mértékben csökkentette a lépméretet. Ez párhuzamba állítható korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyekben az atrazin negatívan hatott az immunfunkciókra és növelte a paraziták általi fertőzöttséget (Rohr és McCoy, 2010). Ezekben a tanulmányokban általában nagyobb koncentrációkat alkalmaztak, ez lehet az oka annak, hogy vizsgálatunk esetében csak enyhe hatást figyeltünk meg. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy a terbutilazin valóban kevésbé immunszuppresszív, mint az atrazin.

6.5. Konklúziók

Összességében elmondható, hogy a korábbi irodalmi adatokkal összevetve, az atrazin hatásai nem prediktálták jól a terbutilazin kísérletünkben megfigyelt hatásait: az esetek egy részében a várt hatás elmaradt, más részében pedig ellentétes tendenciákat figyeltünk meg a két gyomirtó hatóanyag között. Vizsgálatunk eredményei rámutatnak arra, hogy a hasonló kémiai szerkezet, illetve azonos kémiai csoportba való besorolás nem adhat alapot arra, hogy hasonló ökotoxikológiai hatásokat feltételezzünk egy adott vegyületről, tehát szükséges minden szer külön történő ökotoxikológiai vizsgálata. Az olyan nagy mennyiségben használt anyagok esetében, mint a növényvédő és gyomirtó szerek, erre fokozottan szükség van, mivel elkerülhetetlen a természetes közegbe kerülésük. Továbbá, a barna varangyok és erdei békák eltérő reakciói rávilágítanak arra, hogy az egyes kételtű fajok szennyezőanyagokra való érzékenysége különbözhet, ezért populációik megőrzéséhez több információra van szükség a szennyező anyagoknak való kitettségéről és a környezetben előforduló koncentrációk fajspecifikus hatásairól. Ez egy kiemelten fontos feladat, amikor soha nem látott mértékű, folyamatosan súlyosbodó globális biodiverzitás csökkenéssel nézünk szembe.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A mezőgazdasági tevékenységből származó növényvédő és gyomirtó szerek nagymértékű terhelést jelentenek az agrárterületeken vagy azok közelében élő állatok populációira. Természetvédelmi és humán-egészségügyi szempontból is fontos, hogy minél több információnk legyen a különböző peszticidek ökotoxikológiai, nem célszervezetekre gyakorolt hatásairól. A terbutilazin egy széles spektrumú gyomirtó szer, amelyet hazánkban és világszerte is nagy mennyiségben használnak. A hasonló kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú, az Európai Unióban betiltott atrazin esetében a nem-célszervezetekre gyakorolt káros hatások jól ismertek, például kételtűek esetén befolyásolhatja az egyedfejlődés sebességét és az immunrendszert, csökkent testtömeget eredményezhet, hiperaktivitást és nőtény-túlsúlyos ivararányt is okozhat. Ezzel szemben a terbutilazin használatának ilyen jellegű kockázatairól nagyon keveset tudunk. Vizsgálatunkhoz barna varangy (*Bufo bufo*) és erdei béka (*Rana dalmatina*) petéket gyűjtöttünk különböző populációkból, majd laboratóriumi körülmények között neveltük őket. Az ebihalakat a lárvális fejlődés teljes időtartama alatt olyan vízben tartottuk, amely a terbutilazin két, természetes vizekben is előforduló koncentrációjának valamelyikét (0,3 µg/L; 3 ng/L), vagy csak oldószer kontrollt (1 µL/L etanol) tartalmazott. Kísérletünk során mértük azokat a tulajdonságokat, amelyek az állatok fitnessze szempontjából meghatározóak a természetben.

Az erdei békák testtömeget és a két faj fejlődési idejét nem befolyásolta a terbutilazin, azonban az alacsonyabb koncentrációjú terbutilazin növelte a varangyok metamorfózisig elért testtömeget. A varangyok viselkedését nem befolyásolta a kezelés, viszont az erdei béka ebihalak csökkent aktivitást mutattak a magasabb koncentráció hatására, amely ellentmond az atrazin megfigyelt hatásainak. A csökkent aktivitás káros következményekkel járhat: ezek az egyedek hátrányba kerülhetnek a limitált táplálékért folyó kompetícióban, illetve növelheti a predációs kockázatot, ha az állatok lassabban reagálnak a ragadozókra. A lép mérete és pigmentáltsága (az immunrendszer mutatói), valamint a polysplenia (többlépűség) előfordulási gyakorisága nem volt összefüggésben a kezelésekkel egyik faj esetén sem, bár a terbutilazin magas koncentrációja az erdei békáknál marginálisan nem szignifikáns mértékben, 12%-kal csökkentette a lép méretét. A kezelés az ivararányt nem befolyásolta szignifikánsan, bár erdei békáknál az alacsony koncentrációjú terbutilazin a hímek arányát 44,6%-ról 57%-ra növelte, ami szintén

ellentétes az atrazin hatásával. Az egyenlőtlen ivararány veszélyeztetheti a populáció fennmaradását, különösen gyenge terjedő képességgel rendelkező fajok esetén, mint amilyenek a békák. Eredményeink rávilágítanak, hogy nem általánosítható hasonló kémiai szerkezet alapján a peszticidek ökotoxikológiai hatása, és hogy a hatások fajoként eltérőek lehetnek, így minden egyes vegyület célzott vizsgálatára van szükség.

8. ABSRACT

Contaminants originating from agricultural areas reach natural water bodies and thus have considerable environmental impacts and can cause lethal and sublethal effects in non-target organisms, including wildlife and humans. In this study, we investigated the herbicide terbuthylazine used in agriculture worldwide and in Hungary as well. The herbicide atrazine which has similar chemical structure to terbuthylazine is banned in the European Union, because several studies suggest it is an endocrine disruptor. Atrazine can affect amphibians' development rate and immune system, and it can cause decreased body mass, hyperactivity, and female-biased sex ratio. However, the ecotoxicological effects of terbuthylazine are poorly known. We exposed two anuran species throughout their larval development to each of two environmentally relevant concentrations of terbuthylazine (0,3 µg/L and 3 ng/L; the control group received 1 µL/L ethanol as solvent control), and recorded several sub-lethal endpoints that are relevant for fitness in nature.

In common toads (*Bufo bufo*), we found that treatment with 3 ng/L terbuthylazine increased body mass at metamorphosis, but treatment with 0.3 µg/L terbuthylazine had no effect on body mass. In agile frogs (*Rana dalmatina*), treatment with 0.3 µg/L terbuthylazine decreased tadpole activity; this result contradicts the previously reported effects of atrazine. Reduced activity may have deleterious effects in nature: in competition for limited food it may put these individuals at a disadvantage, and predation risk may increase if the animals respond to the predators too slowly. The prevalence of polysplenia, and the spleen's size and pigmentation were not affected by the treatments, although in agile frogs we found that treatment with the higher concentration decreased spleen size by 12% (a marginally non-significant effect). Neither treatments affected the time to metamorphosis or sex ratios significantly, although in agile frogs the proportion of males increased from 44,6% in the control group to 57% in the low-concentration treatment. Unequal sex ratio may threaten to viability of populations especially in taxa like anurans which have limited dispersal.

These results show that environmentally relevant levels of terbuthylazine can have several sub-lethal effects on anurans, which may be harmful to individual fitness and population persistence in natural conditions. Our experiment highlights that toxic effects cannot be generalized between chemicals of similar structure, because the terbuthylazine

effects we observed do not conform with previously reported effects of atrazine. Therefore, it is important to study the ecotoxicological effects of every pesticide.

- Agasyan, A., Avisi, A., Tuniyev, B., Isailovic, J. C., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzüm, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U., (2009). *Bufo bufo*. The IUCN Red List of Threatened Species URL: <https://www.iucnredlist.org/species/54596/11159939> Megtekintve: 2019.10.20.
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499-509.
- Almádi, L., Béres, I., Berzsényi, Z., Horváth, Z., Hunyadi, K., Kazinczi, G., Lehoczky, É., Mikulás, J., Németh, I., Petrányi, I., Reisinger, P., Szemán, L., Szentey, L., Szőke, L., Tóth, E., Varga, Sz. (2000). Gyomnövények, gyomirtás, gyombiológia. Mezőgazda Kiadó.
- Antić, Nikolina, et al. "Pesticide residues in the Danube River Basin in Serbia—a survey during 2009–2011." *CLEAN—Soil, Air, Water* 43.2 (2015): 197-204.
- Berven, K. A., & Grudzien, T. A. (1990). Dispersal in the wood frog (*Rana sylvatica*): implications for genetic population structure. *Evolution*, 44(8), 2047-2056.
- 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. *Science of The Total Environment*, 634, 1335-1345.
- Brodeur, J. C., Sassone, A., Hermida, G. N., & Codugnello, N. (2013). Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 10-17.
- Cassano, G., Bellantuono, V., Ardizzone, C., & Lippe, C. (2006). Atrazine increases the sodium absorption in frog (*Rana esculenta*) skin. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(2), 509-513.
- Chopra, A. K., Sharma, M. K., & Chamoli, S. (2011). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 173(1-4), 905-916.
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). Extinction in our times: global amphibian decline. Oxford, Oxford University Press.
- Davidson, C., & Knapp, R. A. (2007). Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications*, 17(2), 587-597.
- Ehrsam, M., Knutie, S. A., & Rohr, J. R. (2016). The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(9), 2239-2244.
- European Chemicals Agency (2019). Atrazine. URL: <https://echa.europa.eu/hu/substance-information/-/substanceinfo/100.016.017> Megtekintve: 2019.10.20.
- European Chemicals Agency (2019). Terbutylazine. URL: https://echa.europa.eu/hu/substance-information/-/substanceinfo/100.025.125?disssubinfo_WAR_dissubsinforportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fhu%2Fsearch-for-chemicals%3Fp_id%3Ddisssimplesearch_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId%3DdisSimpleSearchSessionParam101401571643274974 Megtekintve: 2019.10.20.
- Eurostat (2015). Land cover statistics. *Eurostat*, 2015, URL: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Land_cover_statistics#Land_cover_in_the_EU Megtekintve: 2019.10.20.
- Fiorentino, M., Pinelli, C., D'Aniello, B., Iela, L., di Meglio, M., & Rastogi, R. K. (2001). Development and distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the toad (*Bufo bufo*) brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, 21(3), 201-213.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., ... & Balzer, C. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Háhn, J., Tóth, G., Szoboszlai, S., Kriszt, B. (2017). Növényvédő szerek biodetoxifikációjára képes mikrobatorzsgyűjtemény kialakítása, VII. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete, 24 November 2017, Budapest, Hungary. URL: https://www.biokontroll.hu/wp-content/uploads/2018/11/okotoxikologiai_konferencia_2018.pdf Megtekintve: 2019.10.20.
- Hadidi, S., Glenney, G. W., Welch, T. J., Silverstein, J. T., & Wiens, G. D. (2008). Spleen size predicts resistance of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge. *The Journal of Immunology*, 180(6), 4156-4165.

- Hayes, T. B. (1997). Steroids as potential modulators of thyroid hormone activity in anuran metamorphosis. *American zoologist*, 37(2), 185-194.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... & Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617.
- Heatwole, H. (2013). Worldwide decline and extinction of amphibians. *The Balance of Nature and Human Impact*, ed. Klaus Rohde. Cambridge University Press. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hoskins, T. D., & Boone, M. D. (2018). Atrazine feminizes sex ratio in Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) at concentrations as low as 0.1 µg/L. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(2), 427-435.
- Kaya, U., Kuzmin, S., Sparreboom, M., Ugurtas, I. H., Tarkhnishvili, D., Anderson, S., Andreone, F., Corti, C., Nyström, P., Schmidt, B., Anthony, B., Ogradowczyk, A., Ogielska, M., Bosch, J., Tejedo, M., (2009). *Rana dalmatina*. The IUCN Red List of Threatened Species URL: <https://www.iucnredlist.org/species/58584/11790570> Megtekintve: 2019.10.20.
- Kerby, J. L., & Storfer, A. (2009). Combined effects of atrazine and chlorpyrifos on susceptibility of the tiger salamander to *Ambystoma tigrinum* virus. *EcoHealth*, 6(1), 91-98.
- Köhler, H. R., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *Science*, 341(6147), 759-765.
- Központi Statisztikai Hivatal (2018). Statisztikai tükör - A fontosabb növények vetésterülete. *KSH*, 2018, URL: <http://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/vet/vet1806.pdf> Megtekintve: 2019.10.20.
- Larson, D. L., McDonald, S., Hamilton, S. J., Fivizzani, A. J., & Newton, W. E. (1998). Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiological Zoology*, 71(6), 671-679.
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., & Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental pollution*, 157(2), 561-568.
- Lorenz, S., Rasmussen, J. J., Süß, A., Kalettka, T., Golla, B., Horney, P., ... & Schäfer, R. B. (2017). Specifics and challenges of assessing exposure and effects of pesticides in small water bodies. *Hydrobiologia*, 793(1), 213-224.
- Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (2019) Magyarország kétéltűi és hullói: Barna varangy <http://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/barna-varangy> Megtekintve: 2019.10.20.
- Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (2019) Magyarország kétéltűi és hullói: Erdei béka <http://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/erdei-beka> Megtekintve: 2019.10.20.
- Ogielska, M., & Kotusz, A. (2004). Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of morphology*, 259(1), 41-54.
- Orton, F., & Tyler, C. R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians?. *Biological Reviews*, 90(4), 1100-1117.
- Pathak, R. K., & Dikshit, A. K. (2011). Atrazine and human health. *International Journal of Ecosystem*, 1(1), 14-23.
- Pethő Ágnes (szerk.) et al. (2015)., Növényvédő szer felhasználás Magyarországon, *NÉBIH*, 2015 URL: http://www.kornyezetvedok.hu/vgt/vgt2/orszagos/3_4_hatteranyag_Novenyvedoszer_felhasznalas_Magyarorszagon.pdf?pi Megtekintve: 2019.10.20.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., & Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9852-9861.
- Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2013). Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4671-4680.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. URL: <http://www.r-project.org/> Megtekintve: 2019.10.20.
- Reading, C. J., Loman, J., & Madsen, T. (1991). Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. *Journal of Zoology*, 225(2), 201-211.
- Relyea, R. A., & Auld, J. R. (2004). Having the guts to compete: how intestinal plasticity explains costs of inducible defences. *Ecology Letters*, 7(9), 869-875.
- Relyea, R., & Hoverman, J. (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9(10), 1157-1171.
- Rohr J.R. (2018) Atrazine and Amphibians: A Story of Profits, Controversy, and Animus. In: Dominick A. DellaSala, and Michael I. Goldstein (eds.) *The*

- Encyclopedia of the Anthropocene, vol. 5, p. 141-148. Oxford: Elsevier.
- Rohr, J. R., & McCoy, K. A. (2010). A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental health perspectives*, 118(1), 20-32.
- Rohr, J. R., & Palmer, B. D. (2005). Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(5), 1253-1258.
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., ... & Schoff, P. K. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235.
- Rohr, J. R., Raffel, T. R., Halstead, N. T., McMahon, T. A., Johnson, S. A., Boughton, R. K., & Martin, L. B. (2013). Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1772), 20131502.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671.
- Semlitsch, R. D. (2008). Differentiating migration and dispersal processes for pond-breeding amphibians. *The Journal of wildlife management*, 72(1), 260-267.
- Skelly, D. K. (1994). Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation. *Animal Behaviour*, 1994, 47, 465-468
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 827.
- Štěpánová, S., Plhalová, L., Doleželová, P., Prokeš, M., Maršálek, P., Škorič, M., & Svobodová, Z. (2012). The Effects of subchronic exposure to terbuthylazine on early developmental stages of common carp. *The Scientific World Journal*, 2012.
- The IUCN Red List of threatened species (2019). iucnredlist.org, 2019, URL: <https://www.iucnredlist.org/> Megtekintve: 2019.10.20.
- Üveges, B., Mahr, K., Szederkényi, M., Bókony, V., Hoi, H., & Hettyey, A. (2016). Experimental evidence for beneficial effects of projected climate change on hibernating amphibians. *Scientific reports*, 6, 26754.
- Van Der Kraak, G. J., Hosmer, A. J., Hanson, M. L., Kloas, W., & Solomon, K. R. (2014). Effects of atrazine in fish, amphibians, and reptiles: An analysis based on quantitative weight of evidence. *Critical reviews in toxicology*, 44(sup5), 1-66.
- van Dijk, H. F., Van Pul, W. A. J., & De Voogt, P. (Eds.). (1999). Fate of pesticides in the atmosphere: implications for environmental risk assessment (pp. 1-276). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Vági, B. (2014). Az ökológiai és szociális környezet, valamint fiziológiai kényszerek szerepe kétéltűek szaporodásában. *PhD értekezés. Budapest, ELTE Környezettudományi Doktori Iskola*
- Verebélyi, V. (2017). Barna varangy (*Bufo bufo*) szaporodási sikerének és szennyezőanyag rezisztenciájának összehasonlítása különböző szennyezetszintű élőhelytípusok között. *Diplomadolgozat. Budapest, Állatorvostudományi Egyetem*
- Wittmer, I. K., Bader, H. P., Scheidegger, R., Singer, H., Lück, A., Hanke, I., ... & Stamm, C. (2010). Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water research*, 44(9), 2850-2862.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bókony Veronikának a rengeteg türelmet, segítséget és támogatást, amit az elmúlt években kaptam, megtisztelő, hogy egy ilyen kiváló kutatóval dolgozhatok együtt. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport munkatársainak, akikkel a terepi, illetve labormunkában is segítettek egymást. Köszönöm Dr. Kosztolányi Andrásnak, belső konzulensemnek, hogy hasznos tanácsokkal látott el és munkámat figyelemmel kísérte az elmúlt évek folyamán. Csoporttársaimnak is szeretném megköszönni, hogy szinte mindig közösen megvitattuk a tananyagot, ez nagyban segítette annak megértését, illetve az itt töltött évek alatt kialakult baráti légkört, amely a vizsgaidőszakok átvészeléséhez is erőt

adott. Végül pedig szeretném megköszönni szüleimnek, hogy rendületlenül mellettem állnak és támogatnak.

Vizsgálatunkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (115402 sz. projekt) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma megbízásából az Emberi Erőforrás Támogatáskezelő által meghirdetett, „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj” (NTP-NFTÖ-18 kódjelű pályázati kiírásra, NTP-NFTÖ-18-B-0412 pályázati azonosító).

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Bókony Veronika igazolom, hogy Verebélyi Viktória Terbutilazin ökotoxikológiai vizsgálata két hazai kétéltű fajon című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.04.17.



.....
Bókony Veronika

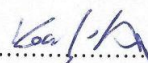
Agrártudományi Kutatóközpont,

Növényvédelmi Intézet

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Kosztolányi András Igazolom, hogy Verebélyi Viktória Terbutilazin ökotoxikológiai vizsgálata két hazai kételtű fajon című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. 04. 21.



.....
Dr. Kosztolányi András

belső konzulens

ÁTE Ökológiai Tanszék