



# **Einfluss von Herbiziden und Temperatur auf die Entwicklung von Erdkröten (*Bufo bufo* L.)**

Forschungsprojekt DaFNE Nr. 100977 / 1

Projekt-Akronym: BufoPestClim

## **Abschlussbericht Mai 2016**

Laufzeit: 01.01.2014 – 18.01.2016 (verlängert bis 31.05.2016)

Projektleitung: Assoc. Prof. Dr. Johann Zaller

Institut für Zoologie

Universität für Bodenkultur Wien

Tel.: 01-47 854 – 83318, [johann.zaller@boku.ac.at](mailto:johann.zaller@boku.ac.at)

Das Projekt wurde mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (BMLFUW) durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Fragestellungen .....	6
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1 Genehmigungen .....	7
2.2 Entnahme von Eiern .....	7
2.3 Vorbereitung der Versuche im Labor .....	7
2.4 Versuchsdurchführung .....	8
2.5 Probenentnahme für Analysen.....	9
2.6 Gewässerproben aus dem Freiland .....	10
2.7 Vorarbeiten im Jahr 2014 .....	10
2.8 Statistische Analyse der Daten .....	10
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>11</b>
3.1 Einfluss der Herbizidbehandlung auf die Entwicklung, Morphologie und Mortalität der Kaulquappen.....	11
3.2 Einfluss von Temperatur auf Kaulquappen.....	12
3.3 Interaktive Effekte von Herbizid und Temperatur auf Kaulquappen.....	13
3.4 Einfluss von pH, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt auf Kaulquappen .....	14
3.5 Einfluss von Herbizid und Temperatur auf pH, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt.....	16
3.6 Schwanzdeformationen bei Kaulquappen.....	18
3.7 Algenanalyse.....	19
3.8 Glyphosat- und Hormonanalysen .....	20
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Zitierte Literatur.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Veröffentlichungen aus dem vorliegenden Projekt.....</b>	<b>31</b>
6.1 Veröffentlichungen in internationalen Zeitschriften .....	31
6.2 Präsentationen auf Konferenzen .....	31
6.3 Masterarbeiten und Berichte .....	32
<b>7. Dank .....</b>	<b>33</b>

## Zusammenfassung

Der Pestizideinsatz steigt sowohl in der Landwirtschaft als auch im Privatbereich. Von den eingesetzten Pestiziden stellen glyphosat-basierte Herbizide die am meisten verwendeten Produkte dar. Wenn diese Produkte in der Nähe von Gewässern eingesetzt werden, kann dies auch zur Kontamination dort lebender Amphibien und Algen führen. Inwiefern die Wirkung von Pestiziden auf Nicht-Zielorganismen durch den Klimawandel (generelle Erwärmung bzw. Zunahme an Extremtemperaturen) beeinflusst wird, ist nur sehr wenig untersucht. Im vorliegenden Projekt wurde ein Experiment zum Einfluss des glyphosat-basierten Herbizids Roundup PowerFlex® und der Temperatur auf die Ei- bzw. Kaulquappen-Entwicklung der Erdkröte (*Bufo bufo*), vergesellschaftete Algengemeinschaften, sowie abiotische Parameter im Umgebungswasser im April und Mai 2015 durchgeführt.

Die Resultate zeigten Effekte von Herbizidkonzentration und Temperatur auf die Morphologie der Erdkröten. Kombinierte Effekte von Herbizidkonzentration und Temperatur wirkten sich signifikant auf die Körperlänge und Körperbreite der Kaulquappen aus. Bemerkenswert war auch eine Interaktion von Herbizid und Temperatur, sodass bei 76% aller Kaulquappen deformierte Schwänze bei 15°C auftraten, wohingegen keine Schwanzdeformationen in der Kontrollgruppe ohne Herbizideinsatz bei 15°C oder generell bei Kaulquappen bei 20°C auftraten.

Die Herbizidkonzentrationen bewirkten auch eine Verschiebung der Diversität und Zusammensetzung der Algengemeinschaften; die Algendichte war nicht beeinflusst. Die Wassertemperatur beeinflusste die Algendiversität, zeigte jedoch nur marginale Effekte auf Algendichte. Weder die Algendichte noch die Algendiversität zeigte signifikante Effekte auf die Morphologie der Kaulquappen. Höhere Temperaturen führte zu einem reduzierten Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Umgebungswassers.

Die durch Herbizide oder Temperatur hervorgerufene Beeinflussung von Erdkrötenentwicklung und Algengemeinschaften können potentiell ökologische Interaktionen in Süßwasserökosystemen verändern. Die hier gefundenen Herbizid-Temperatur-Interaktionen lassen die Relevanz der Risikobewertungen von Pestiziden bei Standardtemperaturen hinterfragen.

## Summary

Pesticide use is increasing both in agriculture and in private gardens. Among the pesticides used glyphosate-based herbicides are the most widely used group of substances that can potentially contaminate nearby water bodies inhabited by amphibians and algae. To what extent the effect of herbicides on non-target organisms is affected by climate change (e.g. global warming and more extreme temperature events) is very little investigated. In this project experiments on the influence of the glyphosate-based herbicide Roundup PowerFlex® and temperature on the egg and tadpole development of the European Toad (*Bufo bufo*) and on associated algae communities were conducted between April and May 2015.

Results showed an influence of temperature and herbicide on the morphology of tadpoles. Combined effects of temperature and pesticides significantly influenced body lengths and widths of tadpoles. Most remarkably, herbicide-temperature interactions led to deformed tails in 76% of all tadpoles at 15°C whereas no tail deformations were observed for the herbicide-free control at 15°C or any tadpole at 20°C.

Herbicide concentrations led to an altered diversity and assemblage of algae communities; algal density was neither affected by herbicides nor temperature. Neither algal density nor algal diversity showed any significant effects on body morphology. Data for oxygen content and pH of water with different pesticide content depended on water temperature.

These herbicide- and temperature-induced changes on toad development and algae communities may have decided effects on ecological interactions in freshwater ecosystems. Moreover, our findings also question the relevance of pesticide risk assessments conducted at standard temperatures.

# 1. Einleitung

Amphibien gehören zu den weltweit gefährdetsten Wirbeltieren (IUCN 2004). Ihr Rückgang hat verschiedene Ursachen wie Landschaftsfragmentierung, Zerstörung der Habitate, Krankheiten, Konkurrenz von invasiven Arten, Umweltverschmutzung durch chemische Stoffe und Klimawandel (IUCN 2004, Blaustein et al. 2011, Brühl et al. 2013). In ihren natürlichen Habitaten sind Amphibien mit Algengemeinschaften vergesellschaftet, die für Kaulquappen eine wichtige Nahrungsquelle darstellen. Algen ihrerseits sind von ähnlichen Umweltfaktoren beeinflusst wie Amphibien (Whitehead et al. 2009, Wilson et al. 2003).

Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen eines glyphosat-basierten Herbizids auf das Wachstum und die Entwicklung von Eiern und Kaulquappen der Erdkröte (*Bufo bufo* L.) sowie auf die Zusammensetzung der assoziierten Algengemeinschaften. Da aufgrund von Klimawandel-Szenarien zunehmend Extremwetterereignisse vorausgesagt werden (IPCC 2013), untersuchten wir zusätzlich, ob unterschiedliche Wassertemperaturen potentielle Effekte von Herbiziden beeinflussen. Global gesehen ist die Erdkröte vorrangig in ganz Europa vom Flachland bis ins Gebirge zu einer Seehöhe von 2500 m verbreitet (Arnold und Ovenden 2002). Erdkröten laichen häufig in Gewässer nahe agrarwirtschaftlich genutzter Flächen oder queren während ihrer Wanderungen vom Laichgewässer zu bewaldeten Winterquartieren Agrargebiete in denen Pestiziden ausgebracht werden (Lenhardt et al. 2015, Berger et al. 2013).

Herbizide auf Glyphosatbasis sind die häufigsten und am weitesten verbreiteten Pestizide in der Landwirtschaft, im Gartenbau, in Wäldern, in Weingärten, in Gemeinden und in Privatgärten. Im Allgemeinen wirkt Glyphosat durch Hemmung eines Enzyms, das nur bei Pflanzen und einigen Mikroorganismen bekannt ist; deshalb und aufgrund seiner Halbwertszeit von 7 - 14 Tagen in Wasser wird Glyphosat für Amphibien als nur gering toxisch eingestuft (Giesy et al. 2000, Franz et al. 1997). Die meisten glyphosat-basierten Herbizide sind nicht für eine Anwendung im aquatischen Bereich gedacht, jedoch wurde über eine Kontamination von Gewässern durch Drift, Oberflächenabfluss oder direktes Übersprühen berichtet (Berger et al. 2013, Peruzzo et al. 2008, Battaglin et al. 2009). Mehrere Studien berichten über schädliche Auswirkungen von glyphosat-basierten Herbiziden auf Amphibien in ihrer aquatischen und terrestrischen Lebensphase (Relyea 2011, Tsui und Chu 2003, Brühl et al. 2011, Fryday und Thompson 2012, Baylis 2000, Duke und Powles 2008). Glyphosat-basierte Herbizide wurden von 0,021 mg acid equivalent (a.e.)/L bis 6,0 mg a.e./L bei Amphibien getestet und bewirkten einen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von nordamerikanischen Amphibienlarven (Edge et al. 2014, Lanctôt et al. 2014, Navarro-Martin 2014, Relyea 2004), zeigten sub-lethale Effekte (Moore et al. 2015, Muñoz et al. 2014, Mann und Bidwell 1999, Cauble und Wagner 2005) und führten bei hoher Dosis sogar zu akuter Mortalität (Fuentes et al. 2011, Moore 2012, Williams und Semlitsch 2010, Relyea 2005). Zum Einfluss von glyphosat-basierten Herbiziden auf einheimische europäische Amphibienarten ist jedoch nur sehr wenig bekannt (Wagner et al. 2013, Folmar et al. 1979). Überdies wurde gezeigt, dass Herbizidformulierungen, wie sie zur Zeit tatsächlich in der Landwirtschaft angewendet werden, sich schädlicher auf Kaulquappen und andere aquatische Organismen auswirken als der aktive Wirkstoff Glyphosat selbst (Relyea 2005, Howe et al. 2004, Monsanto 2014). Leider werden diese Zusatzstoffe üblicherweise nicht angegeben und als Firmengeheimnis betrachtet (Wagner et al. 2013, Annett et al. 2014). Neben Amphibien wird in mehreren Studien aufgezeigt, dass auch Süßwasser-Mikroalgen teilweise empfindlich auf glyphosat-basierte Herbizide reagieren, da sie physiologisch und biochemisch terrestrischen Pflanzen ähnlich sind. Meist wird bei Algen oxidativer Stress verursacht (Romero et al. 2011).

Es ist seit langem bekannt, dass die Temperatur bei der Physiologie und Ökologie von Kaulquappen (Ultsch et al. 1999, Schabhüttl et al. 2013) und Algen (Butterwick et al. 2005, Li et al. 2013) eine große Rolle spielt. Obwohl eine Klimaerwärmung nicht als direkter letaler Faktor für Amphibien erachtet wird, kann eine steigende Wassertemperatur in Laichgewässern von Amphibien die Larvalentwicklung beschleunigen und so die Dauer reduzieren, die diese Arten einem Herbizid ausgesetzt sind (Kattwinkel et al. 2011, Trumbo 2005). Von besonderem Interesse sind mögliche Interaktionen zwischen Herbiziden und Temperatur, da der vom Menschen verursachte Klimawandel die Durchschnittstemperatur erhöhen kann und sehr wahrscheinlich zu einer Zunahme von Extremwetterereignissen mit starken Temperaturschwankungen führen wird (IPCC 2013). Andererseits wird mit steigenden Temperaturen eine vermehrte Pestizidanwendung vorausgesagt, da auch ein Anstieg an Schädlingen und Krankheiten erwartet wird, die vom Klimawandel profitieren (Relyea 2012). Nach unserem Kenntnisstand hat bisher nur eine Studie einen kombinierten Effekt eines Herbizids (Atrazin) und Temperatur auf Amphibien, eine nordamerikanische Salamanderart, untersucht (Wojtaszek et al. 2004). Diese Studie zeigt, dass steigende Temperaturen die Toxizität von Herbiziden zwar nicht erhöht, jedoch die Entwicklung beschleunigt wodurch die Tiere dem Herbizid weniger lange ausgesetzt sind (Wojtaszek et al. 2004).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob (i) ein glyphosat-basiertes Herbizid die Entwicklung der Erdkrötenlarven und von assoziierten Algengemeinschaften beeinflusst und (ii) die Temperatur potentielle Herbizideffekte beeinflusst. Für die Studie wurde ein Experiment in Klimaschränken mit einem vollfaktoriellen Design mit fünf Herbizidkonzentrationen bei zwei Temperaturstufen über 24 Tage durchgeführt. Unsere Hypothese war, dass eine höhere Temperatur das Wachstum und die Entwicklung von Kaulquappen beschleunigt und somit die Dauer reduziert, die sie dem Herbizid ausgesetzt sind. Wenn höhere Temperaturen die Dauer der Herbizideinwirkung stärker reduzieren als sie eine schädliche Wirkung des Herbizids fördern, könnte der Nettoeffekt vorteilhaft sein. Weiters stellten wir die Hypothese auf, dass höhere Temperaturen einen zunehmend negativen Einfluss bei steigender Herbizidkonzentration haben, da multiple Stressfaktoren die Möglichkeiten für Entgiftung und/oder Temperaturregulation für Amphibien reduzieren (Hoff und Wassersug 2000, Wilbur und Semlitsch 1990).

## 1.1 Fragestellungen

- i) **Beeinflusst Roundup® PowerFlex die Ei- und Larvenentwicklung der in Österreich weit verbreiteten Erdkröte (*Bufo bufo*)?**
- ii) **Haben steigende Herbizidkonzentrationen Einfluss auf die Entwicklung von Amphibienlarven und assoziierten Algengemeinschaften?**
- iii) **Beeinflusst die Temperatur etwaige Herbizidwirkungen auf Erdkröten und Algengemeinschaften?**

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Genehmigungen

Für die Untersuchung war es notwendig, ca. 1000 Eier der Erdkröte aus dem Freiland zu entnehmen. Hierfür wurde bereits im Jahr 2014 eine Sammelgenehmigung der Magistratsabteilung 22 (MA 22 – 1629490/2014) sowie eine Grundbesitzer-Genehmigung der Magistratsabteilung 49 der Stadt Wien beantragt (MA 49-808754/2014/5) und genehmigt. Zur Durchführung der Experimente wurde eine Tierversuchsgenehmigung beim Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft und beim Tierschutzgremium der Universität für Bodenkultur Wien als Versuchsantragsteller eingeholt (BMWFV-66.016/0002-WF/V/3b/2015).

### 2.2 Entnahme von Eiern

Die Erdkröteneier wurden Anfang April 2015 aus Teichen der Region Exelberg im Stadtgebiet Wiens entnommen (Abb. 1). Dies erforderte mehrere Erkundungen vor Ort, um die optimale Abbläuchzeit festzustellen. Von den ca. 1000 entnommenen Eiern wurden 500 für Versuche verwendet, die unbeschadeten restlichen Eier wurden wieder in die Ursprungsgewässer zurückgebracht

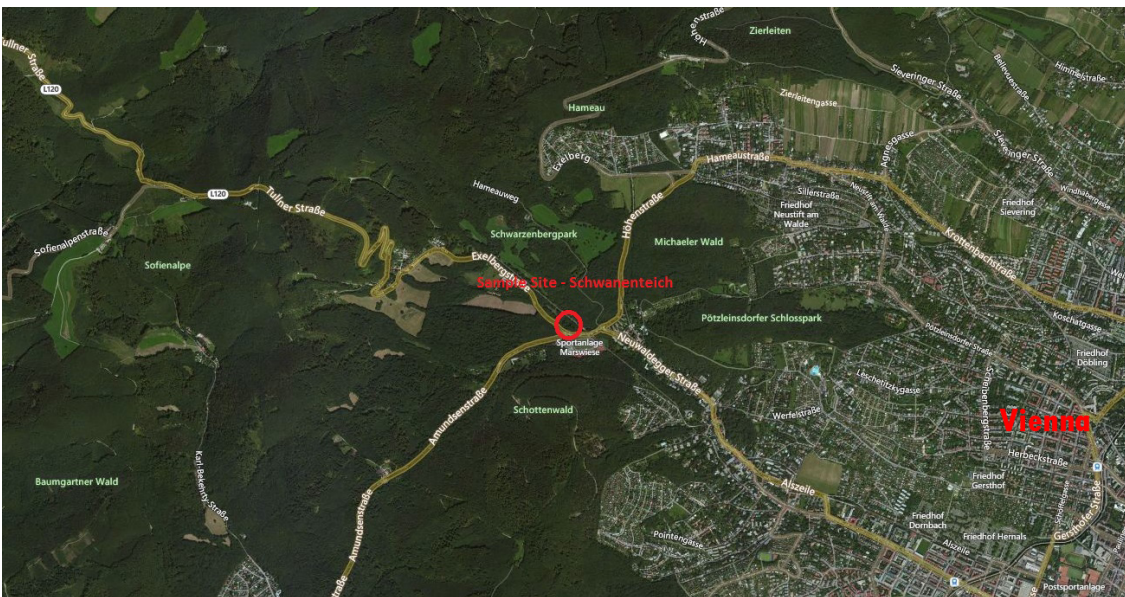


Abb. 1: Standort der Entnahme von Eiern der Erdkröte (*Bufo bufo*) für die vorliegende Studie, Exelbergstraße – Schwanenteich, Vienna, Austria (Grafik: Jedinger 2016).

### 2.3 Vorbereitung der Versuche im Labor

Die Versuche fanden im Labor des Instituts für Zoologie, Universität für Bodenkultur Wien statt. Im Rahmen des Versuchs wurde der Einfluss von zwei Faktoren untersucht: Temperatur und Herbizidkonzentration. Die Temperaturstufen 15°C bzw. 20°C wurde in zwei Klimaschränken mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden simuliert. Die Beleuchtung der beiden Schränke erfolgte mit Tageslichtlampen, deren

Beleuchtungsstärken aneinander angeglichen wurden. Kontinuierlich messende Messsensoren und Dataloggern überwachten die Temperatur in den Schränken.

Zur Aufbewahrung der Eier dienten transparente Polypropylen-Kunststoffwannen (Volumen 5 L, 28 x 19 x 14 cm, L x B x H), die mit 4 L kohlegefiltertem Leitungswasser gefüllt wurden. Als Herbizid wurde Roundup PowerFlex® (Wirkstoffgehalt rein: 480 g/L, Gew.-%: 35.75; Wirkstoffgehalt als Kalium-Salz: 588 g/L; Monsanto Agrar Deutschland, Düsseldorf) verwendet; dieses Präparat ist in Österreich für den Gebrauch in Ackerbau, Forst, Gemüsebau, Grünland, Nichtkulturland, Obstbau, Weinbau und Zierpflanzenbau bis zum Jahr 2022 zugelassen (Pflanzenschutzmittelregister – Bundesamt für Ernährungssicherheit: [http://pmg.ages.at/pls/psmlfrz/pmgweb2\\$PMG\\_WEB\\_STAMMINFO.ActionQuery](http://pmg.ages.at/pls/psmlfrz/pmgweb2$PMG_WEB_STAMMINFO.ActionQuery)).

Folgende Herbizid-Konzentrationen wurden verwendet:

0,0 mg a.e./L; 1,5 mg a.e./L; 3,0 mg a.e./L; 4,0 mg a.e./L sowie eine Gabe von 1,5 + 1,5 + 1,0 mg a.e./L verteilt über mehrere Tage (pulse treatment). Die Ausgangskonzentrationen wurden in 25-L Kanistern abgemischt und anschließend auf die Versuchswannen verteilt. Beim pulse treatment wurden weitere Gaben von Roundup direkt in die Versuchswannen per Pipette verabreicht. Diese Varianten wurden in einem vollfaktoriellen Design mit 5 Wiederholungen pro Herbizidkonzentration und Temperaturstufe angelegt (insgesamt 50 Behälter, 25 Behälter bei 15°C und 25 Behälter bei 20°C).

## 2.4 Versuchsdurchführung

Es wurden insgesamt zwei Versuchsphasen geplant, eine Phase mit Eiern der Erdkröte im Anschluss daran eine Versuchsphase mit Kaulquappen. In jeden der 50 Versuchsbehälter wurden 5 Eier bzw. 5 Kaulquappen hinzugefügt und anschließend folgende Parameter erfasst:

**Abiotische Parameter:** pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Wassertemperatur des Umgebungswassers (jeden 3. Tag), Analyse des Gehaltes an Glyphosat und dessen Hauptabbauprodukt Aminomethylphosphonsäure (AMPA) (am Anfang und am Ende der Versuche).

**Biotische Parameter:**

- Morphologie: Körperlänge, Schwanzlänge, Körperbreite durch Auswertung von Fotos der Kaulquappen mit Hilfe der Computersoftware Image J (2 mal pro Versuchsphase)
- Entwicklungsstadien der Eier bzw. Kaulquappen: nach Gosner 1968
- Mortalität: täglich
- Algenzusammensetzung im Umgebungswasser der Versuchstiere: durchgeführt am Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement (IHG) der BOKU Wien
- Hormonanalysen im Umgebungswasser der Versuchstiere: Adaptation einer Methode zur Analyse von Stresshormonen (Cortisol) im Umgebungswasser von Fischen für Kaulquappen

Die erste Versuchsphase wurde vom Entwicklungsstadium 8 (Eier) bis zum Stadium 29/30 (bei 15°C) bzw. Stadium 34/35 (bei 20°C) in den mit Roundup® versetzten Behältern durchgeführt. Danach wurden die Tiere in sauberes Wasser übersiedelt und ihre Entwicklung bis zur Metamorphose verfolgt.

Die zweite Versuchsphase wurde mit Kaulquappen im Stadium 28 angesetzt. Es sollten die gleichen Parameter wie in der ersten Versuchsphase erfasst werden. Aufgrund einer unvorhergesehenen Verpilzung der Versuchstiere (auch in der Kontrolle) musste dieser Teil des Versuchs jedoch nach einer Woche im



Stadium 29/30 abgebrochen werden. Für eine Wiederholung dieser Variante war die Entwicklung der Erdkröten in den Laichgewässern schon zu weit fortgeschritten.

Die folgenden Punkte beziehen sich daher nur auf die erste Versuchsphase beginnend mit der Eientwicklung.

## 2.5 Probenentnahme für Analysen

Nach Fertigstellung der Versuche wurden folgende Proben entnommen:

### a) Algenzusammensetzung im Umgebungswasser

Entnahme von 100 ml Wasser pro Versuchsbehälter, konserviert mit wenigen Tropfen Iod-Kaliumiodid Lösung (Lugol'sche Lösung). Die Proben wurden anschließend am Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement (IHG) der Universität für Bodenkultur Wien untersucht.

Für die Bestimmung der Algen wurden die Probenbehälter vorsichtig gewendet. Anfänglich wurde eine Vorabuntersuchung mit 5 ml der Algenprobe durchgeführt, um das nötige Volumen für die Analyse zu bestimmen. Für die qualitative Analyse wurden mindestens 5 ml der Probe analysiert. Da eine hohe Anzahl an Algenzellen vorhanden war, wurde für die quantitative Analyse 1 ml in eine Sedimentationskammer mit entsprechendem Volumen gefüllt. Auf die Kammer wurde eine runde Glaskopfplatte gelegt, die Algen konnten sich am Grund der Kammer absetzen. Die Methode besteht aus zwei Teilen – Analyse von Nicht-Diatomeen-Phytoplankton ("soft algae") und Analyse von Diatomeen (Kieselalgen). Für die Nicht-Diatomeen-Phytoplankton – Analyse wurden Algenzellen in einer Sedimentationskammer mithilfe eines inversen Mikroskops (400x Vergrößerung) gezählt. Nur lebende Formen (z. B. Zellen mit Chloroplast) wurden gezählt. Bei dieser Vergrößerung wurden die Kieselalgen als Gruppe ausgezählt. Für die Diatomeen-Analyse wurden die Proben mit starken Oxidationsmitteln vorbehandelt, gereinigt und auf Glasplatten in einem synthetischen Fixiermedium (Naphrax) eingebettet. Die eigentliche Bestimmung und Zählung der Diatomeen wurde unter Öl (1000x) durchgeführt, für die quantitative Analyse wurde ein Minimum von 500 Frusteln (aus Epitheka und Hypotheka bestehende Stückchen der Kieselalgenschalen) gezählt (2 Frusteln = 1 Diatomeenzelle) pro Probe (Glasplatte) verwendet. Für die quantitative Analyse war ein Minimum von 30 Mikroskopierfeldern erforderlich, das nicht weniger als 300 Zellen inkludierte. Wenn innerhalb der 30 Mikroskopierfelder <300 Zellen gefunden wurden, wurde die Zählung fortgeführt, bis 300 Zellen erfasst waren. Die ausgezählte Fläche wurde vermessen, um die Zellanzahl pro Volumen auszurechnen. Die Algentaxa wurden auf die niedrigst mögliche taxonomische Einheit identifiziert. Die taxonomische Identifikation wurde mit Standardliteratur für die Artenbestimmung durchgeführt (Hindák et al. 1978; Krammer und Lange-Bertalot 1986, 1988, 1991a, 1991b). Die Artnamen wurden mit Hilfe einer Algen-Datenbank überprüft (<http://www.algaebase.org/search/species>). Die quantitative Auswertung wurde nach Utermöhl (1958) vorgenommen. Die Algendichte wurde mit Zellzahl pro Liter definiert.

### b) Analyse von Stresshormonen (Cortisol) im Umgebungswasser

Weitere Proben zu je 1000 ml pro Versuchsbehälter wurden für die Analyse von Stresshormonen (Cortisol) bereitgestellt. Die Analysen wurden von Frau Dr. Roza Allabashi, Institut für Siedlungswasserbau,

Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz (SIG) der BOKU Wien durchgeführt. Die Konzentrationen von Cortisol im Umgebungswasser waren jedoch unter der Nachweisgrenze, sodass diese Untersuchungen nicht mehr weiter verfolgt wurden.

### **c) Glyphosatgehalt bzw. AMPA im Umgebungswasser**

Zu Versuchsbeginn und Versuchsende wurden jeweils 250 ml Wasser aus den Versuchsbehältern entnommen und tiefgefroren. Die Proben wurden von Prof. Axel Mentler, Institut für Bodenforschung (IBF), BOKU Wien auf den Gehalt von Glyphosat und AMPA mittels HPLC-MS/MS Methode analysiert (Popp et al. 2008; Todorovic et al. 2013).

## **2.6 Gewässerproben aus dem Freiland**

Da aus der Literatur keine genauen Angaben zu Pestizidgehalten in potentiellen Laichgewässern von Erdkröten bekannt sind, wurden ergänzend zu den Versuchen 27 Gewässerproben aus potentiellen Amphibienlaichgewässern in Wien und NÖ entnommen. Die Proben wurden am Institut für Bodenforschung (IBF), BOKU Wien auf Glyphosat und AMPA sowie auf sechs weitere Pestizide (Bromoxynil, Clomazon, Desethylterbuthylazin, Imidacloprid, Tebuconazol, Terbuthylazin) analysiert.

## **2.7 Vorarbeiten im Jahr 2014**

Erste Vorerhebungen zum Einfluss von Roundup® auf die Entwicklung der Erdkröte wurden bereits im Frühling 2014 durchgeführt. Dabei wurde der Versuchsaufbau mit Kunststoffwannen in Klimaschränken erstmals getestet. Die Vorversuche erlaubten eine verbesserte Vorbereitung der Rahmenbedingungen für das laufende Projekt, wie Haltungsbedingungen der Tiere (Wasserqualität, geeignete Mesokosmen, Entwicklung unter Laborbedingungen etc.), Berechnung relevanter Konzentrationen sowie eine bessere Einschätzung der Erfassung von abiotischen und biotischen Parametern.

## **2.8 Statistische Analyse der Daten**

Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft und bei Vorliegen der Voraussetzungen mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Herbizidkonzentration und Temperatur sowie deren Interaktionen ausgewertet. Mittelwertvergleiche zwischen den einzelnen Varianten wurden mit Tukey HSD – Tests durchgeführt ( $p < 0,05$ ). Waren die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren nicht gegeben, wurden nicht-parametrische Tests angewendet. Alle statistischen Analysen wurden mit der frei zugänglichen Statistiksoftware R durchgeführt (Version 3.0.1; The R Foundation for Statistical Computing; <http://www.R-projekt.org>).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der Herbizidbehandlung auf Kaulquappen

Die Herbizidbehandlung wirkte sich signifikant reduzierend auf die Schwanzlänge der Kaulquappen aus (Tab. 1). Es konnte keine signifikante Auswirkung des Herbizids auf die Entwicklung, die Körperlänge, die Körperbreite, das Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite oder die Mortalität der Erdkrötenlarven festgestellt werden (Tab. 1). Verglichen mit den Kontrollgruppen (0 mg a.e./L) erreichten mit Herbizid behandelte Kaulquappen bei 15°C eine um 10, 5, 5 und 11% geringere Schwanzlänge (in aufsteigender Reihenfolge). Kaulquappen bei 20°C wiesen einen Anstieg in der Schwanzlänge von 3, 7, 5 und 7% auf (Abb. 2).

Tab. 1: ANCOVA Ergebnisse der Effekte von Herbizidbehandlung und Temperatur auf die Entwicklung, Körperlänge (Kl), Körperbreite (Kb), Schwanzlänge, Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite, Mortalität und Schwanzdeformation von *Bufo bufo* -Kaulquappen. Signifikante Effekte in Fettdruck.

Variable	Herbizidkonzentration		Temperatur		Herbizid x Temp.	
	F	P	F	P	F	P
<b>Tadpoles</b>						
Gosner Stadium	0,642	0,633	150,521	< <b>0,001</b>	0,079	0,989
Körperlänge (mm)	1,200	0,317	837,846	< <b>0,001</b>	4,369	<b>0,003</b>
Körperbreite (mm)	0,882	0,478	584,778	< <b>0,001</b>	2,893	<b>0,027</b>
Schwanzlänge (mm)	4,113	<b>0,004</b>	891,085	< <b>0,001</b>	4,851	<b>0,001</b>
Verhältnis (Kl/Kb)	1,413	0,236	17,040	< <b>0,001</b>	2,303	0,065
Mortalität (%)	0,401	0,807	0,760	0,386	2,821	<b>0,030</b>
Schwanzdeformation (%)	4,868	<b>0,003</b>	28,003	< <b>0,001</b>	6,612	< <b>0,001</b>
<b>Algen</b>						
Algendichte (Zellen/L)	2,408	0,090	4,144	0,058	1,632	0,212
Algendiversität (Shannon)	5,022	<b>0,007</b>	9,888	<b>0,006</b>	2,761	0,062
Algendiversität (Evenness)	4,810	<b>0,009</b>	9,562	<b>0,007</b>	3,756	<b>0,023</b>

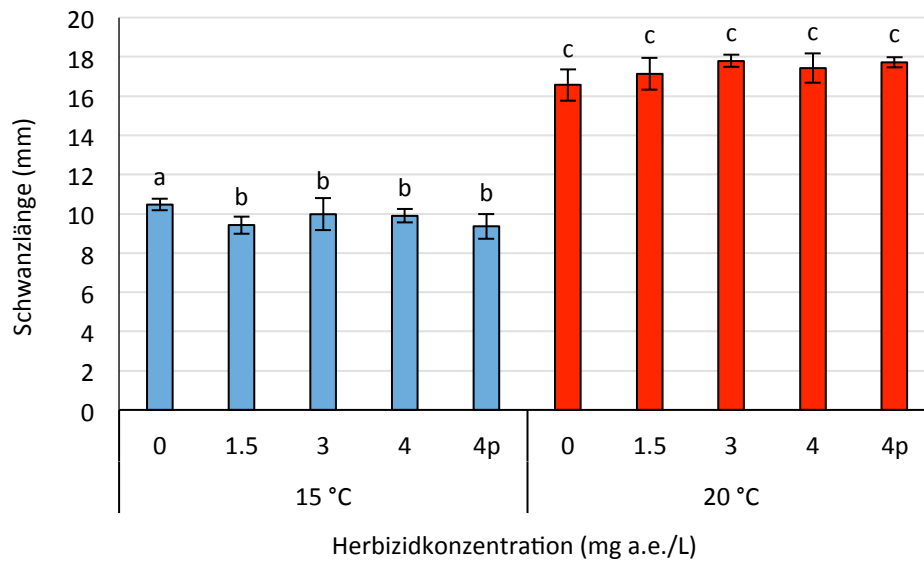


Abb. 2: Durchschnittliche Schwanzlänge der Kaulquappen bei 15°C und 20°C, 24 Tage nach Versuchsstart bei unterschiedlichen Herbizidbehandlungen (mg a.e./L). Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (Tukey's HSD, p < 0,05).

### 3.2 Einfluss von Temperatur auf Kaulquappen

Die Temperatur hatte einen hoch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung und die Morphologie der Kaulquappen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Mortalität der Kaulquappen (Tab. 1). 24 Tage nach Versuchsbeginn waren Kaulquappen bei 15°C durchschnittlich im Gosnerstadium 29, dagegen bei 20°C im Gosner Stadium 35 (Abb. 3). Das Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite war bei 15°C um 4, 5, 5, 4, und 3% niedriger in Konzentrationen von 0 bis 4p mg a.e. /L verglichen zu 20°C.

Die beiden Temperaturvarianten wirkten sich signifikant unterschiedlich auf die Körperlänge und Körperbreite aus. Die Körperlänge war bei 15°C um 30, 37, 36, 35 und 40% niedriger, je nach Herbizidkonzentration, während die Körperbreite bei 20°C um 27, 33, 32, 32 und 38% niedriger war (Abb. 4).

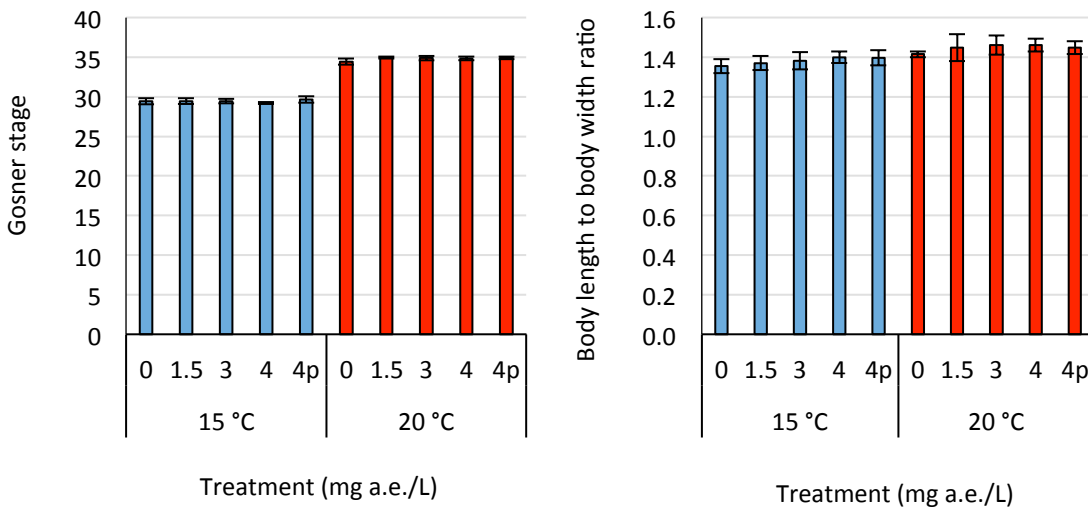


Abb. 3: Entwicklung und Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite von Kaulquappen, 24 Tage nach Versuchsbeginn bei 15°C und 20°C. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5.

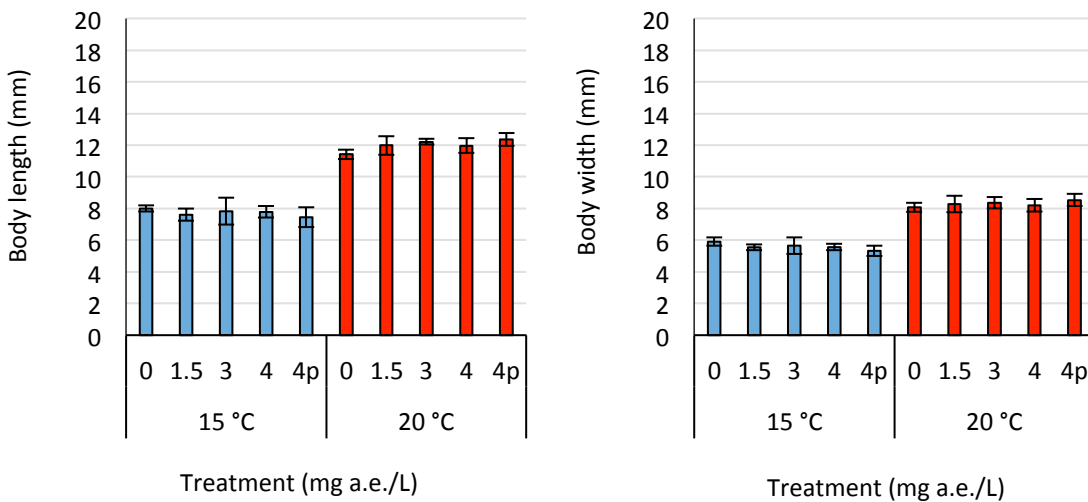


Abb. 4: Körperlänge und Körperbreite von Kaulquappen, 24 Tage nach Versuchsbeginn bei 15°C und 20°C. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5.

### 3.3 Interaktive Effekte von Herbizid und Temperatur auf Kaulquappen

Es ergaben sich signifikante interaktive Effekte von Herbizid und Temperatur auf Körperlänge, Körperbreite, Schwanzlänge und Mortalität der Kaulquappen (Tab. 1), nicht jedoch auf das Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite. Körperlänge, Körperbreite und Schwanzlänge waren bei 15°C mit zunehmender Herbizidkonzentration etwas reduziert, bei 20°C dagegen etwas vergrößert (Abb. 4, Abb. 1). Die Mortalität war bei 15°C höher und stieg mit zunehmender Herbizidkonzentration, bei 20°C hingegen sank die Mortalität mit zunehmender Herbizidkonzentration (Abb. 5).

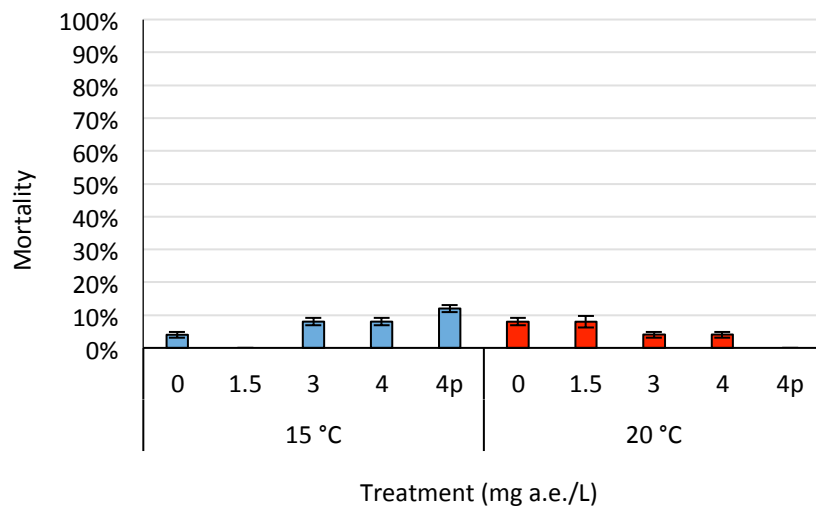


Abb. 5: Mortalität der Kaulquappen 24 Tage nach Versuchsstart bei unterschiedlichen Temperaturen und Herbizidkonzentrationen. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5.

### 3.4 Einfluss von pH, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt auf Kaulquappen

Der pH-Wert und die Wassertemperatur zeigten keinen Einfluss auf die Morphologie und die Entwicklung der Kaulquappen. Jedoch wurde ein signifikanter Effekt des Sauerstoffgehaltes im Umgebungswasser auf die Körperbreite und Schwanzlänge der Kaulquappen festgestellt (Tab. 2, Abb. 6), dennoch war bei der Körperlänge marginal durch den Sauerstoffgehalt beeinflusst (Abb. 7).

Tab. 2: ANCOVA-Ergebnisse zum Einfluss von pH, Wassertemperatur, Sauerstoffgehalt, Entwicklungsdauer, Körperlänge, Körperbreite, Schwanzlänge, Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite, Mortalität und Schwanzdeformation von Kaulquappen der Erdkröte. Signifikante Effekte in Fettdruck.

Variable	pH		Wassertemperatur (°C)		Sauerstoffgehalt (mg/L)	
	F	P	F	P	F	P
Gosner Stadium	2,264	0,133	2,934	0,087	0,005	0,942
Körperlänge Kl	0,640	0,426	2,473	0,119	3,689	0,058
Körperbreite Kb	0,365	0,548	1,633	0,205	5,063	<b>0,027</b>
Schwanzlänge	0,017	0,898	2,893	0,093	14,450	<b>&lt; 0,001</b>
Verhältnis Kl / Kb	2,388	0,126	0,058	0,811	0,044	0,835
Mortalität	0,028	0,867	1,393	0,241	0,212	0,646
Schwanzdeformation	0,109	0,744	0,919	0,344	0,302	0,586
Algae (Zellen/L)	1,352	0,261	0,124	0,730	1,635	0,218
Algae (Diversität)	0,340	0,568	0,450	0,511	0,742	0,401
Algae (Shannon)	0,361	0,556	0,131	0,722	0,375	0,548
Algae (Evenness)	0,837	0,373	< 0,001	0,984	1,185	0,291

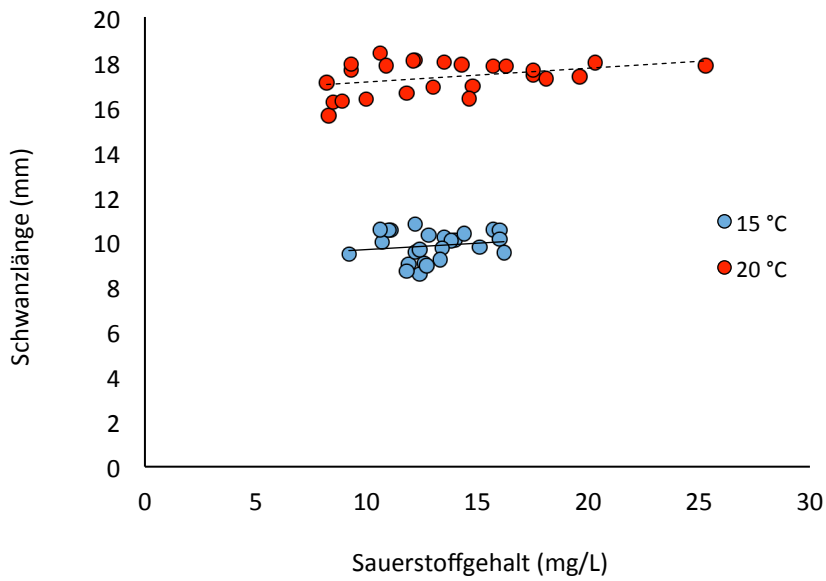


Abb. 6: Schwanzlänge der Kaulquappen und Sauerstoffgehalt im Umgebungswasser der Tiere 24 Tage nach Versuchsbeginn bei 15°C und 20°C. Mittelwerte, n = 25.

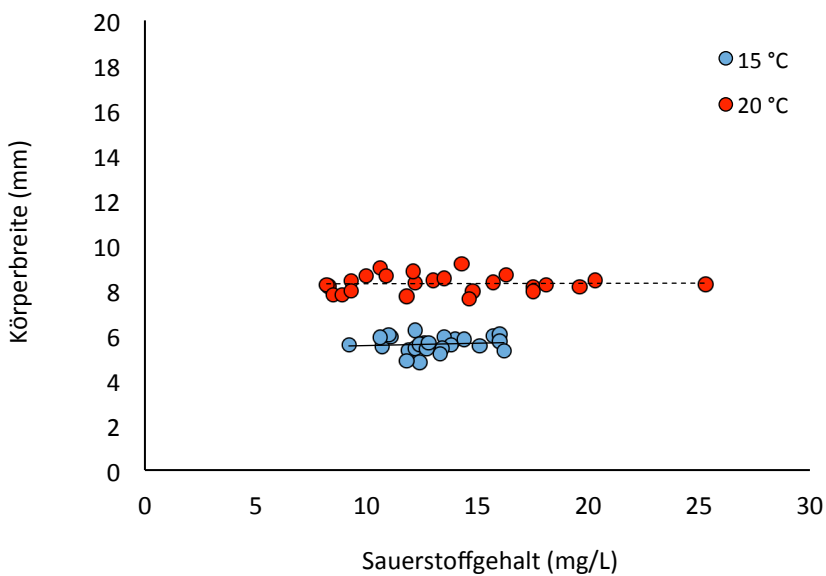


Abb. 7: Körperbreite der Kaulquappen und Sauerstoffgehalt im Umgebungswasser der Tiere 24 Tage nach Versuchsbeginn bei 15°C und 20°C. Mittelwerte, n = 25.

### 3.5 Einfluss von Herbizid und Temperatur auf pH, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt

Die Herbizidkonzentration wirkte sich signifikant auf den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt im Umgebungswasser der Tiere aus. Die Temperatur beeinflusste die Wassertemperatur und den Sauerstoffgehalt (Tab. 3). Die Interaktion von Herbiziden und Temperatur zeigte keine Beeinflussung. Im Schnitt lag der pH-Wert bei 15°C mit 8,34 (0 mg a.e./L) bis 8,66 (1,5 mg a.e./L) etwas höher als bei 20°C (Abb. 8). Bei 20°C lag der niedrigste Wert ebenso in der Kontrollgruppe (0 mg a.e./L), der höchste beim „pulse treatment“ (8,55).

Die Temperatur in den Klimaschränken hatte erwartungsgemäß einen signifikanten Einfluss auf die Wassertemperatur in den Mesokosmen, die gemessene Temperaturdifferenz in den beiden Klimaschränken betrug 2,4°C (Abb. 9).

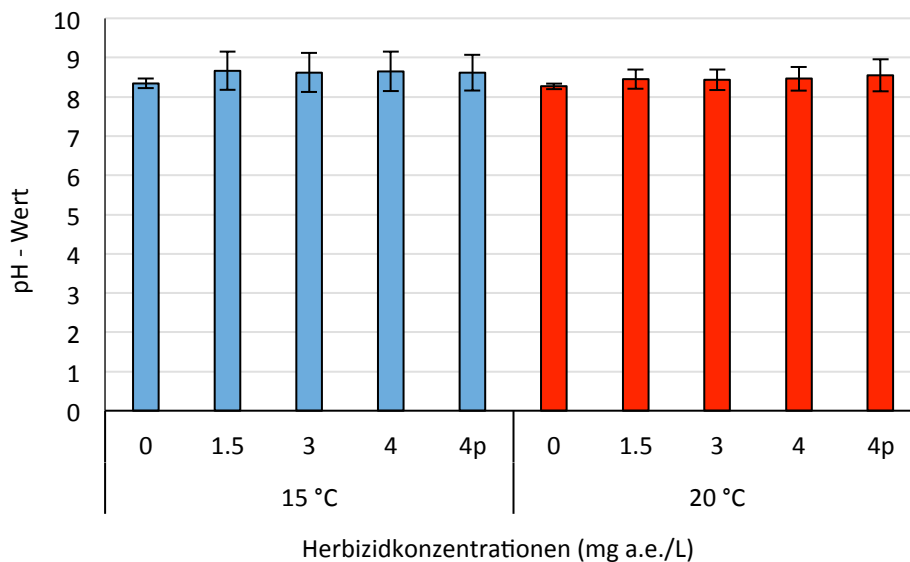


Abb. 8: Herbizid- und Temperatureffekte auf den pH-Wert. Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 25.



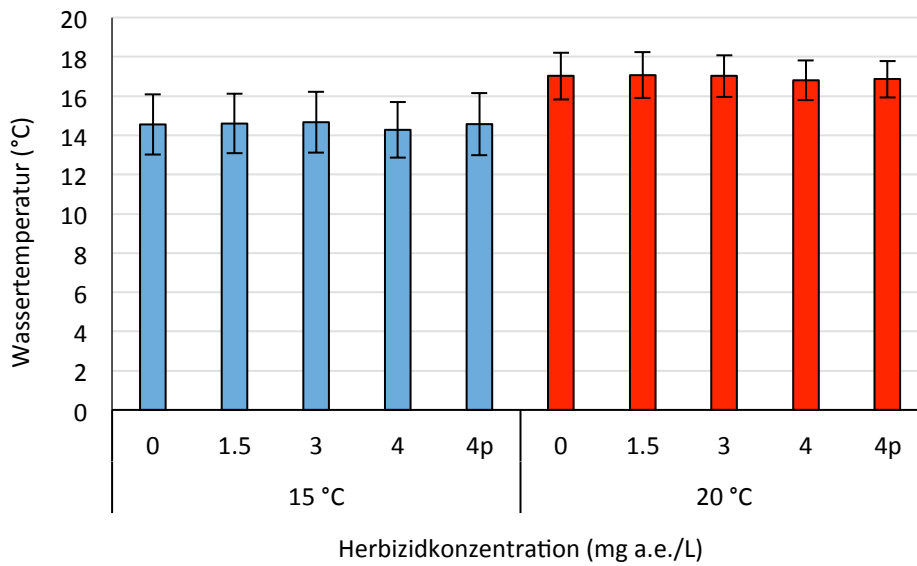


Abb. 9: Herbizid- und Temperatureffekte auf die Wassertemperatur. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 25.

Der Sauerstoffgehalt wurde signifikant von der Herbizidkonzentration und der Temperatur beeinflusst, jedoch nicht von der Interaktion der beiden (Tab. 3). Bei beiden Temperaturvarianten stieg der Sauerstoffgehalt mit steigender Herbizidkonzentration (Abb. 10). Bei 15°C wurde bei allen Herbizidkonzentrationen ein höherer Sauerstoffgehalt als bei 20°C gemessen.

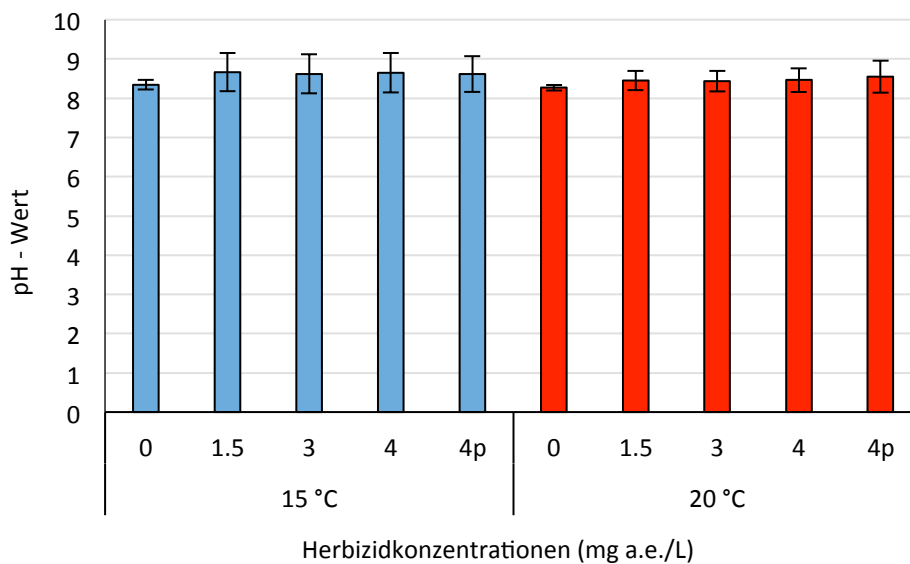


Abb. 10: Herbizid- und Temperatureffekte auf den Sauerstoffgehalt im Umgebungswasser der Versuchstiere. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 25.

Tab. 3: ANCOVA Ergebnisse zum Einfluss von Herbizid und Temperatur auf pH-Wert, Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt im Umgebungswasser von *Bufo bufo*. Signifikante Effekte in Fettdruck.

Variable	Herbizid		Temperatur		Herbizid x Temperatur	
	F	P	F	P	F	P
pH-Wert	7,716	<b>&lt; 0,001</b>	0,037	0,847	1,329	0,258
Wassertemperatur	0,802	0,525	378,098	<b>&lt; 0,001</b>	0,123	0,974
Sauerstoffgehalt	8,054	<b>&lt; 0,001</b>	37,993	<b>&lt; 0,001</b>	1,110	0,351

### 3.6 Schwanzdeformationen bei Kaulquappen

Kurz vor Beendigung der Versuche (am 9. Mai) wies ein Großteil der Kaulquappen in den Mesokosmen bei 15°C deformierte Schwänze auf (Abb. 11, Abb. 12). Die meisten hatten die Schwanzspitze in eine Richtung gekrümmt. Die Schwänze der Kaulquappen waren signifikant von Herbizid, Temperatur und deren Interaktion beeinflusst (Tab. 1). Es wurden keine Schwanzdeformationen, in der Kontrollgruppe bei 15°C, oder in sämtlichen Versuchsbehältern bei 20°C festgestellt.

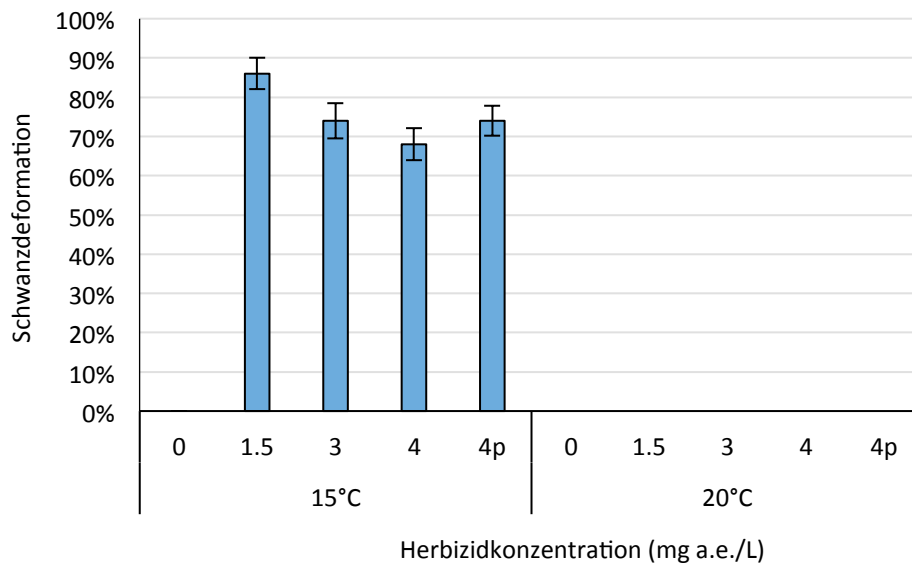


Abb. 11: Anteil an Kaulquappen mit deformierten Schwänzen 25 Tage nach Versuchsbeginn. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5.



Abb. 12: Deutlich sichtbare Schwanzdeformationen bei 4 von 5 Kaulquappen bei einer Herbizidkonzentration von 1,5 mg a.e./L bei 15°C; das Foto wurde 25 Tage nach Versuchsbeginn gemacht.

### 3.7 Algenanalyse

Unter den verschiedenen Pestizidbehandlungen und Temperaturen entwickelte sich unterschiedliches Algenwachstum im Umgebungswasser der Versuchstiere. Es konnten Algenarten aus 4 verschiedenen Familien nachgewiesen werden: Bacillariophyceae (34 spp.), Chlorophyceae (6 spp.), Trebouxiophyceae (2 spp.) and Xanthophyceae (1 spp.). Der Shannon diversity Index für Algen lag bei 15°C um 20,7% höher als bei 20°C (Abb. 13). Bei 15°C lag der höchste Shannon Index bei 0 mg a.e./L ( $2.48 \pm 0.27$ ), bei 20°C lag er bei 4 mg a.e./L ( $2.29 \pm 0.06$ ). Der niedrigste Shannon Index trat bei 15°C bei 3 mg a.e./L ( $2.14 \pm 0.18$ ) und bei 20°C bei 4p mg a.e./L ( $1.23 \pm 0.39$ ) auf.

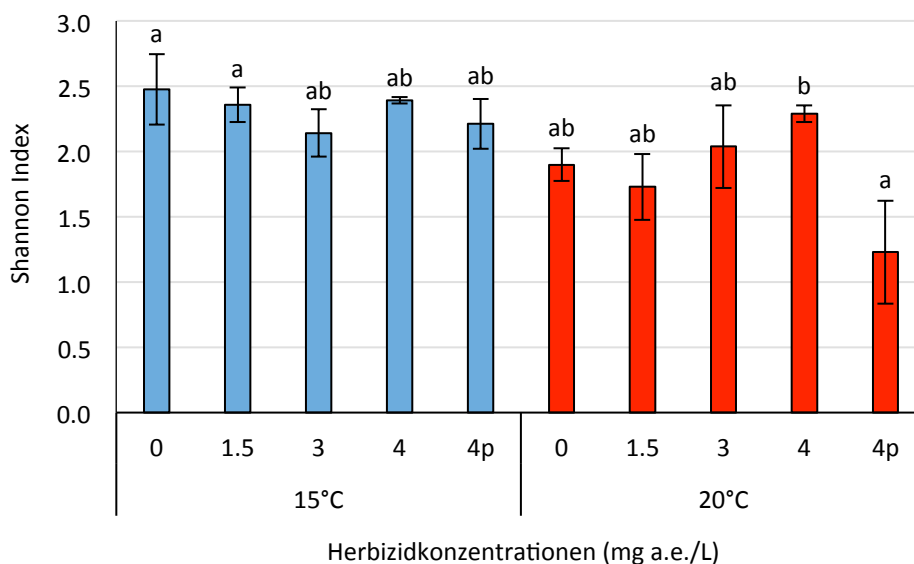


Abb 13: Algen Diversität anhand des Shannon Index bei unterschiedlichen Herbizid- und Temperaturbedingungen. Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3. Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

Die Herbizidbehandlung führte zu einer signifikanten Abnahme der Algendiversität (Shannon Index) und einer Verschiebung der Artenzusammensetzung (Evenness; Tab. 1). Unter erhöhter Temperatur war die Algendiversität (Shannon und Evenness) signifikant reduziert (Tab. 1). Bei beiden Temperaturvarianten zeigte sich ein leichter Trend zur maximalen Algenartenzahl bei den Kontrollvarianten (0 mg a.e./L).

Alle Konzentrationen zusammengefasst wurden im Mittel 33 Algenarten und  $2,9E+07 \pm 7,8E+06$  Algenzellen/L bei 15°C bzw. 30 Algenarten und  $4,9E+07 \pm 3,0E+07$  Algenzellen/L bei 20°C nachgewiesen. Weder die Algendichte noch die Algendiversität zeigte signifikante Effekte auf Körperlänge, Körperbreite, Schwanzlänge oder körperlichen Zustand der Kaulquappen, jedoch hatte die Algendichte einen marginalen Effekt auf die Körperlänge ( $F = 4,096$   $P = 0,060$ ).

### 3.8 Glyphosat- und Hormonanalysen

Die von Prof. Axel Mentler, Institut für Bodenkunde, BOKU Wien am Wasser durchgeführten Analysen auf Glyphosat und AMPA (Metabolit von Glyphosat) bestätigten die Höhe der verwendeten Ausgangskonzentrationen in den Versuchswannen. Bei allen von uns entnommenen Freilandproben war der Glyphosatgehalt  $< 0,1 \mu\text{g/L}$ , der Gehalt von AMPA jedoch lag bei 16 von 27 Proben über  $0,1 \mu\text{g/L}$  (bis max.  $3,205 \mu\text{g/L}$ ). Weitere Pestizide wurden bei 9 Proben gefunden, mit Konzentrationen von  $0,012 \mu\text{g/L}$  bis  $0,11 \mu\text{g/L}$ .

Dr. Roza Allabashi, Institut für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz (SIG), BOKU Wien führte die Adaptierung einer Methode zur Messung von Stresshormonen (Cortisol) der Kaulquappen durch. Es wurden bereits erste Testungen mit Kaulquappen direkt durchgeführt. Der Cortisolgehalt lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze.

## 4. Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass mögliche Kontaminationen von Erdkröten-Laichgewässern mit dem glyphosat-basierten Herbizid Roundup PowerFlex® die Schwanzlänge der Kaulquappen verkürzen, zu Schwanzdeformationen führen und die Diversität von vergesellschafteten Algengemeinschaften reduzieren können. Erwartungsgemäß beschleunigte eine höhere Wassertemperatur die Entwicklung der Kaulquappen und reduzierte die Algendiversität. Darüberhinaus beeinflusste die Interaktion von Herbizid und Temperatur die meisten morphologischen Parameter der Kaulquappen (Körperlänge, Körperbreite, Schwanzlänge, Verhältnis Körperlänge/Körperbreite, Mortalität, Schwanzdeformation) sowie die Algendiversität (Evenness-Index). Interessanterweise fanden wir jedoch keine Hinweise auf einen Dosis-Wirkungs-Effekt, d.h. die Höhe der Herbizidkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Wachstumsreaktion der Kaulquappen oder die Algendiversität bzw. Algendichte.

Im Allgemeinen bestätigen unsere Ergebnisse frühere Studien, die Effekte von verschiedenen Roundup-Formulierungen auf das Wachstum von nordamerikanischen Arten getestet haben (Edge et al. 2014, Lanctôt et al. 2014, Navarro-Martin 2014, Relyea 2004, Howe et al. 2004, Relyea 2012, Wojtaszek et al. 2004). Unser Befund einer um 4,2% verkürzten Schwanzlänge nach Roundup PowerFlex® Zugabe (15°C) steht jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen von *Rana sylvaticus*, bei dem die Zugabe von VisionMax® (2,9 mg a.e./L) verlängerte Schwänze aufwies (Navarro-Martin 2014). Eine Erklärung für ein reduziertes Kaulquappenwachstum nach Beigabe eines Herbizids bei 15°C könnte die herbizidinduzierte Verringerung der Algendiversität sein, die für die Kaulquappen eine wichtige Nahrungsquelle darstellen (Wojtaszek et al. 2004). Auch in unseren Versuchen wurden Algen als Futter bevorzugt, obwohl die Kaulquappen mit Fischfutter *ad libitum* gefüttert wurden. Unser Resultate zeigten weiters, dass die Herbizidkonzentration das Wachstum der Kaulquappen nur bei 15°C beeinflusste, jedoch nicht bei 20°C. Dies führt zur Annahme, dass steigende Temperaturen die Toxizität des getesteten Herbizids nicht signifikant erhöhten. Daraus kann gefolgert werden, dass eine höhere Temperatur den ungünstigen Effekt des Herbizids aufgewogen hat, indem die Entwicklung der Kaulquappen beschleunigt und die Dauer der Herbizideinwirkung reduziert wurde (Rohr et al. 2011). Über die ökologischen Konsequenzen von verkürzten Schwänzen bei Kaulquappen ist wenig bekannt, es wird aber angenommen, dass Kaulquappen mit kürzeren Schwänzen Fressfeinden schwerer entkommen können, als solche mit längeren Schwänzen (Hoff und Wassersug 2000, Wilbur und Semlitsch 1990).

Wie erwartet und in Übereinstimmung mit anderen Studien (SanuyD et al. 2008, Derakhshan und Nokhbatolfoghahai 2015) zeigte sich in unserer Untersuchung, dass sich Kaulquappen bei 20°C viel schneller entwickelten und schneller wuchsen als bei 15°C. Das Verhältnis von Körperlänge zu Körperbreite war bei höherer Temperatur mit 5% leicht gesteigert. Die Temperatur wirkte sich signifikant auf die Bildung von deformierten Schänzen aus. Sie wurde nur bei mit Herbizid behandelten Tieren bei 15°C vorgefunden, jedoch waren keine Schwanzdeformationen bei 20°C beobachtbar. Obwohl Modelle zum Klimawandel höhere Temperaturen während der Laichablage (Laloe et al. 2014), Laichentwicklung und Überwinterung voraussagen, könnte sich während warmer Frühlingsperioden die Phänologie von wechselwarmen Tieren zeitlich nach vorne verlegen, um das warme Klima zu kompensieren (Gao et al. 2015, Klaus und Loughheed 2013, Benard 2015). In manchen Fällen könnten sich durch die phänologische Verschiebung aufgrund eines warmen Frühlings und Winters auch kalte Temperaturen für die Kaulquappen ergeben (Benard 2015). Im Großen und Ganzen existiert ein großer Defizit an Daten, was die saisonale Variation von Temperaturen in Laichgewässern betrifft, und was das Ausmaß betrifft, in dem globaler Klimawandel dies beeinflussen könnte.

Das ökologisch bedeutsamste Ergebnis unserer Studie ist wahrscheinlich der interaktive Effekt zwischen Herbiziden und der Temperatur auf verschiedene Parameter der Kaulquappen und Algen. Unserer Kenntnis nach ist dies das erste Mal, dass Herbizid-Temperatur-Interaktionen mit einem glyphosat-basierten Herbizid an einer europäischen Krötenart und deren vergesellschafteten Algen nachgewiesen wurden. In den Versuchsbehältern bei 15°C, die mit Herbizid behandelt wurden, hatten 76% aller Kaulquappen deformierte Schwänze, wohingegen es in den herbizidfreien Behältern bei 15°C und auch in den mit Herbizid behandelten Behältern bei 20°C keine deformierten Schwänze gab. Im Allgemeinen werden Deformationsraten von > 5% als unnatürlich angesehen und deshalb in Richtlinien für die Beobachtung von Amphibien festgehalten (Wagner et al. 2014). Die Feststellung, welche anderen Prinzipien als Dosis-Effekt-Reaktionen hier mitspielen, erfordert weitere Untersuchungen (Vandenberg et al. 2012).

Schwanzdeformationen, die auf glyphosat-basierte Herbizide zurückzuführen sind, wurden auch in anderen Studien gefunden: z. B. 50 – 90% der tropischen Froschart *Scinax nasicus* zeigten Schwanzdeformationen, wenn sie 3,0 – 7,5 mg/L Glyphos® ausgesetzt wurden (Lajmanovich et al. 2003). Auch Herbizide mit anderen Wirkstoffen als Glyphosat, z. B. Isoproturon, werden schon bei eher niedrigen Konzentrationen (0,1 - 100 µg/L) als Auslöser für Deformationen bei Kaulquappen von *Bombina variegata* und *Rana arvalis* beschrieben (Greulich 2004).

Interaktive Auswirkungen von Herbiziden und Temperatur führten zu reduzierten Körperlängen, Körperbreiten und Schwanzlängen von 2 - 10% bei 15°C. Die gleichen Parameter schienen mit 2 - 8% bei 20°C zu steigen (nicht signifikant), wenn mit Herbizid behandelt wurde, verglichen mit den unbehandelten Behältern. Generell ist sehr wenig über kombinierte Effekte von Herbiziden und Temperatur auf aquatische Organismen, besonders bei Amphibien, bekannt (Rohr et al. 2011, Wagner und Lötters 2013)), da die meisten Studien Herbizidwirkungen bei nur einem Temperaturlevel untersuchten. Eine Studie mit Roundup Original MAX® fand Auswirkungen auf die Schwanzbreite und Körperbreite, jedoch nicht auf die Körperlänge von *Rana pipiens* und *R. sylvaticus* bei 12°C (Relyea 2012). Ähnlich zu unseren Ergebnissen sank die Nasen-Anus-Länge von *Rana pipiens* – Kaulquappen bei der Behandlung mit 0,6 und 1,8 a.e./L Roundup Original® and Roundup Transorb® bei 20°C (Howe et al. 2004). Im Gegensatz zu unserer Studie stieg die Wachstumsrate von *R. clamitans* – Kaulquappen, die mit 1,43 mg a.e./L des Herbizids Vision® bei 20°C behandelt wurden (Li et al. 2013). Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte sein, dass sich glyphosat-basierte Herbizide normalerweise deutlich bei ihren (nicht angegebenen) Zusatzstoffen unterscheiden, von denen gezeigt wurde, dass sie genauso schädlich für Nichtzielorganismen sein können wie der Wirkstoff selbst (Wagner et al. 2013, Relyea 2005, Perkins et al. 2000, Edgington et al. 2004). In welchem Ausmaß Laichgewässer von Amphibien mit glyphosat-basierten Herbiziden kontaminiert sind, hängt stark von den Umständen in der Region ab, z. B. wie sorgfältig Herbizide nach den Vorschriften appliziert wurden, was den Abstand zu Gewässern betrifft. Die meisten Studien berichten von Glyphosatkonzentrationen in Oberflächengewässern von größeren Seen oder Flüssen, während viele Amphibien aber kleine, flache und stehende Gewässer zum Abbläuen nutzen. In Oberflächengewässern in Deutschland wurden kurz nach einer Herbizidapplikation Glyphosatkonzentrationen zwischen 0,27 und 3,10 mg a.e./L gefunden (Wagner et al. 2013). Bei den von uns stichprobenmäßig aus dem Freiland entnommenen Gewässerproben aus landwirtschaftlich genutzten Regionen in und um Wien wurden zwar nur sehr geringe Konzentrationen von Glyphosat und AMPA nachgewiesen, jedoch zeigt das Vorhandensein des Glyphosat-Abbauprodukts AMPA, dass ein Eintrag von Glyphosat in Amphibiengewässer trotz strenger Verwendungsrichtlinien von Herbiziden stattfindet.

Die Algendiversität (Shannon- und Evenness-Index) wurde in unserem Experiment signifikant durch Herbizide und erhöhte Temperatur reduziert, wobei der Effekt des Herbizids bei höherer Temperatur

stärker ausgeprägt war als bei niedriger Temperatur (Interaktion Herbizid x Temperatur). Die Reduktion von Algenzellen bei der Herbizidbehandlung war niedriger als von Pestiziden erwartet wurde, die Pflanzen eliminieren. Mögliche Effekte von glyphosatbasierten Herbiziden auf aquatische Algengemeinschaften wurden bisher wenig untersucht, unsere Studie ist offenbar eine der wenigen, die sich mit diesem Thema beschäftigt. Das Wachstum von Grünalgen (*Scenedesmus acutus*, *S. quadricauda*) wurde mit chemisch reinem Glyphosat und Ron-do, eine Glyphosatformulierung, die in aquatischen Systemen verwendet wird, gehemmt (Saenz et al. 1997). In Toxizitätstests, bei denen die Auswirkung von glyphosat-basierten Herbiziden auf einzelne Algenarten (Kieselalgen und Grünalgen) getestet wurde, wurden stärkere Auswirkungen auf Kieselalgen (*Skeletonema costatum*) gefunden (Tsui und Chu 2003). Andere Untersuchungen ergaben, dass das Wachstum gehemmt wurde, wenn *S. quadricauda* mit einer unspezifischen glyphosat-basierten Formulierung behandelt wurde (Wong 2000) oder wenn vier Süßwasserarten von Phytoplankton mit technical grade glyphosat behandelt wurde (Vendrell et al. 2009). Da Algen fähig sind Mykospurin-ähnliche Aminosäuren zu produzieren, wenn sie gestresst werden, und dieser Prozess vom Shikimatsäureweg abhängen kann (Shick und Dunlap 2002), ist es möglich, dass glyphosat-basierte Herbizide zu einer Abnahme der Produktion dieser Aminosäuren führen können ( Shick et al. 1999), was wahrscheinlich auch den Effekt von Temperaturstress auf Algengemeinschaften erhöht.

Wie erwartet, war der Sauerstoffgehalt negativ mit der Wassertemperatur korreliert, d.h. je kälter das Wasser war, desto höher war der Sauerstoffgehalt (Wetzel 2001). Obwohl die Sauerstoffkonzentration unter den verschiedenen Temperatur- und Herbizidbehandlungen stark variierte, schließen wir einen Sauerstoffmangel aus, da der niedrigste gemessene Wert bei 8,2 mg/L lag, was für eine gesicherte Entwicklung von Kaulquappen als ausreichend gilt (Ultsch et al. 1999). Als eine Konsequenz von erhöhter Temperatur sank der Level des gelösten Sauerstoffs, was das Wachstum der Kaulquappen beeinflusst hat. Im Gegensatz zu unserer Studie fand man in anderen Studien eine Abnahme des pH-Wertes mit zunehmender Roundup® - Konzentration (Tsui und Chu 2003), jedoch könnte dies auch auf unbekannte Zusatzstoffe in den verschiedenen Formulierungen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend gibt es mehrere Gründe, wie unsere Ergebnisse einen Beitrag zur wissenschaftlichen Diskussion von Pestizideinflüssen auf Nicht-Ziel-Organismen leisten können:

- Erstens, aufgrund des anthropogenen Klimawandels werden Extrem-Temperaturereignisse künftig wahrscheinlich öfter auftreten, wodurch die hier aufgezeigten Nicht-Ziel-Effekte von Herbiziden mehr Brisanz erlangen könnten (IPCC 2013, Kattwinkel et al. 2011).
- Zweitens, es sollte in der ökotoxikologischen Betrachtung mehr Aufmerksamkeit auf mögliche sublethale Effekte und deren ökologischer Konsequenzen gelegt werden. Die Interaktion von Herbizid und Temperatur im vorliegenden Experiment lässt folgern, dass interspezifische und intraspezifische Beziehungen in aquatischen Ökosystemen sehr wahrscheinlich beeinflusst werden, wenn Taxa unterschiedlich auf diese Umweltstressfaktoren antworten.
- Drittens, unsere Studie zeigt weiters, dass ökotoxikologische Protokolle, die Nicht-Ziel-Effekte von Herbiziden unter konstanten Temperaturbedingungen bewerten mögliche Feldbedingungen wahrscheinlich nicht korrekt nachbilden.

## 5. Zitierte Literatur

- Annett R, Habibi HR, Hontela A (2014) Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34: 458-479.
- Arnold N, Ovenden D (2002) A field guide to the reptiles and amphibians of Britain and Europe. London: HarperCollins.
- 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.
- Baylis AD (2000) Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299-308.
- Benard MF (2015) Warmer winters reduce frog fecundity and shift breeding phenology, which consequently alters larval development and metamorphic timing. *Global Change Biology* 21: 1058-1065.
- Berger G, Graef F, Pfeffer H (2013) Glyphosate applications on arable fields considerably coincide with migrating amphibians. *Scientific Reports* 3.
- Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PT, Buck JC, et al. (2011) The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223: 108-119.
- 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.
- Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3: 1135.
- Butterwick C, Heaney SI, Talling JF (2005) Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology* 50: 291-300.
- 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.
- Derakhshan Z, Nokhbatolfigohahai M (2015) Thermal tolerance limits and effects of temperature on the growth and development of the green toad, *Bufo viridis*. *German Journal of Herpetology* 51: 129-136.
- Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management and Science* 64: 319-325.



- Edge C, Thompson D, Hao C, Houlahan J (2014) The response of amphibian larvae to exposure to a glyphosate-based herbicide (Roundup WeatherMax) and nutrient enrichment in an ecosystem experiment. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 109: 124-132.
- Edgington AN, Sheridan PM, Stephenson GR, Thompson DG, Boermans HJ (2004) Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 815-822.
- 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.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA (1997) *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Fryday S, Thompson H (2012) Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. Sand Hutton, York, UK: European Food Safety Authority. 348 p.
- Fuentes L, Moore LJ, Rodgers JH, Bowerman WW, Yarrow GK, et al. (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.
- Gao X, Jin C, Llusia D, Li Y (2015) Temperature-induced shifts in hibernation behavior in experimental amphibian populations. *Scientific Reports* 5: 11580.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35-120.
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Greulich K (2004) Einfluss von Pestiziden auf Laich und Larven von Amphibien am Beispiel eines Herbizides (Isoproturon) und eines Insektizides (Cypermethrin). *Studien und Tagungsberichte (Band 49)*. Potsdam: Landesumweltamt Brandenburg.
- Hindák F, Cyrus Z, Marvan P, Javornický P, Komárek J, et al. (1978) *Sladkovodné riasy*. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo.
- Hoff Kv, Wassersug RJ (2000) Tadpole locomotion: axial movement and tail functions in a largely vertebraeless vertebrate. *American Zoology* 40: 62-76.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, et al. (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1928-1938.

- IPCC (2013) Climate Change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press. 1535p.
- IUCN (2004) IUCN red list of threatened species: A global species assessment. Gland, SUI and Cambridge, UK: IUCN.
- Jedinger M (2016) Climate warming and herbicide effects on the development of Amphibia: European toad (*Bufo bufo* L.), Masterarbeit, Universität für Bodenkultur. In prep.
- Kattwinkel M, Kühne JV, Foit K, Lies M (2011) Climate change, agricultural insecticide exposure, and risk for freshwater communities. *Ecological Applications* 21: 2068-2031.
- Katzenberger M, Hammond J, Duarte H, Tejedo M, Calabuig C, et al. (2014) Swimming with Predators and Pesticides: How Environmental Stressors Affect the Thermal Physiology of Tadpoles. *PLOS ONE* 9.
- Klaus SP, Loughheed SC (2013) Changes in breeding phenology of eastern Ontario frogs over four decades. *Ecology and Evolution* 3: 835-845.
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1986) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/1: Bacillariophyceae, 1. Teil: Naviculaceae. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag. 876 p.
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1988) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/2: Bacillariophyceae, 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1991a) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/3: Bacillariophyceae, 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1991b) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/4: Bacillariophyceae, 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (*Lineolata*) und Gomphonema, Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag.
- 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.
- Laloe J-O, Cozens J, Renom B, Taxonera A, Hays GC (2014) Effects of rising temperature on the viability of an important sea turtle rookery. *Nature Climate Change* 4: 513-518.
- Lanctôt C, Navarro-Martín L, Robertson C, Park B, Jackman P, et al. (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.

- Lenhardt PP, Brühl CA, Berger G (2015) Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring. *Basic and Applied Ecology* 16: 54-63.
- Li Y, Cohen JM, Rohr JR (2013) Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology* 8: 145-161.
- 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.
- MONSANTO (2014) Sicherheitsdatenblatt: Roundup® PowerFlex. Antwerpen, BE: MONSANTO Europe S.A./N.V..
- Moore H, Chivers DP, Ferrari MCO (2015) Sub-lethal effects of Roundup™ on tadpole anti-predator responses. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 111: 281-285.
- Moore LJ, Fuentes L, Rodgers JH, Bowerman WW, Yarrow GK, et al. (2012) Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 78: 128-133.
- Muñoz LMH, Rojas CMM, Bautista MHB (2014) Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux® 411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de Biología Tropical* 63: 223-233.
- Navarro-Martín L, Lanctôt C, Jackman P, Park BJ, Doe K, et al. (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.
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, et al. (2009) The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International* 35: 971-986.
- 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.
- Popp, M., Hann, S., Mentler, A., Fürhacker, M., Stingeder, G., and Köllensperger, G. (2008). Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 695-699.

- Relyea RA (2004) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1737-1742.
- Relyea RA (2005) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15: 618-627.
- Relyea RA (2005) The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15: 1118-1124.
- Relyea RA (2011) Amphibians are not ready for Roundup®. In: Elliott JE, Bishop CA, Morrissey CA, editors. *Wildlife ecotoxicology: forensic approaches*. New York: Springer. pp. 466.
- Relyea RA (2012) New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications* 22: 634-647.
- Rohr J, Madison D, Sullivan A (2003) On temporal variation and conflicting selection pressures: a test of theory using newts. *Ecology* 84: 1816-1826.
- Rohr JR, Palmer BD (2013) Climate Change, Multiple Stressors, and the Decline of Ectotherms. *Conservation Biology* 27: 741-751.
- Rohr JR, Sesterhenn TM, Stieha C (2011) Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants. *Global Change Biology* 17: 657-666.
- Saenz ME, Di Marzio WD, Alberdi JL, del Carmen Tortorelli M (1997) Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 638-644.
- Sanuy D, Oromí N, Galofré A (2008) Effects of temperature on embryonic and larval development and growth in the natterjack toad (*Bufo calamita*) in a semi-arid zone. *Animal Biodiversity and Conservation* 31: 41-46.
- Schabhüttl S, Hingsamer P, Weigelhofer G, Hein T, Weigert A, et al. (2013) Temperature and species richness effects in phytoplankton communities. *Oecologia* 171: 527-536.
- Shick JM, Dunlap WC (2002) Mycosporine-Like Amino Acids and Related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms. *Annual Reviews of Physiology* 64: 223-262.
- Shick JM, Romaine-Lioud S, Romaine-Lioud S, Ferrier-Pagès C, Gattuso JP (1999) Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 44: 1667-1682.
- Struger J, Thompson D, Staznik B, Martin P, McDaniel T, et al. (2008) Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 378-384.

- Todorovic, G., Mentler, A., Popp, M., Hann, S., Kollensperger, G., Rampazzo, N., and Blum, W. (2013). Determination of glyphosate and AMPA in three representative agricultural Austrian soils with a HPLC-MS/MS method. *Soil Sediments and Contamination* 22, 332-350.
- Trumbo J (2005) An assessment of the hazard of a mixture of the herbicide Rodeo® and the non-ionic surfactant R-11® to aquatic invertebrates and larval amphibians. *California Fish Game* 91: 38-46.
- 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.
- Ultsch GR, Bradford DF, Freda J (1999) Physiology: coping with the environment (Chapter 8). In: McDiarmid RW, Altig R, editors. *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. Chicago: University of Chicago Press. pp. 189-214.
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 9: 1-38.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, et al. (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33: 378-455.
- Vendrell E, Gómez de Barreda Ferraz D, Sabater C, Carrasco JM (2009) Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: A microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 538-542.
- 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 in 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.
- Wagner N, Züghart W, Mingo V, Lötters S (2014) Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. *Ecological Indicators* 45: 394-401.
- Whitehead PG, Wilby RL, Battarbee RW, Kernan M, Wade AJ (2009) A review of the potential impacts of climate change on surface water quality. *Hydrological Sciences Journal* 54: 101-123.
- Wilbur HM, Semlitsch RD (1990) Ecological consequences of tail injury in *Rana* tadpoles. *Copeia* 1990: 18-24.

- 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.
- Wilson BA, Smith VH, deNoyelles F, Larive CK (2003) Effects of Three Pharmaceutical and Personal Care Products on Natural Freshwater Algal Assemblages. *Environmental Science and Technology* 37: 1713-1719.
- 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.
- Wong PK (2000) Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41: 177-182.
- Wetzel RG (2001) *Limnology: lake and river ecosystems*. San Diego, USA and London, UK: Academic. 1006p.

## 6. Veröffentlichungen aus dem vorliegenden Projekt

### 6.1 Veröffentlichungen in internationalen Zeitschriften

Baier F, Gruber E, Brühl CA, Hein T, Bondar-Kunze E, Ivankovic M, Spangl B, Zaller JG (2016). Non-target effects of glyphosate-based herbicides on Common toads (Amphibia) and associated algae are altered by temperature: implications of climate change. PLOS ONE, in Begutachtung.

Baier F, Jedinger M, Gruber E, Zaller JG (2016) Combined effects of a glyphosate-based herbicide and temperature on eggs and tadpoles of the Common toad (*Bufo bufo*; Amphibia). Frontiers in Environmental Science, in Begutachtung.

### 6.1 Präsentationen auf Konferenzen

Baier F, Gruber E, Spangl B, Zaller JG (2016) Effects of a glyphosate-based herbicide on the growth of Common toads (*Bufo bufo* L.; Amphibia: Anura) at different temperatures, European Geosciences Union General Assembly, Wien, 17. April 2016 - 22. April 2016. Posterpräsentation.

Baier F, Gruber E, Zaller JG (2015). Can climate warming alter side-effects of herbicides on the development of Common toads (*Bufo bufo* L.; Amphibia: Anura)? Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie für Deutschland, Österreich und die Schweiz, Göttingen, 31. August – 4. September 2015. Posterpräsentation.

Baier F, Gruber E, Zaller JG (2015). Can climate warming alter side-effects of herbicides on the development of Common toads (*Bufo bufo* L.; Amphibia: Anura)? Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie für Deutschland, Österreich und die Schweiz, Wien. Posterpräsentation.

Baier F (2016) Effects of a glyphosate-based herbicide and temperature on the development of Common toads (*Bufo bufo*, L.; Amphibia: Anura). 11. CAS Semester Touchdown 9. Juni 2016, Universität für Bodenkultur, Wien. Posterpräsentation.

Baier F, Gruber E, Spangl B, Zaller JG (2016) Effects of a glyphosate-based herbicide and temperature on the development of Common toads (*Bufo bufo*, L.; Amphibia: Anura), SETAC Europe 26<sup>th</sup> Annual Meeting, Nantes, Frankreich. 22. -26. Mai 2016. Vortrag.

Jedinger M, Gruber E, Zaller JG (2015). Klimawandel und Herbizide - Einflüsse auf die Entwicklung der Erdkröte (*Bufo bufo* L., Amphibia). 16. Österreichischer Klimatag, Wien, Österreich, 28. – 30. April 2015. Posterpräsentation.

## 6.2 Masterarbeiten und Berichte

Baier F (2016) Effects of a glyphosate-based herbicide and temperature on the development of Common toads (*Bufo bufo* L.; Amphibia: Anura), Masterarbeit, Universität für Bodenkultur. In Vorbereitung.

Jedinger M (2016) Climate warming and herbicide effects on the development of Amphibia: European toad (*Bufo bufo* L.), Masterarbeit, Universität für Bodenkultur. In Vorbereitung.

Zaller JG (2016) Endbericht für Forstamt und Landwirtschaftsbetrieb Wien (Magistratsabteilung 49), Projekt MA 49-808754/2014/5, Wien.

Zaller JG (2016) Endbericht für die Wiener Umweltschutzabteilung (Magistratsabteilung 22), Projekt MA 22 – 1629490/2014, Wien.



## 7. Dank

Wir danken dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (BMLFUW) für die Finanzierung des Projektes, dem Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung und Wirtschaft für die Erteilung der Tierschutzgenehmigung, der Magistratsabteilung 22 (Wiener Umweltschutzabteilung) für die Erteilung einer Sammelgenehmigung für geschützte Amphibien, der Magistratsabteilung 49 (Forstamt und Landwirtschaftsbetrieb der Stadt Wien) für die Grundbesitzergenehmigung zur Entnahme der Amphibieneier aus dem Freiland, dem Tierschutzgremium der Universität für Bodenkultur Wien für die Unterstützung bei der Antragstellung für die Tierversuchsgenehmigung.

Besonderer Dank gilt Fabian Baier BSc und Mathias Jedinger BSc für die Durchführung der Experimente. Herrn Fabian Baier BSc für das Verfassen von Publikationen und Präsentationen, die als Grundlage für diesen Bericht dienten. Frau Mag. Edith Gruber für die Vorbereitung, Koordination und Betreuung der Experimente sowie die Unterstützung bei der Erstellung der Projektberichte. Herrn Dr. Carsten Brühl (Universität Koblenz – Landau) für seine fachliche Beratung während der gesamten Studie. Frau DI Dr. Roza Allabashi und ihrem Team (Institut für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz (SIG)) für die Entwicklung einer Methode zur Analyse von Stresshormonen bei Kaulquappen, Herrn Assoc. Prof. Dr. Thomas Hein und seinem Team (Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement (IHG)) für die Analyse der Algenproben und Herrn Ass. Prof DI Dr. Axel Mentler (Institut für Bodenforschung IGF) und seinem Team für die chemische Analyse unserer Proben.