

Studien und Tagungsberichte des Landesumweltamtes

Band 49

Einfluss von Pestiziden auf Laich und Larven von Amphibien



Studien und Tagungsberichte
Band 49

Einfluss von Pestiziden auf Laich und Larven von Amphibien

am Beispiel eines Herbizides (Isoproturon)
und eines Insektizides (Cypermethrin)

1 Inhalt

1	Zusammenfassung	5
1.1	Summary	6
2	Publikationsreferenzen	8
2.1	Referenzen zu dieser Dissertationsschrift	8
2.2	Kongressbeiträge	8
3	Einleitung	9
3.1	Untersuchte Pestizidwirkstoffe und deren Freilandkonzentrationen	9
3.2	Toxizität	12
3.3	Biotransformation	13
3.4	Testorganismen	14
3.5	Ziele der Arbeit	16
4	Material und Methoden	18
4.1	Material	18
4.1.1	Geräte	18
4.1.2	Radiochemikalien	18
4.1.3	Chemikalien	19
4.1.4	Puffer	19
4.1.5	Testorganismen	20
4.1.5.1	Hälterung von Laich und Larven	20
4.1.5.2	Beschreibung der untersuchten Larvalstadien	20
4.1.6	Untersuchungsgewässer	21
4.2	Methoden	22
4.2.1	Untersuchungen im Freiland	22
4.2.1.1	Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen	22
4.2.1.2	Amphibienspektrum	23
4.2.1.3	Gewässerparameter	23
4.2.2	Exposition mit ¹⁴ C-markierten Wirkstoffen	23
4.2.2.1	HPLC-Analyse von ¹⁴ C-markiertem Isoproturon	24
4.2.3	Exposition von Amphibienlarven in Wirkstoffen und Handelsprodukten	24
4.2.4	Ermittlung der Schlupfraten	25
4.2.5	Exposition verschiedener Entwicklungsstadien	25
4.2.6	Aktivität der Biotransformationsenzyme	25
4.2.6.1	Präparation der Enzymextrakte	25
4.2.6.2	Messung der Enzymaktivitäten	26
4.2.6.3	Bestimmung des Proteingehaltes	26
4.2.6.4	Berechnung der Enzymaktivitäten	26
4.2.7	Statistische Prüfverfahren	26
5	Ergebnisse	27
5.1	Freilanduntersuchungen	27
5.1.1	Wirkstoffkonzentrationen nach Freilandapplikation	27
5.1.1.1	Isoproturon	27
5.1.1.2	α-Cypermethrin	27

5.1.2	Gewässerparameter	27
5.1.3	Amphibienspektrum	27
5.2	Aufnahme der ¹⁴ C-markierten Substanzen	28
5.2.1	Aufnahme in Laich	28
5.2.1.1	Isoproturon	28
5.2.1.2	Cypermethrin	28
5.2.2	Kinetik der Aufnahme in die Larven	29
5.2.2.1	Isoproturon	29
5.2.2.2	Cypermethrin	29
5.2.3	Metaboliten des Isoproturons	30
5.3	Toxizität	31
5.3.1	Schlupfraten und Teratogenität	31
5.3.1.1	Isoproturon	31
5.3.1.2	α-Cypermethrin	31
5.3.2	Beeinträchtigungen der Larven	31
5.3.2.1	Isoproturon und Handelsprodukt TOLKAN FLO®	31
5.3.2.2	α-Cypermethrin	32
5.3.3	Sensitivität bestimmter Entwicklungsphasen	32
5.3.3.1	Isoproturon	32
5.3.3.2	α-Cypermethrin	33
5.4	Biotransformation	34
5.4.1	Isoproturon	34
5.4.1.1	Reiner Wirkstoff	34
5.4.1.2	Handelsprodukte	35
5.4.1.2.1	TOLKAN FLO®	35
5.4.1.2.2	FENIKAN®	36
5.4.2	Cypermethrin	37
5.4.2.1	Wirkstoffe	37
5.4.2.1.1	Cypermethrin	37
5.4.2.1.2	α-Cypermethrin	39
5.4.2.2	Handelsprodukt	40
5.4.2.2.1	FASTAC SC®	40
6	Diskussion	41
6.1	Freilanduntersuchungen	41
6.2	Aufnahme der Pestizidwirkstoffe	42
6.3	Toxizität	43
6.4	Biotransformation	46
6.4.1	Isoproturon	46
6.4.2	Cypermethrin	49
6.5	Energetische Betrachtungen	51
6.6	Management	52
7	Schlussfolgerungen	54
8	Literatur	56
	Publikationen I-IV	64

Eine der Ursachen für den weltweit zu verzeichnenden zahlen- und flächenmäßigen Rückgang der Amphibienpopulationen ist die Belastung der Reproduktionsgewässer mit Pestiziden. Aufgrund der räumlichen und zeitlichen Koinzidenz der Applikation von Pflanzenschutzmitteln im Frühjahr mit der Laich- und Larvalentwicklung der Amphibien wird vermutet, dass die – während oder nach der Applikation – in die Gewässer gelangten Pestizide die Reproduktion der Amphibien beeinträchtigen. Zur Untersuchung der Effekte von Pestiziden auf die frühen Larvalstadien von Amphibien wurden drei der am häufigsten angewandten Wirkstoffe (aus der Gruppe der Herbizide Isoproturon und aus der der Insektizide Cypermethrin sowie α -Cypermethrin) ausgewählt und an 3 einheimischen Amphibienarten – Rotbauchunke (*Bombina bombina*), Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) und Moorfrosch (*Rana arvalis*) – getestet.

Um den Expositionen im Labor umweltrelevante Daten zugrunde legen zu können, wurde der Wirkstoffeintrag in ein Reproduktionsgewässer von Amphibien in einem intensiv landwirtschaftlich genutzten Gebiet im Land Brandenburg analysiert, wobei Maximalkonzentrationen von 22 $\mu\text{g/l}$ Isoproturon (IPU) bzw. 0,09 $\mu\text{g/l}$ α -Cypermethrin gemessen wurden.

Die Aufnahmestudien mit Hilfe der radioaktiv markierten Wirkstoffe belegten, dass sowohl IPU als auch Cypermethrin von Laich und Larven der Amphibien absorbiert wurden. Die Kinetik der Wirkstoffaufnahme zeigte artspezifische und stoffbezogene Unterschiede.

Umweltrelevante IPU-Konzentrationen beeinträchtigten den Schlupferfolg von *R. arvalis* und riefen bei Larven von *B. variegata* morphologische Schädigungen und Verhaltensänderungen hervor. Die beeinträchtigten Larven regenerierten sich nach der IPU-Exposition im Laufe ihrer weiteren Entwicklung und metamorphosierten. Auch wenn die Effekte reversibel waren, ist zu vermuten, dass sie dennoch einen erhöhten Energieverbrauch im Organismus zur Folge hatten.

Deformationen und Verhaltensabnormitäten der Larven sowie verminderte Schlupfraten des Laiches von *R. arvalis* traten erst bei Überschreitung umweltrelevanter Cypermethrin-Konzentrationen auf. Von den Schädigungen infolge der Cypermethrin-Behandlungen konnten sich die meisten Larven nicht erholen.

Auf Schadstoffkonzentrationen, die während kurzzeitiger Belastungen keine toxischen Wirkungen bei den Larven hervorriefen, reagierten die Kaulquappen während Langzeitexpositionen mit deutlichen morphologischen Veränderungen und abnormen Verhaltensmustern.

Langzeitexpositionen, sowohl in IPU als auch in Cypermethrin, bewirkten eine schnellere Entwicklung der Amphibienlarven, sie metamorphosierten im Vergleich zur Kontrolle 5–7 d früher. Diese Reaktion auf die ungünstigen Lebensbedingungen ermöglicht den Amphibien im Freiland, die kontaminierten aquatischen Habitate vorzeitig zu verlassen. Allerdings waren im Fall der Pyrethroidbelastung die metamorphosierten Jungtiere signifikant kleiner als die unbeeinträchtigten juvenilen Amphibien der Kontrollen. Inwiefern diese zunächst zu konstatierenden physischen Beeinträchtigungen und Vitalitätsminderungen im Laufe der Wachstumsphase bis zur ersten Überwinterung ausgeglichen werden können, hängt stark von den jeweils herrschenden Umweltfaktoren wie Nahrungsangebot, Prädatorenspektrum, Vegetation und Witterungsbedingungen ab.

Möglicherweise wurde die für die Wachstumsvorgänge benötigte Energie zur Biotransformation der Schadstoffe verwendet. Biotransformationsprozesse von Xenobiotika verbrauchen im Organismus große Mengen an Stoffwechselenergie.

Die Aktivierung der GST-Isoenzyme der Larven infolge der Pestizidbelastungen weist auf die Biotransformation der Xenobiotika hin, da das GST-System in den Metabolismus der untersuchten Wirkstoffe involviert ist. So reagierte das GST-System der Amphibienlarven bereits signifikant auf Schadstoff-Konzentrationen bzw. Expositionszeiten, die noch keine akut toxischen Wirkungen hervorriefen.

Im Vergleich der Amphibienspezies wiesen Larven von *B. variegata* im unbelasteten Ausgangszustand der Kontrollen bereits meist höhere GST-Aktivitäten auf als *R. arvalis*. Zudem bewirkten identische Belastungen vor allem von Cypermethrin aber auch von IPU bei *B. variegata* eine deutlich stärkere Aktivierung der GST als bei Larven von *R. arvalis*, was den intensiveren Bio-transformationsprozess der Gelbbauchunken belegt.

Im Vergleich der beiden getesteten Pyrethroidwirkstoffe (α -Cypermethrin und Cypermethrin) bewirkte α -Cypermethrin, das auch stärkere insektizide Effekte hervorruft, eine stärkere Aktivierung der GST-Isoenzyme.

Neben der Untersuchung der ökotoxischen Effekte der Wirkstoffe ist es notwendig, auch die handelsüblichen Pflanzenschutzmittel zu testen, da diese Mixturen aus Wirkstoffen und Formulierungssubstanzen die eigentlich umweltrelevanten Stoffgemische sind. Hinsichtlich der Effekte auf die GST-Isoenzyme zeigten die reinen Wirkstoffe Isoproturon bzw. α -Cypermethrin eine stärkere Reaktion in den Amphibienlarven als die entsprechenden Handelsprodukte TOLKAN FLO® und FASTAC SC®. Im Gegensatz dazu bewirkte das Phenylharnstoffherbizid FENIKAN® stärkere Aktivierungen des GST-System der Larven als das reine Isoproturon. Da der Zusatz von Emulgatoren in den Handelspräparaten den Effekt des eigentlichen Wirkstoffes offensichtlich beeinflusst und die Mechanismen chemischer und toxischer Wechselwirkungen in Stoffgemischen noch weitgehend ungeklärt sind, ist es zur Abschätzung der ökotoxischen Folgen notwendig, die Wirkung dieser Substanzgemische auf Nichtzielorganismen zu testen.

Verknüpft man die im Freiland gemessenen Pestizidkonzentrationen mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur enzymatischen und toxischen Wirkung der Pestizide wird deutlich, dass bei umweltrelevanten Schadstoffkonzentrationen ein Gefährdungspotential für Amphibien besteht. Um eine erfolgreiche Reproduktion der Amphibien – insbesondere der bedrohten Arten – zu gewährleisten und damit negative Effekte auf Populationsebene zu vermindern, ist es notwendig, die Art und Weise der Bewirtschaftung von Agrarflächen in den Verbreitungszentren dieser Amphibienspezies umweltverträglicher zu gestalten.

1.1 Summary

One of the causes of the worldwide decline of amphibian populations in terms of both number and range is the pollution of their reproduction ponds by pesticides. The application of pesticides in the springtime coincides spatially and temporally with the development of amphibian spawn and tadpoles and it is assumed that pesticides, which reach the ponds during or after application, impair amphibian reproduction. Three of the most frequently applied substances (isoproturon from the group of herbicides and cypermethrin and α -cypermethrin from insecticides) and three indigenous amphibian species – the fire-bellied toad (*Bombina orientalis*), the yellow-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the moorfrog (*Rana arvalis*) were chosen to investigate the effects of pesticides on the early life stages of amphibians.

To ensure that the laboratory experiments were based on environmentally relevant data, the entry of pesticides into the reproduction ponds of amphibians was analysed in an intensively used agricultural area of the German state of Brandenburg. The maximum concentrations measured were 22 $\mu\text{g/L}$ isoproturon (IPU) and 0.09 $\mu\text{g/L}$ α -cypermethrin.

The uptake studies using radioactively labelled substances demonstrated that IPU and cypermethrin were absorbed by the spawn and tadpoles of amphibians. The uptake kinetic showed differences between tested species and substances.

Environmentally relevant concentrations of IPU diminished the hatching success of *R. arvalis* and evoked morphological damage and behavioural aberrations in *B. variegata* tadpoles. After exposure to IPU the impaired tadpoles were able to recover during their further development, and they metamorphosed successfully. Although the effects were reversible, it is supposed that they were accompanied by higher energy consumption in the organism.

Deformities and behavioural abnormalities of the tadpoles as well as a diminished hatching rate of *R. arvalis* spawn occurred only at cypermethrin concentrations exceeding the environmentally relevant range. Most of the tadpoles were unable to recuperate from damage caused by cypermethrin treatment at this level.

Long-term exposure to concentrations of the active substances that had no toxic effects during brief exposure resulted in morphological alterations and aberrant behaviour in the tadpoles. Chronic exposure to IPU as well as cypermethrin accelerated the development of the larvae; they metamorphosed 5–7 days earlier than the corresponding control. This reaction to the unfavourable living conditions allowed the amphibians in the field to leave the contaminated aquatic habitats sooner. However, after pyrethroid treatment the metamorphosed juveniles were significantly smaller than the unaffected amphibians of the corresponding control. Whether these physical impairments and reductions of vitality will be compensated for during the growth period up to the first hibernation depends strongly on several environmental factors such as food conditions, predators, vegetation, and weather.

It is possible that the energy required for the amphibians' growth was used for detoxication of the active substances. Organisms need a lot of energy to metabolise xenobiotics in their detoxication processes.

The fact that pesticide treatment leads to activation of the tadpoles' enzyme system of glutathione S-transferases (GST) points to detoxication of the xenobiotics since the GST-system is involved in the metabolism of tested substances. The GST-isoenzymes of the amphibian larvae reacted significantly to pesticide concentrations and exposure times even before the appearance of toxic effects.

Higher basic GST-activities were measured in tadpoles of *B. variegata* compared to *R. arvalis* in the unpolluted situation of controls. Identical concentrations of IPU and also cypermethrin evoked a significantly stronger GST-activation in *B. variegata* compared to *R. arvalis*. This is proof of the more intensive detoxication process of the yellow-bellied toads.

The active substance α -cypermethrin, that causes stronger insecticidal effects, also induced a stronger activation of the GST-isoenzymes than cypermethrin.

It is necessary to investigate the ecotoxic effects of the formulated commercial products as well as the active compounds of pesticides because the former are the environmentally relevant mixtures. In comparison with effects of the commercial products TOLKAN FLO® and FASTAC SC® on GST-isoenzymes, pure active substances isoproturon and α -cypermethrin provoked a stronger enzymatic response in the tadpoles. In contrast, the phenyl urea herbicide FENIKAN® evoked stronger activation of the tadpoles' GST system than pure IPU. The effects of the active substances in the commercial products were obviously influenced by the addition of emulsifiers. Furthermore, the mechanisms of chemical and toxic interactions in mixtures are not fully understood. The effects of the mixtures on non-target organisms must be investigated in order to assess their ecotoxic effects.

The results of enzymatic and toxic studies connected with pesticide concentrations measured in the field show that environmentally relevant concentrations of pollutants pose a risk for amphibians. In order to support the successful reproduction of amphibians – especially of the endangered species – the management of agricultural areas in the ranges of distribution of these amphibian species must be made more environmentally compatible.

2 Publikationsreferenzen

2.1 Referenzen zu dieser Dissertationsschrift

Die hier aufgeführten Literaturreferenzen sind eigene Arbeiten, auf denen diese Dissertationsschrift basiert. Sie sind im Anhang angefügt. Dr. S. Pflugmacher fungierte als direkter Betreuer und Ansprechpartner im Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin.

- I S. 64-74
Greulich, K., Hoque, E. & Pflugmacher, S. (2002). Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 256-266.
- II S. 75-80
Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2002). Untersuchungen zur Wasserqualität eines Reproduktionsgewässers von Amphibien. *Herpetofauna* 24 (141), 5-10.
- III S. 81-95
Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2003). Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in spawn and tadpoles of amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Im Druck.
- IV S. 96-103
Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65, 329-336.

Diese Publikationen werden anhand der römischen Ziffern I - IV im Text der Arbeit zitiert.

2.2 Kongressbeiträge

- Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2001). Effects of pesticides on detoxication enzymes in tadpoles of sensitive species of amphibians. 11th Annual Meeting of SETAC Europe, Madrid, 11. - 16.05. 2001.
- Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2001). Wirkung von Isoproturon auf die frühen Larvalstadien sensibler Amphibienarten; 13. Jahrestagung des Arbeitskreises Wirbeltiere der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, TU Dresden Tharandt, 06. - 07.11. 2001. *Phytomedizin – Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* 32 (1): 16-17.
- Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2001). Wirkung von Isoproturon auf die frühen Larvalstadien sensibler Amphibienarten; 6. SETAC-Tagung (GLB) Ökotoxikologie und Ökologie in Ballungsräumen, Berlin, 10. - 11.09. 2001. *UWSF – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 14 (1), 24-29.
- Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2002). Wirkung ausgewählter Pestizide auf Laich und Larven einheimischer Amphibienarten. 32. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie, Cottbus, 16. – 20.09.2002. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 32: 161.
- Greulich, K. & Pflugmacher, S. (2003). Effects of pyrethroids on spawn and tadpoles of sensitive amphibian species; Proceedings Joint European-Southern African International Conference Pesticides in non-target agricultural environments, Cape Town, 21. - 24. 01. 2003.

Im vergangenen Jahrzehnt wurden in vielen Teilen der Welt drastische Bestandsrückgänge, Arealeinbußen und das Verschwinden ganzer Populationen von Amphibien verzeichnet und eine Vielzahl von Ursachen für diese Entwicklung untersucht. In Europa sind Amphibienpopulationen nachweisbar aufgrund anthropogener Einflüsse im Rückgang begriffen (HALLEY et al., 1996;

BAKER, 1997). So sind in Brandenburg z.B. die Bestände der Rotbauchunke – einer Amphibienart, die noch vor wenigen Jahrzehnten zu den charakteristischen und häufigen Arten im Nordostdeutschen Tiefland zählte – vom Aussterben bedroht (SCHNEEWEISS, 1996; Abb. 1).

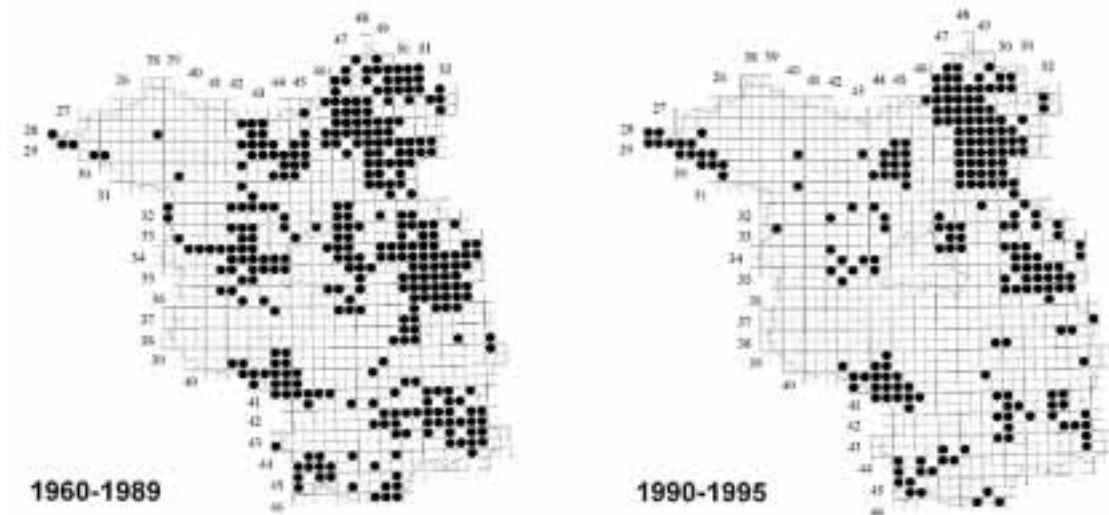


Abb. 1: Vorkommen der Rotbauchunke (*Bombina orientalis*) im Land Brandenburg. (Darstellung der Fundmeldungen im Zeitraum 1960–1989 und 1990–1995 im Messtischblattquadrantenraster) Quelle: Atlas Herpetofauna 2000 www.herpetopia.de

Dabei ist neben der Zerstörung und Fragmentierung der Habitate vor allem die Beeinträchtigung der Laichgewässer ein bedeutender Faktor. Die aquatischen Habitate der Amphibien sind durch die land- und forstwirtschaftliche Nutzung der Landschaft stark geprägt (SCHÄFER & KNEITZ, 1993). Amphibienpopulationen reagieren auf die Belastung ihrer Reproduktionsgewässer mit Pestiziden und Stickstoffdüngemitteln besonders empfindlich (HALL & HENRY, 1992; HECNAR, 1995). So ist aufgrund der räumlichen und zeitlichen Koinkidenz der Frühjahrsapplikationen der Pestizide mit der Laich- und Larvalentwicklung der Amphibien zu vermuten, dass die Reproduktion der Amphibien durch den Eintrag von Pestiziden in die Laichgewässer beeinträchtigt wird. In Abhängigkeit von den Chemikalieneigenschaften, den Witterungsbedingungen und Applikationstechniken geht ein mehr oder minder großer

Anteil während oder nach der Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln in die angrenzenden Ökosystemkomponenten verloren. Bedeutende Eintragswege sind dabei der Oberflächenabfluss sowie Sprühabtrift und Einträge über Drainagen (LIEß & SCHULZ, 1995). Etwa ein Promille der Aufwandmenge – das sind ca. 30 t Pflanzenschutzmittelwirkstoffe – gelangt jährlich in Deutschland in die Oberflächengewässer (UBA, 2000).

3.1 Untersuchte Pestizidwirkstoffe und deren Freilandkonzentrationen

Isoproturon – 3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff – (Abb. 2) gehört zu den Phenylharnstoffherbiziden, die im Vor- und Nachauflauf zur Kontrolle von Gräsern und Ackerkräutern in Weizen, Gerste, Roggen und Triticale eingesetzt werden. Isoproturon (IPU) ist ein selektiv wirkendes systemisches Herbizid, das von den

Wurzeln der Pflanzen absorbiert und dann schnell über das Xylem zu den Blättern transportiert wird. Dort inhibiert es den Elektronentransport der Photosynthese (BERGER & HEITEFUSS, 1991).

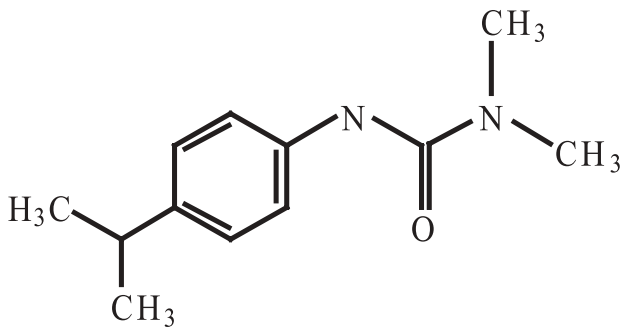


Abb. 2: Chemische Struktur von Isoproturon

Mit 165.000 kg/a ist IPU der im Land Brandenburg derzeit meistverwendete Herbizidwirkstoff (LUA BRANDENBURG, 2001). Aufgrund der weit verbreiteten Anwendung und spezifischer Stoffeigenschaften – wie moderate Persistenz und relativ geringes Adsorptionsvermögen (Tab.1) – wurde IPU zu einem bedeutenden Wasserschadstoff in vielen agrarisch genutzten Gebieten. In Deutschland gelangen jährlich ca. 2 t IPU in die Oberflächengewässer (UBA, 2000).

Tab. 1: Physiko-chemische Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe

	Isoproturon	Cypermethrin	α -Cypermethrin
Schmelzbereich	156 °C	20-40 °C	80,5 °C
Dampfdruck	$3,2 \times 10^{-8}$ hPa	$2,3 \times 10^{-9}$ hPa	$1,7 \times 10^{-9}$ hPa
Löslichkeit in Wasser	65 mg/l	0,009 mg/l	0,002 mg/l
log Po/w	2,48	6,6	5,16

In Abhängigkeit von den Niederschlägen, den Bodenbedingungen und dem Vorhandensein von Drainagen kann die IPU-Konzentration im Oberflächenabfluss (Runoff) bis zu 110 $\mu\text{g/l}$ (PATTY & GRIL, 1995) und im Drainagewasser bis zu 465 $\mu\text{g/l}$ (HARRIS, 1995) betragen. Auch wenn die Bewirtschafter den Regeln guter landwirtschaftlicher Praxis folgen, kann IPU nach der Applikation in Wintergetreide (auf drainierten lehmigen Böden) in beträchtlichen Konzentrationen in nahe gelegene Bäche und Gräben gelangen (JOHNSON et al., 1996).

Eine sowohl in der Landwirtschaft (Baumwolle, Mais, Getreide) als auch in der Forstwirtschaft (Waldbau) sehr häufig angewandte Gruppe von Insektiziden ist die der synthetischen Pyrethroide. Die insektizide Wirkung beruht auf den neurotoxischen Eigenschaften der Pyrethroide. Sie verzögern das Schließen der Natriumkanäle in der Plasmamembran von Nervenzellen, was zur Dauererregung der Nervenfasern und Reizüberempfindlichkeit führt (FENT, 1998).

Cypermethrin (RS-cyano-3-phenoxybenzyl(1RS)-cis, trans-3(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropan-carboxylat) gehört zu den cyano-substituierten Pyrethroiden vom Typ II und ist ein repräsentativer Vertreter der Pyrethroid-Klasse insgesamt (SOLOMON et al., 2001) (Tab.1). Die Toxizität des Cypermethrins resultiert hauptsächlich aus der Wirkung seiner cis-Isomere (WHO, 1992). α -Cypermethrin ist ein Razemat zweier cis-Isomere der 8 Stereoisomere des Cypermethrins (Abb. 3), woraus sich die Ähnlichkeit der physiko-chemischen Eigenschaften erklärt. Die biologisch aktivere Substanz scheint α -Cypermethrin zu sein. Deshalb ist die Applikationsrate von α -Cypermethrin mit 5–30 g Wirkstoff/ha geringer als bei Cypermethrin mit 10–200 g Wirkstoff/ha. Pyrethroide gelangen hauptsächlich über Runoff oder Sprühabdrift in die Gewässer (LIESS & SCHULZ, 1995). In den Oberflächenschichten kontaminierter Kleingewässer wiesen GARFORTH & WOODBRIDGE (1984) sowie PEARSON (1990) bis zu 30 % der applizierten Menge an α -Cypermethrin nach. Im Land Brandenburg ist α -Cypermethrin mit 792 kg/a der am häufigsten angewandte Pyrethroidwirkstoff (LUA BRANDENBURG, 2001).

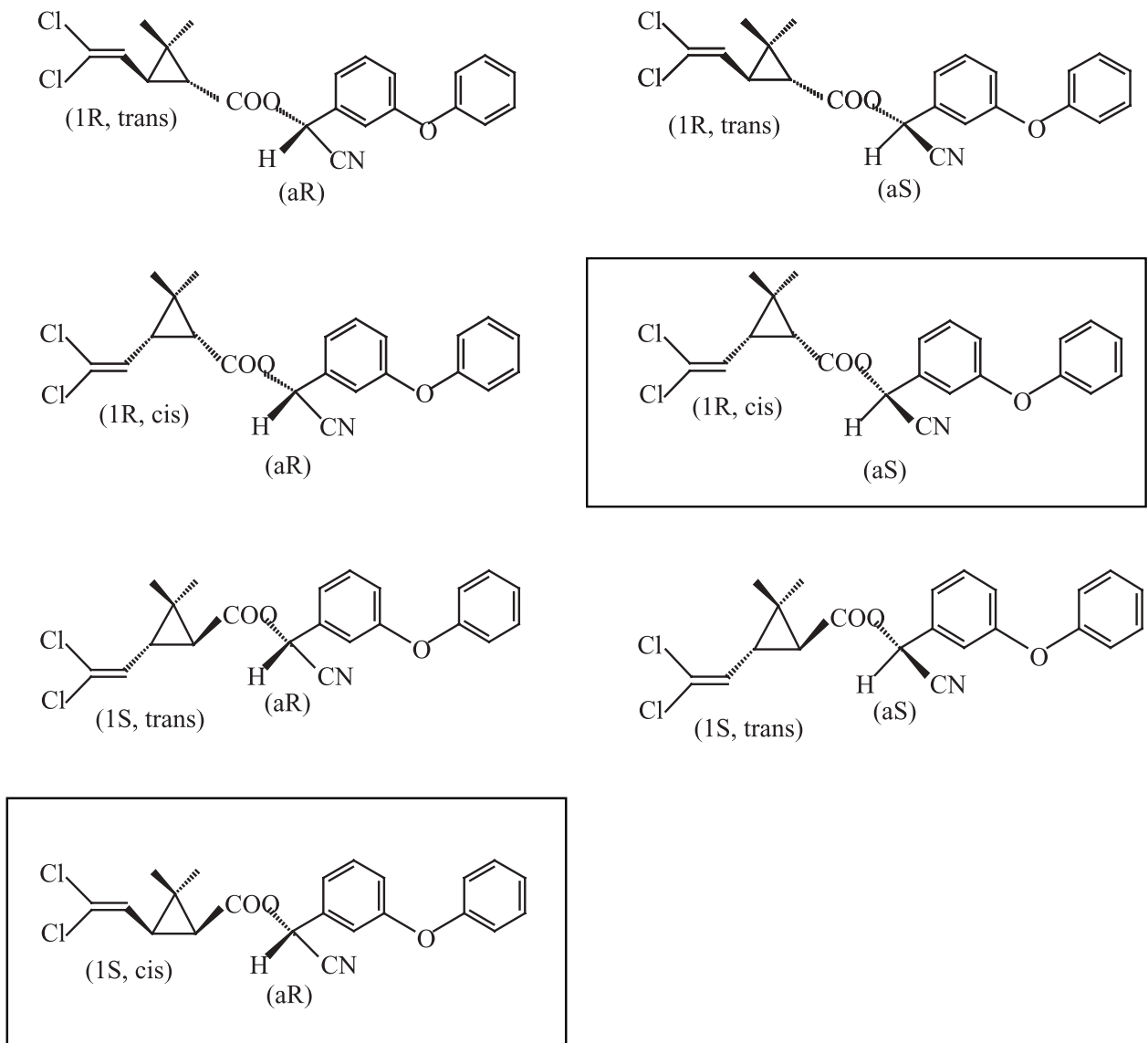


Abb. 3: Chemische Struktur der 8 Stereoisomere des Cypermethrins.
α-Cypermethrin ist ein Razemat der beiden eingerahmten cis-Isomere.

Die höheren Applikationsraten von Cypermethrin (100 g/ha) bewirkten beispielsweise, dass 4 h nach dem Übersprühen von Kleingewässern in 2,5–10,0 cm Wassertiefe eine Wirkstoffkonzentration von 100 µg/l gemessen wurde (CROSSLAND, 1982). Im extrem dünnen Oberflächenfilm (0,05 mm) wurden unmittelbar nach der Applikation 24 mg/l Cypermethrin detektiert, binnen einer Woche sanken die Werte auf 50 µg/l. Innerhalb der ersten Stunde nach der terrestrischen Applikation von Cypermethrin in einem Weinberg wurden in einem angrenzenden Graben unmittelbar unter der Wasser-

oberfläche 0,2 bis 1,7 µg/l Cypermethrin gefunden (BENNETT et al., 1980). Dabei wurden keine Verhaltensabnormitäten und lethalen Effekte an Freilandpopulationen von Fischen und Amphibien beobachtet.

3.2 Toxizität

Im Gegensatz zu den Freilanduntersuchungen von BENNETT et al. (1980) haben Laborstudien gezeigt, dass synthetische Pyrethroide auf Fische, Amphibien und viele aquatische Invertebraten toxisch wirkten (MAYER & ELLERSIECK, 1986, BRADBURY & COATS, 1989). BERRILL & BERTRAM (1997) schlussfolgerten aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen zur Wirkung verschiedener synthetischer Pyrethroide auf Embryonen und Larven von fünf in Nordamerika beheimateten Amphibienarten, dass auch geringe Belastungslevel ein Risiko für die Amphibienlarven darstellten. Bei geringen Pyrethroidkonzentrationen wiesen die frisch geschlüpften Larven Lähmungserscheinungen auf, von denen sie sich im Laufe ihrer weiteren Entwicklung nur allmählich erholten. Bei höheren Dosen wurden auch tote Individuen beobachtet.

Cypermethrin ist als hoch toxisch in Bezug auf aquatische Arthropoden, Fische und Bienen einzustufen, Vögel und Säuger können dieses Pyrethroid vergleichsweise besser metabolisieren (WHO, 1989). Aufgrund der LD₅₀-Werte nach subkutaner Applikation von Cypermethrin bei zwei nordamerikanischen Amphibienarten (*Rana pipiens* und *Rana catesbeiana*) postulierten COLE & CASIDA (1983), dass die Sensitivität von Fröschen eher denen von Insekten als denen von Mäusen und Ratten ähnelt. Die einzig verfügbaren Toxizitätsdaten der Effekte von Cypermethrin auf in Europa beheimatete Amphibienarten erstellte PAULOV (1990). Er beschrieb beeinträchtigende Wirkungen von Cypermethrin (z.B. Verhaltensabnormitäten und Wachstumsverzögerungen) für Larven des Grasfrosches (*Rana temporaria*), wobei signifikante Effekte meist erst bei Konzentrationen auftraten, die oberhalb der umweltrelevanten Bereiche lagen. Eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen existiert zur Sensitivität aquatischer Invertebraten (Crustaceen, Insekten, Arachniden, Mollusken) gegenüber Cypermethrinbelastungen (WHO, 1989). Dabei erwiesen sich marine Crustaceen mit 96-h LC₅₀-Werten um 0,01 µg/l Cypermethrin besonders sensitiv. Für verschiedene Fischarten (Forellen, Karpfen, Plötzen) wurden in Abhängigkeit vom Körpergewicht 96-h LC₅₀-Werte im Bereich zwischen 0,4 und 2,8 µg/l Cypermethrin ermittelt (WHO, 1989).

Die Toxizität von α-Cypermethrin unterschied sich bei den meisten untersuchten Organismen kaum von der des Cypermethrins (WHO, 1992). Höhere akute α-Cypermethrin-Toxizitätswerte ergaben sich nur für Kompostwürmer (*Eisenia foetida*) (INGLESFIELD & SHERWOOD, 1983) und Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) (STEPHENSON, 1983). Für zwei Amphibienarten (*Rana pipiens* und *Rana catesbeiana*) beschrieben COLE & CASIDA (1983) eine stärkere toxische Wirkung der cis-Isomere im Vergleich zu den trans-Isomeren des Cypermethrins. Weiterhin belegten die Autoren für Cyano-Pyrethroide wie Cypermethrin und Deltamethrin eine verstärkte Sensitivität von Amphibienlarven im Vergleich zu adulten Tieren. Die Sensitivität einzelner Entwicklungsstadien der Amphibien gegenüber Pestiziden differierte sehr stark in Abhängigkeit von den geprüften chemischen Substanzen und den getesteten Arten.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Wirkung anderer Pyrethroide vom Typ II (Deltamethrin, Esfenvalerat) auf Amphibienlarven wurde in der Literatur auf das Gefahrenpotential dieser Stoffe in natürlichen Fließ- und Standgewässern hingewiesen (SALIBAN, 1992; MATERNA et al., 1995). Besonders Esfenvalerat konnte in aquatischen Habitaten Konzentrationen erreichen, die Verhaltensabnormitäten, Gewichtsverlust und Entwicklungsverzögerungen bei Amphibienlarven verursachten (MATERNA et al., 1995). Auf indirekte Effekte für adulte Amphibien (z.B. *Bufo fowleri*) durch Aufnahme von Fenvalerat-kontaminierter Nahrung (Grashüpfer, Käfer) wiesen BENNETT et al. (1983) hin. Infolge einer Fenvaleratkontamination (bis zu 6,2 µg/l Fenvalerat im Freiwasser) eines Baches nach Runoff-Eintrag von einer anliegender Agrarfläche beschrieb LIEß (1993) beeinträchtigende Effekte auf die Makroinvertebratengemeinschaft des Fließgewässers wie Veränderung der Dominanzstrukturen in bestimmten Gewässerabschnitten durch erhöhte Mortalität und verminderte Schlupfraten z.B. bei *Limnephilus lunatus* bzw. Drift bei *Gammarus pulex*.

Da in der Agrarlandschaft eine Vielzahl von Stressfaktoren Entwicklung und Wachstum der Anurenlarven beeinflussen können (BISHOP et al., 1999), ist es notwendig, die Wirkung der einzelnen Faktoren mit Hilfe von Freiland- und Laborexperimenten zu trennen. Um die umweltrelevanten Effekte der Pestizide auf die

aquatischen Lebensstadien von Amphibien abzuschätzen, müssen neben den Wirkstoffen auch die Handelsprodukte getestet werden (MANN & BIDWELL, 1999).

3.3 Biotransformation

Der Anteil der Pestizide an der Gesamtheit der in die Umwelt eingetragenen anthropogenen Stoffe ist aufgrund der Vielzahl von Substanzen und ihrer weit verbreiteten Anwendung beträchtlich. Pro Jahr werden allein in Deutschland ca. 30 000 t Pestizidwirkstoffe appliziert (UBA, 2000). Da die Akkumulation dieser Xenobiotika (griech: *xenos bios* = der Natur fremd) im Organismus sowohl auf DNA-Ebene als auch im Stoffwechsel der Zellen zu Schädigungen führen kann (KAUFMAN et al., 1976; KEITH & DIRHEIMER, 1995), mussten die Organismen im Laufe der Evolution geeignete Schutzmechanismen gegenüber schädlichen Fremdstoffen entwickeln. Mit Hilfe der phylogenetisch sehr alten Biotransformationsenzyme sind die Organismen in der Lage, die meist lipophilen Xenobiotika in polare, gut wasserlösliche Verbindungen umzuwandeln. Biotransformationsenzyme sind in allen Zellen der Organismen anzutreffen, bei Tieren ist die katalytische Aktivität in den Leberzellen besonders hoch. Viele Biotransformationsenzyme weisen eine breite Substratazeptanz auf. So können Enzymsysteme, die im endogenen Stoffwechsel der Zellen eine Rolle spielen, neben Naturstoffen auch Xenobiotika umsetzen.

Zur Beschreibung der Biotransformationsprozesse dient ein 3-Phasen Modell:

Phase I

umfasst die Aktivierung der Xenobiotika durch Reduktionen, Hydrolysen und vor allem Oxidationen. Letztere werden insbesondere durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen katalysiert, die speziell in der Leber von Vertebraten, aber auch in Invertebraten, Pflanzenzellen, Hefepilzen und Bakterien vorkommen.

Phase II

beschreibt Konjugationsreaktionen der aktivierten Xenobiotika mit unterschiedlichen endogenen Substraten (z. B. Glutathion, Glucuronsäure), die durch spezifische Transferasen katalysiert werden.

Phase III

schließt Exkretions- und Depositionsvorgänge der in den Phasen I und II transformierten Xenobiotika ein, die nun meist wasserlöslicher sind.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten neben der Dokumentation der toxischen Wirkungen der Pestizide auch deren Effekte auf die Biotransformationsenzyme der Amphibienlarven untersucht werden, um abzuschätzen, inwieweit die Organismen in der Lage sind, die Pestizide zu metabolisieren. Eine Möglichkeit der Biotransformation der untersuchten Pestizide ist die Konjugation an das Tripeptid Glutathion (GSH – bestehend aus γ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin), die von der Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert wird. Die Aktivität der GST ist also ein Maß dafür, inwieweit die Organismen in der Lage sind, die Xenobiotika auf diesem Wege zu metabolisieren. Dabei ermöglicht die höhere Hydrophilie des Konjugates dessen Exkretion aus dem Organismus und somit eine Entgiftung.

Nachweise der Metabolisierung und Biotransformation von IPU mittels des GSH/GST-Systems wurden in Pflanzen (*Alopecurus myosuroides*) (READE & COBB, 2002) und in Lebergewebe von Ratten (HAZARIKA & SARKAR, 2001) erbracht. Auch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen (Phase I-Enzyme) sind in den IPU-Metabolismus involviert (HAAS, 1997), indem sie die elektrophilen Bindungsstellen im Molekül als Voraussetzung für die GSH-Konjugation schaffen.

Die Konjugation von Glutathion an Cypermethrin direkt oder an die nach Spaltung der Esterbindung vorhandenen Metaboliten Phenoxybenzoesäure (PBA) und Cyclopropancarboxylsäure (CPA) (Abb. 4) über Additions- und Substitutionsreaktionen beschrieben GOWLAND et al. (2002) für die Strandkrabbe *Carcinus maenas*. Sie bestätigten die verbesserte Wasserlöslichkeit des Cypermethrins bzw. seiner Metaboliten, was deren Exkretion förderte.

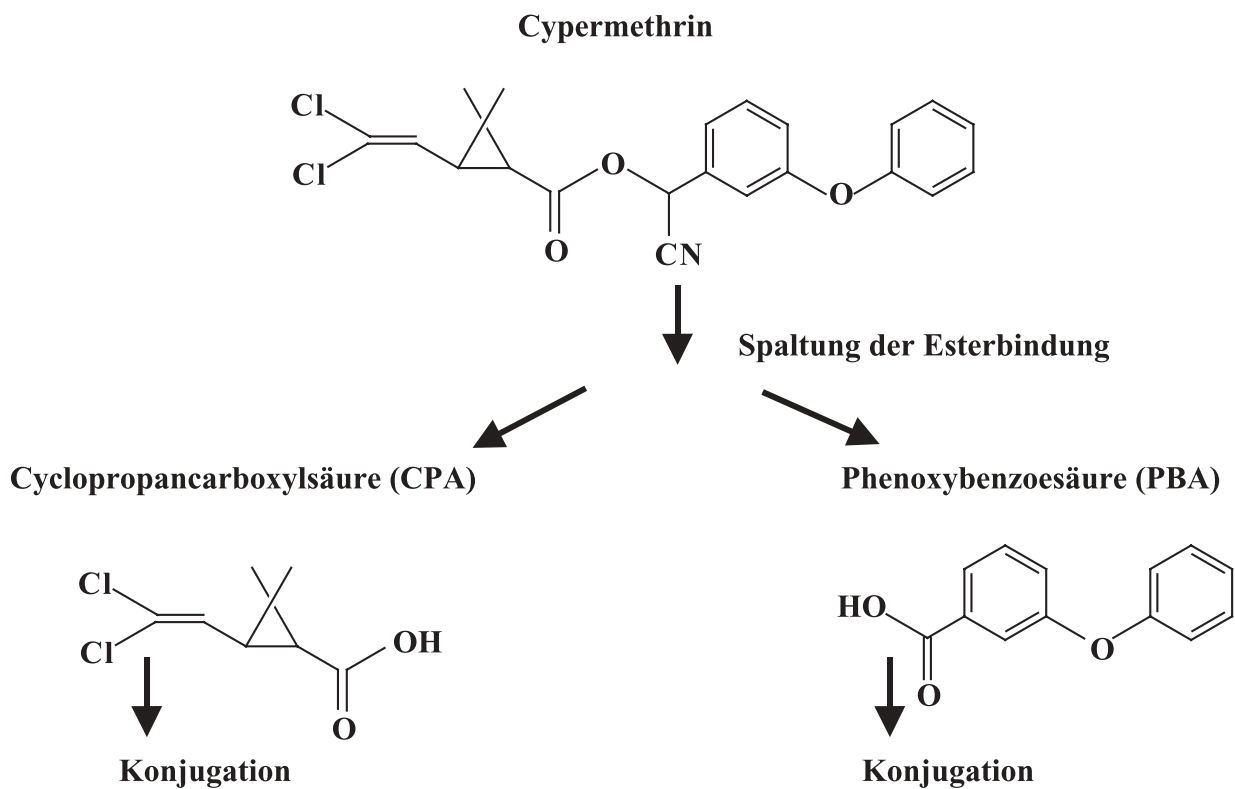


Abb. 4: Möglicher erster Schritt des Metabolismus' von Cypermethrin durch Spaltung der Esterbindung

Auch für die Regenbogenforelle existieren Hinweise der Biotransformation des Cypermethrins über die Konjugation an Glutathion (Phase II) nach vorheriger Oxidation durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen – Enzymgruppen der Phase I (DAVIES et al., 1994).

Die ubiquitäre GST ist in der Lage für eine Vielzahl elektrophiler Komponenten, einschließlich Herbiziden und Insektiziden, die Konjugation an Glutathion zu katalysieren (HAYES & WOLF, 1988; BUCCIARELLI et al., 1999; GLÄßGEN et al., 1999), was die Vielfalt der Isoenzyme verdeutlicht. Die meisten GST-Isoenzyme liegen im Cytosol gelöst vor (sGST). Eine membran gebundene GST (mGST) konnte aus dem Lebergewebe verschiedener Säugetiere (z.B. Ratten; DEJONG et al., 1988) und auch aus der Leber des Krallenfrosches (SUN et al., 1998) isoliert werden. Die cytosolischen Isoenzyme werden aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen und Substratspezifitäten in mindestens sechs unterschiedliche Klassen eingeteilt: α , μ , π , θ , ζ und σ (EATON & BAMMLER, 1999).

Verglichen mit der GST von Säugern ist über die der Amphibien relativ wenig bekannt (BUCCIARELLI et al., 1999). Bisherige Untersuchungen zielten auf die Isolierung und Identifikation verschiedener GST-Isoenzyme in Amphibien (DI ILIO et al., 1992; GRUNDY & STOREY, 1998). Eine Veränderung des GST-Musters bei Amphibien zwischen dem Embryonalstadium und den Adulti wurde für *Bufo bufo* beschrieben, bestimmte – der π -Klasse zugehörige – Isoenzyme der späteren Entwicklungsstadien (bbGST P2-2) schienen mit höherer Effizienz gegen toxische Effekte der reaktiven Metaboliten der Xenobiotika zu wirken (BUCCIARELLI et al., 1999). Deshalb sollten im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit die Effekte der Pestizidbelastung auf die GST-Aktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien der Amphibien untersucht werden.

3.4 Testorganismen

Gegenwärtig wird der FETAX-Tests (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* Test; DAWSON & BANTLE, 1987) als standardisiertes Hilfsmittel zur Untersuchung einer Vielzahl biologischer Prozesse an

Amphibien genutzt. Der als Testspezies verwendete Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) bietet aufgrund artspezifischer Eigenschaften wie aquatiler Lebensweise, ganzjähriger Stimulierbarkeit der Reproduktion oder rascher Embryonalentwicklung gute Voraussetzungen sowohl teratogene Wirkungen als auch akute und chronische Xenobiotikabelastungen zu untersuchen. Jedoch scheint er gegenüber verschiedenen Umweltkontaminanten toleranter zu reagieren als viele einheimische Amphibienarten (BIRGE et al., 2000).



Insbesondere in Hinsicht auf die im Rahmen dieser Studie untersuchten Pestizidwirkstoffe bestand der Verdacht, dass die einheimischen europäischen Arten (Abb. 5) empfindlicher auf die Xenobiotikabelastung reagieren als der südafrikanische Krallenfrosch. So belegten RUDEK & ROZEK (1992), dass das α -Cypermethrin-Präparat FASTAC 10 EC® im Vergleich zu *Xenopus laevis* bei Larven des Grasfrosches (*Rana temporaria*) weitaus stärkere mutagene Effekte verursachte.



Eine besonders sensitive einheimische Art scheint die Rotbauchunke (*Bombina bombina*) zu sein (SCHIEMENZ, 1979; HERRMANN, 1988; SCHNEEWEISS, 1993). Nach dem Verlust ihrer ursprünglichen Habitate in den Flussauen nutzt sie die Kleingewässer der Agrarlandschaft als Reproduktions- und Lebensraum und ist dort den genannten Gefährdungen ausgesetzt. Die nordwestliche Arealgrenze des Verbreitungsgebietes der Rotbauchunke hat sich schon bis zur niedersächsischen Elbtalaue verschoben, die Bestände in Südschweden sind bereits erloschen, die Vorkommen im südlichen Dänemark sind erheblich reduziert, sodass ohne Maßnahmen zum Bestandsschutz ein Überleben der Populationen nicht möglich ist. Im Land Brandenburg erloschen seit Anfang der 1960er Jahre etwa 30 % der Rotbauchunkenpopulationen (SCHNEEWEISS, 1996; Abb. 1). So wird *Bombina bombina* sowohl in der Roten Liste des Landes Brandenburg als auch für das gesamte Bundesgebiet als „vom Aussterben bedrohte Art“ geführt. Mit der Verabschiedung der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie (FFH) der Europäischen Union (Richtlinie 92/43/EWG des Rates vom 21.05.1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen) wurden die Voraussetzungen geschaffen, die überregional gefährdete Rotbauchunke und deren Lebensraum adäquat zu schützen.



Abb. 5: Untersuchte Amphibienarten: Rotbauchunke (*Bombina bombina*), Moorfrosch (*Rana arvalis*), Gelbbauchunke (*Bombina variegata*)

(Fotos: M. Bieszchadsky, K. Greulich, S. Timofejew)

Eine der Rotbauchunke sehr nah verwandte Art ist die Gelbbauchunke (*Bombina variegata*). In der langen Kontaktzone ihrer Verbreitungsgebiete, die beidseitig des Karpatenbogens und am Südrand des Donaubeckens verläuft, kommt es zur Hybridisierung beider Unkenarten (GOLLMANN, 1987; SZYMURA, 1993). Da auch die Gelbbauchunke ursprünglich die im Zuge der Auendynamik der Flüsse und Bäche entstandenen temporären Kleingewässer als Reproduktions- und Lebensraum nutzte, sind mit deren Verschwinden seit Anfang des 20. Jahrhunderts auch die Bestände von *B. variegata* rapide zurückgegangen. Ehemals geschlossene Verbreitungsgebiete entwickelten sich zu kleinen Enklaven, sodass die Einzelpopulationen oftmals stark isoliert sind. Deshalb wird die Gelbbauchunke in der Roten Liste der Bundesrepublik Deutschland als stark gefährdete Art eingeordnet. Bereits FELDMANN (1979) wies auf die mögliche Gefährdung von *B. variegata* durch Pestizidbelastung der Laich- und Aufenthaltsgewässer hin.

Die Hauptverbreitungsgebiete des Moorfrosches (*Rana arvalis*) liegen in Nord- und Ostdeutschland. Im restlichen Bundesgebiet ist er eher lückenhaft vertreten und darum in der Roten Liste Deutschlands in die Kategorie „stark gefährdet“ einzuordnen. Bevorzugt besiedelt der Moorfrosch Habitate mit hohem Grundwasserstand (Niedermoore, Bruchwälder, Nasswiesen). Wie die Rotbauchunke ist auch er in den intensiv ackerbaulich genutzten, kleingewässerreichen Grundmoränen des Nordostdeutschen Tieflandes anzutreffen und dort den beschriebenen Gefährdungen ausgesetzt (BERGER et al., 1999).

3.5 Ziele der Arbeit

Aufgrund der räumlichen und zeitlichen Koinzidenz der Applikation von Pestiziden im Nachauflauf im Frühjahr mit der Laich- und Larvalentwicklung der Amphibien wurde die Hypothese formuliert, dass der Reproduktionserfolg durch den Eintrag von Pestiziden in die Gewässer beeinträchtigt wird.

In Abhängigkeit vom Ertragspotential der Böden unterliegen die kleingewässerreichen Grundmoränenplatten Nordostdeutschlands größtenteils intensiver landwirtschaftlicher Nutzung. Gleichzeitig sind diese Ackerbaustandorte wesentliche Verbreitungszentren einhei-

mischer Amphibienarten (SCHNEEWEIß, 1996). An einem solchen, von intensiver agrarischer Nutzung umgebenen Gewässer soll das Arteninventar an Amphibien aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Studie werden alle Untersuchungen mit drei einheimischen europäischen Arten (*Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Rana arvalis*) durchgeführt. In der Literatur liegen bisher meist nur Informationen zur Pestizidwirkung auf in Nordamerika beheimatete Amphibienarten vor.

Da Angaben zu Freilandkonzentrationen der ausgewählten Pestizidwirkstoffe (Isoproturon und Cypermethrin) bisher meist nur für spezielle Einzelfälle – z.B. worst-case Situationen nach bewusstem Übersprühen von Kleingewässern oder Konzentrationsangaben aus Weinbaugebieten mit den entsprechenden Hanglagen – vorliegen, sollen in enger Zusammenarbeit mit einem landwirtschaftlichen Betrieb die realen Freilandkonzentrationen in einem Kleingewässer inmitten intensiver agrarischer Nutzung analysiert werden. Nach den unter Einhaltung der Regeln guter landwirtschaftlicher Praxis vorgenommenen Pestizidapplikationen werden die umweltrelevanten Freilandkonzentrationen der Wirkstoffe ermittelt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wird mit Hilfe von ¹⁴C-markierten Substanzen untersucht, ob Laich und Larven der Amphibien die Pestizidwirkstoffe absorbieren und wie die Kinetik der Aufnahme verläuft.

Da in der Literatur bisher keine Informationen zu Effekten von IPU auf Amphibien vorliegen und Untersuchungen zu toxischen Wirkungen von Pyrethroiden (u.a. auch Cypermethrin) auf nordamerikanische Amphibienarten Effekte erst bei Überschreitung umweltrelevanter Konzentrationsbereiche zeigten, soll im Rahmen dieser Studie untersucht werden, ob IPU und Cypermethrin die Larvalentwicklung einheimischer europäischer Amphibienspezies beeinträchtigen. In Abhängigkeit von Wirkstoffkonzentration und Expositionszeit werden die Schlupfraten des Laichs, morphologische Veränderungen und Verhaltensabnormitäten der Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien bis zur Metamorphose protokolliert und bewertet.

Da Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen (Phase I-Enzyme) in den IPU-Metabolismus involviert sind, sollen (in begrenztem Umfang) die IPU-Metaboliten analysiert werden.

Aufgrund von Hinweisen in der Literatur, dass die untersuchten Wirkstoffe mittels Glutathion-Konjugation metabolisiert werden können (IPU z. B. in Lebergewebe von Ratten, Cypermethrin in der Regenbogenforelle), wird geprüft, ob die GST-Aktivität der Amphibien in Abhängigkeit von Dosis und Dauer der Pestizidbelastung Veränderungen aufweist. Dabei soll herausgearbeitet werden, ob die GST die Funktion eines Biomarkers für Belastungen übernimmt, bei denen noch keine toxischen Wirkungen auf Amphibien zu verzeichnen sind. Die bisher vorliegende Datenbasis zur Nutzung von Biotransformationsenzymen als Biomarker für die Belastung von Amphibien ist als sehr lückenhaft zu beurteilen (HENRY, 2000).

Neben der Untersuchung der Effekte der Wirkstoffe auf Amphibien ist es notwendig auch die handelsüblichen Pflanzenschutzmittel zu testen, da diese Mixturen aus Wirkstoffen und Formulierungssubstanzen die eigentlich umweltrelevanten Stoffgemische sind.

Im Zusammenspiel der toxischen Effekte und der Wirkungen auf das Phase II-Enzymsystem soll abgeschätzt werden, ob umweltrelevante Konzentrationen von IPU oder Cypermethrin ein Gefährdungspotential für die erfolgreiche Entwicklung der Amphibienlarven darstellen. Damit soll einer der möglichen Gründe für den Rückgang der Amphibienpopulationen – die Sensitivität der Larvalstadien einheimischer Amphibienarten gegenüber häufig angewandten Pestiziden – gezielt durch Experimente in umweltrelevanten Schadstoffkonzentrationen eingegrenzt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen gilt es, Möglichkeiten einer nachhaltigen Bewirtschaftung der Flächen in Verbreitungszentren sensibler Amphibienarten vorzuschlagen und Finanzierungsmöglichkeiten aufzuzeigen, um ökologische und ökonomische Belange miteinander zu verknüpfen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
HPLC mit 996 Dioden Array Detektor LiChrospher 100 RP-18 Säule (250 x 4 mm; 5 µm) Vorsäule (4 x 4mm) Spherisorb ODS Säule (250 x 4,6 mm; 2,5 µm)	Waters Merck Merck Sykam
HPLC mit [¹⁴ C] Yttrium-Glas Scintillationszähler Spherisorb ODSII Säule (250 x 4,6 mm; 3 µm)	Shimadzu Berthold Merck
Leitfähigkeitsmessgerät pH-Meter Rotor 70.1 Sauerstoffmessgerät Scintillationszähler LSC 1900 TR Scintillationszähler 1409 Sep-Pak Extraktionssäulen Spektrophotometer Uvikon 922 Ultrazentrifuge Optima L-60 Photometer PT-3 Photometer	WTW WTW Beckman WTW Packard Wallac Waters Kontron Beckman Macherey & Nagel Uvicon

4.1.2 Radiochemikalien

Chemikalie	Name	spezifische Aktivität	Vertrieb
¹⁴ C- IPU	3-(4-Isopropyl-[¹⁴ C]-phenyl)- 1,1-dimethylharnstoff	3,965 MBq/mg Reinheit > 97%	International Isotope Germany
¹⁴ C- Cypermethrin	R-cyano-3-phenoxybenzyl(1R)- cis-3(2,2-dichlorvinyl)-2,2- dimethyl-[¹⁴ C]-cyclopropan-carboxylat	4,625 MBq/mg Reinheit > 95%	International Isotope Germany

4.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Name	Vertrieb
α -Cypermethrin	R-cyano-3-phenoxybenzyl(1R)-cis-3(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropanocarboxylat	Fluka
Bradford Reagenz Brij-35	Polyoxyethylenlaurylether	Sigma Fluka
CaCl ₂ CDNB CH ₃ CN CH ₃ OH Cypermethrin	Kalziumchlorid 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol Acetonitril Methanol R-cyano-3-phenoxybenzyl(1R)-cis-3(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropanocarboxylat	Merck Fluka Roth Roth Fluka
DCNB Diflufenikan DTE	2,4-Dichlor-1-nitrobenzol Dithioerythritol	Fluka Fluka Sigma
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma
FASTAC SC® FENIKAN® Fluorodifen	4-Nitrophenyl-2,2-nitrofluor-methylphenylether	BASF Bayer Fluka
Glycerol GSH	Glutathion	Sigma Sigma
IPU Meersalz	3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	Fluka Aquarienhandel
Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ NAP-10	Dinatriumhydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat Natriumhydrogencarbonat Sephadex G-25 Säulen	Sigma Sigma Merck Amersham-Pharmacia
TOLKAN FLO®		Bayer

4.1.4 Puffer

Aufbruchpuffer: Natriumphosphatpuffer, 0,1 M, pH 6,5	20 % Glycerol 1,4 mM DTE 1 mM EDTA
Mikrosomenpuffer: Natriumphosphatpuffer, 20 mM, pH 7,0	20 % Glycerol 1,4 mM DTE
Cytosolpuffer: Natriumphosphatpuffer, 20 mM, pH 7,0	

4.1.5 Testorganismen

Im Rahmen dieser Studie wurden Laich und Larven der Rotbauchunke (*Bombina bombina*), der ihr eng verwandten, in Gefangenschaft aber leichter nachzuzüchtenden Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) sowie des Moorfrosches (*Rana arvalis*) untersucht (Tab.2).

Tab. 2: Expositionssubstanzen für die verschiedenen Amphibienspezies

Exposition	Rotbauchunke	Gelbbauchunke	Moorfrosch
¹⁴ C-IPU	X	X	
¹⁴ C-Cypermethrin		X	X
sensitive Stadien		X	X
IPU	X	X	X
TOLKAN FLO®		X	X
FENIKAN®			X
Diflufenikan			X
Cypermethrin		X	X
FASTAC SC®		X	X
α-Cypermethrin			X

Den gesetzlichen Vorschriften entsprechend wurden vor Beginn der Experimente Hälterungs- und Versuchsgenehmigungen (5.2/315 G 0090/00) sowie eine Erlaubnis zur limitierten Entnahme von Laich aus dem Freiland (4440-236-NF/030-2000) eingeholt.

4.1.5.1 Hälterung von Laich und Larven

Zur Hälterung von Laich und Larven der Amphibien wurden entionisiertem Wasser

100 mg/l Meersalz

200 mg/l CaCl₂ · 2 H₂O

103 mg/l NaHCO₃

zugemischt. In jedem 10 l-Aquarium befanden sich 20 Larven oder ein Laichklümpchen, die bei einer Wassertemperatur von 20 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 14/10 h gehältert wurden.

Vor den Expositionen konnten sich die Larven 24 h an diese Bedingungen akklimatisieren und wurden mit fein gemahlenem Trockenfutter (Tetramin AZ 40) gefüttert.

4.1.5.2 Beschreibung der untersuchten Larvalstadien

Die Determinierung der Larvalstadien der Amphibien erfolgte nach GOSNER (1960).

Um die – hinsichtlich der enzymatischen Reaktion auf die Belastung mit Xenobiotika – empfindlichsten Phasen der Larvalentwicklung zu ermitteln, wurden acht Stadien mit folgenden Merkmalen ausgewählt (Gosner Stadien 20-27; Abb. 6): frisch geschlüpfte Larven mit beginnender Herzfähigkeit (Stadium 20), die Entwicklung der äußeren Kiemen (Stadien 21-23), das Erscheinen der Opercularfalte verbunden mit dem Überwachen der äußeren Kiemen (Stadien 23-25) und schließlich die Entwicklung der Hinterbeinknospen (Stadien 26-27).

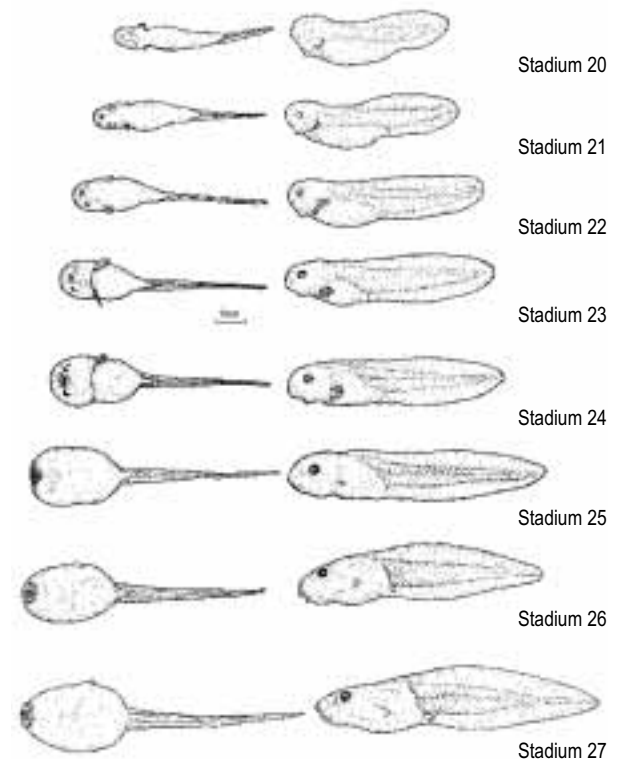


Abb. 6: Untersuchte Entwicklungsstadien der Amphibien (GOSNER, 1960)

Die infolge der Pestizidwirkung verzeichneten adversen morphologischen Effekte bei den Amphibien erforderten genauere Untersuchungen der kritischen Phasen der Embryonal- und Larvalentwicklung. Fünf Entwicklungsstadien wurden nach BRIDGES (2000) geprüft:

- das Ei-Stadium (EGG; definiert als komplett von der Eihaut umgebener Embryo),
- das Embryo-Stadium (EM; definiert als frisch geschlüpfter Embryo mit Dottervorrat),
- die Kombination dieser beiden Stadien (EGG/EM),
- das Kaulquappen-Stadium (TAD; definiert als freischwimmende Kaulquappe) und
- die Gesamtheit der Entwicklungsstadien bis zur Metamorphose (EGG/EM/TAD).

4.1.6 Untersuchungsgewässer

Die Freilanduntersuchungen erfolgten in einem landwirtschaftlich intensiv genutzten Jungmoränengebiet nordöstlich von Berlin, das sich durch eine Vielzahl z. T. eiszeitlich geprägter Sölle und Kleingewässer auszeichnet und elf Amphibienarten – u. a. auch der

Rotbauchunke – Lebensraum bietet. Eines dieser temporären Kleingewässer – der Thierpfuhl – mit einer Wasseroberfläche von 0,7 ha und einer maximalen Wassertiefe von 1,8 m im Frühjahr 2000 wurde für die Untersuchungen ausgewählt (Abb. 7).

In der Nähe des Gewässers (ca. 100 m) befindet sich in einer ehemaligen Parkanlage eines der bevorzugten Winterquartiere der Amphibien.

Das Untersuchungsgewässer verfügt über keinen Pufferstreifen sondern ist unmittelbar von einem ca. 3 ha großen Versuchsfeld umgeben, auf dem im Nachauflauf im Frühjahr folgende Pestizide appliziert wurden (Tab. 3).

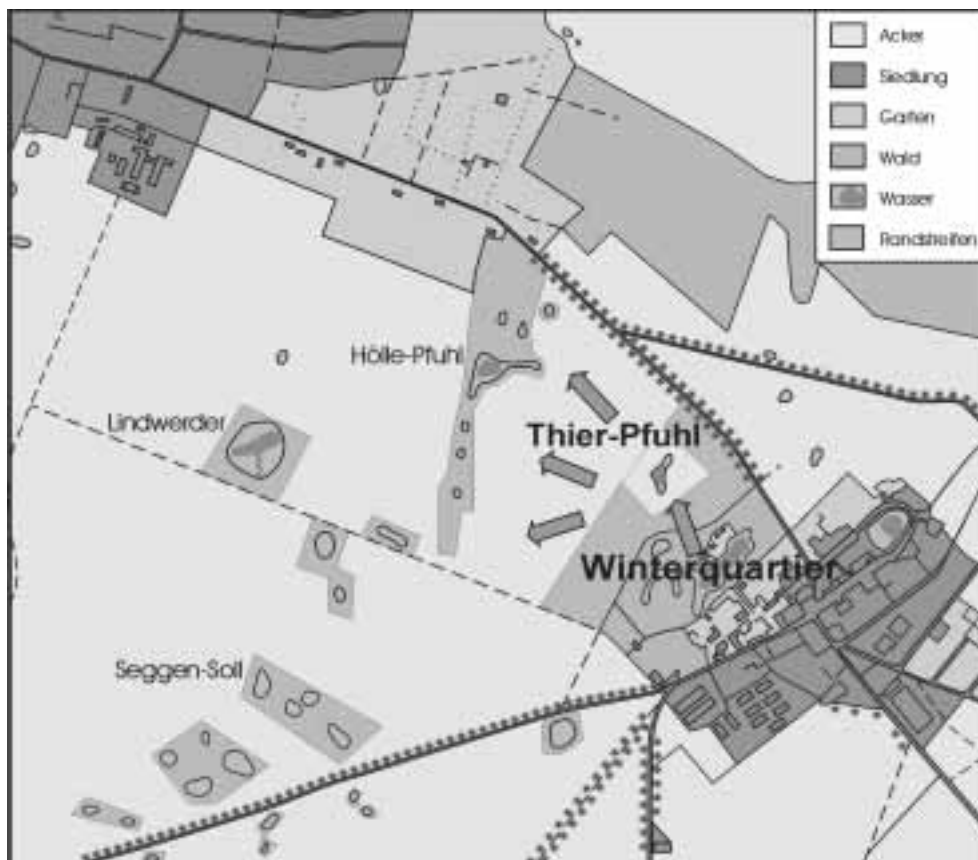


Abb. 7: Untersuchungsgewässer (Thierpfuhl), Winterquartier der Amphibien und Migrationswege im Frühjahr

Tab. 3: Fruchtfolge und Pestizidapplikation auf dem Versuchsfeld während des Untersuchungszeitraumes

Frucht	Pestizid	Wirkstoffgehalt	applizierte Menge	Termin
Sommergerste	TOLKAN FLO®	500 g/l Isoproturon	2,5 l/ha	04.05.2000
Winterraps	FASTAC SC®	100 g/l α -Cypermethrin	0,1 l/ha	01.05.2001

Die Auflagen zum Gewässerschutz, die bei der Ausbringung dieser Pestizide nach den Regeln guter landwirtschaftlicher Praxis zu beachten sind, wurden strikt eingehalten. Die Entfernung des Sprühfahrzeugs vom Uferbereich unterschritt zu keinem Zeitpunkt die Distanz von 15 m bei der IPU-Anwendung bzw. 20 m bei der Applikation von α -Cypermethrin.

4.2 Methoden

4.2.1 Untersuchungen im Freiland

4.2.1.1 Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen

Zur Dokumentation der Ausgangssituation erfolgte bereits zwei Wochen vor dem Sprühtermin eine Entnahme von Wasserproben an fünf verschiedenen Stellen im Gewässer (Publ. I). Weiterhin wurden 0,5; 1; 3; 6; 12; 24; 48 und 72 h nach der Pestizidapplikation, nach dem ersten Starkregen, der sich 16 d nach der IPU-Applikation ereignete, und zehn Wochen nach dem Sprühtermin Wasserproben aus einer Tiefe von ca. 30 cm entnommen.

Zur Verbesserung der Löslichkeit des α -Cypermethrins im Wasser und zur Vermeidung der Sorption während der Lagerung und Analyse der Proben wurde unmittelbar nach der Entnahme den Wasserproben 1×10^{-4} mol/l des Lösungsvermittlers Brij-35 (Polyoxyethylenlauryl-ether) zugesetzt (BROUWER et al., 1994).

Die Anreicherung der Pestizidwirkstoffe aus den Wasserproben erfolgte mit Hilfe einer Flüssig/Fest-Phasen-Extraktion (Sep-Pak, Waters) an mit C-18-Material gefüllten Säulen, die mit Methanol und destilliertem Wasser bei schwachem Vakuum konditioniert wurden. Jeweils 500 ml der Wasserprobe wurden auf die Säule

aufgetragen, mit 1 ml Methanol eluiert und anschließend per HPLC (Waters) analysiert (Tab. 4). Dabei wurde ein Volumen von 100 μ l injiziert und mit einem 996 Dioden-Array-Detektor gemessen. Als Laufmittel kamen Acetonitril und Wasser als lineare Zweistufengradienten (Tab. 5) zum Einsatz. Die Quantifizierung der Pestizidwirkstoffe in den Wasserproben erfolgte entsprechend einer Kalibrierung.

Tab. 4: HPLC-Ausstattung

	Isoproturon	α -Cypermethrin
Säule	LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 μ m) Vorsäule (4 x 4mm)	Spherisorb ODS (250 x 4,6 mm; 2,5 μ m)
Wellenlänge	240 nm	235 nm
Flussrate	1 ml/min	1 ml/min
Temperatur	40°C	40°C

Tab. 5: Laufmittelgradienten

Isoproturon			α -Cypermethrin		
t_R [min]	Acetonitril [%]	Wasser[%]	t_R [min]	Acetonitril [%]	Wasser[%]
0	5	95	0	65	35
15	35	65	3	65	35
30	60	40	7	70	30
35	100	0	14	80	20
45	100	0	30	80	20
60	5	95	35	65	35
			40	65	35

4.2.1.2 Amphibienspektrum

Zur Erfassung der Anwanderung der Amphibien zum Reproduktionsgewässer im Frühjahr wurde in Richtung der Winterquartiere ein Folienzaun mit einer Länge von ca. 250 m an der Uferlinie des Gewässers errichtet. Im Abstand von jeweils 15 m wurden 17 Eimer unmittelbar am Folienzaun ebenerdig eingegraben. Die Kontrolle der Fangeimer erfolgte im Zeitraum vom 1. 3. bis 23. 5. 2000 täglich in den Morgenstunden. Dabei wurden Art, Anzahl, Alter und Geschlecht der Amphibien erfasst.

4.2.1.3 Gewässerparameter

Im Zeitraum vom 14. 3. bis 23. 5. 2000 wurden in 14tägigem Rhythmus hydrochemische und -physikalische Parameter einer Schöpfprobe (Entnahme aus ca. 30 cm Tiefe) des Untersuchungsgewässers erfasst. Elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Wassertemperatur sowie Sauerstoffkonzentration und -sättigung wurden direkt vor Ort mit Elektroden der Fa. WTW gemessen. Die Wasserproben wurden dunkel und gekühlt transportiert. Im Labor erfolgte die quantitative Bestimmung der Nährstoffe (NH₄⁺-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N, SRP, TP), von Chlorid und Sulfat photometrisch (Photometer Nanocolor® PT-3) mit standardisierten Küvettentests der Fa. Macherey & Nagel. Die Carbonathärte der Wasserproben wurde titrimetrisch analysiert.

4.2.2 Exposition mit ¹⁴C-markierten Wirkstoffen

Für die Aufnahmestudien wurden Laich und Larven der Amphibien mit ¹⁴C-markiertem Isoproturon bzw. Cypermethrin nach folgendem Schema mit jeweils drei Parallelen exponiert (Tab. 6).

Nach Ablauf der Expositionszeit wurde der Laich gründlich gespült, anschließend Gallertmasse und Embryo in einer Petri-Schale vorsichtig getrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Ethylacetat homogenisiert. Mit Hilfe eines Szintillation-Counters (Packard 1900 TR) konnte anschließend der radioaktive Gehalt in Gallert und Embryo gemessen werden. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Mengen an Radioaktivität am Beginn und nach Beendigung der Untersuchung im Medium sowie in den Spülflüssigkeiten der Expositionsgefäße und des Laichs analysiert.

Zur Klärung der Aufnahmekinetik und der Untersuchung der Isoproturonmetaboliten wurden Amphibienlarven im Entwicklungsstadium 25 (GOSNER, 1960) exponiert und anschließend – wie für den Laich beschrieben – weiterbehandelt.

Tab. 6: Expositionsschema der ¹⁴C-markierten Substanzen

Substanz	Konzentration	Expositionsdauer	Art	Anzahl/Parallele
¹⁴ C- IPU	1 µg/l	24 h	<i>B. bombina</i>	8 Eier
	1 µg/l	0,5; 1; 2; 4; 6; 12; 24 und 48 h	<i>B. variegata</i>	8 Larven
	1 µg/l	48 h	<i>B. bombina</i> <i>B. variegata</i>	8 Larven 8 Larven
¹⁴ C- Cypermethrin	0,4 µg/l	24 h	<i>B. variegata</i>	8 Eier
	0,4 µg/l	0,5; 1; 2; 4; 6; 12; 24 und 48 h	<i>R. arvalis</i> <i>B. variegata</i> <i>R. arvalis</i>	8 Eier 8 Larven 8 Larven

4.2.2.1 HPLC-Analyse von ¹⁴C-markiertem Isoproturon

Die Auftrennung und Bestimmung der IPU-Metaboliten erfolgte an einer HPLC-Anlage (Shimadzu), die mit einem [¹⁴C] Yttrium-Glas Scintillationszähler (Berthold) ausgestattet war (Tab. 7). Als Laufmittel wurden Acetonitril und Wasser als lineare Zweistufengradienten nach HOQUE (1998) genutzt.

Tab. 7: HPLC-Ausstattung zur Bestimmung der ¹⁴C-markierten IPU-Metabolite

	¹⁴ C- IPU
Säule	Spherisorb ODS (250 x 4,6 mm; 3 µm)
Wellenlänge	240 nm
Flussrate	0,6 ml/min
Temperatur	40°C

4.2.3 Exposition von Amphibienlarven in Wirkstoffen und Handelsprodukten

Um die Abhängigkeit der Effekte von der Wirkstoffkonzentration und der Expositionsdauer zu untersuchen, wurden Amphibienlarven (Stadium 25) den reinen Wirkstoffen (IPU, Diflufenikan, Cypermethrin, α-Cypermethrin) sowie den handelsüblichen Pestiziden (TOLKAN FLO®, FENIKAN®, FASTAC SC®) ausgesetzt. Jeweils drei parallele Ansätze mit acht Kaulquappen wurden bei 20°C nach folgendem Schema exponiert (Tab. 8).

Da die Cypermethrin-Stammlösung als Lösungsmittel Acetonitril enthielt, war es notwendig parallel eine weitere Kontrolle mit 100 µl/l Acetonitril zu prüfen. Nach Ablauf der Expositionszeit wurden Mortalität, Verhalten und Deformationen der Kaulquappen protokolliert. Anschließend wurden die Larven aus dem Expositionsmedium entfernt, gründlich gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Enzympräparation bei – 80 °C gelagert.

Tab. 8: Expositionsschema der verschiedenen Wirkstoffe und Amphibienarten

Substanz	Wirkstoffkonzentration	Expositionsdauer	Art
IPU	0; 0,1; 1; 10 und 100 µg/l	24 h	<i>Bombina variegata</i>
	0; 0,1; 1; 10 und 100 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
	1 µg/l	0,5; 2; 6; 24 und 48 h	<i>Bombina variegata</i>
TOLKAN FLO®	0; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 µg/l	24 h	<i>Bombina variegata</i>
	0; 0,1; 1; 10 und 100 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
	1 µg/l	0,5; 2; 6; 24 und 48 h	<i>Bombina variegata</i>
FENIKAN®	0; 0,1; 1; 10 und 100 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
Diflufenikan	0; 0,0125; 0,125; 1,25; 12,5 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
Cypermethrin	0; 0,001; 0,01; 0,1 und 1 µg/l	24 h	<i>Bombina variegata</i>
	0; 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
	0,1 µg/l	0,5; 2; 6; 24 und 48 h	<i>Bombina variegata</i>
	0,1 µg/l	0,5; 2; 6; 24 und 48 h	<i>Rana arvalis</i>
FASTAC SC®	0; 0,001; 0,01; 0,1 und 1 µg/l	24 h	<i>Bombina variegata</i>
	0; 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
α-Cypermethrin	0; 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/l	24 h	<i>Rana arvalis</i>
	0,1 µg/l	0,5; 2; 6; 24 und 48 h	<i>Rana arvalis</i>

4.2.4 Ermittlung der Schlupfraten

Nach der Entnahme von Laich des Moorfrosches (*Rana arvalis*) im Entwicklungsstadium 12 aus einem Kleingewässer des Untersuchungsgebietes und einer 24stündigen Akklimatisationsphase im Labor wurden Portionen des Laichs über sechs Tage in Konzentrationen von 0,1; 1 und 10 µg/l IPU exponiert, fotografiert und die Schlupfrate protokolliert. In gleicher Weise erfolgte die Exposition des Laichs in α-Cypermethrin-Konzentrationen von 0,1; 1 und 10 µg/l über 48 h.

4.2.5 Exposition verschiedener Entwicklungsstadien

Um die sensitiven Entwicklungsstadien von *Bombina variegata* zu ermitteln, wurden in drei parallelen Ansätzen jeweils acht Larven in den Gosner-Stadien 20 – 27 über 24 h in 0,01 µg/l IPU exponiert und die Wirkung der Pestizidbelastung auf die GST-Aktivität gemessen.

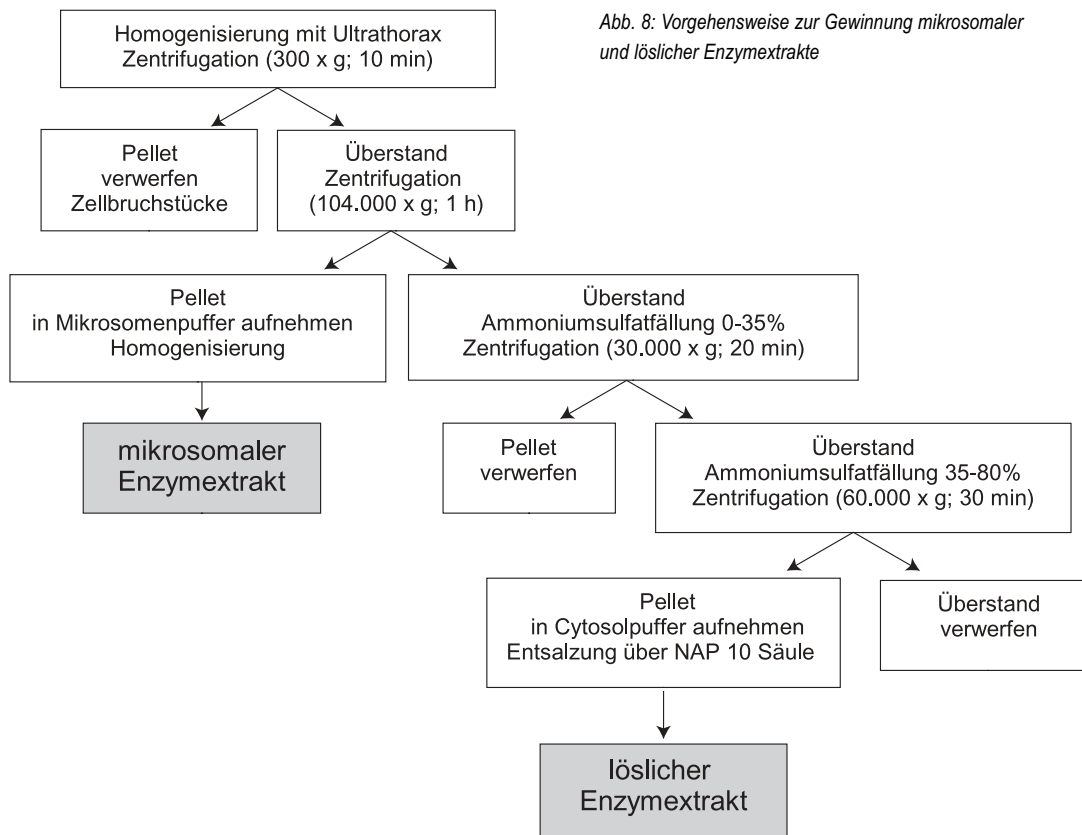
Zur Prüfung der kritischen Phasen der Embryonal- und Larvalentwicklung wurden in drei parallelen Ansätzen je zehn Eier oder Laven von *Rana arvalis* im entsprechenden Teststadium (EGG; EM; EGG/EM; TAD;

EGG/EM/TAD) exponiert. Die Wirkstoffkonzentrationen im Medium betragen 0; 10 und 100 µg/l IPU bzw. 0; 0,1 und 1 µg/l α-Cypermethrin. Sobald die Larven das nächstfolgende Teststadium erreichten (die im EGG-Stadium exponierten Eier z.B. schlüpften und damit das EM-Stadium erreichten), wurden sie aus dem Expositionsmedium entfernt und bis zur Metamorphose unter Bedingungen, wie in Kapitel 4.1.5.1. beschrieben, gehalten. Nach der kompletten Schwanzresorption wurden Länge und Gewicht der Amphibien gemessen.

4.2.6 Aktivität der Biotransformationsenzyme

4.2.6.1 Präparation der Enzymextrakte

Die Präparation der mikrosomalen und löslichen Enzymextrakte erfolgte nach Methoden von PFLUGMÄCHER & STEINBERG (1997) sowie WIEGAND et al. (1999), die für die Amphibienlarven dahingehend modifiziert wurden, dass das gefrorene Probenmaterial in 25 ml Aufbruchpuffer homogenisiert wurde (Abb. 8).



4.2.6.2 Messung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte photometrisch nach HABIG et al. (1974) und SCHRÖDER et al. (1992) unter Verwendung der Modellsubstrate 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 2,4-Dichlor-1-nitrobenzol (DCNB) und Fluorodifen. Diese Modellsubstrate konjugieren enzymkatalysiert mit Glutathion (GSH). Die entstandenen Konjugate weisen eine Eigenfärbung auf und können am Spektralphotometer bei bestimmten Wellenlängen gemessen werden (Tab. 9).

Tab. 9: Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der GST mit verschiedenen Substraten

	CDNB	DCNB	Fluorodifen
Substrat	1,0 mM	1,0 mM	0,3 mM
NaP 0,1 M	pH 6,5	pH 7,5	pH 7,5
GSH	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM
Wellenlänge	340 nm	345 nm	370 nm
Extinktionskoeffizient	9,6 l/mmol cm	8,5 l/mmol cm	3,1 l/mmol cm

Die Substrate wurden in Ethanol gelöst und die Reaktion durch Zugabe des Enzymextraktes gestartet (Gesamtvolumen 1220 µl, Messdauer 5 min). Als Kontrolle wurde statt der Probe destilliertes Wasser zugesetzt. Die Messung erfolgte in drei Parallelen.

4.2.6.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgte nach BRADFORD (1976) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der mit BSA-Lösung erstellten Kalibriergeraden konnte der Proteingehalt der Proben in [mg Protein / ml Extrakt] bestimmt werden. Die Messung erfolgte in drei Parallelen.

4.2.6.4 Berechnung der Enzymaktivitäten

Die Aktivität eines Enzyms ist durch die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion bestimmt. Mit dem Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Enzymaktivität für ein bestimmtes Volumen wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{Volumenaktivität} &= (\Delta E \cdot V) / (\Delta t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v) \\ [\mu\text{kat/ml}] &= [\mu\text{mol} / \text{s} \cdot \text{ml}] \end{aligned}$$

- $\Delta E / \Delta t$ Extinktionsänderung pro Zeiteinheit
- V Gesamtvolumen in der Küvette [µl]
- ϵ molarer Extinktionskoeffizient des Substrates [l/mmol · cm]
- d Schichtdicke der Küvette [cm]
- v Volumens des Enzymextraktes in der Küvette [µl]

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die spezifische Enzymaktivität berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität} &= \text{Volumenaktivität} / \\ &\quad \text{Proteingehalt der Probe} \\ [\mu\text{kat} / \text{mg Protein}] &= [\mu\text{kat} / \text{ml}] / [\text{mg/ml}] \end{aligned}$$

4.2.7 Statistische Prüfverfahren

Die statistische Auswertung der Signifikanz der durch die Wirkung der Pestizide veränderten Enzymaktivitäten gegenüber den Werten der Kontrolle wurde mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Newman-Keuls-Test, $p \leq 0,05$ (SPSS 9.0 für Windows) vorgenommen.

In den Untersuchungen zur Schlupfrate erlaubte die umfangreichere Stichprobengröße ($n=33$) die Signifikanz der Gewichts- und Längenunterschiede der metamorphosierten Amphibien mit Hilfe des Student's t-Test zu beurteilen. Da die erhöhte Mortalität bei den Expositionen verschiedener Entwicklungsstadien der Amphibien die Anzahl der Stichproben reduzierte, wurden die Daten mit Hilfe des Fisher-Tests $p \leq 0,05$ analysiert, der eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Behandlungen auch bei geringem Stichprobenumfang ermöglicht (BRIDGES, 2000).

5.1 Freilanduntersuchungen

5.1.1 Wirkstoffkonzentrationen nach Freilandapplikation

5.1.1.1 Isoproturon

Vor dem Sprühtermin des Herbizids TOLKAN FLO® war an keiner der fünf Probenahmepunkte IPU nachweisbar. Bereits 30 min nach der Applikation wurde in zwei Wasserproben (Entnahmestellen 1 und 2) IPU gemessen. Im weiteren Verlauf nahmen die IPU-Konzentrationen an allen Probenahmepunkten zu und erreichten nach dem ersten Starkregenereignis (16 d nach dem Sprühtermin) ein Maximum von 22 µg/l IPU. Auch zehn Wochen nach der Applikation war an der Probenahmestelle 1 noch 0,2 µg/l IPU nachweisbar (Publ. I, Tab. 10).

5.1.1.2 α-Cypermethrin

Vor der Applikation des Insektizids FASTAC SC® auf der Versuchsfläche war an keiner der fünf Probenahmepunkte α-Cypermethrin nachweisbar. In den Wasserproben, die 24 h nach der Applikation an den Probenahmestellen 1, 2 und 4 entnommen wurden, konnten 0,094 µg/l; 0,037 µg/l und 0,026 µg/l α-Cypermethrin gemessen werden. Dies waren die einzigen Nachweise (Tab. 10).

Tab. 10: Konzentrationen von Isoproturon bzw. α-Cypermethrin [µg/l] an der Probenahmestelle 1 des Tierpfuhls zu bestimmten Zeiten vor und nach der Applikation von TOLKAN FLO® bzw. FASTAC SC® auf der umliegenden Versuchsfläche

Zeit vor bzw. nach der Applikation	-14 d	0,5 h	1 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	16 d	70 d
Isoproturon	-	0,84	-	1,44	0,59	8,88	9,63	-	21,61	0,17
α-Cypermethrin	-	-	-	-	-	0,094	-	-	-	-

Auf den Ergebnissen der Freilandexperimente basierte die Auswahl der Konzentrationsbereiche für die *in vitro* Tests, die die Wirkung der Pestizide auf Laich und Larven der Amphibien klären und umweltrelevante Bedingungen abbilden sollten.

5.1.2 Gewässerparameter

Unter Nutzung einer von SCHLÜPMANN (1992) für Kleingewässer vorgeschlagenen Gliederung nach dem Grad der Eutrophierung war das Untersuchungs-gewässer als schwach hypertroph einzuordnen. Es wurden hohe Leitfähigkeiten (bis 768 µS/cm) und hohe Sulfatkonzentrationen (bis 157 mg/l) gemessen. Mittlere Carbonathärten (10,5 bis 12° dH) und pH-Werte im Bereich zwischen 7,4 und 8,0 wiesen auf die gute Pufferung des Gewässers hin. Die während des betrachteten Frühjahrsaspektes gemessenen Nährstoffkonzentrationen (Ammonium-N, Nitrit-N, Nitrat-N, SRP, TP) waren für solch ein hypertrophes Kleingewässer vergleichsweise gering. Parallel wurde eine starke Biomasseproduktion beobachtet, die sich in der Zunahme des Phytoplanktons aber vor allem des Makrophytenwachstums im Gewässer äußerte (Publ. I, Publ. II).

5.1.3 Amphibienspektrum

Am Foliensaun konnten während der Frühjahrsanwanderung insgesamt 2398 Amphibien (neun verschiedene Arten) gefangen werden (Tab. 11). Moorfrosch (*Rana arvalis*) und Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*) waren deutlich häufiger vertreten als andere Arten. Über den gesamten Zeitraum konnten acht Rotbauchunken (*Bombina bombina*) registriert werden.

Erwartungsgemäß war die Dynamik der Anwanderung der Amphibien artspezifisch verschieden (Publ. II).

Tab. 11: Abundanz und Dominanz der im Zeitraum vom 1.3. bis 23.5.2000 am Thierrpühl gefangenen Amphibien und deren Einordnung in die Rote Liste der gefährdeten Amphibienarten

Art		Rote Liste		Anzahl	Häufigkeit [%]
		BRD	Brdbg		
Teichmolch	<i>Triturus vulgaris</i>	n	n	137	5,71
Kammolch	<i>Triturus cristatus</i>	3	2	161	6,71
Rotbauchunke	<i>Bombina bombina</i>	1	1	8	0,33
Knoblauchkröte	<i>Pelobates fuscus</i>	2	3	704	29,36
Erdkröte	<i>Bufo bufo</i>	n	3	91	3,79
Wechselkröte	<i>Bufo viridis</i>	2	2	1	0,04
Moorfrosch	<i>Rana arvalis</i>	2	3	976	40,70
Grasfrosch	<i>Rana temporaria</i>	V	3	1	0,04
Teichfrosch	<i>Rana esculenta</i>	n	n	319	13,30

- 1 vom Aussterben bedroht
- 2 stark gefährdet
- 3 gefährdet
- V Arten der Vorwarnliste
- n nicht in der Roten Liste geführt

5.2 Aufnahme der ¹⁴C-markierten Substanzen

5.2.1 Aufnahme in Laich

5.2.1.1 Isoproturon

Nach 24stündiger Exposition von Laich der Rotbauchunke (*B. bombina*) in ¹⁴C-markiertem IPU war radioaktive Substanz sowohl in der umgebenden Gallertmasse als auch im Embryo festzustellen. In der Gallerthülle wurden $12 \pm 1,14$ ng IPU/mg Frischgewicht und im Embryo $35 \pm 1,84$ ng IPU/mg Frischgewicht detektiert (Publ. I, Abb. 9).

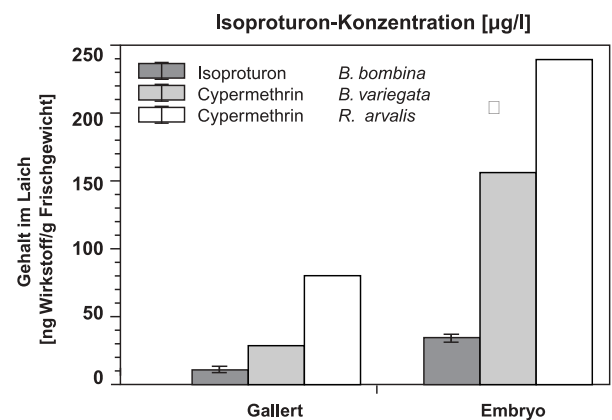


Abb. 9: Aufnahme der ¹⁴C-markierten Wirkstoffe in Gallert und Embryo des Amphibienlaichs nach 24stündiger Exposition.

5.2.1.2 Cypermethrin

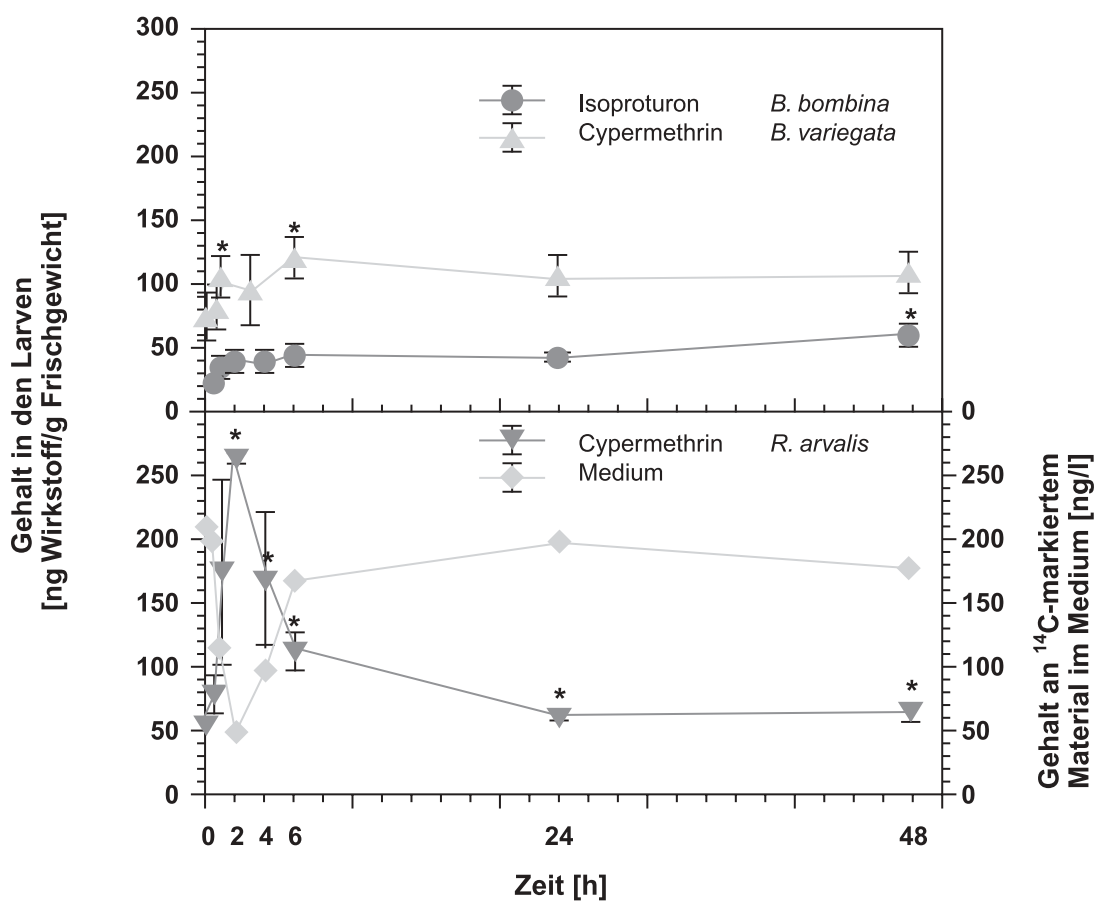
Radioaktiv markiertes Cypermethrin war nach einer Expositionszeit von 24 h bei beiden getesteten Amphibienarten in Embryo und Gallerthülle nachweisbar. Die Aufnahme von ¹⁴C-markiertem Cypermethrin in Laich von *B. variegata* war mit $29,6 \pm 0,02$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht im Gallert und $153,92 \pm 0,04$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht im Embryo deutlich geringer als bei Laich von *R. arvalis* mit $79,44 \pm 0,04$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht im Gallert und $235,53 \pm 0,1$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht im Embryo (Publ. III, Abb. 9).

5.2.2 Kinetik der Aufnahme in die Larven

5.2.2.1 Isoproturon

Bei der Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme des ^{14}C -markierten IPU in Larven von *B. variegata* (Stadium 25) wurden nach 30 min $24,52 \pm 2,79$ ng IPU/mg Frischgewicht gemessen. Der nach 48 h erreichte maximale radioaktive Gehalt in den Larven mit $61,13 \pm 7,4$ ng IPU/mg Frischgewicht unterschied sich signifikant von allen anderen Ergebnissen. Die Wiederfindungsrate betrug 84,5% (Publ. I; Abb. 10).

Abb. 10: Aufnahmekinetik der ^{14}C -markierten Wirkstoffe (IPU und Cypermethrin) über 48 h in Larven von *B. variegata* bzw. *R. arvalis* sowie Veränderungen des Gehaltes an ^{14}C -markiertem Material im Medium während Exposition von *R. arvalis* über 48 h
* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle



5.2.2.2 Cypermethrin

Bei der Messung der zeitabhängigen Aufnahme des ^{14}C -markierten Cypermethrins in die Kaulquappen von *B. variegata* wiesen die Radioaktivitätswerte der Larven nach 1- und 6stündiger Exposition signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf. Der Gehalt an ^{14}C -markiertem Cypermethrin stieg nach 6 h auf ein Maximum von $121,63 \pm 14,25$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht an. Nach 24 h stellten sich konstante Bedingungen um 100 ng Cypermethrin/mg

Frischgewicht ein. Die Wiederfindungsrate der Radioaktivität betrug im Durchschnitt 79,7% (Publ. III; Abb. 10).

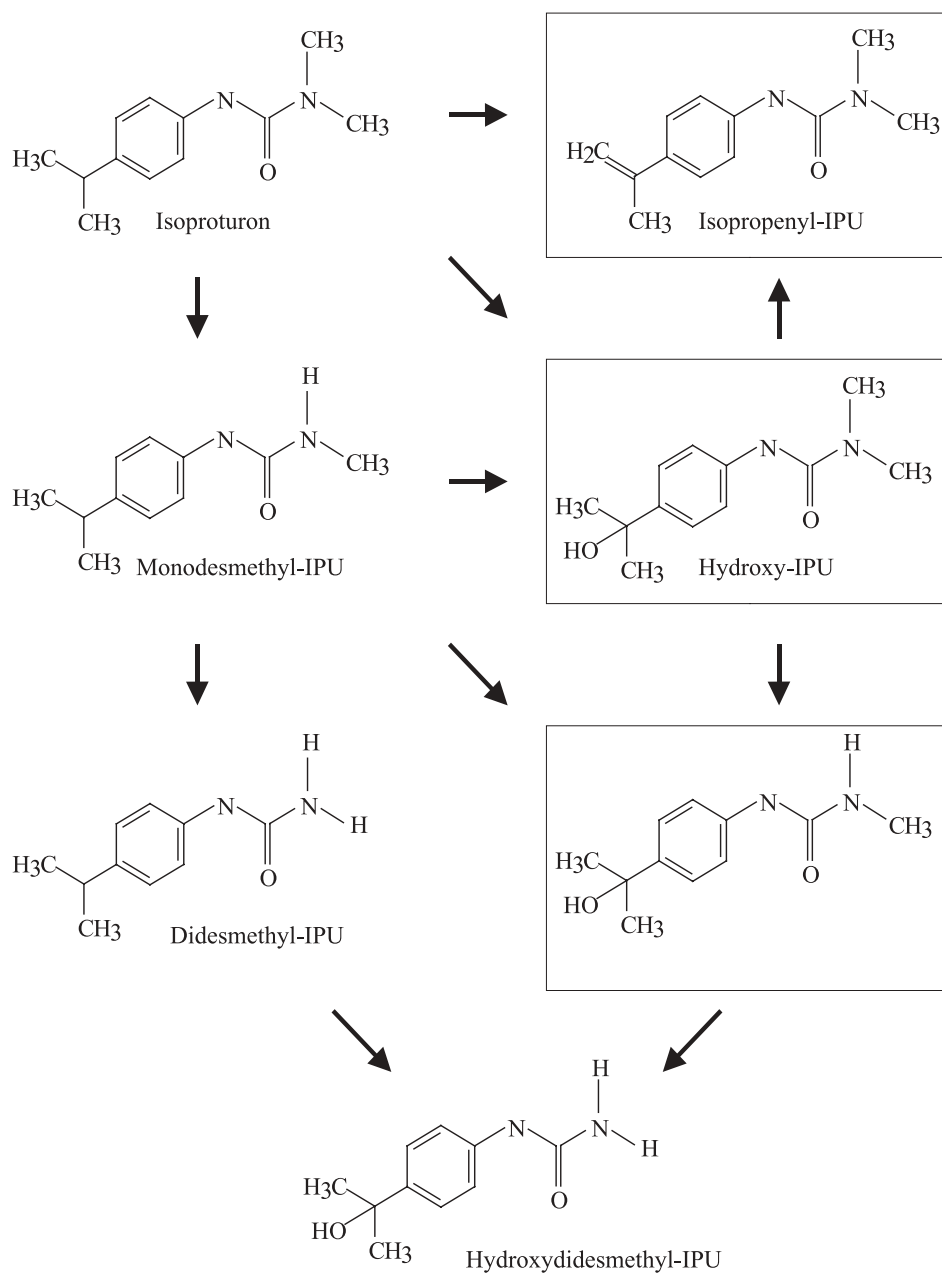
Bei Larven von *R. arvalis* wurde innerhalb der ersten 2 h ein rapider Anstieg der Radioaktivität in den Larven festgestellt. Dabei wurden Werte von $260,83 \pm 3,7$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht ermittelt, die sich signifikant von den Kontrollen unterschieden. Im weiteren

Verlauf nahm der Gehalt an radioaktiver Substanz in den Larven wieder deutlich ab, erreichte nach 24stündiger Exposition mit $59,12 \pm 1,62$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht nahezu die Werte der Kontrolle ($53,65 \pm 3,31$ ng Cypermethrin/mg Frischgewicht) und blieb konstant (Abb. 10). Bei Larven von *R. arvalis* war also eine rasche Aufnahme und anschließende Elimination des ^{14}C -markierten Cypermethrins zu verzeichnen. In der Eliminationsphase wurde parallel eine Zunahme des Gehaltes radioaktiv markierter Kohlenstoffverbindungen im Medium gemessen, wobei es sich um nicht umgesetztes ^{14}C -markiertes Cypermethrin und/oder dessen Metaboliten handeln muss.

5.2.3 Metaboliten des Isoproturons

Über den Vergleich der Retentionszeiten der ^{14}C -markierten Metaboliten von *B. bombina* und *B. variegata* mit denen der Originalstandards konnten in beiden Spezies mehrere IPU-Metaboliten nachgewiesen werden, wie das N-demethylierte Derivat MDM-IPU, die C-hydroxylierten Derivate 1-OH-IPU, 2-OH-IPU, 1-OH-MDM-IPU und 2-OH-MDM-IPU sowie der olefinische Metabolit Isopropenyl-IPU (Abb. 11, Publ. I).

Abb. 11: Metabolisierungsschema von Isoproturon nach HAAS (1997)
Die eingerahmten Metaboliten wurden im Rahmen der hier vorgelegten Studie nachgewiesen.



5.3 Toxizität

5.3.1 Schlupfraten und Teratogenität

5.3.1.1 Isoproturon

Mit zunehmender IPU-Konzentration nahm die Schlupfrate des Laichs von *R. arvalis* ab. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle traten bei Belastung mit 1 und 10 µg/l IPU auf; 95,4 % bzw. 88,3 % der Larven schlüpften (Abb. 12). Zusätzlich waren bei Expositionskonzentrationen von 10 µg/l IPU Verkrümmungen, Deformationen und Verhaltensänderungen (z.B. Schwimmen in Seitenlage) bei einzelnen geschlüpften Larven zu verzeichnen.

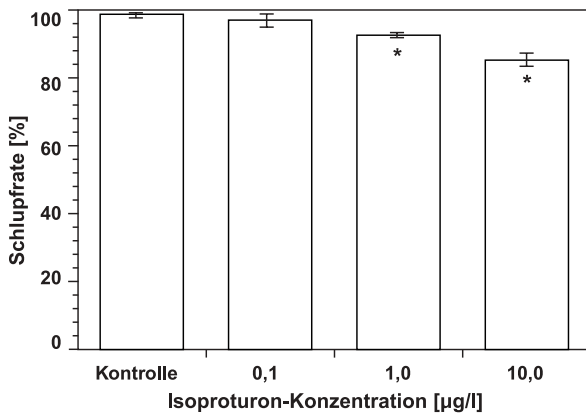


Abb. 12: Schlupfraten von *R. arvalis* bei verschiedenen IPU-Konzentrationen

* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

5.3.1.2 α-Cypermethrin

Sowohl die Individuen in den Kontrollen als auch die den verschiedenen α-Cypermethrin-Konzentrationen ausgesetzten Larven schlüpften 2 d nach Beendigung der Exposition nahezu synchron. Im Vergleich zur Kontrolle waren die Schlupfraten der in 1 oder 10 µg/l α-Cypermethrin exponierten Eier signifikant erniedrigt. Larven die als Laich einer 48stündigen α-Cypermethrin Exposition ausgesetzt waren, zeigten morphologische

Veränderungen und ein abnormes Verhalten. Mit steigender Belastungskonzentration nahm der Anteil von Tieren mit Schwanzdeformationen und konvulsiven Drehungen zu. Weiterhin waren die Körperlängen der metamorphosierten Amphibien, die während ihrer Embryonalentwicklung in umweltrelevanten Konzentrationen von α-Cypermethrin exponiert wurden, im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert (Publ. IV).

5.3.2 Beeinträchtigungen der Larven

5.3.2.1 Isoproturon und Handelsprodukt TOLKAN FLO®

Neben reduzierter Mobilität (seitliche Schwimmlage) waren bei den Larven von *B. variegata* morphologische Abnormitäten wie geknickte Schwanzspitzen, Körperschwellungen sowie Deformationen an Kopf und Darmssystem in allen Belastungsszenarien (sowohl verschiedene IPU-Konzentration als auch unterschiedliche Expositionsdauer) zu verzeichnen.

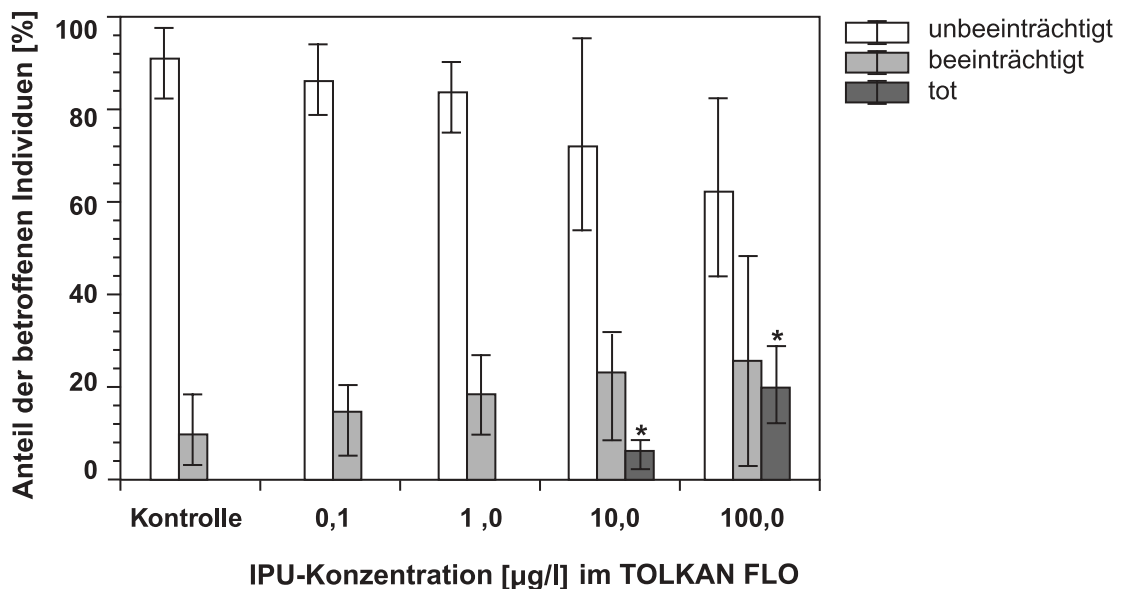
Deformationen und Verhaltensabnormitäten wurden bei Larven von *B. variegata* bei Konzentrationen von 0,1 µg/l IPU und 24stündiger Exposition festgestellt. Im Vergleich zur Kontrolle stieg bei Konzentrationen von 1, 10 und 100 µg/l IPU die Zahl der gelähmten oder toten Kaulquappen signifikant an. In Abhängigkeit von der Konzentration waren bis zu 50 % der exponierten Larven betroffen (Publ. I).

Eine 24- bzw. 48stündige Belastung mit 1 µg/l IPU rief bei fast 40 % der Larven von *B. variegata* Beeinträchtigungen hervor. Allerdings wiesen auch 10 % der nicht exponierten Kaulquappen (Kontrolle über 48 h) Deformationen oder Verhaltensabnormitäten auf (keine Abb.).

Zwölf Prozent der Larven von *B. variegata*, die über 6 h in TOLKAN FLO® (1 µg/l IPU) exponiert wurden, schwammen in Seitenlage. Während der 24- bzw. 48stündigen Herbizidbelastung nahm der Anteil der beeinträchtigten Larven von *B. variegata* deutlich bis auf 34 % zu (keine Abb.).

Tote Individuen wurden bei Belastung mit TOLKAN FLO® in Konzentrationen verzeichnet, die 10 und 100 µg/l IPU entsprachen (Abb. 13). Die Anzahl der beeinträchtigten Individuen stieg bei allen getesteten Belastungen mit TOLKAN FLO® im Vergleich zur Kontrolle an, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Abb. 13: Beeinträchtigung der Larven von *B. variegata* nach 24 h Exposition im handelsüblichen Herbizid TOLKAN FLO®
* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle



5.3.2.2 α-Cypermethrin

Larven von *R. arvalis*, die über 48 h in 1 oder 10 µg/l α-Cypermethrin exponiert waren, zeigten morphologische Veränderungen und Verhaltensabnormitäten (Spasmen). Bei Konzentrationen von 10 µg/l α-Cypermethrin wiesen 90 % der Larven so starke Beeinträchtigungen auf, dass sie anschließend starben (Publ. IV).

Diese Resultate führten zu einem modifizierten Expositionsschema für die zu untersuchenden Entwicklungsphasen; Konzentrationen von 10 µg/l α-Cypermethrin wurden nicht getestet.

5.3.3 Sensitivität bestimmter Entwicklungsphasen

5.3.3.1 Isoproturon

Die verschiedenen getesteten Larvalstadien (Gosner Stadien 21 - 27) von *B. variegata* reagierten auf die Belastung mit 0,01 µg/l IPU in den Stadien 24 und 25 besonders sensitiv (Publ. I).

Bei den Untersuchungen der verschiedenen Entwicklungsphasen von *R. arvalis* schienen Konzentrationen von 10 und 100 µg/l IPU den exponierten Laich (EGG; EGG/EM; EGG/EM/TAD) kaum zu beeinträchtigen. Die Schlupfraten betragen 96 - 100 %.

In den Entwicklungsphasen TAD und EGG/EM/TAD bewirkten die IPU-Belastungen im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Mortalität; die Überlebensraten lagen im Bereich zwischen 40 % und 87 %. Da alle IPU-Belastungen im TAD-Stadium besonders hohe Mortalitäten (bis 60%) zur Folge hatten, konnten diese Daten keiner statistischen Analyse unterzogen werden, die Anzahl der Stichproben war zu gering.

Deformationen wurden nur bei Larven beobachtet, die während der EM-Phase in 10 µg/l IPU exponiert waren. Knapp ein Drittel der Larven zeigten morphologische Veränderungen (geknickte Schwanzspitzen) und/oder abnorme Verhaltensmuster (seitliche Schwimmelage). Die betroffenen Individuen regenerierten sich bis zum Ende der Metamorphose.

In allen getesteten Entwicklungsphasen verkürzte die IPU-Belastung die Metamorphosedauer im Vergleich zur Kontrolle. Die während der EGG/EM/TAD-Phase in 100 µg/l IPU exponierten Kaulquappen metamorphosierten signifikant früher – 5 d eher als in der Kontrolle (Abb. 14).

Unabhängig von der Belastungskonzentration und der Entwicklungsphase waren alle exponierten Larven am Ende der Metamorphose schwerer als die Tiere der Kontrolle. Signifikante Gewichtsunterschiede traten z. B. nach Exposition der Larven im EGG/EM-Stadium in 10 µg/l IPU auf; die metamorphosierten Amphibien waren im Mittel 31 mg schwerer als in der Kontrolle. Betrachtet man die lineare Beziehung zwischen Körperlänge und Gewicht der Amphibien am Ende der Metamorphose, ist am – im Vergleich zur Kontrolle – signifikant (F-Test, $p \leq 0,05$) flacheren Anstieg der Regressionsgeraden die stärkere Gewichtszunahme der Amphibien nach der Exposition der Larven im EM-Stadium in 100 µg/l IPU zu erkennen (Abb. 15).

5.3.3.2 α-Cypermethrin

Die meisten der während ihrer Laichphase über 24 h in α-Cypermethrin exponierten Larven schlüpfen erfolgreich. Lediglich die während der EGG/EM-Phase in 1 µg/l α-Cypermethrin exponierten Embryonen wiesen eine verminderte Schlupfrate von 82% auf; 79% dieser geschlüpften Larven metamorphosierten im weiteren Entwicklungsverlauf (Publ. IV).

Jede Behandlung mit α-Cypermethrin in den Entwicklungsphasen EM, TAD und EGG/EM/TAD reduzierte die Überlebensrate auf 30–87%. Die Expositionen mit α-Cypermethrin riefen bei den Larven Lähmungen und verzögerte Reaktionen hervor oder führten zu ständigen Drehbewegungen und unkoordiniertem Schwimmverhalten. Im EM-Stadium wiesen 40% der Larven nach der Exposition Deformationen auf (Publ. IV).

Expositionen während der EGG, EGG/EM und EM-Phasen bewirkten eine Verkürzung der Metamorphose im Vergleich zur Kontrolle. Larven, die im EM-Stadium mit 1 µg/l α-Cypermethrin behandelt wurden, metamorphosierten 7 d früher und unterschieden sich damit signifikant von den unbelasteten Tieren. Expositionen über die gesamte Embryonal- und Larvalentwicklung (EGG/EM/TAD) verzögerten die Metamorphose (Publ. IV).

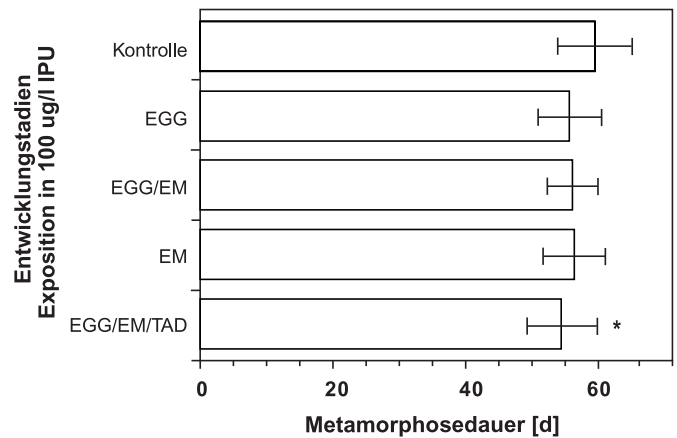


Abb. 14: Wirkung der Exposition verschiedener Entwicklungsstadien von *R. arvalis* in 100 µg/l IPU auf die Dauer der Metamorphose

* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (F-Test, $p \leq 0,05$; $n=17$)

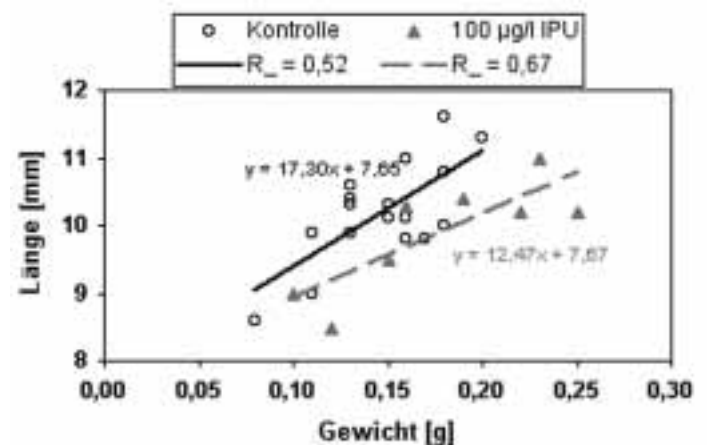


Abb. 15: Korrelation von Länge und Gewicht der metamorphosierten Jungtiere nach Exposition im Embryonalstadium in 100 µg/l IPU im Vergleich zur Kontrolle

Im Vergleich zur Kontrolle war nach der Behandlung von *R. arvalis* mit 1 µg/l α-Cypermethrin während der EGG/EM/TAD-Phase die Körperlänge der Amphibien am Ende der Metamorphose signifikant vermindert. Dies veränderte den Anstieg der Regressionsgeraden – der linearen Beziehung zwischen Körperlänge und Gewicht der Amphibien, der sich signifikant von der Kontrolle und der Exposition in 0,1 µg/l α-Cypermethrin unterschied (Publ. IV).

5.4 Biotransformation

5.4.1 Isoproturon

5.4.1.1 Reiner Wirkstoff

In Bezug auf das Modellsubstrat CDNB wurden bei 1, 10 und 100 µg/l IPU im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte GST-Aktivitäten in der cytosolischen Enzymfraktion (sGST) der Larven von *B. variegata* gemessen (bis zu 22,7 nkat/mg Protein; Abb. 16a), während die Aktivität der mikrosomalen Fraktion (mGST) bei jeder IPU-Belastung signifikant erniedrigt war. Gegenüber Fluorodifen stieg die Aktivität der mGST bei 0,1 µg/l IPU bis auf 22 nkat/mg Protein an und fiel bei höheren Konzentrationen deutlich unter die Werte der Kontrolle. Die sGST wies keine signifikanten Veränderungen auf. Verglichen mit den beiden anderen getesteten Modellsubstraten wurden unter Nutzung von DCNB generell deutlich geringere

Aktivitäten gemessen, jedoch führte jegliche IPU-Belastung im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle zu signifikant erhöhten GST-Aktivitäten (Publ. I).

Untersuchungen zur **Zeitabhängigkeit** der Enzymantwort der Larven von *B. variegata* auf die Belastung mit IPU belegten, dass die GST-Aktivitäten bei allen Modellsubstraten mit zunehmender Expositionsdauer anstiegen. Sie unterschieden sich bereits nach einer Expositionszeit von 0,5 h signifikant von den Werten der Kontrolle (Publ. I).

Betrachtet man das Modellsubstrat CDNB, so verursachte eine Belastung der Larven von *R. arvalis* mit 0,1 µg/l IPU eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle sowohl in der mikrosomalen als auch in der cytosolischen Fraktion (maximale sGST 2,0 nkat/mg Protein). Bei Konzentrationen von 1, 10 und 100 µg/l IPU waren die Enzymantworten der sGST signifikant geringer als die Werte der Kontrolle (Abb. 16a, b).

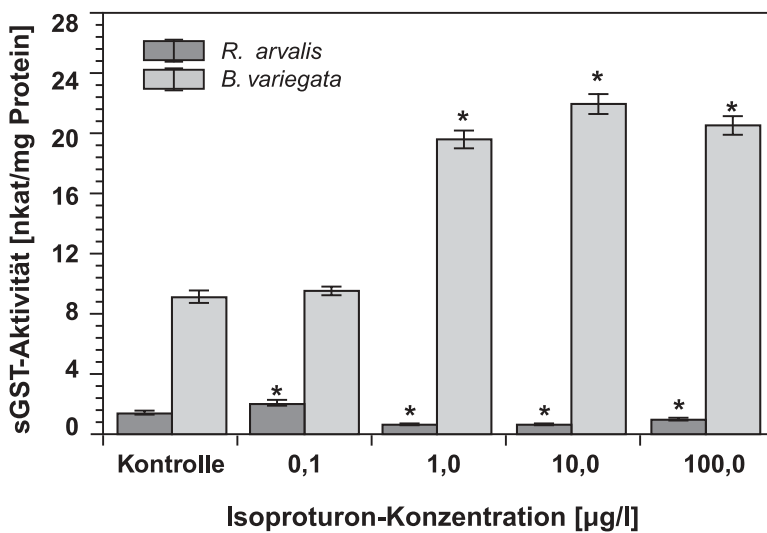


Abb. 16a: Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit Isoproturon
* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

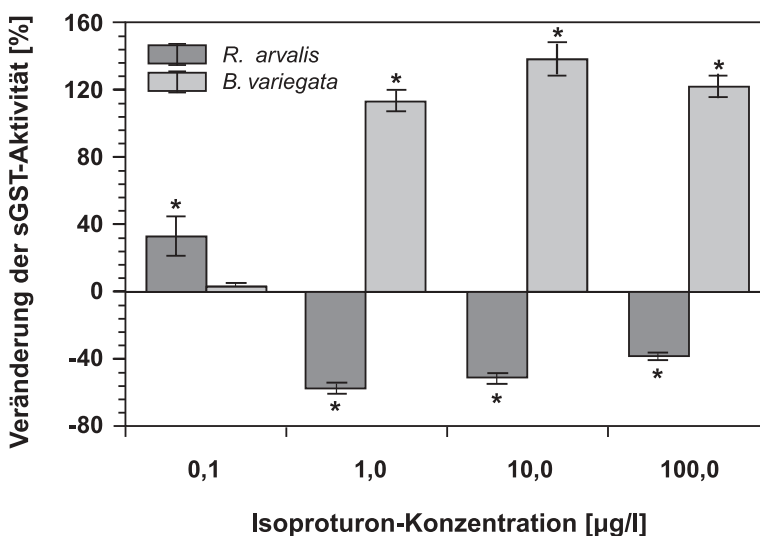


Abb. 16b: Relative Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit Isoproturon
* - signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

Im Vergleich der Amphibienspezies stieg die sGST der Larven von *B. variegata* bei IPU-Konzentration $\geq 1,0 \mu\text{g/l}$ signifikant an, während sie bei Larven von *R. arvalis* signifikant abnahm. Da die GST-Aktivität der unbelasteten Larven bei *B. variegata* deutlich höher war als bei *R. arvalis* (Abb. 16a), erlaubt die Darstellung der relativen Veränderungen der sGST-Aktivität gegenüber den Kontrollen einen Vergleich der unterschiedlichen Reaktionen der Amphibienspezies auf die Belastung mit IPU. Bei Konzentrationen von $0,1 \mu\text{g/l}$ IPU war die sGST bei *R. arvalis* stärker aktiviert als bei *B. variegata*. Konzentrationen von 1, 10 und $100 \mu\text{g/l}$ IPU steigerten die sGST von *B. variegata* um bis zu 140%, während bei *R. arvalis* Aktivitätsminderungen um bis zu 57% verzeichnet wurden (Abb. 16b).

5.4.1.2 Handelsprodukte

5.4.1.2.1 TOLKAN FLO®

Mit zunehmender IPU-Konzentration im TOLKAN FLO® stiegen die GST-Aktivitäten der Larven von *B. variegata* bei allen getesteten Modellsubstraten im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Sie erreichten Maximalwerte bei $10 \mu\text{g/l}$ IPU (CDNB) bzw. bei $100 \mu\text{g/l}$ IPU (DCNB, Fluorodifen). Nach der Belastung der Larven mit $1000 \mu\text{g/l}$ IPU im TOLKAN FLO® waren bei allen Modellsubstraten deutlich geringere Enzymaktivitäten messbar (Publ. I; Abb. 17a).

Die mit CDNB getesteten Isoenzyme der Larven von *R. arvalis* reagierten auf jegliche TOLKAN FLO®-Belastung mit signifikant verminderten Aktivitäten sowohl der mikrosomalen als auch der cytosolischen Fraktion (Abb. 17a, b) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

Abb. 17a: Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit TOLKAN FLO®
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB;
n. g. – nicht getestet

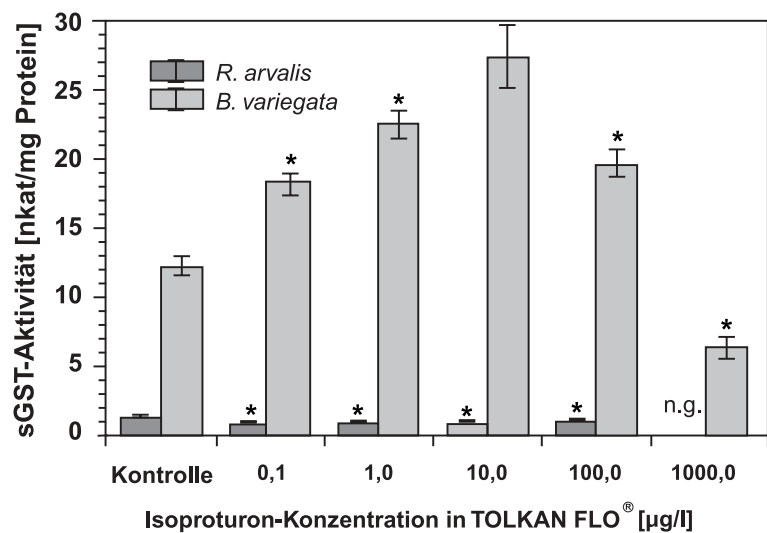
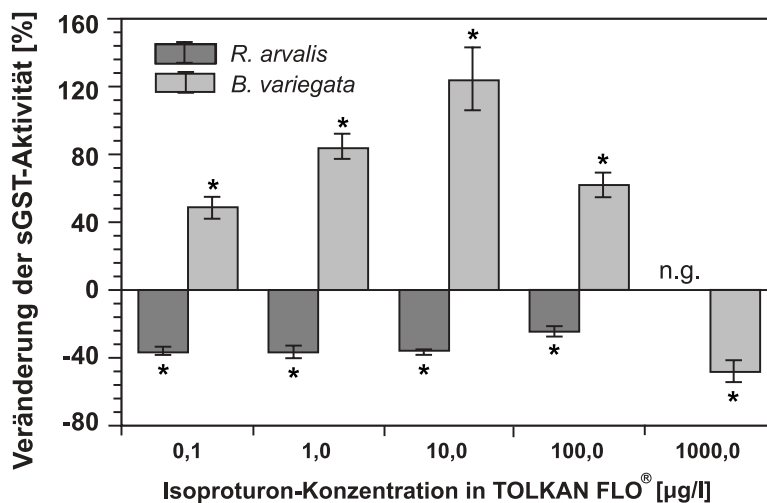


Abb. 17b: Relative Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit TOLKAN FLO®.
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB;
n. g. – nicht getestet.



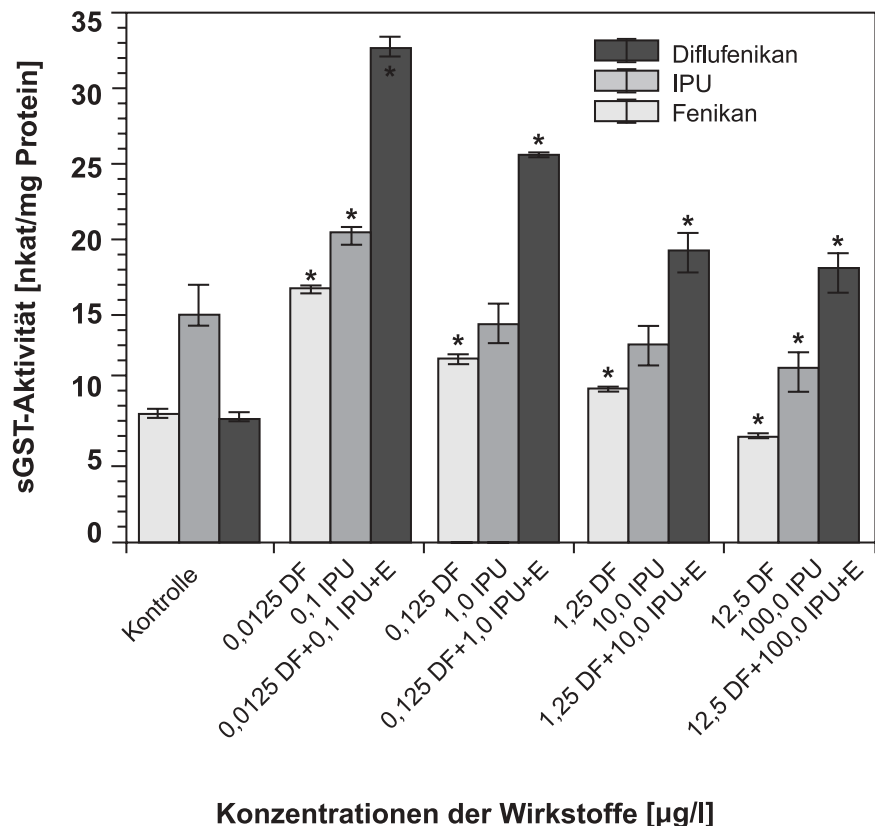
Vergleicht man die Veränderungen der sGST-Aktivitäten die einerseits der reine Wirkstoff und andererseits das Handelsprodukt TOLKAN FLO® hervorriefen, so waren bei *R. arvalis* mit Ausnahme der Belastungskonzentration von 0,1 µg/l IPU nur geringe Differenzen festzustellen (Abb. 16b, 17b). Bei den Larven von *B. variegata* bewirkte das Handelsprodukt TOLKAN FLO® nur bei Konzentrationen von 0,1 µg/l IPU eine stärkere sGST-Aktivierung als der reine Wirkstoff. Bei allen weiteren getesteten Konzentrationen wurde die sGST der Larven durch den reinen Wirkstoff stärker aktiviert. Das bedeutet, dass die Emulgatoren im TOLKAN FLO® eine inhibierende Wirkung auf die sGST-Aktivität der Larven von *B. variegata* ausübten.

5.4.1.2.2 FENIKAN®

Da 1 l des handelsüblichen Herbizids FENIKAN® neben 500 g IPU als weiteren Wirkstoff 62,5 g Diflufenikan enthält, wurden die Effekte beider Wirkstoffe auf die GST-Isoenzyme der Larven von *R. arvalis* entsprechend ihrer Dosierung im FENIKAN® separat geprüft. Betrachtete man die mit dem Modells substrat Fluorodifen gemessenen Enzymaktivitäten, so stieg die sGST bei einer Belastung mit 0,0125 µg/l Diflufenikan im Vergleich zur Kontrolle um 100 % bis auf maximal 16,7 nkat/mg Protein. Bei höheren Belastungskonzentrationen nahm die Enzymaktivität ab, so dass sie bei 12,5 µg/l Diflufenikan signifikant unter den Werten der Kontrolle lag (Abb. 18a, b).

Bei Konzentrationen von 0,1 µg/l IPU reagierte die sGST zunächst mit signifikant erhöhter Aktivität auf die Belastung, wobei das Maximum von 19,4 nkat/mg Protein einer Zunahme um 27 % gegenüber der Kontrolle entsprach. Hingegen hatten Konzentrationen von ≥ 1,0 µg/l IPU eine Verminderung der sGST der Larven zur Folge. Bei 100 µg/l IPU lagen die Werte dann signifikant unter denen der Kontrolle (Abb. 18a, b).

Abb. 18a: Aktivierung der sGST der Larven von *R. arvalis* infolge der 24 h-Belastung mit Diflufenikan (DF), Isoproturon (IPU) und dem handelsüblichen Herbizid FENIKAN®, das aus DF, IPU und Emulgatoren (E) besteht
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modells substrat Fluorodifen



Jede Belastung mit FENIKAN®, d. h. mit einer Mischung aus den auch einzeln getesteten Wirkstoffen Diflufenikan und Isoproturon sowie Emulgatoren, verursachte einen signifikanten Anstieg der sGST-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Eine maximale Enzymaktivität von 32,7 nkat/mg Protein, die eine Steigerung um 300% gegenüber der Kontrolle beschrieb, wurde bei FENIKAN®-Konzentrationen gemessen, die 0,0125 µg/l Diflufenikan und 0,1 µg/l IPU beinhalten. Bei höheren Wirkstoffkonzentrationen im FENIKAN® nahm die sGST-Aktivität wieder ab, blieb aber gegenüber dem Kontrollansatz signifikant erhöht (Abb. 18a, b).

5.4.2 Cypermethrin

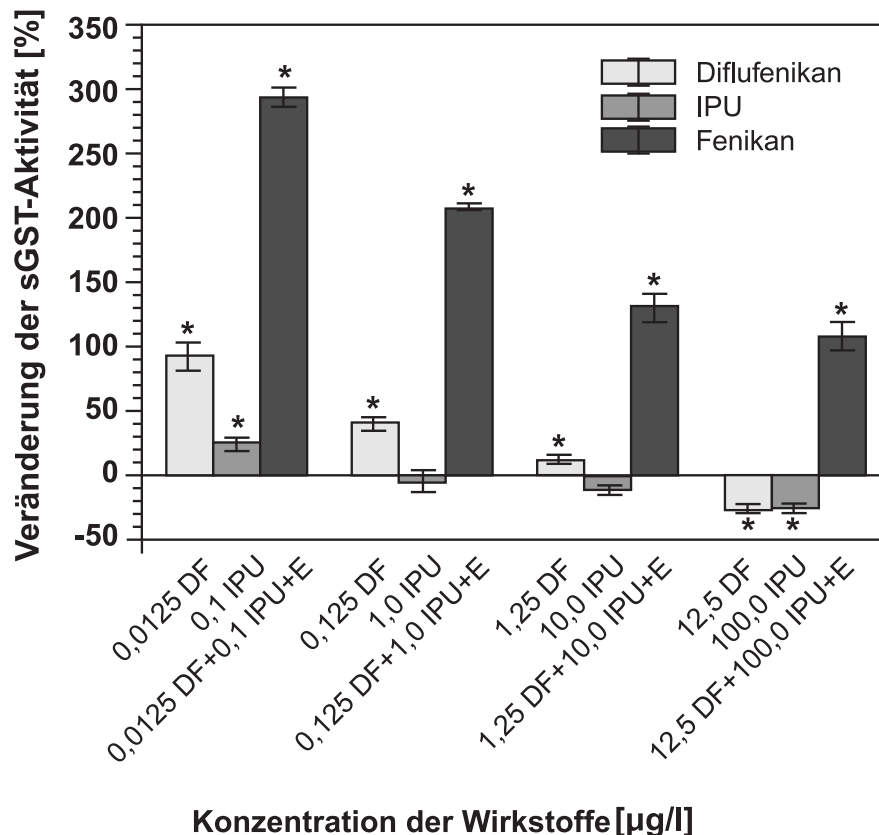
Neben den im Folgenden beschriebenen Wirkungen des Cypermethrins auf die mit CDNB bestimmten GST-Isoenzyme waren auch gegenüber dem Modellsubstrat Fluorodifen Veränderungen der GST-Aktivitäten messbar.

Abb. 18b: Relative Aktivierung der sGST der Larven von *R. arvalis* infolge der 24 h-Belastung mit Diflufenikan (DF), Isoproturon (IPU) und dem handelsüblichen Herbizid FENIKAN®, das aus DF, IPU und Emulgatoren (E) besteht
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat Fluorodifen

5.4.2.1 Wirkstoffe

5.4.2.1.1 Cypermethrin

Jede Cypermethrin-Exposition der Larven von *B. variegata* rief sowohl in der mikrosomalen als auch in der cytosolischen Enzymfraktion signifikant erhöhte GST-Aktivitäten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen hervor. Konzentrationen von 0,1 µg/l Cypermethrin bewirkten einen maximalen Anstieg der sGST auf 9,6 nkat/mg Protein, das entsprach einer Steigerung um 251% gegenüber der Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen nahm die sGST wieder ab, lag aber weiterhin deutlich über den Werten der Kontrolle. Nach der Behandlung von *R. arvalis* Larven mit 0,01 und 0,1 µg/l Cypermethrin waren die GST-Aktivitäten beider Enzymfraktionen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die sGST stieg bis auf 2,7 nkat/mg Protein bei einer Konzentration von 0,1 µg/l Cypermethrin und war gegenüber der Kontrolle um 54% erhöht. Bei Konzentrationen von 1 µg/l Cypermethrin wurden während der Exposition die typischen cypermethrin-induzierten Verhaltensänderungen beobachtet, die GST-Aktivitäten sanken bis etwa auf das Niveau der Kontrolle. Bei 10 µg/l Cypermethrin war eine weitere drastische Abnahme der Enzymaktivität zu verzeichnen (Publ. III).



Die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Enzymantwort auf die Belastung der Larven von *B. variegata* mit Cypermethrin ergaben, dass die sGST-Aktivität mit der Zeit kontinuierlich bis auf 15,4 nkat/mg Protein nach 6 h zunahm. Dies entsprach einer Steigerung um 388 % gegenüber der Kontrolle. Nach 24stündiger Exposition sank die sGST-Aktivität deutlich auf 10,6 nkat/mg Protein (Abb. 19a, Publ. III). Die Aktivität der mGST war durch geringere Veränderungen gekennzeichnet, jedoch gegenüber der Kontrolle meist signifikant erhöht (Publ. III).

Die sGST-Aktivität der Larven von *R. arvalis* stieg nach 2stündiger Belastung mit 0,1 µg/l Cypermethrin signifikant auf 3,5 nkat/mg Protein, was gegenüber der Kontrolle eine Zunahme um 66 % bedeutete (Abb. 19a, b).

Im weiteren Verlauf nahm die sGST drastisch ab, sodass nach 48 h nur noch 1/4 des Wertes der Kontrolle erreicht wurde (Abb. 19a). Die mGST nahm mit zunehmender Belastungsdauer ab und war nach 48 h nicht mehr messbar.

Im Vergleich der Reaktion der verschiedenen Amphibienspezies auf die Dauer der Cypermethrinbelastung wiesen die Larven von *B. variegata* deutlich höhere sGST-Aktivitäten auf als *R. arvalis*, obwohl sich die Aktivitätswerte der Kontrollen nur geringfügig unterschieden. Larven von *R. arvalis* erreichten früher ihre maximale Biotransformationsleistung. Anschließend nahm die sGST-Aktivität ab und fiel bis unter die Werte der Kontrolle, während die Enzymaktivität der sGST bei *B. variegata* auch nach 24stündiger Cypermethrinbelastung gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht blieb (Abb. 19a, b).

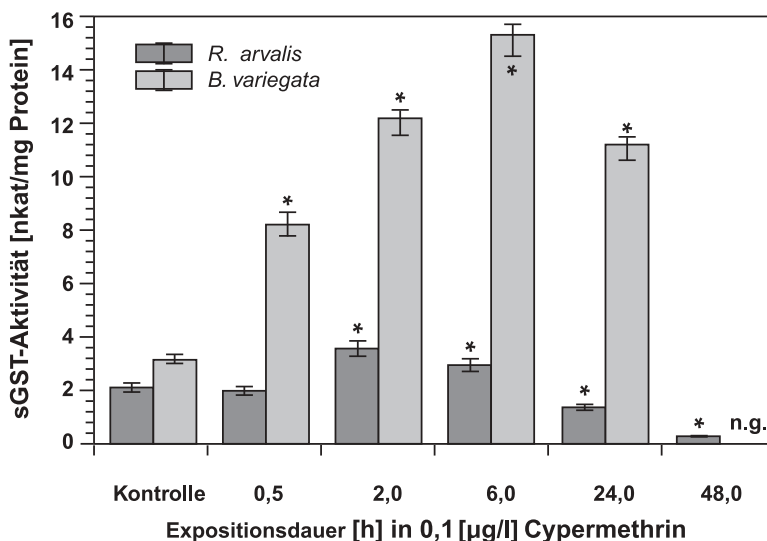


Abb. 19a: Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* in Abhängigkeit von der Dauer der Belastung mit 0,1 µg/l Cypermethrin; *B. variegata* nach 48 h nicht getestet
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

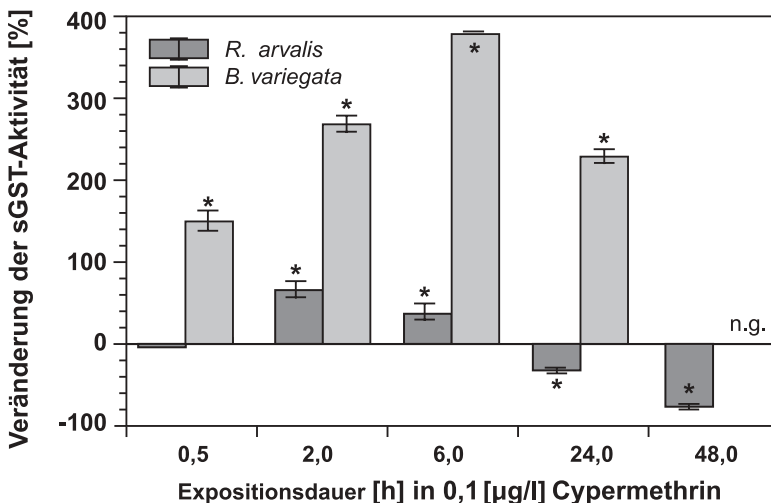


Abb. 19b: Relative Enzymaktivierung in *R. arvalis* und *B. variegata* in Abhängigkeit von der Dauer der Belastung mit 0,1 µg/l Cypermethrin; *B. variegata* nach 48 h nicht getestet
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

5.4.2.1.2. α -Cypermethrin

Jede α -Cypermethrin-Belastung verursachte im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte sGST-Aktivitäten in Larven von *R. arvalis*. Nach Exposition in 0,1 und 1 $\mu\text{g/l}$ α -Cypermethrin wurden Maxima von 9,8 nkat/mg Protein erreicht, was Steigerungsraten von 210% gegenüber den Kontrollen entsprach. Im Vergleich zur sGST war die mGST durch geringere Veränderungen gekennzeichnet, war jedoch gegenüber der Kontrolle stets signifikant erhöht (Publ. III).

Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Belastung der Larven von *R. arvalis* ergaben, dass die sGST-Aktivitäten nach 24- und 48stündiger Exposition in α -Cypermethrin signifikant erhöht waren – z. B. bis auf 11,6 nkat/mg Protein nach 48 h, was gegenüber den Kontrollen eine Zunahme um 111% bedeutete (Abb. 20a, b). Im Vergleich zum Cypermethrin reagierten die Larven von *R. arvalis* auf die Belastung mit α -Cypermethrin deutlich später mit erhöhten GST-Aktivitäten. Während nach 48stündiger Exposition in Cypermethrin die Enzymaktivität der Larven bereits signifikant verringert war, konnte kein Absinken der sGST bei der Behandlung mit α -Cypermethrin über 48 h verzeichnet werden (Abb. 20a, b).

Abb. 20a: Enzymaktivierung in Larven von *R. arvalis* in Abhängigkeit von der Dauer der Belastung mit 0,1 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin bzw. α -Cypermethrin
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modells substrat CDNB

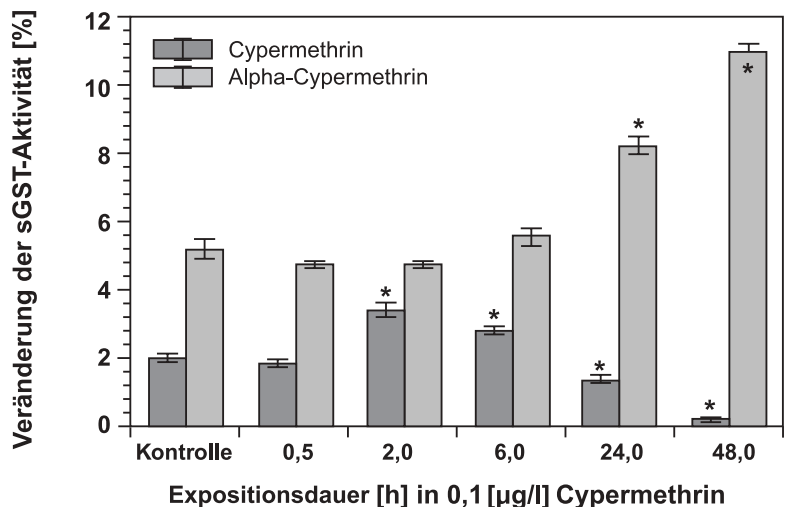
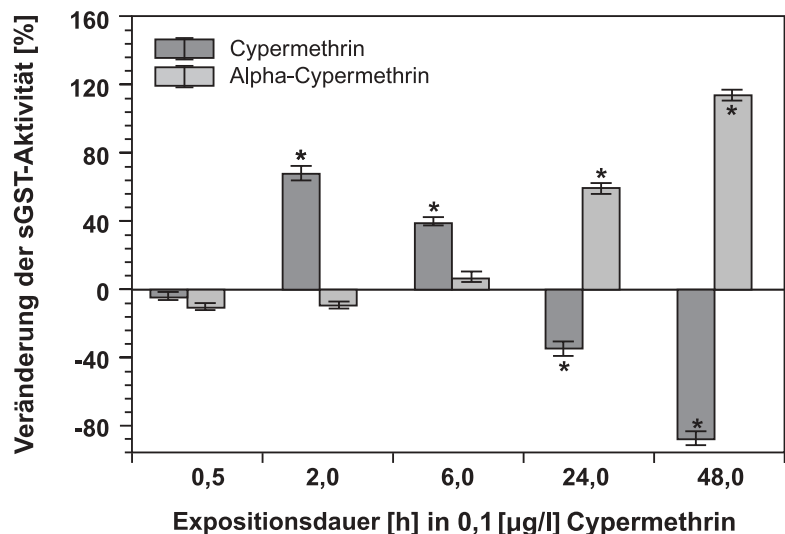


Abb. 20b: Relative Enzymaktivierung in Larven von *R. arvalis* in Abhängigkeit von der Dauer der Belastung mit 0,1 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin bzw. α -Cypermethrin.
* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modells substrat CDNB.



5.4.2.2 Handelsprodukt

5.4.2.2.1 FASTAC SC®

Jede Belastung der Larven von *B. variegata* mit FASTAC SC® verursachte eine signifikante Erhöhung der sGST-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle. Maximalwerte von 22,7 nkat/mg Protein wurden nach der Exposition in 0,01 µg/l α-Cypermethrin in FASTAC SC® festgestellt (Abb. 21a). Signifikante Veränderungen der mGST traten bei Konzentrationen von 0,01; 0,1 und 1 µg/l α-Cypermethrin in FASTAC SC® auf.

Bei Konzentrationen von 0,01 µg/l α-Cypermethrin in FASTAC SC® stieg die sGST Aktivität der Larven von *R. arvalis* signifikant auf ein Maximum von 4,1 nkat/mg Protein, was einer Steigerung um 131 % gegenüber der

Kontrolle entsprach. Bei höheren Konzentrationen wurde eine stufenweise Abnahme bis unter die Werte der Kontrolle bei 10 µg/l beobachtet (Publ. III, Abb. 21a, b).

Beim Vergleich der Reaktion der verschiedenen Amphibienspezies auf identische Konzentrationen von FASTAC SC® fällt die deutlich höhere sGST-Aktivität der Larven von *B. variegata* auf. Da dies auch im unbelasteten Zustand der Kontrollen schon zu verzeichnen war, fiel bei Konzentrationen von 0,01 µg/l α-Cypermethrin in FASTAC SC® die Steigerungsrate der sGST der Larven gegenüber der Kontrolle bei *R. arvalis* mit 131 % deutlich höher aus als bei *B. variegata* mit 58 %. Bei beiden getesteten Amphibienarten nahmen die GST-Aktivitäten der Larven bei Konzentrationen von 0,1 und 1 µg/l α-Cypermethrin in FASTAC SC® wieder ab (Abb. 21a, b).

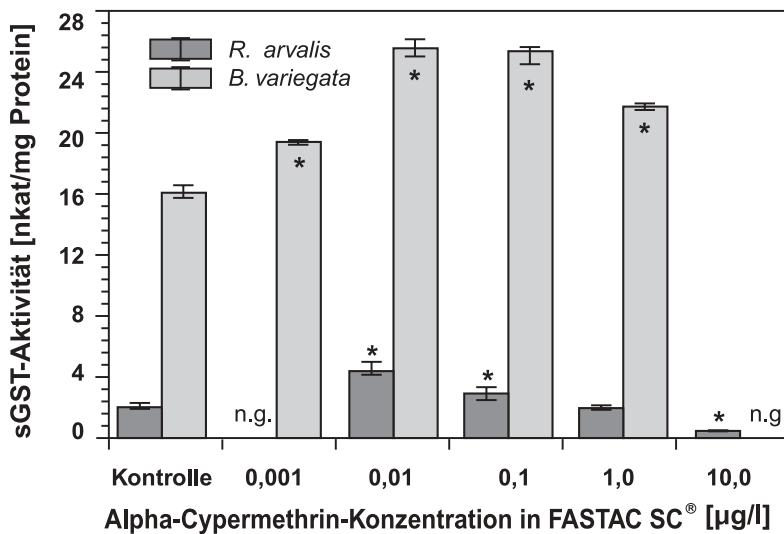


Abb. 21a: Enzymaktivierung in Larven von *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit FASTAC SC®

n. g. – nicht getestet

* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

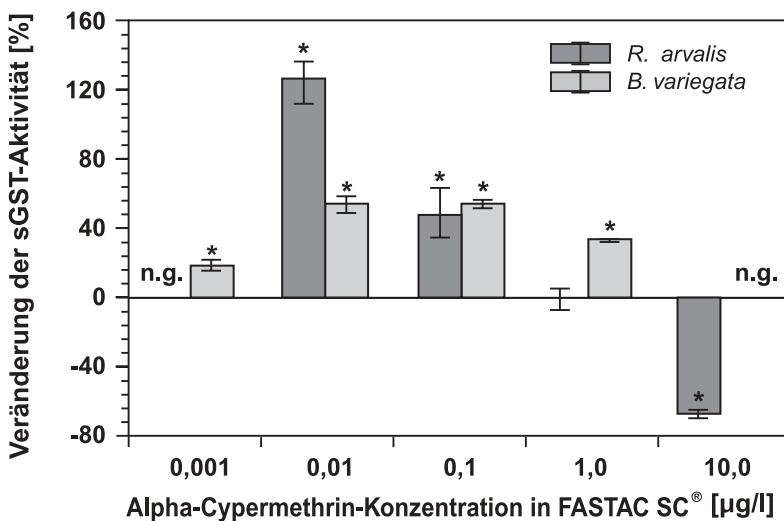


Abb. 21b: Relative Enzymaktivierung in Larven von *R. arvalis* und *B. variegata* infolge der Belastung mit FASTAC SC®

n. g. – nicht getestet

* – signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; Modellsubstrat CDNB

6.1 Freilanduntersuchungen

Der Eintrag von Pflanzenschutzmitteln in die Kleingewässer der Agrarlandschaften ist abhängig von den gewählten Applikationstechniken, Boden- und Reliefbedingungen sowie Niederschlägen und der Existenz von Drainagen. Obwohl der Bewirtschafter der Versuchsfäche den Maßgaben ordnungsgemäßer landwirtschaftlicher Praxis folgte – insbesondere die geforderte Distanz zum Wasserkörper zur Verminderung der Sprühabdrift einhielt – wurden beide Pestizidwirkstoffe im Untersuchungsgewässer nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Studie an einem Kleingewässer ohne schützenden Pufferstreifen gemessenen Freilandkonzentrationen von maximal 22 µg/l IPU und 0,094 µg/l α-Cypermethrin sind durchaus mit Literaturangaben vergleichbar. So wiesen SPITELLER et al. (2000) in Oberflächenwässern, die landwirtschaftlich genutzten Flächen benachbart waren, 24 µg/l IPU nach. GARFORTH & WOODBRIDGE (1984) fanden in einem Graben, der direkt an die behandelte Fläche grenzte, unmittelbar nach der Applikation von FASTAC EC® (15 g Wirkstoff/ha) aus der Luft bis zu 0,6 µg/l α-Cypermethrin und 4 Tage nach der Ausbringung des Insektizides bis zu 0,02 µg/l des Wirkstoffes. In der hier vorgelegten Studie wurde α-Cypermethrin ebenfalls schnell adsorbiert und/oder abgebaut. Es konnte nur zum Probenahmetermin 24 h nach der Applikation an mehreren Stellen im Gewässer nachgewiesen werden. MAUND et al. (2002) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass ungefähr 99 % des Cypermethrins innerhalb von 24 h an suspendiertes partikuläres Material gebunden wurden. Weiterhin mineralisieren die Spaltprodukte des Cypermethrins – Phenoxybenzoesäure (PBA) und Cyclopropancarboxylsäure (CPA) – sehr rasch (WHO, 1989).

Verlauf und Funktionstüchtigkeit der Drainagen im Untersuchungsgebiet sind unklar. Da das Gewässer an der Probenahmestelle 1 (Publ. I) am tiefsten ist (ca. 1,8 m) und dort jeweils die höchsten Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen wurden, ist zu vermuten, dass an diesem Punkt eine Drainage einmündet. Die gute Wasserlöslichkeit des IPU (65 mg/l) ermöglicht den verstärkten Eintrag dieses Stoffes über Drainagen in die

Kleingewässer. Die Gefahr der Auswaschung von IPU während des ersten Regenereignisses nach der Applikation ist besonders groß (BROWN et al., 1995). So fanden JOHNSON et al. (1995) nach Niederschlägen bis zu 290 µg/l IPU im Drainagewasser und bis zu 110 µg/l IPU in Runoff-Proben. Aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften ist das Adsorptionsvermögen von IPU an der Bodenmatrix nur gering. So kann IPU mit der Wasserbewegung in tiefere Bodenschichten verlagert werden. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Bodens und vor allem von den Niederschlägen (Menge und Intensität) wurde IPU ca. 1 Monat nach der Applikation in bis zu 2,2 m tiefen Bodenschichten nachgewiesen (GEISELHART, 1994). Die Halbwertszeiten von IPU differierten in Abhängigkeit von Bodenbeschaffenheit, -feuchtigkeit und Temperatur zwischen 20 und 85 d (BLAIR et al., 1990). Berücksichtigt man diese speziellen Stoffeigenschaften, so sind sowohl das im Rahmen der vorliegenden Studie gemessene Konzentrationsmaximum nach dem ersten Starkregenereignis als auch der Nachweis von IPU 10 Wochen nach der Applikation zu verstehen.

Aufgrund der hohen IPU-Konzentrationen, die auch in Oberflächen- und Grundwässern in Deutschland gemessen wurden, erfolgte seit 1999 eine Verschärfung der Zulassungsbedingungen für IPU-haltige Produkte seitens der zuständigen Behörden. Die Abstandsaufgaben bei der Applikation wurden bis auf 20 m erhöht und der Katalog der anwendungsbeschränkenden Auflagen vervollständigt. So dürfen IPU-Produkte z. B. auf sandigen und tonigen Böden nicht mehr appliziert werden, die Anwendung auf drainierten Flächen ist im Zeitraum zwischen Anfang Juni und Anfang März untersagt und spezielle Anforderungen müssen bei Hangneigung der zu behandelnden Flächen in Richtung der Gewässer von mehr als 2 % beachtet werden.

Zur Minderung des Eintrages beider Wirkstoffe in die Reproduktionsgewässer sensibler Amphibienarten sollten bewachsene Pufferstreifen um die Gewässer angelegt werden. PATTY & GRIL (1995) beschrieben, dass während einer einjährigen Vegetationsperiode 98 % des von einem Weizenfeld stammenden Isoproturons durch einen 11 m breiten, bewachsenen Pufferstreifen zurückgehalten wurden. Da Cypermethrin in

Böden nur eine geringe Mobilität aufwies (KAUFMAN et al., 1981), könnte mit Hilfe von Uferandstreifen die Cypermethrin-Kontamination der Gewässer vermindert werden.

Neben dem Eintrag von Pflanzenschutzmitteln sind Ackerhohlformen in ihrer Funktion als Senken zum Einzug des Oberflächenwassers und der Mündung von Drainagen auch verstärktem Nährstoffimport von umliegenden Agrarflächen ausgesetzt, was sich in einer starken Eutrophierung der Kleingewässer niederschlägt. Das im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchte Gewässer schien im Frühjahr hinsichtlich der hydrochemischen Verhältnisse sowie der Vegetationsstrukturen eine ausreichende Qualität aufzuweisen, um von den Amphibien als Reproduktionshabitat oder Trittssteinbiotop auf dem Weg zu anderen Gewässern im Untersuchungsgebiet genutzt zu werden.

Berücksichtigt man, dass nur ein Teil des Gewässers während der Frühjahrsanwanderung der Amphibien umzäunt war, belegten die Anzahl der gefangenen Individuen (2398) und das vielfältige Artenspektrum die Bedeutung des Untersuchungsgewässers als Laichhabitat. Eine ähnliche Vergesellschaftung der Arten mit starker Dominanz von Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*) und Moorfrosch (*Rana arvalis*) – wie in der hier vorgelegten Studie – beschrieben BERGER et al. (1999) für eine intensiv landwirtschaftlich genutzte Grundmoräne in Ostbrandenburg.

6.2 Aufnahme der Pestizidwirkstoffe

Mit Hilfe von ¹⁴C-markierten Pestizidwirkstoffen wurde der Nachweis der Aufnahme der Substanzen in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen (1 µg/l IPU bzw. 0,4 µg/l Cypermethrin) in den Laich der drei untersuchten Amphibienarten (*B. bombina*, *B. variegata* und *R. arvalis*) erbracht. Dabei absorbierte die Gallerthülle des Laichs jeweils nur einen geringen Wirkstoffanteil und bot dem Embryo keinen Schutz vor dem Einfluss der Pestizide. Diese ungenügende physische Barriere beschrieben einige Autoren unter Nutzung anderer Pflanzenschutzmittel auch für Fische (HASHIMOTO et al., 1982; WIEGAND et al., 2000). Aufgrund der im Vergleich zu den Kontrollen unverminderten

Schlupfrate des Laichs nordamerikanischer Amphibienarten nach Exposition in Endosulfan bzw. Tebufenozid und einer ungestörten weiteren Entwicklung der Larven schlussfolgerten BERRILL et al. (1998) sowie PAULI et al. (1999), dass die den Embryo umgebende Gallerthülle auch eine Schutzfunktion gegenüber dem Einfluss dieser Pestizide ausübte. Es ist zu vermuten, dass diese Schutzfunktion in Abhängigkeit von den getesteten Amphibienarten und den untersuchten Pestiziden unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Im Rahmen der hier vorgelegten Studie nahm Laich von *R. arvalis* Cypermethrin in stärkerem Maße auf als *B. variegata*. Dieser Unterschied scheint artspezifisch zu sein, da gleiche Entwicklungsstadien getestet wurden. Die aus hydratisierten Glycoproteinen bestehenden Gallerthüllen des Laichs wiesen selbst zwischen sehr eng verwandten Arten – wie *Bombina bombina* und *Bombina variegata* (COPPIN et al., 2003) – deutliche strukturelle Unterschiede auf.

In der Gegenüberstellung der getesteten Pestizidwirkstoffe sind stärkere Absorptionsraten des Cypermethrins – sowohl im Laich als auch in den Larven – mit der höheren Lipophilie dieser Substanz im Vergleich zum IPU zu erklären. Vergleicht man die Aufnahme der unterschiedlichen Wirkstoffe in Larven von *B. variegata*, reicherte sich Cypermethrin weitaus stärker (Faktor 10) in den Kaulquappen an (maximaler Konzentrationsfaktor 41,6) als IPU (maximaler Konzentrationsfaktor 4,5). Aufgrund der Differenz der K_{OW} -Werte beider Wirkstoffe um vier Zehnerpotenzen (Tab.1) wäre ein stärkerer Unterschied der Anreicherung von Cypermethrin und IPU in Larven von *B. variegata* zu erwarten gewesen. Da im Rahmen der vorliegenden Studie die Aufnahme der getesteten Wirkstoffe in Laich und Larven der Amphibien unter umweltrelevanten Bedingungen geprüft werden sollte, wurden Konzentrationen getestet, die weit unterhalb der maximalen Löslichkeiten der Substanzen lagen (Tab.1). Aufgrund der geringen Expositionskonzentrationen konnten Eliminierungs- und Metabolisierungsvorgänge in stärkerem Maße die Anreicherung der Pestizidwirkstoffe in den Amphibienlarven beeinflussen. Ein Indiz für die verstärkte Metabolisierung der Pestizidwirkstoffe sind die gegenüber den Kontrollen deutlich erhöhten GST-Aktivitäten der Larven von *B. variegata*. So stieg die sGST bei der Belastung der Larven mit 1 µg/l IPU um 114 %, bei Belastung mit 0,1 µg/l Cypermethrin um 251 %. MCLEESE et al.

(1980) berechneten nach 12- bis 96stündiger Exposition von Lachsen in 1,4 - 12,0 µg/l Cypermethrin Konzentrationsfaktoren im Bereich zwischen 2,6 und 7,1 und verwiesen auf starke Metabolisierung und Elimination des Cypermethrins in den getesteten Fischen.

Die Expositionszeiten bis zum Erreichen der Akkumulationsmaxima in den Larven von *B. variegata* unterschieden sich gravierend. Während die IPU-Aufnahme über den gesamten betrachteten Zeitraum von 48 h erfolgte, wurde Cypermethrin von *B. variegata* hauptsächlich in den ersten 6 h der Exposition akkumuliert. Eine rasche Aufnahme des Cypermethrins in den Organismus und die darauf folgende Elimination beschrieben auch CROSSLAND et al. (1978) für die Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus*) in Freilandgewässern. Ähnliche Ergebnisse wurden im Rahmen der hier vorgelegten Studie für Larven von *R. arvalis* ermittelt. Im zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Cypermethrin wurde nach 2stündiger Exposition maximale Akkumulation und anschließend fast vollständige Elimination festgestellt, was sich in der Zunahme des parallel bestimmten Gehaltes an ¹⁴C-markiertem Material im Expositionsmedium ausdrückte. Die Diffusionsvorgänge über die Membranen hinweg und die Anreicherung in lipophilen Zellkompartimenten scheinen reversibel zu sein.

Die Exposition des Amerikanischen Sonnenbarsches (*Lepomis macrochirus*) über 28 d in 0,19 µg/l ¹⁴C-markiertem Cypermethrin ergab eine Maximalkonzentration von 80 µg Cypermethrin/kg Fisch, was einem BCF von 444 entsprach (US EPA, 1999). Im Rahmen der hier vorgelegten Studie wurde ein maximaler Konzentrationsfaktor von 439 nach 2stündiger Cypermethrin-Exposition von *R. arvalis* berechnet, wobei der Gehalt in den Larven 261 ng Cypermethrin/g Frischgewicht betrug.

6.3 Toxizität

Während die Schlupfraten von *R. arvalis* durch umweltrelevante IPU-Konzentrationen signifikant beeinträchtigt wurden, war bei Exposition in α-Cypermethrin ein verminderter Schlupferfolg erst bei Überschreitung der Umweltkonzentrationen zu verzeichnen. Bei beiden Schadstoffen bewirkten die Expositionen keine Verzögerung des Schlupfes, beeinträchtigten aber Morphologie und Verhalten der Larven.

Für das Pyrethroid Permethrin beschrieben BERRILL et al. (1993), dass sich nach Exposition von Laich des Grünfrosches (*Rana clamitans*) die Schlupfraten nicht von den Werten der Kontrollen unterschieden, die Larven nach dem Schlupf allerdings signifikant kleiner waren und langsamer wuchsen als die unbelasteten Probanden sowie Verhaltensänderungen aufwiesen. Die Autoren vermuteten dadurch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Prädatoren. Verminderte Schlupfraten von 96 und 95 % stellten DHAWAN & KAUER (1996) nach Belastung des Laiches von *Cyprinus carpio* mit 0,01 und 0,1 µg/l Cypermethrin fest. Die geschlüpften Larven wiesen morphologische Veränderungen (z. B. Verkrümmungen der Wirbelsäule) und Verhaltensabnormalitäten auf. Es wurde vermutet, dass eine Blockade des Energietransfer-Systems (z. B. Hemmung der Respiration) diese Deformationen und Entwicklungsanomalien letztlich verursachte (WESTERNHAGEN, 1988).

Bisher wurden signifikante Effekte von Pestiziden auf Metamorphose, Wachstum, Verhalten und besonders Mortalität von Amphibien meist erst bei Überschreitung der umweltrelevanten Konzentrationsbereiche nachgewiesen (BRIDGES, 1997; PAULI et al., 1999). Für Diuron – ein dem Isoproturon verwandtes Phenylharnstoffherbizid – registrierten SCHUYTEMA & NEBEKER (1998) adverse Effekte auf Wachstum und Überlebensraten von vier getesteten Amphibienarten (*Hyla regilla*, *Rana aurora*, *Rana catesbeiana*, *Xenopus laevis*) bei Konzentrationen von 7,6 bis 30 mg/l Diuron. Diese Konzentrationen überschreiten die umweltrelevanten Belastungen im Freiland um ein Vielfaches. Da im Rahmen der hier vorgelegten Studie jedoch bei umweltrelevanten Konzentrationen von IPU – sowohl als reiner Wirkstoff als auch in Form von TOLKAN FLO® – physische Deformationen und Verhaltensabnormalitäten bei Larven von *B. variegata* auftraten, kann die Larvalentwicklung der Amphibien durch den IPU-Eintrag in die Reproduktionsgewässer beeinträchtigt werden. So ist z. B. die Vitalität paralysierter Amphibienlarven beträchtlich reduziert, da das natürliche Fluchtverhalten der Kaulquappen vor Prädatoren gestört ist (BERRILL et al., 1994). Die Literaturrecherche ergab, dass bisher keine Daten zu sublethalen oder lethalen Wirkungen von IPU auf Anurenlarven publiziert wurden. Ciliaten

scheinen die empfindlichsten aquatischen Nichtzielorganismen zu sein, die bisher untersucht wurden. TRAUNSPURGER et al. (1996) fanden verminderte Wachstumsraten von *Tetrahymena pyriformis* bei 700 µg/l IPU.

Im Gegensatz zu PLÖTNER (1998), der darauf hinwies, dass Larven von *Rana esculenta* unmittelbar nach dem Schlupf am empfindlichsten auf Umweltchemikalien reagierten, zeigten die IPU-Untersuchungen, dass die Larven von *B. variegata* im Entwicklungsstadium 24/25 – bei dem die Opercularfalte der Larven erscheint und die äußeren Kiemen allmählich überwachsen – die höchste Sensitivität aufwiesen. Auch PAULI et al. (1999) beschrieben, dass etwa zwei Wochen alte Larven im Gosner-Stadium 25 bei allen vier untersuchten nordamerikanischen Amphibienarten besonders empfindlich auf die Belastung mit Endosulfan reagierten. Auf die Summation bestimmter Stresssymptome im Stadium 40 führten HOWE et al. (1998) die stärkere Sensitivität der Larven von *Rana pipiens* und *Bufo americanus* gegenüber der Belastung mit Atrazin und Alachlor im Vergleich zum Stadium 29 zurück. Die Sensitivität einzelner Entwicklungsstadien der Amphibien gegenüber Pestiziden scheint in Abhängigkeit von den geprüften chemischen Substanzen und den getesteten Arten sehr stark zu differieren.

Adverse Effekte von α -Cypermethrin auf die frühen Lebensstadien von Fischen stellte STEPHENSON (1983) für Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) bei Konzentrationen von 0,09 µg/l fest. Da die Sensitivität der aquatischen Entwicklungsstadien von Amphibien den frühen Lebensstadien der Fische vergleichbar ist (BERRILL & BERTRAM, 1997), könnten im Untersuchungsgewässer gemessene Konzentrationen von 0,094 µg/l α -Cypermethrin durchaus entwicklungshemmend auf die frühen Larvalstadien der Amphibien wirken. Weiterhin verursachten umweltrelevante α -Cypermethrin-Konzentrationen signifikante Abundanzrückgänge bei verschiedenen Gruppen aquatischer Arthropoden, einschließlich Käfer-, Chironomiden- und Zooplanktonarten (GARFORTH & WOODBRIDGE, 1984). Auch wenn sich diese Dezimierungen aufgrund des Abbaus des α -Cypermethrins im Gewässer und der Lebenszyklen der Invertebraten in vier bis sieben Wochen relativ rasch regenerierten (PEARSON, 1990), sind Wirkungen auf das Nahrungsspektrum adulter Amphibien nicht auszuschließen.

Die während der α -Cypermethrin-Expositionen im Rahmen der vorgelegten Studie beobachteten Verhaltensänderungen der Larven von *R. arvalis* entsprachen den typischen Vergiftungserscheinungen der cyanidhaltigen Pyrethroide (Typ II), die u.a. COLE & CASIDA (1983) sowie BERRILL et al. (1993) für die Larven einiger nordamerikanischer Amphibienarten beschrieben. Zuckende Bewegungen der sich krümmenden und windenden Larven weisen auf eine Störung der Signalübermittlung hin, die durch die Dauererregung von Nervenfasern bedingt und mit einer Überempfindlichkeit gegenüber sensorischen Reizen verbunden ist (BRADBURY & COATS, 1989; ALDRIDGE, 1990). Ähnlich wie die Larven von *R. arvalis* in der hier vorgelegten Studie reagierten Kaulquappen von *Rana blairi* und *Rana sphenoccephala* auf die Belastung mit 1,3 - 4,8 µg/l Esfenvalerat – einem weiteren Pyrethroid des Typs II – mit Spasmen, krampfartigen Drehungen sowie Zuckungen von Körper und Schwanz (MATERNA et al., 1995). Diese abnormen Verhaltensmuster erhöhen die Prädationsgefahr durch die verminderte Fähigkeit der Larven sich zu verstecken oder zu flüchten. Lähmungserscheinungen der Larven von *Rana temporaria* stellte auch PAULOVA (1990) nach Exposition in 1 µg/l Cypermethrin fest.

Während bei der α -Cypermethrin-Exposition des Laichs von *R. arvalis* über 48 h die Schlupfraten verringert waren (siehe Kapitel 5.3.1.2), wurde der Schlupferfolg durch 24stündige Belastung nur im EGG/EM-Stadium gemindert. Die Expositionsdauer scheint auch bei Pyrethroiden ein entscheidender beeinträchtigender Faktor zu sein.

Erhöhte Mortalitätsraten der Larven von *R. arvalis* traten während der Untersuchung der verschiedenen Entwicklungsstadien sowohl bei Langzeitexpositionen von IPU als auch von α -Cypermethrin auf. Es ist bekannt, dass Konzentrationen, die während einer akuten Exposition sublethal wirken, nach chronischer Exposition lethale Effekte hervorrufen können. Dies stellte auch BRIDGES (2000) für die Wirkung von Carbaryl auf *Rana sphenoccephala* fest.

Während die Behandlungen mit IPU nur im EM-Stadium Deformationen und Verhaltensänderungen der Larven hervorriefen, waren bei der α -Cypermethrin-Exposition mit Ausnahme des EGG-Stadiums alle anderen getesteten Entwicklungsstadien davon betroffen. Wenn

die Larven – die während ihrer Embryonalentwicklung den Wirkstoffen ausgesetzt waren – erfolgreich schlüpfen, wurden im weiteren Entwicklungsverlauf keine Deformationen und Verhaltensabnormitäten registriert. Wirkstoffkontaminationen in späteren Entwicklungsstadien hingegen riefen – vor allem bei α -Cypermethrin – morphologische Schädigungen und Verhaltensänderungen hervor. Dies könnte auf die fortgeschrittene Entwicklung des Nervensystems der älteren Larven zurückzuführen sein, da Pyrethroide die Funktion der Natrium- und Kaliumkanäle des Nervengewebes beeinträchtigen. Auch BERRILL et al. (1993) fanden, dass ältere Embryonen von *Rana clamitans* empfindlicher auf Pyrethroidexpositionen reagierten als jüngere Entwicklungsstadien.

Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin, die in Freilanduntersuchungen keine beeinträchtigenden Wirkungen auf Amphibien verursachten (BENNETT et al., 1980), riefen während der im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Laboruntersuchungen Deformationen und Verhaltensabnormitäten der Larven hervor. Diese Unterschiede können aufgrund der Adsorption des Cypermethrins an suspendiertem Material, Sediment oder Makrophyten im Freiland interpretiert werden. Für Regenbogenforellen beschrieb REIFF (1978), dass Cypermethrin, welches Wasserproben von Freilandgewässern zugesetzt wurde, – im Vergleich zur Zugabe zu mikrofiltriertem Leitungswasser – eine verminderte Toxizität aufwies. Da die Fischtoxizität von Pyrethroiden durch Wasserhärte und pH-Wert des Expositionsmediums nicht beeinflusst wird (MAUCK et al., 1976), ist die verminderte Toxizität für die Regenbogenforellen vermutlich auf die Adsorption des Cypermethrins an suspendiertem Material des Probenwassers aus dem Freiland zurückzuführen.

Nach Beendigung der IPU-Expositionen erholten sich die Larven im Laufe ihrer weiteren Entwicklung, so dass am Ende der Metamorphose keine Deformationen und Verhaltensabnormitäten zu verzeichnen waren. Im Gegensatz dazu konnten sich die Kaulquappen nach den α -Cypermethrin-Behandlungen nicht regenerieren und starben. Auch Larven von *Rana pipiens*, die während der Exposition in Esfenvalerat (cyanohaltiges Pyrethroid vom Typ II) krampfartige Verhaltensmuster zeigten, starben anschließend (MATERNA et al., 1995).

Im Vergleich der im Rahmen der vorgelegten Studie getesteten Wirkstoffe zeigten die infolge der α -Cypermethrin-Behandlungen aufgetretenen morphologischen Schädigungen und Verhaltensänderungen nachhaltige Wirkungen.

Ebenso wie bei IPU reagierten die Larven in den meisten untersuchten Entwicklungsphasen auch auf die α -Cypermethrin-Belastung mit einer beschleunigten Entwicklung. Die Kaulquappen metamorphosierten 5 bzw. 7 d früher. Larven, die mit α -Cypermethrin behandelt wurden, waren am Ende der Metamorphose signifikant kleiner. Unvorteilhafte Umweltbedingungen beschleunigten die Larvalentwicklung und verursachten eine frühere Metamorphose der Amphibien. Dies stellte auch BRIDGES (2000) für die Wirkung von Carbaryl auf verschiedene Entwicklungsstadien der Larven von *Rana sphenoccephala* fest, die metamorphosierten Jungtiere waren ebenfalls deutlich kleiner.

Im Rahmen der vorgelegten Studie wurde bei Langzeitexposition der Larven von *R. arvalis* (EGG/EM/TAD Stadium) in α -Cypermethrin eine Verzögerung der Metamorphose festgestellt. BRIDGES (2000) fand, dass Larven von *Rana sphenoccephala*, die während ihrer gesamten Larvalentwicklung in Carbaryl exponiert waren, später metamorphosierten. Die Kaulquappen reagierten auf diese chronische Exposition mit Entwicklungsverzögerungen. Ähnliche Wirkungen wie sie α -Cypermethrin in der hier vorgelegten Studie auf Larven von *R. arvalis* ausübte – z. B. verspätete Metamorphose, geringere Metamorphoseraten, Wachstumsverzögerungen und neurotoxische Wirkungen – beschrieb PAULOV (1990) für Cypermethrin-Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/l}$ und eine weitere europäische Amphibienart – den Grasfrosch (*Rana temporaria*). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Unterschiede in der Metamorphosedauer aufgrund der Kontamination der Amphibien mit Pflanzenschutzmitteln von einer Vielzahl von Faktoren wie den konkreten Umweltbedingungen, Temperatur, Individuendichte, untersuchten Entwicklungsstadien und Expositionszeit abhängen.

Aufgrund der Pestizidbelastung waren gravierende Veränderungen der linearen Beziehung von Gewicht und Länge der metamorphosierten Jungtiere im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen, was sich sowohl bei Belastung mit 100 $\mu\text{g/l}$ IPU als auch mit 1 $\mu\text{g/l}$ α -Cypermethrin in einem deutlich verminderten Anstieg der

Regressionsgeraden ($y = ax + b$) äußerte. Am Beispiel des IPU sei noch einmal erläutert, dass bei nahezu identischen Schnittpunkten mit der y-Achse ($b_{\text{Kontrolle}} = 7,65$; $b_{100\mu\text{g/l IPU}} = 7,67$) und signifikant verschiedenen Regressionskoeffizienten (Geradenanstieg $a_{\text{Kontrolle}} = 17,3$; $a_{100\mu\text{g/l IPU}} = 12,47$) die IPU-Belastungen eine stärkere Gewichtszunahme verursachten, die sich aber nicht in einem entsprechenden Längenwachstum der Jungtiere bis zum Ende der Metamorphose niederschlug. Möglicherweise wurde diese Gewichtszunahme durch Ödeme verursacht. Körperschwellungen und Deformationen des Kopfes sowie des Darmsystems wurden bereits während bzw. unmittelbar nach den IPU-Expositionen der Larven beobachtet (Publ. I). Auf Ödembildung bei 3 nordamerikanischen Amphibienarten infolge der Belastung mit Atrazin wiesen ALLRAN & KARASOV (2001) hin. Vergleichbar den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie verursachte eine 20tägige Belastung mit 5 mg/l IPU bei zwei getesteten Fischarten (*Rosbora deniconius* und *Poecilia reticulata*) geringe Veränderungen der Körperlänge aber eine Zunahme des Gewichtes der Tiere um bis zu 15 % (RANA & KUMAR, 1995).

6.4 Biotransformation

6.4.1 Isoproturon

Sowohl *B. bombina* als auch *B. variegata* waren in der Lage, IPU mit Hilfe der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (Phase I der Biotransformation) zu metabolisieren, da die typischen Metaboliten nach HAAS (1997) und GLÄRGEN et al. (1999) in beiden Arten nachgewiesen wurden. Diese Metaboliten wiesen reaktive, elektrophile Zentren zur Konjugation von GSH auf.

In Abhängigkeit von den Belastungskonzentrationen und der Expositionsdauer verursachten sowohl der reine Wirkstoff als auch die handelsüblichen Herbizide Veränderungen der Aktivität der GST-Enzyme bei beiden getesteten Amphibienarten. Im Vergleich zu *R. arvalis* reagierten die Larven von *B. variegata* meist mit deutlich höheren Enzymaktivitäten auf die Belastungen mit IPU bzw. TOLKAN FLO® (Tab.12).

Bei Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/l}$ IPU wies die GST der Larven von *B. variegata* zunächst nur eine geringe Aktivitätssteigerung um 4 % gegenüber der Kontrolle auf. Der Biotransformationsprozess des Isoproturons über das GSH/GST-System schien bei diesen Konzentrationen erst allmählich zu beginnen. Dies belegte auch

Tab. 12: Zusammenstellung der Veränderung der GST-Aktivität [%] gegenüber den entsprechenden Kontrollen nach der Exposition der Larven von *B.variegata* bzw. *R. arvalis* in Isoproturon und TOLKAN FLO® Kontrolle entspricht 0 %; die jeweils höheren Werte sind fettgedruckt

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Expositionszeit [h]	Veränderung der GST-Aktivität [%]	
			<i>Bombina variegata</i>	<i>Rana arvalis</i>
Isoproturon	0,1	24	3,6	33
	1,0		114	-57
	10,0		139	-51
	100,0		128	-38
TOLKAN FLO®	0,1	24	49	-36
	1,0		84	-37
	10,0		124	-37
	100,0		61	-25
	1000,0		-48	

der hohe Anteil toter (15%) und deformierter (12%) Larven (Tab. 13). Konzentrationen von 1 und 10 µg/l sowohl des reinen Wirkstoffes als auch im TOLKAN FLO® bewirkten Steigerungen der sGST-Aktivitäten von *B. variegata* um bis zu 139% im Vergleich zur Kontrolle. Das GST-Enzymsystem schien maximal aktiviert zu sein, die Summe der beeinträchtigten und toten Tiere lag nahezu konstant bei 41–45%. Dabei waren jedoch qualitative Unterschiede zwischen den Wirkungen einzelner IPU-Konzentrationen zu verzeichnen. Die Anzahl der toten Individuen sank mit zunehmender GST-Aktivität bis auf 8%. Dies ist ein Indiz dafür, dass die lethalen Effekte des IPU durch den Biotransformationsprozess gemindert wurden. Der Anteil der deformierten Larven nahm allerdings zu. Wie bereits im Kapitel 6.3 beschrieben, konnten sich die nach Expositionen in IPU deformierten Larven jedoch im Laufe ihrer weiteren Entwicklung bis zum Ende der Metamorphose meist regenerieren.

Bei *R. arvalis* waren die GST-Aktivitäten bei geringen IPU-Konzentrationen von 0,1 µg/l zunächst signifikant erhöht, sanken aber bei Konzentrationen von $\geq 1,0$ µg/l IPU deutlich ab. Dies bestätigte sich sowohl für die mit CDNB als auch mit Fluorodifen bestimmten Isoenzyme (vgl. Abb. 16b und Abb. 18b). Möglicherweise verhinderte die stärkere GST-Aktivierung bei Konzentrationen von 0,1 µg/l IPU eine Schädigung der Larven von *R. arvalis*, denn es wurden keine beeinträchtigten oder toten Individuen verzeichnet. Bei höheren Konzentrationen war die GST inhibiert. In Abhängigkeit von der IPU-Konzentration nahm der Anteil deformierter bzw. toter Larven von *R. arvalis* zu (Tab.13).

Beim Vergleich der Reaktion beider getesteter Amphibienspezies fällt auf, dass die Larven von *B. variegata* trotz stärkerer GST-Aktivierung höhere Verluste hinnehmen mussten als *R. arvalis*. Da die GST-Aktivität der Larven von *R. arvalis* mit Ausnahme der geringsten Testkonzentration inhibiert war, sind bei dieser Art eventuell andere Mechanismen effizienter an der Biotransformation des IPU bzw. an der Reparatur entstandener Schädigungen der Larven beteiligt. In der Literatur gab es keine Hinweise darauf, dass neben der GST andere konjugierende Enzyme in den IPU-Metabolismus involviert sind. Möglicherweise bestehen Unterschiede in der Aktivierung des P-450 Monooxygenasesystems. Auf artspezifische Differenzen hinsichtlich der mikrosomalen Proteingehalte in der Leber sowie der Aktivität der Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen zwischen verschiedenen Amphibienarten wiesen NO-SHIRO & OMURA (1984) hin. Im Vergleich zu *Rana catesbeiana* und *Bufo bufo* wies *Xenopus laevis* deutlich geringere Cytochrom P-450 Werte und deshalb auch niedrigere Oxidationsraten z. B. für Benzo[a]-pyren und 7-Ethoxycoumarin auf.

Bei der Exposition von *B. variegata* in TOLKAN FLO® verursachten Konzentrationen von 10 und 100 µg/l IPU maximale Enzymantworten. Bei höheren IPU-Konzentrationen (1000 µg/l), war die Biotransformation limitiert. Die Larven waren nicht in der Lage, so hohe Belastungen zu tolerieren. Aufgrund dessen wurde das Versuchsprogramm für *R. arvalis* modifiziert und Konzentrationen von 1000 µg/l IPU an dieser Art nicht getestet.

Tab. 13: Veränderung der GST-Aktivität [%] (Kontrolle entspricht 0%) sowie prozentualer Anteil der deformierten bzw. toten Individuen nach der Exposition der Larven von *B. variegata* bzw. *R. arvalis* in Isoproturon

Isoproturon Konzentration [µg/l]	<i>Bombina variegata</i>				<i>Rana arvalis</i>			
	Δ GST [%]	Deformation [%]	Mortalität [%]	Summe [%]	Δ GST [%]	Deformation [%]	Mortalität [%]	Summe [%]
0,1	4	12	15	27	34	0	0	0
1	114	30	11	41	-57	10	0	10
10	139	37	8	45	-51	33	0	33
100	123	30	12	42	-40	10	10	20

Während bei *R. arvalis* keine GST-Werte für die Konjugationen mit DCNB bestimmt werden konnten, waren bei *B. variegata* GST-Isoenzyme mit allen drei Modellsubstraten (CDNB, DCNB, Fluorodifen) messbar, was auf artspezifische Unterschiede hindeutet. Die mit CDNB gemessenen Isoenzymaktivitäten waren besonders hoch, was sich dadurch erklärt, dass die meisten sGST-Isoenzyme – mit Ausnahme der θ -Klasse – in die Konjugation von CDNB eingebunden sind (GEORGE, 1994). Die im Vergleich der Substrate niedrigen Aktivitäten, die mit DCNB gemessenen wurden, wiesen darauf hin, dass die entsprechenden Isoenzyme nur in geringerem Umfang in die Biotransformation der getesteten Wirkstoffe involviert sind. Im Gegensatz zu PFLUGMACHER & STEINBERG (1997), die bei verschiedenen Makrophyten und limnischen Algen Fluorodifen-Konjugationen nur in den cytosolischen Enzymfraktionen feststellten, waren bei den Amphibienlarven mGST- und sGST-Aktivitäten mit dem Modellsubstrat Fluorodifen messbar. Für die sGST ist bekannt, dass die Substratspezifität nicht auf einzelne Isoenzyme begrenzt ist, sondern Überlappungen zeigt (EATON & BAMMLER, 1999). Möglicherweise ist es im Fall der mGST der Amphibienlarven ähnlich und die mGST katalysiert neben der Konjugation von CDNB auch die des Fluorodifens an GSH.

Über die GST von Amphibien ist bisher nur wenig bekannt. In Lebergewebe von *Xenopus laevis* wurden neben einer mGST mehrere sGST-Isoenzyme analysiert, die Ähnlichkeit mit den μ -, α - und ζ -Klasse der GST von Säugern aufwiesen (ANGELUCCI et al., 2002). Die sGST, die aus dem Lebergewebe von *Bufo bufo* isoliert wurde, zeigte Ähnlichkeit mit der π -Klasse der Säuger-GST. Jedoch wiesen DELUNA et al. (2002) Unterschiede im Spektrum der Substratspezifitäten zwischen Fröschen und Säugern für die μ -Klasse der GST nach: die aus der Leber von *Xenopus laevis* isolierte GST der μ -Klasse konjugierte das Modellsubstrat CDNB weniger effektiv als die entsprechende GST von Säugetieren. Offensichtlich besteht auf diesem Gebiet noch erheblicher Forschungsbedarf, um die konstitutive Enzymausstattung der Amphibien weiter aufzuklären.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zeigen, dass identische IPU-Konzentrationen und Expositionszeiten bei beiden getesteten Amphibienarten unterschiedliche Aktivitäten der GST-Isoenzyme hervorriefen.

Die GST-Isoenzyme reagierten also artspezifisch verschieden auf gleiche Belastungen. Sowohl bei *R. arvalis* als auch bei *B. variegata* waren die Wirkungen der IPU-Belastung auf das GST-Enzymsystem bereits bei Konzentrationen bzw. Expositionszeiten messbar, bei denen weder Deformationen noch Verhaltensabnormitäten auftraten. Somit kann die GST als biochemischer Indikator für die Belastung der Amphibienlarven mit Isoproturon genutzt werden.

Im Vergleich zum reinen Wirkstoff Isoproturon waren die GST-Aktivitäten der Larven von *B. variegata* nach der Behandlung mit dem Handelsprodukt TOLKAN FLO® meist vermindert. So wäre in diesem Falle den Formulierungssubstanzen (Emulgatoren) eine inhibierende Wirkung auf die GST-Isoenzyme zuzuschreiben. Da die Mechanismen chemischer Wechselwirkungen in Stoffgemischen nicht aufgeklärt sind (HOWE et al., 1998), unterstreicht dies die Notwendigkeit neben den Wirkstoffen auch die ökotoxischen Effekte der eigentlich umweltrelevanten Handelsprodukte auf Nichtzielorganismen zu untersuchen. Eine Vielzahl von Faktoren – wie Aufnahmezeitpunkt der Wirkstoffe, Metabolisierung, Dispersion und Exkretion der Stoffe – kann in Stoffgemischen im Vergleich zu den Einzelkomponenten verändert sein. MARKING (1977) wies auf eine mögliche Inhibierung der Biotransformation in Stoffgemischen hin.

Vergleicht man analog der Vorgehensweise beim TOLKAN FLO® die Effekte des reinen Wirkstoffes IPU und des Handelsproduktes FENIKAN® auf die Enzymaktivität, so rief das handelsübliche Herbizid in diesem Fall eine starke Aktivierung der GST hervor – das reine IPU hingegen inhibierte die GST meist. Neben den Emulgatoren und IPU ist im FENIKAN® als weiterer Wirkstoff Diflufenikan enthalten. Diese Substanz bewirkte – mit Ausnahme der getesteten Höchstkonzentration – bei den Larven von *R. arvalis* ebenfalls eine Aktivierung der sGST-Isoenzyme. Summiert man die Effekte, die die einzelnen Wirkstoffe auf die sGST-Aktivität ausübten, und vergleicht mit den Wirkungen des Handelsproduktes FENIKAN®, ist den Formulierungssubstanzen des handelsüblichen Herbizides eine stark aktivierende Wirkung auf die GST-Isoenzyme zuzumessen. Dies könnte auf die Effekte der Emulgatoren zurückzuführen sein, die in der Formulierung des Herbizides vorhanden

sind. Emulgatoren erhöhen die biologische Verfügbarkeit der Wirkstoffe und ermöglichen eine optimale Applikation. Auch das handelsübliche Herbizid Roundup 360 erwies sich im Vergleich zum darin enthaltenen Wirkstoff Glyphosat für die Larven von *Litoria moorei* als weitaus toxischer (BIDWELL & TYLER, 1997). Toxische Wirkungen von Formulierungssubstanzen und Detergentien auf Amphibien beschrieben PLÖTNER & GÜNTHER (1987) für *Rana esculenta* sowie MANN & BIDWELL (1999) für vier australische Amphibienarten.

6.4.2 Cypermethrin

Die substratspezifischen GST-Isoenzyme der untersuchten Amphibienlarven reagierten in Abhängigkeit von den Belastungskonzentrationen (Cypermethrin, α -Cypermethrin, FASTAC SC®) und der Expositionsdauer mit signifikanten Änderungen der Enzymaktivitäten. So ist zu vermuten, dass die Biotransformation von Cypermethrin in Amphibienlarven über das GST-System funktioniert. Nachweise, dass die GST-Enzyme in den

Metabolismus von Cypermethrin involviert sind, liegen für einige Arthropoden vor – z.B. für die Deutsche Schabe (*Blattella germanica*) (VALLES, 1998), die Wolfsspinne (*Pardosa amentata*) (NIELSEN et al., 1999) oder die Strandkrabbe (*Carcinus maenas*) (GOWLAND et al., 2002). In der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zeigte die GST-Aktivität dosisabhängig einen signifikanten Anstieg, der bei einer Belastung mit 0,87 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin sein Maximum erreichte (DAVIES et al., 1994). Ein konkreter Nachweis eines Glutathion-Konjugates existiert bisher nur für das Pyrethroid Tetramethrin (SMITH et al., 1982).

Vergleicht man die Enzymantworten beider getesteter Amphibienarten auf identische Belastungen (Expositionskonzentration und -dauer), reagierten – mit Ausnahme der Belastung von 0,01 $\mu\text{g/l}$ α -Cypermethrin im FASTAC SC® – die Larven von *B. variegata* mit deutlich höheren GST-Aktivitäten bzw. Steigerungsraten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen als Larven von *R. arvalis* (Tab. 14).

Tab. 14: Zusammenstellung der Veränderung der GST-Aktivität [%] gegenüber den entsprechenden Kontrollen nach der Exposition der Larven von *B. variegata* bzw. *R. arvalis* in Cypermethrin, α -Cypermethrin und FASTAC SC®
Kontrolle entspricht 0%; die jeweils höheren Werte sind fettgedruckt

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Expositionszeit [h]	Veränderung der GST-Aktivität [%]	
			<i>Bombina variegata</i>	<i>Rana arvalis</i>
Cypermethrin	0,001 0,01 0,1 1,0 10,0	24	64	
			115	30
			251	54
			54	2,4
				-95
	0,1	0,5 2 6 24 48	153	-3
			275	66
			388	38
			234	-33
				-88
α -Cypermethrin	0,01 0,1 1,0 10,0		170	
			209	
			212	
			140	
FASTAC SC®	0,001 0,01 0,1 1,0 10,0	24		21
			58	131
			57	50
			36	-0,5
				-70

Die stärkere Aktivierung der GST in *B. variegata* weist auf einen intensiveren Biotransformationsprozess dieser Art hin. Betrachtet man neben den Wirkungen auf die GST-Aktivität auch die toxischen Effekte der Cypermethrinbelastungen für die Larven, wird offensichtlich, dass der Anteil deformierter bzw. toter Individuen bei *B. variegata* deutlich geringer war als bei *R. arvalis* (Tab. 15). So traten bei umweltrelevanten Cypermethrinkonzentrationen von 0,1 µg/l und maximaler Steigerung der GST-Aktivität um 251 % bei 28 % der Larven von *B. variegata* Deformationen und Verhaltensabnormitäten auf. Wurden hingegen Larven von *R. arvalis* in 0,1 µg/l Cypermethrin exponiert, nahm die GST-Aktivität um lediglich 54 % zu. 40 % der Larven wiesen Deformationen auf, die Mortalität betrug 20 %. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Biotransformation des Cypermethrins über die GST-katalysierte Konjugation an Glutathion die toxischen Wirkungen des Pyrethroids auf die Amphibienlarven verminderte. Das galt allerdings nur bis zu bestimmten maximalen Dosen, wie die Ergebnisse bei Konzentrationen von 1 µg/l Cypermethrin für *B. variegata* bzw. 10 µg/l Cypermethrin für *R. arvalis* belegten. Die GST-Aktivitäten waren deutlich reduziert bzw. inhibiert und dementsprechend stiegen die Mortalitätsraten auf 38 % bzw. 90 %. Möglicherweise war die GST selbst direkt geschädigt oder andere Schädigungen der Zelle führten zu einer Dysfunktion der GST, infolgedessen die toxischen Wirkungen dominierten.

Beim Vergleich der beiden getesteten Pyrethroidwirkstoffe wurde festgestellt, dass α-Cypermethrin dosisabhängig stärkere Enzymantworten induzierte als Cypermethrin (Tab.14). So rief bei Larven von *R. arvalis*

eine 24stündige Belastung mit 0,1 µg/l α-Cypermethrin einen Anstieg der sGST-Aktivität auf das Dreifache – die identische Cypermethrin-Konzentration hingegen auf das Anderthalbfache der entsprechenden Kontrollen hervor. α-Cypermethrin ist eine Mischung der beiden cis-Isomere, die die insektizide – also neurotoxische – Wirkung verursachen, während in Cypermethrin neben diesen beiden cis-Isomeren noch 2 weitere cis- und 4 trans-Isomere vorhanden sind. COLE & CASIDA (1983) zeigten, dass die cis-Isomere des Cypermethrins toxischer auf Adulten von *Rana pipiens* und Larven von *Rana catesbeiana* wirkten als dessen trans-Isomere. Da bei Wirkstoffkonzentrationen von 0,1 µg/l α-Cypermethrin die GST-Aktivität der Larven signifikant erhöht war (um 209 % gegenüber der Kontrolle), ist zu vermuten, dass der Wirkstoff über das GSH/GST-System metabolisiert wurde und seine toxischen Wirkungen nicht entfalten konnte. Morphologische Schädigungen und Verhaltensabnormitäten der Larven traten verstärkt bei Expositionen in 10 µg/l Wirkstoff auf. Bei dieser Konzentration war die GST-Aktivität bereits deutlich vermindert, die Biotransformation des α-Cypermethrins eingeschränkt und daraus die zunehmende toxische Wirkung der Substanz erklärbar. Das GST/GSH-Enzymsystem ist bei höheren Pyrethroidkonzentrationen vermutlich geschwächt. Betrachtet man die Abhängigkeit der Enzymantworten von der Expositionsdauer, konnte im Vergleich der beiden Wirkstoffe festgestellt werden, dass die Larven von *R. arvalis* das lipophilere Cypermethrin rascher aufnahmen als α-Cypermethrin.

Tab. 15: Veränderung der GST-Aktivität [%] (Kontrolle entspricht 0 %) sowie prozentualer Anteil der deformierten bzw. toten Individuen nach der Exposition der Larven von *B. variegata* bzw. *R. arvalis* in Cypermethrin

Cypermethrin Konzentration [µg/l]	<i>Bombina variegata</i>				<i>Rana arvalis</i>			
	Δ GST [%]	Deformation [%]	Mortalität [%]	Summe [%]	Δ GST [%]	Deformation [%]	Mortalität [%]	Summe [%]
0,001	64	0	0	0				
0,01	115	7	0	7	30	0	0	0
0,1	251	28	0	28	54	40	20	60
1	54	0	38	38	3	40	20	60
10					-95	0	90	90

Die sGST der Larven von *R. arvalis* wurde bei der Belastung mit reinem α -Cypermethrin stärker aktiviert als durch die entsprechenden FASTAC SC®-Konzentrationen. Im Vergleich zum reinen Wirkstoff bewirkten bei der Exposition der Kaulquappen in FASTAC SC® geringere Konzentrationen (0,01 $\mu\text{g/l}$ α -Cypermethrin) bereits maximale Enzymaktivität. Möglicherweise waren die Formulierungssubstanzen des Handelsproduktes für diese Effekte verantwortlich. Die unterschiedlichen Wirkungen verschiedener, handelsüblicher α -Cypermethrin-Präparate auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) beschrieb SHIRES (1983). Das Emulsionskonzentrat erwies sich etwa 30fach toxischer als Suspensionskonzentrate, Puder oder Mikrokapseln. Diese erhöhte Toxizität der Emulsionskonzentrate bestätigte STEPHENSON (1987) auch für Karpfen (*Cyprinus carpio*).

Schon geringe Cypermethrin-Konzentrationen von 0,001 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin riefen bei den Larven von *B. variegata* einen signifikanten Anstieg der Enzymantwort (mGST) hervor, obwohl weder im Verhalten noch in den morphologischen Kriterien der Larven Veränderungen sichtbar waren. Die Daten belegen, dass das GST-Enzymsystem ein empfindlicher biochemischer Indikator für die Belastung der Amphibienlarven mit Cypermethrin ist.

Die aufgrund der Cypermethrinbelastung erhöhten GST-Werte deuten auf Aktivierung und Intensivierung der Biotransformationsprozesse in den Amphibienlarven hin, sodass die toxische Wirkung des Pestizidwirkstoffes durch Metabolisierung und Ausscheidung aus dem Organismus vermindert werden konnte.

Generell – vor allem auch in Anbetracht der IPU-Ergebnisse – bleibt jedoch festzuhalten, dass allein aus den Veränderungen der GST-Aktivität keine Voraussagen zur Überlebenschance der Organismen im Ökosystem ableitbar sind. Es besteht kein monokausaler Zusammenhang, da das Verhältnis zwischen den Biotransformationsprozessen einerseits und den toxischen Wirkungen der Fremdstoffe im Organismus andererseits von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. So sind die Effekte z.B. von den speziellen Substanzeigenschaften (Spezifität der Wirkung im Organismus, physiko-chemische Eigenschaften, Metabolisierungsrate usw.), konkreten Umweltbedingungen und vor allem von den Energiereserven der Organismen abhängig.

6.5 Energetische Betrachtung

Zur Aktivierung der GST werden große Mengen an Stoffwechselenergie benötigt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde für verschiedene Belastungsszenarien festgestellt, dass bei Wirkstoffkonzentrationen und Expositionszeiten, die maximale GST-Aktivitäten der Larven hervorriefen, bereits erste deformierte und tote Kaulquappen zu verzeichnen waren. So reagierten z. B. Larven von *B. variegata* auf Belastungen von 0,1 $\mu\text{g/l}$ Cypermethrin mit einer maximalen Steigerung der GST-Aktivität um 251 % gegenüber den Werten der Kontrolle, jedoch wiesen 28 % der exponierten Larven Deformationen und Verhaltensabnormalitäten auf. So ist zu vermuten, dass die für Abbau- und Exkretionsprozesse (Biotransformation der Pestizidwirkstoffe) zur Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichtes verwendete Energie, dann für andere Lebensvorgänge der Amphibienlarven nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. WESTERNHAGEN (1988) beschrieb, dass Deformationen und Entwicklungsanomalien durch eine Blockade des Energieallokation zugunsten der Biotransformationsprozesse kann vor allem bei einer Pestizidbelastung während der Embryonalphase die weitere Entwicklung der Amphibien beeinträchtigen. So führte z.B. die Exposition des Laiches von *Rana perezi* mit dem Organophosphat Methylparathion zu Skelettdeformationen bei den metamorphosierten Jungtieren (ALVAREZ et al., 1995). Verhaltensabnormalitäten und Schwanzdeformationen traten bei Larven von *Microhylya ornata* auf, die während ihrer Embryonalentwicklung in Carbofuran exponiert waren (PAWAR & KATDARE, 1984). Auch Laichexpositionen mit Herbiziden wie Atrazin bewirkten Deformationen bei drei nordamerikanischen Amphibienarten (ALLRAN & KARASOW, 2001).

Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Daten belegen einerseits, dass die untersuchten Pestizidwirkstoffe die Gallerthülle des Laiches passierten und eine Kontamination des Embryos stattfand sowie andererseits die negativen Wirkungen der Laichexposition für die weitere Entwicklung bis zur Metamorphose (verminderte Schlupfraten, Deformationen, abnormales Schwimmverhalten, Wachstumsverzögerungen). Da die Amphibienlarven während der gesamten Embryonalentwicklung und auch in den ersten Tagen nach

dem Schlupf ausschließlich von ihren begrenzten Dottervorräten zehren können, wirkt sich ein zusätzlicher Energieverbrauch – wie z.B. zur Biotransformation – besonders negativ auf den Gesamtenergiehaushalt aus. Erst ab dem Entwicklungsstadium 24 (GOSNER, 1960) sind die Kaulquappen aufgrund der vollständigen Entwicklung der Hornleisten im Mund sowie des Verdauungssystems in der Lage, selbständig Nahrung aufzunehmen und Energieverluste zu kompensieren.

Ein weiteres Indiz für die Verschiebungen im Energiehaushalt der Larven von *R. arvalis* aufgrund der Belastung mit α -Cypermethrin waren die signifikant kleineren Jungtiere am Ende der Metamorphose. Vermutlich investierten die Larven ihre Energiereserven einestheils in die Biotransformation des α -Cypermethrin (Steigerung der GST-Aktivität um bis zu 200 %) und andererseits in die Beschleunigung der Wachstumsprozesse (Verkürzung der Metamorphosedauer um bis zu 7 Tage). Dabei nahmen sie offensichtlich ein vermindertes Längenwachstum in Kauf, um die kontaminierten aquatischen Habitaten möglichst bald – wenn auch nicht in optimaler körperlicher Verfassung – verlassen zu können.

Wenn die GST zur Biotransformation von Fremdstoffen – neben ihren Funktionen im endogenen Stoffwechsel der Organismen – durch Xenobiotika induziert bzw. die vorhandene Enzymaktivität gesteigert wird, kann dies die Energiereserven der Organismen entscheidend dezimieren. Dies gilt insbesondere für die Larvalphase der Amphibien, da sich die Kaulquappen noch in der Entwicklung befinden und für Metamorphose, Organbildung und Perfektionierung der Körperfunktionen größere Energiemengen benötigen.

Veränderungen der Energieallokation haben nicht nur Konsequenzen für den einzelnen Organismus, sondern können auch auf Populationsebene wirken, wenn z.B. nicht genügend reproduktionsfähige Individuen vorhanden sind oder aufgrund mangelnder körperlicher Fitness der Adulti die Anzahl und/oder Fekundität der Eier vermindert ist.

Bilanzierend ist zu bedenken, dass auch Fremdstoffkonzentrationen, die keine lethalen Wirkungen bei den Larven hervorrufen, durch Biotransformationsprozesse deren Energiehaushalt belasten. Unter Freilandbedingungen kann aufgrund der Summation verschiedener

Stressfaktoren (z.B. weiterer Fremdstoff, Parasiten, Krankheitserreger) die Widerstandsfähigkeit der Larven gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen deutlich eingeschränkt sein. So können geringe, ansonsten sublethale Wirkungen einer weiteren Komponente lethalen Effekte hervorrufen.

6.6 Management

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass umweltrelevante Konzentrationen der getesteten Pestizide die Laich- und Larvalentwicklung der einheimischen Amphibien sowohl direkt beeinträchtigten, was sich in erhöhter Mortalität, Deformationen und Verhaltensabnormalitäten widerspiegelte, als auch indirekt beeinflussten, indem die Biotransformation der Schadstoffe vermutlich den Energiehaushalt der Larven veränderte. Um eine erfolgreiche Reproduktion der Amphibien und damit den Erhalt der Populationen in den Agrarlandschaften zu gewährleisten, muss der Eintrag der Pestizide in die Gewässer dezimiert werden.

Eine Minimierung des Eintrags kann durch die Anlage bewachsener Pufferstreifen mit einer Mindestbreite von 20 m um die Gewässer erreicht werden. Aufgrund der hohen Wasserführung der Kleingewässer im Frühjahr und dem geforderten Abstand der Sprühfahrzeuge bei der Applikation der Pflanzenschutzmittel sind die erzielten Erträge in den Uferbereichen der Gewässer ohnehin stark gemindert. Münden allerdings Drainagen der landwirtschaftlichen Nutzflächen in die Kleingewässer, kann die Wirksamkeit dieser Pufferstreifen in Abhängigkeit von den Stoffeigenschaften der Xenobiotika dezimiert sein. In diesen Gebieten ist der integrierte Pflanzenschutz als Weiterentwicklung der bisher gültigen „guten fachlichen Praxis bei der Applikation von Pflanzenschutzmitteln“ zu favorisieren, der auch die Anwendung aller kulturtechnisch praktikablen biologischen (u.a. nicht-chemischen) Maßnahmen zur Vorbeugung und Minderung der Ertragsschäden einbezieht. Auf Grünland sollte die flächenhafte Anwendung von Pestiziden generell unterbleiben.

Dabei bildet die viel zitierte Agrarwende, die umweltverträgliche Produktion von Nahrungsmitteln und nachwachsenden Rohstoffen, Extensivierung und ökologischen Landbau anstrebt, den Rahmen zur Verwirklichung dieser Vorschläge. Finanzielle Unterstützung zur Honorierung ökologischer Leistungen bieten auf nationaler Ebene von Bund und Ländern getragene Förderprogramme, wie z. B. das Kulturlandschaftsprogramm oder Vereinbarungen im Rahmen des Vertragsnaturschutzes und auf europäischer Ebene die EU-Strukturfonds sowie die Agenda 2000.

Mit der Agenda 2000 der Europäischen Union wurden Voraussetzungen geschaffen, die Gemeinsame Agrarpolitik der EU zu reformieren, indem der „ersten Säule“, die die traditionelle Markt- und Preispolitik mit Instrumenten wie Tier- und Flächenprämien oder Direktzahlungen umfasst, eine „zweite Säule“ zur Entwicklung des ländlichen Raumes hinzugefügt wurde. Deren Instrumentarien sind Modulation und Cross-compliance (VAY et al. 2002).

Im Jahr 2003 wird die Modulation in Deutschland erstmalig erprobt, d. h. dass Direktzahlungen aus der Markt- und Preispolitik oberhalb eines betrieblichen Freibetrages von 10000 Euro um 2 % gekürzt werden. So können pro Jahr 64 Mio. Euro freigesetzt werden, die durch nationale Mittel in Höhe von 31 Mio. Euro aufgestockt werden (VAY et al. 2002). Dieses Geld soll zur Finanzierung von Umwelt- und Ausgleichsmaßnahmen (flankierende Maßnahmen), darunter auch Agrarumweltmaßnahmen und Ausgleichszahlungen, in den von umweltspezifischen Einschränkungen betroffenen Gebieten (z. B. FFH-Gebiete) eingesetzt werden.

In Hinsicht auf den EU-Beitritt der mittel- und osteuropäischen Staaten, die über umfassende und wertvolle Naturpotentiale verfügen, müssen die Kapazitäten zur Finanzierung von Umwelt- und Naturschutzmaßnahmen innerhalb der ländlichen Entwicklungspolitik ausgebaut werden und die zweite Säule der Agrarpolitik in Zukunft mehr Gewicht erhalten. So wiesen HAUGWITZ & SCHNUG (2000) am Beispiel des EU-Beitrittskandidaten Polen darauf hin, dass mit der Einführung des Modells der westeuropäischen intensiven Landwirtschaft die bisher vergleichsweise intakte Natur und große Artenvielfalt Polens bedroht wäre. Modernisierung und Ausweitung der Produktion allein genügen nicht, um eine nachhaltige Entwicklung der ländlichen Räume zu garantieren. Die Maßnahmenkataloge und Förderinstrumente der EU sind den spezifischen Gegebenheiten der Beitrittsländer anzupassen.

Die Tatsache, dass mit der Politik für ländliche Räume in der zweiten Säule der Agrarpolitik nicht marktfähige Leistungen im Bereich Naturschutz und Landschaftspflege direkt honoriert werden, ist für die Entwicklung der Landwirtschaft ebenso wie für die Erhaltung von Kultur und Landschaft von richtungweisender Bedeutung.

- 1) Bei der Verknüpfung der im Freiland gemessenen Wirkstoff-Konzentrationen der applizierten Pflanzenschutzmittel mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur enzymatischen und toxischen Wirkung der Pestizide wird deutlich, dass bei umweltrelevanten Schadstoffkonzentrationen ein Gefährdungspotential für Amphibienlarven besteht.
- 2) Auch wenn im Rahmen der Zulassungsprüfung versucht wurde, die möglichen beeinträchtigenden Wirkungen vollständig abzuklären, können sich bei der praktischen Anwendung im Freiland ungünstige Effekte auf Nichtzielorganismen der Flora und Fauna herausstellen. So erwiesen sich umweltrelevante IPU-Konzentrationen für Amphibien gefährlicher als sich auf der Basis der im Zulassungsverfahren getesteten Fischtoxizitäten vermuten ließ. Deshalb sind Untersuchungen zu Verhalten und Wirkung der Pestizide unter realen Freilandbedingungen unverzichtbar. Bei Verdachtsmomenten – wie hier im Fall der Amphibien – sollten weitere Spezies, die über den Umfang der Routineprüfung hinausgehen, getestet werden.
- 3) Die Aufnahmestudien zeigen, dass die untersuchten Pestizidwirkstoffe sowohl von Laich als auch von Larven der Amphibien absorbiert wurden. Dabei sind Unterschiede in der Aufnahmekinetik sowohl artspezifisch begründet als auch von den Stoffeigenschaften (Lipophilie, Metabolisierung) abhängig. Beim Laich bot die den Embryo umgebende Gallerthülle keinen Schutz vor der Pestizidkontamination.
- 4) Die getesteten Wirkstoffkonzentrationen riefen verschiedene toxische Effekte bei den Amphibien hervor (verminderte Schlupfraten des Laiches, Verhaltensabnormitäten, morphologische Veränderungen, Verzögerung oder Verkürzung der Metamorphose). Dabei wurden Unterschiede in der Sensitivität einzelner Arten und Entwicklungsstadien der Amphibien verzeichnet.
- 5) Das GST-Enzymsystem der Amphibien ist in die Biotransformation der untersuchten Pestizide involviert, da die Wirkstoffbelastung in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer die GST-Aktivität der Larven beeinflusste. Die Daten belegen, dass das GST-Enzymsystem der untersuchten Amphibienarten ein sensibler biochemischer Marker für die Belastung der Larven mit IPU bzw. Cypermethrin in umweltrelevanten Konzentrationen ist. In Konzentrationsbereichen, in denen keine direkten toxischen Wirkungen der Pestizide auf die Amphibienlarven festgestellt wurden, reagierte die GST-Aktivität der Larven mit signifikanten Veränderungen.
- 6) Für diese Abbau- und Exkretionsprozesse (Biotransformation der Xenobiotika) zur Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichtes müssen die Amphibienlarven genügend Energie aufbringen, die dann anderen Lebensvorgängen nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. Dieser Energieaufwand könnte Stagnationen im weiteren Verlauf der Entwicklung (Verlängerung der Metamorphose, verzögertes Wachstum, eingeschränkte Mobilität) verursachen und eine allgemeine Reduktion der Fitness herbeiführen.
- 7) Da die toxischen Wirkungen teilweise bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen auftraten und die getesteten Amphibienarten gemäß der Roten Liste der gefährdeten Arten der Bundesrepublik Deutschland in die Kategorien „stark gefährdet“ bzw. „vom Aussterben bedroht“ einzuordnen sind, besteht Handlungsbedarf, um die Reproduktion der Amphibien in ausreichendem Maße zu gewährleisten und langfristig den Fortbestand der Populationen zu sichern.

- 8) Für die Bewirtschaftung der Agrarflächen in Verbreitungszentren sensibler Amphibienarten sind umweltschonendere Produktionsweisen zu fordern. Neben der Favorisierung des integrierten Pflanzenschutzes sowie des Einsatzes abdriftmindernder Technik wird die Etablierung bewachsener Pufferstreifen um die Gewässer (mit einer Mindestbreite von 20 m) empfohlen. Die Agenda 2000 bietet Instrumentarien für Ausgleichszahlungen in den von umweltspezifischen Einschränkungen betroffenen Gebieten.

8 Literatur

- ALDRIDGE, W.N. (1990). An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Critical Review of Toxicology* 21(2), 89-104.
- ALLRAN, J.W. & KARASOV, W.H. (2000). Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from post-hatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2850-2855.
- ALLRAN, J.W. & KARASOV, W.H. (2001). Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 769-775.
- ALVAREZ, R., HONRUBIA, M.P. & HERRAEZ, M.P. (1995). Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox® and Folidol® during larval development of *Rana perezi*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 349-356.
- ANGELUCCI, S., SACCHETTA, P., DE LUCA, A., MOIO, P., AMICARELLI, F. & DI ILIO, C. (2002). Glutathione transferase isoenzymes from frog (*Xenopus laevis*) liver and embryo. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569, 81-85.
- BAKER, J. (1997). The Declining Amphibian Populations Task Force. *British Herpetological Society Bulletin* 59, 35-38.
- BENNETT, D., CROSSLAND, N.O. & SHIRES, S.W. (1980). Spray drift from Ripcord applications to vineyards in France: fate and effects in adjacent streams. Sittingbourne, Shell Research (TLGR.80.095).
- BENNETT, R.S., KLAAS, E.E., COATS, J.R., MAYSE, M.A. & KOLBE, E.J. (1983). Fenvalerate residues in nontarget organisms from treated cotton fields. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 870-877.
- BERGER, B. & HEITEFUSS, R. (1991). Use of isoproturon, alone and in combination with other compounds, on winter wheat and winter barley. *Weed Research* 31, 9-18.
- BERGER, G., SCHÖNBRODT, T., LANGER, C. & KRETSCHMER, H. (1999). Die Agrarlandschaft der Lebusplatte als Lebensraum für Amphibien. In: Krone, A., Kühnel, K.D., Schneeweiß, N. (Hrsg.), *Amphibien in der Agrarlandschaft. -RANA Sonderheft 3. Natur und Text, Rangsdorf*, 81-99.
- BERRILL, M. & BERTRAM, S. (1997). Effects of pesticides on amphibian embryos and tadpoles. In: Green D.M., ed. *Amphibians in decline: Canadian studies of a global problem. Reports from the declining amphibian population task force. Herpetological Conservation* 1, 233-245.
- BERRILL, M., BERTRAM, S., MCGILLIVRAY, L., KOLOHON, M. & PAULI, B. (1994). Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 657-664.
- BERRILL, M., BERTRAM, S., WILSON, A., LOUIS, S., BRIGHAM, D. & STROMBERG, C. (1993). Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 525-539.
- BERRILL, M., COULSON, D.R., MCGILLIVRAY, L. & PAULI, B.D. (1998). Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1738-1744.
- BIDWELL, J. & TYLER, M.J. (1997). Herbicides Pose Threat to Frogs and Toads. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- BIRGE, W.J., WESTERMAN, A.G. & SPROMBERG, J.A. (2000). Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Hrsg.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles, SETAC, Pensacola*, 727-791.
- BISHOP, C.A., MAHONY, N.A., STRUGER, J., NG, P. & PETTIT, K.E. (1999). Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the holland river watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environmental Monitoring and Assessment* 57, 21-43.
- BLAIR, A.M., MARTIN, T.D., WALKER, A. & WELCH, S.J. (1990). Measurement and prediction of isoproturon movement and persistence in three soils. *Crop Protection* 9, 289-294.
- BRADBURY, S.P. & COATS, J.R. (1989). Toxokinetics and toxodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 373-380.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

- BRIDGES, C.M. (1997). Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1935–1939.
- BRIDGES, C.M. (2000). Long term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 91–96.
- BROUWER, E.R., STRUYS, E.A., VREULS, J.J. & BRINKMAN, U.A.T. (1994). Automated determination of pyrethroid insecticides in surface water by column liquid chromatography with diode array UV detection, using on-line micelle mediated sample preparation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 350, 487–495.
- BROWN, C.D., HODGKINSON, R.A., ROSE, D.A., SYERS, J.K. & WILCOCKSON, S.J. (1995). Movement of pesticides to surface waters from a heavy clay soil. *Pesticide Science* 43, 131–140.
- BUCCIARELLI, T., SACCHETTA, P., PENNELLI, A., CORNELIO, L., ROMAGNOLI, R., MELINO, S., PETRUZZELLI, R. & DI ILIO, C. (1999). Characterisation of toad glutathione transferase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1431, 189–198.
- COLE, L.M. & CASIDA, J.E. (1983). Pyrethroid toxicology in the frog. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, 217–224.
- COPPIN, A., FLOREA, D., MAES, E., COGALNICEANU, D. & STRECKER, G. (2003). Comparative study of carbohydrate chains released from the oviducal mucins of the two very closely related amphibian species *Bombina orientalis* and *Bombina orientalis*. *Biochimie* 85 (1–2), 53–64.
- CROSSLAND, N.O. (1982). Aquatic toxicology of cypermethrin. II. Fate and biological effects in pond experiments. *Aquatic Toxicology* 2, 205–222.
- CROSSLAND, N.O., BENNETT, D., KANE, D.F. & STEPHENSON, R.R. (1978). The dispersion and toxic effects of the insecticide WL 43467 in a pond. Sittingbourne, Shell Research (TLGR.0076.78).
- DAVIES, I.M., COOK, L.S.J. & GEONARSO, D. (1994). Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1341–1354.
- DAWSON, D.A. & BANTLE, J.A. (1987). Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). *Journal of Applied Toxicology* 7, 237.
- DHAWAN, A. & KAUR, K. (1996). Toxic effects of synthetic pyrethroids on *Cyprinus carpio* Linn. eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 999–1002.
- DEJONG, J.L., MORGENSTERN, R., JORNVAL, H., DEPIERRE, J.W. & TU, C.P. (1988). Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases. *Journal of Biology and Chemistry* 263 (17), 8430–8436.
- DE LUCA, A., FAVALORO, B., ANGELUCCI, S., SACCHETTA, P. & DI ILIO, C. (2002). Mu-class glutathione transferase from *Xenopus laevis*: molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal* 365(3), 685–691.
- DI ILIO, C., ACETO, A., BUCCIARELLI, T., DRAGANI, B., ANGELUCCI, S., MIRANDO, M., POMA, A., AMICARELLI, F., BARRA, D. & FEDERICI, G. (1992). Glutathione transferase isoenzymes from *Bufo bufo* embryos at an early developmental stage. *Biochemical Journal* 283, 217–222.
- EATON, D.L. & BAMMLER, T.K. (1999). Concise review of glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences* 49, 156–164.
- FELDMANN, R. (1979). Artenhilfsprogramme für Moorfrösch und Gelbbauchunke. *Mitteilungen der Landesanstalt für Ökologie, Landschaftsentwicklung und Forstplanung Nordrhein-Westfalen* 4(5), 108–110.
- FENT, K. (1998). *Ökotoxikologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- GARFORTH, B.M. & WOODBRIDGE, A.P. (1984). Spray drift from aerial application of Fastac; fate and biological effects in an adjacent freshwater ditch. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 84.055).
- GEISELHART, C. (1994). Abbau- und Transportverhalten von Pflanzenschutzmitteln unter Pflanzenbeständen. Dissertation. Universität Hohenheim, Germany.
- GEORGE, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C. & Ostrander, G.K. (Hrsg.), *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*, Lewis Publications, Searcy, AK, 37–85.

- GLÄßGEN, W.E., KOMOSSA, D., BOHNENKAEMPER, O., HAAS, M., HERTKORN, N., MAY, R.G., SZYM CZAK, W. & SANDERMANN JR., H. (1999). Metabolism of the herbicide isoproturon in wheat and soybean cell suspension cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63, 97–113.
- GOLLMANN, G. (1987). Möglichkeiten der Freilanddiagnose von Hybriden der Rot- und Gelbbauchunke, *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761) und *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) (Anura, Discoglossidae). *Salamandra* 23, 43–51.
- GOSNER, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
- GOWLAND, B.T.G., MOFFAT, C.F., STAGG, R.M., HOULIHAN, D.F. & DAVIES, M. (2002). Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research* 54, 169–177.
- GRUNDY, J.E. & STOREY, K.B. (1998). Purification and kinetic properties of glutathione S-transferase from liver and skeletal muscle of the spadefoot toad *Scaphiopus couchii*: Influence of estivation INABIS '98 – 5th Internet World Congress on biomedical sciences at McMaster University Canada Dec 7–16th
- HAAS, M. (1997). Metabolisierung von Xenobiotika durch pflanzliche Zellkulturen und Enzyme. Dissertation. Technische Universität, München-Weihenstephan, Germany.
- HABIG, W., PAPST, M.J. & JACOBY, W.B. (1974). Glutathione S-transferase: The first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 1730–1739.
- HALL, R.J. & HENRY, P.F.P. (1992). Assessing the effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetological Journal* 2, 65–71.
- HALLEY, J.M., OLDHAM, R.S. & ARNTZEN, J.W. (1996). Predicting the persistence of amphibian populations with the help of a spatial model. *Journal of Applied Ecology* 33, 455–470.
- HARRIS, G.L. (1995). Pesticide loss to water – a review of possible agricultural opportunities to minimise pesticide movement. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK, 371–380.
- HASHIMOTO, Y., OKUBO, E., ITO, T. & YAMAGUCHI, M. (1982). Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth. *Pesticide Science* 7, 457–461.
- HAUGWITZ, J. & SCHNUG, E. (2000). Nachhaltige Landwirtschaft und ländliche Entwicklung in Polen im Zuge des EU-Beitritts – Instrumente und Herausforderungen. *Landbauforschung Völkenrode* 1/2 (51), 11–19.
- HAYES, J.D. & WOLF, C.R. (1988). Role of glutathione transferase in drug resistance. In: Sies, H., Ketterer, B. (eds.) *Glutathione conjugation mechanisms and biological significance*. Academic press limited, London, UK, 316–356.
- HAZARIKA, A. & SARKAR, S.N. (2001). Effects of isoproturon pre-treatment on the biochemical toxicodynamics of anilofos in male rats. *Toxicology* 165, 87–95.
- HECNAR, S.J. (1995). Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 2131–2137.
- HENRY, P.F.P. (2000). Aspects of amphibian anatomy and physiology. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Hrsg.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, SETAC, Pensacola, 71–110.
- HERRMANN, H.J., GASSEL, R. & MATZ, W. (1988). Zur Fortpflanzung der einheimischen Froschlurche (Amphibia, Anura) in Labor und Terrarium. Tagungsmaterial Amphibien, 2–15.
- HOQUE, E. (1998). Beiträge zu Wirkungsgefüge und Systemantwort der Pflanzen und Pilze auf Stress. Habilitation. Technische Universität, Dresden, Germany. ISBN: 3-8265-6793-5.
- HOWE, E.H., GILLIS, R. & MOWBRAY, R.C. (1998). Effect of chemicals synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 519–525.
- INGLESFIELD, C. & SHERWOOD, C.M. (1983). Toxicity of cypermethrin and WL85871 to the earthworm, *Eisenis foetida* L. (Oligochaeta: Lumbriculidae) in laboratory tests. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 83.071).
- JOHNSON, A.C., HARIA, A.H., BHARDWAJ, C.L., WILLIAMS, R.J. & WALKER, A. (1996). Preferential flow pathways and their capacity to transport isoproturon in a structured clay soil. *Pesticide Science* 48, 225–237.

- JOHNSON, A.C., HARIA, A.H., CRUXTON, V.L., BATCHELOR, C.H. & WILLIAMS, R.J. (1995). Isoproturon and anion transport by preferential flow through a drained clay soil. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK, 105–110.
- KAUFMAN, D.D., STILL, G.G., PAULSON, G.D. & BANDAL, S.K. (1976). Bound and conjugated pesticides residues ACS Symp. Ser. Nr. 29, American Chemical Society, Washington.
- KAUFMAN, D.D., RUSSEL, B.A., HELLING, C.S. & KAYSER, A.J. (1981). Movement of cypermethrin, decamethrin, permethrin, and their degradation products in soil. Journal of agricultural and food chemistry 29, 239–245.
- KEITH, G. & DIRHEIMER, G. (1995). Postlabeling: A sensitive method for studying DANN adducts and their role in carcinogenesis. Current Opinions in Biotechnology 6, 3-11.
- LANDESUMWELTAMT BRANDENBURG (2001). Pflanzenschutzmittel in der Umwelt; Erhebung zu Wirkstoffmengen von Pflanzenschutzmitteln im Land Brandenburg. Studien und Tagungsberichte 30.
- LIEB, M. (1993). Zur Ökotoxikologie der Einträge von landwirtschaftlich genutzten Flächen in Fließgewässer. Dissertation. Technische Universität, Braunschweig, Germany.
- LIEB, M. & SCHULZ, R. (1995). Ökotoxikologische Bewertung von Pflanzenschutzmittel-Einträgen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen in Fließgewässer. In Handbuch Angewandte Limnologie. Steinberg, C.E.W., Bernhardt, H., Klapper, H. (Hrsg.). Ecomed-Verlag, Landsberg.
- MANN, R.M. & BIDWELL, J.R. (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.
- MARKING, L.L. (1977). Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. STP 634. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- MATERNA, E.J., RABENI, C.F. & LAPOINT, T.W. (1995). Effects of the synthetic pyrethroid insecticide esfenvalerat, on larval leopard frogs (*Rana spp.*). Environmental Toxicology and Chemistry 14, 613–622.
- MAUCK, W.L., OLSEN, L.E. & MARKING, L.L. (1976). Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 4, 18–29.
- MAUND, S.J., HAMER, M.J., LANE, M.C.G., FARRELLY, E., RAPLEY, J.H., GOGGIN, U.M. & GENTLE, W.E. (2002). Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. Environmental Toxicology and Chemistry 21 (1), 9–15.
- MAYER, F.L. & ELLERSIECK, M.R. (1986). Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Washington DC: U.S. Fish Wildlife Service. Resource Publication 160.
- MCLEESE, D.W., METCALFE, C.D. & ZITKO, V. (1980). Lethality of permethrin, cypermethrin; and fenvalerate to salmon lobster, and shrimp. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 25, 950–955.
- NIELSEN, S.A., TOFT, S. & CLAUSEN, J. (1999). Cypermethrin effects on detoxification enzymes in active and hibernating wolf spiders (*Pardosa amentata*). Ecology and Application 9, 463–468.
- NOSHIRO, M. & OMURA, T. (1984). Microsomal monooxygenase system in frog livers. Comparative Biochemistry and Physiology 77 B, 761–767.
- PATTY, L. & GRIL, J.J. (1995). Grassed buffer strips to reduce herbicide concentration in runoff-preliminary study in western France. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK, 397–406.
- PAULI, B.D., COULSON, D.R. & BERRILL, M. (1999). Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to MIMIC® 240LV insecticide following single or double exposures. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 2538–2544.
- PAULOV, S. (1990). Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on the model amphibians (*Rana temporaria*). Biologia (Bratislava) 45, 133–139.
- PAWAR, K.R. & KATDARE, M. (1984). Toxic and teratogenic effects of fenitrothion, BHC and carbofuran on embryonic development of the frog *Microhyla ornata*. Toxicological letters 22, 7–13.
- PEARSON, N. (1990). The fate of "Fastac" in experimental ponds. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 85.290).

- PFLUGMACHER, S. & STEINBERG, C.E.W. (1997). Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes. *Journal of Applied Botany* 71, 144–146.
- PLÖTNER, J. & GÜNTHER, R. (1987). Toxicity of an anionic detergent to the spawn and larvae of anurans (amphibia). *International Review of Hydrobiology* 72, 759–771.
- PLÖTNER, J. (1998). Zum Einfluss von Wasserschadstoffen auf Amphibienlaich und -larven. *Jahreschrift für Feldherpetologie und Ichthyofaunistik Sachsen* 5, 35–49.
- RANA, B.C. & KUMAR, J.I.N. (1995). Observations on the effect of the herbicide Isoproturon on aquatic targets and associated organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 104–110.
- READE, J.P.H. & COBB, A.H. (2001). New, quick tests for herbicide resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) based on increased glutathione S-transferase activity and abundance. *Pest Management Science* 58, 26–32.
- REIFF, B. (1978). The effect of suspended solids on the toxicity of WL 43467 to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Sittingbourne, Shell Research (TLGR.0007.78)*.
- RUDEK, Z. & ROZEK, M. (1992). Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutation Research* 298, 25–29.
- SALIBAN, A. (1992). Effects of deltamethrin on the South American Toad, *Bufo arenarum*, tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 616–621.
- SCHÄFER, H.J. & KNEITZ, G. (1993). Entwicklung und Ausbreitung von Amphibienpopulationen in der Agrarlandschaft – ein E+E-Vorhaben. *Natur und Landschaft* 68 (7/8), 376–385.
- SCHIEMENZ, H. (1979). Schutzmaßnahmen für Amphibienlaichgewässer. *Feldherpetologische Mitteilungen* 2, 2–6.
- SCHLÜPMANN, M. (1992): Kartierung und Bewertung stehender Gewässer In: Eikhorst, R. (Hrsg.) Beiträge zur Biotop- und Landschaftsbewertung. – Verl. f. Ökologie u. Faunistik, Duisburg, 149–176.
- SCHNEEWEISS, N. (1993). Zur Situation der Rotbauchunke *Bombina bombina* Linnaeus, 1761, in Brandenburg. *Naturschutz und Landschaftspflege in Brandenburg* 2, 8–11.
- SCHNEEWEISS, N. (1996). Zur Verbreitung und Bestandsentwicklung *Bombina bombina* LINNAEUS, 1761 in Brandenburg. In: Krone, A., Kühnel, K.D., (Hrsg.), Die Rotbauchunke (*Bombina bombina*) Ökologie und Bestandssituation: RANA Sonderheft 1. Natur und Text, Rangsdorf, Germany, 87–103.
- SCHRÖDER, P., PFLUGMACHER, S. & RENNENBERG, H. (1992). Biomarker für organische Schadstoffe in Fichten (*Picea abies* L.) Dynamik des Enzymes Glutathion S-Transferase. *Angewandte Botanik* 66, 174–179.
- SCHUYTEMA, G.S. & NEBEKER, A.V. (1998). Comparative toxicity of diuron on survival and growth of Pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 370–376.
- SHIRES, S.W. (1983). Effects of formulation type on the toxicity of insecticides to fish. *Sittingbourne, Shell Research (SBGR 83.015)*.
- SMITH, I.H., WOOD, E.J. & CASIDA, J.E. (1982). Glutathione conjugate of the pyrethroid tetramethrin. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* 30, 598–600.
- SOLOMON, K.R., GIDDINGS, J.M. & MAUND, S.J. (2001). Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (3), 652–659.
- SPIELLER, M., HARTMANN, H., BURHENNE, J., MÜLLER, K., BACH, M. & FREDE, H.-G. (2000). Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Oberflächengewässern und Maßnahmen zur Reduktion des Eintrages, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Weimar, Germany, May, 29.-31., 2000, 119–124.
- STEPHENSON, R.R. (1982). WL 85871 and cypermethrin; a comparison of their acute toxicity to *Salmo gairdneri*, *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum*. *Sittingbourne, Shell Research (SBGR 81.277)*.
- STEPHENSON, R.R. (1983). WL 85871 and cypermethrin; a comparison of their acute toxicity to the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Rafinesque). *Sittingbourne, Shell Research (SBGR 82.298)*.
- STEPHENSON, R.R. (1987). An insecticide formulation that spares fish. *Span* 30(2), 75–77.

- SUN, T.H., LING, X., PERSSON, B. & MORGENSTERN, R. (1998). A highly active microsomal glutathione transferase from frog (*Xenopus laevis*) liver that is not activated by N-ethylmaleimide. *Biochemical and Biophysical and Research Communications* 246, 466–469.
- SZYMURA, J.M. (1993). Analysis of hybrid zones with *Bombina*. In: Harrison, R.G. (Hrsg.). *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York. 261–289.
- TRAUNSPURGER, W., SCHÄFER, H. & REMDE, A. (1996). Comparative investigation on the effect of a herbicide on aquatic organisms in single species tests and aquatic microcosms. *Chemosphere* 33, 1129–1141.
- UMWELTBUNDESAMT (2000). Schätzung der Einträge von Pflanzenschutzmitteln aus der Landwirtschaft in die Oberflächengewässer Deutschlands. UBA-Bericht 3/2000. Umweltbundesamt, Berlin.
- US EPA (1999). URL: <http://epa.gov/oscpmont/sap/1999/february/pyreth.pdf>
- VALLES, S.M. (1998). Toxicological and biochemical studies with field populations of the German cockroach (Dictyoptera: *Blattellidae*). *Journal of economic entomology* 89, 21–26.
- VAY, B., SCHUBERT, D., LÜBBEKE, I. & ROBINET, K. (2002). EU-Strukturfonds und die zweite Säule der Gemeinsamen Agrarpolitik – Neue Möglichkeiten der Finanzierung von Naturschutz. Bundesamt für Naturschutz (Hrsg.), BfN-Skripten 63.
- VON WESTERNHAGEN, H. (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (Hrsg.). *Fish Physiology*, Academic Press, New York, XIA 253–364.
- WIEGAND, C., PFLUGMACHER, S., GIESE, M., FRANK, H. & STEINBERG, C.E.W. (2000). Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 122–131.
- WIEGAND, C., PFLUGMACHER, S., OBEREMM, A., MEENS, N., BEATTIE, K.A., STEINBERG, C.E.W. & CODD, G.A. (1999). Uptake and effects of Microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14, 89–95.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Cypermethrin. *Environmental Health Criteria* 82.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1992). Alpha-Cypermethrin. *Environmental Health Criteria* 142.

Abkürzungen

1-OH-IPU	1-Hydroxy-IPU
1-OH-MDM-IPU	1-Hydroxy-Monodesmethyl-IPU
2-OH-IPU	2-Hydroxy-IPU
2-OH-MDM-IPU	2-Hydroxy-Monodesmethyl-IPU
<i>B. bombina</i>	<i>Bombina bombina</i>
<i>B. variegata</i>	<i>Bombina variegata</i>
BCF	Biokonzentrationsfaktor
BSA	Rinderserum Albumin, Fraktion V
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol; Photometersubstrat
CP	Cytosolpuffer
CPA	Cyclopropancarboxylsäure
DCNB	2,4-Dichlor-1-nitrobenzol; Photometersubstrat
DTE	Dithioerythritol
FFH	Fauna-Flora-Habitat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPU	Isoproturon
kat	Katal, Einheit für die Enzymaktivität
K_{OW}	Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser
MDM-IPU	Monodesmethyl-IPU
mGST	mikrosomale Glutathion S-Transferase
MP	Mikrosomenpuffer
NaP	Natriumphosphat-Puffer
PBA	Phenoxybenzolsäure
<i>R. arvalis</i>	<i>Rana arvalis</i>
sGST	lösliche Glutathion S-Transferase

Danksagung

Herrn Prof. C.E.W. Steinberg danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin. Vielen Dank für die konstruktiven Anregungen in der Planungsphase, das Interesse am Fortgang der Arbeit und die wertvollen Hinweise während der Fertigstellung der Dissertation.

Die finanzielle Unterstützung durch das IGB eröffnete mir die Möglichkeit, die Ergebnisse der Untersuchungen auf Kongressen im In- und Ausland dem Fachpublikum vorzustellen und zu diskutieren.

Ganz besonders danke ich dem Leiter der Arbeitsgruppe Biogeochemical Regulation Herrn Dr. S. Pflugmacher, der mich mit fundiertem Fachwissen in den Bereich der Enzymatik einführte und mir erprobte Methoden überließ. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen und weiterführenden Diskussionen zur Auswertung der Ergebnisse sowie für die Durchsicht der Publikationsmanuskripte.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die langjährige Zusammenarbeit und Unterstützung bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der herpetologischen Fachstation des Landesumweltamtes Brandenburg – der Naturschutzstation Rhinluch. Ein ganz besonderer Dank geht an den Leiter Herrn Dr. N. Schneeweiß für die Anregung zur Bearbeitung dieser Thematik, die intensive fachliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft sowie die Hilfe bei den Freilanduntersuchungen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei allen Beteiligten des Herpetofauna-Projektes bedanken, die im Frühjahr 2000 den Amphibienzaun um den Thierpfuhl mit aufgebaut haben. Ein Dankeschön geht vor allem an Herrn M. Stoefer für die Unterstützung bei den Freilandarbeiten sowie an Herrn G. Vogler für seine Hilfe bei der Vegetationskartierung.

Mein Dank gilt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, die mir ein dreijähriges Stipendium gewährte. Neben der finanziellen Unterstützung ermöglichte die DBU auf mehreren Stipendiatenseminaren und Veranstaltungen die Ergebnisse der Arbeit einem breiten Publikum vorzustellen.

Bei Herrn Dr. E. Hoque vom GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung bei den Untersuchungen zur Aufnahme von ^{14}C -markiertem Isoproturon in Laich und Larven der *Bombina*-Arten sowie für die herzliche Aufnahme im Institut für Hydrologie bedanken.

Auf diesem Wege möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IGB und besonders der Arbeitsgruppe Biogeochemical Regulation danken, die mir mit Ratschlägen und Unterstützung stets hilfreich zu Seite standen. Bei Herrn Dr. G. Staaks bedanke ich mich für die Hinweise zur statistischen Auswertung einiger Ergebnisse der Arbeit.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie, die durch ihre Geduld und Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Uptake, Metabolism, and Effects on Detoxication Enzymes of Isoproturon in Spawn and Tadpoles of Amphibians

Kerstin Greulich,* Enamul Hoque,† and Stephan Pflugmacher*¹

* Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 12587 Berlin, Germany; † Institute of Hydrology, GSF National Research Center, 85758 Oberschleissheim, Germany

Received August 24, 2001

Using ring-¹⁴C-labeled isoproturon (1 µg/L), the uptake into spawn and tadpoles of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* was investigated. Two percent of the applied radioactivity was found per gram fresh weight in the embryo after 24 h. Results indicate that the jelly mass of the spawn does not act as a sufficient physical barrier for protection against the uptake and influence of isoproturon (IPU) on the embryo. *In vivo* metabolism of ring-¹⁴C-labeled IPU by the cytochrome P-450 system was analyzed in tadpoles. Different metabolites of IPU, such as N-demethylated and C-hydroxylated derivatives, and the olefinic metabolite were detected. In tadpoles of *B. variegata*, the activity of microsomal and soluble glutathione-S-transferase (sGSTs) toward different model substrates was measured after treatment with IPU. Activities of sGST increased corresponding to elevated stress by IPU dependent on exposure time and dose. Compared to the pure active ingredient IPU, the commercial phenyl-urea herbicide Tolkon Flo, consisting of IPU and an emulsifier, also caused significantly elevated enzymatic response. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: isoproturon; herbicide; amphibians; spawn; tadpoles; microsomal and soluble glutathione-S-transferase.

INTRODUCTION

Populations of many amphibian species all over the world appear to have undergone declines and range reductions recently (Wake, 1991). A series of conservation measures is urgently required to maintain or restore the natural habitats and the populations of threatened amphibian species. In Annex IV of the European Union Habitat and Species Directive (1992)² the fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the yellow-bellied toad (*Bombina orientalis*)

are described as animal species of common interest in need of strict protection. Also the Red Data Book of Germany classifies *B. orientalis* as a critically endangered and *B. orientalis* as an endangered species. Both species are closely related, and hybridization occurs at their range boundaries.

The northwest of middle Europe has experienced marked declines in *B. orientalis*. In northeastern Germany this species has declined by around 30% since the early 1960s (Schneeweiss, 1993). After the loss of its preferred habitat of riverside meadows, *B. orientalis* uses small ponds in agricultural landscapes as summer habitat and for reproduction. *B. orientalis* seems to be especially sensitive to environmental pollution (Schiemenz, 1979; Herrmann *et al.*, 1988; Schneeweiss, 1996).

In general, amphibian populations are potentially sensitive to aquatic contaminants like acid deposition, nitrogen fertilizers, and pesticides which may have contributed to their decline (Hecnar, 1995; Hall and Henry, 1992). Lower species diversity and density in the agricultural zone indicate that despite the presence of a water course, ditches, and ponds, many anuran species do not tolerate intensive agricultural activity (Bishop *et al.*, 1999).

Approximately 30 tons of pesticides reach the surface water in Germany each year with isoproturon (3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylene) (IPU) contributing 2 tons annually (Federal Environmental Protection Agency, 2000). Isoproturon (IPU) is a selective systemic herbicide, which is absorbed by the roots and rapidly transported through the xylem to the leaves. It inhibits photosynthetic electron transport (Berger and Heitefuss, 1991). Phenyl-urea herbicides are used for pre- and postemergence control of annual grasses and many annual broad-leaved weeds in spring and winter wheat, barley, rye, and triticale. Because of its widespread use and its properties of moderate persistence and relatively low adsorption, IPU has become a water contaminant in many agricultural areas.

Sensitivity of aquatic nontarget animals to contamination by IPU has been studied in aquatic invertebrates and fishes.

¹ To whom correspondence should be addressed at Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 301, 12587 Berlin, Germany. Fax: 004930/64181682. E-mail: pflug@igb-berlin.de

² Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the Conservation of Natural Habitats and of Wild Fauna and Flora.

The growth rate of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* was slightly inhibited at 700 µg/L IPU, whereas other hydro-trophic organisms (*Daphnia magna* and the nematode *Caenorhabditis elegans*) were not affected by IPU up to concentrations of 1000 µg/L (Traunspurger *et al.*, 1996). LC₅₀ values (96 h) of 37 mg/L for *Onchorhynchus mykiss* and 9 mg/L for *Ictalurus punctatus* were reported by Perkow (1988) and Leiva *et al.* (1997). However, there are no reports in the literature of lethal or sublethal effects of phenyl-urea herbicides on amphibians.

In principle, organisms are able to detoxicate phenyl-urea herbicides to some extent. The first phase of metabolism of IPU involves hydroxylation of carbon atoms, resulting in reactive functional groups, and catalyzed by cytochrome P450-dependent monooxygenases (Haus, 1997). These activated electrophilic derivatives can be conjugated to glutathione and catalyzed by glutathione-S-transferase (GST) in Phase II (George, 1994). The hydrophilic products of conjugation are excreted in Phase III.

GST is widely distributed in nature and may be implicated in cell line resistance to pesticides (Hayes and Wolf, 1988; Bucciarelli *et al.*, 1999; Glässgen *et al.*, 1999). With the exception of a single microsomal enzyme, GSTs are soluble (George, 1994). Soluble GSTs have been grouped into six distinct classes: α , μ , π , θ , δ , ζ , and β (Bucciarelli *et al.*, 1999). The variety of isoenzymes represents the wide range of different compounds which can be conjugated. Detoxication of aquatic contaminants by conjugation to glutathione is well documented in fish (Donnarumma *et al.*, 1988; George *et al.*, 1989; Wiegand *et al.*, 2000). In contrast, information about detoxication in amphibians is rare. For example, Johnson *et al.* (1995) examined biotransformation and the glutathione antioxidant system after exposure to 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) in the amphibian species *Ambystoma tigrinum*. The results indicate that *A. tigrinum* possess considerable levels of antioxidant enzymes, but tested tissues were not sensitive indicators of TNT exposure. Investigations of Bucciarelli *et al.* (1999) yielded changes in GST amphibian patterns in embryonic and adult life stages of *Bufo bufo*. A specific GST form of later development stages was found to counteract the toxic effects of reactive metabolites of xenobiotics with higher efficiency.

In general, concerning the development stages of amphibians and their differences in sensitivity to pesticide contamination, contradictory results were reported in the literature. Berrill *et al.* (1995) found that within each tested ranid species, 1- and 8-day-old tadpoles are equally sensitive to treatment with the insecticide fenitrothion. However, Pauli *et al.* (1999) described that different aquatic stages of four investigated ranid amphibians exhibited differing degrees of sensitivity to the tested insecticide tebufenozide. Susceptibility of different developmental stages of amphibian tadpoles to pesticide contamination appears to be strongly dependent on both the species and the chemicals tested.

In order to assess the environmentally relevant effects of xenobiotics on aquatic life, the active compounds of pesticides as well as the formulated commercial products should be investigated (Liess, 1993; Mann and Bidwell, 1999; Plötner and Günther, 1987). The mechanisms of chemical interaction in mixtures are not fully understood (Howe *et al.*, 1998). Some theories include increase in rate of uptake, formation of toxic metabolites, reduction of excretion, alteration of distribution, and inhibition of detoxication systems, which appears to be the most popular theory (Marking, 1977). Field-grade herbicide formulations were found to cause more than just additive toxicity to amphibians. This "chemical synergy" suggests a mechanism that is based on a severe inhibition of detoxication (Howe *et al.*, 1998).

The aim of the present study was to investigate the influence of environmentally relevant concentrations of IPU to the early developmental stages of *B. bombina* and *B. variegata*. At first it was necessary to check whether IPU was taken up by spawn and tadpoles of these amphibian species and if they are able to metabolize IPU. Furthermore, the physical and behavioral changes after treatment with IPU were checked. The effects of the pure ingredient IPU on the detoxication enzyme system of phase II were compared to effects of a formulated product consisting of IPU and an emulsifier.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The field investigations were carried out in a pond without buffer strip, situated in an intensively used arable area within the younger Pleistocene landscape of Northeast Germany. These regions are distinguished by a lot of natural potholes and ponds with high diversity and density of amphibians.

The catchment area of the investigated pond comprises approx. 3 ha of slightly sloping field. Summer barley was grown here in 2000 and once, in the spring (5/4/2000), the field was sprayed with the herbicide Tolkan Flo, a commercial phenyl-urea herbicide consisting of IPU (500 g/L) and an emulsifier. Application of Tolkan Flo was carried out strictly in conformance with the rules of agricultural procedure; the spraying distance to the pond was 15 m. The investigated pond is a very important habitat for eight species of amphibians, including the endangered *B. bombina*.

Embryo and Tadpole Culture

Studies of uptake and metabolism of IPU in amphibian tadpoles were carried out with *B. bombina* as well as *B. variegata*. Experiments to clarify the effects on detoxication enzymes were studied in *B. variegata*, because this species can be handled more easily than *B. bombina* in captivity.

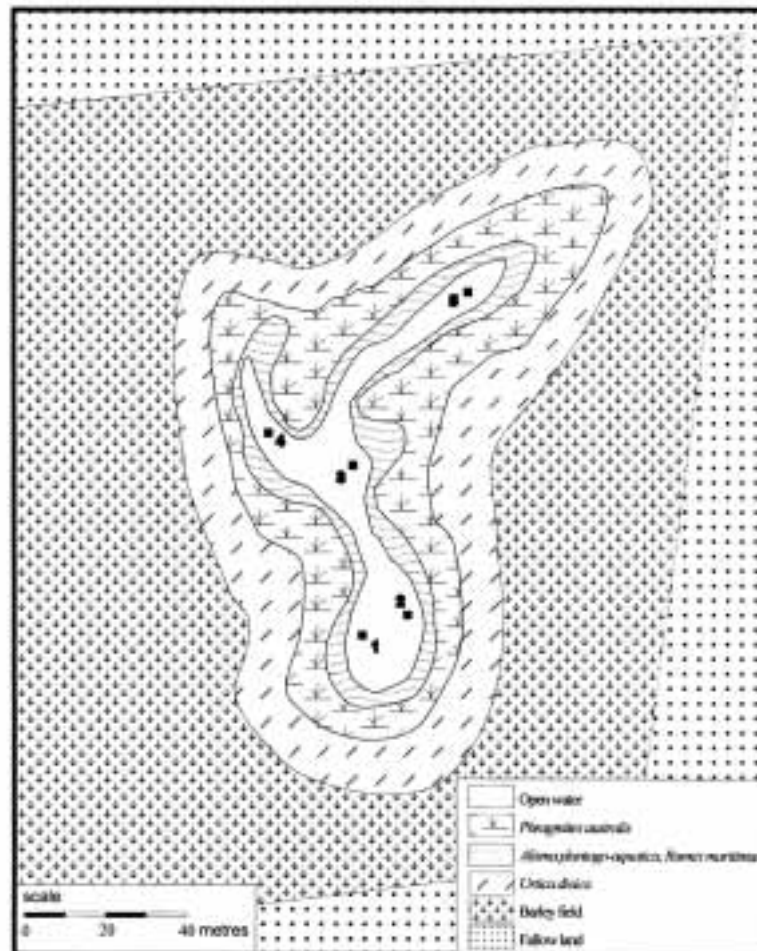


FIG. 1. Study pond showing the five sampling sites.

Determination of the developmental stages of both *Bombina* species was carried out according to Gosner (1960).

Spawn and tadpoles were kept in tanks with artificially salted (100 mg/L sodium chloride, 200 mg/L calcium chloride dihydrate, 103 mg/L sodium hydrogen carbonate), demineralized water. Twenty larvae, or one clutch of eggs, were placed in each aquarium containing 10 L water on a 14:10-h light:dark cycle. Tadpoles were fed with powdered dry food (Tetramin AZ 40). Larvae were placed into water to acclimate 24 h prior to testing. The water temperature was maintained at 20°C.

Experimental Procedures

Field sampling. To quantify IPU contamination in the pond, water samples were taken at five different sites (Fig. 1), following a time schedule: on the day of spraying the sampling was carried out 0.5, 1, 3, 6, and 12 h after application. In

order to determine the background contamination the first sample was taken 2 weeks prior to herbicide application. Samples were also taken after the first precipitation (a thunderstorm) and 10 weeks after application. At this time four of the sampling sites were found dry.

IPU analysis. Target compounds were enriched by solid-phase extraction (Sep-Pak, Waters). Subsequently, 1 L of water was introduced into the cartridges and the sorbent was eluted with 1 mL of methanol for measuring by HPLC.

Analysis of the nonlabeled IPU and its metabolites was performed with a liquid chromatograph (Waters) equipped with an injection valve with a 100- μ L loop and a 996 diode array UV detector, set at 240 nm, containing a 10-mm flow cell. To separate IPU and its metabolites, a LiChrospher 100 RP-18 column (250 \times 4 mm, 5 μ m, Merck) and an adequate precolumn (4 \times 4 mm) were used. The separation was carried out at 40°C at a flow rate of 1 mL/min. The liquid

chromatography high-pressure gradient was prepared by mixing acetonitrile and water according to Haas (1997).

Uptake and metabolism of ring-¹⁴C-labeled IPU. For the investigation of uptake of IPU into spawn and tadpoles of the amphibians, ring-¹⁴C-labeled IPU (sp. act. 3,965 MBq/mg; purity > 97%; Intl. Isotope, Germany) was used. Exposure of the eggs of *B. bombina* to 1 µg/L IPU lasted 24 h. Embryos exposed to the herbicide remained within their jelly capsules. After the treatment, the clutches of spawn were rinsed thoroughly. Then the jelly capsules and the embryos were separated carefully, frozen in liquid nitrogen, and homogenized in ethyl acetate. The radioactivity in the jelly mass and embryo was measured by liquid scintillation counting (Wallac 1409) in optima gold scintillator liquid. For determining the recovery at the beginning and the end of the investigation, the radioactive residues were analyzed in the exposure medium and also in the rinsing liquid of spawn and beakers.

Tadpoles of *B. variegata* at stage 25 were exposed to 1 µg/L ring-¹⁴C-labeled IPU at 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, and 48 h and investigated in the same manner as the spawn. *In vivo* metabolism of ring-¹⁴C-labeled IPU was investigated in *B. bombina* and *B. variegata* tadpoles after 48 h exposure time. Whole-body extracts were analyzed for the detection of IPU metabolites by HPLC.

HPLC analysis of ring-¹⁴C-labeled IPU. The analysis of the ring-¹⁴C labeled IPU was performed with a high-performance liquid chromatograph (Shimadzu) equipped with ¹⁴C Yttrium-glass scintillator (Berthold). A 250 × 4.6-mm i.d. analytical column with a precolumn packed with Spherisorb ODSII 3 µm was used for separation at a flow rate of 0.6 mL/min. The liquid chromatography high-pressure gradient was prepared by mixing acetonitrile and water according to Hoque (1998).

Effects of IPU exposure on tadpoles. Eight tadpoles of *B. variegata* (stage 25) were exposed to 0, 0.1, 1, 10, and 100 µg/L IPU for 24 h at 20°C. The tadpoles were examined for mortality and prodded for assessment of their avoidance response. All experiments were run in triplicate.

Eight developmental stages of amphibians (Gosner stages 20–27) were chosen to check the most susceptible level. The examination covered the developmental phases from newly hatched tadpoles, with detectable heartbeat (stage 20), to the development of external gills (stages 21–23), followed by the development of the operculum and the disappearance of external gills (stages 23–25), up to the appearance of the hind limbs (stages 26–27). Eight tadpoles of *B. variegata* per stage were exposed to 0.01 µg/L IPU for 24 h at 20°C. The enzymatic response was determined by measuring the microsomal GST (mGST) and soluble GST (sGST) to model substrate CDNB (cf. detoxication enzyme system).

Detoxication enzyme system. In order to measure the enzymatic response of amphibians to contamination of IPU herbicides, larvae of *B. variegata* were exposed to solutions of the active ingredient, pure IPU, and also to the commercial herbicide Tolkan Flo.

Eight tadpoles of *B. variegata* (stage 25) were transferred to the tanks containing treatment solutions with concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100, and 1,000 µg/L IPU for 24 h at 20°C. In order to investigate the time-dependent response of the detoxication system to IPU, the larvae were exposed to 1 µg/L IPU for 0.5, 2, 6, 24, and 48 h at 20°C.

Enzyme extracts were prepared according to Pflugmacher and Steinberg (1997) and Wiegand *et al.* (1999) with modifications in volume. In the present experiments, samples were homogenized on ice in 25 mL sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) containing 20% glycerol, 1.4 mM dithioerythritol (DTE), 1 mM EDTA. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000g (10 min). The supernatant was centrifuged again at 40,000g (60 min) to obtain the microsomal fraction which was resuspended in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), 20% glycerol, 1.4 mM DTE. Ammonium sulfate precipitation cut between 35 and 80% saturation, followed by centrifugation at 30,000g (30 min) and desalting in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), was used to obtain soluble proteins.

Substrate specificities of mGST and sGST were quantified colorimetrically using the model substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) (Habig *et al.*, 1974) and the diphenylether herbicide fluorodifen (Schröder *et al.*, 1992). Enzyme activity was calculated in terms of the protein content of the sample (Bradford, 1976).

Analysis of Data

In order to test the significance of increasing or decreasing enzyme activities between control and exposure, a statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test, $P < 0.05$ (SPSS 9.0 for Windows).

RESULTS

Field Investigations

Before herbicide application on the field, IPU was not proved in any water-sample of the investigated pond. Thirty minutes after spraying, IPU was detectable at sampling sites 1 and 2 and after 3 h at all the others. Twelve hours after the application the input ranged from 3 to 9 µg/L IPU with the higher concentrations measured in deeper water in the southern sector of the pond. Presumably drainage water enters the pond here. At the time of the first precipitation—2 weeks after spraying—a clear increase in IPU concentration

(5–22 µg/L) was noted at four sampling sites; one sampling point was found dry. Ten weeks after the herbicide application all sampling sites except site 1 (containing 0.2 µg/L IPU) were dried out due to lack of precipitation (Fig. 2). For *in vitro* tests the concentration range was based on the results of the field experiments in order to clarify the effects of IPU on embryos and larvae.

Uptake and Metabolism of IPU

Using ring-¹⁴C-labeled IPU to expose the spawn of *B. bombina*, radioactive residues were analyzed in the jelly capsules as well as in the embryos. In the jelly 0.7%/g fresh weight of the applied radioactivity were detected, while in the embryo about 2%/g fresh weight was found after 24 h (Fig. 3).

Measuring the time-dependent uptake of ring-¹⁴C-labeled IPU into the tadpoles, 2% of the applied radioactive substance was found in the larvae after 30 min (Fig. 4). The radioactive amount increased to 4.8%/g fresh weight after 48 h, which differed significantly from all other results. During the first 30 min the uptake of IPU into the tadpoles began quickly, increased slightly, and after 4 h reached a steady state which continued till the end of the exposure time. The recovery of radioactivity in the experiment was 84.5%.

In tests of both *Bombina* species, different metabolites of IPU, such as the N-demethylated derivative monodesmethyl-IPU, the C-hydroxylated derivatives 1-hydroxy-IPU/2-hydroxy-IPU, 1-hydroxy-monodesmethyl-IPU/2-hydroxy-monodesmethyl-IPU, and the olefinic metabolite isopropenyl-IPU were detected (Table 1).

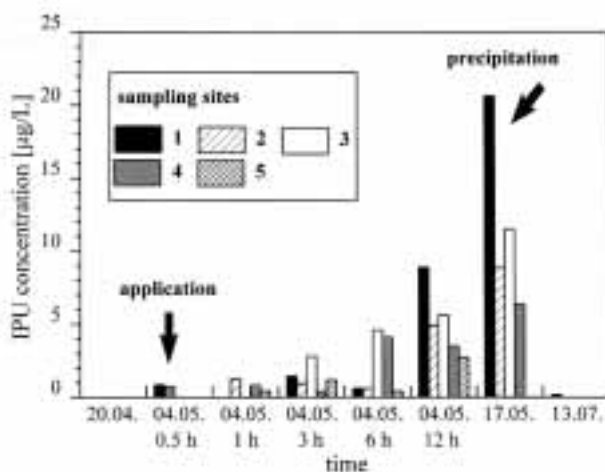


FIG. 2. Concentrations of isoproturon at the five sampling sites before and after application of the commercial herbicide Tolkan Flo.

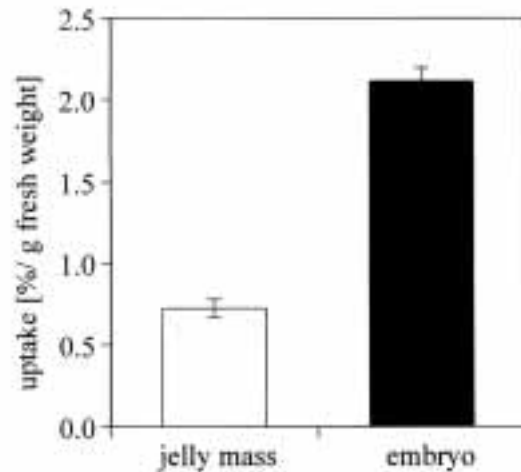


FIG. 3. Uptake of ring-¹⁴C-labeled isoproturon into jelly capsules and embryo of *Bombina bombina* after 24 h. Error bars indicate standard deviations of triplicate experiment.

Effects of IPU Exposure on Tadpoles

Physical and behavioral abnormalities developed at concentrations of 0.1 µg/L in 24 h exposure (Fig. 5). In addition to reduced mobility (lateral swimming), developmental deformities including bent tails, body swelling and bulging, head deformities, and digestive system deformities occurred. At concentrations of 1, 10, and 100 µg/L IPU up to 50% of exposed tadpoles were paralyzed or died after 24 h. Compared to the control the number of impaired and dead tadpoles increased significantly. The tadpoles exhibited mortality up to 25% at 1 and 100 µg/L IPU and clear indications of diminished avoidance response when prodded.

At developmental stages 24 and 25 the sGST activities, tested with the model substrate CDNB, increased to 15 and

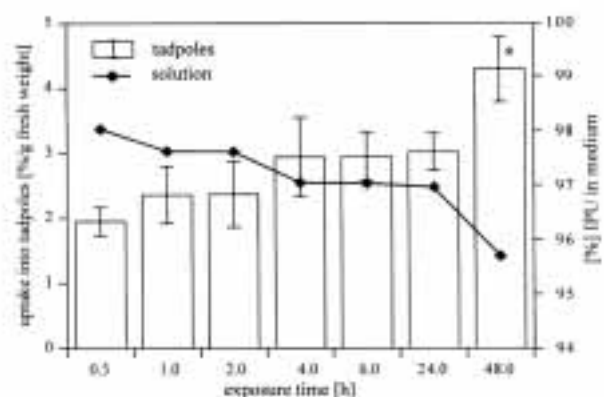


FIG. 4. Uptake of ring-¹⁴C-labelled isoproturon by tadpoles of *Bombina variegata*. Mean of three independent samples and standard deviation. *Significantly different compared to control.

TABLE 1

Identities of Metabolites of [*ring*-¹⁴C] IPU Established by Comparing the Retention Times (*t_R*, min) of the *ring*-¹⁴C-Labeled Metabolites in *B. bombina* and *B. variegata* with Authentic Standards

Metabolite	Standard (<i>t_R</i>)	<i>B. bombina</i> (<i>t_R</i>)	<i>B. variegata</i> (<i>t_R</i>)
2-OH-MDM-IPU	16.4	—	—
1-OH-MDM-IPU	16.7	17.1 ^a	16.7
2-OH-IPU	17.8	17.8	—
1-OH-IPU	17.9	—	17.9
DDM-IPU	24.5	—	—
MDM-IPU	26.6	26.6	26.6
Isoprenyl-IPU	28.3	28.3	—
IPU	28.4	28.4	28.4

Note. 2-OH-MDM-IPU, 2-hydroxy-monodesmethyl-IPU; 1-OH-MDM-IPU, 1-hydroxy-monodesmethyl-IPU; 2-OH-IPU, 2-hydroxy-IPU; 1-OH-IPU, 1-hydroxy-IPU; DDM-IPU, didesmethyl-IPU; MDM-IPU, monodesmethyl-IPU.

^a1-OH-MDM-IPU-like metabolite.

25 nkat/mg protein, respectively, and therefore differ significantly compared to all other stages (Fig. 6).

Effects on the GST Enzyme System

The enzymatic activity of the GST system was detectable in microsomal as well as in soluble enzyme fractions on all tested substrates. After exposure to IPU the activity of GST

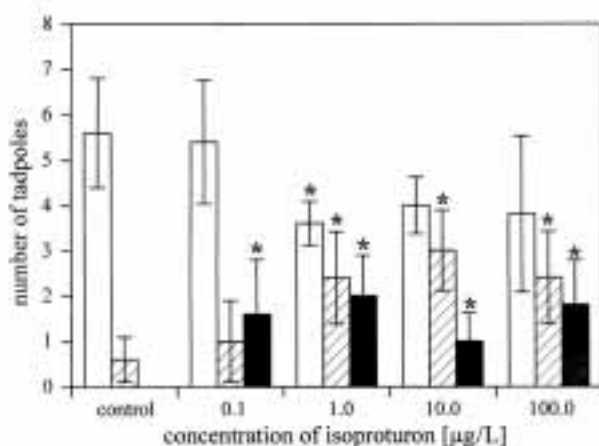


FIG. 5. Response of *Bombina variegata* tadpoles to different concentrations of isotreturon after 24 h exposure. Open bars indicate the mean number of tadpoles per treatment able to dart away with a normal avoidance response when prodded. Hatched bars indicate the mean number of paralyzed tadpoles per treatment or tadpoles twitched in place. Solid bars indicate the mean number of tadpoles per treatment that were completely unresponsive. Error bars indicate standard deviations of triplicate experiment. *Significantly different compared to control.

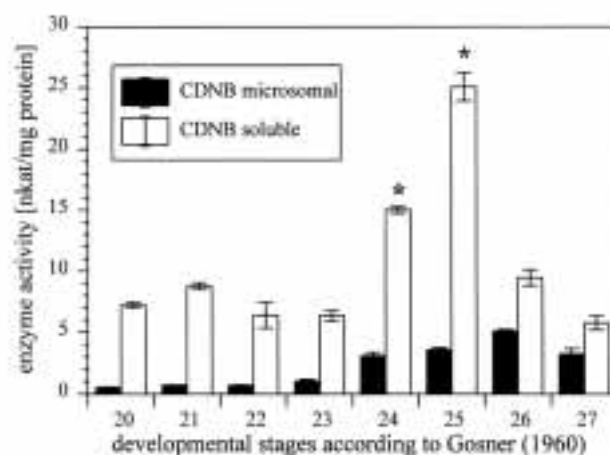


FIG. 6. Activities of soluble and microsomal glutathione-S-transferase (GST) toward CDNB in different developmental stages (Gosner, 1960) of *Bombina variegata* at 0.01 µg/L isotreturon. Mean of three independent samples and standard deviation. *Significantly different compared to all the other stages.

toward CDNB was always higher in the soluble fraction than in the microsomal one (Fig. 7). Soluble GST activity increased significantly up to 23 nkat/mg protein in response to concentrations ≥ 1 µg/L IPU, whereas the activity of the mGST decreased significantly (3 nkat/mg protein) compared to control (5 nkat/mg protein). Measured activities toward DCNB were clearly smaller in comparison to the other substrates. No mGST activity was measurable in the control, whereas a rapid increase at 0.1 µg/L IPU to 0.7 nkat/mg protein followed by a decline was observed. In the soluble fraction, the activity of the GST was significantly elevated at 1 and 10 µg/L IPU. The activity of mGST toward fluorodifen increased up to 22 nkat/mg protein at 0.1 µg/L IPU and then significantly decreased below the control value. The sGST levels did not change significantly.

The study of time-dependent response demonstrated that toward CDNB the enzymatic response of the sGST fraction to IPU was elevated continuously with time up to 44 nkat/mg protein at 48 h (Fig. 8). The mGST activity increased slowly to 9 nkat/mg protein after 24 h IPU exposure. The range of the enzymatic response toward DCNB was clearly weak in comparison to the other substrates. Microsomal GST activity increased up to the maximum 0.4 nkat/mg protein after 6 h and then decreased. All activities differed significantly from the control. No activity of sGST in control toward DCNB was measured. After 48 h, an increase up to 0.6 nkat/mg protein was found. The activity of the mGST toward fluorodifen was always higher than that of the sGST at same concentrations. After 24 h a continuous increase up to 119 nkat/mg protein was observed, which remained at this level for the next 24 h. In addition,

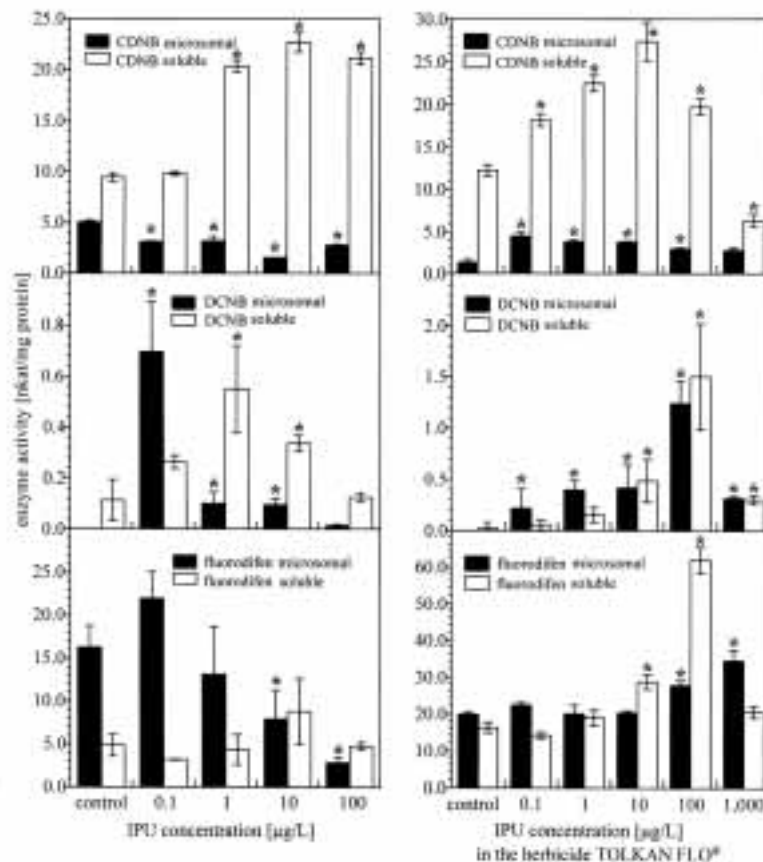


FIG. 7. Activities of soluble and microsomal glutathione-S-transferase (GST) toward CDNB, DCNB, and fluorodifen in different concentrations of isoproturon and the commercial herbicide Tolkan Flo in *Bombus terrestris*. Mean of three independent samples and standard deviation. * Significantly different compared to control.

the activity of the sGST exhibited an increase up to 46 nkat/mg protein after 48 h.

Effects of the Commercial Herbicide Tolkan Flo on GST Activity

In most cases, the enzyme activities after exposure to the herbicide Tolkan Flo were elevated compared to the response of GST activities in the exposure using pure IPU, especially toward fluorodifen and DCNB at concentrations of 100 µg/L (Fig. 7). At concentrations from 0.1 to 10 µg/L IPU in Tolkan Flo the sGST toward CDNB increased significantly to 27 nkat/mg protein and decreased in the following at 100 and 1000 µg/L, where the measured activity remained below the control value. Microsomal GST activities were characterized by smaller variations, but differed significantly from the control. No mGST activity toward DCNB was measured in the control. The activities of mGST and sGST fractions toward this substrate were elevated with

increasing Tolkan Flo concentrations up to 100 µg/L followed by a rapid decline. In contrast to the results obtained with the pure active substance, the mGST activity toward fluorodifen increased slightly. Variations were significant only at concentrations of 100 and 1000 µg/L Tolkan Flo. The sGST activity increased rapidly to 62 nkat/mg protein at 100 µg/L.

DISCUSSION

Field Studies

The concentration of IPU can be elevated in surface runoff to 110 µg/L dependent on precipitation, soil conditions, and draining (Johnson *et al.*, 1995; Patty and Gril, 1995) and in drainflow up to 465 (Harris, 1995) or 500 µg/L (Johnson *et al.*, 1996). In view of these results, measured levels of IPU in the investigated pond (0.2–22 µg/L) can be explained. Despite compliance of the spraying distance to reduce drift, up to 22 µg/L IPU were found, and other

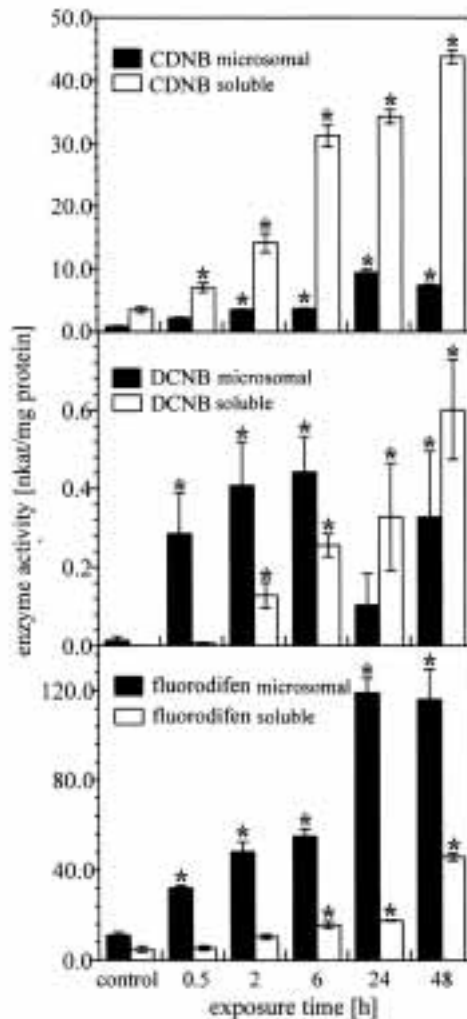


FIG. 8. Activities of soluble and microsomal glutathione-S-transferase (GST) toward CDNB, DCNB, and fluorodifen in *Bombina variegata* at different exposure times. Mean of three independent samples and standard deviation. * Significantly different compared to control.

authors detected concentrations in the same range, for example, up to 24 $\mu\text{g/L}$ (Spiteller, 2000) in surface water adjacent to agricultural treatment. Even if farmers follow good agricultural practice on a drained clay soil, IPU applied to winter cereals will reach nearby streams and ditches at levels of concern (Johnson *et al.*, 1996). Many samples of the present study exceeded the limit for total pesticides approved by the federal water quality guidelines for aquatic life, which is 0.3 $\mu\text{g/L}$. Leaching of IPU was particularly important in the first flushes (thunderstorm on 5/17/2000) after application of the herbicide. Brown *et al.* (1995) described similar results of IPU movement in a heavy clay soil.

In the arable landscape, many stressor compounds can affect the growth and development of the anuran larvae (Bishop *et al.*, 1999); thus, it is necessary to combine experiments in the field and in the laboratory to separate the effects. The observed physical and behavioral abnormalities caused by concentrations as low as 0.1 $\mu\text{g/L}$ indicate that the entry of IPU into the reproduction pond could be relevant for the development of spawn and tadpoles of *Bombina* species.

In order to mitigate the entry of IPU into reproduction ponds of sensitive species of amphibians, establishment of grassed buffer strips around the ponds should be considered. Patty and Gril (1995) observed that an 11-m-wide grassed buffer strip removed 98% of IPU from wheat plots during a 1-year cropping period.

Uptake and Metabolism of IPU

The results of the exposure with ring- ^{14}C -labeled IPU indicate uptake into the spawn of *B. bombina* in relevant ranges of environmental concentrations (1 $\mu\text{g/L}$ IPU). The jelly capsules adsorbed a small amount of IPU and, therefore, cannot protect the embryo from effects of the herbicide. This insufficient physical barrier of protection is reported for other pesticides for amphibians and fish (Hashimoto *et al.*, 1982; Wiegand *et al.*, 2000). In contrast, Berrill *et al.* (1998) and Pauli *et al.* (1999) reported that for amphibians the jelly coat surrounding the embryo provided a protective layer during growth and development. The protection of the forming embryo from pesticide contamination appears to be strongly dependent on tested species and investigated pesticides.

In addition, *B. bombina* and *B. variegata* were able to metabolize the phenyl-urea herbicide by cytochrome P450-dependent monooxygenases (Phase I of detoxication), because the typical metabolites (Haus, 1997; Glässgen *et al.*, 1999) were detected in both species.

Effects of IPU Exposure on Tadpoles

Up to 50% of the *B. variegata* tadpoles were paralyzed and died on exposure at IPU levels corresponding to environmentally relevant concentrations in agricultural ponds. Paralysis is likely to render tadpoles more vulnerable to predation (Berrill *et al.*, 1994). Entry of IPU into the reproduction ponds seems to be a decisive factor for adverse development of *B. variegata* tadpoles.

In contrast to Plötner and Günther (1987), who stated that newly hatched tadpoles with external gills were most sensitive to contamination of the aquatic habitats, current results revealed that tadpoles at developmental stage 25 were the most susceptible ones. Therefore, amphibians of these stage with complete operculum were used in exposure investigations. Pauli *et al.* (1999) confirmed that tadpoles at

stage 25 (about 2 weeks old) were the most sensitive in the four investigated amphibian species. However, older amphibian larvae at stage 40 appeared to be more sensitive than larvae at stage 29 for two species and the chemicals tested by Howe *et al.* (1998). The sensitivity of certain developmental stages of amphibians appear to differ dependent on chemical substances and tested species.

Effects on GST System

In plants, the GSTs transform the reactive metabolites of IPU to more hydrophilic compounds by conjugation of glutathione (Haas, 1997). In amphibian tadpoles, this detoxication pathway could also occur *via* the GST system, but an IPU-glutathione conjugate has not yet been proven. For each level of treatment the mGSTs and sGSTs of *B. variegata* were influenced by dose and exposure time of IPU. The changes of the activities were strongest toward DCNB and fluorodifen. With exception of the β -class enzymes, all other GSTs are involved in conjugation of DCNB (George, 1994). Pflugmacher and Steinberg (1997) reported that the ability to conjugate fluorodifen seemed to be limited to the soluble fraction, using various macrophytes and limnic algae. In contrast, in *B. variegata* the activity of the mGST as well as the sGST for the model substrate fluorodifen seemed to be constitutive. By comparison of the substrates, the low levels of enzyme activities toward DCNB might indicate the weakness of corresponding isoenzymes.

Compared to the exposure to the pure active IPU the levels of detoxication enzymes after treatment with the commercial herbicide Tolkan Flo were significantly enhanced—twice in case of DCNB and fluorodifen. Thus, Tolkan Flo provoked a stronger enzymatic response in the tadpoles than pure IPU. This could be caused by the presence of an emulsifier in the Tolkan Flo formulation which enhanced the availability of IPU and/or the interaction between IPU and emulsifier. Bidwell and Tyler (1997) investigated the toxicity of the commercial herbicide Roundup 360 and its active ingredient glyphosate to larvae of *Litoria moorei*. Compared to the pure glyphosate, Roundup 360 proved to be the more toxic mixture. Adverse effects of formulation and detergents on amphibians have been described by other researchers (Mann and Bidwell, 1999; Plötner and Günther, 1987). The described effects of formulation and mixtures require further investigations using additional common herbicides in combination with other formulations and detergents.

Here the treatment with the commercial herbicide Tolkan Flo caused an increase of the enzymatic response for all tested isoenzymes up to maximum activities at 10 or 100 $\mu\text{g/L}$ IPU. At higher concentrations (1000 $\mu\text{g/L}$), the detoxication was limited. *Bombina* tadpoles are not able to tolerate such high concentrations, which are rarely observed in surface waters. In contrast, the maximum enzyme activity

after exposure to pure IPU was reached at concentrations as low as 0.1 or 1 $\mu\text{g/L}$ IPU, especially in the microsomal fraction. Obviously, the effects of the treatment were triggered at these environmentally relevant concentrations, but with reduced enzymatic response.

Data indicate that the glutathione system constitutes a sensitive biochemical indicator of pollution by IPU to tested species. In order to regain physiological balance, the amphibians must spend energy for detoxication. This may cause delays in growth, development, and mobility, and lead to a reduction in physiological fitness (Allran and Karasov, 2000; Bridges, 1997; Diana *et al.*, 2000).

In the past the effects of pesticides on metamorphosis, growth, behavior, and mortality of amphibians were investigated intensively (Bridges, 1997; Fioramonti *et al.*, 1997; Howe *et al.*, 1998; Pauli *et al.*, 1999). In contrast to current investigations, significant effects occurred mostly at concentrations exceeding the environmentally relevant range. These discrepancies may be interpreted on the basis of differences in species sensitivity or differences in substrates used among the studies. Experimental exposure of amphibians to other pesticides clearly indicated that there exist differences in sensitivity among anuran species and life stages (Berrill *et al.*, 1994; Pauli *et al.*, 1999; Allran and Karasov, 2000).

CONCLUSIONS

The aim of this study was to investigate the combination of morphological effects and enzymatic response of sensitive amphibian tadpoles on contamination with IPU. Data suggest that, according to the rules of agriculture, the use of herbicides containing IPU has adverse effects on the development of early larval stages of *Bombina* species. The results of these studies indicate that spawn and tadpoles of *B. variegata* seemed to be much more susceptible to pollution by IPU as predicted by data on fish and invertebrates.

The investigation of xenobiotic metabolism is important in order to advance understanding of chemical toxicity at the individual, population, or community levels in aquatic ecosystems. In future studies involving amphibians of different species the combinations of IPU with other formulations should be investigated in order to underline the fact that the toxicity of IPU is modulated by the emulsifier. Based on these investigations it will be possible to make suggestions for sustainable agricultural management in ranges of distribution of sensitive amphibian species.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from the German Federal Foundation for the Environment (Contract No. 06000/718). The authors are grateful to A. Fiedler (Berliner Stadtgüter), the farm manager, for cooperation in the course of the field studies. The authors thank Dr. C. Wiegand for helpful discussions and W. Firth for help with the language.

REFERENCES

- Allan, J. W., and Karasov, W. H. (2000). Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2850-2855.
- Berger, B., and Heiteluss, R. (1991). Use of isoproturon, alone and in combination with other compounds, on winter wheat and winter barley. *Weed Res.* **31**, 9-18.
- Berrill, M., Bertram, S., McGillivray, L., Kolohon, M., and Pauli, B. (1994). Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 657-664.
- Berrill, M., Bertram, S., Pauli, B. D., Coulson, D. R., Kolohon, M., and Ostrander, D. (1995). Comparative sensitivity of amphibian tadpoles to single and pulsed exposures of the forest-use insecticide fenitrothion. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 1011-1018.
- Berrill, M., Coulson, D. R., McGillivray, L., and Pauli, B. D. (1998). Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1738-1744.
- Bidwell, J., and Tyler M. J. (1997). *Herbicides Pose Threat to Frogs and Toads*. Abstracts from Third World Congress in Herpetology, 3-10 August 1997, Prague, Czech Republic.
- Bishop, C. A., Mahony, N. A., Strager, J., NG, P., and Pettit, K. E. (1999). Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the holland river watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environ. Monit. Assess.* **57**, 21-43.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bridges, C. M. (1997). Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1935-1939.
- Brown, C. D., Hodgkinson, R. A., Rose, D. A., Syers, J. K., and Wilcockson, S. J. (1995). Movement of pesticides to surface waters from a heavy clay soil. *Pestic. Sci.* **43**, 131-140.
- Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Pennelli, A., Cornelio, L., Romagnoli, R., Mellino, S., Petruzelli, R., and Di Ilio, C. (1999). Characterisation of toad glutathione transferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 189-198.
- Di Ilio, C., Aceto, A., Bucciarelli, T., Dragani, B., Angelucci, S., Miranda, M., Poma, A., Amicarella, F., Barra, D., and Federici, G. (1992). Glutathione transferase isoenzymes from *Bufo bufo* embryos at an early developmental stage. *Biochem. J.* **283**, 217-222.
- Diana, S. G., Reseatis, Jr. W. J., Schaeffer, D. J., Beckmen, K. B., and Beasley, V. R. (2000). Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2961-2967.
- Donnarumma, L., De Angelis, G., Gramenzi, F., and Vittozzi, L. (1988). Xenobiotic metabolizing enzyme systems in test fish. III. Comparative studies of liver cytosolic glutathione S-transferase. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **16**, 180.
- Fioramonti, E., Semlitsch, R. D., Reyer, H. U., and Fent, K. (1997). Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1940-1947.
- George, S., Buchanan, G., Nimmo, I., and Hayes, J. D. (1989). Fish and mammalian liver cytosolic glutathione S-transferase: Substrate specificities and immunological comparison. *Mar. Environ. Res.* **28**, 1.
- George, S. G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* (D. C. Malins and G. K. Ostrander, Eds.), pp. 37-85. Lewis, Searcy, AK.
- Glissgen, W. E., Komossa, D., Bohnenkaemper, O., Hass, M., Herikorn, N., May, R. G., Szymczak, W., and Sandermann, H. Jr. (1999). Metabolism of the herbicide isoproturon in wheat and soybean cell suspension cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* **63**, 97-113, doi: 10.1006/pest.1999.2394.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**, 183-190.
- Haas, M. (1997). *Metabolisierung von Xenobiotika durch pflanzliche Zellkulturen und Enzyme*. PhD thesis, Technische Universität, München-Weihenstephan, Germany.
- Habig, W., Papst, M. J., and Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase: The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 1730-1739.
- Hall, R. J., and Henry, P. F. P. (1992). Assessing the effects of pesticides on amphibians and reptiles: Status and needs. *Herpetol. J.* **2**, 65-71.
- Harris, G. L. (1995). *Pesticide Loss to Water—A Review of Possible Agricultural Opportunities to Minimise Pesticide Movement*. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK pp. 371-380.
- Hashimoto, Y., Okubo, E., Ito, T., and Yamaguchi, M. (1982). Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth. *J. Pestic. Sci.* **7**, 457-461.
- Hayes, J. D., and Wolf, C. R. (1988). Role of glutathione transferase in drug resistance. In *Glutathione Conjugation Mechanisms and Biological Significance* (H. Sies and B. Ketterer, Eds.), pp. 316-356. Academic Press, New York.
- Hecnar, S. J. (1995). Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 2131-2137.
- Herrmann, H. J., Gussel, R., and Matz, W. (1988). Zur Fortpflanzung der einheimischen Froschlurche (Amphibia, Anura) in Labor und Terrarium. *Tagungsmat. Amphibien*, 2-15.
- Hoque, E. (1998). Beiträge zu Wirkungsgefüge und Systemantwort der Pflanzen und Pilze auf Stress. DSc thesis, Technische Universität, Dresden, Germany.
- Howe, E. H., Gillis, R., and Mowbray, R. C. (1998). Effect of chemicals synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 519-525.
- Johnson, A. C., Hara, A. H., Bhardwaj, C. L., Williams, R. J., and Walker, A. (1996). Preferential flow pathways and their capacity to transport isoproturon in a structured clay soil. *Pestic. Sci.* **48**, 225-237.
- Johnson, A. C., Hara, A. H., Cruston, V. L., Batchelor, C. H., and Williams, R. J. (1995). *Isoproturon and Anion Transport by Preferential Flow through a Drained Clay Soil*. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp. 105-110.
- Leiva, F. R., Morris, J., and Blackmore, B. S. (1997). Precision farming techniques for sustainable agriculture. In *Proceedings, First European Conference on Precision Agriculture, 8-10 September 1997, Warwick, UK*.
- Leiss, M. (1993). Zur Ökotoxikologie der Einträge von landwirtschaftlich genutzten Flächen in Fließgewässer. PhD thesis, Universität Braunschweig, Germany.
- Mann, R. M., and Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 193-199.
- Marking, L. L. (1977). *Method for Assessing Additive Toxicity of Chemical Mixtures*. STP 634. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

- Patty, L., and Gril, J. J. (1995). *Grassed Buffer Strips to Reduce Herbicide Concentration in Runoff—Preliminary Study in Western France*. British Crop Protection Council Monograph 62. Pesticide movement to water, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp. 397–406.
- Pauli, B. D., Coulson, D. R., and Berrill, M. (1999). Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to MIMIC 240LV insecticide following single or double exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 2538–2544.
- Perkow, W. (1988). Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Paul Parey Verlag, Berlin.
- Pflugmacher, S., and Steinberg, C. E. W. (1997). Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes. *J. Appl. Botany* **71**, 144–146.
- Plötner, J., and Günther, R. (1987). Toxicity of an anionic detergent to the spawn and larvae of anurans (amphibia). *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **72**, 759–771.
- Schiemenz, H. (1979). Schutzmassnahmen für Amphibienlaichgewässer. *Feldherpetologische Mitteilungen* **2**, 2–6.
- Schneeweiss, N. (1993). Zur Situation der Rotbauchunke *Bombina orientalis* Linnaeus, 1761, in Brandenburg. *Naturschutz Landschaftspflege Brandenburg* **2**, 8–11.
- Schneeweiss, N. (1996). Zur Verbreitung und Bestandsentwicklung *Bombina orientalis* LINNAEUS, 1761 in Brandenburg. In *Die Rotbauchunke (Bombina orientalis) Ökologie und Bestandsituation: RANA Sonderheft 1* (A. Krone, and K. D. Kühnel, Ed.), pp. 87–103. Natur und Text, Rangsdorf, Germany.
- Schröder, P., Pflugmacher, S., and Rennenberg, H. (1992). Biomarker für organische Schadstoffe in Fichten (*Picea abies* L.) Dynamik des Enzymes Glutathion S-Transferase. *Angewandte Botanik* **66**, 174–179.
- Spiteller, M. (2000). Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Oberflächengewässern und Massnahmen zur Reduktion des Eintrages. Proceedings, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Weimar, Germany, May 29–31, 2000, pp. 119–124.
- Trautspurger, W., Schäfer, H., and Remde, A. (1996). Comparative investigation on the effect of a herbicide on aquatic organisms in single species tests and aquatic microcosms. *Chemosphere* **33**, 1129–1141.
- Umweltbundesamt. (2000). Schätzung der Einträge von Pflanzenschutzmitteln aus der Landwirtschaft in die Oberflächengewässer Deutschlands. UBA-Bericht 3/2000. Final Report. Umweltbundesamt, Berlin, Germany.
- Wake, D. B. (1991). Declining amphibian populations. *Science* **253**, 860.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., and Steinberg, C. E. W. (2000). Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 122–131, doi: 10.1006/eesa.1999.1845.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meens, N., Beattie, K. A., Steinberg, C. E. W., and Codd, G. A. (1999). Uptake and effects of Microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* **14**, 89–95.

Untersuchungen zur Wasserqualität eines Reproduktionsgewässers von Amphibien

mit 2 Abbildungen, 3 Grafiken und 1 Tabelle von den Verfassern

Zusammenfassung

Die vorliegende Studie beschreibt den Frühjahrsaspekt eines Reproduktionsgewässers von Amphibien inmitten intensiv genutzter Agrarlandschaft nordöstlich von Berlin. Neben der Charakterisierung des Gewässers mit Hilfe hydrochemischer und physikalischer Daten wurde die Migration der Amphibien im Frühjahr untersucht. Das als schwach hypertroph einzuordnende Kleingewässer bot neun Amphibienarten Reproduktions- und Lebensraum.

Einleitung

Mit Ausnahme des Alpensalamanders sind Laich- und Larvalentwicklung aller heimischen Amphibienarten an geeignete Gewässer gebunden. Die aquatischen Habitate der Amphibien sind durch die land- und forstwirtschaftliche Nutzung der Landschaft stark geprägt. (SCHÄFER & KNEITZ 1993). In Abhängigkeit von den Chemikalieneigenschaften, den Witterungsbedingungen und Applikationstechniken geht ein mehr oder minder großer Anteil während oder nach der Ausbringung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln in die angrenzenden Ökosystemkomponenten verloren. Bedeutende Eintragswege sind dabei der Oberflächenabfluss sowie Sprühabtrift und Einträge über Dränaugen (LISS & SCHULZ 1995). Amphibienpopulationen reagieren besonders empfindlich auf die Belastung ihrer Reproduktionsgewässer mit Pestiziden, Stickstoff-Düngemitteln und durch saure Niederschläge (HALL & HENRY 1992, HECNAR 1995).

In Abhängigkeit vom Ertragspotential der Böden unterliegen die kleingewässerreichen Grundmoränenplatten Nordostdeutschlands größtenteils intensiver landwirtschaftlicher Nutzung. Gleichzeitig sind diese Ackerbaustandorte wesentliche Verbreitungszentren einheimischer Amphibienarten (SCHNEEWEISS 1996). An einem solchen, von intensiver agrarischer Nutzung umgebenen Gewässer wurde das Arteninventar an Amphibien aufgenommen und die Wasserqualität im Frühjahr mehrfach untersucht.

Untersuchungsgewässer

Die Freilanduntersuchungen erfolgten in einem intensiv landwirtschaftlich genutzten Jungmorä-

Abstract

The presented study describes the structure and quality of a reproduction pond of amphibians in an intensively used agricultural landscape northeast of Berlin during spring time. Using hydrochemical and physical data, the water quality was evaluated and the spring migration of amphibians in spring was investigated. Although the pond was classified as weakly hypertrophic, nine amphibian species used it as reproductions site and summer habitat.

nengebiet, nordöstlich von Berlin zwischen der Stadt Bernau und dem Dorf Börnicke gelegen, das sich durch eine Vielzahl z. T. eiszeitlich geprägter Sölle und Kleingewässer auszeichnet.

Eines dieser temporären Kleingewässer mit einer Wasserfläche von 0,7 ha und einer maximalen Wassertiefe von 1,8 m im Frühjahr 2000 wurde für die Untersuchungen ausgewählt (Abb. 1). In der Nähe des Untersuchungsgewässers (ca. 100 m) befindet sich in einer ehemaligen Parkanlage eines der bevorzugten Winterquartiere der Amphibien.

Material und Methoden

Zur Erfassung der Einwanderung der Amphibien zum Reproduktionsgewässer im Frühjahr wurde eine Teilabschrankung des Gewässers in Richtung der Winterquartiere mittels eines Folienzaunes vorgenommen. Im Abstand von jeweils 15 m wurden 17 Eimer unmittelbar am Folienzaun ebenerdig eingegraben. Die Kontrolle der Fangeimer erfolgte im Zeitraum vom 01.03. bis 23.05.2000 täglich in den Morgenstunden. Dabei wurden Art, Anzahl, Alter und Geschlecht der Amphibien erfasst (Abb. 2).

Im Zeitraum vom 14.03. bis 23.05.2000 wurden in 14-tägigem Rhythmus hydrochemische und -physikalische Parameter einer Schöpfprobe (Entnahme aus ca. 30 cm Tiefe) des Untersuchungsgewässers erfasst. Elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Wassertemperatur sowie Sauerstoffkonzentration und -sättigung wurden direkt vor Ort mit Elektroden der Fa. WTW gemessen. Die Wasserproben wurden dunkel und gekühlt transportiert. Im Labor erfolgte die quantitative Bestimmung der Nährstoffe (Ammonium-, Nitrit-, Nitrat-, Phos-



Abb.1:
Frühjahrsaspekt am Untersuchungsge-
wässer.

Abb. 2:
Zaunkontrolle zur Frühjahrsanwan-
derung der Amphibien.



phationen), von Chlorid und Sulfat photometrisch mit standardisierten Tests der Fa. Macherey & Nagel. Die Carbonathärte der Wasserproben wurde titrimetrisch analysiert (Tab. 1).

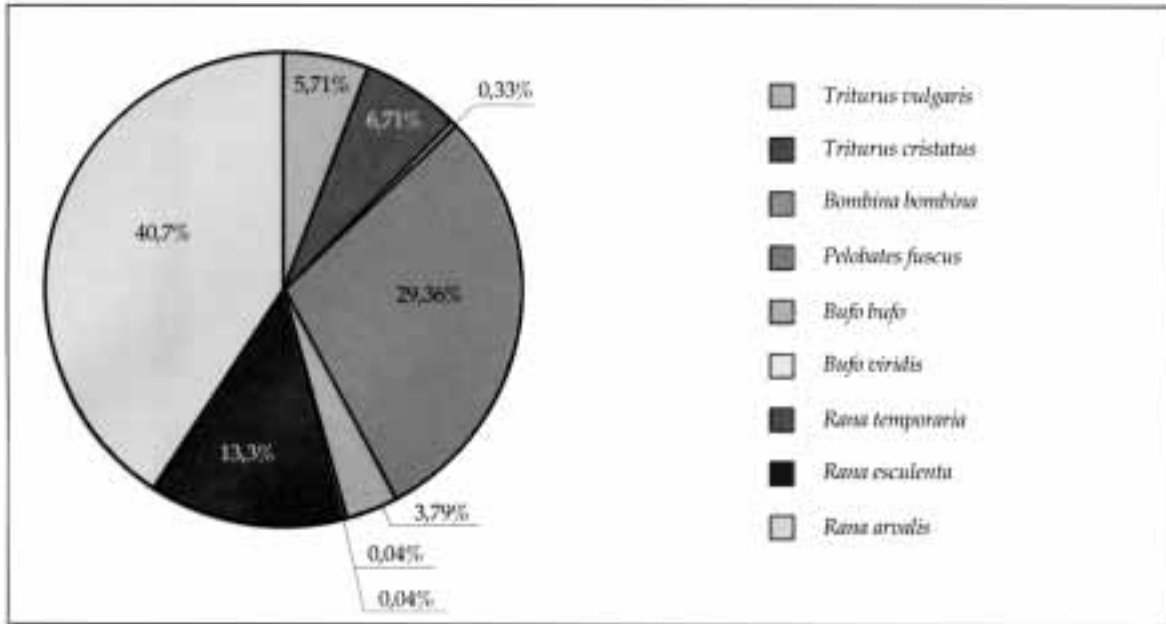
Ergebnisse und Diskussion

Amphibienmigration

Am Folienzaun konnten während der Frühjahrsanwanderung insgesamt 2398 Amphibien (9 verschiedene Arten) gefangen werden (Grafik 1). Moorfrosch (*Rana arvalis*) und Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*) waren mit 976 bzw. 704 Exemplaren deutlich häufiger vertreten als andere Arten (Grafik 3). Von Grasfrosch (*Rana temporaria*) und Wechselkröte (*Bufo viridis*) wurde nur je ein Tier gefangen. Auch die Molcharten waren mit 298 In-

dividuen am Untersuchungsgewässer vertreten. Über den gesamten Zeitraum konnten acht Rotbauchunken (*Bombina bombina*) registriert werden. 27% aller gefangenen Amphibien wurden als subadult eingestuft, nahmen also sicher noch nicht am Fortpflanzungsgeschehen teil. Bei der Mehrzahl der Arten wurde ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis der Adulti verzeichnet ($\sigma^{\sigma}:\text{♀}\text{♀} = 1:1,02$).

Berücksichtigt man, dass es sich nur um eine Teilabschrankung eines Gewässers während der Frühjahrsanwanderung der Amphibien handelte, belegen die Anzahl der gefangenen Individuen (2398) und das vielfältige Artenspektrum die Bedeutung des Untersuchungsgewässers als Laichhabitat bzw. Trittsteinbiotop auf dem Weg zu anderen Repro-

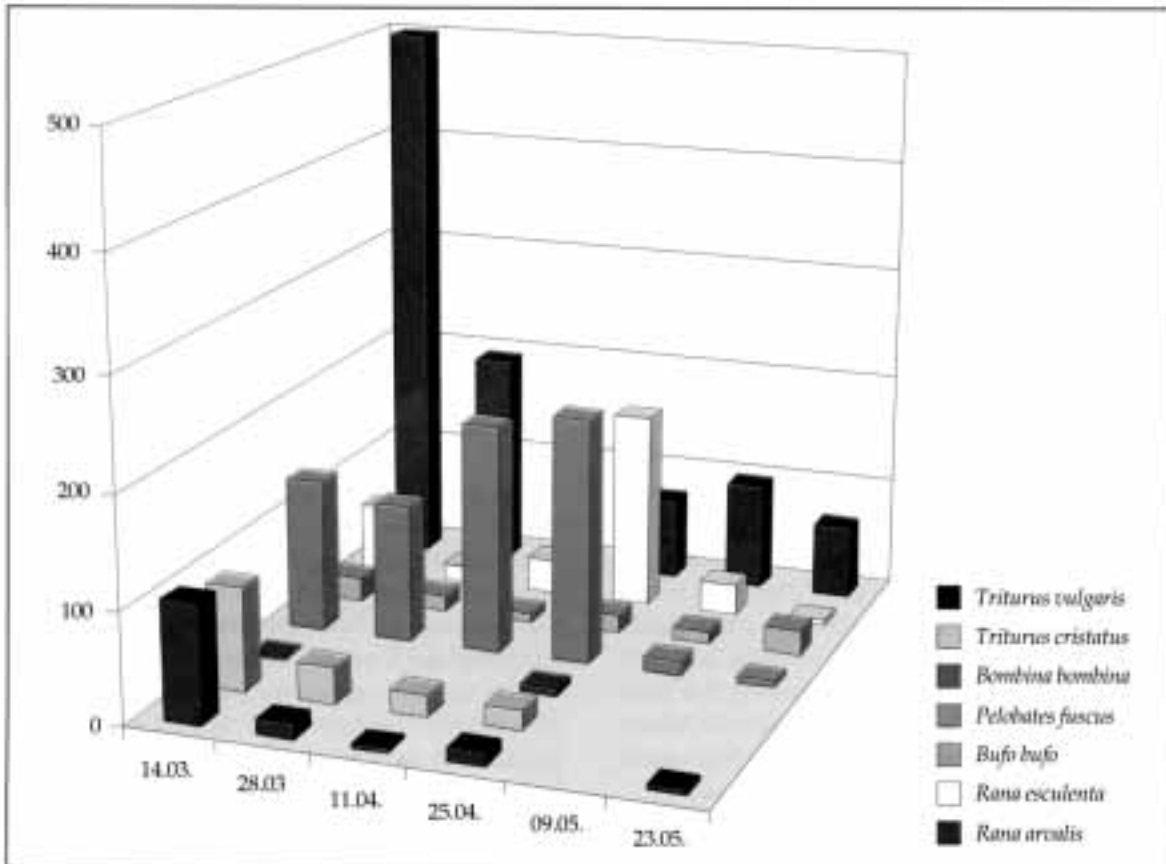


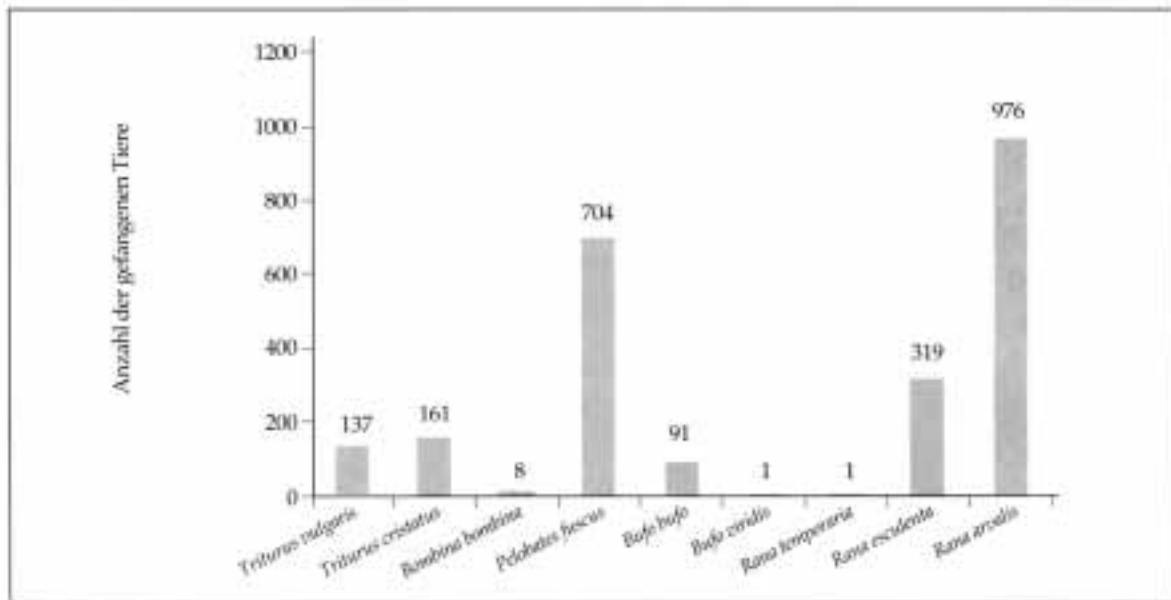
Grafik 1 (oben):

Dominanzspektrum der im Zeitraum vom 01.03.2000 bis zum 23.05.2000 am Untersuchungsgewässer anwandernden Amphibien.

Grafik 2 (unten):

Dynamik der Anwanderung der Amphibien im Zeitraum vom 01.03.2000 bis zum 23.05.2000.





Grafik 3: Abundanz der im Zeitraum vom 01.03.2000 bis zum 23.05.2000 am Untersuchungs-gewässer anwandernden Amphibien.

duktionsgewässern im Untersuchungsgebiet. Eine ähnliche Vergesellschaftung der Arten mit starker Dominanz von Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*) und Moorfrosch (*Rana arvalis*) beschrieben BERGER et al. (1999) für eine intensiv landwirtschaftlich genutzte Grundmoräne in Ostbrandenburg.

Mit Ausnahme des Teichmolches (*Triturus vulgaris*) und des Wasserfrosches (*Rana esculenta*) sind alle anderen im Untersuchungs-gewässer lebenden Amphibien gemäß der Roten Liste der Bundesrepublik und des Landes Brandenburg als »gefährdet« bzw. »stark gefährdet« eingestuft. Selbst die in die Kategorie »vom Aussterben bedroht« einzu-ordnende Rotbauchunke (*Bombina orientalis*), die besonders sensitiv auf die Beeinträchtigung ihrer Habitate reagiert (SCHIEMENZ 1979, HERRMANN et al. 1988, SCHNEEWEISS 1993), schien im Untersu-chungsgewässer geeignete Strukturen und eine ausreichende Wasserqualität vorzufinden.

Die Dynamik der Einwanderung war erwartungs-gemäß artspezifisch verschieden (Grafik 2). Innerhalb der ersten 14 Tage des Untersuchungszeit-raumes wurden 77% der Teichmolche und 58% der Kammmolche am Zaun registriert. Bis Ende März waren auch 71% der frühlaichenden Moor-frösche angewandert, wobei bis Ende Mai immer wieder Moorfrösche zum Gewässer kamen. Ein Großteil der Wasserfrösche (56%) wurde in der zweiten Aprilhälfte am Zaun gefangen. Die An-

wanderung der Knoblauchkröten war Ende April nahezu abgeschlossen (97%). Eine vergleichsweise kontinuierliche Einwanderung wies die Erdkröte auf. In der Trockenperiode zwischen dem 01.05. und 17.05.2000 wurden immerhin 32% der Erdkröten am Zaun registriert, während deutlich weniger Tiere der anderen Arten wanderten.

Da die Einwanderung der Amphibien artspezifisch verschieden ist und von den Witterungsbedingun-gen beeinflusst wird, sind feststehende Terminvor-gaben für die landwirtschaftliche Bearbeitung der Flächen kaum möglich (STOEGER & SCHNEEWEISS 1999).

Qualität des Reproduktionsgewässers

Als Summenparameter für die Ionenkonzentration des Wassers wurde die Elektrische Leitfähigkeit herangezogen, die im Untersuchungs-gewässer im Bereich zwischen 500 und 770 $\mu\text{S}/\text{cm}$ lag (Tab.1). STIPPROWEIT (1984) ordnete Gewässer mit Leit-fähigkeiten über 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ als stark belastet ein. Die gemessenen höheren Leitfähigkeiten waren aufgrund der Lage des Untersuchungs-gewässers inmitten intensiv genutzter Agrarfläche zu erwar-ten. Ackerhohlformen sind Senken zum Einzug des Oberflächenwassers und z. T. Mündung von Dränagen, somit verstärktem Stoffimport ausge-setzt (KALETKA 1996).

Datum	14.03.	28.03.	11.04.	25.04.	09.05.	23.05.
Uhrzeit	08:15	09:00	08:30	09:20	08:05	08:15
Wassertemperatur (° C)	5,9	9,5	7,6	15,3	15,7	14,6
Sauerstoff (mg/l)	11,3	14,5	7,3	5,6	5,0	9,0
Sauerstoffsättigung (%)	91	125	62	53	52	91
pH-Wert	7,6	8	7,5	7,5	7,4	7,6
Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	694	768	756	672	650	503
Chlorid (mg/l)	42	42	49	48	38	50
Sulfat (mg/l)	157	140	134	119	104	94
Ammonium (mg/l)	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
Nitrit (mg/l)	0,09	0,08	0,04	0,03	0,03	0,03
Nitrat (mg/l)	5	2	3	4	4	5
Orthophosphat (mg/l)	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2
Carbonathärte (° dH)	10,5	12	11,5	11	11	10,5

Tabelle 1:
Hydrochemische Daten des Untersuchungsgewässers; gemessen im Frühjahr 2000.

Mittlere Carbonathärten (10,5–12° dH) beschreiben die gute Pufferung des untersuchten Kleingewässers. Durch Assimilation entzogenes Kohlendioxid konnte leicht nachgeliefert werden, so dass kein extremer Anstieg des pH-Wertes registriert wurde. Die pH-Werte lagen im schwach basischen Bereich zwischen 7,4 und 8,0. Das entsprach den Erwartungen für eutrophe Gewässer. Aufgrund des stabilen Puffersystems erlangte der u. a. von CLAUSNITZER (1987), BÖHMER & RAHMANN (1990) beschriebene schädliche Einfluss saurer Niederschläge auf die Larvalentwicklung der Amphibien im Untersuchungsgewässer keine Bedeutung.

Der Sauerstoffgehalt im Gewässer nahm im Untersuchungszeitraum von maximaler Konzentration 14,5 mg/l auf 5 mg/l gemessen am Ende einer 14-tägigen Trockenperiode ab. Sauerstoffübersättigungen im Frühjahr, wie hier Ende März mit 125%, sind in Kleingewässern nicht ungewöhnlich (SCHLÜPMANN 1993). Die Wasserlöslichkeit des Sauerstoffs ist druck- und temperaturabhängig, darum unterliegt der Gehalt in den Gewässern starken raumzeitlichen Schwankungen. Der Anstieg des Sauerstoffgehaltes im Gewässer zum Zeitpunkt der letzten Probenahme (23.05.2000) war mit Sicherheit auf vorangegangene starke gewittrige Niederschläge (Regen, Wind, geringere Wassertemperaturen) zurückzuführen.

Im betrachteten Frühjahrsaspekt waren die Stickstoffkonzentrationen (Ammonium-, Nitrit-, Nitra-

tionen) im Untersuchungsgewässer erwartungsgemäß gering. Ebenfalls belegen niedrige Orthophosphat-Konzentrationen (0,2–0,5 mg/l) im Freiwasser im Zusammenhang mit der beobachteten Zunahme des Phytoplanktons und Makrophythenwachstums die starke Biomasseproduktion im Gewässer. Im Untersuchungsgewässer begannen sich im Frühjahr neben den dominierenden Arten wie Schilf (*Phragmites australis*), Rohrglanzgras (*Phalaris arundinacea*), Gemeinem Froschlöffel (*Alisma plantago-aquatica*), Schwimmendem Laichkraut (*Potamogeton natans*), Kleiner Wasserlinse (*Lemna minor*), Gemeinem Wasserhahnenfuß (*Ranunculus aquatilis*) und Ampfer-Arten (*Rumex spec.*), in geringerem Umfang auch Einfacher Igelkolben (*Sparganium emersus*) und die Wasserfeder (*Hottonia palustris*) zu etablieren. STIPPROWEIT (1984), HÖLL (1979) wiesen Gewässer mit Orthophosphat-Konzentrationen über 0,3 mg/l als verunreinigt aus. Dieser Grenzwert wurde bei einer Beprobung Ende April überschritten.

Im Untersuchungsgewässer wurden Chloridkonzentrationen im Bereich von 38–50 mg/l gemessen. Aufgrund der geologischen Bedingungen sind Werte um 100 mg/l Chlorid in Oberflächenwässern des Norddeutschen Tieflandes nicht ungewöhnlich (KLEE 1991). Unbelastete stehende Gewässer wiesen Chloridkonzentrationen bis 30 mg/l auf (STIPPROWEIT 1985), so konnte der Chloridgehalt im Untersuchungsgewässer als mäßig eingestuft werden.

Für unbelastete Gewässer liegen die Sulfatkonzentrationen zwischen 10 und 50 mg/l. Selbst der im Untersuchungsgewässer gemessene Minimalwert von 94 mg/l Sulfat überschritt diesen Bereich um ein Vielfaches. In der Literatur wird auf den erhöhten Sulfatgehalt landwirtschaftlicher Abwässer hingewiesen (STIPPROWEIT 1984). Möglicherweise wurde die Wasserqualität dadurch beeinträchtigt.

Unter Nutzung einer von SCHLÜPMANN (1992) für Kleingewässer vorgeschlagenen Gliederung nach dem Grad der Eutrophierung war das Untersuchungsgewässer als schwach hypertroph einzuordnen. Seine Strukturen und hydrochemischen Verhältnisse im Frühjahr schienen jedoch eine ausreichende Qualität aufzuweisen, um von den Amphibien als Reproduktionsgewässer oder Trittssteinbiotop auf dem Weg zu anderen Gewässern im Untersuchungsgebiet genutzt zu werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Stipendienprogramm der Deutschen Bundesstiftung Umwelt gefördert. Für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Freilandarbeiten möchten die Autoren den Mitarbeitern der Naturschutzstation Rhinluch des Landesumweltamtes Brandenburg und den Bearbeitern des Projektes »Herpetofauna 2000« danken.

Literatur

BERGER, G., SCHÖNBRODT, T., LANGER, C. & H. KRETSCHMER (1999): Die Agrarlandschaft der Lebusplatte als Lebensraum für Amphibien. In: KRONE, A., KÜHNEL, K. D. & N. SCHNEEWEISS (Hrsg.): Amphibien in der Agrarlandschaft. - RANA, Rangsdorf (Natur und Text), Sonderheft 3: 81-99.

BÖHMER, J. & H. RAHMANN (1990): Influence of surface water acidification on amphibians. - In: HANKE, W. (Hrsg.): Fortschritte der Zoologie / Biology and Physiology of Amphibians. - Stuttgart, New York (G. Fischer Verl.), 38: 287-309.

CLAUSNITZER, H. J. (1987): Gefährdung des Moorfrosches (*Rana arvalis* NILSSON) durch Versauerung der Laichgewässer. - Beih. Schriftenr. Naturschutz Landschaftspf. Niedersachs. 19: 131-137.

HALL, R. J. & P. F. HENRY (1992): Assessing the effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. - Herpetol. J. 2: 65-71.

HÉCNAR, S. J. (1995): Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. - Environmental Toxicology and Chemistry, 14: 2131-2137.

HERRMANN, H. J., GASSEL, R. & W. MATZ (1988): Zur Fortpflanzung der einheimischen Froschlurche (*Amphibia, Anura*) in Labor und Terrarium. - In: HERRMANN, H. J. (Hrsg.): Haltung und Vermehrung von Amphibien in Labor und Terrarium (Tagungsmaterial). - Naturhist. Mus. Schloss Bertholdsburg, Schleusingen, 2-15.

HÖLL, K. (1979): Wasser. - Berlin, New York (W. de Gruyter), 955 S.

KALETKA, T. (1996): Die Problematik der Sölle (Kleinhohlformen) im Jungmoränengebiet Nordostdeutschlands. - Naturschutz und Landschaftspflege in Brandenburg, Sonderheft Sölle: 4-12.

KLEE, O. (1991): Angewandte Hydrobiologie. - Stuttgart, New York (G. Thieme Verl.), 272 S.

LIESS, M. & R. SCHULZ (1995): Ökotoxikologische Bewertung von Pflanzenschutzmittel-Einträgen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen in Fließgewässern. In: STEINBERG, C., BERNHARDT, H. & H. KLAPPER (Hrsg.): Handbuch Angewandte Limnologie. - Lambsberg a. Lech (Ecomed-Verl.): 1-44.

SCHÄFER, H. J. & G. KNETZ (1993): Entwicklung und Ausbreitung von Amphibienpopulationen in der Agrarlandschaft - ein E+E-Vorhaben. - Natur und Landschaft, 68 (7/8): 376-385.

SCHIEMENZ, H. (1979): Schutzmaßnahmen für Amphibienlaichgewässer. - Feldherpetol. Mitt., 2: 2-6.

SCHLÜPMANN, M. (1992): Kartierung und Bewertung stehender Gewässer. - In: EIKHORST, R. (Hrsg.): Beiträge zur Biotop- und Landschaftsbewertung. - Duisburg (Verl. f. Ökologie u. Faunistik), 149-176.

— (1993): Hydrochemische Untersuchungen an stehenden Kleingewässern des Hagener Raumes. - Mehlerer Schriftenreihe für Naturschutz 4: 149-162.

SCHNEEWEISS, N. (1993): Zur Situation der Rotbauchunke *Bombina orientalis* LINNAEUS, 1761, in Brandenburg. - Naturschutz und Landschaftspflege in Brandenburg 2: 8-11.

— (1996): Habitatfunktion von Kleingewässern in der Agrarlandschaft am Beispiel der Amphibien. - Naturschutz und Landschaftspflege in Brandenburg, Sonderheft Sölle: 13-17.

STIPPROWEIT, A. (1984): Chemische und physikalische Vorgänge in Gewässern und deren biologische Bedeutung (1. Teil). - Natur- und Landschaftskunde 20: 40-44.

— (1985): Chemische und physikalische Vorgänge in Gewässern und deren biologische Bedeutung (2. Teil). - Natur- und Landschaftskunde 21: 33-42.

STOFFER, M. & N. SCHNEEWEISS (1999): Zeitliche und räumliche Aspekte beim Schutz von Amphibien in der Agrarlandschaft des Barnims. In: KRONE, A., KÜHNEL, K. D. & N. SCHNEEWEISS (Hrsg.): Amphibien in der Agrarlandschaft. - RANA, Rangsdorf (Natur und Text), Sonderheft 3: 41-48.

Anschrift der Verfasser:

KERSTIN GREULICH & DR. STEPHAN PFLUGMACHER
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei
im Forschungsverbund Berlin e.V.
AG: Biogeochemical Regulation
Müggelseedamm 301
D-12587 Berlin
e-mail: greulich@igb-berlin.de

**Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin
in embryos and tadpoles of amphibians**

Kerstin Greulich, Stephan Pflugmacher*

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 12587 Berlin, Germany

Working Group Biogeochemical Regulation

* author for correspondence

Running Head: **Effects of cypermethrin on embryos and tadpoles of amphibians**

Kerstin Greulich

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries

Working Group Biogeochemical Regulation

Müggelseedamm 301

12587 Berlin

Germany

phone 004930/64181629

fax 004930/64181682

e-mail greulich@igb-berlin.de

Corresponding Author:

Dr. Stephan Pflugmacher

Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries

FG Biogeochemical Regulation

Müggelseedamm 301

12587 Berlin; Germany

phone 004930/64181639

fax 004930/64181682

e-mail pflug@igb-berlin.de

Abstract

A number of factors have been suggested for recently observed amphibian declines, one potential factor is pesticide exposure. Presented study describes uptake and effects of environmentally relevant concentrations of the pyrethroid insecticide cypermethrin on different amphibian species (*Bombina variegata* and *Rana arvalis*).

At first the uptake of ^{14}C -labelled cypermethrin (0.4 $\mu\text{g/L}$) by egg mass and tadpoles of *B. variegata* was investigated. After 24 h exposure 153.9 ng cypermethrin/g fresh weight were found in the embryo, indicating that the jelly mass of the eggs does not act as a sufficient physical barrier to protect the embryo. Uptake of cypermethrin into tadpoles of both tested amphibian species caused dose-dependent deformations, behavioral abnormalities of the amphibian larvae such as twisting, writhing and non-coordinated swimming, and mortality of exposed individuals.

In tadpoles of *B. variegata* and *R. arvalis*, the activity of microsomal (m) and cytosolic glutathione S-transferase (cGST) was measured after treatment with cypermethrin, because some indications exist in literature that GST is involved in metabolism of cypermethrin. GST activities of the tadpoles increased significantly with increasing duration and concentration of cypermethrin exposure. In addition, the enzymatic system of *B. variegata* seems to react with a more intensive biotransformation process to cypermethrin contamination than that of *R. arvalis* tadpoles. Alpha-cypermethrin - a racemic mixture of two cis isomers of cypermethrin - induced a stronger enzymatic response in the cytosolic fraction of *R. arvalis* tadpoles than cypermethrin of the same concentration.

The observed physical and behavioral abnormalities caused by environmentally relevant concentrations of cypermethrin indicate despite the detoxication of the substance via the GST-system that the entry of cypermethrin into the reproduction ponds could evoke adverse effects on development of amphibian embryos and tadpoles.

Keywords: cypermethrin, insecticide, amphibians, egg mass, tadpoles, microsomal and cytosolic glutathione-S-transferase, pyrethroid

Introduction

Amphibian populations at various locations worldwide are suffering from declines in number or reduction in range. Amphibian habitat is often embedded in agricultural landscapes, and therefore the potential for contamination is considerable. The use of pesticides in agriculture can have effects on amphibians inhabiting small ponds within or adjacent to application areas (Berrill and Bertram 1997, Greulich et al. 2002). Pyrethroid insecticides mostly reach into the aquatic habitats via runoff dependent on precipitation, soil conditions, and slope of the catchment area (Liess et al. 1999).

Cypermethrin (R-cyano-3-phenoxybenzyl(1R)-cis-3(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclo-propanecarboxylate) is an active cyano pyrethroid effective against a wide range of pests encountered in agriculture and forestry. It is a representative compound of the pyrethroid class as whole (Solomon et al. 2001). Alpha-cypermethrin is a racemic mixture of two cis isomers of cypermethrin. Reflecting the fact that α -cypermethrin is very similar to cypermethrin, it could be assumed that the effects of both substances on amphibians will be also comparable. Cyano pyrethroids cause a depolarization of nerve membranes in addition to repetitive firing. They produce complex poisoning symptoms including salivation, tonic seizures of the limbs, visual and aural disturbance, and ultimately death (Bradbury and Coats 1989). Cypermethrin is highly toxic to aquatic arthropods, fish, and bees whereas birds and mammals are normally tolerant (WHO 1992). In early life-stages of fish (*Pimephales promelas*) α -cypermethrin concentration of 0.09 $\mu\text{g/L}$ caused adverse effects, the NOEL was determined at 0.03 $\mu\text{g/L}$ (Stephenson 1983). Aquatic stages of amphibians are comparable to freshwater fish in sensitivity to pyrethroid insecticides (Berrill and Bertram 1997). The aim of this study was to investigate whether such environmentally relevant concentrations of cypermethrin producing adverse effects on fish also influenced the development of endangered amphibian species such as the yellow-bellied toad *Bombina variegata* and the moorfrog *Rana arvalis*.

Surface and sub-surface water of contaminated ponds contained up to 20–30 % of the applied dose of α -cypermethrin dependent on application techniques, soil and relief conditions, and precipitation (Pearson et al. 1990; Garforth and Woodbridge 1984). After 4 h deliberate overspraying of ponds with cypermethrin (100 g/ha) resulted in concentrations of 100 $\mu\text{g/L}$ active substance in the surface water, sampled from depth of 2.5 – 10 cm (Crossland 1982). During preliminary field studies of overspraying, wild populations of fish and amphibian were not affected by concentrations of 2.6 $\mu\text{g/L}$ cypermethrin in pond water (Crossland and Bennett 1976).

In principle, organisms are able to detoxicate cypermethrin to some extent. Both cis and trans isomers of cypermethrin are metabolized via cleavage of the ester bond to phenoxybenzoic acid (PBA) and cyclopropane carboxylic acid (CPA). The PBA moiety is mainly excreted as a conjugate. The type of conjugate differs in a number of animal species (WHO 1992). One possibility is the conjugation to glutathione, catalyzed by glutathione S-transferase (GST) (Davies et al. 1994, Gowland et al. 2002). Subsequently the hydrophilic products of conjugation are excreted. GST is widely distributed in nature and may be implicated in cell-line resistance to pesticides (Hayes and Wolf 1988; Bucciarelli et al. 1999). The variety of isoenzymes represents the wide range of different compounds which can be conjugated.

Detoxication of aquatic contaminants by conjugation to glutathione is well documented in fish (Donnarumma et al. 1988; Wiegand et al. 2000). For the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) there are some indications that GST is involved in metabolism of cypermethrin (Davies et al. 1994). Alterations of the GST activity dependent on doses of cypermethrin and duration of exposure should be tested in tadpoles of *B. variegata* and *R. arvalis*. In general, the role of amphibian GST measurement in an ecotoxicological context has received comparatively little attention. Previous investigations have focused on the isolation and identification of various GST-isoforms in amphibians (Grundy and Storey 1998, Di Ilio et al. 1992).

The aim of this study was to evaluate the uptake and potential toxic effects of environmentally relevant concentrations of the pyrethroid insecticide cypermethrin on tadpoles of different amphibian species. Furthermore, the effects on detoxication enzyme system (GST) should be tested.

Materials and methods

Embryo and tadpole rearing

Uptake studies of Cypermethrin in amphibian egg mass and tadpoles were carried out with *B. variegata*. Experiments to clarify the effects on detoxication enzymes were studied in *B. variegata* as well as *R. arvalis*. Determination of the developmental stages of the amphibian species was carried out according to Gosner (1960). An *R. arvalis* egg clutch (approx. 100 eggs) was collected shortly after it was laid from a wetland pond in northeastern Germany in April 2002 (permit no. 4440-236-NF/030-2000). At that point in time no cypermethrin was detectable in pond water. Eggs and tadpoles of *B. variegata* originated from captive breeding. Eggs were cultured in the laboratory until the embryos reached stage 12 (for embryo exposure) or stage 25 (for tadpole exposure).

Egg masses and tadpoles were kept in tanks with artificially salted (100 mg/L sodium chloride, 200 mg/L calcium chloride dihydrate, 103 mg/L sodium hydrogen carbonate), demineralized water. Twenty larvae or 15-20 eggs were placed in each aquarium containing 10 L water on a 14:10 h light:dark cycle. Tadpoles were fed with powdered dry food (Tetramin AZ 40). Larvae were placed into water to acclimate 24 h prior to testing. The water temperature was maintained at 20°C.

Test substances

Cypermethrin (Fluka, Seelze, Germany) is a mixture of 4 cis and 4 trans isomers. Alpha-cypermethrin (Fluka, Seelze, Germany) is a racemic mixture of the insecticidally most active enantiomer pair of the four cis isomers of cypermethrin.

Experimental procedures

Uptake of ¹⁴C-labelled cypermethrin

For the investigation of cypermethrin uptake into eggs and tadpoles of the amphibians, ¹⁴C-labelled cypermethrin (spec. activity, 4.625 MBq/mg; purity > 95%; Intl. Isotope, Germany) was used. Exposure of the eggs (stage 12) of *B. variegata* to 0.4 µg/L cypermethrin lasted 24 h (Tab.1). Embryos exposed to the insecticide remained within their jelly capsules. After the treatment, the eggs were rinsed thoroughly. Then the jelly capsules and the embryos were separated carefully, frozen in liquid nitrogen and homogenized in ethyl acetate. The radioactivity in jelly mass and embryo were measured by liquid scintillation counting (LSC Packard 1900 TR) in optima gold scintillator liquid. For determining the recovery at the beginning and the end of the investigation, the radioactive residues were analyzed in the exposure medium and also in rinsing liquid of eggs and beakers.

Tadpoles of *B. variegata* at stage 25 were exposed to 0.4 µg/L ¹⁴C-labelled cypermethrin for 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h (Tab.1) and investigated in the same manner as the eggs above.

Effects of cypermethrin exposure of tadpoles

In order to measure the enzymatic response of amphibians to contamination of pyrethroid insecticides, larvae of *B. variegata* and *R. arvalis* were exposed to solutions of cypermethrin. Effects of α-cypermethrin were studied in *R. arvalis*.

Eight tadpoles (stage 25) were transferred to the tanks containing treatment solutions with concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/L cypermethrin or α-cypermethrin (Tab.1). The tadpoles were examined for mortality and prodded for assessment of their avoidance response at the end of exposure. In order to investigate the time-dependent response of the detoxication system to the pyrethroid, the larvae of *B. variegata* were exposed to 0.1 µg/L cypermethrin for 0.5, 2, 6, and 24 h at 20°C (Tab.1). All experiments were run in triplicate.

Detoxication enzyme system

Enzyme extracts were prepared according to Pflugmacher and Steinberg (1997) and Wiegand et al. (1999) with modifications in volume. Samples were homogenized on ice in 25 ml sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) containing 20% glycerol, 1.4 mM dithioerythritol (DTE), 1 mM EDTA. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g (10 min). The supernatant was centrifuged again at 40,000 g (60 min) to obtain the microsomal fraction which was resuspended in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), 20% glycerol, 1.4 mM DTE. Ammonium sulfate precipitation cut between 35 and 80% saturation, followed by centrifugation at 30,000 g (30 min) and desalting in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.0) was used to obtain the cytosolic proteins.

Enzyme activities of mGST and cGST were quantified colorimetrically using the model substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Habig et al. 1974) and calculated in terms of the protein content of the sample (Bradford 1976).

Analysis of data

In order to test the significance of increasing or decreasing enzyme activities between exposure and control, a statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test, $p < 0.05$ (SPSS 9.0 for Windows).

Results

Uptake of cypermethrin

Using ¹⁴C-labelled cypermethrin to expose the eggs of *B. variegata*, radioactive residues were analyzed in the jelly capsules as well as in the embryos. In the jelly 29.6 ng cypermethrin/g fresh weight were detected, while in the embryo 153.9 ng cypermethrin/g fresh weight were located after 24 h exposure (Fig.1). Measuring the time-dependent uptake of ¹⁴C-labelled cypermethrin into the tadpoles, 94.8 ng cypermethrin was found per g fresh weight in the larvae after 3 h (Fig.2). After 6 h the radioactive amount increased to maximum of 121.6 ng cypermethrin/g fresh weight, differing significantly from value of the shortest exposure time of 0.5 h. During the first 6 h the uptake of cypermethrin into the tadpoles began quickly, than decreased slightly, and after 24 h reached a steady state which continued till the end of the exposure time. Parallel to the uptake of the radioactive ¹⁴C-labelled cypermethrin into the tadpoles a decrease in the medium was measured after 6 h. Then the radioactivity in the medium increased after 24 h exposure, and remained nearly constant thereafter. The ¹⁴C-labelled carbon-compounds measured in the medium presumably were radioactive labelled cypermethrin and its metabolites. The recovery of total radioactivity in the experiment was about 80 %.

Effects of cypermethrin exposure on tadpoles

Physical and behavioral abnormalities of *R. arvalis* tadpoles developed at concentrations of 0.1 µg/L cypermethrin in 24 h exposure. Forty percent of the tadpoles displayed clear indications of diminished avoidance response when prodded, spasms, convulsive twisting, as well as body and tail twitching (Tab.2). At 10 µg/L cypermethrin nearly 90 % of tadpoles were dead after 24 h. This resulted in modified exposure of *B. variegata*, concentrations of 10 µg/L cypermethrin were not tested at this species. Concentration of 0.01 and 0.1 µg/L cypermethrin evoked deformities and behavioral abnormalities of *B. variegata* (Tab.2). Convulsions, tail kinking, and death all increased with concentration. During 24 h exposure at 1 µg/L cypermethrin 38 % of the tadpoles died.

Effects on the GST enzyme system

Cypermethrin

The study of time-dependent response demonstrated that the enzymatic activity of the cGST fraction of *B. variegata* to cypermethrin was elevated continuously over time up to 15.4 nkat/mg protein at 6 h (Fig.3). After 24 h treatment the activity decreased to 10.6 nkat/mg protein. At any tested exposure time cGST differed significantly compared to control and to each other. Microsomal GST activities were characterized by smaller variations, but differed significantly from the control. The mGST activity obtained the maximum of 4.5 nkat/mg protein after 24 h cypermethrin exposure (Fig.3).

After exposure of *B. variegata* tadpoles to any tested cypermethrin concentration the cGST activity differed significantly to control (Fig.4). At concentrations from 0.001 to 0.1 µg/L cypermethrin the cGST activity increased significantly up to 9.6 nkat/mg protein and displayed consequently an increase by 251 % (Tab.2). However, at higher concentrations (1 µg/L cypermethrin) the cGST activity declined, the alteration to the corresponding control was 54 %.

After treatment of the *R. arvalis* tadpoles with 0.01 and 0.1 µg/L cypermethrin the enzymatic activities of the cytosolic fraction were elevated significantly compared to control (Fig.4). However, the rate of cGST-increase was at most only a quarter or a fifth that of *B. variegata* (Tab.2). Cytosolic GST activity increased up to 2.7 nkat/mg protein at 0.1 µg/L cypermethrin, and decreased slightly at concentrations of 1 µg/L.

Alpha-cypermethrin

Compared to the control, significant differences in enzymatic activity of the cGST were measured at all treatments of α-cypermethrin (Fig.5). Maxima of the cGST activity (9.8 nkat/mg protein) were obtained at exposure concentrations of 0.1 and 1 µg/L α-cypermethrin. In comparison to the sGST the range of the mGST was clearly restricted. Microsomal GST activities were characterized by smaller variations but differed significantly from the control. In *R. arvalis* tadpoles a concentration of 0.1 µg/L α-cypermethrin caused an increase of the cGST activity by 209 % to the respective control, identical concentrations of cypermethrin evoked an increase of 54 % (Fig.4, Fig.5). Variations in both microsomal fractions were negligible.

Discussion

Effects of cypermethrin exposure on tadpoles

Initial reductions in fitness (neurotoxic effects, paralysis) of the tadpoles were observed at cypermethrin levels (0.1 µg/L) corresponding to environmentally relevant concentrations in agricultural ponds.

In contrast to the results of field studies by Bennett et al. (1980), whereat no effects were observed on fish, tadpoles, or frogs contaminated with 0.17 -1.7 µg/L cypermethrin, we found diminished vitality of the amphibian tadpoles at concentrations of 0.1 µg/L cypermethrin under laboratory conditions. The differences could be interpreted in the level of adsorption of cypermethrin onto suspended solids, sediments, and aquatic plants. Diminished toxicity of cypermethrin added to pond water compared to addition to micro-filtered mains water was reported by Reiff (1978). Cypermethrin binds itself to suspended particular matter extensively and rapidly – approximately 99% adsorption occurred within 24 h (Maund et al. 2002).

Observed behavioral abnormalities of the amphibian tadpoles such as twisting, writhing and non-coordinated swimming are typical signs of cyano pyrethroid poisoning (Cole and Casida 1983, Berrill et al. 1993). In *Rana temporaria* a low level of cypermethrin (1 µg/L) in an aquatic environment evoked a pronounced inhibition of body growth (weight reduction) as well as impairment of the developmental process (delay of metamorphosis and its prolongation) plus neurotoxicity and paralysis in the experimental groups (tadpoles and metamorphosed individuals) (Paulov 1990).

Paralysis - and reduced vitality in general - is likely to render tadpoles more vulnerable to predation (Berrill et al. 1994). Entry of cypermethrin into the reproduction ponds of amphibians seems to be a decisive factor for adverse development of tadpoles. The observed physical and behavioral abnormalities caused by concentrations as low as 0.1 µg/L indicate that the entry of cypermethrin into the reproduction pond could be relevant for the development of embryos and tadpoles of amphibians.

Uptake of cypermethrin

The results of exposure to ¹⁴C-labelled cypermethrin indicate uptake into the embryos of *B. variegata* in environmentally relevant concentrations (0.4 µg/L cypermethrin). The jelly capsules adsorbed a small amount of cypermethrin and therefore cannot protect the embryo from the effects of the insecticide. This insufficient physical barrier of protection is reported for other pesticides for amphibians (Greulich et al. 2002) and for fish (Hashimoto et al. 1982; Wiegand et al. 2000). Tadpoles of *Rana clamitans* exposed as embryos to the pyrethroid permethrin for 96 h showed slower growth and abnormal behavior (BERRILL ET AL. 1993). These results imply that the embryos were influenced by pyrethroid exposure of the egg mass. In contrast, Berrill et al. (1998) and Pauli et al. (1999) described that the jelly coat surrounding the embryo provided a protective layer against endosulfan and tebufenozide during growth and development of amphibians. The degree of protection of the developing embryo from pesticide contamination appears to be strongly dependent on the investigated pesticides and tested species. The jelly coat of amphibian eggs which is mainly composed of hydrated glycoproteins showed strict species-specific structural differences even between the closely related amphibian species *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Coppin et al. 2003).

Compared to the uptake of isoproturon into the egg mass and tadpoles of *B. variegata* (Greulich et al. 2002) the stronger lipophilic property of cypermethrin caused the enhanced absorption. The enrichment of cypermethrin (concentration factor 41.6) in tadpoles of *B. variegata* was tenfold enhanced in comparison with isoproturon (concentration factor 4.5). Cypermethrin was accumulated mainly by tadpoles during the first 6 h of exposure. The following elimination from the tadpoles corresponded with the increase of ¹⁴C-labelled material in the medium. A rapid uptake of cypermethrin into the organisms followed by elimination described Crossland et al. (1978) for rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) and McLeese et al. (1980) for salmon (*Salmon salar*). In general, the diffusion throughout the membranes and the enrichment in lipophilic cellular compartments seem to be reversible.

Effects on GST system

At each level of treatment the GST activity of the tadpoles were influenced by dose and exposure time of cypermethrin and α -cypermethrin. The GST seems to be involved in detoxication process of cypermethrin in amphibian larvae. GST has been also implicated in the cypermethrin metabolism in invertebrates such as *Blattella germanica* (Valles 1998), *Pardosa amentata* (Nielsen et al. 1999), and *Carcinus maenas* (Gowland et al. 2002). To date, cypermethrin has only been shown to induce dose-dependent GST activity in one vertebrate; the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) (Davies et al. 1994). In amphibian tadpoles, the detoxication pathway could also occur via the GST system, but a cypermethrin/glutathione conjugate has not yet been proven. Smith et al. (1982) detected a glutathione conjugate of the pyrethroid tetramethrin.

Cypermethrin

The uptake of ^{14}C -labelled cypermethrin into the tadpoles obtained its maximum after 6 h, as did cGST activity. This 6-h specificity of GST induction offers a discrete time point which may be used in studying possible effects of exposure to cypermethrin. In general, the stronger enzymatic response was detectable frequently in the cytosolic fraction. Most of the GST isoenzymes are soluble (George 1994).

Both tested amphibian species reacted to cypermethrin exposure with significantly enhanced GST activities compared to respective control. In *B. variegata* even low concentrations of cypermethrin (0.001 $\mu\text{g/L}$) evoked significant induction of GST activity, and compared to *R. arvalis* the GST in *B. variegata* increased much stronger. The enzymatic system of *B. variegata* seems to react with a more intensive biotransformation process to cypermethrin contamination than that of *R. arvalis* tadpoles. *B. variegata* was presumably able to detoxify cypermethrin, because percentage of tadpoles showed physical and behavioral abnormalities were diminished compared to *R. arvalis*. At higher concentrations (1.0 $\mu\text{g/L}$) the detoxication was limited, the GST activity decreased, and the toxic effects dominated. Tadpoles were not able to tolerate such concentrations. Either the GST was harmed directly or other damages of the cells were responsible for the dysfunction of the GST.

Experimental exposure of amphibians to other pyrethroids clearly indicated that there are differences in sensitivity among species and life stages (Berrill et al. 1993; Cole and Casida 1983). The sensitivity of *Rana sphenoccephala* tadpoles to the cyano pyrethroid esfenvalerate was three times greater than that of *Rana catesbeiana* (Materna et al. 1995).

Alpha-cypermethrin

Alpha-cypermethrin induced a stronger enzymatic response in the cytosolic fraction than cypermethrin of the same concentration. Furthermore, α -cypermethrin causes stronger toxic effects, because it is composed of the two neurotoxic most active cis isomers of the four present in cypermethrin. Cole and Casida (1983) demonstrated that the cis isomers are more toxic to adults of *Rana pipiens* and tadpoles of *Rana catesbeiana* than the trans isomers of cypermethrin.

However, the application rate of α -cypermethrin is at most only half that of cypermethrin (5-30 g active ingredient/ha for α -cypermethrin and 10-200 g active ingredient/ha for cypermethrin). Therefore the danger of environmental contamination may also be only half as great (WHO 1992).

Our data indicate that the glutathione system of tested species constitutes a sensitive biochemical indicator of pollution by cypermethrin in environmentally relevant concentrations. Even before the appearance of morphological or behavioral abnormalities, GST activities reacted with significant alterations. In order to regain their physiological balance the amphibians must spend energy on detoxication. This may cause delays in growth, development and mobility, and indicate a reduction in physiological fitness (Allran and Karasov 2000; Diana et al. 2000).

Acknowledgement

This research was sponsored by the Scholarship Program of the German Federal Environmental Foundation (contract no. 06000/718). The authors wish to thank Prof. C. Wiegand for helpful discussions and W. Firth for checking the language.

References

- Allran JW, Karasov WH (2000) Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environ Toxicol Chem* 19:2850-2855
- Bennett D, Crossland NO, Shires SW (1980) Spray drift from Ripcord applications to vineyards in France: fate and effects in adjacent streams. Sittingbourne, Shell Research (TLGR.80.095)
- Berrill M, Bertram S (1997) Effects of pesticides on amphibian embryos and larvae. In: Green DM (ed) *Amphibians in decline: Canadian studies of a global problem*. Reports from the declining amphibian population task force. *Herpetol Conserv* 1:233-245
- Berrill M, Bertram S, McGillivray L, Kolohon M, Pauli B (1994) Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 13:657-664
- Berrill M, Bertram S, Wilson A, Louis S, Brigham D, Stromberg C (1993) Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 12:525-539
- Berrill M, Coulson DR, McGillivray L, Pauli BD (1998) Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem* 17:1738-1744
- Bradbury SP, Coats JR (1989) Toxokinetics and toxodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environ Toxicol Chem* 8:373-380
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bucciarelli T, Sacchetta P, Pennelli A, Cornelio L, Romagnoli R, Melino S, Petruzelli R, Di Ilio C (1999) Characterisation of toad glutathione transferase. *Biochim Biophys Acta* 1431:189-198
- Cole LM, Casida JE (1983) Pyrethroid toxicology in the frog. *Pest Biochem Phys* 20:217-224

- Coppin A, Florea D, Maes E, Cogalniceanu D, Strecker G (2003) Comparative study of carbohydrate chains released from the oviducal mucins of the two very closely related amphibian species *Bombina orientalis* and *Bombina orientalis*. *Biochimie* 85 (1-2):53-64
- Crossland NO (1982) Aquatic toxicology of cypermethrin. II. Fate and biological effects in pond experiments. *Aquat Toxicol* 2:205-222
- Crossland NO, Bennett D (1976) A field trial to assess the dispersion and toxicity of an EC formulation of the insecticide WL 43467 in a pond system. Sittingbourne, Shell Research (TLGR.0101.76)
- Davies IM, Cook LSJ, Geonardo D (1994) Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 13:1341-1354
- Di Ilio C, Aceto A, Bucciarelli T, Dragani B, Angelucci S, Mirando M, Poma A, Amicarelli F, Barra D, Federici G (1992) Glutathione transferase isoenzymes from *Bufo bufo* embryos at an early developmental stage. *Biochem J* 283:217-222
- Diana SG, Resetarits Jr. WJ, Schaeffer D., Beckmen KB, Beasley VR (2000) Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ Toxicol Chem* 19:2961-2967
- Donnarumma L, De Angelis G, Gramenzi F, Vittozzi L (1988) Xenobiotic metabolizing enzyme systems in test fish: III. Comparative studies of liver cytosolic glutathione S-transferases. *Ecotoxicol Environ Saf* 16:180
- Garforth BM, Woodbridge AP (1984) Spray drift from an aerial application of Fastac; fate and biological effects in an adjacent freshwater ditch. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 84.055)
- George SG (1994) Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins DC, Ostrander GK (ed) *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publications, Searcy, Arkansas, pp 37-85
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190
- Gowland BTG, Moffat CF, Stagg RM, Houlihan DF, Davies M (2002) Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* 54:169-177
- Greulich K, Hoque E, Pflugmacher S (2002) Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Environ Toxicol Saf* 52: 256-266
- Grundy JE, Storey KB (1998) Purification and kinetic properties of glutathione S-transferase from liver and skeletal muscle of the spadefoot toad *Scaphiopus couchii*: Influence of estivation INABIS '98 – 5th Internet World Congress on biomedical sciences at McMaster University Canada Dec 7-16th
- Habig W, Papst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase: The first step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:1730-1739
- Hashimoto Y, Okubo E, Ito T, Yamaguchi M (1982) Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth. *J Pestic Sci* 7:457-461

- Hayes JD, Wolf CR (1988) Role of glutathion transferase in drug resistance. In: Sies H, Ketterer B (ed) Glutathione conjugation mechanisms and biological significance. Academic press limited, London, UK, pp 316-356
- Liess M, Schulz R, Liess MHD, Rother B, Kreuzig R (1999) Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Wat Res* 33:239-247
- Materna EJ, Rabeni CF, LaPoint TW (1995) Effects of the synthetic pyrethroid insecticide esfenvalerat on larval leopard frogs (*Rana* spp). *Environ Toxicol Chem* 14:613-622
- Maund SJ, Hamer MJ, Lane MCG, Farelly E, Rapley JH, Goggin UM, Gentle WE (2002) Partitioning bioavailability and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environ Toxicol Chem* 21(1):9-15
- McLeese DW, Metcalfe CD, Zitko V (1980) Lethality of permethrin, cypermethrin; and fenvalerate to salmon lobster, and shrimp. *Bull Environ Contam Toxicol* 25:950-955
- Nielsen SA, Toft S, Clausen J (1999) Cypermethrin effects on detoxification enzymes in active and hibernating wolf spiders (*Pardosa amentata*). *Ecol Applic* 9:463-468
- Pauli BD, Coulson DR, Berrill M (1999) Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to MIMIC® 240LV insecticide following single or double exposures. *Environ Toxicol Chem* 18:2538-2544
- Paulov S (1990) Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on the model amphibians (*Rana temporaria*) *Biologia (Bratislava)* 45:133-139
- Pearson N (1990) The fate of "Fastac" in experimental ponds. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 85.087)
- Pflugmacher S, Steinberg CEW (1997) Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes. *J Appl Botany* 71:144-146
- Reiff B (1978) The effect of suspended solids on the toxicity of WL 43467 to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Sittingbourne, Shell Research (TLGR.0007.78)
- Smith IH, Wood EJ, Casida JE (1982) Glutathione conjugate of the pyrethroid tetramethrin. *J Agric Food Chem* 30:598-600
- Solomon KR, Giddings JM, Maund SJ (2001) Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environ Toxicol Chem* 20 (3):652-659
- Stephenson RR (1982) Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquat Toxicol* 2:175-185
- Stephenson RR (1983) WL 85871 and cypermethrin; a comparison of their acute toxicity to the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Rafinesque). Sittingbourne, Shell Research (SBGR 82.298)
- Valles SM (1998) Toxicological and biochemical studies with field populations of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econom Entomol* 89:21-26

Wiegand C, Pflugmacher S, Giese M, Frank H, Steinberg CEW (2000) Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf* 45:122-131, doi:10.1006/eesa.1999.1845

Wiegand C, Pflugmacher S, Oberemm A, Meens N, Beattie KA, Steinberg CEW, Codd GA (1999) Uptake and effects of Microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 14:89-95

World Health Organization (1992) Alpha-cypermethrin. *Environmental Health Criteria* 142

Figure and table captions

Figure 1. Uptake of ¹⁴C-labelled cypermethrin into jelly capsules and embryos of *Bombina variegata* after 24 h. Error bars indicate standard deviations of triplicate experiment.

Figure 2. Uptake of ¹⁴C-labelled cypermethrin by tadpoles of *Bombina variegata*. Mean of three independent samples and standard deviation.

* significantly different compared to control

Figure 3. Activities of cytosolic and microsomal glutathione-S-transferase (GST) in *Bombina variegata* at different exposure times. Mean of three independent samples and standard deviation.

* significantly different compared to control and to each other

Figure 4. Activities of cytosolic glutathione-S-transferase (GST) in different concentrations of cypermethrin in *Bombina variegata* and *Rana arvalis*. Mean of three independent samples and standard deviation.

* significantly different compared to control

n.d. not detected

Figure 5. Activities of cytosolic and microsomal glutathione S-transferase (GST) in different concentrations of α -cypermethrin in *Rana arvalis*. Mean of three independent samples and standard deviation.

* significantly different compared to control

Table 1. Summary of the exposure conditions (concentration and duration of exposure), the tested species, and the number of exposed individuals.

Table 2. Dose-dependent alteration of GST activity referred to the corresponding control. Corresponding control was set zero.

Dose-dependent proportion of dead and deformed tadpoles.

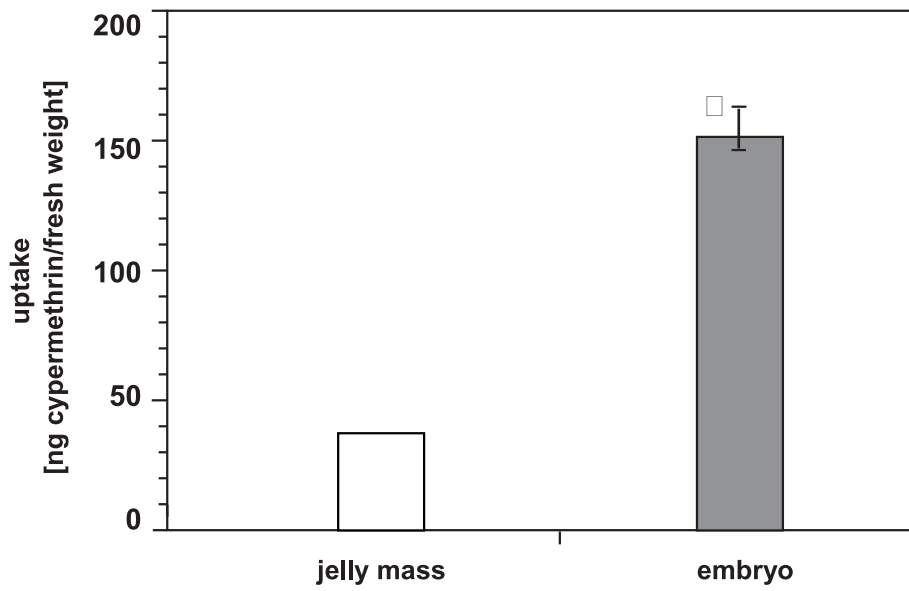


Fig. 1

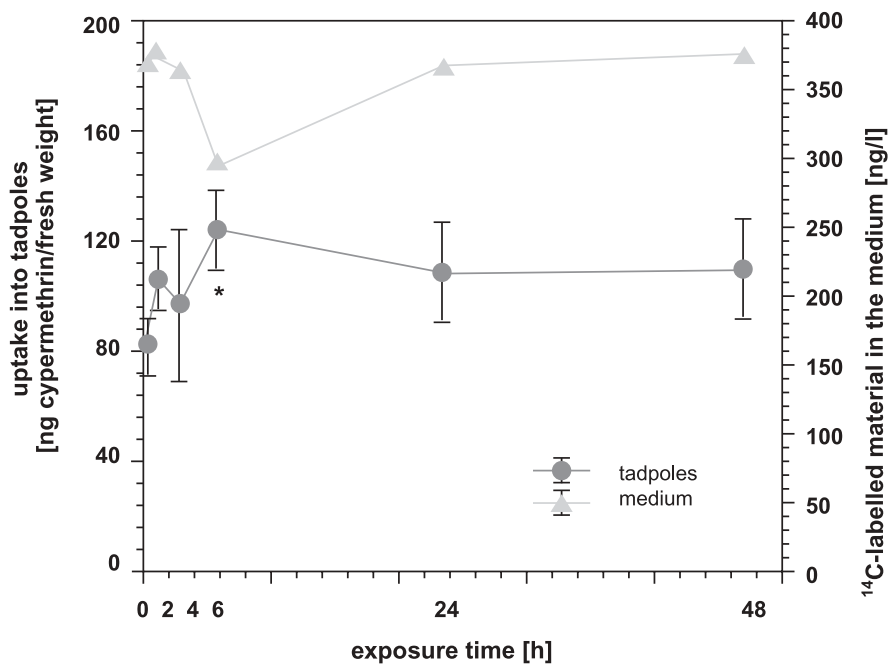


Fig. 2

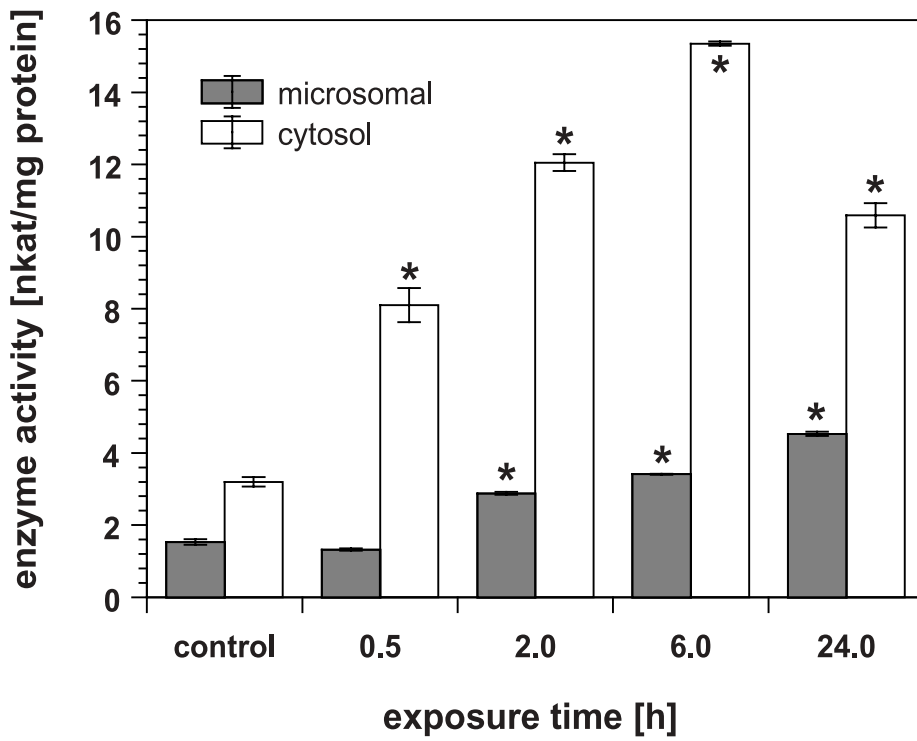


Fig. 3

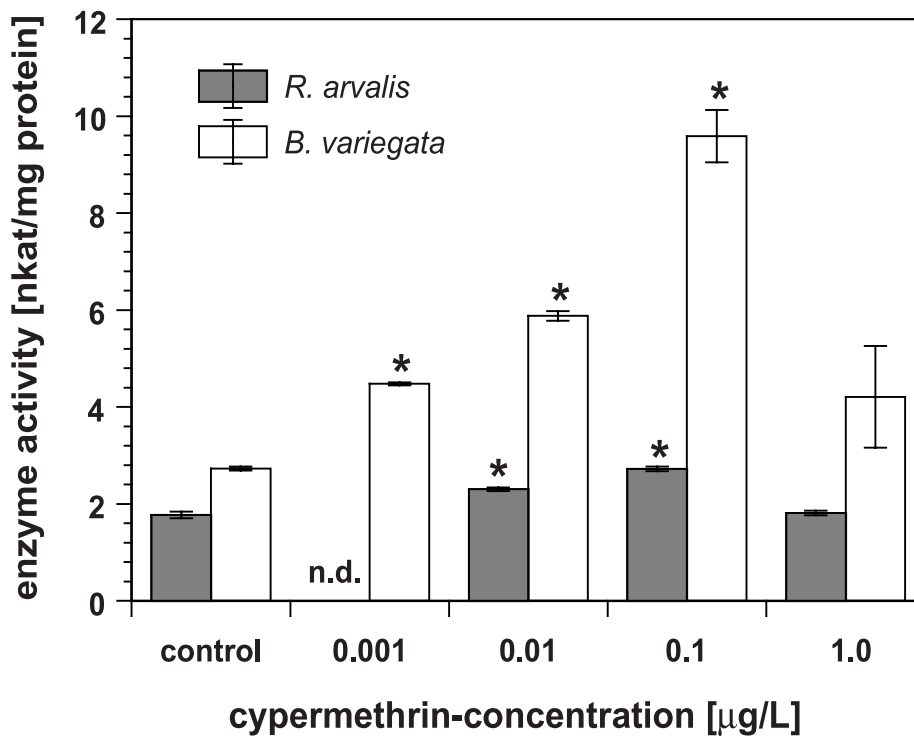


Fig. 4

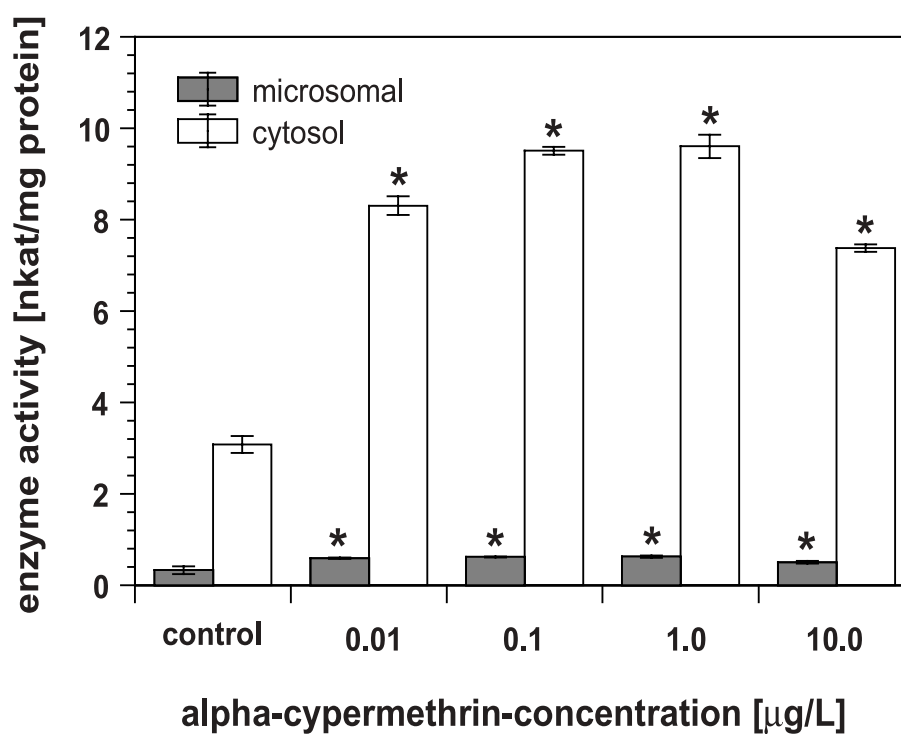


Fig. 5

substance	concentration	exposure time	species	number/ parallel
¹⁴ C- cypermethrin	0.4 µg/l	24 h	<i>B. variegata</i>	8 eggs
	0.4 µg/l	0.5; 1; 3; 6; 24; 48 h	<i>B. variegata</i>	8 tadpoles
cypermethrin	0; 0.001; 0.01; 0.1; 1 µg/L	24 h	<i>B. variegata</i>	8 tadpoles
	0; 0.01; 0.1; 1; 10 µg/L	24 h	<i>R. arvalis</i>	8 tadpoles
	0.1 µg/L	0.5; 2; 6; 24 h	<i>B. variegata</i>	8 tadpoles
α-cypermethrin	0; 0.01; 0.1; 1; 10 µg/L	24 h	<i>R. arvalis</i>	8 tadpoles

Tab. 1

cypermethrin concentration [µg/L]	<i>Bombina variegata</i>				<i>Rana arvalis</i>			
	Δ GST [%]	deformation [%]	mortality [%]	total [%]	Δ GST [%]	deformation [%]	mortality [%]	total [%]
0.001	64	0	0	0				
0.01	115	7	0	7	30	0	0	0
0.1	251	28	0	28	54	40	20	60
1	54	0	38	38	3	40	20	60
10						0	90	90

Tab. 2

Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure

Kerstin Greulich¹, Stephan Pflugmacher*

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, AG Biogeochemical Regulation, Müggelseedamm 301, 12587 Berlin, Germany

Received 16 April 2003; received in revised form 21 May 2003; accepted 9 July 2003

Abstract

Pesticide exposure is discussed as one of the adverse factor that causes impairment of amphibian larval development. Susceptibility of tadpoles to pesticide exposure differs depending on the developmental stages at which individuals are contaminated.

This study focused on the influence of the pyrethroid insecticide cypermethrin on the hatching success, mortality and deformities in further development, duration of metamorphosis, and growth of *Rana arvalis* tadpoles exposed at various life stages.

Eggs were harmed significantly by exposure to different concentrations of α -cypermethrin dependent on exposure time. Amphibian embryos hatched with apparent abnormalities indicate insufficient protection by the jelly coat surrounding the embryo. Exposed individuals exhibited typical signs of cyano pyrethroid poisoning (twisting, writhing, abnormal swimming). During the life-stage treatments the observed morphological deformities and behavioral abnormalities lead mostly to death of the tadpoles in later development. Individuals exposed to α -cypermethrin in early life stages (as eggs or newly hatched tadpoles) metamorphosed earlier than in the corresponding control. However, exposure of the tadpoles throughout their whole development prolonged the metamorphosis. These metamorphs were distinguished by a much more compact physique (significant reduction in length and significant increase in weight compared to the corresponding control) so as to resist the adverse conditions.

Observed effects of α -cypermethrin exposure on various life stages of *R. arvalis* tadpoles refer to the danger potential of this insecticide for amphibian development. Any kind of deformation influences the physiological fitness of the individuals (e.g. increased vulnerability to predation). Diminished hatching success, delays in metamorphosis and body growth impact negatively on the viability of amphibian populations in the long term. In combination with other anthropogenic influences (destruction or dissipation of habitats), these effects can cause the local extinction of amphibian species.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: α -Cypermethrin; Amphibians; Eggs; Tadpoles; Pyrethroid; Various life stages

1. Introduction

Declines in amphibian population have been observed in most continents in the past decade. Lower species diversity and density in the agricultural zone indicate that despite the presence of a water course,

* Corresponding author. Tel.: +49-30-64181639; fax: +49-30-64181682.

E-mail addresses: greulich@igb-berlin.de (K. Greulich), pflug@igb-berlin.de (S. Pflugmacher).

¹ Tel.: +49-30-64181629; fax: +49-30-64181682.

ditches, and ponds, many anuran species do not tolerate intensive agricultural activity (Bishop et al., 1999). So the effects of presently used “new generation” pesticides on amphibian populations are of growing concern; pyrethroid insecticides are one of these groups. α -Cypermethrin—a racemic mixture of two *cis* isomers of cypermethrin (*R*-cyano-3-phenoxybenzyl(1*R*)-*cis*-3(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylate)—is an active cyano pyrethroid effective against a wide range of pests encountered in agriculture.

After an application of α -cypermethrin (15 g active ingredient/ha) to a field, concentrations in subsurface water of an adjacent freshwater ditch were 0.6 $\mu\text{g/l}$ shortly after application (Garforth and Woodbridge, 1984). Residue levels in subsurface water subsequently declined rapidly and within 4 days the α -cypermethrin concentration in subsurface water had decreased to <0.02 $\mu\text{g/l}$.

α -Cypermethrin is highly toxic to aquatic arthropods, fish, and bees, whereas mammals are normally tolerant (WHO, 1992). Sensitivity of aquatic non-target organisms to contamination by α -cypermethrin has been studied in freshwater algae, aquatic invertebrates, and fishes (Garforth, 1982; Stephenson, 1982). In early life stages of fish (*Pimephales promelas*) α -cypermethrin concentration of 0.09 $\mu\text{g/l}$ produced adverse effects, the NOEL was determined at 0.03 $\mu\text{g/l}$ (Stephenson, 1983). Concentrations of 3 ppb (1*R*, α 5)-*cis*-cypermethrin had lethal effects on adult frogs of *Rana pipiens pipiens* (Cole and Casida, 1983) during a 24 h exposure at 4 °C. In the laboratory tests, 48-h LC 50 of *Rana temporaria* tadpoles was determined at 6.5 $\mu\text{g/l}$ cypermethrin; however, adverse effects occurred at environmentally relevant concentrations of 1 $\mu\text{g/l}$ (Paulov, 1990).

Susceptibility of amphibians to pesticide contamination appears to be strongly dependent on the developmental stage of exposed individuals (Pauli et al., 1999; Greulich et al., 2002). Hatching success of amphibian eggs often minimally affected by acute pesticide exposure has been observed, as have significant post-exposure mortality of the tadpoles within following weeks (Berrill et al., 1998), morphological deformities in the later development (Harris et al., 2000; Allran and Karasov, 2000), and delay in larval growth (Bridges, 2000). These results indicate the importance

of the effects of chemical exposure during different life stages on the long-term growth and development rates of amphibians. The timing of contamination is also critical, for a spraying event that coincides with frog egg development is likely to have few direct effects on later tadpole abundance (Berrill et al., 1994). Furthermore, amphibians of later developmental stages seem to counteract the toxic effects of reactive metabolites of xenobiotics with higher efficiency (Bucciarelli et al., 1999).

In general, the amphibians must spend energy on detoxication of the pesticides in order to regain their physiological balance. This may cause delays in growth, development, and mobility, and lead to a reduction in physiological fitness (Allran and Karasov, 2000; Bridges, 1997; Diana et al., 2000).

The aim of this study was to determine whether the development and behavior of *R. arvalis* tadpoles were affected by chronic exposure to α -cypermethrin, and to determine whether this is dependent on the life stage at which individuals were exposed.

2. Materials and methods

2.1. Embryo and tadpole rearing

Two *R. arvalis* egg clutches (altogether approximately 500 eggs) were collected from a wetland pond in northeastern Germany in April 2002 (permit no. 4440-236-NF/030-2000). Eggs and tadpoles were kept in tanks with artificially salted (100 mg/l sodium chloride, 200 mg/l calcium chloride dihydrate, 103 mg/l sodium hydrogen carbonate), demineralized water prior to and after exposure. One clutch of eggs was used for hatching studies immediately after collection, the other one was reared until tadpoles reached determined developmental stages and they could be exposed. Determination of the developmental stages of the amphibian species was carried out according to Gosner (1960).

Twenty tadpoles or one clutch of eggs were placed in each tank containing 10 l artificially salted water on a 14:10 h light:dark cycle. The water temperature was maintained at 20 °C. Water was changed and the tanks were rinsed every third day. Afterwards the tadpoles received powdered dry food (Tetramin AZ 40).

2.2. Test substances

An α -cypermethrin stock solution was prepared consisting of 10 mg α -cypermethrin (purity >99%; Fluka, Seelze, Germany) dissolved in 100 ml acetonitrile (Roth, Karlsruhe, Germany). This single stock solution was used throughout the whole experiment and stored in the refrigerator under dark conditions.

2.3. Experimental procedures

During the preliminary investigations little clutches of eggs (approximately 10 embryos at stage 10–12) and 10 tadpoles (stage 20) were exposed to a well-water control, an acetonitrile solvent control (100 μ l/l), and either 0.1, 1 or 10 μ g/l α -cypermethrin for 48 h. Each treatment was replicated three times.

To determine the point during development at which adverse effects due to α -cypermethrin exposure occur, five developmental stages were chosen according to Bridges (2000). The examination covered the following phases: egg stage (EGG; defined as an embryo completely confined within the egg membrane); embryo stage only (EM; defined as a newly hatched embryo); both egg and embryo stages (EGG/EM); tadpole stage only (TAD, a free-swimming tadpole), and throughout the development (EGG/EM/TAD).

Ten individuals were transferred to the tanks containing treatment solutions: a well-water control, an acetonitrile solvent control (100 μ l/l), and 0.1 or 1 μ g/l α -cypermethrin solution. The tadpoles were examined for the mortality and behavioral abnormalities, such as twisting in response to prodding rather than darting away. All experiments were replicated three times.

Tadpoles were determined to have reached metamorphosis after at least one forelimb had emerged (stage 42). Each metamorphosed tadpole was separated to the complete resorption of its tail. At this time it was weighed (wet weight, nearest 10 mg) and its snout-vent length measured (nearest 0.1 mm).

2.4. Analysis of data

In order to test the significance of the hatching success in preliminary studies, a statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test, $P < 0.05$ (SPSS 9.0 for Windows).

Mortality in the experiments caused reduced sample sizes. Data of survivors were analyzed using Fisher's exact test, $P < 0.05$, which can distinguish the differences among treatments when sample sizes are low. The relationship of the body length and the weight at the end of metamorphosis was described by regression coefficient R^2 of the linear regression analysis for the controls and the different α -cypermethrin concentrations in each of the life-stage treatments. Fisher's exact test, $P < 0.05$ was used to evaluate the significant differences in location of regression lines (slope, intercept).

3. Results

Because the two controls (well-water control and acetone solvent control) did not differ statistically from one another, in the following "control" represents their means.

3.1. Hatching studies

None of the embryos were hatched before the completion of 48-h exposure. Two days after the end of exposure all embryos hatched approximately in synchrony. Hatching success of the larvae exposed to 1 or 10 μ g/l α -cypermethrin decreased significantly compared to the control (Fig. 1).

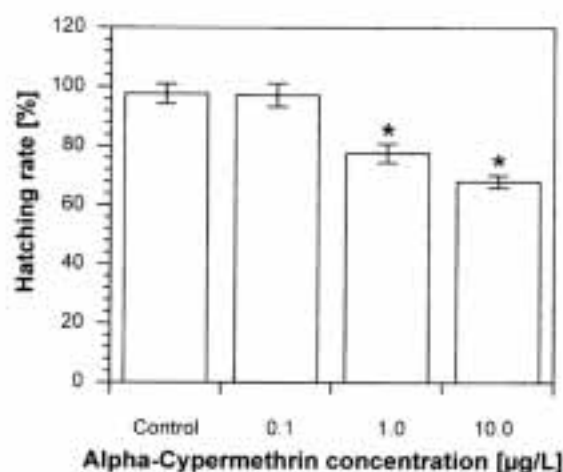


Fig. 1. Hatching success of *Rana arvalis* after 48-h exposure at different concentrations of α -cypermethrin. Error bars indicate standard deviations of triplicate experiment. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control.

Clear behavioral differences of the newly hatched embryos could be distinguished between treatments. In the control and in lower exposure concentrations (0.1 µg/l α-cypermethrin) the embryos were grouped around the jelly mass whereas after treatment in 1 or 10 µg/l α-cypermethrin the newly hatched larvae could be localized exclusively at tank panes.

In the study of the life-stage treatment, eggs of *R. arvalis* were exposed to α-cypermethrin over 24 h, because after this time the next developmental stage (EM-stadium) was reached. *Rana arvalis* embryos seems to be unaffected by α-cypermethrin exposure, all of them had hatched under both control and experimental conditions. None of the hatched tadpoles died during the recovery period following hatching. When *R. arvalis* were exposed to the pyrethroid during the EGG/EM stage all embryos hatched at 0.1 µg/l α-cypermethrin comparable to the hatching success of the unexposed individuals. Concentrations of 1 µg/l α-cypermethrin reduced the hatching rate to 82%. In life-stage treatment EGG/EM/TAD all embryos hatched successfully.

3.2. Mortality

Tadpoles in life-stage treatments EGG and EGG/EM that had hatched successfully during or after exposure metamorphosed indistinguishably from the control individuals. After exposure to 1 µg/l α-cypermethrin, 79% of the embryos at EGG/EM life stage reached metamorphosis. At stages EM, TAD, and EGG/EM/TAD any chemical treatment reduced the survival rate of metamorphosed amphibians to 30–87% (Table 1). The impaired tadpoles exhibited delayed development and died mostly towards the end of metamorphosis. In TAD life stage, the α-cypermethrin treatments provoked excessive mortality (70%); therefore, this life-stage treatment was excluded from the statistical analysis.

3.3. Deformities

Tadpoles exposed to α-cypermethrin as eggs for 48 h exhibited abnormal morphology or behavioral abnormalities. Convulsions and tail kinking increased with concentration. Although a few were initially unresponsive to prodding following exposure to 0.1 and

Table 1
Summary of responses at each life-stage treatment reared in each of the α-cypermethrin treatments and the control

Treatment	Control	0.1	1	10
Eggs	0	5.7	9.1	12.1
Larvae	3	0	26.7	90.3
EGG	100	100	100	n.t.
	0	0	0	
EGG/EM	100	100	78.6	n.t.
	0	0	21.4	
EM	100	80	80	n.t.
	0	40	40	
TAD	100	50	30	n.t.
	3.4	20	0	
EGG/EM/TAD	100	86.7	51.25	n.t.
	3.4	9.4	0	

The values corresponding to eggs and larvae indicate the percentage of survivors reaching metamorphosis. The values corresponding to EGG, EGG/EM, EM, TAD, and EGG/EM/TAD indicate the percentage of survivors exhibiting any type of deformation; n.t.: not tested.

1 µg/l α-cypermethrin, most tadpoles recovered in the course of their further development. After 48 h exposure of tadpoles to 10 µg/l α-cypermethrin 90% of them were seriously impaired and subsequently died. This resulted in modified exposure of the various life stages; concentrations of 10 µg/l α-cypermethrin were not tested.

In life-stage treatments, all tadpoles that hatched successfully during or after the exposure responded to prodding with normal avoidance response and their behavior was indistinguishable from the tadpoles that had been exposed to artificial water (Table 1). In contrast, when the hatching success of the embryos was influenced by α-cypermethrin exposure, some of the surviving individuals exhibited physical and behavioral abnormalities. Tadpoles displayed clear indications of diminished avoidance response when prodded, spasms, convulsive twisting, as well as body and tail twitching. Deformities were observed immediately after the exposure (EM and EGG/EM stages) or at the beginning of the exposure (TAD and EGG/EM/TAD stages). Paralyzed tadpoles were unable to recover after exposure, and died. Compared to the other life-stage treatments in EM stage, many more individuals (40%) exhibited morphological deformities and behavioral abnormalities.

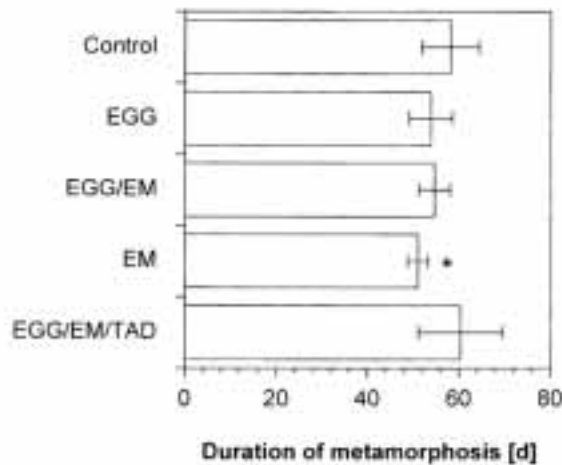


Fig. 2. Duration of metamorphosis of various life-stage treatments at 1 µg/l α-cypermethrin. Mean of three independent samples and standard deviation. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control.

3.4. Duration of metamorphosis

At concentration of 1 µg/l α-cypermethrin the mean duration of metamorphosis shortened in life-stage treatments EGG, EGG/EM, and EM compared to the control (Fig. 2). The α-cypermethrin contamination during the whole tadpole development (EGG/EM/TAD) caused a prolonged metamorphosis. Significant differences in the control were found in treatment EM; the tadpoles metamorphosed approximately 7 days earlier.

Comparing both the tested α-cypermethrin concentrations, a trend was observed irrespective of the life-stage treatments: at 1 µg/l α-cypermethrin the tadpoles metamorphosed 1–2 days later than at 0.1 µg/l. Furthermore, the first metamorphosis of the few survivors from life-stage treatment TAD appeared in 1 µg/l α-cypermethrin 12 days later than in the control.

3.5. Length at metamorphosis

Mean length of metamorphosed amphibians—exposed as eggs during 48 h—decreased with the increasing α-cypermethrin concentrations (Fig. 3). The significant difference in the length between the control and 10 µg/l treatment was nearly 5 mm.

When measured for total body length of exposed larvae at the end of the experiment, there were no signif-

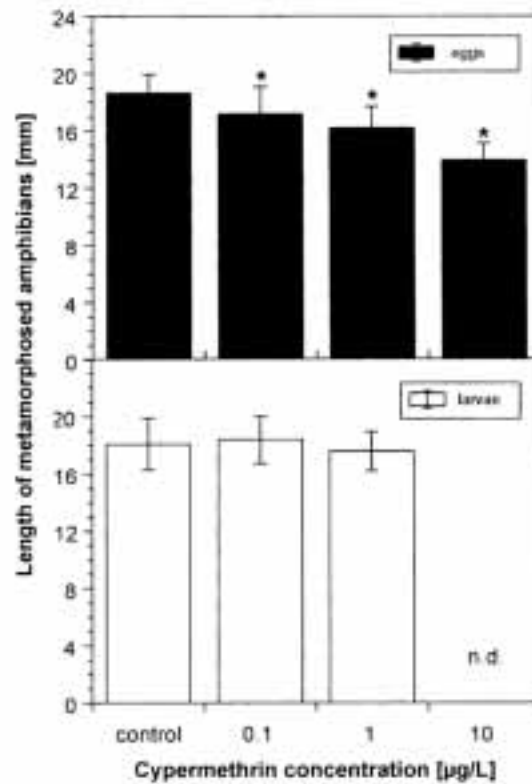


Fig. 3. Length of metamorphosed amphibians after 48h exposure of spawn and larvae at different concentrations of α-cypermethrin. Error bars indicate standard deviations of triplicate experiment. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control.

icant differences among chemical treatments (Fig. 3). Their growth seemed to be unaffected by exposure to 0.1 and 1 µg/l α-cypermethrin, however, all tadpoles exposed to 10 µg/l α-cypermethrin died.

Life-stage treatment EGG/EM/TAD with 1 µg/l α-cypermethrin had a significant effect on the length of metamorphosed amphibians (Fig. 4). The mean length of metamorphosis was smaller than in the other tested stages and was reduced significantly (0.4 mm) compared to the corresponding control. In life-stage treatments EGG and EGG/EM the metamorphosed amphibians were smaller—in EM life stage larger—than in the corresponding controls.

Considering the linear relationships of body length and weight of the metamorphosis in life-stage treatment EGG/EM/TAD, straight lines of different inclination were detected regarding control and

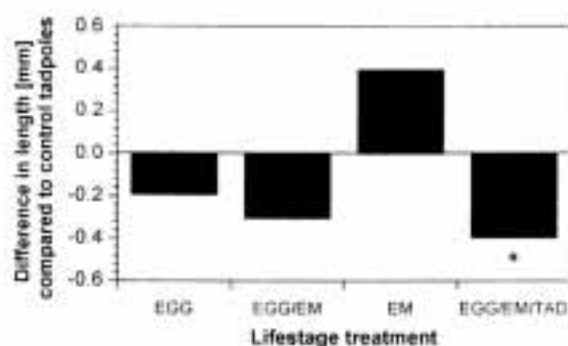


Fig. 4. Length at metamorphosis when compared with the control (0) on graph of various life-stage treatments at $1 \mu\text{g/l}$ α -cypermethrin. Mean of three independent samples. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control.

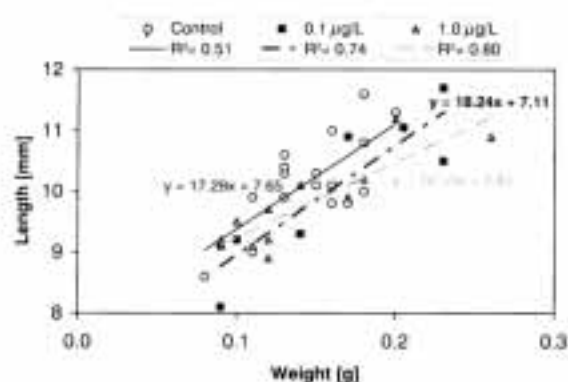


Fig. 5. Weight and length of metamorphs after life-stage treatment EGG/EM/TAD at different concentrations of α -cypermethrin and their corresponding correlation straight line.

chemical treatments (Fig. 5). At concentrations of $1 \mu\text{g/l}$ α -cypermethrin, the straight line best fitted the data ($R^2 = 0.80$). This inclination of correlation straight line differed significantly from the control and data at $0.1 \mu\text{g/l}$ treatment.

4. Discussion

4.1. Hatching studies

During 48 h of exposure, hatching success of *R. arvalis* decreased significantly. The jelly layer surrounding the eggs of *R. arvalis* obviously could not protect them against α -cypermethrin exposure. In contrast,

Berrill et al. (1998) and Pauli et al. (1999) reported for amphibian species of Northern America that the jelly coat provided a protective layer against the influence of pesticides (endosulfan, tebufenozide) during growth and development of the embryos. The degree of protection of the developing embryo from pesticide contamination and also the hatching rate appear to be strongly dependent on the tested species and investigated pesticides. Experimental exposure of amphibians to other pyrethroids clearly indicated that there are differences in sensitivity among species and life stages (Berrill et al., 1993; Cole and Casida, 1983). The sensitivity of *Rana sphenoccephala* tadpoles to the cyano pyrethroid esfenvalerate was three times greater than that of *Rana catesbeiana* (Materna et al., 1995).

In studies of life-stage treatment EGG *R. arvalis* eggs were exposed to α -cypermethrin during 24 h to the attainment of the next stage. In this case, all embryos were hatched and no abnormalities were observed. Duration of exposure seemed to be a deciding factor of impairment (Maund et al., 2001).

4.2. Mortality

Significant effects of pesticides on metamorphosis, growth, behavior, and in particular mortality of amphibians occurred mostly at concentrations exceeding the environmentally relevant range (Bridges, 1997; Pauli et al., 1999).

Significant lethal effects (mortality 100%) during acute exposure of *R. arvalis* tadpoles were observed at concentrations of $10 \mu\text{g/l}$ α -cypermethrin. Tadpoles are not able to tolerate such high concentrations, which are rarely observed in surface waters—only in the worst case. Surface and subsurface water of contaminated ponds contained up to 20–30% of the applied dose of α -cypermethrin dependent on application techniques, soil and relief conditions, and precipitation (Pearson, 1990; Garforth and Woodbridge, 1984). The application rate of α -cypermethrin is 5–30 g active ingredient/ha (WHO, 1992).

During life-stage treatments the morphological deformities and behavioral abnormalities observed mostly lead to death of the individuals at a later time. Concentrations that are sublethal during acute exposures may be lethal during chronic exposures (Bridges, 2000).

4.3. Deformities

Contrary to expectations, the tadpoles that exhibited deformities during life-stage treatments were unable to recover when placed into clean water. Except in the control, the individuals in life-stage treatment EGG/EM/TAD recuperated. Materna et al. (1995) described that most of the *Rana pipiens* tadpoles which exhibited convulsive behavior during initial exposure eventually died.

Observed behavioral abnormalities of the amphibian tadpoles such as twisting, writhing and non-coordinated swimming are typical signs of the cyano pyrethroid poisoning (Cole and Casida, 1983; Berrill et al., 1993). In *Rana temporaria* a low level of cypermethrin (1 µg/l) in an aquatic environment evoked a pronounced inhibition of body growth (weight reduction) as well as impairment of the developmental process (delay of metamorphosis and its prolongation, neurotoxicity and paralysis) in the experimental groups (tadpoles and metamorphic individuals) (Paulov, 1990). Aberrant behavior (tail kinking and consequent twirling activity) causes greater hazards of predation as it diminishes the capability of the tadpoles to escape predators (Materna et al., 1995).

Differences in sensitivity between the developmental stages occurred, especially between tadpoles exposed already as eggs and tadpoles exposed exclusively as newly hatched embryos. Berrill et al. (1993) described that older, more developed embryos of *R. clamitans* are more sensitive to pyrethroid exposure than younger, less developed stages. They concluded that the greater sensitivity of the late-stage embryos reflects the more differentiated state of the nervous system, because pyrethroids apparently act primarily on sodium and calcium channels in nervous tissue.

4.4. Duration of metamorphosis

In life-stage treatments EGG and EGG/EM, the tadpoles metamorphosed earlier and they were smaller compared to the corresponding control. In an unfavourable environment tadpoles will accelerate the development and metamorphose sooner, but at smaller size (Bridges, 2000).

In contrast, tadpoles in EM life stage reacted to α -cypermethrin exposure also with significantly shorter duration of metamorphosis; however their

mean body length was 0.4 mm larger than in the control. If tadpole populations are reduced by contaminant exposure, it is possible that surviving tadpoles will grow larger (Materna et al., 1995). Rapid growth also allows tadpoles to metamorphose earlier, avoiding possible desiccation of their habitat.

Prolongation of metamorphosis occurred during long-time exposure in life-stage treatments TAD and EGG/EM/TAD. Bridges (2000) described also that the treatments exposing individuals throughout the development produced their first metamorph much later than the other life-stage treatments. Tadpoles seem to react to such chronic exposure with developmental delays. In summary, differences in duration of metamorphosis as a result of chemical contamination seem to be dependent on many factors such as environmental conditions, temperature, tadpole density, tested life stage, and exposure time.

4.5. Final length after metamorphosis

Tadpoles exposed to α -cypermethrin during the egg stage (life-stage treatments EGG, EGG/EM, and EGG/EM/TAD) were smaller at metamorphosis. The jelly layer around the egg obviously offered insufficient protection. Bridges (2000) observed the same phenomenon with smaller metamorphs in *Rana sphenoccephala* after exposure of eggs to carbaryl and hypothesized that this reduction in growth was caused by metabolic or mitotic demands placed on individuals in the egg stage which are not manifested until later development.

Weight and length of metamorphs exposed during the EGG/EM/TAD stage to 0.1 µg/l α -cypermethrin did not differ significantly from the control, but concentrations of 1 µg/l α -cypermethrin caused significant reduction in the length and significant increase in the weight of the tadpoles. The survivors of the continual exposure throughout all phases of growth and development were distinguished by a much more compact physique. That seemed to be the best way to resist the adverse conditions.

5. Conclusion

The aim of this study was to investigate the behavioral and morphological effects of α -cypermethrin

exposure on various life stages of *R. arvalis* tadpoles. In summary, dependence on the life stage at which individuals were exposed, tadpoles responded differentially to α -cypermethrin contamination. Diminished hatching success, delays in metamorphosis, and body growth impact negatively on the long-term viability of amphibian populations.

Acknowledgements

This research was sponsored by the Scholarship Program of the German Federal Environmental Foundation (contract no. 06000/718). The authors wish to thank Dr. C. Wiegand for helpful discussions and W. Firth for checking the language.

References

- Allan, J.W., Karasov, W.H., 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from post-hatch through metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2850–2855.
- Berrill, M., Bertram, S., Wilson, A., Louis, S., Brigham, D., Stromberg, C., 1993. Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 525–539.
- Berrill, M., Bertram, S., McGillivray, L., Kolohon, M., Pauli, B., 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 657–664.
- Berrill, M., Coulson, D.R., McGillivray, L., Pauli, B.D., 1998. Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1738–1744.
- Bishop, C.A., Mahony, N.A., Struger, J., Ng, P., Pettit, K.E., 1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in Holland river watershed, Ontario, Canada (1990–1992). *Environ. Monit. Assess.* 57, 21–43.
- Bridges, C.M., 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1935–1939.
- Bridges, C.M., 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 91–96.
- Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Pennelli, A., Cornelio, L., Romagnoli, R., Melino, S., Petruzzelli, R., Di Ilio, C., 1999. Characterisation of toad glutathione transferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 189–198.
- Cole, L.M., Casida, J.E., 1983. Pyrethroid toxicology in the frog. *Pest. Biochem. Phys.* 20, 217–224.
- Diana, S.G., Resetarits Jr, W.J., Schaeffer, D.J., Beckmen, K.B., Beasley, V.R., 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2961–2967.
- Garforth, B.M., 1982. A comparison of toxicities of WL 85871 and Ripcord to freshwater invertebrates in small field enclosures. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 82.015).
- Garforth, B.M., Woodbridge, A.P., 1984. Spray drift from an aerial application of Fastac fate and biological effects in an adjacent freshwater ditch. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 84.055).
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
- Greulich, K., Hoque, E., Pflugmacher, S., 2002. Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoprotruron in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 256–266.
- Harris, M.L., Chora, L., Bishop, C.A., Bogart, J.P., 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 263–270.
- Materna, E.J., Rabeni, C.F., LaPoint, T.W., 1995. Effects of the synthetic pyrethroid insecticide esfenvalerat on larval leopard frogs (*Rana* spp.). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 613–622.
- Maud, S.J., Travis, K.Z., Hendley, P., Giddings, J.M., Solomon, K.R., 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: V Combining landscape level exposures and ecotoxicological effects data to characterize risks. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (3), 687–692.
- Pauli, B.D., Coulson, D.R., Berrill, M., 1999. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to MIMIC® 240LV insecticide following single or double exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2538–2544.
- Paulov, S., 1990. Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on the model amphibians (*Rana temporaria*). *Biologia (Bratislava)* 45, 133–139.
- Pearson, N., 1990. The fate of "Fastac" in experimental ponds. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 85.087).
- Stephenson, R.R., 1982. WL 85871 and cypermethrin: a comparison of their acute toxicity to *Salmo gairdneri*, *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum*. Sittingbourne, Shell Research (SBGR 81.277).
- Stephenson, R.R., 1983. WL 85871 and cypermethrin: a comparative study of their toxicity to the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Rafinesque). Sittingbourne, Shell Research (SBGR 82.298).
- World Health Organization, 1992. Alpha-Cypermethrin. *Environmental Health Criteria*, p. 142.

Impressum

Studien und Tagungsberichte, Schriftenreihe - ISSN 0948-0838

Herausgeber: Landesumweltamt Brandenburg (LUA)
Berliner Str. 21-25
14467 Potsdam
Tel.: 0331 - 23 23 259
Fax: 0331 - 29 21 08
E-Mail: infoline@lua.brandenburg.de

Band 48

**Einfluss von Pestiziden auf Laich und Larven von Amphibien
am Beispiel eines Herbizides (Isoproturon) und eines
Insektizides (Cypermethrin)**

Konzeption und Redaktion auf Basis der gleichnamigen Dissertationsschrift von Frau Kerstin Greulich zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.) im Fach Biologie, eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin im Jahr 2003

Kerstin Greulich
Bundesinstitut für Risikobewertung
Thielallee 88-92
14195 Berlin
k.greulich@bfr.bund.de

Diese Arbeit wurde durch das Landesumweltamt Brandenburg und das Stipendienprogramm der Deutschen Bundesstiftung Umwelt gefördert.

Bearbeitung
des Textes,

technische Umsetzung: LUA, Referat Öffentlichkeitsarbeit
Dr. Barbara Herrmann

Gesamtproduktion: Werbeagentur PoWer-DesignThing

Potsdam, im Mai 2004

Schutzgebühr 7 EUR

Diese Druckschrift wird im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit des Ministeriums für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von Wahlwerbenden zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zwecke der Wahlwerbung. Nachdruck, auch auszugsweise, ist nur mit schriftlicher Genehmigung des Herausgebers gestattet.

**Ministerium für Landwirtschaft,
Umweltschutz und Raumordnung
des Landes Brandenburg**

Landesumweltamt Brandenburg
Referat Öffentlichkeitsarbeit

Berliner Straße 21-25
14467 Potsdam
Tel: (03 31) 23 23 259
Fax: (03 31) 29 21 08
E-Mail: info@lua.brandenburg.de
www.brandenburg.de/lua