

Comparación entre hábitats de los efectos a corto, medio y largo plazo de una exposición crónica a amonio durante la fase larvaria de la rana común (*Pelophylax perezi*)



TESIS DOCTORAL

Sonia Zambrano Fernández




Programa de Doctorado en Diversidad Biológica y Medio Ambiente
Departamento de Biología Animal
Universidad de Málaga

2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Sonia Zambrano Fernández

 <https://orcid.org/0000-0002-9151-7130>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Comparación entre hábitats de los efectos a corto, medio y largo plazo de una exposición crónica a amonio durante la fase larvaria de la rana común (*Pelophylax perezi*)

TESIS DOCTORAL

Sonia Zambrano Fernández



Programa de Doctorado en Diversidad Biológica y Medio Ambiente
Departamento de Biología Animal
Universidad de Málaga
2023

Directores:
Pedro Aragón Carrera
Francisco Javier Zamora Camacho

A mis padres,
Quienes sembraron la semilla de todos mis frutos.



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña SONIA ZAMBRANO FERNÁNDEZ

Estudiante del programa de doctorado DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: COMPARACIÓN ENTRE HÁBITATS DE LOS EFECTOS A CORTO, MEDIO Y LARGO PLAZO DE UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A AMONIO DURANTE LA FASE LARVARIA DE LA RANA COMÚN (PELOPHYLAX PEREZI)

Realizada bajo la tutorización de JESÚS OLIVERO ANARTE y dirección de PEDRO ARAGÓN CARRERA Y FRANCISCO JAVIER ZAMORA CAMACHO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 14 de MARZO de 2023

Fdo.: SONIA ZAMBRANO FERNÁNDEZ Doctorando/a	Fdo.: JESÚS OLIVERO ANARTE Tutor/a
--	---------------------------------------



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

<p>Fdo.: PEDRO ARAGÓN CARRERA Director</p>	<p>Fdo.: FRANCISCO JAVIER ZAMORA CAMACHO Director</p>
--	---



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

Pedro Aragón Carrera y **Francisco Javier Zamora Camacho**, respectivamente científico titular y contratado Juan de la Cierva-Incorporación en el departamento de Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en calidad de **directores**, y **Jesús Olivero Anarte**, Profesor Titular de la Universidad de Málaga en el Departamento de Biología Animal de la Universidad, en calidad de **tutor**,

ACREDITAN QUE:

D^a **Sonia Zambrano Fernández**, doctoranda del Programa de Doctorado en Diversidad Biológica y Medio Ambiente, ha realizado, en el Departamento de Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), las investigaciones que han conducido a la redacción de la presente Memoria de Tesis Doctoral, titulada “**Comparación entre hábitats de los efectos a corto, medio y largo plazo de una exposición crónica a amonio durante la fase larvaria de la rana común (*Pelophylax perezi*)**”.

La presente memoria, que recoge los resultados obtenidos y su interpretación, reúne los requisitos necesarios para ser sometida al juicio de la Comisión correspondiente, y para ser presentada bajo el formato de compendio de publicaciones. Por tanto, como directores y tutor de la tesis, autorizamos su exposición y defensa para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmamos la presente acreditación el 14 de marzo de 2023.

Fdo.: Pedro Aragón Carrera, director

Fdo.: Francisco Javier Zamora Camacho, director

Dpto. Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)

Fdo.: Jesús Olivero Anarte, tutor

Dpto. Biología Animal, Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**AUTORIZACIÓN PARA LA LECTURA E INFORME SOBRE LA TESIS DE
Doña Sonia Zambrano Fernández**

Jesús Olivero Anarte, Profesor Titular del departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, en calidad de tutor de la tesis doctoral de D. Sonia Zambrano Fernández, titulada **Comparación entre hábitats de los efectos a corto, medio y largo plazo de una exposición crónica a amonio durante la fase larvaria de la rana común (*Pelophylax perezi*)**; y Pedro Aragón Carrera y Francisco Javier Zamora Camacho, respectivamente científico titular y contratado Juan de la Cierva-Incorporación en el departamento de Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en calidad de directores de dicha tesis, AUTORIZAN su lectura.

Asimismo, Jesús Olivero Anarte, Pedro Aragón Carrera y Francisco Javier Zamora Camacho, en calidad de tutor y directores de dicha tesis, INFORMAN que las publicaciones que avalan la tesis no han sido utilizadas en tesis anteriores.

Málaga, 14 de marzo de 2023.

Fdo.: Jesús Olivero Anarte, tutor

Fdo.: Pedro Aragón Carrera, director

Fdo.: Francisco Javier Zamora Camacho, director

ÍNDICE

Agradecimientos	4
1. Introducción	9
1.1. Cambio climático	11
1.2. Cambios en los usos del suelo	12
1.3. Invasiones biológicas	12
1.4. Contaminación	13
1.5. Los agrosistemas como marco de estudio del cambio global.....	15
1.6. El amonio: fertilizante contaminante	17
1.7. Los anfibios como modelo de estudio del cambio global	17
1.8. Efectos de los compuestos nitrogenados sobre los anfibios	19
1.8.1. Supervivencia y crecimiento	19
1.8.2. Locomoción	22
1.8.3. Anomalías morfológicas	22
1.8.4. Respuesta inmune	23
1.9. Objetivos generales	24
1.10. Referencias	25
2. Métodos generales	44
2.1. La especie de estudio: Rana verde común, <i>Pelophylax perezi</i> (adaptado de García-París et al., 2004 y Egea-Serrano, 2014).	44
2.1.1. Descripción morfológica	44
2.1.2. Corología	46
2.1.3. Hábitat	46
2.1.4. Demografía	47
2.1.5. Reproducción.....	47
2.1.6. Ecología trófica	48
2.1.7. Amenazas	48
2.1.8. Depredadores.....	49
2.1.9. Parásitos	50
2.2. ¿Por qué <i>P. perezi</i> ?	50
2.3. Zona de estudio.....	51
2.4. Manipulación y mantenimiento	52
2.5. Bibliografía.....	54
3. Resumen.....	62
3.1. Introducción	62

3.2.	Materiales y Métodos	63
3.2.1.	Objetivo 1: Supervivencia, morfología y locomoción de las larvas (Capítulo 1).....	64
3.2.2.	Objetivo 2: Aparición de malformaciones morfológicas en los metamórficos (Capítulo 2).	66
3.2.3.	Objetivo 3: Supervivencia, morfología y locomoción de las fases postmetamórficas (Capítulo 3).	67
3.2.4.	Objetivo 4: Respuesta inmunitaria de los adultos (Capítulo 4).	70
3.3.	Bibliografía.....	72
4.	Capítulos.....	79
I.	Chapter 1.....	80
II.	Chapter 2.....	82
III.	Chapter 3.....	84
IV.	Chapter 4.....	86
5.	General Discussion	88
5.1.	Bibliografía.....	94
6.	Conclusions	100
7.	ANEXOS	102
7.1.	ANEXO A1	103
7.2.	ANEXO A2	112
7.3.	ANEXO A3	115
7.4.	ANEXO A4	122

Agradecimientos

¡Amorrrrrrrrr! Bonita palabra para comenzar unos agradecimientos. De hecho, no se me ocurre ninguna mejor con la que empezar. 18 años, AMORRR, 18 años hace que nos conocimos, exactamente con 18 añitos. Departamento de botánica, octubre, 16:00h, última planta de la Facultad. Ahí estabas tú esperando nuestra primera práctica de botánica cuando yo llegué. Ahí ocurrió nuestra primera y mítica conversación “de dónde eres”, “de Lepe”- “como los chistes”, ahí comenzó nuestra gran y preciosa aventura. Benditos apellidos, que hicieron, que además de estar juntos en clase de teoría de todas las asignaturas, por elección propia, hiciera que además estuviéramos juntos en todas nuestras prácticas de todas las asignaturas a lo largo de la carrera. Quién me iba a decir a mí que esta maravillosa carrera, aparte de aportarme tantísimo iba a regalarme y a enseñarme el verdadero significado de la palabra amistad. Amistad en su grado máximo y óptimo, en su plenitud. Una amistad en la cual no son necesarias las palabras, bueno, ahora que estamos lejos el uno del otro sí, una amistad que con solo mirarnos podemos entendernos. Y quién me iba a decir a mí, que aparte de ser mi “amor” y catalogarte dentro del concepto familia, años más tarde seguirías aquí conmigo al pie de cañón. GRACIAS. Gracias por tanto. Gracias por aquel verano de 2018, verano en el cual comenzamos nuestra nueva aventura. No podía tener mejor compañero de hazañas. Gracias por estar ahí siempre, gracias por ayudarme tantísimo. Gracias por darme ánimo ese verano, verano de oposiciones no muy bueno donde una proposición indecente hace que te olvides de todo lo malo y te anime a hacer algo que nunca pensaste que conseguirías. Gracias por nuestros audios diarios. Gracias infinitas por este último año. Por no faltarme audio tuyo ni un solo día, incluso días en los que el móvil no paraba de sonar. Gracias por darme los mejores consejos en un momento de mi vida en el que todo se me venía encima. Gracias por esa frase que siempre recordaré, “es un año de aprendizaje, amor, tanto en lo profesional como en lo personal”. Gracias por estar siempre ahí. Porque si me pasa algo bueno tengo que contártelo en el momento porque si no, no lo disfruto igual, y porque si me pasa algo no tan bueno necesito los mejores asesoramientos y el apoyo del mejor. Gracias por estar presente ese 6 de agosto como un miembro más de mi familia. Gracias por contribuir a hacer que fuera precioso. Gracias por tus regalos y gracias por el mayor de ellos, tu presencia. En definitiva, darte las gracias por absolutamente todo. Gracias por elegir esta preciosa carrera y además elegir Granada para cursarla. Gracias por cruzarte en mi camino y gracias por quedarte conmigo saboreándolo, disfrutándolo y bailando bajo la lluvia en él. En definitiva, gracias por existir. Gracias por ser tú. Gracias por este nosotros.

Agradezco a mis directores de tesis, Francisco Javier y Pedro, por su dedicación, comprensión, su enseñanza y su cariño siempre ante todas mis dudas y preguntas.

Agradezco a mis tutores, Javier Palomo y Jesús Olivero, al igual que a Ana Carmen Durán, toda su ayuda y apoyo ante cualquier duda o consulta que he tenido que realizarles.

Agradezco a mis padres y hermanos tanto que me faltan hojas para poder agradecerles. Todo cuanto soy se lo debo a ellos. Familia de las que ya quedan pocas. Familia “Cuéntame” en su mayor grado de esplendor.

Agradezco a mi madre su carisma, su fuerza, su optimismo, su confianza siempre puesta en mí y su presencia siempre para todo. Por toda su dedicación con nosotros cuando mis hermanos y yo éramos pequeños. Por nuestras tardes haciendo deberes y preguntándome la lección. Por esas noches de vuelta de fiesta, cuando ya no era tan pequeña, en las que siempre bajaba para hablar conmigo y preguntarme cómo había ido la noche con la mejor de las sonrisas. Por solventar todas mis dudas y miedos y solucionar siempre hasta lo que parecía que no tuviera solución. Por hacer fácil las cosas más difíciles. Por sus consejos. Por su simplemente estar. Por ser la más luchadora y conseguir su sueño contra viento y marea, como toda una mujer guerrera. Por ayudarme a organizar uno de los eventos más importantes que hay en la vida y hacerlo más bonito aun cuando todo iba en nuestra contra; mamá, lo que no consigas tú... eres grande, eres muy grande. No podría tener mejor madre que tú.

Agradezco a mi padre, el cual lleva como profesión la mía y la más bonita. Él ha sido siempre mi gran referente. Desde pequeñita me llevaba con él al instituto cuando aún no había alumnos/as y yo creo que de ahí me viene mi pasión por la tiza y la enseñanza, por esta increíble profesión que tengo la suerte de disfrutar día tras día. Por sus sabios consejos. Su seriedad y templanza. Por no importarle la hora que fuera para venir a recogerme cuando salía de fiesta. Por nuestros largos paseos por la vega con James salvando el mundo y contándome miles de relatos e historias. Siempre aprendiendo de ti. Por los miles de problemas de matemáticas, física, química, inglés, etc., que te encargaste de hacer para ayudarme a mí. Por comer “como los pavos” nada más salir del trabajo para llevarme al conservatorio y permanecer allí tardes enteras esperando a que saliera y siempre recibíendome con su mejor agrado. Por empujarme y ayudarme en mis andaduras de profesora particular cuando la vida aún no me había concedido el privilegio de formar parte de la enseñanza pública. Por ser el mejor padre que uno pueda tener.

Agradezco a mis hermanos, José y Carlos, por hacer que conozca el verdadero significado de lapalabra “hermano”, y por hacerme sentir siempre protegida aun siendo yo la mayor de los tres. A mi hermano José por compartir juegos de infancia, cojines bajo la mesa para ver películas y mesas redondas de estudio junto a nuestra madre y/o padre. Por los fines de semana de gusanitos y películas repetidas que las disfrutábamos como si de la primera vez se tratara. Y por pasar de una niñez a una etapa adulta donde tu sensatez calma siempre una

situación donde no se le va salida. A mi hermano Carlos, el peque de la casa. Por su nobleza, su gran corazón y estar siempre pendiente de los demás y de todo en su conjunto. Por nuestros ensayos, conciertos y procesiones con la banda, banda en la cual tocábamos los tres. Por lo que transmites a través de tu saxofón y que he podido disfrutar tantas veces y finalmente en mi baile. Gracias por fundirte con tu saxofón y hacerme partícipe en mi gran día. Por estar ahí siempre para todo. Gracias.

Agradezco a mi abuela, que con sus 93 años es la persona más sabia de toda la provincia. Una mujer con unos principios y valores de los que ya pocos quedan. Siempre ahí para sus hijos e hijas. Siempre ahí para sus nietos y nietas. Gracias abuela, eres todo un ejemplo a seguir.

Agradezco a mi tita Manoli, tito Mariano, y a mis primas Gema y Cristina. Primas que son como hermanas. Domingos familiares mágicos. Domingos veraniegos con piscina, juegos en el “cercao” y cena. Domingos de invierno con chimenea. Chimenea rodeada por toda la familia, con pipas, castañas o simplemente unos polvorones navideños. Risas. Más risas. Recuerdos de infancia. De adolescencia. Agradezco el clan “fernandinos”, siempre unidos. Para lo bueno y para lo no tan bueno. Siempre los primeros.

Agradezco a Dani, mi compañero de viaje. Todos y cada uno de sus detalles. Por estar pendiente de mí y de cada una de mis cosas. Por quererme y cuidarme como solo él sabe. Por la primera cita. Por nuestros paseos por Granada y Málaga. Por nuestros viajes. Por querer ser siempre su copiloto, aunque yo no sea la mejor acompañante y me quede dormida la mayoría de las veces. Por nuestro solar. Por nuestra casa. Por ser mi acompañante de coche en mi primer destino a Almería y sentir que estaba ahí conmigo simplemente mandándome un whatsapp que podía ver mientras seguía las indicaciones del GPS. Por todos los momentos buenos que acompañan a diez años de relación y por todos los malos, que tampoco han sido pocos. Por este último año, que aunque ha sido complicado como el que más, de alguna manera ha servido para conocernos y unirnos más. Por el 6 de agosto. Y por el 13. Por todos los 13. Por todos los 13 que nos rodean y que nos dan señales de que efectivamente este es el camino.

Agradezco a todos y cada uno de mis profesores/as. Agradezco a Miguel Ballesteros, “Don Miguel”, el mejor maestro que he tenido a lo largo de mi larga vida de estudiante, la cual empecé en la infancia y de la cual aún sigo siendo partícipe. Maestro de los pies a la cabeza, exigente pero a la vez excelente y cercano. Maestro que hace que no tengas ni una falta de ortografía y a la vez tengas ganas de entrar a clase todos los días. Maestro con el cual me reencontré hace cinco años, ya que “sus niños” nos pusimos en contacto y lo buscamos hasta encontrarlo, y del cual tuve que despedirme para siempre hace justo ahora un año. Se quedan conmigo todos sus recuerdos, sus reglas nemotécnicas para recordar todo lo importante, su

energía, su positividad, su carisma, y su mujer, Carmen, la cual he tenido el placer de conocer y con la cual sigo compartiendo anécdotas.

Agradezco a Córdoba y a todo, todas y todos lo que ella implica. Ciudad que me vio crecer. Ciudad en la que viví desde mi primer año de vida hasta la adolescencia, 14 años. Ciudad en la que pasé, sin duda alguna, los mejores años de mi vida. Ciudad que me ha aportado tantísimo y que sigue haciéndolo, ya que a ella estaré conectada por siempre. Ciudad en la que viví la mayoría de mis primeras veces. Ciudad que me ha concedido amistades que aún a día de hoy disfruto.

Agradezco a Laura su incondicional y fiel amistad. Amistad que nos une desde preescolar, juntas en clase durante toda nuestra infancia y parte de nuestra juventud. Nuestras primeras quedadas al Eroski. Nuestras aventuras dentro de clase. Nuestros largos acompañamientos a nuestras respectivas casas, la una acompañando a la otra. Nuestras primeras salidas. Y de ahí, sin apenas darnos cuenta, y aun estando a kilómetros de distancia, llegó su boda, a la cual no podía faltar, y sus hijos, a los cuales no podía dejar de ir a ver, y mi boda, a la cual ella no podía faltar. Y así seguimos, veintitantos años después. Sabiendo que la una está con la otra.

Agradezco a Lydia, “mi hermanita”, todo lo que me ha transmitido desde que nos conocimos. Conocer a alguien de manera profesional, como la madre de una alumna de clases particulares, y acabar siendo tu hermanita es algo precioso de encontrar y de vivir. Podría escribir 1000 folios, pero me voy a centrar en dos ocasiones importantísimas para mí. Desde estar pasando una mala racha y que toque a tu puerta con un libro de regalo en las manos. A cederte su cita de peluquería y acompañarte toda la tarde para terminar de cañas y celebrando mi despedida de soltera. Por los cartapalios. Por las confesiones. Por los consejos de hermana mayor. Por las cervezas. Por los días soleados. Por los días grises. Por esos tres soles de hijos que tiene, dos de ellos antiguos alumnos míos, y de los cuales ha hecho que sean mis sobrinos. Por los whatsapp mañaneros dándome ánimos para el nuevo día en días que tú sabías que me hacía mucha falta. Por ese año de interina en Almería, año complicado donde los haya en el cual me tocó aprender. Año de enseñanzas tanto en lo profesional como en lo personal. Y año en el cual no me faltó el audio mañanero día tras día, y unos cuantos más a lo largo de este. Gracias por todos tus consejos, sabios como tú y como si de un auténtico miembro de mi familia se tratara. Gracias por todo lo vivido y sobre todo por lo que nos queda por vivir juntas.

Agradezco a Gloria, amistad pura donde las haya. La amistad más bonita que me llevo de mi adolescencia y mi época de instituto en Granada. Los problemas de física y química. La profe de matemáticas y su peculiar forma de hacernos preferir morir antes que entrar a clase. Las clases de biología y sus exámenes a medias. Los exámenes de sintaxis y nuestros millones de códigos para poder entendernos. La ansiedad y los nervios esperando la nota del primer y único examen

del primer trimestre. Las risas. Las barbacoas de comienzo de verano en la piscina. Su forma de darle a todo un toque de positividad y energía. Tú. Mi médica particular. Esa adolescente que con valentía y coraje entra en la facultad de medicina y sale de allí siendo una gran profesional. Esa amiga que te llama un día con “número largo” preguntando por Sonia Zambrano y haciendo saber que la llamaba la médico Gloria María para acabar rompiendo entre risas porque estando en consulta había visto que la paciente que le tocaba eras tu amiga. Esa amiga que, aunque no vea en un mes, o dos, o tres incluso, y que aunque a veces tardemos también en escribirnos, sabemos que estamos ahí la una para la otra, tanto para un momento pizza como para un momento abrazo. Por sus dos niños, que son dos tesoros. Y su marido, Ángel Luis, del cual sé, desde que empezaron muy jovencitos a salir, sus entrañables historias de adolescentes enamorados hasta su preciosa boda, a la cual tuve el privilegio de asistir. Por ese ramo con el que me obsequiaste tú el día de la mía. Y por los millones de historias y de momentos que aún nos quedan por compartir.

1. Introducción

A primeros del presente siglo, el premio Nobel de Química neerlandés Paul J. Crutzen y el biólogo estadounidense Eugene F. Stoermer propusieron que nuestro planeta había cambiado de era geológica, abandonando el Holoceno y dando paso al Antropoceno, dentro del período Cuaternario (Crutzen y Stoermer, 2000). Esta propuesta rápidamente se granjeó el apoyo de la comunidad científica (Crutzen et al., 2007; Steffen et al., 2011), y se emplea hoy en centenares de libros y artículos especializados, se cita miles de veces y se usa cada vez más en los medios de comunicación (Ulloa, 2017). El concepto se acuñó para designar las interacciones mutuas entre las modificaciones en el clima, los cambios en la biodiversidad, la rápida acumulación de gases de efecto invernadero y los daños irreversibles ocasionados por el consumo excesivo de recursos naturales por parte del ser humano (Trischler, 2017). Por ende, el Antropoceno define la época en la que las actividades del ser humano empezaron a provocar cambios biológicos y geofísicos a escala mundial. Se ha comprobado que estos cambios han alterado el relativo equilibrio en que se mantenía el sistema terrestre desde los comienzos de la época holocena (desde 11.700 años atrás). Tristemente, esta nueva época con registro estratigráfico está asociada a la llamada sexta extinción masiva de las especies, cuya diferencia con las anteriores radica en que esta está causada por *Homo sapiens*. Esto es debido a que en los últimos cien años la población humana se ha incrementado seis veces, y su actividad económica diez veces en los últimos cincuenta años. La definición de Antropoceno lleva implícita que ha de tener un registro estratigráfico de la actividad humana para poder diferenciarlo del Holoceno (Waters et al., 2016). Técnicamente, solo con el poso de la bomba atómica la definición es suficiente para diferenciar el Antropoceno del Holoceno, pero hay muchas más evidencias (los llamados tecnofósiles, etc.). Sin embargo, parece ser un debate inacabado porque la Comisión Internacional de Estratigrafía, que es el referente mundial, aun no lo ha reflejado en la última versión de la serie estratigráfica del año 2022 (<https://stratigraphy.org/chart>). Esto refuerza más la justificación general sobre estudios que examinen los efectos del cambio global en la Biodiversidad.

El Antropoceno viene marcado por un brusco cambio global, cuyas causas fundamentales se encuentran en la explotación humana del medio ambiente (Di Donato, 2008; Solomon, 2007). El origen de este cambio global antropogénico puede hallarse en cuatro componentes principales: los usos del suelo, la contaminación, el cambio climático y la dispersión de las especies invasoras. (Sala et al., 2000). Para las décadas venideras, se prevé una aceleración de este cambio, de la mano de un aumento de las actividades humanas que lo originan (Peduzzi, 2019). Entre otros factores, se espera un aumento en los cuatro componentes

principales de este cambio global: se pronostica que esta intensificación de los componentes del cambio global acentúe la degradación de la funcionalidad de los ecosistemas (Duarte et al., 2006; Pérez et al., 2012), que está desembocando en la extinción masiva actual (Rodríguez, 2018).

Estos desencadenantes no funcionan de forma aislada, sino a través de complejas sinergias que actúan a múltiples niveles (Hardy, 2003; Osmond et al., 2004; Camarero et al., 2004). Por ejemplo, los cambios en el uso del suelo implican un aumento en área de tierras de cultivo (Veldkamp and Lambin, 2001; Ewers et al., 2009) y un predominio creciente de las técnicas agrícolas intensivas sobre las tradicionales (Nonhebel, 2002; Calderón et al., 2012), lo que conlleva un incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global (Caballero et al., 2007; González et al., 2007; Johnson et al., 2007). Las prácticas agrícolas también representan un aporte notable de nitrógeno a través de fertilizantes (Olivares et al., 2013; Cárdenas-Navarro et al., 2004), que en gran medida percola en el medio (Stark and Richards, 2008; Benintende et al., 2008). Además, estos hábitats enriquecidos con nutrientes facilitan el establecimiento de plantas, animales e incluso microorganismos exóticos (Pimentel et al., 2001; Guillemaud et al., 2011). Por su parte, las alteraciones en los rangos de distribución de las especies pueden modificar las relaciones ecológicas preexistentes (Schweiger et al., 2008; Lobo, 1999), o dar lugar a interacciones novedosas (Tylianakis et al., 2008), que pueden amenazar el equilibrio de los ecosistemas. De hecho, las invasiones biológicas se han considerado durante mucho tiempo entre las principales consecuencias del cambio global (Lövei, 1997; Alonso et al., 2015). De excepcional relevancia son los casos recientes de expansión geográfica de patógenos (Wilcox and Gubler, 2005) a medida que sus huéspedes (Seimon et al., 2007) o vectores (Léger et al., 2013) siguen climas más permisivos, se ven favorecidos por cambios en los usos del suelo, o se extienden gracias al uso o comercio de animales (Randolph, 2009; Jiménez-Clavero, 2012; Kutz et al., 2013). A esta complejidad inherente al cambio global antropogénico hay que añadir efectos del cambio global de origen natural, ya que pueden llegar incluso a ocurrir conjuntamente. Por ejemplo, la erupción del volcán Pinatubo en 1991 proyectó cenizas hasta la estratosfera, lo que provocó un enfriamiento global y una disminución global de la producción primaria a corto plazo (Lucht et al. 2002), a pesar del calentamiento global contemporáneo a más largo plazo. Toda esta complejidad justifica el abordaje de este tipo de estudios mediante aproximaciones experimentales capaces de dilucidar relaciones de causa-efecto.

Para hacer frente a los problemas del Antropoceno, uno de los principales escollos con que se tropieza es la necesidad de resolver la delicada cuestión de la justicia medioambiental. Este concepto hace referencia a la distribución equitativa de cargas y beneficios en el uso y

aprovechamiento de los bienes naturales de interés común, como son por ejemplo el agua y el aire. Además, demuestra la conexión entre el gran deterioro del entorno natural y el reparto no equitativo entre países de sus consecuencias negativas y la aplicación de leyes medioambientales para afrontarlo. Es por ello que se puede hablar de una dimensión distributiva, la cual defiende la equidad en la solución de los conflictos socioambientales, y de una dimensión participativa, donde persiste la participación significativa de las personas afectadas o involucradas por aquellas decisiones relacionadas con el medio ambiente (López, 2014; Mohai et al., 2009)

Ahora bien, esos riesgos están desigualmente repartidos y en general afectan más a las personas y grupos desfavorecidos. Por ello, no resulta fácil encontrar una solución a este problema, conociendo lo heterogéneos que son los países en función de su nivel de desarrollo, extensión territorial, población, recursos naturales, etc. Además, la huella ecológica humana, es decir, el área necesaria para producir los recursos consumidos y para asimilar los residuos generados por una población determinada con un modo de vida específico (Domenech Quesada, 2009), sobrepasa en un 50% la capacidad de regeneración y absorción del planeta. El 80% de la población mundial vive en países cuya capacidad biológica, es decir, la capacidad de un área específica biológicamente productiva de generar un abastecimiento regular de recursos renovables y de absorber los desechos resultantes de su consumo (Hernández Álvarez et al., 2007), ya es menor que su huella ecológica (Olivo y Soto-Olivo, 2010; Pabón, 2003).

1.1. Cambio climático

El cambio climático, según lo define la convención de las Naciones Unidas (Sánchez, 2016; Bodansky, 1993), es una modificación en el clima, atribuida directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera (Fernández, 2013) y que se suma a los cambios regulares que, de forma natural, se dan en el planeta. El cambio climático se debe en buena medida al efecto invernadero, que se produce normalmente en la atmósfera gracias a moléculas que retienen el calor, como vapor de agua, dióxido de carbono, óxido nitroso, metano y ozono, sin los cuales la temperatura global sería tan baja que dificultaría enormemente la vida en la Tierra (Caballero et al., 2007; Ballesteros y Aristizabal 2007; Dove, 1996). Sin embargo, en los últimos 100 años, el efecto invernadero se ha ido intensificando de manera acelerada debido a la acumulación de esos mismos gases derivados de las actividades humanas (Olivo y Soto-Olivo, 2010; Baethgen y Martino, 2000). De acuerdo con la mayoría de las predicciones, el cambio climático va a generar nuevos peligros y a aumentar los que ya se ciernen sobre los ecosistemas naturales y humanos (Mendoza de Armas y Jiménez Narváez, 2017).

En los últimos años, las temperaturas globales han estado en promedio 1,0°C por encima

del valor de la era preindustrial, y se proyecta una probabilidad del 70% de que en el futuro próximo se den uno o varios meses al año con una temperatura por lo menos 1,5°C superior a dichos valores (Pörtner et al., 2022). Un aumento de casi 0,6°C en la temperatura media global ha tenido lugar en los últimos 30 años (Pörtner et al., 2022). Este incremento en la temperatura global es de especial interés por sus posibles consecuencias negativas sobre la biodiversidad (Olivo y Soto-Olivo, 2010; Searle y Rovira, 2008).

1.2. Cambios en los usos del suelo

Los cambios en los usos del suelo son una de las acciones que más impacto tienen en su degradación, así como en la conectividad entre poblaciones a causa de la fragmentación del hábitat, y uno de los temas que genera mayor preocupación en las disciplinas ambientales (Nogueira y Rico, 2017). Se cuentan entre los factores primordiales en el cambio global, ya que altera ciclos biogeoquímicos como el del agua o el del carbono (Lassaletta y Rovira, 2005; Llosa, 2010). Es un proceso antrópico que provoca la pérdida de biodiversidad a nivel mundial, así como una degradación de la productividad y estructura de los bosques y otras áreas naturales, causando en gran parte la emisión de dióxido de carbono al ambiente, tratándose además del medio por el que la sociedad resiente las alteraciones en el entorno (Paruelo et al., 2005)

1.3. Invasiones biológicas

Las invasiones biológicas son un proceso de introducción, establecimiento y expansión de especies exóticas procedentes de otras áreas geográficas, ocupando regiones en las que previamente no se encontraban, pudiendo generar daños a las especies y al ecosistema receptor (Vilà et al., 2008). Una de las razones por las que las especies alóctonas aumentan rápidamente en número, pese a encontrarse en un hábitat para el que deberían estar peor adaptadas que las nativas, es que en la nueva región no tendrán enemigos naturales, por lo que además de no estar amenazadas podrán derivar más recursos hacia la mejora de su crecimiento y reproducción (Medina-Vogel, 2010; Weickert y Sánchez, 2006). Aun así, no podemos considerar que las especies alóctonas sean invariablemente perjudiciales, ya que algunas no causan daños relevantes en los ecosistemas donde son introducidas (Bogosavljević y Zlatković, 2017). Los ecosistemas invadidos pueden ser alterados de muy diversas formas y en un grado ampliamente variable por las especies invasoras (Gutiérrez Bonilla, 2006). Los efectos serán más drásticos si sus estrategias para el uso de los recursos son diferentes a las de otras especies ya presentes: pueden, por ejemplo, aumentar o disminuir la disponibilidad de agua (Sosa-Rodríguez, 2012), nutrientes o luz (Giorgi et al., 2014) e incluso modificar la frecuencia de incendios (Jaksic y Fariña, 2015; Vidal et al., 2015; Ferreira et al., 2018). Las especies invasoras pueden afectar

negativamente a las nativas de otras formas más directas, utilizándolas como alimento, compitiendo o reproduciéndose con ellas, o introduciendo o comportándose como patógenos que las hagan enfermar o que incluso las maten (Montori et al., 2007; Olivera 2020). El resultado de esto podría ser el desplazamiento de las especies nativas con la consiguiente pérdida de biodiversidad (Capdevila-Argüelles y Suárez-Álvarez, 2013; Vilà et al., 2006). Por tanto, las invasiones producen graves e irreversibles impactos en el medio ambiente y los recursos naturales, al dañar la biodiversidad, la calidad del hábitat y el funcionamiento de los ecosistemas (Castro-Díez, et al., 2004).

1.4. Contaminación

Las múltiples fuentes de contaminación ambiental a las que se enfrenta el planeta, derivadas de diversas actividades humanas, constituyen una de las grandes amenazas para la biosfera (Dong et al., 2021). Especial mención merecen los contaminantes nitrogenados. El nitrógeno es un nutriente esencial para el desarrollo de todas las formas de vida conocidas (García y Navarro García, 2013; Hueso, 2017; Harder, 1983). Es por ello que la deposición de nitrógeno como fuente de contaminación es tan particular, dado que el nitrógeno actúa como fertilizante y contaminante a la misma vez (Fernández, 2008; Galindo et al., 2020; García-Velázquez y Gallardo 2017). En la actualidad, se registra una excesiva deposición de nitrógeno a consecuencia de presiones antrópicas como la quema de combustibles fósiles, principalmente en forma de nitrógeno oxidado, las actividades industriales o asociadas al parque móvil, o las explotaciones agropecuarias, que típicamente producen nitrógeno reducido (Gruber y Galloway 2008; Eugercios-Silva et al., 2017). Es por ello que la cantidad de nitrógeno reactivo fijado se ha visto multiplicada de tres a cinco veces a raíz de la revolución industrial, como consecuencia de las actividades humanas actuales, alterando así de manera muy pronunciada el ciclo del nitrógeno (Fowler et al., 2015). Estos desequilibrios en la cantidad de nitrógeno disponible han ido acompañados de una pérdida sistemática de biodiversidad en todos los niveles tróficos (productores primarios, consumidores y descomponedores) y grupos biológicos (Tylianakis et al., 2008; Baron et al., 2014) y la disrupción de buena parte de las interacciones ecológicas que aseguran el normal funcionamiento de los ecosistemas (Sala et al., 2000; Bobbink et al., 2010). Dichas alteraciones interrumpen la funcionalidad de los ecosistemas, afectando a su vez a la fertilidad del suelo, la regulación del clima, la composición del aire y de las masas de agua, o la polinización, entre otros muchos factores (Chapin et al., 2000). Algo que viene contemplándose desde hace tiempo es que la deposición de nitrógeno va a aumentar de manera significativa en todos los puntos calientes de biodiversidad del planeta, zonas que contienen un gran porcentaje de la biodiversidad global, aun teniendo una extensión geográfica relativamente reducida

(Phoenix et al., 2006).

Este aumento en la disponibilidad de nitrógeno se traduce en no pocas ocasiones en un traspaso del umbral de saturación de nitrógeno (Dise y Wright 1995; Brenner et al., 2005; Nilsson et al., 2006; Stevens et al., 2006), que suele provocar un aumento de las pérdidas de nitrógeno por lavado (Dise y Wright 1995). El traspaso de este umbral suele desencadenar efectos negativos por dicho elemento, ya que en este punto la disponibilidad de nitrógeno pasa a ser mayor que la que el ecosistema es capaz de procesar. Especialmente los compuestos nitrogenados más solubles en agua, nitratos, nitritos y amonio, son las formas en las que el nitrógeno suele perderse por lixiviado, sobre todo durante periodos de grandes precipitaciones (Pilkington et al., 2005; Fowler et al., 2013).

Un aumento de la deposición de nitrógeno también suele provocar un incremento de la exportación de nitrógeno, que eutrofiza las aguas subterráneas y los cursos de agua, con las correspondientes consecuencias negativas para las comunidades dulceacuícolas que a menudo se ven fuertemente alteradas (Sinsabaugh et al., 2004; Waldrop y Zak 2006; Wei et al., 2013). La eutrofización es el aporte excesivo de nutrientes inorgánicos, en la mayoría de los casos procedentes de actividades humanas, en un ecosistema acuático. Estos nutrientes inorgánicos son principalmente el nitrógeno y el fósforo. Dicho exceso de nutrientes conlleva una proliferación desmesurada de algas fitoplanctónicas, que llegan a agotar los recursos tróficos y bloquear la entrada de luz solar, impidiendo la fotosíntesis a mayores profundidades y llevando paradójicamente al colapso anóxico (Daoudi et al., 2013; Wurtsbaugh, et al., 2019). Además, se registran fuertes impactos en las comunidades dulceacuícolas, con un aumento de la biomasa de dichas algas a costa de una disminución de la biodiversidad (Ochoa-Hueso, 2017). Los cambios en el metabolismo de las comunidades microbianas del suelo son producidos precisamente por un aumento de carbono orgánico disuelto (Ochoa-Hueso, 2017), capaz de inhibir sus enzimas oxidativas (Jian et al. 2016). Esto conlleva un declive en la matriz del suelo, la cual acaba perdiéndose debido a la disfuncionalidad de los microorganismos para inmovilizar la materia orgánica disuelta (Sinsabaugh et al. 2004; Waldrop y Zak 2006). Todo esto puede desencadenar una acidificación del suelo (Horswill et al. 2008; Stevens et al. 2009; Ochoa-Hueso et al. 2013) debido a que el lavado de nitrógeno lleva consigo la pérdida de cationes básicos como son el potasio o el magnesio (Horswill et al. 2008; Stevens et al. 2009; Ochoa-Hueso et al. 2013; Ochoa-Hueso, 2017), cosa que, junto al aumento de nitrificación, conlleva la liberación de protones al medio (Brenner et al. 2005; Nilsson et al. 2006). También pueden presentarse cambios en el pH por otras razones (Van Straalen y Verhoef 1997; Xu et al. 2007; Ochoa-Hueso et al. 2014b), como consecuencia de los efectos indirectos de la deposición de nitrógeno sobre la fauna del suelo, afectando así a las redes tróficas y provocando numerosos cambios (Wolters

1991; Cole et al. 2008). Esto es debido a alteraciones en la calidad y cantidad de los aportes de hojarasca (Vourlitis y Fernández 2012; Ochoa-Hueso, 2017).

Existen diferentes causas por las que se produce la eutrofización (Prepas y Charette, 2003; Ansari, et al., 2010). Una de ellas es la agricultura (Withers et al., 2014), principalmente por el uso de fertilizantes nitrogenados, los cuales acaban en las aguas superficiales o subterráneas por lixiviación y arrastre. Numerosos estudios observacionales y experimentales demuestran que existe una relación directa entre la deposición de nitrógeno, el aumento de la eutrofización y la acidificación del suelo (Stevens et al. 2009; Ochoa-Hueso et al. 2014a; Ochoa-Hueso et al. 2015; Ochoa-Hueso, 2017). Otra causa con gran incidencia es la ganadería (Biagini y Lazzaroni, 2018), ya que si no se gestionan de manera adecuada los excrementos de los animales (ricos en nutrientes, fundamentalmente amonio), se generan vertidos a las aguas próximas. De la misma manera, los residuos urbanos, como por ejemplo los detergentes con fosfatos, producen consecuencias nocivas en las aguas (Owusu y Kuitunen, 2002). La actividad industrial también es de importante mención, ya que entre los muchos productos tóxicos que produce la industria se encuentran los vertidos nitrogenados y fosfatados (Braga et al., 2000, Khan y Mohammad, 2014). Estos se caracterizan por afectar a zonas concretas y de manera puntual, al igual que ocurre con la actividad industrial, en la cual destacan la producción de vertidos nitrogenados y fosfatados. La explotación forestal también puede producir un proceso de eutrofización (Ahtiainen y Huttunen, 1999).

1.5. Los agrosistemas como marco de estudio del cambio global

No todos los hábitats son igualmente susceptibles a las alteraciones derivadas del cambio global, ya que hay áreas sometidas a una mayor presión humana y que por lo tanto son notablemente más vulnerables (Nicholls et al., 2015). Esto es lo que ocurre en el caso de los agrosistemas. Estos representan una fuente de gases de efecto invernadero (Miller et al., 2016), un cambio notable en el uso del suelo, un reservorio de especies invasoras (Blanco y Leyva, 2007), una causa de fragmentación del hábitat (San Vicente y Valencia, 2010; San Vicente y Valencia (2012) y un nada desdeñable aporte de pesticidas y nitrógeno como fertilizante (Rodríguez, 1982; Loewy, 2004). Dado que no hay evidencia sólida de que el cambio global contribuya a mejorar la producción agrícola promedio en todo el mundo (Ortiz, 2012), alimentar a la creciente población humana requerirá una actividad agrícola cada vez más extensa e intensiva que no hará sino exacerbar esos problemas en un futuro cercano (De la Fuente y Suárez, 2008; Martínez-Castillo, 2009).

Los ecosistemas agrícolas están sometidos a cambios continuos de sus componentes con el fin de maximizar la producción. Estos cambios implican una pérdida de hábitat natural,

con las subsecuentes consecuencias perniciosas para la biodiversidad (Bionda et al., 2012). Por otra parte, la contaminación química propia de los agrosistemas afecta directamente a la funcionalidad ecosistémica, produce pérdidas en la integridad ecológica, además de dificultar el manejo de los recursos de agua y suelo, generar una dependencia de altos insumos externos (recursos no renovables, fertilizantes, plaguicidas y/o combustibles fósiles) y una degradación de la aptitud del suelo (Bello et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2010). Desde el punto de vista ambiental, la gestión inadecuada de la actividad agrícola, la aplicación de cantidades excesivas de fertilizantes minerales a los suelos, o la ejecución de prácticas agrícolas inapropiadas sin tener en cuenta las características del suelo, conforman elementos de riesgos para la salud (Sarabia, 2011). Al ser propensas a diversas alteraciones, las tierras agrícolas pueden también desempeñar un papel importante en la expansión de patógenos (Bebber 2015), ya que se sabe que los hábitats modificados por humanos desestabilizan las dinámicas de ciertas enfermedades (Brearley et al., 2013).

La agricultura amenaza de una manera menos obvia a los ecosistemas acuáticos, ya que intensifica el desperdicio de agua y contamina los recursos hídricos. Dicha contaminación del agua en sus diversas formas plantea un desafío excepcional para los humanos (Tarquino, 2004; Guzmán et al., 2016; Díaz, 2018) y muchos otros organismos (Sánchez y Tello, 2019; Baquerizo et al., 2019). Desde el punto de vista ambiental, la consecuencia final y más alarmante de la contaminación del agua es una pérdida dramática de biodiversidad acuática (Mancera-Pineda et al., 2013; Badii et al., 2015; Guadarrama-Tejas et al., 2016) e incluso terrestre (Bravo, 2002; Badii et al., 2015), con repercusiones perjudiciales también a nivel de comunidad (Camargo y Alonso, 2007; García-García et al., 2012). Estos daños a la biodiversidad podrían ser consecuencia de los efectos directos de la contaminación sobre los animales (Amoatey and Baawain, 2019) ya sea a través de deficiencias en la morfología (Pérez, 1999; Tomanova y Tedesco, 2007), fisiología (Pérez, 1999), salud (Romero et al., 2006; Elieser, 2014; Ubilla y Yohannessen, 2017), comportamiento (Espina y Vanegas, 2005, desempeño locomotor (Henao Muñoz y Bernal Bautista, 2011; Arenas, 2015) o reproducción (Ávila, 2007).

Sin embargo, tales efectos de la contaminación bien pueden representar potentes agentes selectivos capaces de promover resistencia (Cuevas-Reyes, 2010; Dussi y Flores, 2018). La heterogeneidad en la distribución espacial (Arellano y Rangel-Ch, 2008; Ares y Entraigas, 2022) y temporal (Ares y Entraigas, 2022) de las fuentes de contaminación puede llevar a una divergencia geográfica en la resistencia al agente que la produce (Bridges and Semlitsch, 2001a,b; Wirgin and Waldman 2004), cuya base genética se ha rastreado con éxito en varias ocasiones (Williams et al., 2008). La agricultura es, de hecho, una fuente notable de divergencia geográfica en la distribución de la contaminación (Moss, 2008), al ser responsable del vertido de

plaguicidas (Huseth and Groves, 2014), herbicidas (Lutri et al., 2020) y fertilizantes (Kundu et al., 2009). Entre estos últimos, la agricultura representa una fuente notable de fertilizantes nitrogenados (Báez-Pérez et al., 2020; WingChing-Jones, 2016) que aparecen sometidos a procesos de lixiviado que los arrastran a aguas superficiales (Brye et al., 2001; Randall and Mulla, 2001).

1.6. El amonio: fertilizante contaminante

Las distintas formas de contaminación del agua plantean un desafío importante para la vida silvestre (Qin et al., 2010). Una fuente notable de fertilizantes nitrogenados es representada por la agricultura (Olivares et al., 2013), ya que estos pueden lixiviarse por las superficies y llegar y transportarse a las aguas superficiales (Brye et al., 2001). En particular, a menudo se ha reportado al amonio como el compuesto nitrogenado dominante en agrosistemas y cuerpos de agua adyacentes (Garzón y Cárdenas, 2013; Cabrera, 2021; Liu et al., 2021a,b). Por un lado, el aumento moderado de la productividad primaria (base de la cadena alimentaria) debido a un incremento en la dosis de este fertilizante podría tener efectos positivos indirectos, al aumentar la materia orgánica disponible (González y Pomares, 2008). No obstante, al percolar en masas de agua, el amonio puede dar lugar a un crecimiento incontrolado de las algas por eutrofización, que a menudo origina aguas hipóxicas o incluso anóxicas, con las alteraciones concomitantes del ecosistema (Camargo and Alonso, 2006). Por otra parte, el amonio es un tóxico con múltiples efectos negativos sobre la salud y la fisiología de los animales (Camargo and Alonso, 2006; Spósito y Moltedo, 2016). Por ejemplo, se han descrito efectos negativos de diversa consideración en invertebrados de agua dulce (Berenzen et al., 2001) y salada (Abbott, 1977), mamíferos (Melin et al., 2014), aves (Mcnabb et al., 2009), reptiles (Marco et al., 2004) y anfibios (Goleman et al., 2002).

1.7. Los anfibios como modelo de estudio del cambio global

En cualquier caso, no todos los animales son igualmente susceptibles a estas alteraciones. Entre los vertebrados, los anfibios están particularmente amenazados a nivel global, habiendo sufrido sus poblaciones un importante declive en las últimas décadas (Marco, 2002; Sparling, 2003; Collins et al., 2009). El origen de este declive de los anfibios se halla en distintas causas que pueden actuar de manera independiente o conjunta. Las causas más frecuentes de este declive son la alteración y la destrucción de su hábitat (Ayllón, 2005; Méndez-Narváez, 2014). Como la mayoría de los taxones, las poblaciones de anfibios se ven frecuentemente amenazadas por barreras a la conectividad (Cushman, 2006) y competidores exóticos (Shuman-Goodier et al., 2017), patógenos (Pounds et al., 2006) o depredadores (Galán y Ferreiro, 2010; Falaschi et al., 2020). Además, como ectotermos, los cambios térmicos pueden ser perjudiciales para su

fisiología (Babini et al., 2015; Basanta, 2019). Pero los anfibios son particularmente susceptibles a la contaminación debido a su piel permeable (Beebee and Griffiths, 2005; Egea-Serrano et al., 2012). Junto con los pesticidas (Brühl et al., 2013) y otros agroquímicos (Torres y Capote, 2004; Moreno, 2017; Bernasconi, 2021), los compuestos nitrogenados derivados de fertilizantes infligen un impacto importante en las poblaciones de anfibios (Marco and Ortiz-Santaliestra, 2009a).

En este contexto, varios estudios realizados con anfibios en diferentes etapas de su desarrollo indican que la contaminación global por compuestos nitrogenados puede estar contribuyendo decisivamente en la crisis de biodiversidad en este grupo animal, ya que estos contaminantes nitrogenados pueden afectar negativamente a los embriones de anfibios al poder atravesar la barrera gelatinosa de las puestas (Aguillón-Gutiérrez, 2018). De hecho, aquellas concentraciones de nitrógeno que son consideradas legales para el consumo humano, para las larvas recién eclosionadas de varias especies son nocivas y letales (Benli y Köksal, 2005; de Lourdes et al., 2014). De igual forma, niveles subletales de contaminantes nitrogenados, así como los fertilizantes químicos o los residuos ganaderos, también pueden afectar negativamente a los anfibios tras su metamorfosis (Marco, 2002). Por su sensibilidad a la contaminación, los anfibios funcionan como bioindicadores del estado del ecosistema, es decir, el avance de esta contaminación produce efectos letales y subletales en anfibios, y es por esto que estos organismos sirven para evaluar variaciones en la calidad ambiental, tanto por sus requerimientos de hábitats acuáticos y terrestres en condiciones óptimas como por sus características morfo-fisiológicas (Holt y Miller, 2011).

Entre los compuestos nitrogenados, el amonio a menudo provoca los mayores efectos en la disminución del consumo de alimento, la supervivencia y la tasa de crecimiento en larvas de anfibios (Egea-Serrano et al., 2009; Ilha y Schiesari, 2014; Bellezi et al., 2015; Garriga et al., 2017). Por ejemplo, los renacuajos de la rana de bosque norteamericana (*Rana sylvatica*) expuestos a amonio experimentan una mayor mortalidad (Burgett et al., 2007), mientras que los expuestos a nitrato y nitrito no se ven afectados (Smith, 2007). Ocurre algo similar en el caso de *Pelophylax perezi*: el amonio tiene efectos mayores que el nitrito y el nitrato, como por ejemplo en el incremento de las tasas de actividad y la disminución del consumo de alimentos, compromete más el crecimiento, y causa mayores tasas de mortalidad (Egea-Serrano et al., 2009, 2011).

Por otra parte, se ha podido comprobar, en los últimos años, el rol de las enfermedades emergentes en los casos más enigmáticos de declives y extinciones de anfibios (Daszak et al., 1999; Kilpatrick et al., 2010; Vredenburg et al., 2010). Las amenazas más serias para muchas especies de anfibios en todo el mundo son virus y hongos que actúan como patógenos

específicos de este grupo (Carey et al., 1999; Densmore y Green, 2007). En cuanto a los virus, cobra especial relevancia la familia de los iridovirus. Estos iridovirus que afectan a los anfibios son tremendamente resistentes y además se transmiten con una gran facilidad (Daszak et al., 1999; Hyatt et al., 2000). Aparecen normalmente en ambientes degradados, donde los anfibios, para reproducirse, se concentran en grandes cantidades en pocas charcas (Gibbons et al., 2000; Andreone et al., 2006). La sintomatología de las enfermedades que causan es complicada, ya que mientras gran cantidad de veces los individuos infectados mueren sin síntomas externos evidentes, otras veces se producen hemorragias locales y úlceras en la piel y, en general, necrosis agudas en órganos internos (Daszak et al., 1999; Densmore y Green, 2007; Gray et al., 2009). Además, en la mayoría de los casos, los anfibios afectados sufren infecciones bacterianas secundarias, lo que complica el diagnóstico de la enfermedad (Bosch, 2003 a,b). Con respecto a las enfermedades fúngicas, la quitridiomycosis es el principal protagonista (Berger et al., 1999; Fites et al., 2013; Fisher y Garner, 2020). La quitridiomycosis es una enfermedad causada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* y es el principal factor que contribuye en el declive y extinción de muchas especies de anfibios (Bosch et al., 2007; Van Rooij et al., 2015).

1.8. Efectos de los compuestos nitrogenados sobre los anfibios

1.8.1. Supervivencia y crecimiento

1.8.1.1. Fases embrionarias

A diferencia de sus homólogos terrestres, que pueden evitar activamente los suelos contaminados (Marco et al., 2001), los huevos y larvas de anfibios no pueden escapar de los cuerpos de agua que habitan y, por lo tanto, de la contaminación si están contaminados (Griffis-Kyle, 2007; Daam et al., 2020). Se sabe que la gelatina de las puestas de gran cantidad de especies de anfibios aporta muchos tipos de beneficios para los embriones, entre los cuales figura una función protectora frente al efecto nocivo de diversos contaminantes (Marco y Blausten, 1998; Marco, 2001). Por ello, los embriones suelen ser más resistentes que las larvas a compuestos como el amonio, ya que estos están protegidos por sus membranas y, además, las matrices gelatinosas suelen ser resistentes a dicho contaminante (Schuytema y Nebeker, 1999a; b). No obstante, esto no implica que los embriones de anfibios sean inmunes al amonio. Por el contrario, los embriones de distintas especies de rana son sensibles a dicha sustancia, tanto cuando se encuentra formando parte de fertilizantes químicos agrarios como cuando actúa de forma aislada (Boyer y Grue, 1995; Schuytema y Nebeker, 1999a; b; Marco, 2002). Incluso, hay estudios que indican que este amonio podría ser más tóxico aún que el nitrito en el caso de los embriones, probablemente porque las membranas del huevo o la gelatina podrían ser más permeables al amonio (Randall y Tsui, 2002; Chew et al., 2005; Ip y Chew, 2010).

1.8.1.2. Fases larvarias

La alta sensibilidad de las larvas de anfibios a muchas de las sustancias químicas que producen la contaminación de hábitats acuáticos, además de las alteraciones de la calidad del agua como la eutrofización y la acidificación, está ampliamente documentada (Freda, 1986; Pierce, 1985; Marco, 2002). En consecuencia, se ha encontrado evidencia de que los compuestos nitrogenados pueden afectar directamente al crecimiento y desarrollo de los renacuajos (Burgett et al., 2007; Egea-Serrano et al., 2011). Esto podría estar mediado por una disminución e inhibición en el consumo de alimento por parte de las larvas de anfibios debido a la presencia de nitritos y nitratos en el agua (Watt y Oldham, 1995). También se sabe que la presencia de estos compuestos puede disminuir los niveles de actividad (Egea-Serrano et al., 2011), y mermar la supervivencia (Egea-Serrano et al., 2009). Además, las alteraciones morfológicas provocadas por estas sustancias podrían dificultar la locomoción, dado el impacto de la morfología en el rendimiento locomotor (Liu et al., 2022; Gómez et al., 2020). Dicha alteración del comportamiento antidepredador es un efecto secundario negativo de los compuestos nitrogenados bien documentado en las larvas de anfibios (Ortiz-Santaliestra et al., 2010), que podría causar indirectamente la reducción de la supervivencia (Burgett et al., 2007; Ilha and Schiesari, 2014). De hecho, las larvas de anfibios sometidas a contaminación por compuestos nitrogenados pueden llegar a nadar con dificultad, mostrar falta de equilibrio y parálisis, sufrir anomalías morfológicas y edemas, y finalmente incluso morir (Baker y Waights, 1993, 1994; Marco et al., 1999). Estos efectos pueden verse agravados por otros factores estresantes concomitantes, como la hipoxia (Jiang et al., 2022).

No obstante, se han descubierto diferencias notables en la sensibilidad de distintas especies e incluso entre individuos. Existen especies en las cuales todos los individuos muestran una misma tolerancia a estos compuestos, por lo cual, cuando se supera un umbral de concentración determinado, todos los individuos se ven afectados (Marco et al., 1999). Si la zona en la que estas especies habitan registra niveles de concentración próximos o por encima del umbral de tolerancia de manera continuada, estas especies podrían incluso llegar a desaparecer. Sin embargo, hay especies en las que podemos hacer una distinción entre individuos, de manera que algunos individuos son sensibles a bajas concentraciones del contaminante o bien a exposiciones agudas, mientras que otros ejemplares van a resultar muy resistentes, tanto a concentraciones más altas como a exposiciones más prolongadas en el tiempo (Nussbaum et al., 1983; Leonard et al., 1993; Marco et al., 1999). Para ilustrar esto, podemos recurrir a un ejemplo de la sensibilidad de dos especies de anfibios de Norteamérica a compuestos nitrogenados (Marco et al., 1999). La rana moteada de Oregón (*Rana pretiosa*), se encontraría en el primer supuesto, es decir, posee una elevada sensibilidad, pero escasa variabilidad en esta entre los distintos individuos, habiendo desaparecido de amplias zonas agrícolas. Por el contrario, la

salamandra noroccidental (*Ambystoma gracile*) experimentaría una gran variabilidad entre individuos en cuanto a la sensibilidad a nitratos se refiere, siendo capaz de sobrevivir en zonas con una actividad agrícola intensiva (Nussbaum et al., 1983; Leonard et al., 1993). De igual modo, se ha descubierto que las larvas de rana toro (*Rana catesbeiana*) son muy tolerantes al nitrito (Huey y Beitinger, 1980 a, b).

1.8.1.3. Fases postmetamórficas

Los efectos de la contaminación acuática sobre las fases postmetamórficas de los anfibios siguen siendo comparativamente poco estudiados, a pesar de la gran importancia que pueden llegar a tener las etapas postmetamórficas en la dinámica de las poblaciones de anfibios (Biek et al., 2002; Marco and Ortiz-Santaliestra, 2009b). Aunque los anfibios pueden absorber tóxicos a través de su piel incluso después de la metamorfosis (Brühl et al., 2011), una vez en sus etapas terrestres pueden evitar activamente las áreas contaminadas, esquivando así los efectos negativos de los contaminantes (Rouse et al., 1999). Sin embargo, la exposición a contaminantes durante las etapas larvares acuáticas podría dañar posteriormente las fases terrestres, como se ha encontrado en algunos insectos bifásicos (Debecker et al., 2017). Como se ha mencionado anteriormente, las tres formas de nitrógeno afectan de manera negativa al crecimiento, la supervivencia y el desarrollo de embriones y larvas de anfibios (Jofre y Karasov, 1999; Schuytema y Nebeker, 1999c; Griffis-Kyle, 2007). Los anfibios en fase terrestre pueden detectar y evitar fertilizantes en su entorno (Hatch et al., 2001; Ortiz-Santaliestra et al., 2005). Esto es especialmente relevante en especies que, durante sus etapas postmetamórficas, utilizan hábitats acuáticos o semiacuáticos como refugio de depredadores (Martín et al., 2006), forrajeo (Docampo y Vega, 1990) y hábitat de reproducción (Egea-Serrano et al., 2005a,b). Diferentes especies de anfibios evitan altas concentraciones de fertilizantes en su ambiente terrestre en el laboratorio, según estudios previos (Hatch et al., 2001; Marco et al., 2001; Ortiz-Santaliestra et al., 2005), los cuales muestran también que la combinación de contaminantes puede producir una respuesta multiplicativa en lugar de una aditiva (Brown y Spence, 2003). Marco et al. (2001) señalaron que los estadios postmetamórficos de los anfibios son vulnerables a los fertilizantes debido a la absorción de nitrógeno a través de la piel. Por el contrario, hay ranas capaces de ocupar hábitats contaminados, a pesar de las consecuencias perjudiciales que este comportamiento de evitación puede tener sobre la supervivencia o el éxito reproductivo (Oldham et al., 1997; Hatch et al., 2001; Marco et al., 2001; Ortiz-Santaliestra et al., 2005; Egea-Serrano, et al., 2008). Estos anfibios pueden diferir notablemente en su nivel de evitación de la exposición a fertilizantes, lo que viene indicado por la variación significativa interindividual en la evitación de contaminantes, con valores de repetibilidad moderados (Hatch et al., 2001; Egea-Serrano et al., 2008). Esto podría tener efectos importantes a escala poblacional, ya que la

repetibilidad podría estar asociada a la heredabilidad, poniendo de esta manera un límite superior a la heredabilidad, y por ende, al potencial para adaptarse a estos ambientes contaminados (Falconer, 1989). Por otro lado, Hatch et al. (2001) explicaron el hecho de que los juveniles de *Bufo boreas* no evitaran una concentración elevada de urea en el sustrato del suelo por el estrés que los sapos podrían haber experimentado durante el estudio, lo cual pudo dificultar la detección de dicha concentración.

1.8.2. Locomoción

El desempeño locomotor de los animales potencia su eficacia biológica (Miles, 2004; O'Steen et al., 2002). Esto es debido a que un mayor desempeño locomotor propicia la optimización del uso de refugios (Martín y López, 2000), la huida de depredadores (McGee et al., 2009; Moore y Biewener, 2015), la consecución de presas (Budick y O'Malley, 2000; Higham, 2007), el control del territorio (Peterson y Husak, 2006; Singleton y Garland, 2018), la dominancia social (Perry et al., 2004) y la reproducción (Husak et al., 2006). El desempeño locomotor puede ser favorecido por la selección sexual (Husak y Fox, 2008), ya que los machos más rápidos son capaces de defender mejor a las hembras de otros machos (Husak, Fox y Van Den Bussche, 2008), lo que conlleva un mayor éxito reproductor (Husak et al., 2006). Finalmente, el desempeño locomotor se relaciona positivamente con la supervivencia (Jayne y Bennett, 1990; Husak, 2006).

Las alteraciones morfológicas provocadas por compuestos nitrogenados podrían desencadenar un efecto negativo en la locomoción, debido al gran impacto de la morfología en el desempeño locomotor (Dayton et al., 2005; Arendt, 2010; Johnson et al., 2015). Esto se ha comprobado en otros agroquímicos, como los plaguicidas imidacloprid (Sievers et al., 2018), endosulfán (Denöel et al., 2013) y carbaril (Bridges, 1997), así como el herbicida diuron (Moreira et al., 2019), que perjudican la locomoción de varias especies de renacuajos. Efectos similares se han descrito a causa de otros factores químicos estresantes como el aluminio (Jung y Jagoe, 1995), el cobre (Sievers et al., 2018) e incluso los microplásticos (Araújo y Malafaia, 2020), los cuales reducen la velocidad de los renacuajos (Feder, 1983).

1.8.3. Anomalías morfológicas

Por lo general, en la mayoría de las poblaciones de anfibios, la prevalencia de anomalías morfológicas es menor del 5 % (Ouellet et al., 1997; Vandenlangenberg et al., 2003; Mester et al., 2015). No obstante, se está constatando un gran aumento, en todo el mundo, de anomalías morfológicas en las poblaciones de anfibios (Lanoo 2008; Johnson y Bowerman 2010; Laurentino et al., 2016). Entre estas anomalías, las más comunes son las malformaciones en las

extremidades, como fusiones y deformidades, y la presencia de extremidades adicionales y falanges de las extremidades posteriores (Harris et al. 2008; Johnson y Bowerman 2010; Reeves et al., 2013). Esto es algo muy importante, ya que la morfología en anfibios está estrechamente relacionada con el rendimiento locomotor (Zamora-Camacho 2018; Zamora-Camacho y Aragón 2019a), razón por la que se encuentra bajo una fuerte selección (Watkins, 1996). Probablemente, esta baja frecuencia refleja los efectos negativos de las anomalías en el rendimiento de estos organismos, ya que se ha constatado que los anuros con extremidades deformes presentan una locomoción deficiente (Zamora-Camacho y Aragón 2019b; c).

Las posibles causas de estas anomalías no están demasiado claras. Hay interacciones bióticas que pueden producir este tipo de anomalías: por ejemplo, las infecciones parasitarias (Johnson et al., 2003), a veces en sinergia con eventos de depredación (Johnson et al., 2006). Una alteración en la temperatura (Worthington 1974), y/o un exceso de radiación ultravioleta (Pahkala et al., 2001) durante el desarrollo embrionario, también puede provocar anomalías morfológicas en los anfibios. En otras ocasiones, la contaminación del hábitat ha sido diagnosticada como desencadenante de alteraciones morfológicas anómalas en anfibios (Álvarez et al., 1995; Taylor et al., 2005; D'Amen et al., 2008). Es por ello que el cambio global podría estar relacionado con el aumento en las tasas de anomalía de los anfibios (revisado en Blaustein y Johnson, 2003). En este contexto, no faltan indicios de que la contaminación por agroquímicos podría incrementar las tasas de malformaciones morfológicas (Sinawat et al., 2003).

1.8.4. Respuesta inmune

Entre las causas fundamentales de la crisis global de los anfibios están las enfermedades infecciosas emergentes (Daszak et al., 1999), especialmente las infecciones de parásitos trematodos (Rohr et al., 2008), las infecciones virales generadas por *Ranavirus* (Robert, 2010), o la quitridiomycosis causada por el patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Moss et al., 2008; Gahl et al., 2012). Estos patógenos están aumentando su prevalencia y rango de distribución (Reeder et al., 2012). De hecho, se prevé que las infecciones por *Ranavirus* y *B. dendrobatidis* aumenten en frecuencia y se propaguen en el contexto del calentamiento global (Seimon et al., 2007). Además, existe evidencia de que los humanos pueden actuar como agentes de dispersión de *B. dendrobatidis* (Fisher et al., 2009) y *Ranavirus* (Bryan et al., 2009). Por estas razones, estas y otras infecciones podrían representar una amenaza en general para los anfibios, y en particular para los que habitan en agrosistemas, donde el ser humano podría potenciar la dispersión de estos patógenos, lo cual ya ha sido reportado para *B. dendrobatidis* (Murray et al., 2009) y parásitos trematodos (Marcogliese y Pietrock, 2011).

Un factor clave en la dinámica de las enfermedades infecciosas es la capacidad de los hospedadores para generar respuestas inmunes eficientes (Carey et al., 1999; Kolby, 2018). Los sistemas inmunológicos contra patógenos y parásitos están muy extendidos en el reino animal (Rauw, 2012). En términos generales, consisten en una defensa de múltiples capas, progresivamente específicas, comenzando con barreras físicas al ingreso de patógenos y continuando con leucocitos que pueden provocar una respuesta innata genérica basada en la fagocitosis, o una respuesta adaptativa específica basada en anticuerpos (Mebs et al., 2016; Yilmaz et al., 2017). Dado su papel contra los patógenos, una respuesta inmune eficiente mejora la supervivencia (Voron et al., 2014). Sin embargo, no está exenta de costes (Schmid-Hempel, 2011), ya sea debido al consumo de energía (Groner et al., 2013; Savage et al., 2016) o de metabolitos (Narayan, 2013) debido al aumento de la tasa metabólica (Sherman and Stephens, 1998). También es fundamental el papel del estrés oxidativo (Szuroczki et al., 2016; Robinson et al., 2021) como consecuencia del ataque oxidativo contra patógenos (Rosenblum et al., 2012; Rollins-Smith, 2020). Paradójicamente, pueden darse problemas de salud debido a respuestas inmunes demasiado fuertes (Allen and Wynn, 2011) o desviadas hacia componentes del propio huésped (Bebo et al., 1998).

En determinadas circunstancias, los animales podrían tener dificultades para cubrir estos costes. Por ejemplo, la fragmentación del hábitat (Berggren, 2009) y la contaminación (Ménard et al., 2010; Pilosof et al., 2014), comunes en los agrosistemas, pueden comprometer la respuesta inmune de los animales (revisado en Martin et al., 2010). Además, se han detectado efectos negativos de los agroquímicos sobre las respuestas inmunitarias de invertebrados (Repetto y Baliga, 1996; Cristin et al., 2003) y vertebrados (Pigeon et al., 2013). En consecuencia, la eficiencia del sistema inmunológico de ciertas especies se ve comprometida en los agrosistemas (Toju et al., 2018). Aunque no hay evidencia de que la exposición a agroquímicos aumente significativamente la mortalidad por quitridiomycosis, sí aumenta la carga de patógenos, lo que podría facilitar su propagación (Buck et al., 2015). Hasta el momento, se ha detectado un efecto inmunodepresor de los plaguicidas sobre los anfibios (Gilbertson et al., 2003; Hayes et al., 2010), así como un recuento reducido de glóbulos blancos (Davis y Durso, 2009; Attademo et al., 2011) y una respuesta inflamatoria retardada en anfibios de agrosistemas (Zamora-Camacho, 2019). Por tanto, la respuesta inmune de los anfibios podría verse afectada por agroquímicos como el amonio.

1.9. Objetivos generales

El principal objetivo que esta tesis pretende alcanzar es describir los posibles efectos de una exposición crónica a concentraciones subletales de amonio (NH_4^+) durante la fase larvaria de

Pelophylax perezii sobre:

- Objetivo 1: La supervivencia, morfología y locomoción de las larvas (Capítulo 1).
- Objetivo 2: La aparición de malformaciones morfológicas en los metamórficos (Capítulo 2).
- Objetivo 3: La supervivencia, morfología y locomoción de las fases postmetamórficas (Capítulo 3).
- Objetivo 4: La respuesta inmunitaria de los adultos (Capítulo 4).

1.10. Referencias

- Abbott OJ. 1977. The toxicity of ammonium molybdate to marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin* 8: 204-205.
- Aguillón-Gutiérrez, D. R. 2018. Anomalías macroscópicas en larvas de anfibios anuros. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 1: 8-21.
- Ahtiainen M, Huttunen P. 1999. Long-term effects of forestry managements on water quality and loading in brooks. *Boreal Environment Research* 4: 101-114.
- Alonso Á, Castro-Díez P. 2015. Las invasiones biológicas y su impacto en los ecosistemas. *Ecosistemas* 24: 1-3.
- Álvarez R, Honrubia MP, Herráez MP. 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox® and Folidol® during larval development of *Rana perezii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 349-356.
- Andreone F, Mercurio V, Mattioli F. 2006. Between environmental degradation and international pet trade: conservation strategies for the threatened amphibians of Madagascar. *Nature*, 95: 81-96.
- Ansari AA, Singh GS, Lanza, GR, Rast W. 2010. *Eutrophication: causes, consequences and control* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Araújo APdC, Malafaia G. 2020. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). *Journal of Hazardous Materials* 391: 122214.
- Arellano H, Rangel-CH JO. 2008. Patrones en la distribución de la vegetación en áreas de páramo de Colombia: heterogeneidad y dependencia espacial. *Caldasia* 30: 355-411.
- Arenas Rodríguez A. 2015. Efectos letales y subletales en embriones y renacuajos de anuros expuestos a pH ácidos y básicos. Universidad del Tolima. Trabajo de Fin de Máster.
- Arendt J, 2010. Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: comparison of morphometric methods. *Journal of Morphology* 271: 1044–1052.
- Ares MG, Entraigas I. 2022. Los efectos de la heterogeneidad espacial y temporal sobre la pérdida de suelo en una cuenca agrícola. *Ecosistemas* 31: 2298-2298.
- Attademo AM, Cabagna-Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C, Bassó A. 201. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology* 20: 274-282.
- Ávila G, Gaete H, Morales M, Neaman A. 2007. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 435-441.
- Ayllón E, Bustamante P, Cabrera F, Flox L, Galindo A, Gonçalves R, Zamora F. 2005. Problemas de conservación de

- anfibios y reptiles en la provincia de Ciudad Real. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 15: 112-119.
- Babini MS, Salas NE, de Lourdes Bionda C, Martino AL. 2015. Implicaciones de la urbanización en la presencia, distribución y ecología reproductiva de la fauna de anuros de una ciudad del área central de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 188-195.
- Badii MH, Guillen A, Rodríguez CE, Lugo O, Aguilar J, Acuña M. 2015. Pérdida de biodiversidad: causas y efectos. *Revista Daena (International Journal of Good Conscience)* 10.
- Baethgen W, Martino D. 2000. Cambio climático, gases de efecto invernadero e implicancias en los sectores agropecuario y forestal del Uruguay. Resúmenes del Taller sobre el Protocolo de Kyoto. Ministerio de Vivienda, ordenamiento territorial y Medio Ambiente. Uruguay. Dirección Nacional de Medio Ambiente.
- Baker J, Waights V. 1993. The effect of sodium nitrate on the growth and survival of toad tadpoles (*Bufo bufo*) in the laboratory. *Herpetological Journal* 3: 147-148.
- Baker J, Waights V. 1994. The effects of nitrate on tadpoles of the tree frog (*Litoria caerulea*). *Herpetological Journal* 4: 106-108.
- Ballesteros HB, Aristizabal GL. 2007. Información técnica sobre gases de efecto invernadero y el cambio climático. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales-IDEAM. Bogotá, Colombia.
- Baquerizo M, Acuña M, Solis-Castro M. 2019. Contaminación de los ríos: caso río Guayas y sus afluentes. *Manglar* 16: 63-70.
- Baron JS, Barber M, Adams M, Agboola JJ, Allen EB, Bealey WJ, Bobbink R, et al. 2014. Nitrogen deposition, critical loads and biodiversity. Sutton MA, Mason KE, Sheppard LJ, Sverdrup, H, Haeuber R, Hicks WK. (eds.). Dordrecht. Springer Netherlands.
- Basanta MD. 2019. Ecología y evolución de enfermedades emergentes en anfibios: una revisión de ranavirus y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 2:9-25.
- Bebber DP. 2015. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. *Annual Review of Phytopathology* 53: 335-356.
- Beebee, TJ y Griffiths, RA. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271-285.
- Bellezi L, Ilha P, Schiesari L. 2015. Ontogenetic variation in the sensitivity of the gladiator frog, *Hypsiboas faber*, to inorganic nitrogen. *Copeia* 103, 14–21.
- Bello A, López-Pérez JA, Díez-Rojo MA, López-Cepero J, García-Álvarez A. 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *Arbor* 184: 19-29.
- Benintende MC, De Battista JJ, Benintende SM, Saluzzio MF, Muller C, Sterren MA. 2008. Estimación del aporte de nitrógeno del suelo para la fertilización racional de cultivos. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 37: 141-174.
- Benli AÇK, Köksal G. 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 339-344.
- Berenzen N, Schulz R, Liess M. 2001. Effects of chronic ammonium and nitrite contamination on the macroinvertebrate community in running water microcosms. *Water Research* 35: 3478-3482.
- Berger L, Speare R, Hyatt A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and disappearances of Australian frogs. Environment Australia, Canberra* 1999: 23-33.
- Berggren A. 2009. Effect of landscape and population variables on immune response in experimentally introduced bush-cricket populations. *Landscape Ecology* 24: 749–757.

- Bernasconi, Demetrio PM, Alonso LL, Mac Loughlin TM, Cerdá, Sarandón SJ, Marino DJ. 2021. Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 313: 107341.
- Biagini D, Lazzaroni. 2018. Eutrophication risk arising from intensive dairy cattle rearing systems and assessment of the potential effect of mitigation strategies. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 266: 76-83.
- Biek R, Funk WC, Maxell BA, Scott L. 2002. What is missing in amphibian decline research insights from ecological sensitivity analysis. *Conservation Biology* 16: 728-734.
- Bionda C, Gari N, Luque E, Salas N, Lajmanovich R, Martino A. 2012. Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en agroecosistemas y sus posibles implicaciones para la conservación. *Revista de Biología Tropical* 60: 771-779.
- Blanco Y, Leyva A. 2007. Las arvenses en el agroecosistema y sus beneficios agroecológicos como hospederas de enemigos naturales. *Cultivos Tropicales* 28: 21-28.
- Blaustein AR, Johnson PTJ. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1: 87-94.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, Spranger T, Alkemade R, Ashmore M, Bustamante M, et al. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: A synthesis. *Ecological Applications* 20: 30-59.
- Bodansky D. 1993. The United Nations framework convention on climate change: a commentary. *Yale J. Int'l L* 18: 451.
- Bogosavljević S, Zlatković B. 2017. *Dysphania pumilio* (R. Br.) Mosyakin & Clemants (Amarantaceae), a new allochthonous species in the flora of Serbia. *Botanica Serbica* 41: 83-87.
- Bosch J. 2003a. Enfermedades emergentes en anfibios. *El Ecologista* 37: 28-30.
- Bosch J. 2003b. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe* 16: 56-73.
- Bosch J, Carrascal LM, Duran L, Walker S, Fisher MC. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 253-260.
- Boyer R, Grue CE. 1995. The need for water quality criteria for frogs. *Environmental Health Perspectives* 103: 352-357.
- Braga ES, Bonetti CV, Burone L, Bonetti Filho J. 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System—Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 40: 165-173.
- Bravo E. 2002. Caso 2: La industria camaronera en Ecuador. Ponencia presentada en “Globalización y Agricultura. Barcelona. Jornades para la Soberanía Alimentaria.
- Brenner RE, Boone RD, Ruess RW. 2005. Nitrogen additions to pristine, high-latitude, forest ecosystems: Consequences for soil nitrogen transformations and retention in mid and late succession. *Biogeochemistry* 72: 257-282.
- Brearley G, Rhodes J, Bradley A, Baxter G, Seabrook L, Lunney D, Liu Y, McAlpine C. 2013. Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. *Biological Reviews* 88: 427-442.
- Bridges CM. 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1935-1939.
- Bridges, CM, Semlitsch, RD .2001a. Genetic variation in insecticide tolerance in a population of southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*): implications for amphibian conservation. *Copeia* 2001: 7-13.
- Bridges CM, Semlitsch RD. 2001b. Variation in

- pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology* 14: 1490–1499.
- Brown K, Spence KM. 2003. Effects of sublethal concentrations atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Contamination and Toxicology* 22: 627-635.
- Bryan LK, Baldwin CA, Gray MJ, Miller DL. 2009. Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 89-94.
- Brühl CA, Pieper S, Weber B. 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 2465–2472.
- Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A. 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3: 1135.
- Brye KR, Norman JM, Bundy LG, Gower ST. 2001. Nitrogen and carbon leaching in agroecosystems and their role in denitrification potential. *Journal of Environmental Quality* 30: 58–70.
- Buck JC, Hua J, Brogan WR, Dang TD, Urbina J, Bendis RJ, Stole, AB, Blaustein AR, Relyea RA. 2015. Effects of pesticide mixtures on host-pathogen dynamics of the amphibian chytrid fungus. *PLoS ONE* 10: e0132832.
- Budick SA, O'Malley DM. 2000. Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. *Journal of Experimental Biology* 203: 2565–2579.
- Burgett AA, Wright CD, Smith GR, Fortune DT, Johnson SL. 2007. Impact of ammonium nitrate on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles: effects on survivorship and behavior. *Herpetological Conservation and Biology* 2: 29–34.
- Caballero M, Lozano S, Ortega B. 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista Digital Universitaria* 8: 1-12.
- Cabrera Rodríguez A. 2021. Secuestro de carbono en agroecosistemas de ambientes tropicales y áridos con diferentes métodos de manejo. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis Doctoral.
- Calderón Puig A, Lara Franquis D, Cabrera Rodríguez A. 201). Confección de mapas temáticos para evaluar la fertilidad del suelo en las áreas agrícolas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. *Cultivos Tropicales* 33: 11-18.
- Camargo JA, Alonso Á. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International* 32: 831-849.
- Camargo J A, Alonso A. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* 16.
- Camarero JJ, Lloret F, Corcuera L, Peñuelas J, Gil-Pelegrín E. 2004. Cambio global y decaimiento del bosque. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 397-423.
- Cárdenas-Navarro R, Sánchez-Yáñez J M, Farías-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ. 2004. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 173-178.
- Capdevila-Argüelles L, Zilletti B, Suárez-Álvarez VÁ. 2013. Causas de la pérdida de biodiversidad: Especies Exóticas Invasoras. *Memorias Real Sociedad Española de Historia Natural*. 2a. época 10.
- Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology* 23: 459-472.
- Castro-Díez P, Valladares F, Alonso A. 2004. La creciente amenaza de las invasiones biológicas. *Ecosistemas* 13.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU et al. 2000. Consequences of

- changing biodiversity. *Nature* 405: 234-242.
- Cole L, Buckland SM, Bardgett RD. 2008. Influence of disturbance and nitrogen addition on plant and soil animal diversity in grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 505-514.
- Collins JP, Crump ML, Lovejoy III, TE. 2009. Extinction in our times: global amphibians decline. Oxford University Press.
- Crutzen PJ, Stoermer EF. 2000. The 'Anthropocene'. *Global Change Newsletter* 41: 17-18.
- Crutzen PJ, Ramanathan V. 2007. Atmospheric chemistry and climate in the anthropocene. Making peace with the Earth: what future for the human species and the planet, 113-120.
- Cuevas-Reyes P. 2010. Importancia de la resiliencia biológica como posible indicador del estado de conservación de los ecosistemas: implicaciones en los planes de manejo y conservación de la biodiversidad. *Biológicas* 12: 1-7.
- Cushman SA. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation* 128: 231-240.
- Daam MA, Ilha P, Schiesari L, 2020. Acute toxicity of inorganic nitrogen (ammonium, nitrate and nitrite) to tadpoles of five tropical amphibian species. *Ecotoxicology* 29: 1516–1521.
- Daoudi M, Serve L, Rharbi N, El Madani F, Vouvé F. 2013. Phytoplankton distribution in the Nador lagoon (Morocco) and possible risks for harmful algal blooms. *Transitional Waters Bulletin* 6:4-19.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5: 735.
- Davis AK, Durso AM. 2009. White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica* 65: 260-267.
- Dayton GH, Saenz D, Baum KA, Langerhans B, DeWitt TJ. 2005. Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111: 582–591.
- Debecker S, Dinh KV, Stoks R. 2017. Strong delayed interactive effects of metal exposure and warming: latitude-dependent synergisms persist across metamorphosis. *Environmental Science and Technology* 51: 2409–2417.
- De la Fuente EB, Suárez SA. 2008. Problemas ambientales asociados a la actividad humana: la agricultura. *Ecología Austral* 18: 239-252.
- de Lourdes Cobo M, Sonnenholzner S, Wille M, Sorgeloos P. 2014. Ammonia tolerance of *Lithopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research* 45: 470-475.
- Denoël M, Libon S, Kestemont P, Basseur C, Focant JF, De Pauw E. 2013. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere* 90: 945–951.
- Densmore CL, Green DE. 2007. Diseases of amphibians. *ILAR Journal* 48: 235-254.
- Díaz Duque JA. 2018. El agua en Cuba: un desafío a la sostenibilidad. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental* 39: 46-59.
- Di Donato M. 2008. Impacto del Cambio Global en el Antropoceno: crisis, consecuencias y adaptación. *CIP-Ecosocial Boletín* 5: 1-10.
- Dise NB, Wright RF. 1995. Nitrogen leaching from European forests in relation to nitrogen deposition. *Forest Ecology and Management* 71: 153-161.
- Docampo L, Vega MM. 1990. Contribución al estudio de la alimentación de *Barbus bocagei* (Steindachner, 1866), *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) y *Rana perezi* (Seoane, 1885) en ríos de Bizkaia. *Scientia Gerundensis*, 16: 61-73.
- Domenech Quesada JL. 2009: "Huella Ecológica y Desarrollo Sostenible". A.E.N.O.R., Madrid.
- Dong M, Chen W, Chen X, Xing X, Shao M,

- Xiong X, Luo Z. 2021. Geochemical markers of the Anthropocene: perspectives from temporal trends in pollutants. *Science of the Total Environment* 763: 142987.
- Dove J. 1996. Student teacher understanding of the greenhouse effect, ozone layer depletion and acid rain. *Environmental Education Research* 2: 89-100.
- Dussi MC, Flores L B. 2018. Visión multidimensional de la agroecología como estrategia ante el cambio climático. *Inter Disciplina* 6: 129-153.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005a. Selección de hábitat reproductor por *Rana perezi* Seoane, 1885 en el NO de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). *Revista Española de Herpetología* 19: 113-125.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005b. Fenología reproductiva de la comunidad de anfibios del Noroeste de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). *Zoologica Baetica* 16: 59-72.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2008. Analysis of the avoidance of nitrogen fertilizers in the water column by juvenile Iberian water frog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), in laboratory conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 178-183.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2009. Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi*. *Chemosphere* 76: 869-877.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M, 2011. Behavioral responses of the Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), to three nitrogenous compounds in laboratory conditions. *Ecotoxicology* 20: 1246–1257.
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2: 1382-1397.
- Elieser EG. 2014. Daños a la salud por mala disposición de residuales sólidos y líquidos en Dili, Timor Leste. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52: 270-277.
- Espina S, Vanegas C. 2005. Ecofisiología y contaminación. *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, México, 53-78.
- Eugercios Silva A, Álvarez-Cobelas M, Montero González E. 2017. Impactos del nitrógeno agrícola en los ecosistemas acuáticos. *Ecosistemas* 26: 37-44.
- Ewers RM, Scharlemann JPW, Balmford A, Green RE. 2009. Do increases in agricultural yield spare land for nature? *Global Change Biology* 15: 1716-1726.
- Falaschi M, Melotto A, Manenti R, Ficetola, GF (2020). Invasive species and amphibian conservation. *Herpetologica* 76: 216-227.
- Falconer DS. 1989. Longman, Harlow. Introduction to quantitative genetics.
- Feder ME. 1983. The relation of air breathing and locomotion to predation on tadpoles, *Rana berlandieri*, by turtles. *Physiological Zoology* 56: 522–531.
- Fernández JL U. 2013. El cambio climático: sus causas y efectos medioambientales. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid* 50: 71-98.
- Ferreira OR, Cruz O, Duro JG, Arán D, Fuentes RG., Riveiro SF, Jiménez MC. 2018. Especies invasoras e incendios forestales en el NW de la Península Ibérica. In *Ecología de la regeneración de zonas incendiadas* (pp. 75-87). Academia de Ciencias Sociales y del Medio Ambiente de Andalucía.
- Fisher MC, Garner, TW, Walker SF. 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annual Review of Microbiology* 63: 291-310.
- Fisher MC, Garner TW. 2020. Chytrid fungi

- and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology* 18: 332-343.
- Fites JS, Ramsey JP, Holden WM, Collier SP, Sutherland DM, Reinert LK, Rollins-Smith LA. 2013. The invasive chytrid fungus of amphibians paralyzes lymphocyte responses. *Science* 342: 366-369.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ et al. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 368: 20130164.
- Fowler D, Steadman CE, Stevenson D, Coyle M, Rees RM, Skiba UM, Sutton MA et al. 2015. Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 15: 1747-1868.
- Freda J. 1986. The influence of acidic pond water on amphibians: a review. *Water Air Soil Pollution* 30: 439-450.
- Gahl MK, Longcore JE, Houlahan JE. 2012. Varying responses of northeastern North American amphibians to the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 26: 135-141.
- Galán P, Ferreiro R. 2010. Depredación de *Pelobates cultripes* en Galicia por un mustélido. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 19, 49-50.
- García-García MS N, Pedraza-Garciga CJ, Martínez M, Leyva CJ. 2012. Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las bahías de Buenavista y San Juan de los Remedios, Villa Clara, Cuba. *Revista Cubana de Química* 24: 126-135.
- García GN, Navarro García S. 2013. *Química agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas*. Mundi-Prensa Libros.
- García-Velázquez L, Gallardo A. 2017. El ciclo global del nitrógeno. Una visión para el ecólogo terrestre. *Ecosistemas* 26: 4-6.
- Garzón J, Cárdenas EA. 2013. Emisiones antropogénicas de amoníaco, nitratos y óxido nítrico: compuestos nitrogenados que afectan el medio ambiente en el sector agropecuario colombiano. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 60: 121-138.
- Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS, Winne CT. 2000. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience* 50: 653-666.
- Gilbertson MK, Haffner GD, Drouillard KG, Albert A, Dixon B. 2003. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 22: 101-110.
- Giorgi A, Vilches C, Rodríguez Castro MC, Zunino E, Debandi J, Kravetz S, Torremorell A. 2014. Efecto de la invasión de acacia negra (*Gleditsia triacanthos* L. (Fabaceae)) sobre la temperatura, luz y metabolismo de un arroyo pampeano. *Acta Biológica Colombiana* 19: 99-106.
- Goleman WA, Carr JA, Anderson TA. 2002. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 590-597.
- González AD, Carlsson Kanyama A. 2007. Emisiones de gases de efecto invernadero con alto potencial de calentamiento global: el sector agropecuario. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 11.
- González V, Pomares F. 2008. *La fertilización y el balance de nutrientes en sistemas agroecológicos*. Madrid. Sociedad Española de Agricultura Ecológica.

- Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT. 2009. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 87: 243-266.
- Griffis-Kyle KL. 2007. Sublethal effects of nitrite on Eastern tiger salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) and Wood frog (*Rana sylvatica*) embryos and larvae: implications for field populations. *Aquatic Ecology* 41: 119-127.
- Groner ML, Buck JC, Gervasi S, Blaustein AR, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Relyea RA. 2013. Larval exposure to predator cues alters immune function and response to a fungal pathogen in post-metamorphic wood frogs. *Ecological Applications* 23: 1443-1454.
- Gruber N, Galloway JN. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451: 293-296.
- Guadarrama-Tejas R, Kido-Miranda J, Roldan-Antunez G, Salas-Salgado M, Mata-García M, Vázquez-Briones MDC, Ortega-Herera F. 2016. Contaminación del agua. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales* 2: 1-10.
- Guillemaud T, Ciosi M, Lombaert É, Estoup A. 2011. Biological invasions in agricultural settings: insights from evolutionary biology and population genetics. *Comptes Rendus Biologies* 334: 237-246.
- Gutiérrez Bonilla FDP. 2006. Estado de conocimiento de especies invasoras. Propuesta de lineamientos para el control de los impactos. Bogotá, Colombia: Consejo Editorial IAvH.
- Harris ML, Bishop CA, McDaniel TV. 2008. Assessment of rates of deformity in wild frog populations using *in situ* cages: a case study of leopard frogs (*Rana pipiens*) in Ontario, Canada: *Biomarkers* 6: 52-63.
- Harder W, Dijkhuizen L. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Annual Review of Microbiology* 37: 1-23.
- Hardy JT. 2003. *Climate Change: Causes, Effects and Solutions*. Wiley, Chichester. Hartson, R.B., Orlofske, S., Melin, V.E., Dillon, R.T., Johnson, P.T.J., 2011. Land use and wetland spatial position jointly determine amphibian parasite communities. *EcoHealth* 8: 485-500.
- Hatch AC, Belden LK, Scheessele E, Blaustein AR. 2001. Juvenile amphibians do not avoid potentially lethal levels of urea on soil substrate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2328-2335.
- Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology* 213: 921-933.
- Henao Muñoz LM, Bernal Bautista MH. 2011. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 35: 105-110.
- Hernández Álvarez JL, Velázquez Buendía R, Alonso Curiel D, Garoz Puerta I, López Crespo C, López Rodríguez Á, Castejón Oliva FJ. 2007. Evaluación de ámbitos de la capacidad biológica y de hábitos de práctica de actividad física: estudio de la población escolar española. *Revista de Educación*.
- Hernández-Rodríguez OA, Ojeda-Barríos DL, López-Díaz JC, Arras-Vota AM. 2010. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnociencia Chihuahua* 4: 1-6.
- Higham TE. 2007. The integration of locomotion and prey capture in vertebrates: morphology, behavior and performance. *Integrative and Comparative Biology* 47: 82-95.
- Holt EA, Miller SW. 2011. Bioindicators: using organisms to measure. *Nature* 3: 8-13.
- Horswill P, O'Sullivan O, Phoenix GK, Lee JA, Leake JR. 2008. Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental Pollution* 155: 336-

- 349.
- Hueso RO. 2017. El ciclo del nitrógeno y el hombre: De lo esencial a lo excesivo. *Ecosistemas* 26: 1-3.
- Huey DW, Beitinger TL. 1980^a. Hematological responses of larval *Rana catesbeiana* to sublethal nitrate exposures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 574-577.
- Huey DW, Beitinger TL. 1980^b. Toxicity of nitrite to larvae of the salamander *Ambystoma texanum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 909-912.
- Husak JF. 2006. Does speed help you survive? A test with collared lizards of different ages. *Functional Ecology* 20: 174-179.
- Husak JF, Fox SF. 2008. Sexual selection on locomotor performance. *Evolutionary Ecology Research* 10: 213-228.
- Husak JF, Fox SF, Lovern MB, Van Den Bussche RA. 2006. Faster lizards sire more offspring: Sexual selection on whole-animal performance. *Evolution* 60: 2122e2130.
- Husak JF, Fox SF, Van Den Bussche RA. 2008. Faster male lizards are better defenders not sneakers. *Animal Behaviour* 75: 1725-1730.
- Huseth, AS y Groves, RL. 2014. Environmental fate of soil applied neonicotinoid insecticides in an irrigated potato agroecosystem. *PLoS ONE* 9: e97081.
- Hyatt AD, Gould R, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Coupar BEH. 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology* 145: 301-331.
- Ilha P, Schiesari L, 2014. Lethal and sublethal effects of inorganic nitrogen on gladiator frog tadpoles (*Hypsiboas faber*, Hylidae). *Copeia* 221-230: 2014.
- Ip YK, Chew SF. 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in Physiology* 1: 134.
- Jaksic FM, Fariña JM. 2015. Incendios, sucesión y restauración ecológica en contexto. In *Anales del Instituto de la Patagonia* (Vol. 43, No. 1, pp. 23-34). Universidad de Magallanes.
- Jayne BC, Bennett AF. 1990. Selection on locomotor performance capacity in a natural population of garter snake. *Evolution* 44: 1204-1229.
- Jian S, Li J, Chen J, Wang G, Mayes MA, Dzantor KE, Hui D, Luo Y. 2016. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 101: 32-43.
- Jiang H, He J, Wang H, Zheng L, Wang, X, Zhang H, Shu Y. 2022. Gill junction injury and microbial disorders induced by microcystin-leucine Arginine in *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Toxins* 14:479.
- Jiménez-Clavero MÁ. 2012. Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms. *Frontiers in Genetics* 3: 105.
- Jofre, MB, Karasov WH. 1999. Direct effect of ammonia on three species of North American anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1806-1812.
- Johnson PT J and J Bowerman. 2010. Do predators cause frog deformities? The need for an eco-epidemiological approach. *Journal of Experimental Zoology B, Molecular and Developmental Evolution* 314: 515-518.
- Johnson, PTJ, ER Preu, DR Sutherland, JM Romansic, BHan, and AR Blaustein. 2006. Adding infection to injury: synergistic effects of predation and parasitism on amphibian malformations. *Ecology* 87: 2227-2235.
- Johnson PTJ, KB Lunde, DA Zelmer, K Werner. 2003. Limb deformities as an emerging parasitic disease in amphibians: evidence from museum specimens and resurvey data. *Conservation Biology* 17: 1724-1737.
- Johnson, JMF, Franzluebbbers AJ, Weyers S L, Reicosky DC. 2007. Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental*

- Pollution 150: 107-124.
- Johnson JB, Saenz D, Adams CK, Hibbitts TJ. 2015. Naturally occurring variation in tadpole morphology and performance linked to predator regime. *Ecology and Evolution* 5: 2991–3002.
- Jung RE, Jagoe CH. 1995. Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green tree frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. *Canadian Journal of Zoology* 73: 2171–2183.
- Khan MN, Mohammad F. 2014. Eutrophication: challenges and solutions. Springer, Dordrecht. In *Eutrophication: causes, consequences and control* (pp. 1-15).
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 109-118.
- Kolby JE. 2018. Amphibia: global amphibian declines caused by an emerging infectious disease and inadequate immune responses. Springer, Cham. In *Advances in comparative immunology* (pp. 981-990).
- Kundu MC, Manda B, Hazra GC. 2009. Nitrate and fluoride contamination in groundwater of an intensively managed agroecosystem: a functional relationship. *Science of the Total Environment* 407: 2771–2782.
- Kutz SJ, Checkley S, Verocai GG, Dumond M, Hoberg EP, Peacock R, Wu JP, Orsel K, Seegers K, Warren AL, Abrams A. 2013. Invasion, establishment, and range expansion of two parasitic nematodes in the Canadian Arctic. *Global Change Biology* 19: 3254-3262.
- Lanoo MJ. 2008. *Malformed Frogs: The Collapse of Aquatic Ecosystems*. Berkeley: University of California Press. 288 pp.
- Lassaletta L, Rovira JV. 2005. Agricultura industrial y cambio global. *El Ecologista* 45: 52-55.
- Laurentino TG, Pais MP, Rosa GM. 2016. From a local observation to a European-wide phenomenon: amphibian deformities at Serra da Estrela Natural Park, Portugal: Basic and Applied Herpetology.
- Léger E, Vourc’h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD. 2013. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology* 59: 219-244.
- Leonard WP, Brown HA, Jones LLC, McAllister KR, Storm RM. 1993. *Seattle Audubon Society, Seattle, Washington. Amphibians of Washington and Oregon*. 168pp.
- Liu G, Rowley JLL, Kingsford RT, Callaghan CT. 2021a. Species’ traits drive amphibian tolerance to anthropogenic habitat modification. *Global Change Biology* 27: 3120–3132.
- Liu XL, Han G, Zeng J, Liu M, Li XQ, Boeckx P. 2021b. Identifying the sources of nitrate contamination using a combined dual isotope, chemical and Bayesian model approach in a tropical agricultural river: case study in the Mun River, Thailand. *Science of the Environment* 760: 143938.
- Liu C, Gu B, Sun C, Li D. 2022. Effects of aquaponic system on fish locomotion by image-based YOLO v4 deep learning algorithm. *Computers and Electronics in Agriculture* 194: 106785.
- Llosa ZB. 2010. Problemática de los ciclos biogeoquímicos, hidrológico y de nutrientes en la meseta central de Costa Rica. *Posgrado y Sociedad Revista Electrónica del Sistema de Estudios de Posgrado* 10: 23-37.
- Lobo JM. 1999. Individualismo y adaptación espacial: un nuevo enfoque para explicar la distribución geográfica de las especies. *Boletín de la SEA* 26:561-572.
- Loewy T. 2004. Fraccionamiento del nitrógeno y fertilización foliar en trigo. Paraná (Entre Ríos): In *Actas del XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. (pp. 22-25).
- López I. 2014. Justicia ambiental. *Eunomía: Revista en Cultura de la Legalidad* 6: 261-268.

- Lucht W, Prentice IC, Myneni RB, Sitch S, Friedlingstein P, Cramer W, Bousquet P, Buermann W, Smith B. 2002. Climatic control of the high-latitude vegetation greening trend and Pinatubo Effect. *Science* 296: 1687–1689.
- Lutri VF, Matteoda E, Blarasin M, Aparicio V, Giacobone D, Maldonado L, Becher Quinodoz F, Barrera A, Albo JG. 2020. Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina: *Science of the Total Environment* 711: 134557.
- Mancera-Pineda JE, Gavio B, Lasso-Zapata J. 2013. Principales amenazas a la biodiversidad marina. *Actualidades Biológicas* 35: 111-133.
- Marco A, Blaustein AR. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in cascade frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 946-949.
- Marco A. 2002. Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios. *Revista Española de Herpetología* 16: 5-17.
- Marco A, Blaustein AR. 1998. Egg gelatinous matrix protects *Ambystoma gracile* embryos from prolonged exposure to air. *Journal of Herpetology* 8: 207-211.
- Marco A, Cash D, Belden LK, Blaustein AR. 2001. Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 406-409.
- Marco A, Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniagua C. 2004. Toxic effects of ammonium nitrate fertilizer on flexible-shelled lizard eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73: 125-131.
- Marco A., Ortiz-Santaliestra, ME. 2009a. Impact of reactive nitrogen on amphibians. In: Heatwole H, Wilkinson JW. (Eds.), *Amphibian Decline*. Baulkham Hills, New South Wales, Australia: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution, Amphibian Biology, vol. 8. Surrey Beatty & Sons.
- Marco A, Ortiz-Santaliestra, ME. 2009b. Pollution: impact of reactive nitrogen on amphibians (nitrogen pollution). *Amphibian Biology* 8:3145-3185.
- Marcogliese DJ, Pietrock M. 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends in Parasitology* 27: 123-130.
- Martín J, López P. 2000. Fleeing to unsafe refuges: effects of conspicuousness and refuge safety on the escape decisions of the lizard *Psammotromus algirus*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 265–270.
- Martín J, Luque-Larena JJ, López P. 2006. Collective detection in escape responses of temporary groups of Iberian green frogs. *Behavioral Ecology* 17: 222-226.
- Martínez-Castillo R. 2009. Sistemas de producción agrícola sostenible. *Revista Tecnología en Marcha* 22: ág-23.
- Mcnabb FMA, Larsen CT, Pooler PS. 2009. Ammonium perchlorate effects on thyroid function and growth in bobwhite quail chicks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 997-1003.
- McGee MR, Julius ML, Vajda AM, Norris DO, Barber L, Schoenfuss HL. 2009. Predator avoidance performance of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*) following short-term exposure to estrogen mixtures. *Aquatic Toxicology* 91: 355e361.
- Mebs D, Yotsu-Yamashita M, Arakawa O. 2016. The praying mantis (Mantodea) as predator of the poisonous red-spotted newt *Notophthalmus viridescens* (Amphibia: Urodela: Salamandridae). *Chemoecology* 26: 121-126.
- Medina-Vogel G. 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de medicina veterinaria* 42: 11-24.
- Melin VE, Potineni H, Hunt P, Griswold J,

- Siems B, Werre SR, Hrubec TC. 2014. Exposure to common quaternary ammonium disinfectants decreases fertility in mice. *Reproductive Toxicology* 50: 163-170.
- Ménard L, Escarné R, Marcogliese DJ, Cyr D, Fournier M, Gagné F. 2010. The impacts of human pollution on the immune system of spottail shiners *Notropis hudsonius* in the St. Lawrence river. *Fresenius Environmental Bulletin* 19: 1369–1374.
- Méndez-Narváez J. 2014. Diversidad de anfibios y reptiles en hábitats altoandinos y paramunos de la cuenca del río Fúquene, Cundinamarca, Colombia. *Biota Colombiana* 15.
- Mendoza de Armas C, Jiménez Narváez G. 2017. Relación entre el efecto invernadero y el cambio climático desde la perspectiva del sector agrario. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 70: 8120-8122.
- Mester B, Lengyel S, Puky M. 2015. Low frequency of amphibian morphological anomalies in a large protected wetland and grassland complex in Hungary. *Herpetological Conservation and Biology* 10: 679-687.
- Miles DB. 2004. The race goes to the swift: Fitness consequences of variation in sprint performance in juvenile lizards. *Evolutionary Ecology Research*, 6, 63e75.
- Montori A, Llorente G, Richter-Boix A, Villero D, Franch M, Garriga N. 2007. Colonización y efectos potenciales de la especie invasora *Discoglossus pictus* sobre las especies nativas. *Munibe* 25: 14-27.
- Moore TY, Biewener AA. 2015. Outrun or outmaneuver: Predator-prey interactions as a model system for integrating biomechanical studies in a broader ecological and evolutionary context. *Integrative and Comparative Biology* 55: 1188e1197.
- Moreira RA, Freitas JS, Pinto TJS, Schiesari L, Daam MA, Montagner CC, Goulart BV, Espindola ELG. 2019. Mortality, spatial avoidance and swimming behavior of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide Diuron. *Water, Air and Soil Pollution* 230: 125.
- Moss B. 2008. Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 659–666.
- Moss AS, Reddy NS, Dortaj IM, San Francisco MJ. 2008. Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. *Mycologia* 100: 1-5.
- Murray KA, Skerratt LF, Speare R, McCallum H. 2009. Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 23: 1242-1252.
- Narayan EJ. 2013. Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. *Conservation Physiology* 1: cot011.
- Nicholls CI, Henao A, Altieri MA. 2015. Agroecología y el diseño de sistemas agrícolas resilientes al cambio climático. *Agroecología* 10: 7-31.
- Nilsson LO, Wallander H, Bååth E, Falkengren-Grerup U. 2006. Soil N chemistry in oak forests along a nitrogen deposition gradient. *Biogeochemistry* 80: 43-55.
- Nogueira DF, Rico EC. 2017. Cambios en los usos de suelo en la Península Ibérica: Un meta-análisis para el período 1985-2015. *Biblio3W Revista Bibliográfica de Geografía y Ciencias Sociales*.
- Nonhebel S. 2002. Energy yields in intensive and extensive biomass production systems. *Biomass and Bioenergy* 22:159-167.
- Nussbaum RA, Brodie EDJR, Storm RM. 1983. *Amphibian and Reptiles of the Pacific Northwest*. Moscow, ID, USA. University of Idaho Press.
- Ochoa-Hueso, R- 2017. Consecuencias de la deposición de nitrógeno sobre la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres: Una

- aproximación general desde la ecología de ecosistemas. *Ecosistemas* 26: 25-36.
- Ochoa-Hueso R, Arróniz-Crespo M, Bowker MAMA, Maestre FTFT, Pérez-Corona MEE, Theobald, MR, Vivanco MGM., Manrique E. 2014a. Biogeochemical indicators of elevated nitrogen deposition in semiarid Mediterranean ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment* 186: 5831-5842.
- Ochoa-Hueso R, Delgado-Baquerizo M, Gallardo A, Bowker MA, Maestre FT. 2015. Climatic conditions, soil fertility and atmospheric nitrogen deposition largely determine the structure and functioning of microbial communities in biocrust-dominated Mediterranean drylands. *Plant and Soil* 399: 271-282.
- Ochoa-Hueso R, Rocha I, Stevens CJ, Manrique E, Luciañez MJ. 2014b. Simulated nitrogen deposition affects soil fauna from a semiarid Mediterranean ecosystem in central Spain. *Biology and Fertility of Soils* 50: 191-196.
- Ochoa-Hueso R, Stevens CJ, Ortiz-Llorente MJ, Manrique E. 2013. Soil chemistry and fertility alterations in response to N application in a semiarid Mediterranean shrubland. *Science of the Total Environment* 452-453: 78-86.
- Oldham RS, Latham DM, Hilton-Brown D, Towns M, Cooke AS, Burn A. 1997. The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog (*Rana temporaria*) survival. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 61: 69-74.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 486-494.
- Olivera JM, Riaño ME, Etchebarne V, García ML, Justo C, Martino D. 2020. Monitoreo de especies exóticas invasoras del bosque nativo de Uruguay mediante sensoramiento remoto. Proyecto REDD+ Uruguay. Montevideo, MGAP/MVOTMA.
- Olivo MDL, Soto-Olivo A. 2010. Comportamiento de los gases de efecto invernadero y las temperaturas atmosféricas con sus escenarios de incremento potencial. *Universidad, Ciencia y Tecnología* 14: 221-230.
- Ortiz R. 2012. El cambio climático y la producción agrícola. *Banco Interamericano de desarrollo* 836.
- Ortiz-Santaliestra ME, Marco A, Lizana M. 2005. Sensitivity and behaviour of the Iberian newt, *Triturus boscai*, under terrestrial exposure to ammonium nitrate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 662-669.
- Ortiz-Santaliestra ME, Fernández-Benéitez MJ, Marco A, Lizana M. 2010. Influence of ammonium nitrate on larval anti-predatory responses of two amphibian species. *Aquatic Toxicology* 99: 198-204.
- Osmond B, Ananyev G, Berry J, Langdon C, Kolber Z, Lin G, Monson R, Nichol C, Rascher U, Schurr U, Smith S, Yakir D. 2004. Changing the way we think about global change research: scaling up in experimental ecosystem science. *Global Change Biology* 10: 393-407.
- O'Steen S, Cullum AJ, Bennett AF. 2002. Rapid evolution of escape ability in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* 56: 776-784.
- Ouellet M, J Bonin, J Rodrigue, JL DesGranges, and S Lair. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 95-104.
- Owusu Boadi K, Kuitunen M. 2002. Urban waste pollution in the Korle lagoon, Accra, Ghana. *Environmentalist* 22: 301-309.
- Pabón JD. 2003. El cambio climático global y su manifestación en Colombia: Cuadernos de Geografía: *Revista Colombiana de Geografía* 12: 111-119.
- Pahkala M, Laurila A, Merilä J. 2001. Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*.

- Proceedings of the Royal Society of London B 268: 1699-1706.
- Paruelo JM, Guerschman JP, Verón SR. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia Hoy* 15: 14-23.
- Peduzzi P. 2019. The disaster risk, global change, and sustainability nexus. *Sustainability* 11: 957.
- Pérez GIA, Castro LG. 2012. Degradación, pérdida y transformación de la biodiversidad continental en Colombia: invitación a una interpretación socioecológica. *Ambiente y Desarrollo* 16: 53-71.
- Pérez GR. 1999. Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. *Academia Colombiana de Ciencia* 23: 375-387.
- Perry G, Levering K, Girard I, Garland T. 2004. Locomotor performance and social dominance in male *Anolis cristatellus*. *Animal Behaviour* 67: 37e47.
- Peterson CC, Husak JF. 2006. Locomotor performance and sexual selection: individual variation in sprint speed of collared lizards (*Crotaphytus collaris*). *Copeia* 2006: 216–224.
- Phoenix GK, Hicks W., Cinderby S, Kuylenstierna JCI, Stock WD, Dentener FJ, Giller KE et al. 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: The need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology* 12: 470-476.
- Pierce BA. 1985. Acid tolerance in amphibians. *BioScience* 35: 239-243.
- Pigeon G, Baeta M, Bélisle M, Garant D, Pelletier F. 2013. Effects of agricultural intensification and temperature on immune response to phytohemagglutinin in tree swallows *Tachycineta bicolor*. *Canadian Journal of Zoology* 91: 56–63.
- Pilkington MG, Caporn SJM, Carroll JA, Cresswell N, Lee JA, Ashenden TW, Brittain SA et al. 2005. Effects of increased deposition of atmospheric nitrogen on an upland moor: Leaching of N species and soil solution chemistry. *Environmental Pollution* 135: 29-40.
- Pilosof S, Korine C, Moore MS, Krasnov BR. 2014. Effects of sewage-water contamination on the immune response of a desert bat. *Mammalian Biology* 79: 183–188.
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O’Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T, Tsomondo T. 2001. Economic and environmental threats of alien plant, animal and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84: 1-20.
- Pörtner HO; Roberts DC, Adams H, Adelekan I, Adler C, Adrian R, Aldunce P, Ali E, Ara Begum R, Bednar-Friedl B, et al. IPCC, 2022. *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability: Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK, 2022: Cambridge University Press.
- Prepas EE, Charette T. 2003. Worldwide eutrophication of water bodies: causes, concerns, controls. *Treatise on Geochemistry* 9: 612.
- Qin Y, Lv X, Li J, Qi G, Diao Q, Liu G, Xue M, Wang J, Tong J, Zhang L, Zhang K, 2010. Assessment of melamine contamination in crop, soil and water in China and risks of melamine accumulation in animal tissues and products. *Environment International* 36: 446–452.
- Randall GW, Mulla DJ. 2001. Nitrate nitrogen in surface waters as influenced by climatic conditions and agricultural practices. *Journal of Environmental Quality* 30: 337-344.
- Randall D, Tsui TKN. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45: 17-23.
- Randolph SE. 2009. Perspectives on climate change impacts on infectious diseases. *Ecology* 90: 927-931.
- Rauw WM. 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics* 3: 267.
- Reeder NM, Pessier AP, Vredenburg VT. 2012. A reservoir species for the

- emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* thrives in a landscape decimated by disease. PLoS ONE 7: e33567.
- Reeves MKKA, Medley AE Pinkney, M Holyoak PTJ, Johnson MJ Lannoo. 2013. Localized hotspots drive continental geography of abnormal amphibians on U.S. wildlife refuges. PLoS ONE 8: e77467.
- Repetto R, Baliga SS. 1996. Pesticides and the immune system: the public health risks (p. 100). Washington, DC. World Resources Institute.
- Robinson SA, Chlebak RJ, Young SD, Dalton RL, Gavel MJ, Prosser RS de Solla SR. 2021. Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. Environmental Pollution 284: 117149.
- Rodríguez Sousa AA. 2018. Ciencia y divulgación sobre la sexta extinción masiva de biodiversidad, ¿es realmente el cambio climático el principal responsable? La comunicación de la mitigación y la adaptación al Cambio Climático.
- Rodríguez SF. 1982. Fertilizantes. México, DF. Nutrición Vegetal. AGT editor.
- Rohr JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, Beasley VR. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. Nature 455: 1235-1239.
- Rollins-Smith L A. 2020. Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium fungi* and the immune system. Herpetologica 76: 178-188.
- Romero Placeres M, Diego Olite F, Álvarez Toste M. 2006. La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología 44: 0-0.
- Rosenblum EB, Poorten TJ, Settles M, Murdoch GK. 2012. Only skin deep: shared genetic response to the deadly chytrid fungus in susceptible frog species. Molecular Ecology 21: 3110-3120.
- Rouse JD, Bishop CA, Struger J. 1999. Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival. Environmental health perspectives 107: 799-803.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber- Sanwall E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287: 1770-1774.
- Sánchez AA, Tello LLG. 2019. La contaminación ambiental en los acuíferos de Ecuador. Revista Visión Contable: 64-101.
- Sánchez Zavaleta CA. 2016. Evolución del concepto de cambio climático y su impacto en la salud pública del Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 33: 128-138.
- San Vicente MG, Valencia PJL. 2010. Causas de los procesos territoriales de fragmentación de hábitats. Lurralde Investigación y Espacio 33: 147-158.
- San Vicente MG, Valencia PJL. 2012. Efectos de la fragmentación de hábitats y pérdida de conectividad ecológica dentro de la dinámica territorial. *Polígonos*. Revista de Geografía 16: 35-54.
- Sarabia Meléndez IF, Cisneros Almazán R, Aceves de Alba J, Durán García HM, Castro Larragoitia J. 2011. Calidad del agua de riego en suelos agrícolas y cultivos del Valle de San Luis Potosí, México: Revista Internacional de Contaminación Ambiental 27: 103-113.
- Savage AE, Terrell KA, Gratwicke B, Mattheus NM, Augustine L, Fleischer RC. 2016. Reduced immune function predicts disease susceptibility in frogs infected with a deadly fungal pathogen. Conservation Physiology 4: cow011.
- Searle JP, Rovira J. 2008. Cambio climático y efectos en la biodiversidad: el caso chileno. Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos 502-503.
- Schuyttema GS, Nebeker AV. 1999a. Effects of

- ammonium nitrate, sodium nitrate, and urea on red legged frogs, Pacific treefrogs and African clawed frogs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 357-364.
- Schuytema GS, Nebeker AV. 1999c. Comparative effects of ammonium and nitrate compounds on Pacific treefrog and African clawed frog embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 200-206.
- Schuytema GS, Nebeker AV. 1999b. Comparative toxicity of ammonium and nitrate compounds to Pacific treefrog and African clawed frog tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2251-2257.
- Schweiger O, Settele J, Kudrna O, Klotz S, Kühn I. 2008. Climate change can cause spatial mismatch of tropically interacting species. *Ecology* 89: 3472-3479.
- Smith GR. 2007. Lack of effect of nitrate, nitrite, and phosphate on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Basic and Applied Herpetology* 4: 287-291.
- Seimon TA, Seimon A, Daszak P, Halloy SRP, Schloegel LM, Aguilar CA, Sowell P, Hyatt AD, Konecky B, Simmons JE. 2007. Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology* 13: 288-299.
- Shuman-Goodier ME, Singleton GR, Propper CR. 2017. Competition and pesticide exposure affect development of invasive (*Rhinella marina*) y native (*Fejervarya vitigera*) rice paddy amphibian larvae. *Ecotoxicology* 26: 1293-1304.
- Sievers M, Hale R, Swearer SE, Parris KM. 2018. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161: 482-488.
- Sinawat S, Hsiao WC, Flockhart JH, Kaufman MH, Keith J, West JD. 2003. Fetal abnormalities produced after preimplantation exposure of mouse embryos to ammonium chloride. *Human Reproduction* 18: 2157-2165.
- Singleton JM, Garland T. 2018. Among-individual variation in desert iguanas (Squamata: *Dipsosaurus dorsalis*). Endurance capacity is positively related to home range size. *Physiological and Biochemical Zoology* 91: 725e730.
- Sinsabaugh R, Zak D, Gallo M, Lauber C, Amonette R. 2004. Nitrogen deposition and dissolved organic carbon production in northern temperate forests. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1509-1515.
- Solomon S, IPCC .2007. Climate change the physical science basis. In AGU Fall Meeting Abstracts.
- Sosa-Rodríguez FS. 2012. El futuro de la disponibilidad del agua en México y las medidas de adaptación utilizadas en el contexto internacional. *Revista Internacional de Ciencias Sociales y Humanidades, Sociotam* 12: 165-187.
- Sparling DW. 2003. A review of the role of contaminants in amphibian declines. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GAJ, Cairns JJ, (eds). *Handbook of Ecotoxicology*. CRC, New York, USA 1099-1128.
- Spósito M, Moltedo JCE. 2016. Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representantes de diferentes hábitats y niveles tróficos. *Innotec* 12: 48-53.
- Stark CH, Richards KG. 2008. The continuing challenge of agricultural nitrogen loss to the environment in the context of global change and advancing research. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 2: 1-12.
- Steffen W, Persson Å, Deutsch L, Zalasiewicz J, Williams M, Richardson K, Crumley C, Crutzen P, Folke C, Gordon L, Molina M, Ramanathan V, Rockström J, Scheffer M, Schellnhuber HJ, Svedin, U. (2011). The Anthropocene: from global change to planetary stewardship. *Ambio* 40: 739-761.
- Stevens CJ, Dise NB, Gowing DJG, Mountford JO. 2006. Loss of forb diversity in

- relation to nitrogen deposition in the UK: Regional trends and potential controls. *Global Change Biology* 12: 1823-1833.
- Stevens CJ, Dise NB, Gowing DJ. 2009. Regional trends in soil acidification and exchangeable metal concentrations in relation to acid deposition rates. *Environmental Pollution* 157: 313-319.
- Tarquino IR. 2004. Tendencias mundiales en la gestión de recursos hídricos: desafíos para la ingeniería del agua. *Ingeniería y Competitividad* 6: 63-71.
- Szuroczki D, Koprivnikar J, Baker R L. 2016. Dietary antioxidants enhance immunocompetence in larval amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 201: 182-188.
- Taylor B, Skelly D, Demarchis LK, Slade MD, Galusha D, Rabinowith PM. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives* 113: 1497-1501.
- Tejedo M, Reques R. 2003. Evaluación del efecto del vertido tóxico de las minas de Aznalcóllar sobre la comunidad de anfibios del río Guadiamar. Pp. 156-169. En: *Ciencia y Restauración del Río Guadiamar*. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Tejedo M, Semlitsch RD, Hotz A .2000. Covariation of morphology and jumping performance in newly metamorphosed water frogs: effects of larval growth history. *Copeia* 2000: 448-458.
- Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Kiers ET. 2018. Microbiomas centrales para agroecosistemas sostenibles. *Plantas Naturales* 4: 247-257.
- Tomanova S, Tedesco PA. 2007. Tamaño corporal, tolerancia ecológica y potencial de bioindicación de la calidad del agua de *Anacroneuria* spp. (Plecoptera: Perlidae) en América del Sur. *Revista de Biología Tropical* 55: 67-81.
- Torres D, Capote T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas* 13.
- Trischler H, 2017. El Antropoceno, ¿un concepto geológico o cultural, o ambos? *Desacatos* 54: 40-57.
- Tylianakis JM, Didham RK, Bascompte J, Wardle DA. 2008. Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 1351-1363.
- Ubilla C, Yohannessen K. 2017. Contaminación atmosférica efectos en la salud respiratoria en el niño. *Revista Médica Clínica Las Condes* 28: 111-118.
- Ulloa A. 2017. Dinámicas ambientales y extractivas en el siglo XXI: ¿es la época del Antropoceno o del Capitaloceno en Latinoamérica? *Desacatos*: 58-73.
- Vandenlangenberg SJ. Canfield, and J. Magner. 2003. A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA). *Environmental Monitoring and Assessment* 82: 45-61.
- Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F. 2015. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research* 46: 1-22.
- Van Straalen NM, Verhoef HA. 1997. The development of a bioindicator system for soil acidity based on arthropod pH preferences. *Journal of Applied Ecology* 34: 217-232.
- Veldkamp A, Lambin EF. 2001. Predicting land-use change. *Agricult Ecosyst Environ* 85: 1-6.
- Vidal OJ, Aguayo M, Niculcar R, Bahamonde N, Radic S, San Martín C, Félez J. 2015. Plantas invasoras en el Parque Nacional Torres del Paine (Magallanes, Chile): estado del arte, distribución post-fuego e implicancias en restauración ecológica. In *Anales del Instituto de la Patagonia* (Vol. 43, No. 1, pp. 75-96). Universidad de Magallanes.
- Vilà M, Valladares F, Traveset A, Santamaría

- L, Castro P. 2008. Invasiones biológicas (pp. 215-215). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Vilà M, Bacher S, Hulme P, Kenis M, Kobelt M, Nentwig W, Solarz W. 2006. Impactos ecológicos de las invasiones de plantas y vertebrados terrestres en Europa. *Ecosistemas* 15.
- Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, Terme M. 2014. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Frontiers in oncology* 4: 70.
- Vourlitis GL, Fernández JS. 2012. Changes in the soil, litter, and vegetation nitrogen and carbon concentrations of semiarid shrublands in response to chronic dry season nitrogen input. *Journal of Arid Environments* 82: 115-122.
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9689-9694.
- Waldrop MP, Zak DR. 2006. Response of oxidative enzyme activities to nitrogen deposition affects soil concentrations of dissolved organic carbon. *Ecosystems* 9: 921-933.
- Waters CN, Zalasiewicz J, Summerhayes C, Barnosky AD, Poirier C, Gálfuszka A, Cearreta A, Edgeworth M, Ellis EC, Ellis M, Jeandel C, Leinfelder R, McNeill JR, Richter DD, Steffen W, Syvitski J, Vidas D, Wagreich M, Williams M, Zhisheng A, Grinevald J, Odada E, Oreskes N, Wolfe AP. 2016. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science* 351: aad2622.
- Watkins TB. 1996. Predator-mediated selection on burst swimming performance in tadpoles of the Pacific tree frog, *Pseudacris regilla*. *Physiological Zoology* 69: 154-167.
- Watt PJ y Oldham RS. 1995. The effect of ammonium nitrate on the feeding and development of larvae of the smooth newt, *Triturus vulgaris* (L.), and on the behaviour of its food source, *Daphnia*. *Freshwater Biology* 33: 319-324.
- Wei C, Yu Q, Bai E, Lü X, Li Q, Xia J, Kardol, P. et al. 2013. Nitrogen deposition weakens plant-microbe interactions in grassland ecosystems. *Global Change Biology* 19: 3688-97.
- Weickert P, Sánchez E. 2006. 114. Algunas especies adventicias o naturalizadas en la provincia de Huelva (SO de España). Notas taxonómicas y corológicas para la flora de la Península Ibérica y el Magreb. *Notas* 108-125, 26, 180.
- Wilcox BA, Gubler DJ. 2005. Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environmental Health and Preventive Medicine* 10: 263-272.
- Williams RN, Bos DH, Gopurenko D, DeWoody JA. 2008. Amphibian malformations and inbreeding. *Biology Letters* 4: 549-552.
- WingChing-Jones R, Lorío LU, Barquero, LC. 2016. Uso de *Azospirillum* spp. como biofertilizante en la producción de estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*). *Cuadernos de Investigación UNED* 8: 259-265.
- Wirgin I, Waldman JR. 2004. Resistance to contaminants in North American fish populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 73-100.
- Withers PJ, Neal C, Jarvie HP, Doody DG. 2014. Agriculture and eutrophication: where do we go from here? *Sustainability* 6: 5853-5875.
- Wolters V. 1991. Biological processes in two beech forest soils treated with simulated acid rain—A laboratory experiment with *Isotoma tigrina* (Insecta, Collembola). *Soil Biology and Biochemistry* 23: 381-390.
- Worthington RD. 1974. High incidence of anomalies in a natural population of spotted salamanders, *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica* 30: 216-220.
- Wurtsbaugh WA, Paerl HW, Dodds WK. 2019. Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine

- continuum. Wiley Interdisciplinary Reviews: Water 6: e1373.
- Xu GL, Mo JM, Fu SL, Per G, Zhou GY, Xue JH. 2007. Response of soil fauna to simulated nitrogen deposition: A nursery experiment in subtropical China. *Journal of Environmental Sciences* 19: 603-609.
- Yılmaz E, Özgür E, Bereli N, Türkmen D Denizli, A. 2017. Plastic antibody based surface plasmon resonance nanosensors for selective atrazine detection. *Materials Science and Engineering*: 73: 603-610.
- Zamora-Camacho FJ. 2018. Locomotor performance in a running toad: roles of morphology, sex, and agrosystem versus natural habitat. *Biological Journal of the Linnean Society* 123: 411–421.
- Zamora-Camacho FJ, Aragón P. 2019a. Failed predator attacks have detrimental effects on antipredatory capabilities through developmental plasticity in *Pelobates cultripes* toads. *Functional Ecology* 33: 846–854.
- Zamora-Camacho FJ, Aragón P. 2019b. Hindlimb abnormality reduces locomotor performance in *Pelobates cultripes* metamorphs but is not predicted by larva morphometrics. *Herpetozoa* 32: 125–131.
- Zamora-Camacho FJ, Medina-Gálvez L. 2019. Anomalías en las extremidades de varios ejemplares de *Triturus pygmaeus* de una misma charca. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 30: 43–44.

2. Métodos generales

2.1. La especie de estudio: *Rana verde común, Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885) (adaptado de García-París et al., 2004 y Egea-Serrano, 2014).

2.1.1. Descripción morfológica

La especie objeto de este estudio es la rana común, *Pelophylax perezi* (Figura 2.1). Esta rana se caracteriza por tener una cabeza alargada, ser de tamaño mediano y tener un hocico redondeado. Los ojos se encuentran próximos entre sí y son de pupila horizontal (Seoane, 1885; Salvador, 1974, 1985). Posee un tímpano muy prominente (García-París, 1985; Barbadillo, 1987) y de color bronceado (García-París, 1985; Bertolero et al., 2017). Presenta un pliegue glandular dorsoventral en ambos flancos (García-París, 1985; Barbadillo, 1987; Barbadillo et al. 1999). Los cinco dedos de las extremidades posteriores están unidos por membranas interdigitales extensas. La piel es lisa, generalmente verde con manchas oscuras, aunque la coloración dorsal es enormemente variable (Crochet et al., 1995; Salvador y García París, 2001; Malkmus, 2004; García-París et al., 2004). Muchos ejemplares presentan una línea vertebral de color verde claro. Las extremidades poseen un barreado oscuro, mientras que la coloración ventral es blancuzca, a veces jaspeada de negro (Rivera-Correa y Daza, 2016; Barbadillo, 1987; Barbadillo et al. 1999). El dimorfismo sexual es muy pronunciado. Las hembras son más grandes que los machos, si bien los machos presentan extremidades delanteras más fuertes y sacos vocales en ambas comisuras de la boca, las cuales tienen apariencia de manchas grisáceas cuando no están siendo utilizados (Docampo y Milagrosa-Vega, 1988; Real y Antúnez, 1991; Salvador y García-París, 2001). Los machos poseen callosidades negras en la cara interna del primer dedo y en la base durante el período de celo (García-París et al., 2004; Díaz-Paniagua et al., 2005).



Figura 2.1. – Ejemplar adulto de *Pelophylax perezi*.

Las larvas (Figura 2.2) tienen una morfología típica de especies propias de charcas (Duellman y Trueb, 1994). Suelen alcanzar tallas de 6 cm, aunque se pueden encontrar individuos de tamaños mayores (Llorente et al., 1995). De hecho, estas larvas pueden crecer más si las condiciones en las que se encuentran son favorables (Díaz-Paniagua, 1988). El espiráculo se abre en el costado izquierdo, mientras que en el ano se dispone en el lado derecho, antes de la cola. Posee una cola cuya longitud duplica la del cuerpo (Salvador, 1985; García-París, 1985, 1989). La cresta caudal nace en posición atrasada, y está menos desarrollada ventral que dorsalmente, terminando en ángulo agudo (Díaz-Paniagua, 1985; Llorente et al., 1995). El disco oral aparece totalmente rodeado por papilas, con la excepción de la región superior, y los ojos se encuentran próximos entre sí y en posición dorsal (Barbadillo et al., 1999; Salvador y García-París, 2001; Malkmus, 2004; García-París et al., 2004). Son de color verdosas dorsalmente, aunque la coloración y el diseño pueden variar mucho de unos individuos a otros (Díaz-Paniagua, 1985; García-París, 1989; Llorente et al., 1995). Algunos pueden tener manchas más oscuras (Díaz-Paniagua, 1985; Llorente et al., 1995). La coloración de la parte ventral posee reflejos metálicos o nacarados sobre una base blanquecina (Llorente et al., 1995).



Figura 2.2. – Larva de *Pelophylax perezii*.

al., 2020). Puede hallarse en una amplia gama de medios dulciacuícolas (Malkmus, 1982; Meijide et al., 1994; Lizana et al., 1995; Malkmus, 1997), tanto lóticos como lénticos, aunque prefiere corrientes suaves (Gracia y Pleguezuelos, 1990; Pollo et al., 1998; Egea-Serrano et al., 2005c,d,e), y tanto temporales como permanentes, aunque con una marcada preferencia por estos últimos (Díaz-Paniagua, 1983; Richter-Boix et al., 2006, 2007a; c). También evita las aguas frías, los arroyos de alta montaña donde la pendiente es elevada, y los cursos de agua rodeados de excesiva vegetación (Malkmus, 1979, 1982, 1997). Aunque puede aparecer más de 2000 m de altitud (Fernández-Cardenete et al., 2000), prefiere masas de agua de altitud baja o media (Malkmus, 1979; Morales et al., 2002). De hecho, únicamente la altitud y la falta de cuerpos de agua imponen límites a la distribución de la especie (Llorente y Arano, 1997; Llorente et al., 2002).

Por lo demás, los requerimientos ecológicos de esta rana son escasos (Llorente et al., 2002), por lo que puede colonizar medios alterados (Sánchez y Rubio, 1996; Galán, 1997a), o de reciente creación (Malkmus, 1982), así como áreas urbanas de diversa índole (García-París y Martín, 1987a). Tolera diversos grados de salinidad en el agua, incluso medios salobres (Margalef, 1951; 1952), así como aguas notablemente eutrofizadas (Lacomba y Sancho, 1999; Llorente et al., 2002; Merchán et al., 2002). Debido a lo tardío del período reproductor de este anuro, las larvas habitan aguas con características propias del verano mediterráneo en buena parte de su extensión geográfica, lo que les permite tolerar menores concentraciones de oxígeno que otras especies (Díaz-Paniagua, 1983; Díaz-Paniagua, 1988).

2.1.4. Demografía

Esta especie alcanza la madurez reproductora en un tiempo relativamente corto, lo que facilita los estudios longitudinales que comprenden desde la fase larvaria hasta la adultez. En el norte de la península ibérica, la madurez sexual se alcanza con dos años de edad, en el caso de los machos, y con uno, en el caso de las hembras (Docampo y Milagrosa-Vega, 1991). En el suroeste de su distribución, no obstante, los machos y las hembras maduran en su segundo año, si bien algunos machos lo pueden hacer en el primer año y algunas hembras en el tercero. Los machos viven hasta 4 años y las hembras hasta 6 (Esteban et al., 1996).

2.1.5. Reproducción

Esta rana se reproduce de manera marcadamente más tardía que la mayoría de los anfibios ibéricos (Salvador y Carrascal, 1990; Díaz-Paniagua, 1992), ya que la máxima actividad reproductora ocurre a finales de primavera y principios de verano (Díaz-Paniagua et al., 2005; Richter-Boix et al., 2007b; d). Además, la reproducción de *P. perezi* se relaciona positivamente

con la temperatura ambiental (Richter-Boix et al., 2006). Para la reproducción, seleccionan cuerpos de agua permanentes, que poseen agua a finales de primavera y verano (Díaz-Paniagua, 1983; Díaz-Paniagua, 1990). No obstante, de manera ocasional, también ha sido descrita su reproducción en medios temporales (Díaz-Paniagua, 1983; Díaz-Paniagua, 1990).

A lo largo de la estación reproductora, las hembras desovan entre 1959-7160 huevos (González de la Vega, 1988) o aproximadamente una media de 2309 huevos (Hotz et al., 1994). La mayoría de hembras se reproducen reiteradas veces durante este período. La fase larvaria normalmente dura dos meses, aunque en general su periodo larvario es variable (Díaz-Paniagua, 1986).

2.1.6. Ecología trófica

Las fases postmetamórficas se alimentan de presas tanto terrestres como acuáticas (Lizana et al., 1986; Docampo y Milagrosa-Vega, 1990; Hódar et al., 1990). Empero, las terrestres son mayoritarias, mientras que la captura de presas acuáticas podría ser ocasional (Hódar et al., 1990). Por orden de abundancia, las presas más comunes que se encuentran en los estómagos se corresponden con los órdenes Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (Lizana et al., 1986; Jover, 1989; Docampo, y Milagrosa-Vega, 1990; Hódar et al., 1990; Anastacio y Ferrand d'Almeida, 1995; Díaz-Paniagua et al., 2005). En lo tocante al tamaño de sus presas, suele estar comprendido entre 3 y 6 mm (Hódar et al., 1990).

Las larvas se alimentan principalmente de algas, fanerógamas y detritos, y muy escasamente de carroña (Doménech, 1999) e incluso animales (Rotífera, Arthropoda, Nematoda) (Díaz-Paniagua, 1985). Los renacuajos se encuentran en momentos, finales de primavera y verano, en la que los recursos son muy bajos, es por esto que su dieta posee niveles muy bajos de diversidad (Díaz-Paniagua, 1985). Por esta razón, las larvas se han clasificado como las más nadadoras de todas las especies existentes en el sur de la península (Díaz-Paniagua, 1987).

2.1.7. Amenazas

Uno de los principales factores a los que se enfrenta como amenaza esta especie, es la destrucción de su hábitat (Llorente y Arano, 1997), debida a actividades humanas como el monocultivo de eucaliptos (Malkmus, 2004), o la construcción (Galán, 1999). Otro factor importante que amenaza a esta especie es la alteración del hábitat. Aun así, la gran plasticidad ecológica de esta especie la hace capaz de explotar y colonizar zonas alteradas (Galán, 1997 a), y masas de agua artificiales (Malkmus, 1987; Egea-Serrano et al., 2005 c,d,e; Ballester, 2003). La

contaminación de los medios acuáticos desencadena numerosas amenazas. En individuos que habitan cultivos de arroz se han detectado contaminantes organoclorados (Pastor et al., 2004). Además, se han encontrado metales pesados en individuos de las marismas del Guadalquivir (Rico et al., 1987). Esta especie, al menos en sus estadios larvarios, acumula concentraciones de metales superiores a las concentraciones que otras muchas especies de anfibios pueden acumular (Tejedo et al., 2000; Tejedo y Reques, 2003). Estos contaminantes dañan órganos como el hígado, el corazón, la vesícula biliar, las branquias y la notocorda, además de provocar malformaciones morfológicas (Honrubia et al., 1993; Álvarez et al., 1995). Aun así, se hallan frecuentemente en hábitats acuáticos con altos niveles de contaminación por fertilizantes nitrogenados (Egea-Serrano et al., 2008).

Por último, la introducción de especies exóticas, como peces (*Gambusia hobrooki*, *Carasius auratus*) o crustáceos (*Procambarus clarkii*), en cuerpos de agua donde la especie estaba presente ha llevado a la regresión de diversas poblaciones en la península ibérica (Galán, 1997b; Rodríguez et al., 2005).

2.1.8. Depredadores

Las distintas fases vitales de esta especie pueden ser presa de anfibios como el sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*), reptiles como la culebra viperina (*Natrix maura*) (Pleguezuelos y Moreno, 1989; Santos y Llorente, 1998; Santos et al., 2000), aves como la lechuza (*Tyto alba*), o la garcilla bueyera (*Bubulcus ibis*) (Mateos y Lázaro, 1986; Rey et al., 1994), y mamíferos como la nutria (*Lutra lutra*), el visón americano (*Neovison vison*), o el meloncillo (*Herpestes ichneumon*). Asimismo, el cangrejo de río americano (*P. clarkii*) puede herir severamente a estas ranas (Bermejo, 2006). Sus larvas son depredadas por anfibios como el gallipato (*Pleurodeles waltl*) (Santos et al., 1986), reptiles como la culebra viperina (*Natrix maura*), el galápago leproso (*Mauremys leprosa*) o el galápago europeo (*Emys orbicularis*) y crustáceos (Cruz y Rebelo, 2005), entre otros.

Frente a una amenaza inminente, los adultos saltan al agua para escapar de los depredadores (Martín et al., 2005). Algunos individuos, cuando se encuentran acorralados, pueden llevar a cabo una reacción refleja que consiste en arquear la columna vertebral (Martínez-Solano y García-París, 2004; Díaz-Paniagua et al., 2005), o bien incrementan su anchura trabando con sus dedos las patas posteriores, lo que las hace menos manejables (Martínez-Solano y García-París, 2004). Son capaces de vocalizar cuando son capturadas (Díaz-Paniagua et al., 2005).

2.1.9. Parásitos

Se ha descrito parasitismo, en la península ibérica, por parte de una especie de cestodo (Vojtkova y Roca, 1996), 29 especies de trematodos (Roca et al., 1984; Lluch et al., 1985; Lluch et al., 1986a,b, c, d; Navarro y Lluch, 1991; Vojtkova y Roca, 1994), 10 especies de nematodos (Navarro et al., 1988; Navarro et al., 1989; Vojtkova y Roca, 1996), y 17 especies de protozoos (Hassl y Hassl, 1988; Vojtkova y Roca, 1993). Estudios más recientes amplían el número de parásitos (Jiménez et al., 2001).

2.2. ¿Por qué *P. perezii*?

Como se ha visto, *P. perezii* es una especie generalista en la mayor parte de sus requerimientos ecológicos, ampliamente distribuida por la península ibérica, y con una considerable tolerancia a la contaminación que le permite estar presente en hábitats tanto prístinos como alterados. Estas características la convierten en la especie ideal para los objetivos de esta tesis.

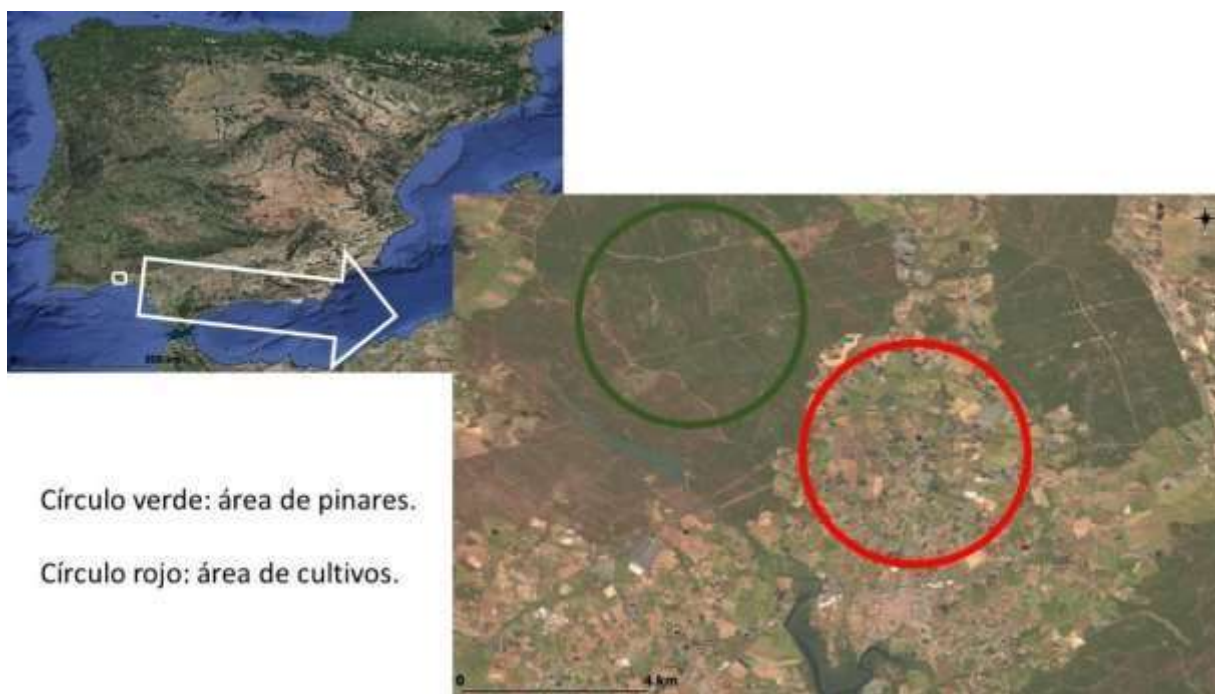


Figura 2.4.— Mapa ortogonal de la zona de estudio dentro de la península ibérica, y de las áreas de muestreo dentro de la zona de estudio.

2.3. Zona de estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo en los Pinares de Cartaya y los agrosistemas circundantes (SW España, 37°20' N, 7°09' W; Figura X). Los Pinares de Cartaya (Figura 2.5.a) son unos bosques de pino piñonero (*Pinus pinea*) de unas 11000 hectáreas de extensión, con un sotobosque dominado por jara pringosa (*Cistus ladanifer*), lentisco (*Pistacia lentiscus*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). Si bien el origen autóctono o antrópico de esta formación en la zona es controvertido, se sabe que es la comunidad vegetal dominante durante al menos los últimos 4000 años, por lo que se considera un paisaje natural (Martínez y Montero, 2004). Los agrosistemas (Figura 2.5.b), a unos 6 km de distancia, consisten en un área tradicional de cultivo extensivo de hortalizas que ha pasado a lo largo de las últimas décadas a plantaciones intensivas de fresa, frambuesa y naranja, entre otros cultivos.



Figura 2.5.a.



Figura 2.5.b.

Figura 2.5.– Hábitat de *Pelophylax perezi* en el área de pinares (Figura 2.5.a) y de cultivos (Figura 2.5.b).

2.4. Manipulación y mantenimiento

Para la obtención de larvas, se capturaron manualmente 10 adultos de cada sexo de cada hábitat. Las ranas se agruparon por separado de acuerdo con su hábitat de procedencia en dos recintos seminaturales al aire libre adyacentes. Cada recinto tenía 6x6 m de largo y 2 m de alto: una pared de ladrillos de 1 m de altura desde el suelo, más una malla de acero de 1 m de altura

y 5 mm de luz. El techo se cubrió con el mismo tipo de malla. Por lo tanto, las ranas no podían escapar de los recintos, ni los depredadores podían entrar en ellos. Además, cada recinto tenía un estanque de 11 m² de superficie y 50 cm de profundidad, donde las ranas podían reproducirse. Diariamente, se verificó la presencia de masas de huevos en los estanques, que fueron transferidos al laboratorio dentro de las 12 h posteriores a la puesta. Después de la oviposición, las ranas adultas se liberaron en sus lugares de procedencia lo antes posible.

En el laboratorio, se recolectaron inmediatamente grupos aleatorios de 15 huevos de cada una de estas masas de huevos. Cada grupo se alojó en una réplica, un acuario de plástico (19x38x27 cm) que contenía 6 litros de agua de manantial sin tratar. En la mitad de los acuarios, aleatoriamente seleccionados, se agregaron 178.87 mg de NH₄Cl puro al 99.7%, de modo que la concentración de amonio fue de 10 mg NH₄⁺/L. Una concentración de 13.5 mg NH₄⁺/L desencadena una tasa de mortalidad de alrededor del 70% según un experimento a medio plazo con larvas de *P. perezi* de hábitats naturales (Egea-Serrano, 2009). Por ende, se eligió una concentración ligeramente más baja para desencadenar efectos subletales, evitando tasas de mortalidad excesivas. Esta concentración se encuentra dentro de rangos ambientalmente relevantes (Egea-Serrano and Tejedo, 2014; Garriga et al., 2017). Los acuarios remanentes conformaron el grupo control, que contenía agua de manantial sin tratar. Se guardaron estas réplicas en estantes de laboratorio. El agua se reemplazó completamente dos veces por semana, pero los tratamientos con o sin amonio se mantuvieron en las condiciones descritas. Cada vez, se cambió aleatoriamente la posición de todas las réplicas dentro de los estantes. Una ventana dejaba entrar la luz natural, lo que permitió a los animales ajustar los ritmos circadianos. Todos los renacuajos fueron alimentados *ad libitum* con espinacas hervidas.

2.5. Bibliografía

- Álvarez R, Honrubia MP, Herráez MP. 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.
- Anastasio PM, Ferrand d'Almeida F. 1995. Food habits of *Rana perezi*. Ciência Biológica Ecology and Systematics, 15: 21-31.
- Ballester R. 2003. Los humedales de la Región de Murcia. Humedales y ramblas de la Región de Murcia. Murcia: Dirección General del Medio Natural. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia.
- Barbadillo LJ. 1987. La guía de Incafo de los anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias. Madrid: Incafo.
- Barbadillo LJ, Lacomba JI, Pérez-Mellado V, Sancho V, López-Jurado LF. 1999. Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. Barcelona. GeoPlaneta.
- Barceló i Combis F. 1876. Nuevos apuntes para la fauna balear: Catálogo de los reptiles y de los moluscos terrestres y de agua dulce observados en las islas Baleares. Palma de Mallorca: Pedro José Gelabert.
- Bermejo A. 2006. Nuevos datos de agresiones de *Procambarus clarkii* sobre *Pleurodeles waltl*. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 17: 82-85.
- Bertolero A, Busak, SD. 2017. Mauremys leprosa (Schoepff in Schweigger 1812) – Mediterranean Pond Turtle, Spanish Terrapin, Mediterranean Stripe-necked Terrapin. In: Rhodin AGJ, Iverson JB, van Dijk PP, Buhlmann KA, Pritchard PCH, Mittermeier RA. (Eds.). Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs 5: 102.1-102.19.
- Boscá E, 1883. Exploración herpetológica de la isla de Ibiza. Anales de la Sociedad Española de Historia Natural 12: 241-250.
- Capellà-Marzo B, Sánchez-Montes G, Martínez-Solano I. 2020. Contrasting demographic trends and asymmetric migration rates in a spatially structured amphibian population. Integrative Zoology 15: 482-497
- Corti C, Masseti M, Delfino M, Pérez-Mellado V. 1999. Man and herpetofauna of the Mediterranean islands. Revista Española de Herpetología. 13: 83- 100.
- Crochet PA, Dubois A, Ohler A, Tunner H. 1995. *Rana (Pelophylax) ridibunda* Pallas, 1771, *Rana (Pelophylax) perezi* Seoane, 1885 and their associated klepton (Amphibia, Anura): morphological diagnoses and description of a new taxon. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle 17: 11-30.
- Cruz MJ, Rebelo R. 2005. Vulnerability of Southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. Amphibia-Reptilia 26: 293-303.
- Díaz-Paniagua C. 1983. Influencia de las características del medio acuático sobre las poblaciones de larvas de anfibios en la Reserva Biológica de Doñana (Huelva,

- España). Doñana, Acta Vertebrata 10: 41-53.
- Díaz-Paniagua C. 1985. Larval diets related to morphological characters of five anuran species in the Biological Reserva of Doñana (Huelva, Spain). Amphibia-Reptilia 6: 307-332.
- Díaz-Paniagua C. 1986. Reproductive period of amphibians in the Biological Reserve of Doñana (SW Spain). Pp. 429-432. En: Rocek Z. (Ed.). Studies in Herpetology (Proceedings of the Third Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica). Prague: Charles University.
- Díaz-Paniagua C, Rivas R. 1987. Datos sobre actividad de anfibios y pequeños reptiles de Doñana (Huelva, España). Mediterránea 9: 15-27.
- Díaz-Paniagua C. 1988. Temporal segregation in larval amphibian communities in temporary ponds at a locality in SW Spain. Amphibia-Reptilia 9: 15-26.
- Díaz-Paniagua C. 1990. Temporary ponds as breeding site of amphibians at a locality in Southwestern Spain. Herpetological Journal 1: 447-453.
- Díaz-Paniagua C. 1992. Variability in timing of larval season in an amphibian community in SW Spain. Ecography 15: 267-272.
- Díaz-Paniagua C, Rodríguez C, Portheault A de Vries W. 2005. Los anfibios de Doñana. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
- Docampo L, Milagrosa-Vega M. 1988. Aplicación de un método estadístico al dimorfismo sexual del crecimiento relativo de *Rana perezi* (Seoane, 1885). Cuadernos de Investigación Biológica 13: 53-65.
- Docampo L, Milagrosa-Vega M. 1991. Determinación de la edad en *Rana perezi* (Seoane, 1885). Aplicación al análisis somático de poblaciones. Doñana, Acta Vertebrata 18: 21-38.
- Docampo L, Vega MM. 1990. Contribución al estudio de la alimentación de *Barbus bocagei* (Steindachner, 1866), *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) y *Rana perezi* (Seoane, 1885) en río de Bizkaia. Scientia Gerundensis 16: 61-73.
- Duellman WE, Trueb L. 1994. Biology of Amphibians. Baltimore: The Johns Hopkins Univeristy Press.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005a. Selección de hábitat reproductor por *Rana perezi* (Seoane, 1885) en el NO de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). Revista Española de Herpetología 19: 113-125.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005b. Fenología reproductiva de la comunidad de anfibios del Noroeste de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). Zoologica Baetica 16: 59-72.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Miñano P, Verdiell D, de Maya JA, Andreu A, Tejedo M, Torralva M. 2005c. Actualización de la distribución de los anfibios de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). Anales de Biología 27: 53-62.
- Egea-Serrano A, Verdiell D, de Maya JA, Miñano

- P, Andreu A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005d. Actualización del atlas de distribución de los anfibios en la Región de Murcia (SE Península Ibérica). Boletín de la Asociación Herpetológica Española 16: 11-14.
- Egea-Serrano A, Oliva-Paterna FJ, Torralva M. 2005e. Caracterización de la distribución altitudinal de la comunidad de anfibios de la Región de Murcia (SE Península Ibérica). Boletín de la Asociación Herpetológica Española 16: 15-18.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2008. Analysis of the avoidance of nitrogen fertilizers in the water column by juvenile Iberian water frog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), in laboratory conditions. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 80: 178-183.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2009. Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi*. Chemosphere 76: 869-877.
- Egea-Serrano A. 2014. Rana común – *Pelophylax perezi*. In: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles (Salvador A, Martínez-Solano I, eds). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Esteban M, García-París M, Castanet J. 1996. Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perezi*) from a warm temperate climate area. Canadian Journal of Zoology 74: 1914-1921.
- Fernández-Cardenete JR, Luzón-Ortega JM, Pérez-Contreras J, Pleguezuelos JM, Tierno de Figueroa JM. 2000. Nuevos límites altitudinales para seis especies de herpetos de la Península Ibérica. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 11: 20-21.
- Fernández Loras A. 2021. Quitridiomycosis en anfibios: inmunidad, tratamiento y mitigación en el medio natural. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Galán P. 1997a. Colonization of spoil benches of an opencast lignite mine in northwest Spain by amphibians and reptiles. Biological Conservation 79: 187-195.
- Galán P. 1997b. Declive de poblaciones de anfibios en dos embalses de La Coruña (noroeste de España) por introducción de especies exóticas. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 8: 38-40.
- Galán P. 1999. Conservación de la herpetofauna gallega. Situación actual de los anfibios y reptiles de Galicia. Univesidade de Coruña. La Coruña. Servicio de Publicacións.
- García-París M. 1985. Los anfibios de España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- García-París M. 1997. *Rana perezi* Seoane, 1885. Pp. 152-153. En: Gasc JP et al. (Eds.). Atlas of amphibians and reptiles in Europe. Paris. Muséum National d'Histoire Naturelle.
- García-París M, Montori A, Herrero P. 2004. *Amphibia. Lissamphibia*. En: Ramos Sánchez MA, et al. (Eds.). Fauna Ibérica. Vol. 24. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.

- García-París M, Martín C. 1987. Herpetofauna del área urbana de Madrid. *Revista Española de Herpetología* 2: 131-144.
- García-París, M. 1989. Guía para la identificación de los renacuajos españoles. *Quercus* 38: 16- 23.
- Garriga N, Montori A, Llorente GA. 2017. Impact of ammonium nitrate and sodium nitrate on tadpoles of *Alytes obstetricans*. *Ecotoxicology* 26: 667–674.
- Garzón JE, Cárdenas EA. 2013. Emisiones antropogénicas de amoníaco, nitratos y óxido nítrico: compuestos nitrogenados que afectan el medio ambiente en el sector agropecuario colombiano. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 60: 121-138.
- González de la Vega JP. 1988. Anfibios y reptiles de la provincia de Huelva. Huelva. Ertisa.
- Gracia P, Pleguezuelos JM. 1990. Distribución de los anfibios en la provincia de Granada (SE Península Ibérica). *Anales de Biología* 16: 71-84.
- Hassl A, Hassl D. 1988. Ein Coccidium im Blut von *Rana perezi* Seoane, 1885 (Sporozoa: Coccidia/Anura: Ranidae). *Salamandra* 24: 75-76.
- Hódar JA, Ruiz I, Camacho I. 1990. La alimentación de la rana común (*Rana perezi* Seoane, 1885) en el sureste de la Península Ibérica. *Miscelánea Zoológica* 14: 145-153.
- Honrubia MP, Herráez MP, Álvarez R. 1993. The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart and notochord of *Rana perezi* tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 184-191.
- Hotz H, Uzzell T, Berger L. 1994. Hemiclonal hybrid water frogs associated with the sexual host species *Rana perezi*. *Zoologica Poloniae* 39: 243-266.
- Jiménez MS, Zapatero LM, Castaño C. 2001. Parasites of *Rana perezi* Seoane, 1885 in Avila province (Spain). *Research and Reviews in parasitology* 61: 73-78.
- Jover L. 1989. Nuevas aportaciones a la tipificación trófica poblacional: el caso de *Rana perezi* en el Delta del Ebro. Universidad de Barcelona. Tesis doctoral.
- Kiesecker JM, Blaustein AR. 1997. Population differences in responses of redlegged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. *Ecology* 78: 1752-1760.
- Lacomba J I, Sancho V. 1999. Atlas de los anfibios y reptiles de la Comunidad Valenciana. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 10: 2-10.
- Lizana Avia M, Ciudad Pizarro M J, Pérez-Mellado V. 1986. Uso de los recursos tróficos en una comunidad ibérica de anfibios. *Revista Española de Herpetología* 1: 207-271.
- Lizana M, Ciudad MJ, Pérez-Mellado V. 1989. Actividad, reproducción y uso del espacio en una comunidad de anfibios. *Treballs de la Societat Catalana D'Ictiologia i Herpetología* 2: 92-127.
- Lizana M, Arco C, del Morales JJ, Bosch J, Cejudo D, López FJ., Gutiérrez J, Martín R. 1995. Atlas provisional de la herpetofauna en el Sistema

- Central segoviano. *Revista Española de Herpetología* 9: 113-132.
- Llorente GA, Arano B, García-Serra N, Civantos E. 1995. Extreme variability in the oral morphs of *Rana perezi* larvae: their dubious application in the diagnosis of the P-RP system. *Revista Española de Herpetología* 9: 85-91.
- Llorente GA, Arano B. 1997. *Rana perezi* Seoane, 1885. Pp. 164-166. En: Pleguezuelos, J.M. (Ed.). *Distribución y Biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Monografías de Herpetología, nº 3. Granada. Editorial Universidad de Granada y Asociación Herpetológica Española.
- Llorente GA, Montori A, Carretero MA, Santos X. 2002. *Rana perezi*. Pp. 126-128. En: Pleguezuelos JM, Márquez R, Lizana M. (Eds.). *Atlas y Libro Rojo de los anfibios y reptiles de España*. Madrid. Dirección General de la Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española.
- Lluch J, Navarro P, Roca V. 1985. Presencia en España de *Ratzia parva* (Stossich, 1904) Poche, 1926 (Digenea, Opisthorchiidae) parásito de anfibios y reptiles. *Miscellanea Zoologica* 9: 25-29.
- Lluch J, Roca V, Navarro P. 1986a. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de los herpetos ibéricos. III. Digenea, Paramphistomidae, Hemiuridae, Gorgoderidae, Plagiorchiidae, Haematoloechidae y Cephalogonimidae de *Rana perezi* Seoane, 1885 (Amphibia: Ranidae). *Revista Ibérica de Parasitología* 46: 387-392.
- Lluch J, Roca V, Navarro P. 1986b. Helmintofauna de anfibios del Levante Ibérico. Trematodos de *Rana perezi* Seoane, 1885. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 81: 43-49.
- Malkmus R. 1979. Beitrag zur vertikalen Verbreitung der herpetofauna Portugals. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* 19: 125-145.
- Malkmus R. 1982. Beitrag zur Verbreitung der Amphibien und Reptilien in Portugal. *Salamandra* 18: 218-299.
- Malkmus R. 1987. Herpetofaunistische untersuchungen bei Lissabon. *Arquivos do Museo Bocage* 2: 263-288.
- Malkmus R. 1997. Verbreitung und Biotopwahl des Iberischen Wasserfrosches *Rana perezi* Seoane 1885 auf Madeira, den Azoren und den Kanaren. *Nachrichten des Naturwissenschaftlichen Museums der Stadt Aschaffenburg*. Aschaffenburg 104: 65-69.
- Malkmus R. 2004. Über den Einfluss von Eukalyptusaufforstungen auf Amphibien-Population en in Portugal. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 11: 1-12.
- Margalef R. 1951. Materiales para la hidrobiología de la isla de Ibiza. *Publicaciones del Instituto de Biología Aplicada* 8: 5-70.
- Margalef R. 1952. Materiales para la hidrobiología de la isla de Menorca. *Publicaciones del Instituto de Biología Aplicada* 11: 5-112.
- Martín J, Luque-Larena JJ, López P. 2006. Collective detection in escape responses of temporary groups of Iberian green frogs.

- Behavioral Ecology 17: 222-226.
- Martín J, Luque-Larena JJ, López P. 2005. Factors affecting scape behavior of Iberian green frogs (*Rana perezi*). Canadian Journal of Zoology 83: 1189-1194.
- Martínez F, Montero G. 2004. The Pinus pinea L. woodlands along the coast of South-western Spain: data for a new geobotanical interpretation. Plant Ecology 175: 1-18.
- Martínez-Solano I, García-París M. 2004. Comportamientos defensivos de ranas y sapos: se enfrentan a depredadores acuáticos y terrestres. Quercus 225: 32-35.
- Mateos A, Lázaro E. 1986. Contribución al estudio de la alimentación de la garcilla bueyera (*Bubulcus ibis ibis* L.) en Extremadura. Alytes (Mérida) 4: 49-68.
- Meijide M, Meijide F, Arribas O. 1994. Atlas herpetológico de la provincia de Soria. Revista Española de Herpetología 8: 45-58.
- Merchán T, Fernández-Beneítez J, Nascimento-Montana F, Lizana M. 2002. Nuevos datos sobre la distribución de anfibios en zonas bajas del suroeste de Castilla y León (Zamora y Salamanca). Boletín de la Asociación Herpetológica Española 13: 7-11.
- Morales JJ, Lizana M, Del Arco C. 2002. Análisis de la distribución altitudinal de la herpetofauna en tierras de Segovia. Revista Española de Herpetología 16: 29-42.
- Navarro P, Izquierdo S, Pérez-Soler P, Hornero MJ, Lluch, J. 1988. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de los herpetos ibéricos. 8. Nematoda Ascaridida Skrjabin et Schultz, 1940 de *Rana* spp. Revista Ibérica de Parasitología 48: 167-173.
- Navarro P, Lluch J. 1991. Sobre las asociaciones helmínticas establecidas entre los trematodos Lecithodendriidae levantinos. Rivista di Parassitologia 8: 259-267.
- Navarro P, Lluch J, Izquierdo S. 1989. *Strongyloides mascomai* sp. n. (Strongyloididae) un nouveau nematodeparasite de *Rana perezi* Seoane, 1885 (Amphibia: Ranidae) de l'est de l'Espagne. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee, 64: 315-318.
- Pastor D, Sanpera C, Gonzalez-Solís J, Ruiz X, Albaiges J. 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). Chemosphere 55: 567-576.
- Peduzzi P. 2019. The disaster risk, global change, and sustainability nexus. 11: 957.
- Pollo JC, Velasco-Marcos JC, González-Sánchez N. 1998. La fauna herpetológica del espacio natural de los Arribes del Duero. Boletín de la Asociación Herpetológica 9: 4-10.
- Real R, Antúnez A. 1991. Análisis e interpretación de las dimorfometrías en una población de *Rana perezi*. Anales de Biología, 17: 63-69.
- Real R, Guerrero JC, Antúnez A, Olivero J, Vargas JM. 2001a. Respuestas corológicas de las especies de anfibios frente a los gradientes ambientales en el Sur de España. I. Patrones individualistas. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural 96: 243-249.

- Real R, Guerrero JC, Antúnez A, Olivero J, Vargas JM. 2001b. Respuestas corológicas de las especies de anfibios frente a los gradientes ambientales en el Sur de España. II. Patrones comunes. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural 96: 251-261.
- Rey JM, Esteban M, Sanchíz B. 1994. Registros corológicos de anfibios españoles fundamentados en egagrópilas de lechuza común. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 5: 4-8.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori, A. 2006. Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. Amphibia-Reptilia 27: 544-549.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A. 2007a. A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. Hydrobiologia 583: 435-446.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A. 2007b. Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area. Amphibia-Reptilia 28: 247-261.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A. 2007c. Structure and dynamics of an amphibian metacommunity in two regions. Journal of Animal Ecology 76: 607-618.
- Richter-Boix, A, Llorente GA, Montori A. 2007d. Segregación espacial y temporal de una comunidad de anfibios en una región mediterránea. Pp. 120-128. En: Gosá A, Egaña-Callejo A, Rubio X. (Eds.). Herpetologia iberiarraren egoera = Estado actual da Herpetologia Ibérica = Estado actual de la Herpetología Ibérica: Lehen Herpetologia Kongressua Euskal Herrian, IX Congresso Luso-Espanhol, XIII Congreso Español de Herpetología. Munibe.
- Rico MC, Hernández LM, González MJ, Fernández MA, Montero MC. 1987. Organochlorine and metal pollution in aquatic organisms sampled in the Doñana National Park during the period 1983-1986. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 39: 1076-1083.
- Rivera-Correa M, Daza JM. 2016. Molecular phylogenetics of the *Pristimantis lacrimosus* species group (Anura: Craugastoridae) with the description of a new species from Colombia. Acta Herpetologica 11: 31-45.
- Roca V, Lluch J, Navarro P. 1984. Sur la presence en Espagne de *Sonsinotrema tacapense* (Sonsino, 1894) Balozet et Callot, 1938 (Trematoda: Lecithodendriidae) parasite d'amphibiens et de reptiles. Vie et Milieu, 33: 177-179.
- Rodríguez CF, Bécares E, Fernández-Aláez M, Fernández-Aláez C. 2005. Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. Biological Invasions 7: 75-85.
- Salvador A. 1974. Guía de los anfibios y reptiles españoles. Madrid: Icona.
- Salvador A. 1985. Guía de campo de los anfibios y reptiles de la Península Iberica, Islas Baleares y Canarias. S. García, León.
- Salvador A, Carrascal LM. 1990. Reproductive phenology and temporal patterns of mate

- access in Mediterranean anurans. *Journal of Herpetology*, 24: 438-441.
- Salvador A, García-París M. 2001. Anfibios Españoles. Identificación, historia natural y distribución. Talavera de la Reina: Canseco Editores.
- Sánchez J, Rubio JL. 1996. Atlas preliminar de los anfibios y reptiles de las Sierras Prebéticas albacetenses. *Al-Basit* 38: 5-30.
- Sánchez-Montes G, Martínez-Solano I. 2011. Population size, habitat use and movement patterns during the breeding season in a population of Perez's frog (*Pelophylax perezii*) in central Spain. *Basic and Applied Herpetology*, 25: 81-96
- Santos FJ, Salvador A, García C. 1986. Dieta de las larvas de *Pleurodeles waltl* y *Triturus marmoratus* (Amphibia: Salamandridae) en simpatria en dos charcas temporales de León. *Revista Española de Herpetología*. 1: 293-313.
- Santos X, González-Solís J, Llorente GA. 2000. Variation in the diet of the viperine snake, *Natrix maura*, in relation to prey availability. *Ecography* 23: 185-192.
- Santos X, Llorente GA. 1998. Sexual and size-related differences in the diet of the snake *Natrix maura* from the Ebro Delta (Spain). *Herpetological Journal* 8: 161-165.
- Seoane VL. 1885. On two forms of *Rana* from N.W. Spain. *The Zoologist* 9: 169-172.
- Vidal A. 1965. Les batraciens des îles Pithyuses. *Rapports et Procès Verbaux des Réunions –*

Scientifique de la mer Méditerranée 18:
561- 564.

Vidal A. 1966. Estudio biológico de las islas Pitiusas: Anfibios. Publicaciones del Instituto de Biología Aplicada 40: 81-112.

Vojtkova L, Roca V. 1993. Parasites of the frogs and toads in Europe. Part I: Protozoa. Revista Española de Herpetología 7: 37-45.

Vojtkova L, Roca V. 1994. Parasites of the frogs and toads in Europe. Part II: Trematoda. Revista Española de Herpetología. 8: 7-18.

Vojtkova L, Roca V. 1996. Parasites of the frogs and toads in Europe. Part III: Nematoda, Cestoda, Acanthocephala, Hirudinea, Crustacea and Insecta. Revista Española de Herpetología 10: 13-27.

3. Resumen

3.1. Introducción

El planeta Tierra está sufriendo un rápido proceso de cambio global cuyas causas fundamentales se encuentran en la explotación humana del medio (IPCC, 2014; Sage, 2020). Se prevé un aumento a gran escala en la magnitud de los principales motores de este cambio, a saber, el consumo excesivo de alimentos, las emisiones de gases de efecto invernadero, las invasiones biológicas, los cambios en los usos del suelo y la deposición de contaminantes, especialmente nitrógeno (Sala et al., 2000; Carlsson-Kanyama y González, 2009). No obstante, no todos los hábitats son igualmente susceptibles a estas alteraciones, ya que las áreas sometidas a mayor presión antrópica son especialmente vulnerables (Geldmann et al., 2014). Tal es el caso de los agrosistemas, donde todos los antedichos promotores del cambio global se encuentran exacerbados (Banerjee et al., 2021).

Por otra parte, algunos taxones son más propensos que otros a sufrir los efectos de los estresores propios de los agrosistemas (Foden et al., 2008). Entre los vertebrados, la conservación de los anfibios representa una enorme preocupación debido al declive global que afecta a sus poblaciones (Collins y Crump, 2009), presumiblemente ligado a los fenómenos anteriormente enumerados (Sodhi et al., 2008). En cuanto a la contaminación, los anfibios son especialmente vulnerables dada la permeabilidad de su piel (Slaby et al., 2019). Entre los contaminantes con mayores efectos entre los anfibios, por sus propiedades fisicoquímicas y por su amplia difusión en el medio, se encuentran los compuestos nitrogenados procedentes de los fertilizantes (Marco y Ortiz-Santaliestra, 2009; Baker et al., 2013), y entre estos, el amonio supone un problema de especial relevancia en agrosistemas, donde es uno de los compuestos nitrogenados más frecuentes (Olivares et al., 2013), incluso en masas de agua próximas, debido a procesos de filtración (Amano et al., 2016; Liu et al., 2021).

Es frecuente que el amonio, en comparación con otros compuestos nitrogenados sea el que mayores efectos negativos presente sobre la supervivencia, el consumo de alimento o las tasas de crecimiento de larvas de anfibio (Egea-Serrano et al., 2009; Ilha y Schiesari, 2014; Bellezi et al., 2015; Garriga et al., 2017), pudiendo incluso alterar la morfología y el desempeño locomotor (Egea-Serrano et al., 2009; Egea-Serrano y Tejedo, 2014). Además, los compuestos nitrogenados pueden también contarse entre las causas de ciertas anomalías morfológicas desarrolladas a lo largo de la metamorfosis en anfibios (Xu y Oldham, 1997), razón por la cual se ha comprobado que pueden ser más frecuentes en los agrosistemas (Spolyarich et al., 2011). No obstante, en otros grupos de animales bifásicos se ha comprobado que los efectos de la contaminación durante una fase larvaria acuática pueden incluso alcanzar las fases adultas de

vida aérea, libres de dicha contaminación (Debecker et al., 2017), lo que podría suceder también en anfibios. Asimismo, se sabe que otros contaminantes pueden debilitar la respuesta inmunológica de los anfibios (Albert et al., 2007), caso que podría extenderse también a los compuestos nitrogenados, y particularmente al amonio.

En cualquier caso, estos compuestos nitrogenados pueden entenderse como fuerzas selectivas capaces de promover tolerancia en las poblaciones expuestas a ellos (Miaud y Merilä, 2001). De este modo, se ha detectado divergencia geográfica en la tolerancia a compuestos nitrogenados, incluso a nivel intraespecífico (Shinn et al., 2008), a menudo como una posible consecuencia de presiones selectivas diferenciales impuestas por disparidades espaciales en el grado de exposición (Egea-Serrano et al., 2009; Karaoglu et al., 2010). En este contexto, esta tesis busca explorar los efectos de una exposición crónica al amonio durante la fase larvaria de un anfibio, la rana común (*Pelophylax perezi*) sobre la supervivencia, el crecimiento, la morfología y la locomoción de las fases larvianas (Objetivo 1), sobre la aparición de anomalías morfológicas sobre los metamórficos (Objetivo 2), sobre la supervivencia, el crecimiento, la morfología y la locomoción de las fases postmetamórficas hasta la edad adulta (Objetivo 3) y sobre la respuesta inmunitaria de los adultos (Objetivo 4). Se prevén efectos negativos de la exposición al amonio en todos los factores enumerados. No obstante, también se pretende comparar dichos efectos entre individuos procedentes de hábitat natural, un pinar, y de hábitat alterado por el hombre, un agrosistema. Se prevé que, si se ha producido tolerancia, dichos efectos sean menores en los ejemplares provenientes de agrosistema.

3.2. Materiales y Métodos

Para contestar a dichas preguntas, en la primavera de 2018 se capturaron adultos de ambos sexos de cada hábitat, en el suroeste de la Península Ibérica. Los ejemplares de cada hábitat se mantuvieron juntos en unas instalaciones donde pudieron reproducirse entre sí. Durante la época de reproducción, se comprobó la presencia de masas de huevos cada 12 horas. De cada masa de huevo recolectada, se seleccionaron al azar 15, y cada grupo de 15 se mantuvo en una réplica, es decir, un acuario de plástico que contenía 6 litros de agua no tratada. La mitad de estas réplicas, elegidas de forma aleatoria, constituyeron el grupo experimental, al agregárseles cloruro de amonio (NH_4Cl). El resto de réplicas se mantuvo con agua sin tratar, y constituyeron el grupo control. En total, hubo 15 réplicas de cada combinación posible de hábitat (pinar o agrosistema) y tratamiento (experimental o control).

Para cumplir con el Objetivo 1, se hizo un seguimiento semanal de las tasas de eclosión y de supervivencia en cada réplica, y a la quinta semana después de la eclosión, se midió el tamaño corporal y el desempeño locomotor de las larvas supervivientes.

Para cumplir con el Objetivo 2, en el momento de la metamorfosis, se contó cuántos metamórficos procedentes de cada réplica mostraban anomalías morfológicas en sus extremidades posteriores.

Para cumplir con el Objetivo 3, se midió el tamaño corporal, la longitud de las extremidades posteriores, y el desempeño locomotor de estos individuos como metamórficos, horas después del fin de la metamorfosis (junio-julio de 2018); como juveniles, el primer otoño después de la metamorfosis (noviembre de 2018); como subadultos, la primera primavera después de la metamorfosis (abril de 2019); y como adultos, el segundo invierno después de la metamorfosis (enero de 2020). A partir del momento de la metamorfosis, estos individuos no estuvieron sometidos a contaminación en ningún caso.

Para cumplir con el objetivo 4, se sometió a los adultos al test de la fitohemoaglutinina (PHA). Esta sustancia es una proteína inocua que causa una inflamación a nivel local cuya magnitud es directamente proporcional a la intensidad de la respuesta inmune celular (Clulow et al., 2015; Josserand et al., 2015).

En todos los casos, se comprobaron los efectos del hábitat, el tratamiento, el sexo (solo en los test realizados en individuos adultos, ya que los ejemplares en fases anteriores no se pudieron sexar) y sus interacciones.

3.2.1. Objetivo 1: Supervivencia, morfología y locomoción de las larvas (Capítulo 1).

El amonio no afectó al éxito de eclosión en ningún caso. Sin embargo, la supervivencia temprana de los renacuajos se redujo drásticamente en los ejemplares criados con amonio después de la primera semana desde la eclosión, independientemente del hábitat de origen. Esta reducción en la supervivencia solo se produjo durante los primeros días de la vida de estos renacuajos, tras lo cual las tasas de supervivencia se mantuvieron estables. Por su parte, Egea-Serrano et al. (2009) detectaron que una concentración de amonio de 13,5 mg/l, levemente superior a la usada en este proyecto, también aumenta las tasas de mortalidad de larvas de *P. perezi* en estadios posteriores, aunque la supervivencia en ese caso fue mayor en individuos de origen contaminado que en los de hábitats naturales.

Esta disparidad en la supervivencia provocó claras diferencias en la densidad entre los tratamientos, siendo las réplicas de control más densamente pobladas que las experimentales. Por lo tanto, una reducción en la densidad pudo haber funcionado como un efecto indirecto del amonio que, a su vez, tuvo efectos directos sobre el crecimiento, la morfología y el desarrollo de los renacuajos. Específicamente, el aumento de la densidad dio lugar a una reducción del tamaño del cuerpo, incluida la longitud hocico-cloaca (en adelante 'LHC'), la longitud y la altura de la cola, así como la masa corporal, medidas cinco semanas después de la eclosión. Estos

resultados corroboran en su gran medida los resultados de trabajos previos que encontraron un crecimiento más lento a densidades más altas de larvas de *Scaphiopus holbrooki* (Semlitsch y Caldwell, 1982), *Litoria spenceri* (Gillespie, 2002) y *Litoria aurea* (Browne et al., 2003), probablemente impulsados por la competencia por los recursos (Alford, 1999). Finalmente, la densidad tuvo una relación negativa con la etapa de Gosner en la que los ejemplares se encontraban cinco semanas después de la eclosión, lo que coincide con hallazgos anteriores que apuntan a que el desarrollo es más rápido a densidades más baja en larvas de diversas especies de anuros (Semlitsch y Caldwell, 1982; Gillespie, 2002; Browne et al., 2003).

Pero incluso teniendo en cuenta estas consecuencias de la densidad, el amonio infligió efectos directos sobre algunos (pero no todos) de los rasgos de la morfología y el desarrollo de los renacuajos. Concretamente, los renacuajos criados con amonio alcanzaron mayores valores de LHC. Por el contrario, el hecho de que el índice de masa corporal (Scaled Mass Index, en adelante 'SMI' por sus siglas en inglés; Peig y Green, 2009) no difiriera entre tratamientos sugiere que estas diferencias morfológicas fueron simplemente alométricas, pero no afectaron a la capacidad de los renacuajos de almacenar recursos. De manera similar, las exposiciones crónicas al nitrato de amonio produjeron renacuajos de *Lithobates clamitans* más grandes (Smith et al., 2013). Estos resultados están en marcado contraste con estudios previos sobre renacuajos de *P. perezi* donde la masa corporal se redujo después de una exposición de 21 días a concentraciones más altas de amonio (13,5 mg/l) en comparación con concentraciones más bajas (1,35mg/l) (Egea-Serrano et al., 2009). Asimismo, las larvas de sapos *Alytes obstetricans* sometidas a exposición aguda al amonio experimentaron una tasa de crecimiento más lenta (Garriga et al., 2017). A la luz de estos hallazgos, el hecho de que la exposición al amonio sea aguda o crónica podría interactuar de manera diferente con la densidad y, por lo tanto, ejercer consecuencias opuestas sobre el tamaño del cuerpo del renacuajo.

A la quinta semana tras la eclosión, los renacuajos en el tratamiento con amonio estuvieron en una etapa de Gosner más avanzada, lo que es indicativo de un desarrollo más rápido. Este hallazgo coincide con estudios previos donde el tiempo de desarrollo fue más corto en renacuajos de *Bufo bufo* expuestos a nitrato de amonio (Xu y Oldham, 1997). El desarrollo acelerado en condiciones estresantes podría ser beneficioso, ya que permite a los renacuajos evitar antes la masa de agua en cuestión. De hecho, otros factores estresantes como la privación de alimento (Doughty y Roberts, 2003), la desecación del medio acuático (Lent y Babbitt, 2020) o las infecciones (Warne et al., 2011) también pueden desencadenar un desarrollo más rápido.

Sin embargo, ninguno de estos efectos del amonio interactuó con el hábitat, lo que no apoya la hipótesis de que los renacuajos del agrosistema serían más resistentes a este factor estresante. Esta hipótesis, no obstante, sí fue apoyada con respecto a la velocidad de natación,

que se vio afectada negativamente por el amonio solo en los renacuajos de los pinares. Varios estudios sobre renacuajos de anuros han demostrado que los nadadores más rápidos tienen mayores posibilidades de sobrevivir a los intentos de depredación (Teplitsky et al., 2005; Arendt, 2009). De hecho, la presión de depredación podría representar una fuerza de selección más fuerte que los efectos morfológicos del amonio antes mencionados, llegando incluso a desempeñar un papel en la configuración de estas diferencias de hábitat en el efecto del amonio sobre la velocidad de natación. En los agrosistemas, ligados a la contaminación por amonio, los depredadores podrían eliminar aquellos renacuajos cuya velocidad de natación se reduce después de la exposición a dicha sustancia, seleccionando así renacuajos cuyo desempeño locomotor es resistente al amonio. Tal efecto es improbable en los pinares, donde la exposición al amonio no es frecuente. En marcado contraste con nuestros resultados, Egea-Serrano y Tejedo (2014) no detectaron ningún efecto de una exposición aguda al amonio sobre el rendimiento de nado de los renacuajos de *P. perezi* de hábitats contaminados o prístinos. Sin embargo, otros agroquímicos (Sievers et al., 2018; Moreira et al., 2019), e incluso otros estresores químicos no relacionados con la agricultura (Sievers et al., 2018; Araújo y Malafaia, 2020), sí que perjudican la locomoción de renacuajos de otras especies.

Finalmente, encontramos que la velocidad de natación aumentaba con la LHC y la masa corporal, lo que confirma que los renacuajos con mayores tamaños corporales nadan más rápido (Wilson y Franklin, 2000; Johnson et al., 2015). Sin embargo, detectamos un efecto negativo del SMI en la velocidad de natación, lo que indica que los individuos proporcionalmente más masivos eran nadadores más deficientes, una consecuencia probable de la carga que el exceso de masa corporal representa comúnmente para el rendimiento locomotor en otros taxones (Zamora-Camacho et al., 2014) o incluso en las etapas post-metamórficas de esta especie de estudio (Moreno-Rueda et al., 2020). Además, la longitud de la cola tuvo un efecto positivo en la velocidad de nado. Se sabe que las colas más largas facilitan una mayor velocidad de nado en otras especies de renacuajos (Arendt, 2010; Johnson et al., 2015). Por otro lado, no detectamos ningún efecto de la altura de la cola en la velocidad de natación, al igual que sucedió en estudios previos con renacuajos de *Hyla versicolor* (Van Buskirk y McCollum, 2000), pero al contrario que en otras larvas de anuro donde la altura de la cola sí mejora el rendimiento locomotor (Dayton et al., 2005; Arendt, 2010).

3.2.2. Objetivo 2: Aparición de malformaciones morfológicas en los metamórficos (Capítulo 2).

No se encontró evidencia de que las anomalías fueran más frecuentes en los ejemplares sometidos a amonio. Por tanto, al menos a la concentración usada, la exposición crónica al amonio durante el estadio larvario no aumentó la prevalencia de dichas malformaciones. Sin

embargo, una exposición subcrónica a concentraciones incluso más bajas de estos compuestos reduce la supervivencia (Egea-Serrano et al., 2009) y afecta al comportamiento de larvas de *Pelophylax perezi* (Egea-Serrano et al., 2011) estudiadas en otros trabajos. Por otra parte, la prevalencia de anomalías en las extremidades de *Bufo bufo* fue mayor tras una exposición aguda a una concentración de 100 mg/l de nitrato de amonio durante el estadio larvario que tras una exposición subcrónica a concentraciones de 50 y 100 mg/l de nitrato de amonio (Xu y Oldham, 1997). Estos resultados podrían ser consecuencia de la gran mortalidad que sufrieron las larvas expuestas a los tratamientos subcrónicos (Xu y Oldham, 1997), lo cual puede enmascarar su potencial para causar anomalías si los futuros portadores mueren. La exposición crónica a otros contaminantes, como el mercurio en *Rana sphenoccephala* (Unrine et al., 2004) y el níquel, cobalto o cadmio crónicos en *Xenopus laevis* (Plowman et al., 1994), causan malformaciones en metamórficos. También, exposiciones subcrónicas a carbamato y organofosfatos pesticidas causan malformaciones en *P. perezi* (Alvarez et al., 1995).

Según estudios anteriores, los individuos juveniles de *P. perezi* de agrosistemas son más pequeños y muestran mayor asimetría fluctuante en las extremidades posteriores que sus conspecíficos de hábitat naturales (Burghilea et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados tampoco denotan efecto alguno del hábitat en la prevalencia de anomalías en las extremidades posteriores de esta especie. En esta misma línea, la prevalencia de este tipo de anomalías no fue mayor en ejemplares de *Rana temporaria* de agrosistemas que de hábitats naturales (Piha et al., 2006). Sin embargo, estos hallazgos contrastan con otros que detectaron un aumento de dicha prevalencia en agrosistemas en varios anuros (Kiesecker, 2002; Guerra y Aráoz, 2016). Por tanto, nuestros resultados no apoyaron la hipótesis de que las ranas de agrosistemas podrían haber desarrollado resistencia al amonio.

3.2.3. *Objetivo 3: Supervivencia, morfología y locomoción de las fases postmetamórficas (Capítulo 3).*

No se hallaron evidencias de supervivencia diferencial a lo largo de estas fases para cada uno de los grupos estudiados. No obstante, sí se encontraron efectos de la exposición crónica al amonio durante la fase larvaria sobre otros parámetros de las fases postmetamórficas, que variaron según el hábitat de procedencia de los padres. Sorprendentemente, la forma en que estos efectos de la exposición al amonio interactuaron con el hábitat no fue consistente a lo largo del desarrollo post-metamórfico. La morfología de los metamórficos, en primer lugar, no pareció verse afectada por el tratamiento, pero sí por el hábitat: los metamórficos de agrosistemas tenían mayor LHC, longitud de las patas traseras, masa corporal y SMI que los de pinares. Esto no coincide con los hallazgos previamente descritos para las fases larvarias, donde la exposición crónica al amonio indujo un mayor tamaño corporal. Sin embargo, en juveniles, subadultos y

adultos, la LHC y la masa corporal se redujeron en los individuos experimentales del agrosistema lo que revierte las tendencias observadas en las larvas. La masa corporal fue mayor en los individuos experimentales solo en el caso de los juveniles de los pinares. A su vez, el SMI solo se vio afectado por el hábitat de procedencia en los juveniles, aunque a diferencia de los metamórficos, fue mayor en los individuos de pinares que en los de agrosistema. No obstante, el tratamiento afectó al SMI en subadultos: no solo fue mayor en los individuos del agrosistema, sino también en los expuestos al amonio durante sus estadios larvarios. Los adultos del grupo experimental también presentaron un mayor SMI. La longitud de las patas traseras fue mayor en los juveniles experimentales del agrosistema y en los juveniles control del pinar, pero estas diferencias desaparecieron en los subadultos y se invirtieron en los adultos.

Los patrones de tamaño en el momento de la metamorfosis no fueron consistentes con los encontrados en etapas previas y posteriores, lo que podría ser consecuencia de un crecimiento compensatorio. Con bases endocrinas complejas que aún no se han dilucidado, el crecimiento compensatorio permite a los individuos cuyo desarrollo se ve afectado por condiciones extrínsecas adversas igualar o incluso superar el tamaño corporal de sus congéneres que crecen en circunstancias prósperas (Mangel y Munch, 2005; Johnsson y Bohlin, 2005). En los anuros, la compensación de las diferencias en el tamaño corporal provocadas por condiciones estresantes, como la privación de alimentos o el estrés osmótico, puede ocurrir antes de la metamorfosis (Capellán y Nicieza, 2007; Orizaola et al., 2010). Tal podría ser el caso en el sistema aquí descrito: 5 semanas después de la eclosión, las larvas expuestas al amonio fueron más grandes que las criadas en ausencia de este. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron en el momento de la metamorfosis y se invirtieron en las etapas adultas. Mientras que, en algunos casos, los anuros metamorfoseados con mayor tamaño corporal mantienen esta ventaja posteriormente (Earl y Whiteman, 2015), en otros, el tamaño en la metamorfosis no predice el de las etapas postmetamórficas (Beck y Congdon, 1999). De hecho, también se ha descrito el crecimiento compensatorio después de la metamorfosis: algunos anuros que ven reducido el tamaño de su cuerpo en la metamorfosis en determinadas circunstancias, como una mayor densidad o exposición a pesticidas durante la etapa larvaria, pueden compensar este defecto con un mayor crecimiento posterior (Boone, 2005). Aunque los renacuajos de *P. perezi* parecían sobrecompensar el crecimiento a pesar de la contaminación por amonio y, según nuestros resultados, originan metamórficos de tamaño equivalente al grupo de control, no logran mantener el ritmo de crecimiento post-metamórfico de los individuos de control. Estos resultados sugieren que el crecimiento compensatorio de las larvas expuestas al amonio podría estar sujeto a costes retardados, similares a los detectados en forma de reducción del tamaño corporal, almacenamiento de grasa o masa muscular mucho después

de la restricción de alimento en los salmones (Morgan y Metcalfe, 2001), o después del estrés por calor (Sniegula et al., 2017) y la exposición a pesticidas en odonatos (Janssens et al., 2014).

Otra explicación no excluyente de estas disparidades en los efectos morfológicos del hábitat y el tratamiento entre las etapas estudiadas podría estar relacionado con el sexo. Se detectaron diferencias sexuales en el tamaño corporal en adultos. No obstante, no podemos descartar que ya pudieran existir diferencias sexuales en las fases postmetamórficas previas, aunque estas no pudieran ser sexadas ni, por ende, controladas. Una vez que se pudo controlar el sexo, desaparecieron algunos resultados inesperados, como el efecto negativo del amonio sobre la LHC y la masa corporal en los individuos de agrosistema, pero no en las ranas sexualmente inmaduras de los pinares. De hecho, la LHC y la masa corporal de las ranas adultas se vieron afectados negativamente por el amonio, lo que coincide con la predicción de que la contaminación durante la etapa larvaria afectaría el crecimiento posterior. Sin embargo, el SMI fue mayor en los adultos experimentales que en los controles. Por lo tanto, la exposición de las larvas al amonio redujo el tamaño corporal de los adultos, al tiempo que aumentó la condición corporal. Las posibles consecuencias de estos efectos combinados son poco claras. El tamaño corporal (Green, 2015) y la condición corporal (Gastón y Vaira, 2020) suelen estar correlacionados positivamente con el éxito reproductivo en los anuros. Sin embargo, dado que ni la masa corporal ni el SMI de las ranas adultas difirieron entre los hábitats, estos efectos opuestos del amonio sobre el tamaño corporal y el SMI, y los supuestos efectos positivos que ambos podrían tener en la reproducción, cualquier posible explicación debe tomarse con cautela.

No menos intrincadas fueron las interacciones entre el hábitat y el tratamiento con respecto a la distancia de salto a lo largo de las etapas de vida postmetamórficas. Los metamórficos mantuvieron la tendencia observada en las larvas, por lo que solo los individuos de pinar vieron reducido su rendimiento locomotor. Este hallazgo apoya la hipótesis de que este rasgo es resistente a la contaminación por amonio en los metamorfismos de los agrosistemas. Sin embargo, esta tendencia se invirtió en las sucesivas etapas focales, en las que el amonio tuvo efectos negativos solo en las ranas de agrosistema. Este efecto se mantuvo incluso después de controlar el sexo en los adultos, aunque las hembras tuvieron mayor desempeño locomotor que los machos. Por lo tanto, podría decirse que el crecimiento no es el único rasgo susceptible de compensación, ya que también podría serlo el rendimiento locomotor, a la luz de estos resultados. Sin embargo, el hecho contraintuitivo de que las ranas del agrosistema fueron las únicas que sufrieron una disminución en la distancia de salto a causa del amonio también puede sugerir costes retrasados de su inversión temprana en crecimiento y/o locomoción como larvas. Hasta donde sabemos, este es el primer caso documentado en el que el

crecimiento compensatorio y/o la locomoción en etapas tempranas de la vida produce costes posteriores en el rendimiento locomotor.

Por último, los correlatos morfológicos del rendimiento locomotor detectados a lo largo de las etapas focales corroboran en gran medida hallazgos previos sobre este (Moreno-Rueda et al., 2020) y otros anuros saltadores antes (Zamora-Camacho y Aragón, 2019) y después de alcanzar la madurez sexual (Brady et al., 2019). Es de destacar que, a pesar de las fuertes correlaciones encontradas, el rendimiento locomotor apareció hasta cierto punto desacoplado de la morfología, o al menos determinado por otros parámetros no medidos, de modo que las tendencias de la distancia de salto a través de hábitats y tratamientos no siguen los mismos patrones de los rasgos morfológicos en cuestión.

3.2.4. *Objetivo 4: Respuesta inmunitaria de los adultos (Capítulo 4).*

Los resultados confirmaron que la exposición al amonio durante la etapa larvaria de esta rana incurre en costos en la capacidad de los adultos de mostrar una respuesta inmune inflamatoria a la PHA. Esta idea está alineada con hallazgos previos de que la exposición al nitrato puede afectar la función inmunológica a través de una disminución en el recuento de glóbulos blancos de renacuajos y ranas (Dappen, 1983). Hasta donde sabemos, nuestros resultados prueban por primera vez que la exposición a un agroquímico en general, y a un fertilizante en particular, durante la etapa larvaria de un anfibio puede afectar a la función inmunológica de las etapas adultas, y probablemente su resistencia a patógenos y parásitos, incluso a pesar de la liberación de contaminantes tras la metamorfosis.

Sin embargo, ese efecto solo se detectó en los machos, mientras que la respuesta inflamatoria de las hembras permaneció inalterada por la exposición al amonio durante sus etapas larvarias. Este resultado está alineado con la hipótesis de la desventaja de la inmunocompetencia, que postula que la testosterona desvía la energía hacia rasgos que mejoran la reproducción, a costa de la función inmunológica, lo que hace que los individuos con más testosterona (supuestamente los machos) sean más vulnerables a los patógenos y parásitos (Folstad y Karter, 1992). Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que la respuesta inflamatoria de los machos adultos a la PHA es susceptible a los efectos de la exposición temprana al amonio, mientras que la de las hembras no lo es. En este sentido, un estudio de McCoy et al. (2008), que incluyó machos y hembras de *Rhinella marina*, también detectó anomalías morfológicas en las gónadas de los machos de agrosistema, pero no en las de las hembras. Estos machos también padecían una expresión deficiente de hormonas y rasgos sexuales secundarios en comparación con sus congéneres de hábitat prístino (McCoy et al.,

2008).

Los efectos descritos fueron comparables en individuos de ambos hábitats, lo que no apoya la hipótesis de que la respuesta inflamatoria de las ranas del agrosistema podría haber desarrollado resistencia al amonio. Según los resultados de esta tesis, en el caso de *P. perezii*, la mortalidad y la morfología de larvas de agrosistemas y la morfología de post-metamórficos de agrosistema expuestos crónicamente al amonio hasta la metamorfosis no muestran evidencia de tolerancia, mientras que la locomoción de larvas y metamórficos (pero no de etapas de vidas subsiguientes) sí lo hace.

3.3. Bibliografía

- Albert A, Drouillard K, Haffner GD, Dixon B. 2007. Dietary exposure to low pesticide doses causes long-term immunosuppression in the leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1179-1185.
- Alford RA. 1999. Tadpole ecology: resource use, competition and predation. In Altig R, McDiarmid RW (eds). *Tadpoles: biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, USA. Pp 240-278.
- Alvarez R, Honrubia MP, Herráez MP. 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.
- Amano H, Nakagawa K, Berndtsson R. 2016. Groundwater geochemistry of a nitrate-contaminated agricultural site. *Environmental Earth Sciences* 75: 1145.
- Araújo APdC, Malafaia G. 2020. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). *Journal of Hazardous Materials* 391: 122214.
- Arendt J. 2009. Influence of sprint speed and body size on predator avoidance in New Mexican spadefoot toads (*Spea multiplicata*). *Behavioral Ecology* 159: 455-461.
- Arendt J. 2010. Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: comparison of morphometric methods. *Journal of Morphology* 271: 1044-1052.
- Baker NJ, Bancroft BA, Garcia TS. 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of the Total Environment* 449: 150-156.
- Banerjee A, Jhariya MK, Meena RS, Yadav DK. 2021. Ecological footprints in agroecosystems: an overview. In: Banerjee A, Meena RS, Jhariya MK, Yadav DK (eds). *Agroecological footprints management for sustainable food systems*. Springer, Singapore.
- Beck CW, Congdon JG. 1999. Effects of individual variation in age and size at metamorphosis on growth and survivorship of southern toad (*Bufo terrestris*) metamorphs. *Canadian Journal of Zoology* 77: 944-951.
- Bellezi L, Ilha P, Schiesari L. 2015. Ontogenetic variation in the sensitivity of the gladiator frog, *Hypsiboas faber*, to inorganic nitrogen. *Copeia* 103: 14-21.
- Boone MD. 2005. Juvenile frogs compensate for small metamorph size with terrestrial growth: overcoming the effects of larval density and insecticide exposure. *Journal of Herpetology* 39:

416-423.

- Brady SP, Zamora-Camacho FJ, Goedert D, Comas M, Calsbeek R. 2019. Fitter frogs from polluted ponds: the complex impacts of human-altered environments. *Evolutionary Applications* 12: 1360-1370.
- Browne RK, Pomeroy M, Hamer AJ. 2003. High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture* 215: 109-121.
- Burgheloa C, Zaharescum D, Palanca A. 2013: Phenotypic indicators of developmental instability in an endemic amphibian from an altered landscape (Monegros, NE Spain). *Amphibia-Reptilia* 34: 505-516.
- Capellán E, Nicieza AG. 2007. Non-equivalence of growth arrest induced by predation risk or food limitation: context-dependent compensatory growth in anuran tadpoles. *Journal of Animal Ecology* 76: 1026-1035.
- Carlsson-Kanyama A, González AD. 2009. Potential contributions of food consumption patterns to climate change. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89: 1704S-1709S.
- Clulow S, Harris M, Mahony MJ. 2015. Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conservation Physiology* 3: cov042.
- Collins JP, Crump ML. 2009. *Extinction in our times: global amphibian decline*. New York: Oxford University Press.
- Dappen GE. 1983. Effects of nitrates upon hemopoietic, lymphoid and vascular tissues of tadpoles and frogs. *Proceedings of the Nebraska Academy of Science* 92: 23.
- Dayton GH, Saenz D, Baum KA, Langerhans B, DeWitt TJ. 2005. Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111: 582-591.
- Debecker S, Dinh KV, Stoks R. 2017. Strong delayed interactive effects of metal exposure and warming: latitude-dependent synergisms persist across metamorphosis. *Environmental Science and Technology* 51: 2409-2417.
- Doughty P, Roberts D. 2003. Plasticity in age and size at metamorphosis of *Crinia georgiana* tadpoles: responses to variation in food levels and deteriorating conditions during development. *Australian Journal of Zoology* 51: 271-284.
- Earl JE, Whiteman HH. 2015. Are commonly used fitness predictors accurate? A meta-analysis of amphibian size and age at metamorphosis. *Copeia* 103:297-309.
- Egea-Serrano A, Tejedo M. 2014. Contrasting effects of nitrogenous pollution on fitness and swimming performance of Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), larvae in mesocosms and field enclosures. *Aquatic*

Toxicology 146: 144-153.

- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2009. Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). *Chemosphere* 76: 869-877.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M. 2011. Behavioral responses of the Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), to three nitrogenous compounds in laboratory conditions. *Ecotoxicology* 20: 1246-1257.
- Foden W, Mace G, Vié JC, Angulo A, Butchart S, DeVantier L, Dublin H, Gutsche A, Stuart S, Turak E. 2008. Species susceptibility to climate change impacts. In Vié JC, Hilton-Taylor C, Stuart SN (eds). *The 2008 review of the IUCN Red List of threatened species*. Pp 77–88. IUCN, Gland, Switzerland.
- Folstad I, Karter AJ. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* 139: 603-622.
- Garriga N, Montori A, Llorente GA. 2017. Impact of ammonium nitrate and sodium nitrate on tadpoles of *Alytes obstetricans*. *Ecotoxicology* 26: 667-674.
- Gastón MS, Vaira M. 2020. Male mating success is related to body condition and stress-induced leukocyte response in an anuran with scramble competition. *Canadian Journal of Zoology* 98: 391-398.
- Geldmann J, Joppa LN, Burgess ND. 2014. Mapping change in human pressure globally on land and within protected areas. *Conservation Biology* 28: 1604-1616.
- Gillespie GR. 2002. Impacts of sediment loads, tadpole density, and food type on the growth and development of tadpoles of the spotted tree frog *Litoria spenceri*: an in-stream experiment. *Biological Conservation* 106: 414-150.
- Green DM. 2015. Implications of female body-size variation for the reproductive ecology of an anuran amphibian. *Ethology, Ecology and Evolution* 27:173-184.
- Guerra C, Aráoz E. 2016. Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 121: 105-116.
- Ilha P, Schiesari L. 2014. Lethal and sublethal effects of inorganic nitrogen on gladiator frog tadpoles (*Hypsiboas faber*, Hylidae). *Copeia* 2014: 221-230.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. *Climate change 2014: Sixth assessment report climate change 2014: The physical science basis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Janssens L, Dinh Van K, Stoks R. 2014. Extreme temperatures in the adult stage shape delayed effects of larval pesticide

stress: a comparison between latitudes. *Aquatic Toxicology* 148: 74-82.

Johnsson JI, Bohlin T. 2005. Compensatory growth for free? A field experiment on brown trout, *Salmo trutta*. *Oikos* 111: 31-38.

Johnson JB, Saenz D, Adams CK, Hibbitts TJ. 2015. Naturally occurring variation in tadpole morphology and performance linked to predator regime. *Ecology and Evolution* 5:2991-3002.

Josserand R, Troianowski M, Grolet O, Desprat JL, Lengagne T, Mondy N. 2015. A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia* 36:111-118.

Karaoglu H, Kutrup B, Ogut H. 2010. Intraspecific differences in responses of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) tadpoles exposed to environmentally relevant and acute levels of ammonium nitrate fertilizers. *Journal of Freshwater Ecology* 25: 353-366.

Kiesecker JM. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900-9904.

Lent EM, Babbitt KJ. 2020. The effects of hydroperiod and predator density on growth, development, and morphology of wood frogs (*Rana sylvatica*). *Aquatic Ecology* 54: 369-386.

Liu XL, Han G, Zeng J, Liu M, Li XQ, Boeckx P. 2021. Identifying the sources of nitrate contamination using a combined dual isotope, chemical and Bayesian model approach in a tropical agricultural river: case study in the Mun River, Thailand. *Science of the Total Environment* 760: 143938.

Mangel M, Munch SB. 2005. A life-history perspective on short- and long-term consequences of compensatory growth. *American Naturalist* 166: E155-E176.

Marco A, Ortiz-Santaliestra ME. 2009. Impact of reactive nitrogen on amphibians. In: *Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. H. Heatwole, J.W. Wilkinson (Eds.). *Amphibian Biology*, Vol. 8, Surrey Beatty & Sons, Baulkham Hills, New South Wales, Australia.

McCoy KA, Bortnick LJ, Campbell CM, Hamlin HJ, Guillette LJ, St Mary CM. 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives* 116:1526-1532.

Miaud C, Merilä J. 2001. Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota* 2: 31-50.

Moreira RA, Freitas JS, Pinto TJS, Schiesari L, Daam MA, Montagner CC, Goulart BV, Espindola ELG. 2019. Mortality, spatial avoidance and swimming behavior of bullfrog tadpoles (*Lithobates*

catasbeianus) exposed to the herbicide Diuron. *Water, Air, and Soil Pollution* 230: 125.

Moreno-Rueda G, Requena-Blanco A, Zamora-Camacho FJ, Comas M, Pascual G. 2020. Morphological determinants of jumping performance in the Iberian green frog. *Current Zoology* 66: 417-424.

Morgan IJ, Metcalfe NB. 2001. Deferred costs of compensatory growth after autumnal food shortage in juvenile salmon. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 295-301.

Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 486-494.

Orizaola G, Dahl E, Laurila A. 2010. Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos* 119: 980-987.

Peig J, Green AJ. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: The scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883e1891.

Plowman MC, Grbac-Ivankovic S, Martin J, Hopfer SM, Sunderman FW. 1994. Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to Ni²⁺, Co²⁺, or Cd²⁺ in FETAX assays. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 14:

135-144.

Piha H, Pekkonen M, Merilä J. 2006. Morphological abnormalities in amphibians in agricultural habitats: a case study of the common frog *Rana temporaria*. *Copeia* 2006: 810-817.

Sage RF. 2020. Global change biology: A primer. *Global Change Biology* 26: 3-30.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwall E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.

Semlitsch RD, Caldwell JP. 1982. Effects of density on growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrooki*. *Ecology* 63: 905-911.

Shinn C, Marco A, Serrano L. 2008. Inter- and intra-specific variation on sensitivity of larval amphibians to nitrite. *Chemosphere* 71: 507-514.

Sievers M, Hale R, Swearer SE, Parris KM. 2018. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161: 482-488.

Slaby S, Marin M, Marchand G, Lemiere S. 2019. Exposures to chemical contaminants: what can we learn from reproduction and development endpoints in the

amphibian ecotoxicology literature?
Environmental Pollution 248: 478-495.

- Smith GR, Dibble CJ, Terlecky AJ, Dayer CB, Burner AB, Ogle ME. 2013. Effects of invasive western mosquitofish and ammonium nitrate on green frog tadpoles. *Copeia* 2013: 248-253.
- Sniegula S, Janssens L, Stoks R. 2017. Integrating multiple stressors across life stages and latitudes: combined and delayed effects of an egg heat wave and larval pesticide exposure in a damselfly. *Aquatic Toxicology* 186: 113-122.
- Sodhi NS, Bickford D, Diesmos AC, Lee TM, Koh LP, Brook BW, Sekercioglu CH, Bradshaw CJA. 2008. Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. *PLoS ONE* 3: e1636.
- Spolyarich N, Hyne RV, Wilson SP, Palmer CG, Byrne M. 2011. Morphological abnormalities in frogs from a rice- growing region in NSW, Australia, with investigations into pesticide exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* 173: 397-407.
- Teplitsky C, Plenet S, Léna JP, Mermet N, Malet E, Joly P. 2005. Escape behaviour and ultimate causes of specific induced defences in an anuran tadpole. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 180-190.
- Unrine JM, Jagoe CH, Hopkins WA, Brant HA. 2004. Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog (*Rana sphenocephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2964-2970.
- Warne RW, Crespi EJ, Brunner JL. 2011. Escape from the pond: stress and developmental responses to ranavirus infection in wood frog tadpoles. *Functional Ecology* 25: 139-146.
- Wilson R, Franklin C. 2000. Effect of ontogenetic increases in body size on burst swimming performance in tadpoles of the striped marsh frog, *Limnodynastes peronii*. *Physiological and Biochemical Zoology* 73: 142-152.
- Xu Q, Oldham RS. 1997. Lethal and sublethal effects of nitrogen fertilizer ammonium nitrate on common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 298-303.
- Van Buskirk J, McCollum A. 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology* 203: 2149-2158.
- Zamora-Camacho FJ, Aragón P. 2019. Failed predator attacks have detrimental effects on antipredatory capabilities through developmental plasticity in *Pelobates cultripes* toads. *Functional Ecology* 33: 846-854.
- Zamora-Camacho FJ, Reguera S, Rubiño-Hispán MV, Moreno-Rueda G. 2014. Effects of limb length, body mass, gender, gravidity

and elevation on escape speed in the
lizard *Psammodromus algirus*.

Evolutionary Biology 41: 509-517.

4. Capítulos

I. Chapter 1

Direct and Indirect Effects of Chronic Exposure to Ammonium on Anuran Larvae Survivorship, Morphology, and Swimming Speed



Title	Direct and indirect effects of chronic exposure to ammonium on anuran larvae survivorship, morphology, and swimming speed.
Authors	Sonia Zambrano-Fernández, Francisco Javier Zamora-Camacho, Pedro Aragón
Journal	Chemosphere
Year	2022
Impact Factor	8.943
JCR Categories	Environmental Sciences
Status	Published
DOI	https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132349
Cite	Zambrano-Fernández, S.; Zamora-Camacho, F.J.; Aragón, P. 2022. Direct and indirect effects of chronic exposure to ammonium on anuran larvae survivorship, morphology, and swimming speed. Chemosphere, 287: 132349.

Abstract

Several constituents of the current global change are usually deemed accountable for the worldwide declines of amphibian populations. Among these, water contamination poses a major threat, especially to larval stages, which are unable to escape a polluted water body. This problem is remarkable in agrosystems, one of the main sources of water pollution and whose area is forecasted to increase in the forthcoming decades. However, pollutants represent a selective pressure that may result in tolerance in affected areas. In this work, we tested whether chronic exposure to a sublethal concentration of ammonium (10 mg/L), one of the most frequent agrochemicals, affects differently hatching success, survivorship, morphology and swimming performance of *Pelophylax perezi* tadpoles from agrosystem and pine grove habitats. Ammonium diminished survivorship at the earliest stages after hatching. Thus, lower density was a by-product of exposure to ammonium. Higher density slowed down development, reduced snout-vent length, and had a sharper negative effect on body mass and tail length and depth of ammonium treated individuals with respect to the control. In turn, ammonium accelerated development and increased body mass, SVL, and tail length and depth. These effects did not depend on provenance habitat. However, only pine grove tadpoles' swimming speed was negatively affected by ammonium, which supports the hypothesis that agrosystem tadpoles are more tolerant to ammonium. Finally, corroborating previous findings, tadpoles with larger bodies and tails were faster swimmers, whereas proportionally more massive individuals were slower, and tail depth was unrelated to swimming speed.

II. Chapter 2

Does Chronic Exposure to Ammonium during the Pre-Metamorphic Stages Promote Hindlimb Abnormality in Anuran Metamorphs? A Comparison between Natural-Habitat and Agrosystem Frogs



Title	Does chronic exposure to ammonium during the pre-metamorphic stages promote hindlimb abnormality in anuran metamorphs? A comparison between natural-habitat and agrosystem frogs.
Authors	Sonia Zambrano-Fernández, Francisco Javier Zamora-Camacho, Pedro Aragón
Journal	Acta Herpetologica
Year	2020
Impact Factor	0.848
JCR Categories	Zoology
Status	Published
DOI	https://doi.org/10.13128/a_h-10016
Cite	Zambrano-Fernández, S.; Zamora-Camacho, F.J.; Aragón, P. 2020. Does chronic exposure to ammonium during the pre-metamorphic stages promote hindlimb abnormality in anuran metamorphs? A comparison between natural-habitat and agrosystem frogs. <i>Acta Herpetologica</i> , 15: 119-123.

Abstract

Despite their detrimental effects on locomotion, prevalence of hindlimb abnormalities is increasing in anuran populations worldwide. Among others, agrochemical pollution during the larval stage is a potential cause. However, populations exposed to such a strong selective pressure could evolve resistance. In this work, we examine the potential effects of chronic exposure to ammonium during the pre-metamorphic stages of *Pelophylax perezi* frogs on metamorph hindlimb abnormality prevalence, as compared with unpolluted-water-reared conspecifics. We conducted the experiment on tadpoles either from natural-habitat or from agrosystem parents. We detected no effect of chronic exposure to ammonium on hindlimb abnormality prevalence in frogs from either habitat, which suggests that the lack of effect detected is not related to resistance evolved in agrosystem frogs.

III. Chapter 3

Carryover Effects of Chronic Exposure to Ammonium during the Larval Stage on Post-Metamorphic Frogs



Title	Carryover effects of chronic exposure to ammonium during the larval stage on post-metamorphic frogs.
Authors	Francisco Javier Zamora-Camacho, Sonia Zambrano-Fernández, Pedro Aragón
Journal	Aquatic Toxicology
Year	2022
Impact Factor	5.202
JCR Categories	Toxicology, Marine and Freshwater Biology
Status	Published
DOI	https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106196
Cite	Zamora-Camacho, F.J.; Zambrano-Fernández, S.; Aragón, P. 2022. Carryover effects of chronic exposure to ammonium during the larval stage on post-metamorphic frogs. <i>Aquatic Toxicology</i> , 248: 106196. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106196 .

Abstract

Water contamination poses an important challenge to aquatic fauna, including well-documented effects on amphibian larvae. However, little is known about how contamination during the larval stages may affect post-metamorphic phases, or whether resistance may have evolved in some populations. In this work, we tested the hypothesis that chronic exposure to ammonium (a common contaminant in agroecosystems with confirmed effects on anuran tadpoles) during the larval stage of *Pelophylax perezi* frogs would affect growth and locomotor performance of metamorph, juvenile, subadult and adult stages. We also predicted that the effects of ammonium would be milder in offspring originated from parental agroecosystem frogs than those originating from forests. We compared tadpoles from both habitats either reared in untreated water or chronically exposed to ammonium. We found that exposure to ammonium during the larval stage inflicted effects on morphology (different measures of body size) and swimming speed after metamorphosis until adulthood. However, these effects were not always consistent through post-metamorphic stages and the effects differed as a function of treatment and habitat. In adults, body size and condition were greater in non-ammonium and ammonium exposed individuals, respectively. These differences were not detectable in metamorphs, for which only ammonium-exposed individuals from agroecosystem showed reduced body size in intermediate post-metamorphic stages. In turn, treatment reduced jumping distance only in agroecosystem adults, subadults and juveniles, which was opposite to the trend observed just after metamorphosis. These changes of patterns throughout the ontogeny of *P. perezi* could be due to processes such as compensatory growth, to delayed energy costs derived from it, or to early sexual differences that could be present even before they can be accounted for. In summary, this study suggests that exposure to ammonium during larval stages can result in diverse biological and long-term outcomes in later life stages.

IV. Chapter 4

Long-Term Sex-Dependent Inflammatory Response of Adult Frogs to Ammonium Exposure during the Larval Stage



Title	Long-term sex-dependent inflammatory response of adult frogs to ammonium exposure during the larval stage.
Authors	Francisco Javier Zamora-Camacho, Sonia Zambrano-Fernández, Pedro Aragón
Journal	Chemosphere
Year	2022
Impact Factor	8.943
JCR Categories	Environmental Sciences
Status	Published
DOI	https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136202
Cite	Zamora-Camacho, F.J.; Zambrano-Fernández, S.; Aragón, P. 2022. Long-term sex-dependent inflammatory response of adult frogs to ammonium exposure during the larval stage. Chemosphere, 307: 136202.

Abstract

Among others, the global change involves a worldwide increase in cropland area, with the concomitant rise in nitrogenous fertilizer supplementation and species range alterations, including parasites and pathogens. As most animals rely on their immune systems against these infectious agents, studying the potential effects of nitrogenous compounds on animal immune response is vital to understand their susceptibility to infections under these altered circumstances. Being subjected to an alarming process of global declines, amphibians are the object of particular attention, given their sensitivity to these compounds, especially to ammonium. Moreover, whereas adults can actively avoid polluted patches, larvae are confined within their waterbodies, thus exposed to contaminants in it. In this work, we test whether chronic exposure to a sublethal dose of ammonium during the larval stage of *Pelophylax perezi* frogs, released from all contamination after metamorphosis, leads to impaired inflammatory response to phytohemagglutinin in adults. We also test whether such a response differs between agrosystem individuals as compared with conspecifics from natural habitats. We found negative carryover effects of chronic exposure of larvae to ammonium on adult inflammatory response, which could imply a greater susceptibility to pathogens and parasites. However, this damage is only true for males, which, according to the immunocompetence handicap hypothesis, could be a consequence of a testosterone-triggered impairment of male immune function. In disagreement with our prediction, however, we detected no differences in the inflammatory response of agrosystem frogs to phytohemagglutinin as compared with natural habitat conspecifics.

5. General Discussion

Approximately, 12% of the land surface on planet Earth is covered by agrosystems, whose tendency to expand is far from being forecast to decelerate (Foley et al., 2011; Laso Bayas et al., 2017). Quite the opposite, feeding the growing human population will require an increasingly extensive and intensive agricultural activity (Tilman et al., 2001; Dobrovolski et al., 2011). This will pose a considerable challenge to global biodiversity. Agrosystems are known to contribute to multifarious facets of the global change, starting with the shift in land use they entail as a concomitant trait of their very essence (Hanaček and Rodríguez-Labajos, 2018). Moreover, not few of the species cultivated are alien, trait that can in turn favor the establishment of allochthonous plagues and the arousal of novel and unbalanced ecological interactions (Sujay et al., 2010; Marrero et al., 2017). Plus, agrosystems represent a remarkable source of greenhouse effect gases (Banerjee et al., 2021) as well as pollutants such as microplastics (Okeke et al., 2022), heavy metals (Shi et al., 2018), biocides of different types (Pérez et al., 2021), and fertilizers (Wang et al., 2018). Among the latter, nitrogenous compounds are of the essence to the success of most crops (Ichihashi et al., 2020). However, nitrogenous compounds tend to vanish from soils due to volatilization or leaching into deep ground layers or water bodies (Mahmud et al., 2021). Therefore, repeated pulses of nitrogen input are the norm in agrosystems, with the subsequent degradation of the area in question and those in its vicinity (Man et al., 2021). In this context, understanding the ecological processes resulting from exposure to agricultural stressors in general, and of nitrogenous compounds in particular, is of the utmost importance for the preservation of the yet rich biodiversity that these habitats harbor (Durán et al., 2014; Wang, 2020).

This thesis fills substantial knowledge gaps regarding various short- and long-term consequences of chronic exposure to ammonium during the larval stage of an amphibian on its survival, morphology, locomotor performance and immune response. The elected focal species was the Iberian green frog, *Pelophylax perezi*, whose ecological requirements are low enough for it to be present in pristine but also in polluted environments (Egea-Serrano, 2014). This key characteristic was fundamental to compare the effects of a chronic exposure to ammonium during the larval stage between pine grove and agrosystem individuals. This approach tested the hypothesis that agrosystem frogs, allegedly exposed to agrochemicals in their habitat, could have evolved tolerance to this pollutant, as only those individuals with the ability to overcome their effects could thrive in such a habitat. According to this prediction, agrosystem frogs should be less affected by ammonium than their pine grove counterparts. However, little support was found to this hypothesis. For starters, the first effect of ammonium observed was a dramatic

reduction in survival shortly after hatching, which was comparable in larvae from both habitats. This differential mortality triggered the appearance of reduced density during the larval stage as a side effect of ammonium. Developmental rate and body size were negatively correlated with density, which can be interpreted as indirect effects of ammonium contamination. Those negative effects of density, from which ammonium-exposed larvae were released, could be attributed to exacerbated competition (Amundsen et al., 2007). However, given that all larvae were fed ad-libitum, the mechanistic process by which density affected growth and development are not elucidated. It cannot be discarded that some individuals could corner the resources, which could be more likely to happen as the number of individuals increased. Also, greater densities could boost stress (Iguchi et al., 2003).

Nonetheless, tolerance to ammonium in agrosystem frogs was supported in the case of locomotor performance of larvae: pine grove larvae subjected to ammonium pollution were slower swimmers than those in the experimental group, whereas agrosystem larvae remained unaffected. The data compiled here do not allow to assess differences in predation pressure between these habitats, but avian, reptilian and invertebrate tadpole predators are known to abound in both (pers. obs.). Assuming that both populations are under comparable predation pressure, it could be thought that predators in agrosystem may eliminate tadpoles whose locomotor performance is reduced as a consequence of pollution, thus allowing survival of tolerant individuals only. However, agrosystem tadpoles were slower than pine grove tadpoles regardless of the treatment, which could suggest milder predation pressure or a constitutive limitation in locomotor performance of tadpoles from agrosystem. The latter explanation could be possible if the physiological mechanisms that allow faster swimming are irrelevant, and thus not positively selected, in a scenario where pollution is bound to interfere with them and limit their functionality anyway. In any case, this result contrasts with findings by Egea-Serrano and Tejedo (2014), who found no effect of an acute exposure to ammonium on swimming performance of tadpoles from either polluted or pristine environments. These differences might be due to the fact that the experiment of Egea-Serrano and Tejedo (2014) was not conducted in controlled laboratory conditions, unlike the one described in this thesis. Therefore, primary production (which can be exacerbated by ammonium, thus providing extra food for tadpoles) was not standardized in that experiment, whereas it was in ours. Indeed, our result is aligned with other works in which other pollutants and stressors have proven to diminish locomotor performance of amphibian larvae (e.g. Sievers et al., 2018; Moreira et al., 2019; Araújo and Malafaia, 2020).

This tendency was also true of locomotor performance of metamorphs. However, juveniles, subadults and adults reversed it: in these age groups, exposure to ammonium during

the larval stage affected negatively jumping distance of agrosystem individuals, but not of pine grove conspecifics. Such a result could be explained in the light of a compensatory mechanism, according to which individuals that experience a poorer condition for a given character in early life stages divert greater amounts of resources to it in subsequent phases (Metcalf and Monaghan, 2001). Compensation has proven possible in life-history traits (Johnston and Post, 2009), but, to the best of our knowledge, other attempts to prove ontogenetic compensation in locomotion have not been successful (i.e., Royle et al., 2006). Compensation, or even overcompensation, has been detected to involve body growth, as individuals with limited early growth owing to unfavorable circumstances can reach, or even surpass, body sizes of conspecifics raised under prosperous conditions once released from such limiting factors (Russell and Wootton, 1992; Johnsson and Bohlin, 2005; Mangel and Munch, 2005). Such compensatory growth has been demonstrated in other anurans (Boone, 2005; Gramapurohit, 2009), and could apply to the system described here. Larvae from both habitats grew and developed faster in the presence of ammonium. But, by the time of metamorphosis, this pollutant did not affect body size, whereas in later immature stages body size of agrosystem individuals only was affected by the presence of ammonium during the larval stage. Interestingly, once adulthood was reached, control individuals had greater body sizes than those exposed to ammonium as larvae. Likewise, the scaled mass index (SMI), a body condition index that has proven to accurately predict energy stores (Peig and Green, 2009), did not differ between experimental and control individuals in their larval and early post-metamorphic stages, but was greater in the former than in the latter in subadults and adults. The complex developmental patterns of the effects of habitat and treatment on body size can illustrate the limitations and compromises to which compensatory growth might be subjected. An alternative, yet not necessarily mutually-exclusive explanation to these intricate patterns, could involve sex. Secondary sexual traits are only obvious in adults, so earlier stages could not be sexed. Once they were, sexual differences were evidenced: females performed better than males in the locomotor performance trials, and had greater body sizes, but lower SMI. It cannot be discarded that such sexual differences could be present before maturity. Thus, what the results would have been could the individuals have been sexed earlier, and had sex been controlled for in statistical models, remains unknown.

Ammonium accelerated growth of larvae, as ammonium-exposed larvae were larger than non-ammonium exposed conspecifics 5 weeks after hatching. However, these differences had disappeared by the time of metamorphosis, and ammonium-exposed larvae gave rise to smaller adults than their control counterparts. Ammonium also presented negative effects on locomotor performance of larvae and adults. Thus, although larvae seem to cope relatively well

with ammonium, and even to divert more energy and resources to growth and development than control individuals, they appeared to undergo long-term negative effects. Rapid growth during the larval stage can be at the expense of subsequent development. The validity of this potential explanation is reinforced by the finding that adults that had been subjected to ammonium as larvae presented hampered swelling response, significative of a less potent immune system (Clulow et al. 2015; Josserand et al., 2015). However, this effect was sex-dependent, as it only appeared in males. This can be explained in the light of the immunocompetence handicap hypothesis, which posits that testosterone sequestrates resources to compartments that enhance reproduction to the detriment of somatic maintenance, which results in less resources diverted to the immune system (Roberts et al., 2004). According to this result, exposure to ammonium during the larval stage leads to adult males with worse ability to overcome infectious diseases.

Nonetheless, some of the effects detected may have been consubstantially independent of sex. For instance, the relationships between morphology and locomotor performance: in both sexes, and in all post-metamorphic stages, body size and hindlimb length were positively related to jumping distance. This is aligned with previous findings in this (Moreno-Rueda et al., 2020) and other frogs (Brady et al., 2019; Zamora-Camacho and Aragón, 2019a). The relationship between jumping distance and SMI was negative, but only in the case of subadults: proportionally more massive subadults saw their locomotor performance impaired, probably due to the burden that excess body mass represents (Zamora-Camacho et al., 2014). Also in line with previous research (Arendt, 2010; Johnson et al., 2015), swimming speed of larvae was positively related to body size and tail length, whereas its relationship with SMI was also negative. Thus, across stages, larger individuals perform better at the locomotion trials, whereas those proportionally more massive perform worse.

Given these causal relationships between morphology and locomotion, it comes as no surprise that hindlimb morphological abnormalities hinder jumping performance (Zamora-Camacho and Aragón, 2019b), which could dramatically affect survival and fitness. In this sample, some of the metamorphs presented an anomalous 180° insertion of one hindlimb, which was as well impossible to normally fold. This anomaly appeared in 2-4% of the metamorphs, which is in agreement with other studies on related aberrant morphology in other amphibians (Mester et al., 2015; Zamora-Camacho, 2020). However, the proportion of abnormal individuals did not differ between habitats, which coincides with some studies (Piha et al., 2006), but is against others that show a greater prevalence of limb abnormality in amphibians from polluted habitats than in those from unaltered environments (Kiesecker 2002; Guerra and Aráoz, 2016). Thus, the appearance of this anomaly does not seem to be caused by exposure to

ammonium, nor is it more frequent in the altered habitat. Moreover, these results do not back the hypothesis that agrosystem frogs may have developed resistance to the ammonium.

To synthesize, chronic exposure to ammonium before metamorphosis caused a dramatic mortality early after hatching in these tadpoles, which was similar in pine grove and in agrosystem individuals. This led to indirect effects of ammonium via reduced density. Ammonium triggered a faster development and growth in larvae, which did not translate into larger metamorphs though, and was even reversed in adults. Thus, that accelerated growth during the larval stage appears to be at the expense of growth in the post-metamorphic stages. Larval locomotor performance was negatively affected by ammonium only in pine grove individuals. This tendency was also maintained by metamorphs, which are the only instances in which the hypothesis that agrosystem individuals may have developed tolerance to contamination, given that it allegedly is a constant in their environment. However, in subsequent stages, this effect of habitat disappeared. In any case, once adulthood was reached, individuals that had been exposed to ammonium as larvae were smaller and had impaired locomotor performance as compared with conspecifics that had not. In addition, the immune response of adult males exposed to ammonium as larvae was weaker than that of individuals that were not exposed to this pollutant. Therefore, there is evidence for long-term negative effects of chronic exposure to ammonium in larval anurans on body size, locomotion and immune response. Other traits, however, such as the appearance of morphological abnormalities, appeared unrelated to ammonium.

In any case, this study was not devoid of limitations. In the first place, the choice of the focal species was based on its ability to thrive in both habitats studied and to resist some extent of pollution. Although other species can occasionally be found in this agrosystem, only *Pelophylax perezi* and *Epidalea calamita* are abundant enough to provide a sufficient sample (personal observation). However, *E. calamita* usually reproduces in small ponds and ditches of short duration, where its brief larval period finishes within three or four weeks from hatching (Gómez-Mestre, 2014). Therefore, the exposure of this species to contamination during the larval stage is scarce, which is probably one of the causes of its existence there. On the other hand, *P. perezi* breeds in larger water bodies and has a longer metamorphosis (Egea-Serrano, 2014), so its larvae are bound to face the conditions in them. However, the fact that *P. perezi* is known to stand a considerable degree of contamination (Egea-Serrano, 2014) could limit the potential of these results to be extrapolated to other more pollution-sensitive species.

Moreover, individuals could not be marked, which prevented a follow-up of each individual. Nonetheless, long-term marking was challenging for several reasons. In the first place, the larvae, and even the metamorphs, were too small for marking with standard passive

integrated transponders (Schumann et al., 2020). Toe clipping was not a possibility in larvae, although it has been successfully implemented in adults (Sánchez-Montes and Martínez-Solano, 2011; Capellà-Marzo et al., 2020). Nonetheless, in our case, individuals should have been marked as metamorphs, when their SVL barely surpassed 10 mm. By the time the individuals reached the size that would have allowed toe clipping, they had already been mixed in the seminatural enclosures and were, therefore, impossible to identify individually. Moreover, especially when clipped at such a short age and small size, toe regeneration cannot be discarded, which would invalidate the technique in the long run (Caballero-Gini et al., 2019). In turn, visible implant elastomers tend to migrate or fade in time (Kopecký, 2020). The inability to mark the individuals led to another drawback, which was the impossibility of sexing individuals before sexual maturity. Had individuals been marked, their sex could have been established for younger stages, once adults could be sexed. The fact that the sex of larvae, metamorphs, juveniles and subadults remained unknown could be a source of uncontrolled variability. However, logistic and economic limitations precluded all possibility of using molecular techniques to ascertain the sex of the individuals at different points of their lives.

Future research lines could attempt to overcome those limitations, some of which could be solved with sufficient pecuniary resources. Also, the effects of pollution on less resistant species is worthy of investigation, although most species will not be found in agrosystems, which will preclude the comparison between habitats. Moreover, other potential effects of ammonium on these frogs remain poorly understood, such as potential effects on the oxidative stress, telomere attrition or corticosterone expression, among others.

5.1. Bibliografía

- Amundsen PA, Knudsen R, Klemetsen A. 2007. Intraspecific competition and density dependence of food consumption and growth in arctic charr. *Journal of Animal Ecology* 76: 149-158.
- Araújo APdC, Malafaia G. 2020. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). *Journal of Hazardous Materials* 391: 122214.
- Arendt J. 2010. Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: comparison of morphometric methods. *Journal of Morphology* 271: 1044-1052.
- Banerjee A, Jhariya MK, Meena RS, Yadav DK. 2021. Ecological footprints in agroecosystem: an overview. In: Banerjee A, Meena RS, Jhariya MK, Yadav DK (eds.) *Agroecological footprints management for sustainable food system*. Singapore, Springer.
- Boone MD. 2005. Juvenile frogs compensate for small metamorph size with terrestrial growth: overcoming the effects of larval density and insecticide exposure. *Journal of Herpetology* 39: 416-423.
- Brady SP, Zamora-Camacho FJ, Goedert D, Comas M, Calsbeek R. 2019. Fitter frogs from polluted ponds: the complex impacts of human-altered environments. *Evolutionary Applications* 12: 1360–1370.
- Caballero-Gini A, Bueno Villafañe D, Romero L, Ferreira M, Cañete L, Laino R, Musalem K. 2019. Visible implant alphanumeric (VIA) as a marking method in the lesser snouted treefrog *Scinax nasicus*. *Acta Herpetologica* 14: 129-133.
- Capellà-Marzo B, Sánchez-Montes G, Martínez-Solano I. 2020. Contrasting demographic trends and asymmetric migration rates in a spatially structured amphibian population. *Integrative Zoology* 15: 482-497.
- Clulow S, Harris M, Mahony MJ. 2015. Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conservation Physiology* 3: cov042.
- Dobrovolski R, Diniz-Filho JAF, Loyola RD, Júnior PDM. 2011. Agricultural expansion and the fate of global conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* 20: 2445-2459.
- Durán AP, Duffy JP, Gaston KJ, 2014. Spatial conservation prioritization strategies: consequences for biodiversity and ecosystem service representation. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 20141529.

- Egea-Serrano A. 2014. Rana común – *Pelophylax perezi*. In: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles (Salvador A, Martínez-Solano I, eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://vertebradosibericos.org>
- Egea-Serrano A, Tejedo M. 2014. Contrasting effects of nitrogenous pollution on fitness and swimming performance of Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), larvae in mesocosms and field enclosures. *Aquatic Toxicology* 146: 144-153.
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill J, Monfreda C, Polasky S, Rockström J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D, Zaks DPM. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342.
- Gómez-Mestre, I. 2014. Sapo corredor – *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768). Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. In: Salvador A. and Marco, A. editors. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. See <http://www.vertebradosibericos.org>
- Gramapurohit NP. 2009. Catch-up growth during juvenile life can compensate for the small metamorphic size in *Euphlyctis cyanophlyctis*. *Current Science* 97: 1243-1246.
- Guerra C, Aráoz E. 2016. Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 121: 105-116.
- Hanaček K, Rodríguez-Labajos B. 2018. Impacts of land-use and management changes on cultural agroecosystem services and environmental conflicts – a global review. *Global Environmental Change* 50: 41-59.
- Ichihashi Y, Date Y, Shino A, Nihei N. 2020. Multi-omics analysis on an agroecosystem reveals the significant role of organic nitrogen to increase agricultural crop yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 14552-14560.
- Iguchi K, Ogawa K, Nagae M, Ito F. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220: 515-523.
- Johnson JB, Saenz D, Adams CK, Hibbitts TJ. 2015. Naturally occurring variation in tadpole morphology and performance linked to predator regime. *Ecology and Evolution* 5: 2991–3002.

- Johnsson JI, Bohlin T. 2005. Compensatory growth for free? A field experiment on brown trout, *Salmo trutta*. *Oikos* 111: 31-38.
- Johnston FD, Post JR. 2009. Density-dependent life-history compensation of an iteroparous salmonid. *Ecological Applications* 19: 449-467.
- Josserand R, Troïanowski M, Grolet O, Desprat JL, Lengagne T, Mondy N. 2015. A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia* 36: 111-118.
- Kiesecker JM. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900-9904.
- Kopecký O. 2020. Factors affecting the retention of visible implant elastomer (VIE) tags in smooth newts (*Lissotriton vulgaris*) during the breeding period. *South American Journal of Herpetology* 15: 41-46.
- Laso Bayas JC, Lesiv M, Waldner F, Schucknecht A, Duerauer M, See L, Fritz S, Fraisl D, Moorthy I, McCallum I, Perger C, Danylo O, Defourny P, Gallego J, Gilliams S, Hassan Aktar Iu, Jyoti Baishya S, Baruah M, Bunnamey K, Campos A, Changkakati T, Cipriani A, Das K, Das D, Das I, Frankel Davis K, Hazarika P, Johnson BA, Malek Z, Molinari ME, Panging K, Pawe CK, Pérez-Hoyos A, Sahariah PK, Sahariah D, Saikia A, Saikia M, Schlesinger P, Seidacaru E, Singha K, Wilson JW. 2017. A global reference database of crowdsourced cropland data collected using the Geo-Wiki platform. *Scientific Data* 4: 170136.
- Mahmud K, Panday D, Mergoum A, Missaoui A. 2021. Nitrogen losses and potential mitigation strategies for a sustainable agroecosystem. *Sustainability* 13: 2400.
- Man M, Deen B, Dunfield KE, Wagner-Riddle C, Simpson MJ. 2021. Altered soil organic matter composition and degradation after a decade of nitrogen fertilization in a temperate agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 310: 107305.
- Mangel M, Munch SB. 2005. A life-history perspective on short- and long-term consequences of compensatory growth. *American Naturalist* 166: E155-E176.
- Marrero HJ, Torretta JP, Vázquez DP, Hodara K, Medan D. 2017. Exotic plants promote pollination niche overlap in an agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 239: 304-309.
- Mester B, Lengyel S, Puky M. 2015. Low

- frequency of amphibian morphological anomalies in a large protected wetland and grassland complex in Hungary. *Herpetological Conservation and Biology* 10: 679-687.
- Metcalfe NB, Monaghan P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology and Evolution* 16: 254-260.
- Moreira RA, Freitas JS, Pinto TJS, Schiesari L, Daam MA, Montagner CC, Goulart BV, Espindola ELG. 2019. Mortality, spatial avoidance and swimming behavior of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide Diuron. *Water, Air, and Soil Pollution* 230: 125.
- Moreno-Rueda G, Requena-Blanco A, Zamora-Camacho FJ, Comas M, Pascual G. 2020. Morphological determinants of jumping performance in the Iberian green frog. *Current Zoology* 66: 417-424.
- Okeke ES, Okoye CO, Atakpa EO, Ita RE, Nyaruaba R, Mgbechidinma CL, Akan OD. 2022. Microplastics in agroecosystems-impacts on ecosystem functions and food chains. *Resources, Conservation and Recycling* 177: 105961.
- Peig J, Green AJ. 2009. New perspectives forestimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883-1891.
- Pérez DJ, Iturburu FG, Calderon G, Oyesqui LAE, De Gerónimo E, Aparicio VC. 2021. Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. *Chemosphere* 263: 128061.
- Piha H, Pekkonen M, Merilä J. 2006. Morphological abnormalities in amphibians in agricultural habitats: a case study of the common frog *Rana temporaria*. *Copeia* 2006: 810-817.
- Roberts ML, Buchanan KL, Evans MR. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour* 68:227-239.
- Royle NJ, Metcalfe NB, Lindström J. 2006. Sexual selection, growth compensation and fast-start swimming performance in green swordtails, *Xiphophorus helleri*. *Functional Ecology* 20: 662-669.
- Russell NR, Wootton RJ. 1992. Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxynus phoxynus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction. *Environmental Biology of Fishes* 34: 277-285.
- Sánchez-Montes G, Martínez-Solano I. 2011. Population size, habitat use and movement patterns during the breeding season in a population of

- Perez's frog (*Pelophylax perezii*) in central Spain. *Basic and Applied Herpetology* 25: 81-96.
- Schumann DA, Graeb KN, Wagner MD, Graeb BDS, Prenosil E, Hoekwater J. 2020. Suitability of surgically implanted 8-mm passive integrated transponder tags for small-bodied fishes. *Journal of Applied Ichthyology* 36: 682-692.
- Shi T, Ma J, Wu X, Ju T, Lin X, Zhang Y, Li X, Gong Y, Hou H, Zhao L, Wu F. 2018. Inventories of heavy metal inputs and outputs to and from agricultural soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164: 118-124.
- Sievers M, Hale R, Swearer SE, Parris KM. 2018. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161: 482-488.
- Sujay YH, Sattagi NH, Patil RK. 2010. Invasive alien insects and their impact on agroecosystem. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 23: 26-34.
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292: 281-284.
- Wang M, Pendall E, Fang C, Li B, Nie M. 2018. A global perspective on agroecosystem nitrogen cycles after returning crop residues. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 266: 49-54.
- Wang S. 2020. Agrobiodiversity and ecosystem stability. In Caldwell C, Wang S (eds.): *Introduction to Agroecology*. Springer, Singapore.
- Zamora-Camacho FJ. 2020. Morphological abnormalities in a population of *Pleurodeles waltl* (Caudata: Salamandridae) from southwestern Spain. *Phyllomedusa* 19: 131-135.
- Zamora-Camacho FJ, Aragón P. 2019a. Failed predator attacks have detrimental effects on antipredatory capabilities through developmental plasticity in *Pelobates cultripes* toads. *Functional Ecology* 33: 846-854.
- Zamora-Camacho FJ, Aragón P. 2019b. Hindlimb abnormality reduces locomotor performance in *Pelobates cultripes* metamorphs but is not predicted by larva morphometrics. *Herpetozoa* 32: 125-131.
- Zamora-Camacho FJ, Reguera S, Rubiño-Hispán MV, Moreno-Rueda G. 2014. Effects of limb length, body mass, gender, gravidity, and elevation on escape speed in the lizard *Psammodromus algirus*. *Evolutionary Biology* 41: 509-517.

6. Conclusions

The main conclusions that can be drawn from this thesis are:

- Ammonium diminished survivorship at the earliest stages after hatching. Therefore, tadpoles exposed to ammonium were raised at lower densities. A greater density involved slowed down development, reduced SVL, and had a markedly more negative effect on tail length and depth, and body mass of the treated than the control group. Even when effects of density were statistically controlled for, ammonium directly accelerated development and increased SVL, tail length and depth, and body mass. These effects did not depend on provenance habitat, which does not support the hypothesis that agrosystem tadpoles would be more tolerant to ammonium.
- The effect of ammonium on swimming speed did interact with habitat: only pine grove tadpoles were negatively affected by ammonium. This finding suggests that predation pressure may shape this geographical pattern, as slower tadpoles are more likely to be preyed on. Finally, corroborating previous findings, tadpoles with larger bodies and tails were faster swimmers, whereas proportionally more massive individuals were slower, and tail depth was unrelated to swimming speed.
- Effects of chronic exposure to ammonium during the larval stage on morphology and locomotor performance were detectable after metamorphosis until adulthood. However, given the complex dynamics observed, not always were these effects consistent through post-metamorphic stages and relative to treatment and habitat. These inconsistencies could be due to processes such as compensatory growth, to delayed costs derived from it, or to sexual differences that could be present even before they can be accounted for. Exposure to ammonium during larval stages can result in diverse biological and long-term outcomes in later life stages.
- The prevalence of hindlimb abnormal morphology was unrelated to ammonium or the habitat of origin, which does not support a role of this contaminant as a trigger of morphological anomalies. Consequently, a greater tolerance of agrosystem individuals to develop morphological abnormalities as a consequence of ammonium was not found either.
- Chronic exposure to a sublethal dose of ammonium during the larval stage of *P. perezii* frogs has negative carryover effects on adult inflammatory response to PHA, which

could imply a greater susceptibility to pathogens and parasites. However, this effect was only true for males, which, in the light of the immunocompetence handicap hypothesis, could be a consequence of a sex-hormone-triggered impairment of male immune function. In disagreement with our prediction, we did not detect tolerance of the inflammatory response of agrosystem frogs to the treatment as compared with natural habitat conspecifics.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A1

Direct and indirect effects of chronic exposure to ammonium on anuran larvae survivorship, morphology, and swimming speed

Table A1.1 – Full mixed model including weekly survivors (starting from and including hatchings) in each replicate as a response variable, treatment, habitat, week and their interaction as fixed factors, and replicate as a random factor. Indicated are X^2 and degrees of freedom (d.f.). Symbols represent: ^{ns} = non-significant; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. Significant results are in bold.

Variable	d.f.	χ^2
Habitat	1, 336	0.021 ^{ns}
Treatment	1, 336	0.002 ^{ns}
Week	5, 336	55.751***
Habitat*Treatment	1, 336	0.015 ^{ns}
Habitat*Week	5, 336	3.445 ^{ns}
Treatment*Week	5, 336	21.361**
Habitat*Treatment*Week	5, 336	0.240 ^{ns}

Table A1.2 – Post-hoc Tukey tests on the interaction Week*Treatment, with survivorship as the response variable. Indicated are *t*- and *P*-values. Significant results are in bold.

Comparison	<i>t</i> -value	<i>P</i> -value
Hatching-Control vs Hatching-Ammonium	0.061	1.000
Hatching-Control vs Week 1-Ammonium	4.039	0.006
Hatching-Control vs Week 2-Ammonium	4.981	<0.001
Hatching-Control vs Week 3-Ammonium	5.072	<0.001
Hatching-Control vs Week 4-Ammonium	5.133	<0.001
Hatching-Control vs Week 5-Ammonium	5.133	<0.001
Hatching-Control vs Week 1-Control	0.766	1.000
Hatching-Control vs Week 2-Control	3.063	0.096
Hatching-Control vs Week 3-Control	3.063	0.096
Hatching-Control vs Week 4-Control	3.063	0.096
Hatching-Control vs Week 5-Control	3.063	0.096
Hatching-Ammonium vs Week 1-Ammonium	8.360	<0.001
Hatching-Ammonium vs Week 2-Ammonium	10.339	<0.001
Hatching-Ammonium vs Week 3-Ammonium	10.530	<0.001
Hatching-Ammonium vs Week 4-Ammonium	10.658	<0.001
Hatching-Ammonium vs Week 5-Ammonium	10.658	<0.001
Hatching-Ammonium vs Week 1-Control	0.304	1.000
Hatching-Ammonium vs Week 2-Control	1.397	0.961
Hatching-Ammonium vs Week 3-Control	1.397	0.961
Hatching-Ammonium vs Week 4-Control	1.397	0.961
Hatching-Ammonium vs Week 5-Control	1.397	0.961
Week 1-Control vs Week 1-Ammonium	3.675	0.020
Week 1-Control vs Week 2-Ammonium	4.616	0.000
Week 1-Control vs Week 3-Ammonium	4.708	0.001
Week 1-Control vs Week 4-Ammonium	4.768	<0.001
Week 1-Control vs Week 5-Ammonium	4.768	<0.001
Week 1-Control vs Week 2-Control	2.297	0.481
Week 1-Control vs Week 3-Control	2.297	0.481
Week 1-Control vs Week 4-Control	2.297	0.481
Week 1-Control vs Week 5-Control	2.297	0.481
Week 1-Ammonium vs Week 2-Ammonium	1.978	0.708
Week 1-Ammonium vs Week 3-Ammonium	2.170	0.573
Week 1-Ammonium vs Week 4-Ammonium	2.297	0.481
Week 1-Ammonium vs Week 5-Ammonium	2.297	0.481
Week 1-Ammonium vs Week 2-Control	-2.582	0.307
Week 1-Ammonium vs Week 3-Control	-2.582	0.307
Week 1-Ammonium vs Week 4-Control	-2.582	0.307
Week 1-Ammonium vs Week 5-Control	-2.582	0.307

Week 2-Control vs Week 2-Ammonium	3.523	0.031
Week 2-Control vs Week 3-Ammonium	3.614	0.024
Week 2-Control vs Week 4-Ammonium	3.675	0.020
Week 2-Control vs Week 5-Ammonium	3.675	0.020
Week 2-Control vs Week 3-Control	0.000	1.000
Week 2-Control vs Week 4-Control	0.000	1.000
Week 2-Control vs Week 5-Control	0.000	1.000
Week 2-Ammonium vs Week 3-Ammonium	0.191	1.000
Week 2-Ammonium vs Week 4-Ammonium	0.319	1.000
Week 2-Ammonium vs Week 5-Ammonium	0.319	1.000
Week 2-Ammonium vs Week 3-Control	-3.523	0.031
Week 2-Ammonium vs Week 4-Control	-3.523	0.031
Week 2-Ammonium vs Week 5-Control	-3.523	0.031
Week 3-Control vs Week 3-Ammonium	3.614	0.024
Week 3-Control vs Week 4-Ammonium	3.675	0.020
Week 3-Control vs Week 5-Ammonium	3.675	0.020
Week 3-Control vs Week 4-Control	0.000	1.000
Week 3-Control vs Week 5-Control	0.000	1.000
Week 3-Ammonium vs Week 4-Ammonium	0.128	1.000
Week 3-Ammonium vs Week 5-Ammonium	0.128	1.000
Week 3-Ammonium vs Week 4-Control	-3.614	0.024
Week 3-Ammonium vs Week 5-Control	-3.614	0.024
Week 4-Control vs Week 4-Ammonium	3.675	0.020
Week 4-Control vs Week 5-Ammonium	3.675	0.020
Week 4-Control vs Week 5-Control	0.000	1.000
Week 4-Ammonium vs Week 5-Ammonium	0.000	1.000
Week 4-Ammonium vs Week 5-Control	-3.675	0.020
Week 5-Control vs Week 5-Ammonium	3.675	0.020

Table A1.3 – Full mixed models including either SVL, tail length, tail depth, body mass, SMI, or swimming speed as response variables, habitat, treatment, density and their interactions as fixed factors, and replicate as a random factor. Note that in the cases of tail length and tail depth SVL was included as a covariable. Indicated are X^2 and degrees of freedom. Symbols represent: ^{ns} = non-significant; * = P < 0.05; *** = P < 0.001. Significant results are in bold.

Variable	SVL	Tail length	Tail depth	Body mass	SMI	Swimming speed
	$X^2_{1,652}$	$X^2_{1,651}$	$X^2_{1,651}$	$X^2_{1,652}$	$X^2_{1,652}$	$X^2_{1,652}$
SVL	-	883.827***	622.955***	-	-	-
Habitat	0.004 ^{ns} _s	0.216 ^{ns}	2.280 ^{ns}	0.247 ^{ns}	2.087 ^{ns}	0.170 ^{ns}
Treatment	0.380 ^{ns} _s	1.986 ^{ns}	1.517 ^{ns}	4.129*	0.694 ^{ns}	0.158 ^{ns}
Density	5.975*	0.219 ^{ns}	0.004 ^{ns}	2.003 ^{ns}	1.818 ^{ns}	0.544 ^{ns}
Habitat*Treatment	0.083 ^{ns} _s	0.007 ^{ns}	0.127 ^{ns}	0.092 ^{ns}	0.693 ^{ns}	0.174 ^{ns}
Habitat*Density	0.034 ^{ns} _s	0.412 ^{ns}	1.800 ^{ns}	0.061 ^{ns}	2.175 ^{ns}	0.514 ^{ns}
Treatment*Density	0.097 ^{ns} _s	1.483 ^{ns}	1.261 ^{ns}	2.706 ^{ns}	0.537 ^{ns}	0.186 ^{ns}

Habitat*Treatment*Density	0.116 ⁿ _s	0.008 ^{ns}	0.254 ^{ns}	0.184 ^{ns}	0.557 ^{ns}	0.515 ^{ns}
----------------------------------	---------------------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Table A1.4. - Full mixed models including swimming speed as a response variable, habitat, treatment, density and their interactions as fixed factors, replicate as a random factor, and either SVL, tail length, tail depth, body mass, or SMI as covariates. Note that, in the cases of tail length and tail depth, SVL was included as a covariable. Indicated are χ^2 and degrees of freedom. Symbols represent: ^{ns} = non-significant; *** = P < 0.001. Significant results are in bold.

	SVL	Tail length	Tail depth	Body mass	SMI
	$\chi^2_{1, 651}$	$\chi^2_{1, 650}$	$\chi^2_{1, 650}$	$\chi^2_{1, 651}$	$\chi^2_{1, 651}$
Covariable	24.955***	37.886***	1.522 ^{ns}	15.745***	63.993***
Habitat	0.185 ^{ns}	0.074 ^{ns}	0.122 ^{ns}	0.262 ^{ns}	0.128 ^{ns}
Treatment	0.267 ^{ns}	1.127 ^{ns}	0.344 ^{ns}	0.627 ^{ns}	0.001 ^{ns}
Density	0.082 ^{ns}	0.019 ^{ns}	0.081 ^{ns}	0.249 ^{ns}	0.020 ^{ns}
Habitat*Treatment	0.138 ^{ns}	0.111 ^{ns}	0.135 ^{ns}	0.174 ^{ns}	0.004 ^{ns}
Habitat*Density	0.479 ^{ns}	0.264 ^{ns}	0.386 ^{ns}	0.605 ^{ns}	0.001 ^{ns}
Treatment*Density	0.244 ^{ns}	0.949 ^{ns}	0.312 ^{ns}	0.569 ^{ns}	0.012 ^{ns}
Habitat*Treatment*Density	0.442 ^{ns}	0.448 ^{ns}	0.425 ^{ns}	0.492 ^{ns}	0.103 ^{ns}

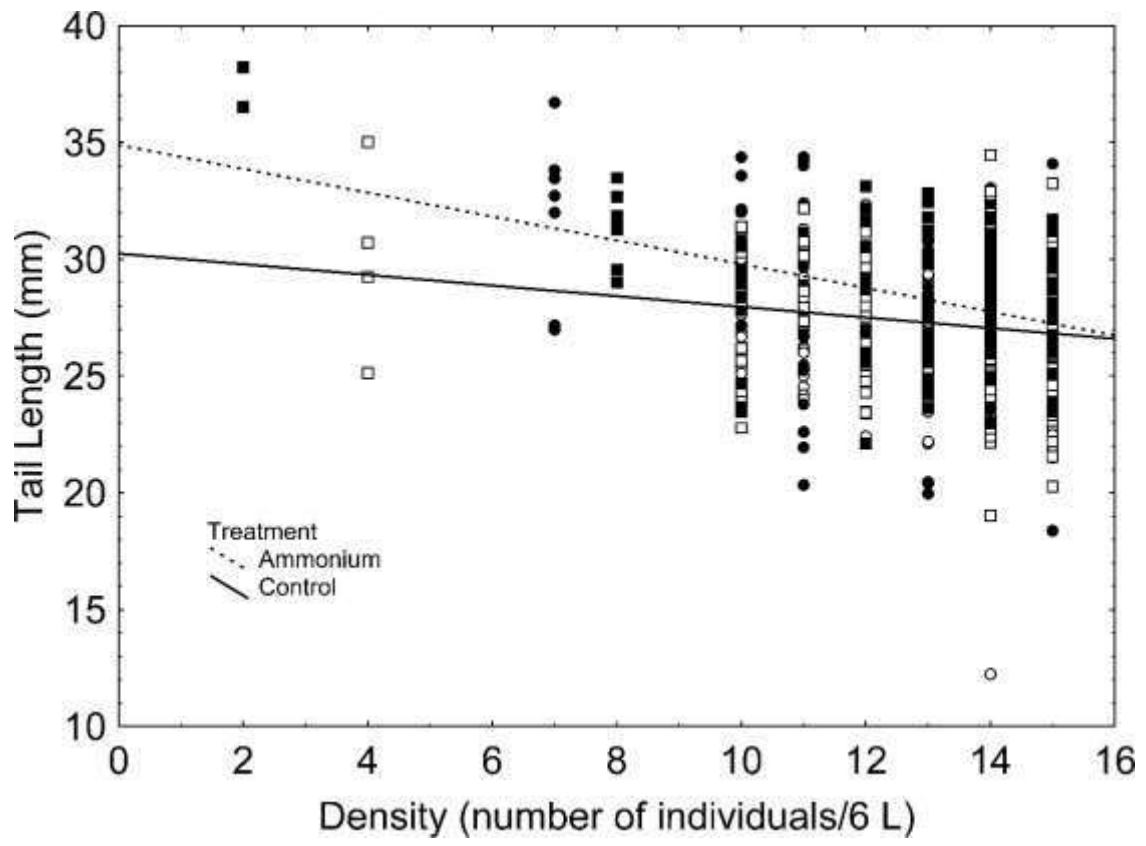


Fig. A1.1

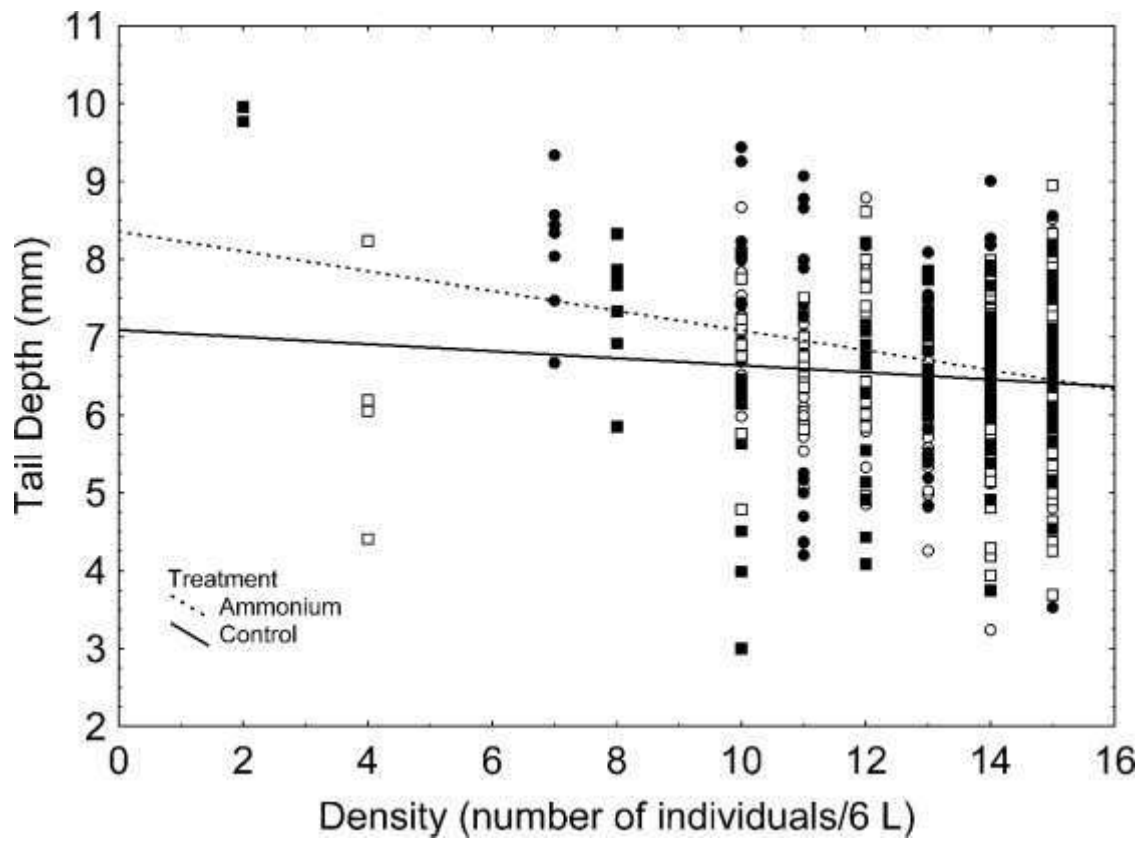


Fig. A1.2

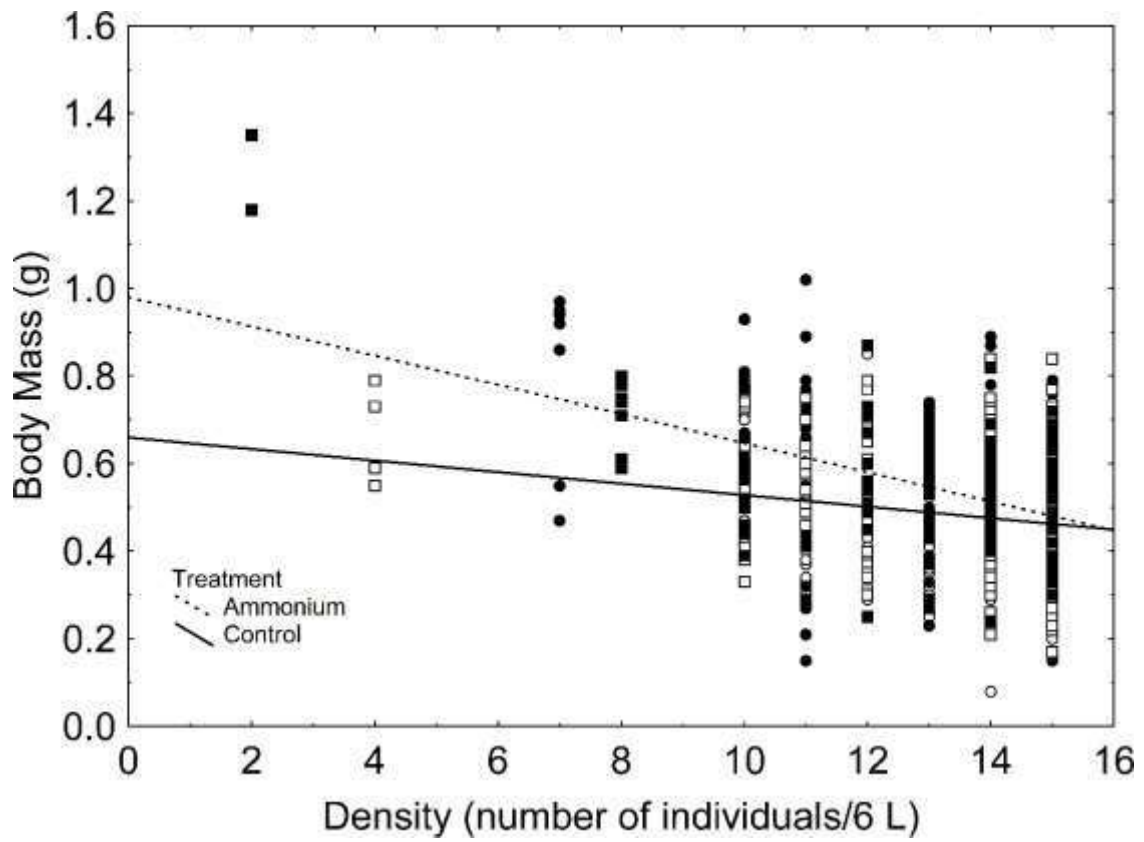


Fig. A1.3

Fig. A1 - Separate correlations between density and tail length (Fig. A.1), tail depth (Fig. A.2) and body mass (Fig. A.3) for each treatment. Empty symbols represent the control treatment, black symbols represent the ammonia treatment. Squares represent pine grove individuals, circles represent agrosystem individuals.

7.2. ANEXO A2

Does chronic exposure to ammonium during the pre-metamorphic stages promote hindlimb abnormality in anuran metamorphs? A comparison between natural-habitat and agrosystem frogs



Fig. A2.1



Fig. A2.2



Fig. A2.3

Figure A2. Photographs showing the semi-natural enclosures where adult frogs were housed for reproduction. Each enclosure was 6 × 6 m long, and 2 m high: a 1-meter- high brick wall from the ground, plus a 1-meter-high, 5-mm-size steel mesh (Fig. A2.1). The roof was covered with the same mesh. Therefore, frogs could not escape the enclosures, nor could predators enter them. However, the mesh size allowed insects in, which constitute the main food source for these frogs (Fig. A2.1). The ponds (11-m²area,50-cm depth) are large enough for reproduction, and the ground is provided with abundant cork bark as shelters that maintain humidity and temperature (Figs. A2.2 and A2.3). A general external view (Fig. A2.1) and the internal view of both enclosures used are shown (Fig. A2.2 and A2.3). Note that the whole structure contains four enclosures, but only two of them were needed.

Table A2.1. Number of abnormal-limbed metamorphs (numerator), the total number of metamorphs obtained (denominator), and proportion of abnormal-limbed metamorphs (right side of the equation) obtained from tadpoles from pine grove and agrosystem parents, reared with and without NH_4^+ .

	With NH_4^+	Without NH_4^+
Pine Grove	3/129 = 0.02326	5/179 = 0.02793
Agrosystem	2/143 = 0.01399	1/205 = 0.00488

7.3. ANEXO A3

Carryover effects of chronic exposure to ammonium during the larval stage on post-metamorphic frogs

Table A3.1-Percentage of variance explained by the random (replicate) and the fixed factors (habitat, treatment, and the habitat*treatment interaction), as well as the residual variance, in the mixed models with metamorph SVL, body mass, SMI, and jumping distance as response variables.

	Snout-Vent Length	Body Mass	Scaled Mass Index	Jumping Distance
Replicate	8.879	7.443	19.242	4.518
Habitat	25.796	18.770	25.076	0.032
Treatment	0.381	0.324	0.870	25.226
Habitat*Treatment	26.251	54.369	0.959	44.797
Residual	38.692	19.094	53.853	25.428

Table A3.2-Full models testing the effects of habitat, treatment, and their interaction on SVL, body mass, SMI and jumping distance of metamorphs (Table A3.2.1), juveniles (Table A3.2.2) and subadults (Table A3.2.3). Table A3.2.4 tests the effects of habitat, treatment, sex and the resulting interactions on the same variables. In the case of metamorphs, replicate was included as a random factor (Table A3.2.1). Degrees of freedom and X^2 -values are indicated. Symbols mean: ^{ns} = non-significant; [§] = marginally non-significant; * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** P < 0.001. Significant results are in bold.

	SVL	Body Mass	SMI	Jumping Distance
Degrees of Freedom	1, 583	1, 583	1, 583	1, 583
Habitat	1.545 ^{ns}	8.257**	38.188***	1.281 ^{ns}
Treatment	0.869 ^{ns}	0.339 ^{ns}	0.848 ^{ns}	0.049 ^{ns}
Habitat*Treatment	0.934 ^{ns}	<0.001 ^{ns}	0.848 ^{ns}	3.990*

Table A3.2.1

	SVL	Body Mass	SMI	Jumping Distance
Degrees of Freedom	1, 157	1, 157	1, 157	1, 157
Habitat	10.400**	5.306*	10.819**	2.773 [§]
Treatment	23.802***	18.743***	0.225 ^{ns}	7.735**
Habitat*Treatment	11.583***	8.402**	0.260 ^{ns}	3.463 [§]

Table A3.2.2

	SVL	Body Mass	SMI	Jumping Distance
Degrees of Freedom	1, 159	1, 159	1, 159	1, 159
Habitat	1.032 ^{ns}	0.001 ^{ns}	3.566 [§]	0.341 ^{ns}
Treatment	19.066***	27.422***	17.966***	1.903 ^{ns}
Habitat*Treatment	5.782*	4.438*	0.016 ^{ns}	6.796**

Table A3.2.3

	SVL	Body Mass	SMI	Jumping Distance
Degrees of Freedom	1, 143	1, 143	1, 143	1, 143
Habitat	0.894 ^{ns}	0.361 ^{ns}	0.069 ^{ns}	3.690 [§]
Treatment	13.675***	6.844**	1.430 ^{ns}	29.390***
Sex	40.398***	21.420***	1.721 ^{ns}	8.290**
Habitat*Treatment	0.174 ^{ns}	0.048 ^{ns}	0.851 ^{ns}	4.404*
Habitat*Sex	0.006 ^{ns}	0.024 ^{ns}	0.110 ^{ns}	2.412 ^{ns}
Treatment*Sex	0.947 ^{ns}	0.935 ^{ns}	< 0.001 ^{ns}	3.308 [§]
Habitat*Treatment*Sex	0.012 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.202 ^{ns}	1.356 ^{ns}

Table A3.2.4

Table A3.3 - Full models including jumping distance as a response variable, habitat, treatment, and their interactions as fixed factors, and either SVL, hindlimb length, body mass, or SMI as covariates, in metamorphs (Table A3.3.1), juveniles (Table A3.3.2) and subadults (Table A3.3.3). Table A3.3.4 tests similar models, but incorporating sex as a factor, as well as the resulting interactions with habitat and treatment. Note that models testing hindlimb length also included SVL as a covariate. In the case of juveniles, replicate was included as a random factor (Table A3.3.1). Degrees of freedom and χ^2 -values are indicated. Symbols mean: ^{ns} = non-significant; ^s =marginally non-significant; * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** P < 0.001. Significant results are in bold.

	SVL	Hindlimb Length	Body Mass	SMI
Degrees of freedom	1, 582	1, 581	1, 582	1, 582
Covariable β -value	1.623	1.035	23.181	2.611
Covariable χ^2	272.792***	37.886***	287.288***	0.602 ^{ns}
Habitat χ^2	0.555 ^{ns}	2.080 ^{ns}	0.057 ^{ns}	1.048 ^{ns}
Treatment χ^2	1.207 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.543 ^{ns}	0.056 ^{ns}
Habitat*Treatment χ^2	2.287 ^{ns}	3.780 ^s	4.151*	4.084*

Table A3.3.1

	SVL	Hindlimb Length	Body Mass	SMI
Degrees of freedom	1, 156	1, 155	1, 156	1, 156
Covariable β-value	0.919	0.861	2.576	2.607
Covariable X^2	138.843***	19.801***	85.169***	0.756 ^{ns}
Habitat X^2	0.026 ^{ns}	0.013 ^{ns}	0.112 ^{ns}	0.441 ^{ns}
Treatment X^2	<0.001 ^{ns}	0.020 ^{ns}	0.291 ^{ns}	0.982 ^{ns}
Habitat*Treatment X^2	0.054 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.443 ^{ns}

Table A3.3.2

	SVL	Hindlimb Length	Body Mass	SMI
Degrees of freedom	1, 158	1, 157	1, 158	1, 158
Covariable β-value	1.231	1.128	1.863	-5.640
Covariable χ^2	199.230***	18.589***	89.426***	12.204***
Habitat χ^2	2.854 [§]	3.580 [§]	0.458 ^{ns}	1.274 ^{ns}
Treatment χ^2	1.822 ^{ns}	1.793 ^{ns}	0.461 ^{ns}	6.585*
Habitat* χ^2 Treatment	1.366 ^{ns}	2.037 ^{ns}	2.722 [§]	7.410**

Table A3.3.3

	SVL	Hindlimb Length	Body Mass	SMI
Degrees of Freedom	1, 142	1, 141	1, 142	1, 142
Covariable β -value	0.780	0.741	0.839	-1.088
Covariable X^2	27.923***	15.410***	13.386***	2.282 ^{ns}
Habitat X^2	2.437 ^{ns}	1.139 ^{ns}	3.297 [§]	3.592 [§]
Treatment X^2	21.327***	15.245***	24.463***	27.605***
Sex X^2	2.036 ^{ns}	0.717 ^{ns}	3.850*	7.537**
Habitat*Treatment X^2	4.157*	3.966*	4.519*	3.858*
Habitat*Sex X^2	2.742 [§]	2.717 [§]	2.770 [§]	2.318 ^{ns}
Treatment*Sex X^2	2.726 [§]	1.837 ^{ns}	2.742 [§]	3.360 [§]
Habitat*Treatment*Sex X^2	1.477 ^{ns}	2.057 ^{ns}	1.448 ^{ns}	1.236 ^{ns}

Table A3.3.4

7.4. ANEXO A4

Long-term sex-dependent inflammatory response of adult frogs to ammonium exposure during the larval stage

Table A4.1- Full model testing the effects of habitat, treatment, sex and their interactions on swelling, controlled for body mass. χ^2 and P -values are indicated. Degrees of freedom were 1 and 141. β -value of body mass was 0.006.

Variable	χ^2 -value	P -value
Habitat	2.372	0.124
Treatment	1.877	0.171
Sex	0.005	0.946
Body Mass	0.534	0.465
Habitat*Treatment	1.128	0.288
Habitat*Sex	0.356	0.551
Treatment*Sex	1.056	0.304
Habitat*Treatment*Sex	0.594	0.441