

Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas

Manuel E. Ortiz-Santaliestra^{1,2} & Andrés Egea-Serrano³

¹ Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) CSIC-UCLM-JCCM. Ronda de Toledo, s/n. 13005 Ciudad Real. España. C.e.: manuele.ortiz@uclm.es

² CESAM & Departamento de Biología. Universidade de Aveiro. Campus Universitário de Santiago. 3810-193 Aveiro. Portugal.

³ Universidade Estadual de Santa Cruz. Laboratório Zoologia de Vertebrados. Pavilhão Max de Menezes, Campus Soane Nazaré de Andrade. Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho. CEP 45662-900 Ilhéus-Bahia (Brazil).

Fecha de aceptación: 19 de junio de 2013.

Key words: environmental pollution, ecotoxicology, fitness, bioaccumulation, biomarkers, risk assessment.

Contaminación química y conservación de la herpetofauna

La contaminación química es uno de los impactos principales que amenazan la integridad de los ecosistemas naturales. Las fuentes y tipos de contaminación son muy numerosos, incluyendo por ejemplo la aplicación de productos agroquímicos, la liberación accidental o intencionada de residuos urbanos, industriales y mineros, o la movilización de metales presentes en la litosfera, lo que hace que, aunque en muchas ocasiones el foco de acción sea local, la contaminación química en su conjunto sea un problema de ámbito global. Además, muchas sustancias químicas potencialmente tóxicas son liberadas a la atmósfera o en corrientes de agua, tanto marinas como fluviales, pudiendo ser transportadas y afectar a zonas remotas muy alejadas del foco de contaminación.

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el 31% de las especies de anfibios del planeta y el 22% de las de reptiles están amenazadas. La contaminación aparece como una amenaza para 1.119 especies de anfibios (17% del total de especies descritas) y 98 especies de reptiles (3% del total) (IUCN, 2012). La mayoría de

expertos coinciden en señalar que estos valores, especialmente el correspondiente a los reptiles, subestiman el verdadero impacto de la contaminación sobre la herpetofauna. De hecho, hay datos que reflejan una evidente falta de información al respecto. Anfibios y reptiles son las dos clases de vertebrados menos estudiadas en el campo de la ecotoxicología; mientras que ambos grupos constituyen un 20% y un 28%, respectivamente, de las especies de vertebrados conocidas, solo un 3,8% y un 0,8% de los estudios ecotoxicológicos relacionados con vertebrados se centran respectivamente en estos taxones (Sparling *et al.*, 2010). Entre los anfibios, un análisis detallado permite apreciar sesgos geográficos y taxonómicos en las especies objeto de estudio (Schiesari *et al.*, 2007); únicamente 11 de las 6.300 especies conocidas focalizan más de la mitad de los trabajos sobre ecotoxicología del grupo, y apenas un 6% de las especies amenazadas por la contaminación ha sido alguna vez objeto de algún estudio toxicológico. Entre los reptiles, la escasez de estudios es tal que el trabajo de un solo grupo de investigación ha convertido al aligátor *Alligator mississippiensis* en el reptil más estudiado en ecotoxicología, siendo los escamosos el orden que menos atención ha recibido a pesar de ser el grupo más diverso de reptiles (Campbell & Campbell, 2002).

Tanto anfibios como reptiles presentan una serie de características que les hacen particularmente vulnerables a la contaminación. La mayor parte de las especies de anfibios presenta un ciclo de vida caracterizado por una fase acuática y otra terrestre, lo que hace que puedan entrar en contacto con aquellas sustancias químicas presentes en los hábitats acuáticos o en los terrestres. Además, su piel desnuda es altamente permeable a la difusión de los agentes químicos (e.g., McDiarmid & Altig, 1999). La mayor parte de los anfibios presentan escasas capacidades para el desplazamiento, lo que compromete sus opciones de responder ante la presencia de contaminantes en sus hábitats. Los reptiles, salvo excepciones, son predominantemente carnívoros, estando expuestos a la ingesta masiva de contaminantes acumulados en sus presas, lo que puede dar lugar a procesos de biomagnificación. Además, muchas especies son muy longevas y presentan dominios vitales pequeños en comparación con vertebrados endotermos de tamaño similar, con el consiguiente potencial de sufrir exposiciones prolongadas y por tanto de acumular contaminantes en el organismo (Hopkins, 2000).

En esta revisión abordamos el estado de conocimiento actual de la ecotoxicología de anfibios y reptiles, describiendo las vías de exposición, tipos de contaminación y efectos habituales de los contaminantes sobre los anfibios y reptiles, además de los principales métodos y herramientas utilizados en estudios ecotoxicológicos. Aunque nuestro objetivo es centrar la revisión en el ámbito de la herpetofauna española, la falta de información nos obliga sistemáticamente a consultar estudios llevados a cabo en otros países. Precisamente la escasez de información se convierte en el principal reto a afrontar con el objetivo último

de conocer y paliar los efectos de la contaminación química sobre la herpetofauna.

Perspectiva histórica de la ecotoxicología de anfibios y reptiles

A mediados del siglo XX los huevos y las larvas de los anfibios se empleaban como modelos para el estudio del potencial teratogénico (i.e. alteración del desarrollo) de algunas sustancias en vertebrados (e.g., Chang *et al.*, 1954). Sin embargo, el concepto conservacionista de protección frente a la contaminación no está presente en los estudios toxicológicos hasta el nacimiento del ambientalismo en la década de 1960, con la publicación del trabajo de Rachel Carson *La Primavera Silenciosa*. En 1969 se definió el término ecotoxicología como la rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos causados por sustancias naturales o contaminantes artificiales en organismos vivos, sean animales o vegetales, terrestres o acuáticos, y sobre la interacción de estas sustancias con el medio físico (Truhaut, 1975).

La mayor parte de los estudios pioneros en ecotoxicología, llevados a cabo durante las décadas de 1970 y 1980, estaban relacionados con las especies de fauna silvestre con un reconocido valor económico. Sin embargo, en este periodo comienzan a desarrollarse algunos estudios acerca del efecto de los contaminantes sobre los anfibios en el campo (e.g., Cooke, 1977). A partir de la década de 1990, las noticias sobre el declive de las poblaciones de anfibios (Blaustein & Wake, 1990) disparan el interés por el papel que podía jugar la contaminación en el mismo, fruto del cual aparecen las primeras directrices de evaluación de contaminantes en las que se contempla el uso de anfibios (ASTM,

1996, 1998). En el caso de los reptiles, su uso en estudios toxicológicos es prácticamente inexistente hasta la década de 1990, momento en el cual empiezan a emplearse determinadas especies de quelonios y caimanes para la biomonitorización de la acumulación de contaminantes en tejidos en ambientes acuáticos (e.g., Bishop *et al.*, 1998).

Paralelamente al desarrollo de la ecotoxicología de anfibios y reptiles hacia finales del siglo XX (Figura 1), diversos autores empiezan a reclamar un mayor realismo ecológico en los estudios que sirva al objetivo de identificar y corregir los impactos de la contaminación ambiental sobre estos animales (e.g., Semlitsch & Bridges, 2005). En esta línea, los trabajos actuales tienden a alejarse de los diseños simplificados y a buscar escenarios que se aproximen a la realidad, tales como las interacciones entre diversos contaminantes, la influencia de las variables ambientales en la sensibilidad a la contaminación, o las estimas de efectos a nivel poblacional ante exposiciones de larga duración. No obstante, hay que destacar que, aunque esta tendencia se está desarrollando en el caso de los anfibios, el grado de desarrollo de la ecotoxicología de reptiles sigue siendo extremadamente precario.

En España, la tradicional falta de seguimientos a largo plazo de las poblaciones de anfibios y reptiles ha motivado que apenas se haya podido evidenciar la existencia de declives poblacionales (e.g., Martínez-Solano *et al.*, 2003; Santos & Llorente, 2009), y, en consecuencia, analizar el posible papel que ejercería la contaminación química. Así, el desarrollo de la ecotoxicología de anfibios y reptiles en España ha sido tardío en comparación con otros países. A excepción de algunos estudios puntuales aparecidos durante la década de 1980 (e.g., Montori *et al.*, 1982; Rico *et al.*, 1987), no es hasta finales del siglo XX y principios del XXI cuando se empiezan a publicar con cierta continuidad diferentes trabajos acerca de la relación entre contaminación y herpetofauna, casi siempre enfocados a la biomonitorización de contaminantes acumulados en organismos (Santos *et al.*, 1999; Díaz-Paniagua *et al.*, 2002). Mientras algunas revisiones del estado de conservación de los anfibios y reptiles españoles o ibéricos sugieren que la contaminación es una causa potencial de declives poblacionales (e.g., Márquez & Lizana, 2002), e incluso algunos trabajos que muestran la existencia de dichos declives postulan la contami-

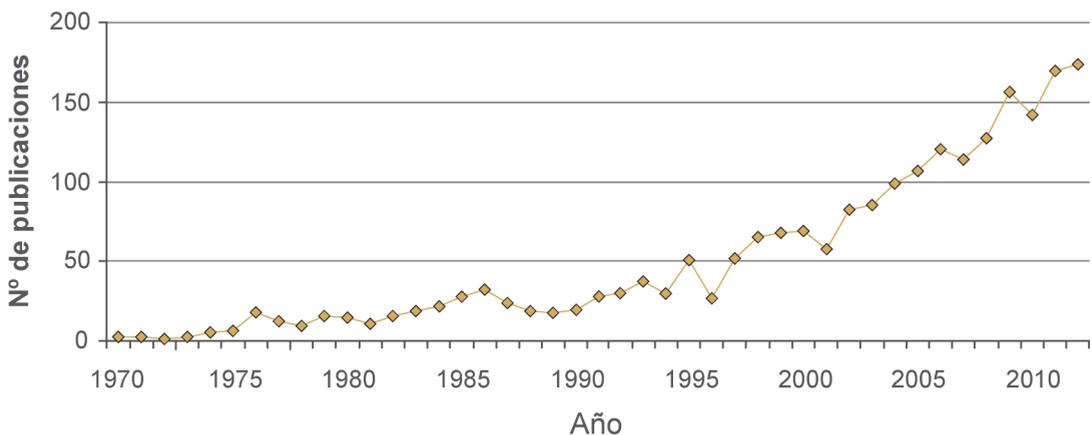


Figura 1. Evolución anual del número de publicaciones sobre ecotoxicología de anfibios y reptiles desde 1970 hasta 2012. Fuente: Web of Science.

nación química como un factor implicado en los mismos (Montori *et al.*, 2009; Santos & Llorente, 2009), existen todavía muy pocos datos experimentales (véase Anexo) o estudios de campo que sustenten estas hipótesis.

Principales tipos de contaminantes que afectan a los anfibios y reptiles

Agroquímicos: fertilizantes y fitosanitarios

La contaminación de origen agrícola es seguramente la que afecta a una mayor extensión de los hábitats ocupados por anfibios y reptiles. El uso de agroquímicos, ya sean fertilizantes químicos a base de nitrógeno, fósforo y potasio, o productos fitosanitarios diseñados para mejorar la salud de las especies cultivadas, se incrementó rápidamente después de la Segunda Guerra Mundial. Por ejemplo, el consumo de fertilizantes nitrogenados, aplicados sobre todo como compuestos de nitrato o amonio, se multiplicó por ocho durante las últimas cuatro décadas del siglo XX (FAO, 2005). Los fertilizantes promueven el crecimiento rápido de los cultivos, reduciendo las zonas sin crecimiento y por tanto limitando la posibilidad de desarrollo de otras plantas, lo que disminuye la diversidad de recursos para la fauna terrestre. Además, son productos muy solubles en agua, por lo que el nitrógeno que no es asimilado por las plantas es lavado hacia los medios acuáticos próximos (Vitousek *et al.*, 1997), donde se producen incrementos repentinos en las concentraciones de nitrato o amonio que pueden superar los umbrales de seguridad para la fauna acuática. Por ejemplo, en lagunas del suroeste de Valladolid se han detectado concentraciones de nitrógeno amoniacal superiores a los 10 mg / L (M.E. Ortiz-Santaliestra, datos no publicados), mientras

que el nivel de seguridad para la fauna acuática ante exposiciones crónicas, a pH neutro y 20°C, es de 4,15 mg / L (USEPA, 1998). La exposición de diferentes especies de anfibios ibéricos a niveles ambientales de nitrato y amonio puede inducir mortalidad embrionaria y larvaria (Ortiz *et al.*, 2004) y alteraciones de conducta en individuos adultos (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2007, 2009). En cultivos de secano es muy frecuente la práctica de añadir los fertilizantes directamente al agua de riego. La ingesta de esta agua con concentraciones de nitrato muy elevadas puede afectar a las aves típicas de ambientes agrícolas (Rodríguez-Estival *et al.*, 2010), y lo mismo podría suceder a especies de reptiles comunes en terrenos abiertos como *Psammotromus hispanicus*.

Entre los fitosanitarios, los plaguicidas son los que constituyen un mayor riesgo para la fauna, siendo herbicidas y fungicidas los más utilizados en términos generales. Aunque la toxicidad de estas sustancias sobre la fauna no es muy elevada al no tratarse de compuestos diseñados para actuar sobre organismos animales, se han descrito algunos efectos adversos sobre la herpetofauna tales como la disrupción del sistema endocrino (Hayes *et al.*, 2006; Bicho *et al.*, 2013). El estudio del impacto de los herbicidas sobre la herpetofauna se ha centrado en el medio acuático como consecuencia de su potencial de contaminación de aguas subterráneas, si bien se ha especulado mucho acerca del riesgo de contaminación de medios acuáticos superficiales, ya que la aplicación de herbicidas directamente sobre el agua no está permitida. Sin embargo, los cuerpos de agua próximos a las zonas de aplicación estarían expuestos a los productos transportados por el agua de escorrentía o que se aplican directamente sobre el agua de manera accidental (por deriva de los equipos

de fumigación) o intencionada (al fumigar, por ejemplo, desde avionetas) (Guerrero *et al.*, 2005; García-Muñoz *et al.*, 2010).

Glifosato y atrazina son los dos herbicidas cuyos efectos sobre los anfibios han recibido mayor atención, ambos ampliamente utilizados a nivel mundial pese a que el uso de atrazina está prohibido en la Unión Europea. El glifosato se comercializa en diferentes formatos en los que el ingrediente activo se combina con distintos aditivos que pueden ser más tóxicos que el ingrediente activo. Uno de estos aditivos es el surfactante POEA (tallow amina polietoxilada), cuya presencia en los formatos comerciales de glifosato se ha relacionado con la toxicidad directa sobre los anfibios (Mann & Bidwell, 1999), habiéndose descrito efectos letales de algunos formulados en fases tanto terrestres como acuáticas (Relyea, 2005a). Sin embargo, la restricción legal de aplicación de glifosato sobre el agua, unida a la escasa persistencia del producto en el agua (Degenhardt *et al.*, 2012), han sido utilizados como argumentos para defender que las concentraciones reales de exposición en el campo serían inferiores a las que se han mostrado tóxicas para los anfibios (Thompson *et al.*, 2006). Por el contrario, otros estudios estiman que estos niveles susceptibles de afectar a los anfibios podrían aparecer en el agua como consecuencia de la aplicación accidental de glifosato sobre los medios acuáticos, el lavado del herbicida del suelo o la limpieza de los tanques empleados durante la fumigación en las charcas próximas a los cultivos (Mann & Bidwell, 1999).

La atrazina no suele asociarse a la aparición de efectos letales en anfibios (e.g., Allran & Karasov, 2000), si bien se han descrito algunos efectos subletales como la depresión de la respuesta inmune y consiguiente incremento del riesgo de infecciones (Brodkin *et al.*, 2007) o su

potencial estrogénico, y en particular sus efectos sobre la determinación sexual. Hayes *et al.* (2002, 2003) comprobaron que la exposición al herbicida de larvas de los anuros *Xenopus laevis* y *Lithobates pipiens* producía malformaciones en las gónadas, originando ovarios supernumerarios y la aparición de ovocitos en los testículos, es decir, una tendencia hacia la feminización de los individuos.

Además, la aplicación de herbicidas produce una alteración severa del hábitat al eliminar la vegetación natural, lo que termina por modificar completamente las condiciones del ecosistema (Figura 2). En general, los efectos indirectos de los plaguicidas, ya sea mediante la alteración del hábitat o la reducción de alimento disponible (e.g., fitoplancton, perfiton, zooplancton, artrópodos terrestres, etc.) pueden ser más importantes a nivel ecológico que la toxicidad directa sobre los individuos (Relyea, 2005b).

Los plaguicidas que suponen un mayor riesgo de intoxicación en anfibios y reptiles son los insecticidas y los rodenticidas, compuestos diseñados para matar animales. El primer insecticida sintético utilizado ampliamente en el mundo, ya desde la década de 1940, fue el p,p'-DDT, cuyo impacto ambiental comenzó a cuestionarse tras detectarse que su exposición se asociaba a una reducción del grosor de las cáscaras de huevos de aves, y al consiguiente riesgo de mortalidad embrionaria (Hickey & Anderson, 1968). Este efecto, que posteriormente ha sido descrito también para algunos fungicidas como el tiram (Lopez-Antia *et al.*, 2013), no se ha descrito en reptiles, pero dada la similitud entre ambos grupos en las propiedades del huevo se podría sospechar de un efecto similar.

La elevada persistencia del p,p'-DDT y otros insecticidas organoclorados, considerada

inicialmente una ventaja al permitir reducir la frecuencia de los tratamientos, resultó ser a largo plazo un gran problema al constituir un tipo de contaminación crónica que todavía hoy, 40 años después de la prohibición del DDT, sigue afectando a los ecosistemas naturales. Por este motivo, el desarrollo actual de plaguicidas está dirigido a la obtención de productos menos persistentes, menos acumulativos, y que en definitiva no se incorporen a la cadena trófica. Los insecticidas organoclorados fueron reemplazados en el mercado por los anticolinesterásicos, que incluyen a las familias de los organofosforados y los carbamatos, y cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la acetilcolinesterasa, una enzima encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina, común a todos los animales con un sistema nervioso desarrollado. Son por lo tanto potentes neurotóxicos tanto para sus organismos diana (insectos) como para el resto de la fauna. En el oeste de los Estados Unidos se han registrado mortalidades masivas de anfibios atribuibles al efecto tóxico de estos insecticidas (Sparling *et al.*, 2001). Debido a su elevada toxicidad, el uso de insecticidas anticolinesterásicos se ha ido reduciendo progresivamente desde la década de 1980, y muchos de los ingredientes activos más tóxicos se encuentran actualmente restringidos. Sin embargo, alguno de estos productos, como el clorpirifos, se encuentran todavía entre los insecticidas más consumidos en Europa y en el mundo (Eurostat, 2007). En un estudio reciente, Amaral *et al.* (2012a) describieron efectos nocivos de este insecticida, administrado a través de la dieta, sobre diversas variables a nivel fisiológico y orgánico en *Podarcis bocagei* del norte de Portugal. En concreto, los individuos expuestos al insecticida mostraban niveles encefálicos de glutatión, un péptido con función antioxidante, más elevados



Figura 2. Campo tratado con herbicidas. Se aprecia la profunda modificación del hábitat que supone la aplicación de este tipo de productos (Ciudad Real).

que los animales no expuestos, además de la inhibición generalizada de la enzima carboxil-esterasa. Otro de los efectos hallados fue el incremento de la frecuencia de lesiones tisulares en el hígado, tales como vacuolación, fibrosis y degeneración de los hepatocitos, o congestiones. Por último, los efectos del insecticida a nivel neurológico se manifestaron en una alteración de la conducta de los individuos expuestos, los cuales emplearon más tiempo que los controles en capturar, manipular e ingerir una presa.

En las últimas dos décadas, los anticolinesterásicos han ido siendo sustituidos por los llamados insecticidas de nueva generación, que suelen ser de menor toxicidad aguda que sus predecesores, si bien estos nuevos productos aparecen entre los contaminantes más detectados en aguas superficiales (Gilliom, 2007), a concentraciones suficientemente elevadas como para afectar a los anfibios (Lehman & Williams, 2010). Entre los insecticidas modernos se encuentran los piretroides, compuestos sintéticos cuya estructura se asemeja a la de las piretrinas, unas sustancias que se extraen de la flor

de *Chrysanthemum cinerariifolium*. Este grupo de insecticidas está ampliamente aceptado como una alternativa razonable a sus predecesores dada su escasa toxicidad sobre organismos no diana. Sin embargo, su toxicidad sobre anfibios y reptiles parece significativamente mayor que sobre aves y mamíferos (IPCS, 1990; Abe *et al.*, 1994). La toxicidad de otro grupo de insecticidas modernos muy utilizados en la actualidad, los neonicotinoides, apenas se ha estudiado en anfibios y reptiles (e.g., Feng *et al.*, 2004). Estos compuestos bloquean el sistema nervioso mediante su unión a receptores de la acetilcolina, por lo que presentan un elevado potencial de afectar a organismos no diana, y algunos insecticidas de esta familia están actualmente en cuestión porque su liberación durante la siembra de las semillas blindadas (i.e. semillas tratadas antes de la siembra para protegerlas de las plagas durante su germinación) puede afectar a los insectos polinizadores (Henry *et al.*, 2012) y a las aves (Lopez-Antia *et al.*, 2013). De hecho, los efectos neurotóxicos de tres de estos insecticidas (i.e. imidacloprid, tiametoxan y clotianidina) sobre las abejas motivó que en abril de 2013 se prohibiera de manera temporal su uso en la Unión Europea.

El uso de rodenticidas anticoagulantes para el control de plagas de roedores supone una fuente de contaminación que ha pasado bastante desapercibida hasta hace poco. Estos productos inhiben la enzima vitamina K-reductasa, que sirve para reciclar la vitamina K envuelta en el proceso de coagulación sanguínea, por lo que los animales intoxicados sufren hemorragias internas que se van extendiendo según se consume la vitamina K almacenada en el hígado. Al tratarse de un mecanismo común a todos los vertebrados terrestres, el riesgo para especies no diana es muy elevado, y así los cebos envenenados deben colocarse en lugares

a los que sólo los organismos diana (roedores) tengan acceso (e.g., interior de tubos o madrigueras). Esta estrategia, desarrollada pensando en la protección de otros mamíferos o de las aves, no parece del todo efectiva en la reducción del riesgo para algunos reptiles. Por ejemplo, los ofidios pueden acceder con facilidad a los lugares en los que se colocan los cebos, que además les resultarán atractivos al ser frecuentados por roedores. Además, el control de las plagas del roedor *Microtus arvalis* en España se ha estado llevando a cabo mediante la distribución con sembradora de grano tratado con rodenticida (Vidal *et al.*, 2009), en lugar de ocultar los cebos, lo que expone al consumo de rodenticidas de manera generalizada a todas las especies de reptiles. Sánchez-Barbudo *et al.* (2012) analizaron la presencia de rodenticidas en únicamente dos ejemplares de reptiles, uno de *Testudo hermanni* en la que no encontraron niveles detectables, y otro de *Hemorrhois hippocrepis* de las Chafarinas en cuyo hígado se detectaron 0,54 µg / g en peso fresco de flocumafén. En el valle del Okanagan, una región vitivinícola en el oeste de Canadá, se ha desarrollado recientemente una evaluación para estimar el efecto de los rodenticidas en la serpiente *Pituophis catenifer deserticola* que concluyó que si el número anual de serpientes que consumen roedores (*Thomomys talpoides*) alimentados con cebo contaminado fuese de 30, su población se reduciría hasta el 17% de su tamaño actual en 25 años (C.A. Bishop, comunicación personal).

Contaminantes orgánicos persistentes

Los contaminantes orgánicos persistentes (POP, de *Persistent Organic Pollutants*) son una serie de compuestos con propiedades tóxicas que se caracterizan por su naturaleza orgánica, resistencia a la degradación y capa-

cidad de bioacumulación, pudiendo ser transportados por el aire, el agua y las especies migratorias hasta depositarse lejos del lugar de su liberación. Los insecticidas organoclorados entrarían dentro de esta categoría junto a otros compuestos organoclorados de origen industrial como los bifenilos policlorados (PCBs) y sus residuos (dioxinas y furanos), compuestos bromados y fluorados, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos derivados de la combustión de la materia orgánica que se originan fundamentalmente por la quema de combustibles fósiles y los incendios. La toxicidad de los POPs sobre las especies de anfibios y reptiles es muy variable, habiéndose descrito desde efectos letales a concentraciones muy bajas hasta una enorme variedad de efectos subletales como alteraciones del desarrollo embrionario, depresión de la respuesta inmune, neurotoxicidad o disrupción endocrina (e.g., Keller *et al.*, 2006; Van Schmidt *et al.*, 2012).

Los POP tienen en común su elevada capacidad de bioacumulación. Al tratarse de sustancias poco solubles en agua, tienden a almacenarse en el tejido adiposo, desde donde su eliminación se produce muy lentamente. Al permanecer retenidos en el tejido adiposo apenas producen efectos hasta que el organismo recurre a sus reservas lipídicas, sobre todo durante periodos de mayor demanda energética (e.g., ovogénesis) o de menor ingesta de alimento (e.g., hibernación, metamorfosis). Revisiones completas de la acumulación de POPs en anfibios y reptiles pueden encontrarse en Sparling (2010) y de Solla (2010), y diversos estudios han reportado niveles de estos compuestos en diferentes especies de herpetofauna en España (Rico *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1999; Díaz-Paniagua *et al.*, 2002; Gómara *et al.*, 2007; Monagas *et al.*, 2008; Orós *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2012).

Otra particularidad de algunos POPs, y sobre todo de los PAHs, es que pueden ver alterada su toxicidad como consecuencia del efecto de la radiación ultravioleta, en lo que se conoce como toxicidad fotoinducida. Por ejemplo, Fernandez & L'Haridan (1992) describieron que la concentración de benzo(a)antraceno necesaria para inducir micronucleosis en los eritrocitos de *Pleurodeles waltl* era de 187,5 $\mu\text{g} / \text{L}$. Sin embargo, al exponer las larvas a este PAH en presencia de radiación ultravioleta de tipo A (el tipo de radiación UV que alcanza la superficie terrestre), la concentración necesaria para causar el mismo efecto era de tan solo 3,12 $\mu\text{g} / \text{L}$.

Metales pesados y metaloides

La liberación de metales pesados y metaloides al ambiente es habitualmente resultado de diversas actividades humanas tales como irrigación de suelos ricos en metales, extracción y quema de combustibles fósiles, minería, siderurgia y vertidos urbanos. En el pasado, una gran variedad de plaguicidas incorporaban también metales en sus fórmulas, si bien en la actualidad apenas quedan algunos fungicidas a base de cobre. En este sentido, se ha observado que el sulfato de cobre utilizado en los olivares del sur de España causaba, tras 96 horas de exposición, retrasos en el desarrollo embrionario y larvario de *Bufo calamita*, además de alteraciones en la conducta de huida de las larvas (García-Muñoz *et al.*, 2009).

Los metales existen de manera natural en el medio, siendo algunos de ellos esenciales para el funcionamiento de los organismos, por lo que el riesgo de intoxicación viene determinado por su concentración y su disponibilidad. Por ejemplo, la solubilidad de muchos metales aumenta con la disminución del pH, por lo que su toxicidad a una concen-

tración determinada sobre las larvas de anfibios aumentará en medios acidificados al ser mayor la cantidad disponible para su asimilación cutánea (Horne & Dunson, 1995). La degradación de los metales es muy lenta, por lo que su liberación al ambiente resulta en exposiciones crónicas. Además, existe un riesgo de contaminación diferida, por ejemplo al liberarse efluentes mineros a los cursos de agua, lo que genera niveles de contaminación crecientes aguas abajo (recordemos el vertido minero de Aznalcóllar acacido en 1998), o en el caso de elementos volátiles como el mercurio, al transportarse vía atmosférica y depositarse en zonas alejadas del punto de emisión.

Los metales y metaloides están entre el grupo de sustancias más estudiadas en anfibios y reptiles, sobre todo en lo que se refiere a su acumulación en los organismos. En España, los estudios se centran sobre todo en quelonios (Torrent *et al.*, 2004; García-Fernández *et al.*, 2009; Jerez *et al.*, 2010; Martínez-López *et al.*, 2010; pero véase García-Muñoz *et al.*, 2009), si bien a raíz del citado vertido de Aznalcóllar, Márquez-Ferrando *et al.* (2009) monitorizaron los niveles de metales y metaloides en *Psammodromus algirus* nueve años después de la rotura de la balsa, encontrándose todavía niveles más elevados de arsénico, talio, cadmio, estaño, plomo y cobre en poblaciones de zonas afectadas por la riada tóxica que en poblaciones no afectadas. Sin embargo, mientras que el estudio de la acumulación de metales en anfibios y reptiles es relativamente fácil, la caracterización precisa de sus efectos no es tan sencilla ya que los ensayos de toxicidad tienden a utilizar escenarios de exposición poco realistas (Hopkins & Rowe, 2010). Por ejemplo, el uso de exposiciones crónicas (de larga duración) es mucho menos frecuente que el de exposiciones agudas (de corta dura-

ción), pese a que es seguramente más realista al tratarse de sustancias que tardan mucho tiempo en degradarse. En estudios en medio acuático se tienden a administrar los metales disueltos en el agua, pese a que, salvo en medios muy acidificados, los metales en el agua suelen aparecer adsorbidos al sedimento o incorporados a la materia orgánica, siendo por tanto la dieta la principal vía de exposición para las fases acuáticas de los anfibios (Unrine *et al.*, 2005).

Algunos metales aparecen en forma de diferentes especies químicas dependiendo de las condiciones, en lo que se conoce como especiación, y su toxicidad varía dependiendo de las especies. Por ejemplo, las formas más abundantes de arsénico en el medio, y también las más tóxicas, son las inorgánicas, mientras que algunas formas orgánicas (e.g., ácido monometilarsínico, ácido dimetilarsénico) presentan menor toxicidad aguda pero son cancerígenas (Walvekar *et al.*, 2007). Las larvas de *Pelophylax perezii* expuestas crónicamente a arsénico inorgánico acumulan el elemento durante sus primeros estadios; sin embargo, a partir de la formación del hígado, sobre el estadio de Gosner 30 (Gosner, 1960), empiezan a eliminarlo del organismo, coincidiendo con un proceso de metilación del elemento, que sucedería en el hígado y concluiría con la formación de tetrametilarsonio, el cual es eliminado fácilmente (Bryszewska *et al.*, 2011). No obstante, las formas cancerígenas mono- y di-metiladas aparecen como productos intermedios durante este proceso.

El mercurio es otro elemento en el que la especiación juega un papel muy relevante. La forma elemental es muy volátil y poco tóxica, pero en sedimentos en medios acuáticos las bacterias pueden incorporarla a la materia orgánica para formar metilmercurio, mucho más

tóxico y con un elevado potencial de bioacumulación. En este sentido, el metilmercurio acumulado durante la vida larvaria en el anuro *Silurana tropicalis* puede terminar por inhibir la metamorfosis (Davidson *et al.*, 2011).

Contaminantes emergentes

El número de agentes químicos que durante las últimas dos décadas se han añadido a la lista de contaminantes es muy elevado, tratándose mayoritariamente de hormonas de uso humano y ganadero, fármacos, biocidas (sustancias destinadas a neutralizar a cualquier organismo vivo que ejerza un efecto nocivo para el hombre, excluidos los plaguicidas de uso agrícola), cosméticos y otros compuestos orgánicos presentes en residuos industriales, urbanos y agrícolas. También en los últimos años se ha focalizado mucho el interés en el estudio del potencial tóxico de los nanomateriales, sustancias cuyo pequeño tamaño molecular las hace muy fácilmente asimilables por los organismos y les confiere una gran reactividad. El grado de conocimiento sobre el potencial tóxico que estos contaminantes emergentes pueden tener sobre la herpetofauna es todavía incipiente, y apenas se cuenta con información acerca de los efectos de unos pocos compuestos sobre algunas especies de anfibios. En el caso de fármacos o biocidas, Smith & Burgett (2005) no encontraron efectos negativos sobre el crecimiento y otras respuestas biológicas de larvas del anuro *Anaxyrus americanus* expuestas al antipirético acetaminofén, al agente microbiocida triclosán, y a la cafeína. En uno de los pocos trabajos con nanomateriales, Salvaterra *et al.* (2013) describen que los efectos del silicato de titanio sobre larvas de *P. perezii* tras una exposición de 96 h se observaban a nivel bioquímico, pero no en términos de mortalidad.

Dentro de los contaminantes emergentes se incluyen también algunos POP, sobre todo los compuestos organobromados y organofluorados. Los primeros se utilizan sobre todo como retardantes de llama y son añadidos a todo tipo de materiales siendo los éteres difenilos polibromados (PBDEs) los más utilizados. Los PBDEs tienen entre uno y 10 átomos de bromo en la molécula, siendo por lo general mayor su toxicidad cuanto menor es dicho número. De hecho, el uso de PBDEs con menos de seis átomos de bromo está prohibido en la Unión Europea desde el año 2000. Sin embargo, el deca-BDE (la molécula con menor toxicidad y la más sintetizada en la actualidad), tras ser ingerido por algunos animales acuáticos, puede sufrir un proceso de debrominación en el intestino para transformarse en moléculas más tóxicas (Stapleton *et al.*, 2006). Este efecto se ha detectado también en el interior de los huevos del galápagu *Trachemys scripta* (Eisenreich & Rowe, 2013). Las moléculas con menor número de átomos de bromo son también más fácilmente asimilables, como demostraron Eisenreich & Rowe (2013) al aplicar diversos PBDEs sobre las cáscaras de huevo de los quelonios *T. scripta* y *Chelydra serpentina*. La exposición oral de larvas de anfibios a PBDEs afecta a la metamorfosis al inhibir la acción de las hormonas tiroideas (Schriks *et al.*, 2006); además, dicha exposición durante la fase larvaria termina afectando a la morfología de las gónadas y a la funcionalidad del sistema reproductor (Van Schmidt *et al.*, 2012), así como a la respuesta inmune de los individuos juveniles (T.L. Cary *et al.*, datos no publicados).

Los compuestos organofluorados, en particular el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), se han utilizado ampliamente en la industria textil, como ingrediente del teflón y

como componente de las espumas de los extintores, aunque muchos de estos usos están actualmente restringidos. Ankley *et al.* (2004) demostraron que la bioacumulación de PFOS en larvas de *L. pipiens* se asociaba a un impacto negativo sobre el crecimiento y la metamorfosis. En reptiles, la acumulación de PFOS se ha estudiado sobre todo en tortugas marinas (e.g., Keller *et al.*, 2012), siendo los niveles generalmente inferiores a los encontrados en aves y mamíferos (De Witt *et al.*, 2012), si bien también se ha sugerido una alteración de la respuesta inmune en el saurio *Sceloporus occidentalis* (Peden-Adams *et al.*, 2009).

Exposición de la herpetofauna a la contaminación química

Exposición dérmica o tópica

El acceso de los compuestos químicos al interior del organismo a través de la piel es especialmente importante para las larvas y adultos de anfibios en fase acuática. Durante estos estadios, el tegumento es muy permeable debido a que, entre otros aspectos, es un órgano fundamental en el intercambio gaseoso (McDiarmid & Altig, 1999). Las larvas presentan además branquias que, en determinadas fases del desarrollo, están en contacto directo con el medio externo (McDiarmid & Altig, 1999). En el caso de los embriones, la protección conferida por la envuelta gelatinosa podría impedir a los compuestos químicos acceder al organismo. Sin embargo, los resultados publicados evidencian que, aunque esto es así en algunos casos (e.g., Edginton *et al.*, 2007), compuestos como el ácido sulfúrico o disolventes como el metanol o el dimetil sulfóxido pueden interaccionar con los componentes de la envoltura gelatinosa viéndose

incrementada su toxicidad (Räsänen *et al.*, 2003; Marquis *et al.*, 2006).

La exposición dérmica en anfibios también es importante durante las fases terrestres. Así, se ha descrito que la migración de individuos adultos de los anuros *Rana temporaria* o *Rana arvalis* por terrenos recientemente fertilizados con diferentes sustancias puede afectar a las tasas ventilatorias e incrementar su tasa de mortalidad (Oldham *et al.*, 1997; Schneeweiss & Schneeweiss, 1997). Del mismo modo, durante el periodo de hibernación en que los adultos se entierran en el suelo la entrada de contaminantes desde esas fases sólidas puede ser importante (Shoemaker *et al.*, 1992).

La piel de los reptiles es bastante impermeable, por lo que la exposición dérmica a los contaminantes es en principio menos importante que en el caso de los anfibios. Sin embargo, este tipo de exposición puede ser muy relevante cuando, por ejemplo, los reptiles se desplazan por suelos recién fumigados con un plaguicida o incluso cuando el producto es fumigado directamente sobre ellos. En este sentido, Amaral *et al.* (2012b) apenas encontraron efectos de la fumigación con una serie de herbicidas más el insecticida clorpirifos sobre diversos parámetros biométricos, metabólicos e histológicos en *P. bocagei*, si bien otros estudios sí describen efectos nocivos de la fumigación de plaguicidas sobre reptiles (e.g., Lambert, 1993).

Del mismo modo que la exposición dérmica, la exposición *in ovo* (i.e. exposición del huevo) en reptiles es probablemente menos importante que en anfibios, si bien conviene recordar que las membranas del huevo son permeables a la difusión de humedad y oxígeno desde el aire y suelo, y que por tanto existe un riesgo de entrada de contaminantes en formas volátiles o solubles hacia el interior, y

de posterior asimilación por el embrión. Marco *et al.* (2004a) observaron que los embriones de la lagartija *Iberolacerta cyreni* expuestos *in ovo* a arsénico aplicado sobre el sustrato de incubación acumulaban cantidades significativas de este elemento. Sin embargo, la mayor parte del arsénico asimilado quedaba en la cáscara del huevo, siendo significativamente inferior la cantidad del elemento que llegaba al embrión. Utilizando un diseño similar, Marco *et al.* (2004b) describieron un efecto negativo de la exposición de huevos de los saurios *Podarcis carbonelli* y *Podarcis hispanica* a nitrato amónico sobre el tamaño y el peso de los recién nacidos.

Exposición oral

Cuando una sustancia es ingerida, su potencial para causar un efecto tóxico va a depender en gran medida de la proporción que será finalmente absorbida y pasará al torrente sanguíneo. Para muchos contaminantes, la mayoría de lo que es ingerido nunca se absorbe; por ejemplo, Mann *et al.* (2006), tras alimentar a *P. carbonelli* durante 21 días con grillos tratados con cadmio, observaron un porcentaje de absorción gastrointestinal entre el 4,2 y el 6,7% del total ingerido. La absorción no sólo depende del contaminante en sí, sino también de la presencia de otras sustancias que pueden facilitarla o reducirla. Por ejemplo, la absorción gastrointestinal de nitrito, molécula que se genera mayoritariamente en el propio tracto digestivo por reducción del nitrato, decrece en presencia de cloruros al existir una competencia por las vías de absorción. Así, Huey & Beitinger (1980) no encontraron efectos letales en larvas del urodelo *Ambystoma texanum* expuestas en presencia de cloruros a una concentración de nitrito que, en ausencia de cloruros, causaba la muerte del 90% de los individuos expuestos.

La exposición oral está muy influenciada por la acumulación de contaminantes en el alimento consumido. Por ejemplo, el consumo de perifiton, organismos asociados y material muerto y abiótico que está sobre las superficies sumergidas expuestas a la contaminación por mercurio incrementa la tasa de mortalidad y de malformación en larvas del anuro *Lithobates sphenoccephalus*, afectando asimismo al crecimiento y desarrollo (Unrine *et al.*, 2004). En este sentido, una de las principales consecuencias derivadas de esta exposición por consumo de alimento contaminado es la posibilidad de biomagnificación de sustancias tóxicas, de la que trataremos a continuación.

Bioacumulación y biomagnificación

La bioacumulación es el incremento de la concentración de una sustancia en el organismo a lo largo de su vida como consecuencia de que la tasa de asimilación de dicha sustancia supera a la tasa de eliminación. En la práctica, la bioacumulación se produce cuando la exposición a una sustancia es de tipo crónico y la biotransformación y posterior eliminación de dicha sustancia es muy lenta. Esto sucede, por ejemplo, en zonas donde existe una contaminación persistente por metales o POP de manera que el individuo está continuamente expuesto a sustancias que, además, quedan retenidas en los tejidos y se movilizan o metabolizan muy lentamente. Anfibios y reptiles son buenos candidatos a bioacumular sustancias porque i) habitan en áreas de campeo restringidas que hacen difícil evitar la contaminación cuando existe, ii) muestran una relación superficie / volumen muy alta, por lo que la asimilación dérmica de contaminantes es muy elevada, y iii) presentan tasas metabólicas altas durante sus periodos de actividad, lo que unido a los

largos periodos de anorexia (hibernación, estivación, metamorfosis, muda, etc.), les obliga a comer mucho en poco tiempo y a almacenar lo que ingieren en forma de reservas lipídicas.

Cuando un organismo acumula una sustancia, ésta puede pasar a su depredador, donde puede quedar a su vez almacenada en los diferentes tejidos. Si la depredación sobre organismos contaminados se mantiene en el tiempo, el depredador acaba almacenando niveles de contaminantes muy superiores a los de sus presas, en lo que se conoce como biomagnificación. Al ocupar anfibios y reptiles posiciones intermedias en los procesos de transferencia de energía dentro de los ecosistemas (Murphy *et al.*, 2000; Hopkins *et al.*, 2005), pueden actuar como fuente para la biomagnificación de contaminantes en sus depredadores al mismo tiempo que biomagnifican aquellas sustancias acumuladas en sus presas.

En su papel como presas, anfibios y reptiles pueden constituir una parte importante de la biomasa en determinados ecosistemas. Por ejemplo, numerosas especies de anuros son muy prolíficas, desovando una gran cantidad de huevos que, cuando eclosionan, hacen que aparezcan gran cantidad de larvas (Murphy *et al.*, 2000) que constituyen un recurso trófico fundamental para muchas especies de peces, invertebrados acuáticos y ofidios. En cuanto a los reptiles, en un estudio en el que se analizaba la acumulación de compuestos organoclorados en carnívoros españoles, Mateo *et al.* (2012) describieron una correlación entre los niveles de PCBs y DDT acumulados en hígado y grasa y el porcentaje de biomasa que los reptiles constituían para cada especie de carnívoro, pese a que en todos los casos los reptiles aparecían

como presa accesoria. Esto podría sugerir que algunos reptiles acumularían grandes cantidades de estos organoclorados constituyendo una fuente principal de exposición para sus depredadores, como se ha observado para algunas especies de ofidios en los Estados Unidos (Clark *et al.*, 2000). Tomando como referencia los datos de acumulación de organoclorados en poblaciones ibéricas de *Natrix maura* (Santos *et al.*, 1999) y de micromamíferos (Mathias *et al.*, 2007), el cambio desde una dieta compuesta en un 100% de micromamíferos a una dieta compuesta en un 5% por culebras y en un 95% de conejo supondría duplicar las concentraciones de p,p'-DDE (un metabolito del p,p'-DDT) acumuladas por el depredador.

Como depredadores, sobre todo algunos lagartos y serpientes aparecen en los estratos intermedios o superiores de las cadenas tróficas de los ecosistemas terrestres, si bien los estudios sobre biomagnificación son más frecuentes en ecosistemas acuáticos, más claramente delimitados. Chumchal *et al.* (2011) analizaron la biomagnificación de mercurio en un lago continental en Texas, incluyendo entre otras especies un anfibio, *Lithobates catesbeianus*, y tres reptiles, el aligátor *A. mississippiensis*, el quelonio *T. scripta* y el ofidio *Agkistrodon piscivorus*. De los cuatro herpetos, el nivel trófico más alto le correspondió a *A. piscivorus*, que fue la especie que mostró los niveles más altos de mercurio entre los 20 taxones analizados, mientras que el nivel trófico más bajo correspondió a *T. scripta*. Los niveles de metilmercurio en músculo e hígado de *A. piscivorus* fueron, respectivamente, 19,8 y 14 veces superiores a los de *T. scripta*, y 5,6 y 4,3 veces superiores a los de *L. catesbeianus*, especie sobre la que supuestamente depreda la serpiente (Figura 3).

Transferencia materna

Los compuestos bioacumulables pueden concentrarse en folículos y huevos antes del desove, existiendo, por lo tanto, el potencial para ser transferidos a la descendencia (e.g., Hopkins *et al.*, 2006), lo cual puede afectar significativamente a la supervivencia, crecimiento, y desarrollo de la descendencia durante sus primeros estadios (Hopkins *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2013). La probabilidad de que una sustancia sea transferida a la descendencia depende de su naturaleza química, siendo las hidrosolubles transferidas más deprisa que las liposolubles, si bien para algunas ranas se ha sugerido que podría existir una retención selectiva por parte de la madre de las sustancias más tóxicas como dioxinas o furanos (Kadokami *et al.*, 2004).

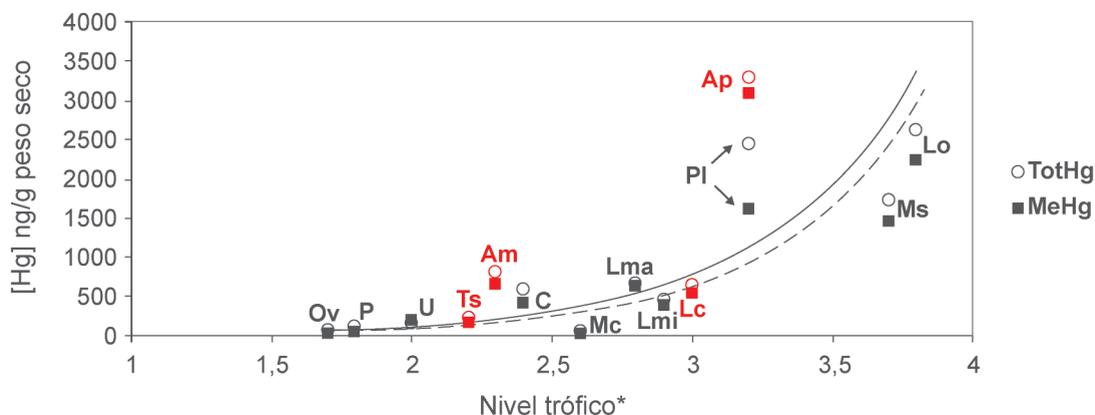
La transferencia materna de contaminantes se ha estudiado con mayor frecuencia en reptiles que en anfibios. En el caso del mercurio, de conocido efecto neurotóxico, se han observado alteraciones de la conducta locomotora o antipredatoria en neonatos del ofidio *Nerodia sipedon*

cuya única exposición al contaminante provenía de la transferencia materna (Chin *et al.*, 2013). Estos efectos no suelen observarse en las hembras, en las que el contaminante se encuentra almacenado y apenas interviene en las diferentes funciones del organismo; sin embargo, las reservas que la hembra transfiere al embrión, y los contaminantes contenidos en ellas, son utilizadas para el desarrollo embrionario con el consiguiente riesgo de intoxicación.

Caracterización de los efectos de la contaminación sobre la herpetofauna

Relaciones dosis-respuesta y efectos letales

La toxicidad de una sustancia depende fundamentalmente de la cantidad que se incorpora al organismo, la cual se cuantifica en términos de dosis (i.e. cantidad de sustancia por unidad de masa) y depende a su vez de la concentración de la sustancia en el medio de administración y del tiempo de exposición.



*Estimado a partir del análisis de las firmas de isótopos estables de nitrógeno

Figura 3. Relación entre el nivel trófico y la acumulación de mercurio total (TotHg) y metilmercurio (MeHg) en músculo de los diferentes organismos componentes del ecosistema en el lago Caddo (Texas). Los marcadores señalados en rojo corresponden a las cuatro especies de herpetos estudiadas: Am: *A. mississippiensis*; Ap: *A. piscivorus*; Lc: *L. catesbeianus*; Ts: *T. scripta*. Los marcadores en negro corresponden al resto de especies: Invertebrados: C: Cambaridae; P: Planorbidae; U: Unionidae. Peces: Lma: *Lepomis macrochirus*; Lmi: *Lepomis microlophus*; Lo: *Lepisosteus oculatus*; Ms: *Micropterus salmoides*. Mamíferos: Mc: *Myocastor coypus*; Ov: *Odocoileus virginianus*; Pl: *Procyon lotor*. Adaptado de Chumchall *et al.* (2011).

Así, el principal concepto considerado en estudios ecotoxicológicos es la relación dosis-respuesta (Calabrese & Baldwin, 2003), habiéndose utilizado tradicionalmente modelos lineales, en los que la variación en ambos parámetros está relacionada, y modelos de umbral, en los que el efecto aparece a partir de una dosis determinada (Calabrese & Baldwin, 2003), para describir la respuesta de los anfibios y reptiles a la contaminación (e.g., Ortiz *et al.*, 2004). No obstante, los organismos afectados pueden desarrollar respuestas compensatorias ante niveles bajos de contaminación, apareciendo relaciones dosis-respuesta con forma de U asociadas a procesos de hormesis (Calabrese & Baldwin, 2002, 2003).

A nivel orgánico, el efecto más severo que puede ejercer un tóxico es la muerte del individuo. Al tratarse de una respuesta fácilmente mensurable, numerosos estudios utilizan los efectos letales para comparar diferentes sustancias (e.g., véanse revisiones Marco & Ortiz-Santaliestra, 2009; Egea-Serrano *et al.*, 2012) o entre diferentes taxones (e.g., Kerby *et al.*, 2010), utilizando parámetros estandarizados como la concentración letal media (LC50), definida como la concentración que mataría al 50% de la población en un tiempo de exposición concreto, y la dosis letal media (LD50), que es la cantidad de tóxico por unidad de masa que hay que administrar para causar la muerte a la mitad de los individuos expuestos. Sin embargo, la determinación de estos parámetros suele hacerse mediante ensayos de corta duración, empleándose concentraciones muy elevadas, habitualmente superiores a las registradas en el medio natural (e.g., Egea-Serrano *et al.*, 2009a).

Efectos subletales

Lo más habitual es que los niveles ambientales de contaminación no se asocien a una mortalidad directa de los individuos, sino que

ejercen su impacto mediante diferentes efectos subletales. Del mismo modo que los efectos letales, los subletales pueden evaluarse mediante la concentración media de efecto (EC50), la concentración mínima capaz de producir efectos (LOAEC) y la concentración máxima que no produce efectos (NOAEC).

En general, cuando un contaminante es incorporado al organismo, éste debe invertir parte de su energía en metabolizar el contaminante para eliminarlo o acumularlo. Por ejemplo, la tasa metabólica del ofidio *Nerodia fasciata* que habitaba zonas afectadas por los residuos de una central térmica de carbón era un 32% superior a la de los individuos de zonas libres de contaminación (Hopkins *et al.*, 1999). Esa energía extra se gasta a expensas de comprometer otras funciones biológicas, especialmente aquéllas que requieran mayores cantidades de energía.

El comportamiento se ha señalado como uno de los parámetros subletales más sensible a la contaminación, habiéndose reconocido su importancia en estudios ecotoxicológicos con anfibios y reptiles (Hatch & Blaustein, 2000; Amaral *et al.*, 2012a,b). Muchas sustancias químicas pueden afectar a la transmisión del impulso nervioso o condicionar una mayor necesidad de oxígeno atmosférico en individuos en fase acuática (e.g., Huey & Beitinger, 1980; Marco & Blaustein, 1999; Widder & Bidwell, 2008), lo que hará que se modifiquen aspectos como la actividad, capacidad de desplazamiento, uso del hábitat, respuesta a depredadores e incluso el cortejo (e.g., Marco & Blaustein, 1999; Shinn *et al.*, 2008; García-Muñoz *et al.*, 2009, 2011; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2009, 2010a; Egea-Serrano *et al.*, 2011). Esto puede a su vez comprometer la capacidad de los individuos afectados para encontrar alimento, y en consecuencia afectar a su crecimiento (Egea-Serrano *et al.*, 2009b, 2011).

Los efectos de la contaminación sobre el crecimiento y desarrollo se han estudiado más en profundidad en anfibios que en reptiles. Aunque algunos estudios indican que el desarrollo de las fases acuáticas de los anfibios no está afectado por determinados tipos de contaminación química (véase revisión en Egea-Serrano *et al.*, 2012), muchos trabajos ponen de manifiesto que la exposición a la contaminación puede acelerar o retrasar tanto la eclosión como la metamorfosis (Hayes *et al.*, 2006; Griffis-Kyle, 2007; Distel & Boone, 2009; Sparling & Fellers, 2009; pero véase Mackey & Boone, 2009). La aceleración del desarrollo puede implicar un menor tamaño en la metamorfosis, comprometiendo la supervivencia y condición física de los individuos afectados (Altwegg & Reyer, 2003), mientras que su retraso puede hacer que los organismos estén más tiempo expuestos a fenómenos de competencia y depredación. Además, dicho retraso incrementa el riesgo de no completar el desarrollo acuático antes de la desecación de los cuerpos de agua, algo que podría agravarse si se tienen en cuenta las previsiones del calentamiento global para los próximos años (IPCC, 2001).

El desarrollo puede también verse afectado por algunas sustancias con potencial para afectar al sistema endocrino; en particular aquellas que alteran la función del tiroides pueden inhibir la metamorfosis por completo (Ortiz-Santaliestra & Sparling, 2007), al tratarse ésta de un proceso regulado fundamentalmente por las hormonas tiroideas (Shi, 2000).

Además de su impacto sobre el desarrollo mediante la alteración de la función tiroidea, el efecto más importante de la contaminación a nivel endocrino tiene que ver con las hormonas esteroideas, con el consiguiente efecto sobre la reproducción de los individuos (Hayes *et al.*, 2010). Se ha descrito que diferentes plaguicidas

(e.g., atrazina), compuestos nitrogenados (e.g., nitrato), POP (e.g., PBDEs) o productos farmacéuticos (e.g., etinilestradiol) pueden actuar como disruptores estrogénicos o antiandrogénicos para anfibios y reptiles (e.g., Orton *et al.*, 2006; Van Schmidt *et al.*, 2012; Bicho *et al.*, 2013). Por ejemplo, el declive de una población de *A. mississippiensis* en un lago de Florida se atribuyó a fallos en la reproducción como consecuencia de una reducción de los niveles de testosterona y de malformaciones en las gónadas (Guillete *et al.*, 1994). Por lo que respecta a los anfibios, aparte de los ya mencionados efectos de feminización de la atrazina (Hayes *et al.*, 2002, 2003) o la alteración morfológica en las gónadas de ranas expuestas a PBDEs (Van Schmidt *et al.*, 2012), la exposición a compuestos estrogénicos afecta en general a la expresión de vitelogenina y de la enzima aromataasa (Rohr & McCoy, 2010), reduciendo la fertilidad, el número de espermatozoides en los testículos, el volumen testicular y el número de células germinales, y produciendo sesgos de la razón de sexos, oogénesis testicular, hermafroditismo e incluso castración química (Hayes *et al.*, 2002, 2003, 2006, 2010; Orton *et al.*, 2006).

La aparición de malformaciones, especialmente en anfibios, también se ha relacionado con la exposición a compuestos nitrogenados, residuos urbanos o industriales, metales pesados o plaguicidas, sobre todo durante las fases iniciales del desarrollo (e.g., Egea-Serrano *et al.*, 2012). De hecho, el ensayo FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus*) (ASTM, 1998), consistente en la exposición a una sustancia de embriones de *X. laevis* durante 96 h, es un método estandarizado utilizado ampliamente para analizar el potencial teratogénico de los compuestos químicos. Muchos contaminantes pueden alterar las enzimas implicadas en el desarrollo o causar daño en el material

genético (Dunson & Connell, 1982; Ralph & Petras, 1997), originando la aparición de branquias y bocas deformadas, edemas, curvaturas anómalas de la notocorda o deformaciones gonadales (e.g., Rowe *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004), con consecuencias evidentes sobre la actividad, locomoción y supervivencia de los individuos. En reptiles, por el contrario, este aspecto ha sido muy poco estudiado, si bien no parece tener el mismo grado de impacto que en anfibios. Una sustancia como el mercurio con un conocido efecto teratogénico en vertebrados (e.g., Scheuhammer *et al.*, 2007) apenas produjo malformaciones embrionarias sobre las especies de reptiles estudiadas a este respecto (e.g., *C. serpentina* [Hopkins *et al.*, 2013]).

Por último, la exposición a diversos contaminantes también puede provocar efectos genotóxicos. Por ejemplo, Poletta *et al.* (2011), trabajando con *Caiman latirostris* de Argentina

expuestos *in ovo* a glifosato o a una mezcla de glifosato con los insecticidas endosulfan y cipermetrina, observaron un incremento de los daños en el material genético. Dichos daños se caracterizaron utilizando el test del cometa, capaz de detectar rupturas en las cadenas de ADN, y la frecuencia de aparición de micronúcleos (estructuras derivadas de la condensación de fragmentos de cromosomas), que pueden interpretarse como indicadores de la presencia de aberraciones cromosómicas.

Efectos indirectos

Además de los efectos que pueden tener lugar por el contacto directo de los individuos con los contaminantes, algunas sustancias ejercen un efecto indirecto a través de su impacto en la cadena trófica (Figura 4). La presencia de fertilizantes o insecticidas en ecosistemas acuáticos puede incrementar la biomasa de fitoplancton y perifiton al incre-

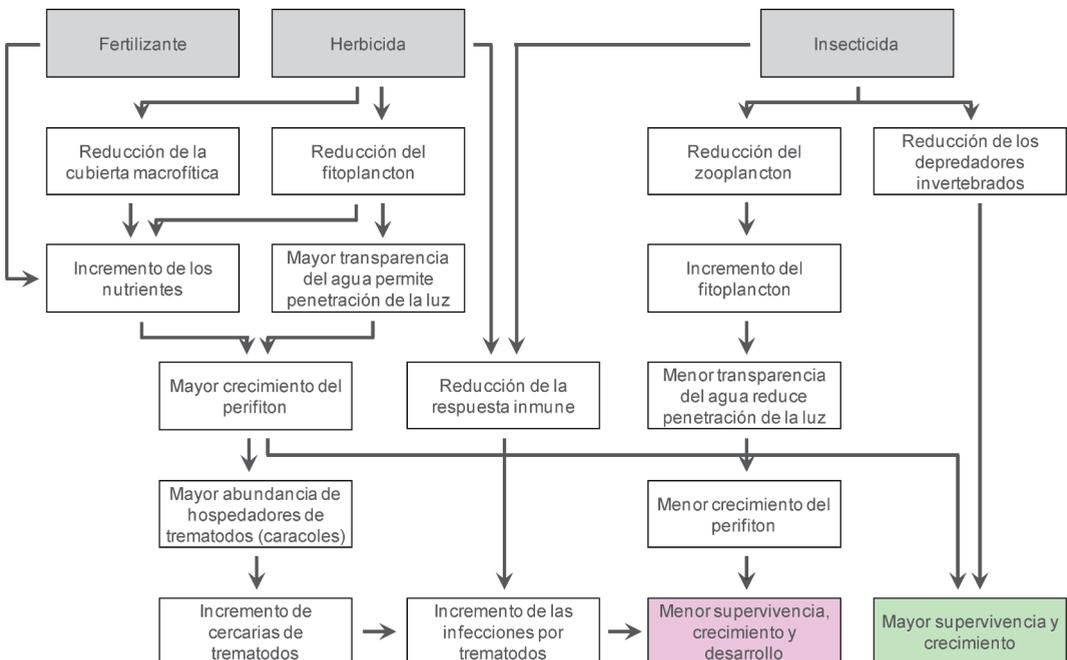


Figura 4. Esquema de los posibles efectos indirectos asociados al uso de agroquímicos sobre las larvas de los anfibios (adaptado de Mann *et al.*, 2009).

mentarse los nutrientes y eliminarse el zooplancton (e.g., Relyea, 2009), lo que supone un incremento de recursos para las larvas de anuros y una disminución para las de urodelos (Boone *et al.*, 2007). Además, algunas de las especies de algas cuyo crecimiento se vea favorecido pueden producir toxinas (Camargo & Alonso, 2006) que afecten negativamente al crecimiento y desarrollo de los anfibios (e.g., Oberemm *et al.*, 1999). Por otra parte, la sensibilidad de insectos o peces depredadores a un determinado compuesto puede ser diferente a la de los anfibios (e.g., Kerby *et al.*, 2010), lo que modificará la relación depredador-presa en uno u otro sentido dependiendo de cuál sea el taxón más sensible.

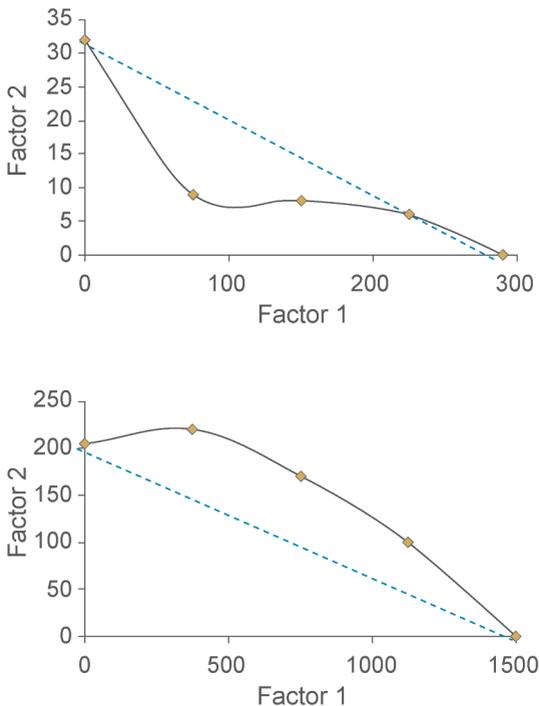


Figura 5. Representación esquemática de la interacción entre dos factores hipotéticos. (arriba) Efectos sinérgicos. (abajo) Efectos antagonísticos. La línea discontinua representa combinaciones de diferentes niveles de los factores 1 y 2 que ejercen el mismo efecto. Los efectos por encima de esta línea indican que la combinación de factores es menos efectiva de lo esperado. Adaptado de Berenbaum (1989).

Este tipo de efectos indirectos de los contaminantes aparece también en el medio terrestre, si bien apenas se han caracterizado en lo que respecta a su impacto sobre reptiles y anfibios adultos. Existen evidencias de la reducción de la biodiversidad de aves o mamíferos como consecuencia de la pérdida de recursos tróficos en medios tratados con plaguicidas (véase Sotherton, 1998), y todo hace pensar que este efecto es también extensible a la herpetofauna terrestre.

Factores que determinan la magnitud del impacto de la contaminación

En el medio natural, la sensibilidad de cada individuo está condicionada por multitud de factores, tanto intrínsecos como externos, ya sean naturales o antropogénicos, cuya interacción va a determinar el efecto final de los contaminantes que entren en contacto con dicho individuo. Esta interacción puede tener efectos aditivos (si los efectos de los factores implicados se suman), sinérgicos (si el efecto global es superior a la suma de los efectos de cada factor por separado) o antagonísticos (si el efecto global es inferior a la suma de los efectos de cada factor por separado) (Figura 5; Berenbaum, 1989). La presencia de compuestos químicos en el medio puede alterar la capacidad de respuesta de los anfibios y reptiles frente a factores como la presencia de depredadores, competidores o parásitos, la falta de recursos tróficos o espaciales, o el estrés osmótico (e.g., Relyea, 2005b; Distel & Boone, 2009; Mackey & Boone, 2009; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2010b; Paetow *et al.*, 2012). Sin embargo, también hay estudios que evidencian la ausencia de interacciones significativas entre la contaminación y otros factores (e.g., Boone & Bridges-Britton, 2006), lo que ha hecho que de manera general no se haya identificado un patrón que de modo

consistente indique el sentido de tales interacciones (Egea-Serrano *et al.*, 2012).

En los últimos años está adquiriendo cierta relevancia la influencia que puede tener el cambio climático en el impacto de la contaminación sobre las poblaciones de anfibios y reptiles. Como organismos poiquiloterms y con escasa movilidad, anfibios y reptiles serían particularmente sensibles a este fenómeno. Por ejemplo, la creciente aridez asociada al cambio climático se ha postulado como una causa potencial de declive de poblaciones de anfibios (Pounds & Crump, 1994). Paralelamente, se ha demostrado la influencia negativa que la atrazina jugaría en la capacidad de respuesta de estos vertebrados al aumento de la aridez al afectar a los procesos fisiológicos por los que los individuos recién metamorfoseados retienen agua en el organismo (Rohr & Palmer, 2013). La capacidad de retención de agua resulta imprescindible para sobrevivir durante la etapa juvenil, especialmente en ambientes áridos, lo que pone de manifiesto cómo el herbicida puede interactuar con una de las consecuencias del cambio climático para incrementar el riesgo de extinción de las poblaciones de anfibios.

En lo que respecta a las características propias de los individuos, el estadio de desarrollo puede condicionar la sensibilidad a la contaminación (e.g., Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006). La envoltura gelatinosa de los huevos de los anfibios o las cubiertas del huevo cleidoico en los reptiles pueden proteger a los embriones de la contaminación (Marco *et al.*, 2004a; Edginton *et al.*, 2007). Además, el hecho de que los embriones no tengan el sistema nervioso totalmente desarrollado les proporciona cierta protección frente a los compuestos neurotóxicos (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006). Del mismo modo, algunos compuestos tras ser ingeridos pueden

transformarse en el tracto digestivo en sustancias más tóxicas; por ejemplo, el nitrato puede convertirse en nitrosaminas o en nitrito, sustancias capaces de causar efectos cancerígenos o déficit en el transporte de oxígeno a los tejidos, respectivamente (Committee on Nitrate Accumulation, 1972; Huey & Beiting, 1980). Así, el desarrollo incompleto del tracto digestivo en fases iniciales del desarrollo evita la exposición a este compuesto. Por otra parte, los individuos más maduros pueden ser más tolerantes que otros más jóvenes debido a que pueden presentar mayores capacidades detoxificantes (Bucciarelli *et al.*, 1999; Bryszewska *et al.*, 2011). Las larvas de anuros más desarrolladas tienen branquias internas y la piel más gruesa, lo que reduce la superficie de contacto con el medio y les protege frente a la asimilación de agentes químicos y el estrés osmótico (McDiarmid & Altig, 1999). Sin embargo, estas características limitan también la respiración cutánea, lo que supone que para las larvas que carecen de la capacidad de obtener oxígeno del aire (e.g., bufónidos) la toxicidad de los contaminantes que producen hipoxia tisular se incrementaría a lo largo del desarrollo (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006).

Numerosos estudios apuntan a la variabilidad inter e intraespecífica en relación a la sensibilidad a la contaminación (e.g., Johansson *et al.*, 2001; Shinn *et al.*, 2008; Widder & Bidwell, 2008; Egea-Serrano *et al.*, 2009b, 2011; Jones *et al.*, 2009; Sparling & Fellers, 2009; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2010b). Aunque se ha llegado a sugerir que esta variabilidad tendría un componente filogenético (Jones *et al.*, 2009; pero véase Egea-Serrano *et al.*, 2012), lo cierto es que la estrategia de vida sería un factor más determinante. Así, especies que habiten ambientes temporales pueden mostrar mayor tolerancia a la contaminación debido a una mayor tolerancia genética a factores estre-

santes ambientales que aquéllas que habitan ambientes más estables (Shinn *et al.*, 2008). Por otra parte, la exposición a diferentes historias de contaminación puede hacer que determinadas poblaciones sean más tolerantes que otras, pudiendo darse casos de adaptación local a la contaminación (Johansson *et al.*, 2001). La posible adaptación genética a la contaminación podría tener, no obstante, un coste evolutivo al reducir la diversidad genética de la población, con la consiguiente pérdida de plasticidad para responder a procesos estocásticos futuros (Medina *et al.*, 2007).

Influencia de la contaminación a nivel supra-individual

Los efectos descritos anteriormente pueden afectar a las tasas de reclutamiento de las poblaciones, comprometiendo su viabilidad (Hayes *et al.*, 2010). Sin embargo, es muy difícil inferir hasta qué punto los efectos de la contaminación sobre los individuos pueden afectar a la dinámica de las poblaciones de anfibios y reptiles (Schmidt, 2004). Por ejemplo, Ernst *et al.* (1994) describieron la desaparición del que-lonio *Graptemys flavimaculata* de una porción de arroyo aguas abajo de una planta papelera en Mississippi, pero fueron incapaces de discernir si ello se debía a una mortalidad de tortugas asociada a la contaminación originada por la planta papelera, o a que los animales habían abandonado la zona en busca de hábitats libres de contaminación. Además, el carácter críptico de muchas especies de anfibios y reptiles, en particular de algunos saurios y muchos ofidios, dificulta identificar los efectos asociados a la contaminación.

Las causas propuestas para explicar el declive de las poblaciones de anfibios son múltiples (e.g., Blaustein & Wake, 1990; Wake & Vredenburg, 2008). Los niveles de contamina-

ción tienden a ser superiores en aquellos emplazamientos donde el hombre desarrolla sus actividades, lugares donde también aparecen con mayor intensidad otros factores de amenaza de origen antropogénico (e.g., destrucción y alteración del hábitat, presencia de especies exóticas, etc.), por lo que a menudo resulta imposible separar los efectos atribuibles a cada factor. Pese a ello, en algunos casos se ha podido establecer una relación entre el declive de diversas poblaciones de anfibios y la contaminación química. Así, la aplicación de agroquímicos se ha asociado con el declive de algunas poblaciones del anuro *Litoria aurea* en el sureste de Australia (Hamer *et al.*, 2004) o la progresiva desaparición de *Rana muscosa* y *Rana aurora* en California (Davidson *et al.*, 2001; Sparling *et al.*, 2001; Fellers *et al.*, 2004).

Por lo que a los reptiles respecta, también se ha reconocido que las poblaciones de diversas especies están amenazadas por una serie de factores, entre los que se encuentra la contaminación química (Gibbons *et al.*, 2000). En concreto, la aplicación de plaguicidas se ha asociado con la disminución de la abundancia de los saurios *Merole suborbitalis* y *Pedioplanis namaquensis* en Sudáfrica (Alexander *et al.*, 2002) o con el aumento del estrés metabólico en las poblaciones de *P. bocagei* del noroeste de Portugal (Amaral *et al.*, 2012c), a pesar de que, por el momento, no se han detectado efectos negativos en la densidad o el tamaño en dichas poblaciones (Amaral *et al.*, 2012d). Romero & Wilkelski (2002) describieron un declive poblacional en las iguanas marinas de las Islas Galápagos (*Amblyrhynchus cristatus*) y lo asociaron a un vertido de petróleo en la zona, ya que las poblaciones de las islas que no se habían visto afectadas por el vertido permanecían estables. En este caso, la causa de la muerte no tendría que ver tanto con una into-

xicación directa como con una incapacidad de digerir alimento, provocada por la destrucción de la microbiota intestinal como consecuencia del petróleo ingerido.

Métodos de estudio y monitorización empleados en ecotoxicología

La ecotoxicología tiene por objetivo conocer el impacto de la contaminación sobre los ecosistemas, lo que requiere la integración de diferentes niveles de aproximación, desde la caracterización de los efectos a nivel sub-individual hasta el estudio de los riesgos para las diferentes poblaciones y las interacciones entre ellas y con los diferentes elementos del

ecosistema. Esta integración se puede realizar siguiendo los procesos *top-down* y *bottom-up*. En el primer caso se partiría de una estima de los efectos a nivel colectivo que se iría desgranando en los niveles de menor complejidad hasta simplificar la explicación al problema. En el segundo caso, más habitual en ecotoxicología, se empieza estudiando el nivel de organización más simple para, a partir de los resultados obtenidos, ir haciendo inferencias sobre lo que sucederá a medida que aumente la complejidad del sistema. En la Figura 6 se muestran ejemplos de diseños ecotoxicológicos integrados siguiendo cada uno de estos procesos. Evidentemente, esta aproximación a múltiples niveles va a requerir diseños muy diferentes dependiendo de la complejidad del

sistema biológico que pretendamos estudiar, que incluyen desde ensayos en laboratorio, pasando por experimentos en mesocosmos, hasta trabajos de monitorización *in situ*.

La mayor parte de estudios ecotoxicológicos se realizan en laboratorio (Boone & James, 2005), lo que permite tener un control riguroso de las condiciones en las que se realizan los experimentos, pudiendo, por tanto, determinar el efecto directo de las sustancias consideradas. Además, se pueden registrar variables, como aquellas relacionadas con el comportamiento, que difícilmente se podrían analizar en otras condiciones. Sin embargo, la realización de un experimento en el laboratorio tiene el inconveniente de que no se representan

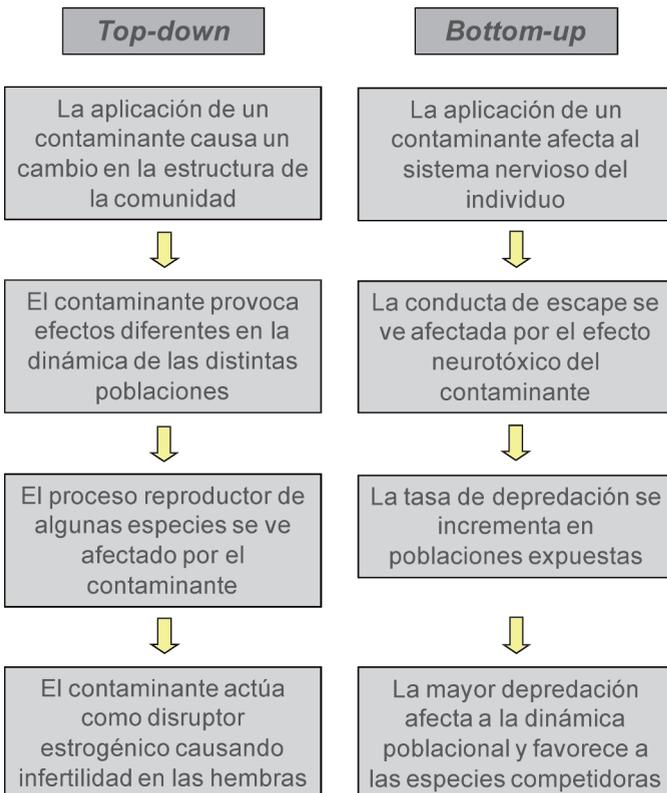


Figura 6. Ejemplos de aproximaciones integradas siguiendo los procesos *top-down* y *bottom-up* aplicados a la ecotoxicología.

las condiciones que se pueden encontrar en el medio natural, de modo que puede que las inferencias que se hagan sobre el impacto de un compuesto estén sesgadas o sean en todo caso limitadas.

Los mesocosmos y los corrales son herramientas muy útiles para poder determinar los efectos de la contaminación sobre los anfibios y reptiles en las condiciones lo más naturales posibles (Boone & James, 2005; Harper *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2012b). Los mesocosmos son sistemas artificiales cerrados, independientes y dispuestos al aire libre que contienen cadenas tróficas y procesos representativos del medio ambiente natural (Figura 7), mientras que los corrales son contenedores permeables que encierran a los organismos objeto de estudio dentro de un ambiente particular, permitiéndose el intercambio entre corrales (Figura 7; Boone & James, 2005). Por todo ello, tanto los mesocosmos como los corrales representan metodologías que permiten estudiar procesos a escala de población o comunidad, así como los efectos de múltiples factores, en condiciones con un elevado grado de realismo (Boone & James, 2005).

Otros aspectos a considerar en relación al diseño experimental corresponden a la duración de los experimentos y a la renovación de los tratamientos. Por lo que respecta a la duración, las exposiciones varían desde agudas hasta crónicas. Las primeras pueden ser definidas como exposiciones breves e intensas, y generalmente se establecen en un período máximo de 96 h (Newman & Clements, 2008). Las exposiciones agudas se utilizan a menudo en procedimientos estandarizados de evaluación de toxicidad (e.g., FETAX), ya que su corta duración reduce el riesgo de variabilidad incontrolada, o para simular fenómenos puntuales de contaminación (vertidos, aplicaciones de plaguicidas, etc.). Las exposiciones cró-

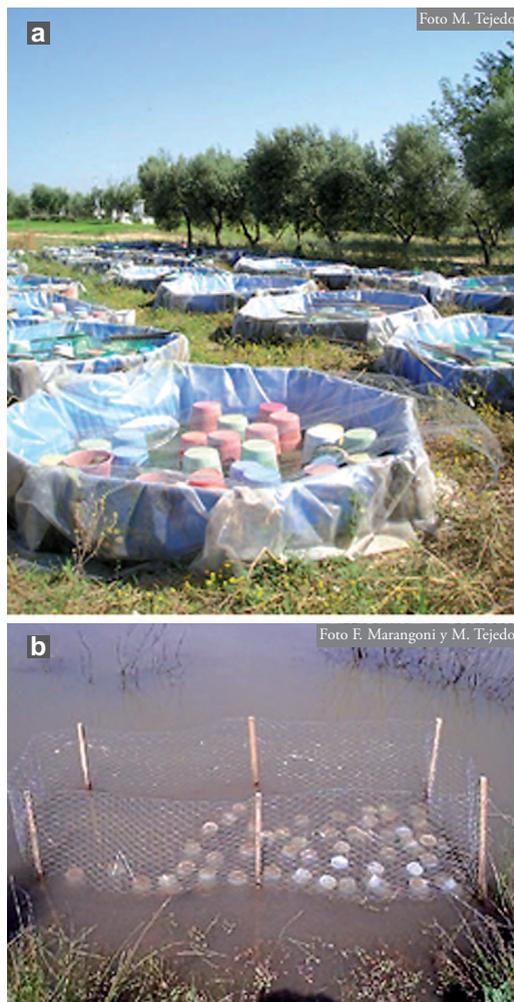


Figura 7. Ejemplos de condiciones experimentales en las que se pueden realizar estudios ecotoxicológicos. (a) Mesocosmos. (b) Corrales.

nicas, por el contrario, se extienden mucho más en el tiempo, si bien esta duración no puede ser definida con precisión, habiéndose llegado a determinar de manera arbitraria que un experimento es crónico si su duración excede el 10% de la vida del organismo estudiado (Suter, 1993). Las exposiciones crónicas son especialmente útiles para analizar procesos de contaminación persistente (e.g., acumulación de metales pesados en suelos o sedimentos) o para estudiar respuestas a largo plazo como

el desarrollo embrionario en reptiles, desarrollo larvario y metamorfosis en anfibios, o efectos inter-generacionales.

Por otro lado, en la ejecución de experimentos ecotoxicológicos se consideran diversos métodos para la aplicación y, en su caso, renovación de los tratamientos (Stephen, 1975). Así, los experimentos estáticos consisten en la aplicación del contaminante al inicio del experimento, no renovándose las concentraciones en ningún momento durante el desarrollo del mismo (Newman & Clements, 2008), y es habitual en exposiciones agudas. Sin embargo, dado que con el tiempo la concentración del contaminante en la matriz de administración (alimento, agua, suelo) se irá reduciendo progresivamente, en los experimentos que se prolongan en el tiempo los tratamientos experimentales se renuevan periódicamente (e.g., Buikema *et al.*, 1982).

Los métodos descritos sirven para caracterizar los efectos de un contaminante sobre un organismo. Sin embargo, para evaluar el impacto potencial que puede tener la liberación al medio de agentes químicos sobre los organismos es preciso conocer también el riesgo de exposición a la contaminación de dichos organismos en estudio, completándose así el análisis de riesgos (Birge *et al.*, 2000). La caracterización de la exposición es generalmente más complicada que la de los efectos, ya que supone conocer parámetros como el comportamiento, uso del hábitat o fenología reproductora de los individuos, lo cual conlleva necesariamente el desarrollo de estudios de campo de una cierta duración y complejidad. Para el análisis de riesgos se consideran generalmente los efectos a nivel individual, fundamentalmente la mortalidad estimada a partir de ensayos de laboratorio (Newman & Clements, 2008). Sin embargo, otros parámetros pueden propor-

cionar información sobre la salud del ecosistema o de sus componentes sin tener que recurrir a la realización de dichos ensayos. Estos parámetros son los que en toxicología se conoce como biomarcadores.

Biomarcadores

En toxicología se define un biomarcador como la variación inducida por un xenobiótico (i.e. sustancia ajena al organismo) en componentes celulares o bioquímicos, estructuras o funciones, que es medible en un sistema biológico o en una muestra (National Research Council, 1989). Existen dos tipos de biomarcadores, los de exposición y los de efecto. Los primeros consisten en identificar la presencia del xenobiótico, su metabolito o el producto de la interacción del xenobiótico con una molécula o célula diana, obteniendo así una prueba directa de que el organismo ha estado expuesto al contaminante. La medición directa de metales pesados, POP o plaguicidas en distintos tejidos de anfibios y reptiles (e.g., Montori *et al.*, 1982; Rico *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1999) permite establecer si los individuos de una determinada población, que por otra parte pueden no mostrar otros síntomas, están o han estado expuestos a la contaminación.

Los biomarcadores de efecto indican un cambio fisiológico, bioquímico o alteración del organismo que puede representar un problema de salud y que se produce como consecuencia de la acción de un contaminante. Una de las principales características a considerar en los biomarcadores de efecto es su especificidad. Así, nos encontramos desde biomarcadores muy específicos, como la inhibición de la enzima dehidratasa del ácido δ -amino levulínico (δ -ALAD) como consecuencia de la exposición a plomo, pasando por biomarcadores de especificidad interme-

día, como la inhibición de las enzimas colinesterasas por parte de los insecticidas organofosforados y carbamatos, hasta biomarcadores de baja especificidad como la generación de estrés oxidativo o el daño en el material genético, que responden a la acción de una gran variedad de contaminantes.

En anfibios y reptiles la variedad de biomarcadores estudiados y validados es muy baja en comparación con otros grupos de vertebrados, e incluyen la síntesis de vitelogenina hepática como respuesta a la exposición a compuestos estrogénicos (Palmer *et al.*, 1998), la síntesis de metalotioneínas, proteínas que se producen ante la presencia de metales y que forman complejos con éstos para facilitar su metabolismo y eliminación (Pérez-Coll *et al.*, 1999; Simoniello *et al.*, 2010), diversos parámetros bioquímicos indicadores de estrés oxidativo como respuesta sobre todo a la exposición a metales pesados (Marques *et al.*, 2011), y las mencionadas inhibiciones de la δ -ALAD por exposición a plomo (Martínez-Lopez *et al.*, 2010) y de colinesterasas por exposición a organofosforados y carbamatos (Sparling *et al.*, 2001; Sánchez-Hernandez *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2012a). Todos estos biomarcadores han sido ampliamente descritos en otros grupos de vertebrados y su aplicación a la herpetofauna se ha desarrollado a partir de ahí, no existiendo biomarcadores particulares para anfibios o reptiles.

Perspectivas futuras de la ecotoxicología de anfibios y reptiles

Tal vez el reto más importante en el estudio de los efectos de la contaminación sobre los anfibios y reptiles es alcanzar la relevancia ecológica suficiente para convertir las conclusiones de los estudios experimentales en planes

reales de actuación destinados a minimizar, corregir o evitar el impacto de los contaminantes sobre las poblaciones naturales (Relyea *et al.*, 2005). Los tradicionales ensayos de laboratorio están lejos de representar fidedignamente los efectos de la contaminación sobre los anfibios y reptiles en el medio natural, debido a las diferencias en el entorno físico de los animales entre el campo y el laboratorio, así como a la elevada probabilidad de que los animales se vean expuestos en el medio a un elevado número de contaminantes interactuando entre ellos y con otros factores ambientales.

Los anfibios y reptiles tienen un gran potencial como modelos de estudio en ecotoxicología y su extrapolación para el desarrollo de medidas regulatorias y correctoras de los impactos ambientales. Por ejemplo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos se ha basado en la influencia de las hormonas tiroideas en la metamorfosis de los anfibios para desarrollar un protocolo de análisis del potencial de disrupción endocrina de las sustancias químicas, utilizando *X. laevis* como modelo (directriz TG231 [OECD, 2009]). La legislación europea establece que cualquier producto fitosanitario susceptible de causar efectos sobre la función tiroidea debe analizarse en un test de este tipo antes de poder comercializarse.

Precisamente la incorporación de anfibios y reptiles en la evaluación de los riesgos asociados al uso de fitosanitarios es uno de los aspectos que más interés están suscitando en los últimos años. En la Unión Europea se liberan anualmente 250 000 toneladas de productos fitosanitarios (Eurostat, 2007), muy a menudo sobre los hábitats de anfibios y reptiles. Aunque el conocimiento del impacto de los fitosanitarios sobre la herpetofauna ha crecido notablemente

en la última década, la toxicidad de una proporción muy importante de estos productos jamás ha sido estudiada en anfibios (Hayes *et al.*, 2006) o reptiles (Pauli *et al.*, 2010). Una de las razones que explican esto es que anfibios y reptiles han sido los únicos vertebrados que no se han tenido en cuenta en los análisis de riesgos de toxicidad ambiental que los fabricantes deben presentar a las autoridades antes de recibir la aprobación para la comercialización de un producto. La antigua Directiva europea 91 / 414, actualmente derogada, relativa a la comercialización de fitosanitarios, establecía que, en términos de toxicidad sobre vertebrados silvestres, únicamente se debían presentar datos referentes a peces (para la caracterización de la toxicidad en el medio acuático), aves y mamíferos (para la caracterización en el medio terrestre).

Ignorar a los anfibios y reptiles en el análisis de riesgos asociados al uso de plaguicidas es preocupante ya que, como se ha comentado al principio de esta revisión, ambos taxones presentan particularidades que les hacen especialmente vulnerables al impacto de este tipo de contaminantes (e.g., McDiarmid & Altig, 1999; Hopkins, 2000). De hecho, la opinión más extendida es que los efectos de los fitosanitarios sobre los reptiles o las fases terrestres de los anfibios no quedarían cubiertos por los datos obtenidos en ensayos con aves o mamíferos (e.g., Linder *et al.*, 2010; Friday & Thompson, 2012). Dichos ensayos no consideran las exposiciones dérmicas, poco importantes en aves y mamíferos, pero que sin embargo pueden jugar un papel muy relevante en la asimilación de contaminantes por parte de los anfibios y los reptiles (Weir *et al.*, 2010). En el medio acuático, por el contrario, algunos estudios indican que la toxicidad de los fitosanitarios sobre los anfibios estaría cubierta por los ensayos realizados con peces (Weltje *et al.*,

2013), al ser éstos al menos tan sensibles como los primeros. Sin embargo, estas comparaciones se limitan casi exclusivamente a ensayos en los que se emplean escenarios de exposición basados en peces (i.e. medios acuáticos permanentes) y en los que se analizan efectos letales, mientras que apenas se tienen en cuenta la posible acumulación de sustancias químicas en medios de menor entidad, más utilizados por los anfibios, o sus efectos sobre parámetros subletales determinantes para la estabilidad de las poblaciones.

El nuevo Reglamento 1107 / 2009 sobre comercialización de fitosanitarios en la Unión Europea, y en concreto su anexo publicado en marzo de 2013 acerca de los requerimientos específicos (Reglamento 284/2013), reconoce específicamente la obligatoriedad de evaluar los riesgos de un fitosanitario sobre anfibios y reptiles antes de que el producto pueda ser aprobado para su uso. Sin embargo, dichas evaluaciones deben realizarse mediante ensayos protocolizados aprobados por agencias como la OECD o la agencia ambiental estadounidense (EPA), y actualmente, aparte de la mencionada directriz TG231 de la OECD, no existe este tipo de ensayos para anfibios y reptiles. Así, los siguientes pasos en este camino deben incluir el desarrollo de modelos para caracterizar la exposición *in situ*, tanto en el medio acuático como en el terrestre, además de protocolos apropiados en los que se evalúe la toxicidad de cada producto sobre anfibios y reptiles, considerando a ser posible no sólo efectos letales sino también efectos subletales que puedan ser relevantes desde el punto de vista ecológico.

Como consecuencia de todo lo expuesto, es evidente que todavía existe una notable falta de información que habría que subsanar promoviendo más investigación en esta línea, si bien debemos considerar que el uso de

alternativas a la experimentación animal es una demanda creciente tanto a nivel legal como a nivel social. Así, podríamos plantear tres retos inmediatos a afrontar en el ámbito de la ecotoxicología de los anfibios y reptiles, al menos en nuestro entorno más cercano:

- Rentabilizar al máximo la información disponible, coordinando grupos de trabajo multidisciplinares en los que deben integrarse herpetólogos, no necesariamente familiarizados con la ecotoxicología, cuyos conocimientos sobre la biología y ecología de las especies son necesarios para que los evaluadores de riesgos puedan inferir los impactos de la contaminación sobre la herpetofauna y las posibles medidas correctoras.

- Una vez analizada la información disponible, determinar aquellos aspectos que se deban trabajar relativos al estudio de la exposición y efectos particulares para anfibios y/o reptiles, teniendo en cuenta que toda experimentación futura deberá hacerse bajo el principio de las tres Rs (Reemplazo por modelos alternativos, Reducción del número de animales utilizados, y Refinamiento de los animales que se utilicen).

- Transferir el conocimiento al sector gubernamental responsable de regular en lo relativo a la producción de sustancias químicas y su impacto ambiental, al sector privado responsable del desarrollo, síntesis y liberación de sustancias químicas y, por supuesto, a una sociedad preocupada por el impacto de la contaminación y que demanda conocer los avances en investigación.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos a los Drs. X. Santos y A. Richter-Boix la invitación para publicar esta revisión. Los Drs. R. Mateo (IREC), M.J. Amaral y E. García-Muñoz (Universidade de Aveiro) revisaron una versión preliminar del manuscrito. El Dr. R. Mateo cedió la foto para la Figura 2 y los Drs. M. Tejado (Estación Biológica de Doñana – CSIC) y F. Marangoni (Universidad Nacional de Misiones) las fotos presentadas en la Figura 7. Durante el proceso de elaboración de esta revisión MEOS contó con un contrato del Programa Juan de la Cierva (Ministerio de Economía y Competitividad) y con una beca posdoctoral de la Fundação para a Ciência e a Tecnologia de Portugal (ref. SFRH/BPD/84716/2012). AES fue financiado por una beca posdoctoral del Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico y Tecnológico – CNPq de Brasil (ref. 370592/2013-1).

REFERENCIAS

- Abe, Y., Senbo, S., Takada, Y., Kawada, H. & Ito, T. 1994. The effectiveness of prallethrin against public health pests. 1023-1030. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, Part 3*. British Crop Protection Council. Leicestershire.
- Alexander, G.J., Horne, D. & Hanrahan, S.A. 2002. An evaluation of the effects of deltamethrin on two non-target lizard species in the Karoo, South Africa. *Journal of Arid Environments*, 50: 121-133.
- Allran, J.W. & Karasov, W.H. 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2850-2855.
- Altwegg, R. & Reyer, H.U. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57: 872-882.
- Amaral, M.J., Sanchez-Hernandez, J.C., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Valente, R., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M. 2012a. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 2345-2353.
- Amaral, M.J., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Sanchez-Hernandez, J.C., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M. 2012b. The usefulness of mesocosms for ecotoxicity testing with lacertid lizards. *Acta Herpetologica*, 7: 263-280.
- Amaral, M.J., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Sanchez-Hernandez, J.C., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M. 2012c. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies - Part 2 Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere*, 87: 765-774.

- Amaral, M.J., Carretero, M.A., Bicho, R.C., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M. 2012d. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies - Part I: Field demographics and morphology. *Chemosphere*, 87: 757-764.
- Ankley, G.T., Kuehl, D.W., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Butterworth, B.C. & Nichols, J.W. 2004. Partial life-cycle toxicity and bioconcentration modeling of perfluorooctanesulfonate in the northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 2745-2755.
- ASTM. 1996. *ASTM E729-96 Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, Pennsylvania.
- ASTM. 1998. *ASTM E1439-98 Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, Pennsylvania.
- Berenbaum, M.C. 1989. What is synergy?. *Pharmacological Reviews*, 41: 93-141.
- Bicho, R.C., Amaral, M.J., Faustino, A.M.R., Power, D.M., Réma, A., Carretero, M.A., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M. 2013. Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. *Ecotoxicology*, 22: 156-165.
- Birge, W.J., Westerman, A.G. & Spromberg, J.A. 2000. Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. 727-791. In: Sparling, D.W., Linder, G. & Bishop, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press. Pensacola, Florida.
- Bishop, C.A., Ng, P., Pettit, K.E., Kennedy, S.W., Stegeman, J.J., Norstrom, R.J. & Brooks, R.J. 1998. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) from the Great Lakes-St. Lawrence River basin (1989-1991). *Environmental Pollution*, 101: 143-156.
- Blaustein, A.R. & Wake, D.B. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon?. *Trends in Ecology and Evolution*, 5: 203-204.
- Boone, M.D. & Bridges-Britton, C. 2006. Examining multiple sublethal contaminants on the gray treefrog (*Hyla versicolor*): effects of an insecticide, herbicide and fertilizer. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 3261-3265.
- Boone, M.D. & James, S.M. 2005. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2: 231-257.
- Boone, M.D., Semlitsch, R.D., Little, E.E. & Doyle, M.C. 2007. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications*, 17: 291-301.
- Brodtkin, M.A., Madhoun, H., Rameswaran, M. & Vatnick, I. 2007. Atrazine is an immune disruptor in adult Northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 80-84.
- Bryszewska, M.A., Sanz, E., Sanz-Landaluze, J., Muñoz-Olivas, R., Ortiz-Santaliestra, M.E. & Cámara, C. 2011. Evaluation of arsenic biotransformation by Iberian green frog during metamorphosis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26: 178-186.
- Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Pennelli, A., Cornelio, L., Romagnoli, R., Merino, S., Petruzelli, R. & Di Ilio, C. 1999. Characterization of toad glutathione transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1431: 189-198.
- Buikema, A.L., Jr., Niederlehner, B.R. & Cairns, J., Jr. 1982. Biological monitoring. Part IV - Toxicity testing. *Water Research*, 16: 239-262.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A. 2002. Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*, 21: 91-97.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature*, 421: 691-692.
- Camacho, M., Boada, L.D., Orós, J., Calabuig, P., Zumbado, M. & Luzardo, O.P. 2012b. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine Pollution Bulletin*, 64: 1974-1980.
- Camargo, A. & Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Campbell, K.R. & Campbell, T.S. 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 894-898.
- Carr, J.A., Gentles, A., Smith, E.E., Goleman, W.L., Urquidi, L.J., Thuett, K., Kendall, R.J., Giesy, J.P., Gross, T.S., Solomon, K.R. & Van der Kraak, G. 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 396-405.
- Chang, C.Y., Witschi, E. & Ponseti, I.V. 1954. Teratologic development in *Xenopus* larvae caused by sweet pea seeds (*Lathyrus odoratus*) and their extracts. *Anatomical Record*, 120: 816.
- Chin, S.Y., Willson, J.D., Cristol, D.A., Drewett, D.V.V. & Hopkins, W.A. 2013. Altered behavior of neonatal northern watersnakes (*Nerodia sipedon*) exposed to maternally transferred mercury. *Environmental Pollution*, 176: 144-150.
- Chumchal, M.M., Rainwater, T.R., Osborn, S.C., Roberts, A.P., Abel, M.T., Cobb, G.P., Smith, P.N. & Bailey, F.C. 2011. Mercury speciation and biomagnification in the food web of Caddo Lake, Texas and Louisiana, USA, a subtropical freshwater ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 1153-1162.
- Clark Jr., D.R., Bickham, J.W., Baker, D.L. & Cowman, D.F. 2000. Environmental contaminants in Texas, USA, wetland reptiles: evaluation using blood samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2259-2265.
- Committee on Nitrate Accumulation. 1972. *Accumulation of Nitrate*. National Academy of Sciences. Washington, DC.
- Cooke, A.S. 1977. Effects of field applications of the herbicides diquat and dichlobenil on amphibians. *Environmental Pollution*, 12: 43-50.

- Davidson, C., Shaffer, H.B. & Jennings, M.R. 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses. *Ecological Applications*, 11: 464-479.
- Davidson, M.A., Croteau, M.C., Millar, C.S., Trudeau, V.L. & Lean, D.R.S. 2011. Fate and developmental effects of dietary uptake of methylmercury in *Silurana tropicalis* tadpoles. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 74: 364-379.
- de Solla, S.R. 2010. Organic contaminants in amphibians. 289-324. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition*. SETAC Press. Pensacola.
- Degenhardt, D., Humphries, D., Cessna, A.J., Messing, P., Badiou, P.H., Raina, R., Farenhorst, A. & Pennock, D.J. 2012. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment of two Canadian prairie wetlands. *Journal of Environmental Science and Health B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47: 631-639.
- De Witt, J.C., Peden-Adams, M.M., Keller, J.M. & Germolec, D.R. 2012. Immunotoxicity of perfluorinated compounds: recent developments. *Toxicologic Pathology*, 40: 300-311.
- Díaz-Paniagua, C., Marco, A., Fernández, M., & Hernández, L.M. 2002. Lead, PCBs and other environmental pollutants on chameleon eggs in southern Spain. *Fresenius Environmental Bulletin*, 11: 631-635.
- Distel, C.A. & Boone, M.D. 2009. Effects of aquatic exposure to the insecticide carbaryl and density on aquatic and terrestrial growth and survival in American toads. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1963-1969.
- Dunson, W.A. & Connell, J. 1982. Specific inhibition of hatching in amphibians exposed to low pH. *Journal of Herpetology*, 16: 314-316.
- Edginton, A.N., Rouleau, C., Stephenson, G.R. & Boermans, H.J. 2007. 2,4-D butoxyethyl ester kinetics in embryos of *Xenopus laevis*: the role of the embryonic jelly coat in reducing chemical absorption. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 113-120.
- Egea-Serrano, A., Tejedo, M. & Torralva, M. 2009a. Estimating mean lethal concentrations of three nitrogenous compounds for larvae of the Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). *Revista Española de Herpetología*, 23: 107-116.
- Egea-Serrano, A., Tejedo, M. & Torralva, M. 2009b. 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.
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M. & Torralva, M. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution*, 2: 1382-1397.
- Eisenreich, K.M. & Rowe, C.L. 2013. Experimental exposure of eggs to polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) and possible species-specific differences in debromination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32: 393-400.
- Ernst, C.H., Barbour, R.W. & Lovich, J.E. 1994. *Turtles of the United States and Canada*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Eurostat. 2007. *The use of Plant Protection Products in the European Union. Data 1992-2003*. European Commission. Luxemburgo.
- FAO. 2005. *FAO Statistical Databases*. Food and Agricultural Organization. <<http://faostat.fao.org/>> [Consulta: 19 diciembre 2005].
- Fellers, G.M., McConnell, L.L., Pratt, D. & Datta, S. 2004. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 2170-2177.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L. & Peng, P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere*, 56: 457-463.
- Fernandez, M. & L'Haridan, J. 1992. Influence of lighting conditions on toxicity and genotoxicity of various PAHs in the newt *in vivo*. *Mutation Research*, 298: 31-41.
- Friday, S. & Thompson, H. 2012. *Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments*. European Food and Safety Authority. Parma. <www.efsa.europa.eu/publications/> [Consulta: 24 septiembre 2012].
- García-Fernández, A.J., Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., Hernández-García, A., María-Mojica, P., Romero, D., Jiménez, P., Castillo, J.J. & Bellido, J.J. 2009. Heavy metals in tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the southwestern Mediterranean (Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 557-563.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F. & Parra, G. 2009. Effects of copper sulfate on growth, development, and escape behavior in *Epidalea calamita* embryos and larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 557-565.
- García-Muñoz, E., Gilbert, J.D., Parra, G. & Guerrero, F. 2010. Wetlands classification for amphibian conservation in Mediterranean landscapes. *Biodiversity and Conservation*, 19: 901-911.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F. & Parra, G. 2011. Larval escape behavior in anuran amphibians as a wetland rapid pollution biomarker. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44: 109-123.
- Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S. & Winne, C.T. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience*, 50: 653-666.
- Gilliom, R.J. 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environmental Science and Technology*, 41: 3408-3414.
- Gómara, B., Gómez, G., Díaz-Paniagua, C., Marco, A. & González, M.J. 2007. PCB, DDT, arsenic, and heavy

- metal (Cd, Cu, Pb, and Zn) concentrations in chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*) eggs from Southwest Spain. *Chemosphere*, 68: 25-31.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- Griffis-Kyle, K.L. 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 Toxicology*, 41: 119-127.
- Guerrero, F., Parra, G., Jiménez-Gómez, F., Castro, M.C., Jiménez-Melero, R., Galotti, A. & Ortega, F. 2005. Los ecosistemas acuáticos en el contexto de los agroecosistemas: el caso de la Comarca del Alto Guadalquivir. 377-398. In: Anta, J.L., Palacios, J. & Guerrero, F. (eds.), *La Cultura del Olivo: Ecología, Economía, Sociedad*. Universidad de Jaén. Jaén.
- Guillette Jr., L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M. & Percival, H.F. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes. *Environmental Health Perspectives*, 102: 680-688.
- Hamer, A.J., Makings, J.A., Lane, S.J. & Mahony, M.J. 2004. Amphibian decline and fertilizers used on agricultural land in south-eastern Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102: 299-305.
- Harper, E.B., Pechmann, J.H.K. & Petranka, J.W. 2010. Field enclosures and terrestrial cages. 203-226. In: Kenneth, C., Jr. (ed.), *Amphibian Ecology and Conservation. A Handbook of Techniques*. Oxford University Press. Nueva York.
- Hatch, A.C. & Blaustein, A.R. 2000. Combined effects of UV-B, nitrate and low pH reduce the survival and activity level of larval Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 494-499.
- Hayes, T., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. & Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 5476-5480.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. & Vonk, A. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, 111: 568-575.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjoux, Y. & Tsui, M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, 114: 40-50.
- Hayes, T.B., Khourya, V., Narayana, A., Nazira, M., Parka, A., Browna, T., Adamea, L., Chana, E., Buchholz, D., Stuevea, T. & Gallipeau, S. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 4612-4617.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336: 348-350.
- Hickey, J.J. & Anderson, D.W. 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science*, 162: 271-273.
- Hopkins, W.A. 2000. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2391-2393.
- Hopkins, W.A. & Rowe, C.L. 2010. Interdisciplinary and hierarchical approaches for studying the effects of metals and metalloids on amphibians. 326-336. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition*. SETAC Press. Pensacola.
- Hopkins, W.A., Rowe, C.L. & Congdon, J.D. 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snakes (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 1258-1263.
- Hopkins, W.A., Staub, B.P., Baionno, J.A., Jackson, B.P. & Talent, L.G. 2005. Transfer of selenium from prey to predators in a simulated terrestrial food chain. *Environmental Pollution*, 134: 447-456.
- Hopkins, W.A., Durant, S.E., Staub, B.P., Rowe, C.L. & Jackson, B.P. 2006. Reproduction, embryonic development, and maternal transfer of contaminants in the amphibians *Gastrophryne carolinensis*. *Environmental Health Perspectives*, 114: 661-666.
- Hopkins, B.C., Willson, J.D. & Hopkins, W.A. 2013. Mercury exposure is associated with negative effects on turtle reproduction. *Environmental Science and Technology*, 47: 2416-2422.
- Horne, M.T. & Dunson, W.A. 1995. Effects of low pH, metals, and water hardness on larval amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29: 500-505.
- Huey, D.W. & Beitinger, T.L. 1980. Toxicity of nitrite to larvae of the salamander *Ambystoma texanum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 25: 909-912.
- IPCC. 2001. *Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- IPCS. 1990. *Deltamethrin. Environmental Health Criteria 97*. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. Ginebra.
- IUCN. 2012. *The IUCN Red List of Threatened Species 2012.2*. International Union for Conservation of Nature. <<http://www.iucnredlist.org/>> [Consulta: 18 febrero 2013].
- Jerez, S., Motas, M., Cánovas, R.A., Talavera, J., Almela, R.M. & del Río, A.B. 2010. Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere*, 78: 256-264.
- Johansson, M., Räsänen, K. & Merilä, J. 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquatic Toxicology*, 54: 1-14.

- Jones, D.K., Hammond, J.I. & Relyea, R.A. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1939-1945.
- Kadokami, K., Takeishi, M., Kuramoto, M. & Ono, Y. 2004. Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs. *Chemosphere*, 57: 383-389.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Kucklick, J.R., Keil, D.E. & Peden-Adams, M.M. 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and *in vitro* exposure experiments. *Environmental Health Perspectives*, 114: 70-76.
- Keller, J.M., Ngai, L., McNeill, J.B., Wood, L.D., Stewart, K.R., O'Connell, S.G. & Kucklick, J.R. 2012. Perfluoroalkyl contaminants in plasma of five sea turtle species: Comparisons in concentration and potential health risks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 1223-1230.
- Kerby, J.L., Richards-Hrdlicka, K.L., Storfer, A. & Skelly, D.K. 2010. An examination of amphibian sensitivity to environmental contaminants: are amphibians poor canaries?. *Ecology Letters*, 13: 60-67.
- Lambert, M.R.K. 1993. Effects of DDT ground-spraying against tsetse flies on lizards in NW Zimbabwe. *Environmental Pollution*, 82: 231-237.
- Lehman, C.M. & Williams, B.K. 2010. Effects of current-use pesticides on amphibians. 167-202. *In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition.* SETAC Press. Pensacola.
- Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K. & Sparling, D. 2010. Ecotoxicology of amphibians and reptiles – Where should we be going and how do we get there? 548-551. *In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition.* SETAC Press. Pensacola.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F. & Mateo, R. 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology*, 22: 125-138.
- Mackey, M.J. & Boone, M.D. 2009. Single and interactive effects of malathion, overwintered green frog tadpoles, and cyanobacteria on gray treefrog tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 637-643.
- Mann, R.M. & Bidwell, J.R. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 193-199.
- Mann, R.M., Serra, E.A. & Soares, A.M.V.M. 2006. Assimilation of cadmium in a European lacertid lizard: Is trophic transfer important?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 3199-3203.
- Mann, R., Hyne, R.V., Choung, C.B. & Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157: 2903-2927.
- Marco, A. & Blaustein, A.R. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 946-949.
- Marco, A. & Ortiz-Santaliestra, M.E. 2009. Impact of reactive nitrogen on amphibians (Nitrogen pollution). 3145-3185. *In: H. Heatwole & J.W. Wilkinson (eds.), Amphibian Biology, Vol 8. Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution.* Surrey Beattie & Sons. Baulkham Hills, Australia.
- Marco, A., López-Vicente, M. & Pérez-Mellado, V. 2004a. Arsenic uptake by reptile flexible-shelled eggs from contaminated nest substrates and toxic effect on embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 983-990.
- Marco, A., Hidalgo-Vila, J. & Diaz-Paniagua, C. 2004b. Toxic effects of ammonium nitrate fertilizer on flexible-shelled lizard eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73: 125-131.
- Marques, S.M., Antunes, S.C., Nunes, B., Gonçalves, F. & Pereira, R. 2011. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology*, 20: 1315-1327.
- Márquez, R. & Lizana, M. 2002. Conservación de los anfibios y reptiles de España. 417-453. *In: Pleguezuelos, J.M., Márquez, R. & Lizana, M. (eds.), Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España.* Ministerio de Medio Ambiente, Asociación Herpetológica Española. Madrid.
- Márquez-Ferrando, R., Santos, X., Pleguezuelos, J.M. & Ontiveros, D. 2009. Bioaccumulation of heavy metals in the lizard *Psammotromus algirus* after a tailing-dam collapse in Aznalcóllar (Southwest Spain). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 276-285.
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S. & Miaud, S. 2006. Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae. *Chemosphere*, 63: 889-892.
- Martínez-López, E., Sousa, A.R., María-Mojica, P., Gómez-Ramírez, P., Guilhermino, L. & García-Fernández, A.J. 2010. Blood δ -ALAD, lead and cadmium concentrations in spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) from Southeastern Spain and Northern Africa. *Ecotoxicology*, 19: 670-677.
- Martínez-Solano, I., Bosch, J. & García-París, M. 2003. Demographic trends and community stability in a montane amphibian assemblage. *Conservation Biology*, 17: 238-244.
- Mateo, R., Millán, J., Rodríguez-Estival, J., Camarero, P.R., Palomares, F. & Ortiz-Santaliestra, M.E. 2012. Levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the critically endangered Iberian lynx and other sympatric carnivores in Spain. *Chemosphere*, 86: 691-700.
- Mathias, M.L., Graça, C., Ferreira, A.M. & Duarte-Rodrigues, P. 2007. Residues of DDT and other organochlorines in small mammals from Central Portugal. *Mammalia*, 71: 83-85.
- McDiarmid, R.W. & Altig, R. 1999. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae.* University of Chicago Press. Chicago.

- Medina, M.H., Correa, J.A. & Barata, C. 2007. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67: 2105-2114.
- Monagas, P., Orós, J., Araña, J. & González-Díaz, O.M. 2008. Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1949-1952.
- Montori, A., Llorente, G.A. & Nadal, J. 1982. Niveles de residuos plaguicidas organoclorados en el tritón pirenaico (*Euproctus asper* Dugès, 1852). *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental*, 13: 33-38.
- Montori, A., Franch, M., Llorente, G.A., Richter, A., Sansebastián, O., Garriga, N. & Pascual, G. 2009. Declivi de les poblacions d'amfibis al Delta del Llobregat. *Materials del Baix Llobregat*, 15: 65-70.
- Murphy, J.E., Phillips, C.A. & Beasley, V.R. 2000. Aspects of amphibian ecology. 141-178. In: Sparling, D.W., Linder, G. & Bishop, C.A. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press. Pensacola.
- National Research Council. 1989. *Biologic Markers in Reproductive Toxicology*. National Academy Press. Washington, DC.
- Newman, M.C. & Clements, W.H. 2008. *Ecotoxicology. A Comprehensive Treatment*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, J.A. & Steinberg, C. 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology*, 14: 77-88.
- OECD. 2009. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. The Amphibian Metamorphosis Assay*. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris.
- Oldham, R.S., Lathan, D.M., Hilton-Brown, D., Towns, M., Cooke, A.S. & Burn, A. 1997. The effect of ammonium nitrate fertilizer on frog (*Rana temporaria*) survival. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 61: 69-74.
- Orós, J., González-Díaz, O.M. & Monagas, P. 2009. High levels of polychlorinated biphenyls in tissues of Atlantic turtles stranded in the Canary Islands, Spain. *Chemosphere*, 74: 473-478.
- Ortiz, M.E., Marco, A., Saiz, N. & Lizana, M. 2004. Impact of ammonium nitrate on growth and survival of six European amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 234-239.
- Ortiz-Santaliestra, M.E. & Sparling, D.W. 2007. Alteration of larval development and metamorphosis by nitrate and perchlorate in southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 639-646.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Marco, A., Fernández, M.J. & Lizana, M. 2006. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 105-111.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Marco, A., Fernández-Benítez, M.J. & Lizana, M. 2007. Effects of ammonium nitrate exposure and water acidification on the dwarf newt: The protective effect of oviposition behaviour on embryonic survival. *Aquatic Toxicology*, 85: 251-257.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Marco, A., Fernández-Benítez, M.J. & Lizana, M. 2009. Alteration of courtship behavior because of water acidification and minor effect of ammonium nitrate in the Iberian newt (*Lissotriton boscai*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1500-1505.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Fernández-Benítez, M.J., Marco, A. & Lizana, M. 2010a. Influence of ammonium nitrate on larval anti-predatory responses of two amphibian species. *Aquatic Toxicology*, 99: 198-204.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Fernández-Benítez, M.J., Marco, A. & Lizana, M. 2010b. Adaptation to osmotic stress provides protection against ammonium nitrate in *Pelophylax perezii* embryos. *Environmental Pollution*, 158: 934-940.
- Orton, F., Carr, J. & Handy, R. 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 65-71.
- Paetow, L.J., McLaughlin, J.D., Cue, R.I., Pauli, B.D. & Marcogliese, D.J. 2012. Effects of herbicides and the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on the health of post-metamorphic northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 372-380.
- Palmer, B.D., Huth, L.K., Pietro, D.L. & Selcer, K.W. 1998. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 30-36.
- Pauli, B.D., Money, S. & Sparling, D.W. 2010. Ecotoxicology of pesticides in reptiles. 203-224. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition*. SETAC Press. Pensacola.
- Peden-Adams, M.M., Keil, D.E., Romano, T., Mollenhauer, M.A.M., Fort, D.J., Guiney, P.D., Houde, M., Kannan, K., Muir, D.C., Rice, C.D., Stuckey, J., Segars, A.L., Scott, T., Talent, L., Bossart, G.D., Fair, P.A. & Keller, J.M. 2009. Health effects of perfluorinated compounds – what are the wildlife telling us?. *Reproductive Toxicology*, 27: 414-415.
- Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J., Fridman, O., Daniel, P. & D'Eramo, J.L. 1999. Metallothionein induction and cadmium uptake in *Bufo arenarum* embryos following an acclimation protocol. *Environmental Pollution*, 106: 443-448.
- Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A. & Siroski, P.A. 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 852-859.
- Pounds, J. & Crump, M. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: The case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8: 72-85.
- Ralph, S. & Petras, M. 1997. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29: 418-430.
- Räsänen, K., Pahkala, M., Laurila, A. & Merilä, J. 2003. Does jelly envelope protect the common frog *Rana temporaria* embryos from UV-B radiation?. *Herpetologica*, 59: 293-300.

- Relyea, R.A. 2005a. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 351-357.
- Relyea, R.A. 2005b. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15: 618-627.
- Relyea, R.A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159: 363-376.
- Relyea, R.A., Schoeppner, N.M. & Hoverman, J.T. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, 15: 1125-1134.
- Rico, M.C., Hernández, L.M., González, M.J., Fernández, M.A. & Montero, M.C. 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.
- Rodríguez-Estival, J., Martínez-Haro, M., Martín-Hernando, M.P. & Mateo, R. 2010. Sub-chronic effects of nitrate in drinking water on red-legged partridge (*Alectoris rufa*): Oxidative stress and T-cell mediated immune function. *Environmental Research*, 110: 469-475.
- Rohr, J.R. & McCoy, K.A. 2010. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental Health Perspectives*, 118: 20-32.
- Rohr, J.R. & Palmer, B.D. 2013. Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. *Conservation Biology* (in press), DOI: 10.1111/cobi.12086.
- Romero, L.M. & Wikelski, W. 2002. Severe effects of low-level oil contamination on wildlife predicted by the corticosterone-stress response: preliminary data and a research agenda. *Spill Science and Technology Bulletin*, 7: 309-313.
- Rowe, C.L., Kinney, O.M., Fiori, A.P. & Congdon, J.D. 1996. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 36: 723-730.
- Salvaterra, T., Alves, M.G., Domingues, I., Pereira, R., Rasteiro, M.G., Carvalho, R.A., Soares, A.M.V.M. & Lopes, I. 2013. Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). *Aquatic Toxicology*, 128-129: 190-192.
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R. & Mateo, R. 2012. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Science of the Total Environment*, 420: 280-288.
- Sánchez-Hernández, J.C., Carbonell, R., Henríquez Pérez, A., Montealegre, M. & Gómez, L. 2004. Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti* palmae by pesticides: A field study. *Environmental Pollution*, 132: 479-488.
- Santos, X. & Llorente, G.A. 2009. Decline of a common reptile: Case study of the viperine snake *Natrix maura* in a Mediterranean wetland. *Acta Herpetologica*, 4: 161-169.
- Santos, X., Pastor, D., Llorente, G.A. & Albaigés, J. 1999. Organochlorine levels in Viperine Snake *Natrix maura* carcasses from the Ebro Delta (NE Spain): Sexual and size-related differences. *Chemosphere*, 39: 2641-2650.
- Scheuhammer, A.M., Meyer, M.W., Sandheinrich, M.B. & Murray, M.W. 2007. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. *Ambio*, 36: 12-18.
- Schiesari, L., Grillitsch, B. & Grillitsch, H. 2007. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. *Conservation Biology*, 21: 465-471.
- Schmidt, B.R. 2004. Pesticides, mortality and population growth rate. *Trends in Ecology and Evolution*, 19: 459-460.
- Schnee Weiss, N. & Schnee Weiss, U. 1997. Mortality of amphibians as a consequence of mineral fertilizing. *Salamandra*, 33: 1-8.
- Schriks, M., Zvinavashe, E., Furlow, J.D. & Murk, A.J. 2006. Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere*, 65: 1904-1908.
- Semlitsch, R.D. & Bridges, C.M. 2005. Future directions for amphibian ecotoxicology and their conservation implications. 241-243. In: Lanoo, M. (ed.), *Amphibian Declines, The Conservation and Status of United States species*. University of California Press. Berkeley.
- Shi, Y.B. 2000. *Amphibian Metamorphosis: From Morphology to Molecular Biology*. Wiley-Liss. Nueva York.
- Shinn, C., Marco, A. & Serrano, L. 2008. Inter- and intra-specific variation on sensitivity of larval amphibians to nitrite. *Chemosphere*, 71: 507-514.
- Shoemaker, V.H., Hilman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C. & Wygoda, M.L. 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. 125-150. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (eds.), *Environmental Physiology of the Amphibians*. University of Chicago Press. Chicago.
- Simoniello, P., Motta, C.M., Scudiero, R., Trinchella, F. & Filosa, S. 2010. Spatiotemporal changes in metallothionein gene expression during embryogenesis in the wall lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology A*, 313: 410-420.
- Smith, G.R. & Burgett, A.A. 2005. Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicology*, 14: 447-482.
- Sotherton, N.W. 1998. Land use changes and the decline of farmland wildlife: an appraisal of the set-aside approach. *Biological Conservation*, 83: 259-268.
- Sparling, D.W. 2010. Ecotoxicology of organic contaminants to amphibians. 261-288. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition*. SETAC Press. Pensacola.
- Sparling, D.W. & Fellers, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1696-1703.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M. & McConnell, L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in

- California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1591-1595.
- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Second Edition*. SETAC Press. Pensacola.
- Stapleton, H.M., Brazil, B., Holbrook, R.D., Mitchelmore, C.L., Benedict, R., Konstantinov, A. & Potter, D. 2006. *In vivo* and *in vitro* debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental Science and Technology*, 40: 4653-4658.
- Stephen, C.E. 1975. *Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians*. EPA-660/3-75-006. U.S. Environmental Protection Agency. Corvallis, Oregon.
- Suter, C.W., II. 1993. *Ecological Risk Assessment*. CRC Press/Lewis Publishers. Boca Raton, Florida.
- Thompson, D.G., Solomon, K.R., Wojtaszek, B.F., Edginton, A.N. & Stephenson, G.R. 2006. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 16: 2022-2027.
- Torrent, A., González-Díaz, O.M., Monagas, P. & Orós, J. 2004. Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 854-860.
- Truhaut, R. 1975. Ecotoxicology – a new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods, and prospects. 3-24. In: McIntyre, A.D. & Mills, C.F. (eds.), *Ecological Toxicology Research: Effects of Heavy Metal and Organohalogen Compounds. Proceedings of a NATO Science Committee Conference 1974*. Plenum Press. Nueva York.
- Unrine, J.M., Jagoe, C.H., Hopkins, W.A. & Brant, H.A. 2004. Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog (*Rana sphenocephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 2964-2970.
- Unrine, J.M., Jagoe, C.H., Brinton, A.C., Brant, H.A. & Garvin, N.T. 2005. Dietary mercury exposure and bioaccumulation in amphibian larvae inhabiting Carolina bay wetlands. *Environmental Pollution*, 135: 245-253.
- USEPA. 1998. *Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. Report number EPA 822-R-98-008*. Office of Water, United States Environmental Protection Agency. Washington.
- Van Schmidt, N.D., Cary, T.L., Ortiz-Santaliestra, M.E. & Karasov, W.H. 2012. Effects of chronic polybrominated diphenyl ether exposure on gonadal development in the Northern leopard frog, *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 347-354.
- Vidal, D., Alzaga, V., Luque-Larena, J.J., Mateo, R., Arroyo, L. & Viñuela, J. 2009. Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Science of the Total Environment*, 408: 267-271.
- Vitousek, P.M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, D. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Issues in Ecology*, 1: 1-16.
- Wake, D.B. & Vredenburg, V.T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 11466-11473.
- Walvekar, R.R., Kane, S.V., Nadkarni, M.S., Bagwan, I.N., Chaukar, D.A. & D'Cruz, A.K. 2007. Chronic arsenic poisoning: a global health issue – a report of multiple primary cancers. *Journal of Cutaneous Pathology*, 34: 203-206.
- Weir, S.M., Suski, J.G. & Salice, C.J. 2010. Ecological risk of anthropogenic pollutants to reptiles: Evaluating assumptions of sensitivity and exposure. *Environmental Pollution*, 158: 3596-3606.
- Weltje, L., Simpson, P., Gross, M., Crane, M. & Wheeler, J.R. 2013. Comparative acute and chronic sensitivity of fish and amphibians: A critical review of data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32: 984-9943.
- Widder, P.D. & Bidwell, J.R. 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 88: 9-18.

Galápago Europeo



Especie del Año 2013