

Paper Type: Original Article



## Studying the Effect of Chemical Pollutants on the Larvae of the Green Toad *Bufotes sitibundus* (Pallas, 1771)

Ali Reza Pesarakloo<sup>\*1</sup> , Mina Karimi<sup>1</sup>, Raziye Alaei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of biology, Faculty of science, Arak university, Arak, Iran;

<sup>\*</sup>(Associate Professor: Corresponding author: A.pesarakloo@gmail.com).

<sup>2</sup>Zoology Department, Faculty of Biology, Tehran University, Tehran, Iran.

### Citation:

Pesarakloo, A. R., Karimi, M. & Alaei, R. (2025). Studying the effect of chemical pollutants on the larvae of the green toad *Bufotes sitibundus* (Pallas, 1771). *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 38 (Issue No. 1), PP. 76-88.

Received: 2024.06.13

Accepted: 2024.10.02

### Abstract

**Introduction:** Chemical pollution of water has been introduced as one of the main threats to biological communities. Amphibians have a close relationship with aquatic environments due to their biphasic life cycle, permeable skin and aquatic larvae. In the present study, the effect of environmental pollutants in some amphibian habitats around Arak and Shazand cities was investigated on egg hatching and survival of green toad larvae *Bufotes sitibundus*.

**Methods:** Egg samples of green toad *B. sitibundus* were collected and to observe and investigate the effect of physical and chemical water pollution on these eggs, water samples were also taken from three site as a treatment and a control sample was collected. Physicochemical parameters including PH, TDS, Salt, EC, DO, BOD, COD and elemental analysis using ICP device in water samples and the number of six biological traits such as growth index, physical condition, incubation period of embryo-larval stages, malformation, survival and mortality percentages were investigated in larval samples.

**Results:** The results of the present study showed a significant decrease in survival in all containers containing contaminated water, a decrease in growth in some containers and an increase in growth in one of the treatment containers compared to the control sample, as well as the occurrence of abnormalities in the larval period in treatment containers.

**Conclusion:** According to the previous researches and the significant results of the current research, the decrease in the survival percentage, the increase in the occurrence of abnormalities, and the difference in the growth percentage in the breeding containers can be attributed to the chemical pollution of the water (COD), presence of heavy metals, and water salinity.

**Keywords:** Abnormality, Amphibian Extinction, *Bufotes sitibundus*, Green Toad Larvae, Growth Index, Water Chemical Pollution

## تأثیر آلاینده‌های شیمیایی بر لاروهای وزغ سبز *Bufo sitibundus* (Pallas, 1771)

علیرضا پسرکلو<sup>۱</sup>، مینا کریمی<sup>۲</sup>، راضیه علائی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

<sup>۳</sup>دانشجوی دکتری، گروه علوم جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

(\*نویسنده مسئول: [A.pesarakloo@gmail.com](mailto:A.pesarakloo@gmail.com))

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۴

### چکیده

**مقدمه:** آلودگی‌های شیمیایی آب به عنوان یکی از تهدیدات اصلی جوامع زیستی معرفی شده است. دوزیستان به واسطه چرخه زندگی دوفازی، پوست نفوذ پذیر و لارو آبی، ارتباط تنگاتنگی با محیط‌های آبی دارند. در مطالعه حاضر، تأثیر آلاینده‌های محیطی موجود در برخی از زیستگاه‌های دوزیستان در اطراف شهرستان‌های اراک و شازند، بر تفریح تخم و بقای لاروهای وزغ سبز *Bufo sitibundus* مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** نمونه تخم‌هایی از وزغ سبز *B. sitibundus* جمع‌آوری و برای مشاهده و بررسی اثر انواع آلودگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب بر این تخم‌ها، نمونه آب‌هایی نیز از سه منطقه بعنوان تیمار و یک نمونه کنترل جمع‌آوری شد. پارامترهای فیزیکوشیمیایی از جمله PH، TDS، EC، DO، BOD، COD و تجزیه عنصری با استفاده از دستگاه ICP در نمونه‌های آب و تعداد شش صفت زیستی از قبیل شاخص رشد، وضعیت فیزیکی، طول دوره گرماگذاری مراحل جنینی- لاروی، ناهنجاری، درصد بقاء و مرگ و میر در نمونه‌های لارو مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** کاهش معنادار بقا در همه ظروف حاوی آب‌های آلوده نسبت به نمونه کنترل، کاهش رشد در بعضی از ظروف و افزایش رشد در یکی از ظروف پرورش در مقایسه با نمونه کنترل، و بروز ناهنجاری‌ها در دوران لاروی در ظروف تیمار دیده شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به پژوهش‌های قبلی و نتایج معنادار حاصل از پژوهش حاضر می‌توان کاهش درصد بقاء، افزایش بروز ناهنجاری‌ها، و تفاوت درصد رشد در ظروف پرورش را به آلودگی شیمیایی آب (COD)، وجود فلزات سنگین و شوری آب نسبت داد.

کلیدواژه‌ها: آلودگی‌های شیمیایی آب، انقراض دوزیستان، شاخص رشد، لارو وزغ سبز، ناهنجاری، *Bufo sitibundus*

## مقدمه

مطالعات مرتبط با بحران کاهش تنوع زیستی از جمله بحث‌های عمیق در سال‌های اخیر است. بطوری که در نتیجه از دست دادن تنوع زیستی و سایر اثرات بارز انسان بر روی سیاره، پیشنهاد شده که عصر حاضر اغلب به عنوان ششمین دوره انقراض دسته جمعی و یا آنتروپوسن شناخته شود [1]، [2].

در میان گروه‌های مختلف موجودات زنده، ارگانسیم‌های ساکن محیط‌های آب شیرین و دریا متحمل طیف وسیعی از عوامل استرس‌زای زیستی و غیرزیستی از جمله تغییرات آب و هوایی [3]، [4]، آلودگی [5]، تخریب و تغییر زیستگاه [5]، [6] و گونه‌های مهاجم [7] می‌شوند که هر کدام می‌توانند اثرات مخربی بر افراد و جمعیت‌ها داشته باشد [3]، [8]. از سوی دیگر، اثرات ناشی از عوامل استرس‌زا به ندرت به صورت مجزا و اغلب بطور همزمان یا متوالی با اثرات متقابل رخ می‌دهند که می‌تواند بصورت افزایشی، متضاد و یا هم افزایی دیده شود [8]، [9]، [10]، [11]. علاوه بر این، شدت اثر عامل استرس می‌تواند با توجه به عوامل زمینه‌ای همچون نوع و مدت زمان قرارگیری در معرض استرس، شرایط قبلی، گونه‌های دیگر و محیط مورد نظر تعیین شود [11]، [12]، [13]. علیرغم آگاهی روزافزون از سیستم‌های چند تنش پیچیده موجود در اکوسیستم‌های آبی، سؤالات زیادی در مورد چگونگی تعامل همزمان عوامل استرس‌زا با یکدیگر و تأثیر مشترک بر گونه‌های آبی باقی می‌ماند.

در میان گروه‌های مختلف جانوران مرتبط با محیط‌های آبی، دوزیستان با توجه به تحرک فضایی کم و ویژگی‌های فیزیولوژیک و اکولوژیک خاص خود، از نظر توزیع و استفاده از زیستگاه از محدودیت‌های بالایی برخوردارند [14]، [15]، [16]، [17]. در طی سال‌های اخیر، گزارش‌های بسیاری در زمینه کاهش جمعیت دوزیستان در سرتاسر جهان داده شده بطوری که یک سوم گونه‌های در معرض خطر انقراض و آسیب پذیرترین گروه در میان مهره داران به آن‌ها تعلق دارد [18]. این پدیده برای اولین بار ۳ دهه پیش گزارش شد [19]، و از آن زمان مطالعات متعددی کاهش جمعیت جهانی دوزیستان را مورد بحث قرار داده است [20]، [21]، [22].

از سوی دیگر، با توجه به چرخه زندگی دوفازی و پوست نفوذپذیر، این جانوران ارتباط تنگاتنگی با محیط‌های آبی همچون رودخانه‌ها در طی مراحل اولیه زندگی، تولید مثل و زنده ماندن داشته و محیط آبی به عنوان اولین زیستگاه لاروهای آبی دوزیستان بی دم شناخته می‌شود [15]، [23]. از این رو، محدودیت‌های گوناگون که توسط گرادیان‌های محیطی اعمال می‌شود ممکن است در طول رشد لارو وجود داشته باشد [24]. علاوه بر این، هم افزایی بین عوامل استرس‌زای غیر زنده و قرار گیری در معرض آلاینده‌های شیمیایی می‌تواند اثرات منفی بر دوزیستان را تشدید کند [25].

در میان عوامل گوناگون، نقش فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بر رشد مراحل مختلف تخم، لارو و به دنبال آن جانور بالغ از اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان، مقادیر بالای رسانای الکتریکی، غلظت بالای نیترات، نیتریت، فسفات کل، کلرید، آمونیوم و فلزات کمیاب، مقادیر شدید pH، غلظت بالای آفت کش‌های آلی، مواد دارویی، سطوح بالای مواد آلی و غلظت کم اکسیژن محلول در آب می‌توانند با موفقیت کم در تخم ریزی، بقای لارو و سرعت رشد در ارتباط باشند [26]، [27]، [28]، [29]. از سوی دیگر، شرایط تغذیه‌ای و میزان اسیدیته آب می‌توانند بر میزان دگرذیسی و سرعت رشد دوزیستان بطور مستقیم یا غیر مستقیم اثرگذار باشند [30]. علاوه بر این، میزان تابش اشعه UV-B از جمله عوامل مؤثر بر ایجاد ناهنجاری رشد جنین در دوزیستان ساکن حوضچه‌های آفتابی شناخته شده است [31]. غلظت یون‌های فلزی محلول در آب نیز از جمله عوامل مؤثر بر تراکم و رشد دوزیستان می‌باشد. بطوری که یون‌های فلزی اثرات منفی بر میزان بقای لاروها و توانایی آن‌ها برای جلوگیری از شکار گذاشته و می‌توانند رفتار لاروها و دوزیستان بالغ را تغییر دهند [32]، [33].

از این رو، انجام مطالعات روی مراحل لاروی دوزیستان بی دم در انواع محیط‌های آشفته و بررسی فرآیندهای بازیابی در جهت ماندگاری گونه در یک محیط خاص بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این راستا، بررسی اثر فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب بر لاروهای

وزغ سبز *Bufoes sitibundus* بعنوان هدف اصلی در نظر گرفته شد. بدین منظور، فاکتورهایی همچون شاخص رشد، وضعیت فیزیکی، طول دوره گرماگذاری مراحل جنینی- لاروی، ناهنجاری، درصد بقاء و مرگ و میر، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

نمونه برداری در سه منطقه مشکوک به آلاینده‌های محیطی و یک منطقه کنترل حاوی آب چشمه و عاری از آلودگی واقع در حومه شهرستان اراک، استان مرکزی صورت گرفت. جهت انجام مطالعات آزمایشگاهی، نمونه‌های لارو در نه ظرف حاوی آب‌های آلوده و یک ظرف کنترل با ذکر نام هر منطقه بر ظروف پرورش، مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- مناطق مورد مطالعه

Table 1- Study areas

Pollution	Definition	Symbol	Number of water samples	Site
unpolluted spring (control)	spring water	Control	1	Anbarte village
Contaminated well in the vicinity of sodium sulfate factory	Mubarak Abad well water 1	M1	2	Mubarak Abad village
	Mubarak Abad well water 2	M2		
Contaminated well in the vicinity of petrochemical companies and refineries	well water	K	5	Kazaz village
	Sewage water	WK 100		
	Sewage 50%	WK50		
	Sewage 75%	WK75		
Nistan wetland with village sewage	seasonal water	C		
Contaminated well near the detergent factory	well water	S1	2	Sarsakhti village
		S2		

به منظور بررسی اثر آلاینده‌های محیطی در نمونه‌های آب جمع آوری شده بر لاروهای وزغ سبز *B. sitibundus*، رشته‌های تخم در فروردین ماه سال ۱۴۰۱، پس از شناسایی از محیط طبیعی با استفاده از دست و تور مخصوص نمونه گیری در هنگام صبح تا ظهر جمع آوری و جهت ادامه روند مطالعات آزمایشگاهی فوراً به آزمایشگاه تحقیقاتی جانورشناسی دانشگاه اراک منتقل شد. سپس، نمونه‌های تخم ابتدا در یک ظرف بزرگ حاوی آب چشمه قرار گرفته و در مرحله بعد تعداد ۵۰۰ تخم به هر ظرف منتقل شد. مطالعات آزمایشگاهی در دو مرحله صورت گرفت: ۱- بررسی و آنالیز ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب و ۲- بررسی وقایع زیستی جنین و لارو وزغ سبز در ظروف پرورش به صورت روزانه. در جهت انجام آنالیزهای شیمیایی تعداد ۱۰ نمونه آب (۹ نمونه آلوده و یک نمونه کنترل) مورد مطالعه قرار گرفت. در این راستا فاکتورهایی از قبیل pH، TDS (کل مواد جامد محلول)، EC (هدایت الکتریکی آب)، Salt (درصد شوری)، DO (اکسیژن محلول در آب)، BOD (اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی)، COD (اکسیژن مورد نیاز شیمیایی) مورد اندازه گیری قرار گرفت. علاوه بر این، بررسی میزان فلزات سنگین در هر نمونه با استفاده از روش تحلیل عنصری در دستگاه طیف سنجی پلاسمای القایی (ICP)، صورت گرفت. در نهایت، جهت مقایسه پارامترهای فیزیکوشیمیایی در نمونه‌های تیمار و کنترل مورد مطالعه از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده شد. از سوی دیگر، در جهت بررسی وقایع زیستی، عوامل مختلف همچون دما، رطوبت، تعداد تلفات و نمونه‌های زنده، طول و وزن نمونه‌ها در مراحل مختلف رشد و تعداد نمونه‌های ناهنجار به صورت روزانه در طول مدت گرماگذاری طی ماه‌های فروردین تا مرداد سال ۱۴۰۱، ثبت شد.

### آنالیزهای آماری

در جهت برآورد درصد و تخمین تابع بقاء در نمونه‌های مورد مطالعه، اطلاعات حاصل از تعداد تلفات و بازماندگان در طی دوره گرماگذاری با استفاده از آزمون کاپلان-مایر در نرم افزار آنلاین آماری R نسخه ۳.۶.۱ مورد بررسی قرار گرفت. سپس، معناداری نتایج حاصل با استفاده مقایسه‌های گروهی و دوتایی و به کارگیری آزمون لگاریتم رتبه‌های مانتل- هانزل مطالعه شد. به منظور

تخمین درصد مرگ و میر در مراحل مختلف حیات لاروهای مورد مطالعه و تعداد نمونه‌هایی که به دگردیسی کامل رسیدند از آزمون رگرسیون لجستیک و تابع GLM به همراه یک نمودار توصیفی طراحی شده در نرم افزار R بهره گرفته شد. از سوی دیگر، شاخص رشد با اندازه‌گیری میزان رشد در طول و وزن لارو در اواخر مراحل لاروی و شروع دگردیسی با انتخاب سه نمونه (تعداد نمونه‌ها بیش از ۱۰ عدد) بصورت تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور دو متغیر طول (SVL) و وزن بدن به ترتیب با استفاده از کولیس دیجیتال (دقت ۰/۰۱ میلی‌متر) و ترازوی دیجیتال (۰/۰۱ گرم) اندازه‌گیری و اطلاعات حاصل با به کارگیری آزمون‌های آماری تحلیل واریانس چند متغیره (MANOVA) و تک متغیره (ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی TukeyHSD مورد بررسی قرار گرفت. لیست شاخص‌های رشدی بررسی شده همراه با علائم اختصاری در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های لاروی وزغ سبز *Bufo sitibundus*

Table 2- Growth indices measured in the larval samples of the green toad *Bufo sitibundus*

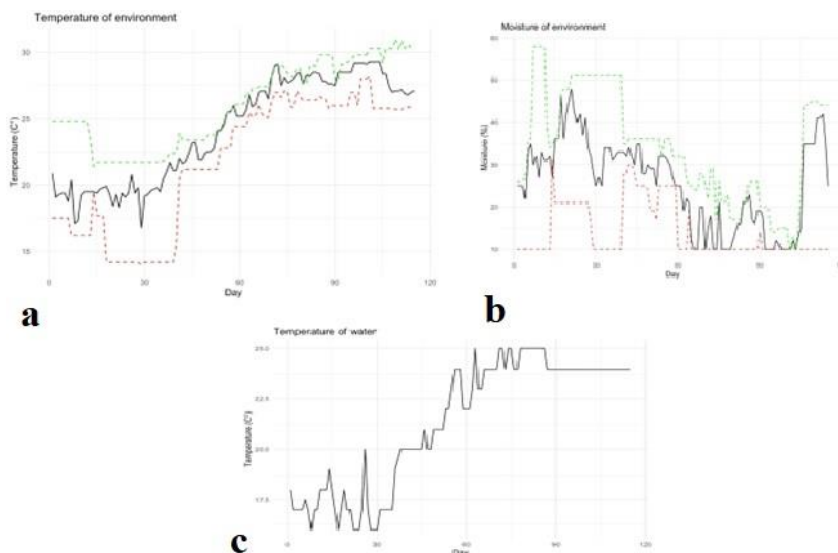
Definition	Symbol
(Length of biggest larva)	LBL
(Length at the beginning of metamorphosis)	LBM
(Weight at the beginning of metamorphosis)	WBM
(length at the end of metamorphosis)	LEM
(Weight at the end of metamorphosis)	WEM
Physical condition ( $\frac{\text{Snout-vent length}}{\text{weight}}$ )	$\frac{SVL}{W}$

در جهت بررسی وضعیت فیزیکی نمونه‌های مورد مطالعه، نسبت SVL به وزن بدن بعنوان معیاری از وضعیت فیزیکی در نظر گرفته شد و اطلاعات حاصل با استفاده از آزمون تحلیل واریانس تک متغیره (ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفت.

طول دوره جنینی (فاصله زمانی بین نقطه شروع آزمایش تا تفریح تقریباً نیمی از تخم‌ها)، زمان اولین دگردیسی (تعداد روزهای سپری شده تا دگردیسی کامل اولین نمونه)، طول دوره گرماگذاری (فاصله بین نقطه صفر آزمایش تا دگردیسی یا مرگ آخرین لارو زنده موجود در ظرف پرورش اندازه‌گیری شده و داده‌های حاصل با استفاده از نمودار طراحی شده در نرم افزار R مورد تحلیل قرار گرفتند. در نهایت، ناهنجاری رشدی با در نظر گرفتن صفاتی چون تورم شکمی، دم خمیده، دم مواج، دم کوتاه، روده پیچ خورده و بیرون زدگی روده از ناحیه تحتانی مورد مطالعه قرار گرفت.

## نتایج و بحث

با توجه به نمودارهای حاصل از ثبت دما، با نزدیک شدن به فصل تابستان (از فروردین تا مرداد) دمای محیط و دمای آب در ظروف پرورش بیشتر شد. از سوی دیگر، رطوبت محیط آزمایشگاه با وجود نوسانات زیاد، در فصل تابستان میزان پایین‌تری را نشان داد (شکل ۱).

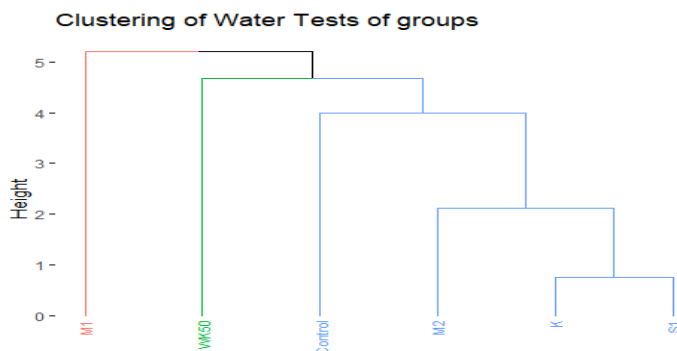


شکل ۱- تغییرات (a) دمای محیط، (b) رطوبت و (c) دمای آب در طول دوره گرماگذاری

Figure 1- Changes of a) environmental temperature, b) humidity and c) water temperature during the incubation period

### نتایج آنالیزهای فیزیوشیمیایی آب

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون لجستیک، میزان دو فاکتور COD و pH تفاوت معناداری را بین ظروف تیمار و کنترل نشان داد. که در این میان، COD بیشترین و pH کمترین میزان را بصورت معنادار در ظروف تیمار نسبت به کنترل نشان داد. از سوی دیگر، سه فاکتور TDS، EC و Salt در نمونه آب‌های M1 و M2 بسیار بالا بود که نشان دهنده شوری بسیار بالای آب در مناطق مذکور است. از سوی دیگر، نمودار حاصل از شاخص‌های فیزیوشیمیایی در نمونه‌های آب مناطق مختلف، سه شاخه مجزا را نشان داد. براین اساس، نمونه M1 با توجه به میزان شوری بیشتر که به دلیل نزدیکی با ناحیه کویری می‌باشد و نیز میزان بالای TDS و EC، متفاوت‌تر از سایرین بود و نمونه‌های کنترل، M2، S و K در یک شاخه قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب

Figure 2- Dendrogram of water physicochemical indicators

جدول ۳- دندروگرام شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب

Table 3- Dendrogram of water physicochemical indicators

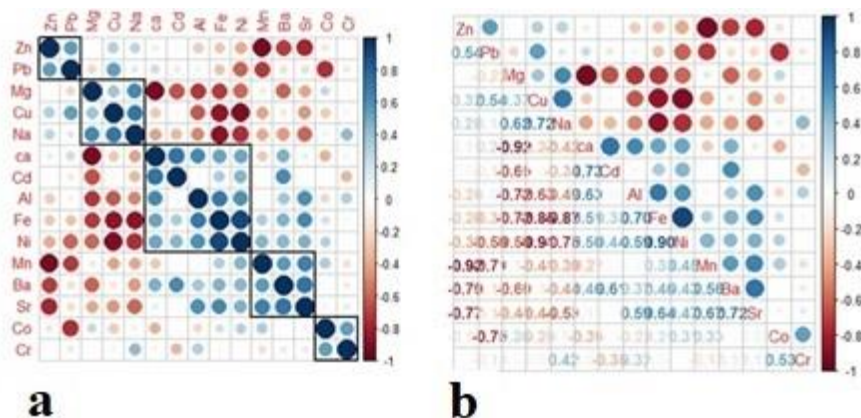
Variable	M1	M2	K	S1 & S2	KW50%	C	Control
PH	7.10	7.20	7.40	7.40	7.20	7.66	7.90
TDS	2980.00	1592.00	789.00	386.00	581.00	546.00	211.00
salt	2.40	1.20	0.50	0.20	0.40	0.30	0.10
EC	4520.00	2410.00	1204.00	587.00	878.00	824.00	321.00
DO	7.10	6.39	6.91	6.65	0.74	*	7.80
BOD	0.63	0.38	0.39	2.00	11.91	*	3.00
COD	151.00	148.00	152.00	156.00	194.00	*	6.00

## نتایج حاصل از تحلیل عنصری

مقادیر حاصل از تجزیه عنصری نمونه‌های آب با استفاده از دستگاه ICP، در جدول ۴ ارائه گردیده است و نمودار توصیفی همبستگی حاصل از مقادیر به دست آمده در شکل ۳ نشان داده شده است. نمودار توصیف همبستگی حاصل از مقادیر فلزات سنگین با استفاده از دستگاه ICP بازگوکننده همبستگی مثبت یا منفی بین عناصر مورد مطالعه بود. که در این میان، همبستگی قوی بین عناصر روی و سرب؛ منیزیم، مس و سدیم؛ کلسیم، کادمیوم، آلومینیوم، آهن و نیکل؛ منگنز، باریم و استرانسیم؛ کبالت و کروم مشهود بود. همبستگی‌های مذکور، حضور هر عنصر با عناصر همبسته آن را در هر کدام از ظروف پرورش نشان می‌دهد (شکل ۳). از سوی دیگر، نمودار دندروگرام تهیه شده از مقادیر فلزات سنگین مورد مطالعه، وجود سه شاخه تیمار را از مجموع نمونه آب‌های مورد مطالعه نشان داد که در این میان نمونه کنترل همبستگی مجزایی را نسبت به سایرین نشان داد که بازگوکننده شیمی متفاوت آن از نظر عناصر سنگین است (شکل ۴).

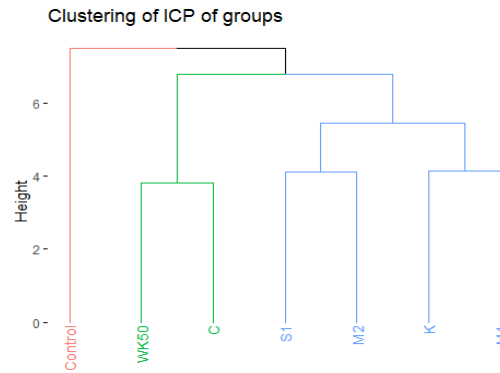
جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه عنصری نمونه‌های آب با استفاده از دستگاه ICP. اعداد بر حسب میلی گرم بر لیتر می باشند.  
Table 4- Results of elemental analysis of water samples using ICP device. Numbers are in milligrams per liter.

component	control	K	WK50%	S1 & S2	M1	M2	C
Ca	78.64	73.65	73.1	70.36	71.27	72.5	75.21
Mn	0.075	0.0805	0.074	0.0732	0.0806	0.0793	0.0702
Mg	20.63	24.25	25.6	27.56	26.58	27.59	25.15
Cu	0.0002	0.00065	0.00097	0.00056	0.00054	0.0005	0.00096
Fe	0.09	0.135	0.11	0.123	0.1236	0.1159	0.1003
Zn	0.0053	0.00148	0.0069	0.00764	0.00125	0.00365	0.0068
Co	0.00036	0.00089	0.00025	0.00085	0.000269	0.000657	0.000254
Ba	0.00065	0.000682	0.00063	0.00058	0.00064	0.00062	0.00062
Sr	1.69	1.87	1.33	1.35	1.89	1.256	1.25
Al	0.125	0.1168	0.11	0.1145	0.1198	0.11247	0.1178
Cd	0.00058	0.000569	0.000556	0.00045	0.00045	0.000546	0.00052
Pb	0.036	0.03369	0.038	0.0354	0.0361	0.0324	0.0382
Cr	0.00065	0.000681	0.00061	0.00069	0.00065	0.000639	0.000682
Ni	0.00023	0.000187	0.00013	0.000156	0.000159	0.000187	0.000126
Na	50.36	52.369	52.2	52.98	51.968	52.78	54.36



شکل ۳- (a و b) نمودار توصیفی همبستگی میان عناصر موجود در نمونه‌های آب جمع آوری شده است.

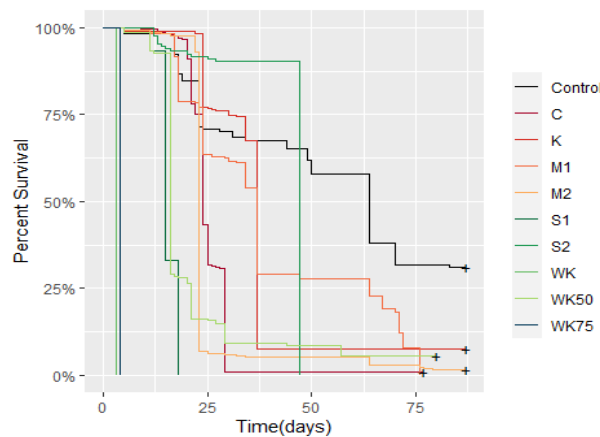
Figure 3- (a and b) Descriptive diagram of correlation between the elements present in the collected water samples.



شکل ۴- دندروگرام حاصل از دسته بندی نمونه آب‌های تیمار و کنترل، از نظر همبستگی عناصر حاصل از نتایج ICP-OES  
 Figure 4- Dendrogram obtained from the classification of treated and control water samples, in terms of the correlation of the elements obtained from the ICP-OES results

### نتایج حاصل از مشاهدات و ثبت وقایع زیستی

نرخ بقاء وزغ سبز (*B. sitibundus*): با توجه به نتایج حاصل از تخمین بقاء در تعداد ۵۰۰ تخم وزغ سبز *B. sitibundus* با استفاده از آزمون‌های کاپلان-مایر و لگاریتم رتبه‌های مانتل-هنزل، درصد بقاء در طول زمان تفریح تا دگردیسی در همه نمونه‌ها رو به کاهش بود. در این میان، میزان بقاء در لاروهای نمونه کنترل بطور معناداری بالاتر از سایر ظروف نشان داده شد (شکل ۵).



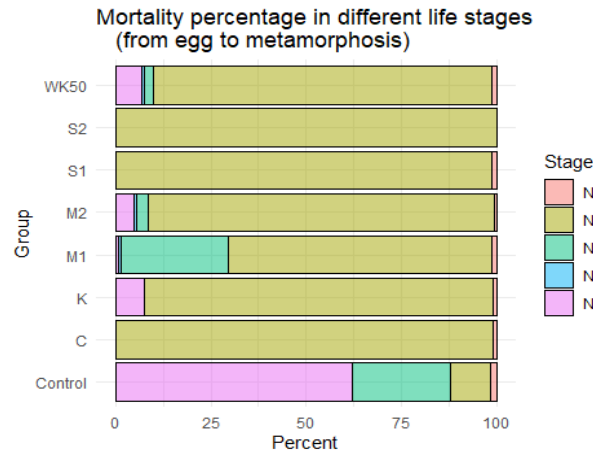
شکل ۵- منحنی‌های مقایسه‌ای درصد بقا نمونه‌های پرورش یافته وزغ سبز *B. sitibundus* در ظروف مختلف پرورش از نمونه آب‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل با استفاده از آزمون کاپلان مایر

Figure 5- Comparative curves of percentage of survival of green toad *Bufotes sitibundus* in different culture containers from different water samples compared to the control group using the Kaplan-Meier test

### درصد مرگ و میر

نتایج حاصل از آزمون رگرسیون لجستیک و تابع GLM، میزان مرگ و میر کمتری را در گروه کنترل نسبت به سایرین بطور معنادار نشان داد (ضریب رگرسیون:  $-۲/۷۹$ ، سطح معناداری  $\geq ۰/۰۵$ ). از سوی دیگر، بیشترین میزان مرگ و میر بین مراحل تفریح تا دگردیسی (N2) و بیشترین تعداد دگردیسی (N5) در نمونه‌ی کنترل مشاهده شد (شکل ۶).





شکل ۶- میزان مرگومیر وزغ سبز (*B.sitibundus*) در مراحل مختلف رشد. N1: میزان مرده‌ها قبل از تفریخ، N2: میزان مرده‌ها بین تفریخ تا دگرذیسی، N3: میزان مرده‌ها از شروع دگرذیسی تا مشاهده دست، N4: میزان مرده‌ها از مشاهده دست تا جذب دم، N5: دگرذیسی کامل  
Figure 6- Mortality rate of green toad (*B.sitibundus*) in different growth stages. N1: the amount of dead before hatching, N2: the amount of dead between hatching and metamorphosis, N3: the amount of dead from the beginning of metamorphosis to the observation of the hand, N4: the amount of dead from the observation of the hand to the absorption of the tail, N5: complete metamorphosis

### شاخص رشد

نتایج حاصل از آزمون واریانس چند متغیره (MANOVA) نشان داد که اندازه تأثیر در شاخص‌های رشدی گروه‌های تیمار و کنترل، متفاوت است. از سوی دیگر، نتایج حاصل از بررسی ضریب اتا چندمتغیره (MANOVA (Eta<sup>2</sup>))، وجود گروه بندی‌های قوی و معنادار را در شاخص‌های رشدی نشان داد (جدول ۵). نتایج شاخص رشدی در ۶ صفت LLL، LSL، LBM، LEM، WMB و WEM عبارتند از:

LBM: K > M2, LSL: K > M2, WK50 > M1 = control = C = S2, LLL: K > M2, WK50 > M1 > control > C > S2  
WBM: K > WK50 > control, تقریباً همه یکسان و با توجه به آزمون آنووا همه در یک گروه قرار گرفتند: LEM: WK50 > M1 > control > C > S2  
WEM: K > control > M2 > WK50 > M1, M2 > control, M1

جدول ۵- نتایج حاصل از آزمون واریانس چند متغیره مانووا

Table 5- The results of the multivariate variance MANOVA test

Comparison type	Number of groups	Degrees of freedom (Df)	p-value	Eta <sup>2</sup>
Group	10	9	P < 0.0001	0.91

### وضعیت فیزیکی (SVL/W) نمونه‌های وزغ سبز *B.sitibundus* پس از دگرذیسی

نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان داد که این شاخص در همه‌ی گروه‌های تیمار و کنترل دارای تفاوت معنادار است (P < 0.001) (جدول ۶)، و براساس نتایج حاصل از آزمون تعقیبی TukeyHSD، ۷۰ درصد تیمارها، اختلاف معناداری را نسبت به یکدیگر نشان دادند (P < 0.05).

جدول ۴- نتایج حاصل از نتایج حاصل از آزمون تخمین واریانس تک متغیره‌ی ANOVA برای بررسی وزن در پایان دگرذیسی وضعیت

فیزیکی (SVL/W)، Df: درجه آزادی، P value: معناداری

Table 4- The results of the univariate ANOVA variance estimation test to check the weight at the end of the transformation of the physical condition (SVL/W), Df: degree of freedom, P value: significance

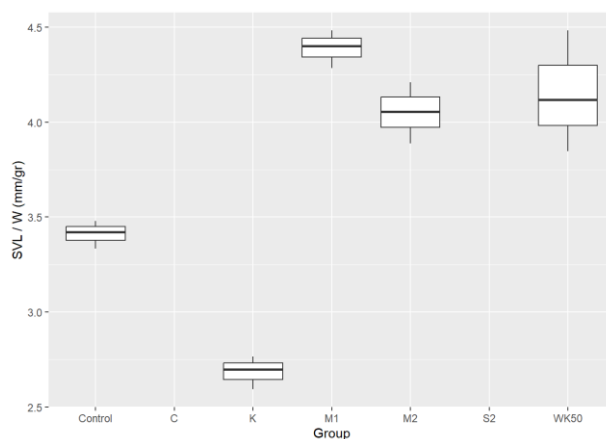
Df	F value	P value
----	---------	---------

Group	4	47.43	P < 0.001
-------	---	-------	-----------

در این میان، بالاترین سطح وضعیت فیزیکی (بالاترین میزان طول بدن نسبت به وزن) در نمونه‌های وزغ سبز *B. sitibundus* پس از دگردیسی در M1 مشاهده شد که نسبت به نمونه‌های موجود در ظروف کنترل و K از تفاوت معنادار برخوردار بود. علاوه بر این، نمونه‌های ظرف K کمترین میزان وضعیت فیزیکی را بطور معناداری نسبت به سایرین نشان دادند و به تنهایی در گروهی مجزا جای گرفتند (شکل ۷).

### طول دوره لاروی، دگردیسی و گرماگذاری

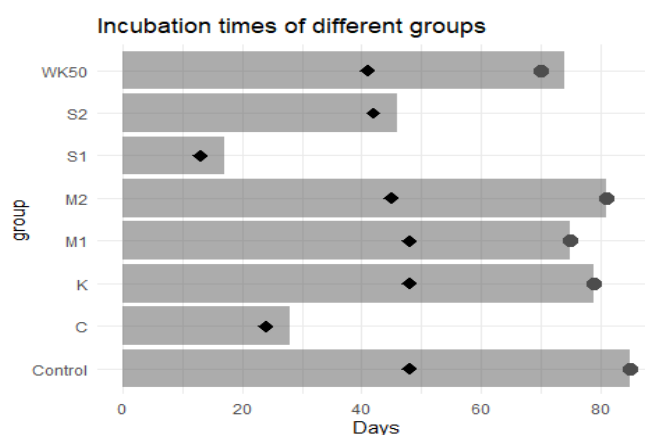
از سوی دیگر، با توجه به نمودارهای توصیفی، بیشترین زمان کل گرماگذاری در ظرف کنترل (۸۵ روز) و کمترین زمان گرماگذاری در S1 نشان داده شد. گرماگذاری S1 جهت اطمینان از نتیجه بدست آمده و مجدداً تکرار شد و نمونه‌ها در کمتر از ۲۰ روز همگی تلف شدند (شکل ۸).



شکل ۷- مقایسه وضعیت فیزیکی پس از دگردیسی ( $\frac{SVL}{W}$ ) در نمونه‌های *B. sitibundus* تیمار شده با آب های آلوده و گروه کنترل  
**Figure 7- Comparison of physical condition after metamorphosis (SVL/W) in samples of *Bufo sitibundus* treated with polluted water and control group**

### ناهنجاری

از سوی دیگر، نتایج حاصل از بررسی ناهنجاری در ۶ صفت مورد مطالعه، بیشترین میزان ناهنجاری در گروه‌های M1 و M2 (آب چاه‌های واقع در روستای مبارک آباد در مجاورت کارخانه سولفات سدیم) و کمترین آن در گروه کنترل (آب چشمه روستای عنبرته فاقد هر گونه آلاینده) مشاهده شد (جدول ۷).



شکل ۸- طول دوره لاروی، دگردیسی و گرماگذاری. اشکال لوزی نشان دهنده زمان شروع دگردیسی و همچنین اتمام دوره لاروی است (زمانی که اولین نمونه از هر ظرف دگردیسی را آغاز کرده است). دایره‌ها نشان دهنده اتمام دوره دگردیسی جمعیت است (زمانی که آخرین نمونه از هر ظرف به دگردیسی رسیده است).

**Figure 8- Length of larval period, metamorphosis and incubation. The rhombus shapes indicate the time of onset of metamorphosis as well as the completion of the larval period (when the first specimen from each container has begun metamorphosis). Circles indicate the end of population metamorphosis (when the last sample from each container has metamorphosed)**

جدول ۷- تعداد ناهنجاری‌های مشاهده شده در هر ظرف

Table 7- The number of abnormalities observed in each container

Breeding containers	Twisted intestine	Edema	short tail	Bowel protrusion from the lower part	Diagonal and curved tail
control	5	0	0	0	0
WK50	63	40	6	30	45
K	30	10	0	20	20
C	33	20	3	9	3
M1	41	76	0	32	35
M2	48	86	0	38	31
S	10	26	1	6	18

Egea-Serrano و همکاران (۲۰۱۲) [34]، در یک بازبینی فراتحلیلی، اکولوژیکی و تکاملی، اثر مواد شیمیایی را بر خانواده‌های مختلف دوزیستان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن‌ها، اثر منفی آلاینده‌ها را بصورت ناهمگن و معنادار در نرخ بقاء در خانواده‌های *Ranidae*، *Pipidae*، *Bufo* و *Ambystomatida* نشان داد. در پژوهش مذکور، از بین آلاینده‌ها یخ‌شکن‌های جاده‌ای کشنده‌ترین و آفتکش‌ها، آلاینده‌های فاضلاب و شیمیایی اثر متوسط ۱۴/۵ درصدی در کاهش بقا داشتند. علاوه بر این، اثر منفی آلاینده‌های محیطی بر کاهش ۷/۵ درصدی جرم و ایجاد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی دوزیستان مورد مطالعه گزارش شد. از سوی دیگر، در پژوهش Egea-Serrano و همکارانش هیچ اثر کلی‌ای از آلاینده‌ها بر زمان تفریح و زمان دگردیسی یافت نشد [34]. در مطالعه حاضر با توجه به بالا بودن میزان COD و بالا بودن نرخ مرگ و میر در نمونه‌های آب آلوده می‌توان یکی از علل کاهش بقا را COD بالای آب‌های مذکور بیان کرد. همچنین بروز ناهنجاری‌های مختلف در لاروها نیز کاملاً قابل ارتباط با آلودگی شیمیایی این نمونه آب‌ها می‌باشد. از سوی دیگر، در نمودار حاصل از مقایسه درصد بقاء نمونه‌های پرورش یافته وزغ سبز، تنها گروه‌های کنترل، K، KW50%، M2 و M1 (به ترتیب با تعداد نمونه‌های دگردیسی یافته: ۱۵۵، ۳۸، ۳۴، ۲۴ و ۳ عدد) به دگردیسی کامل رسیدند. در مقابل، لاروهای موجود در ظروف KW100%، KW75%، S1 و S2 به دلیل وجود مقادیر بالای آلاینده‌های فیزیکی شیمیایی مورد مطالعه پیش از آغاز دگردیسی از بین رفتند. علاوه بر این، در پژوهش حاضر نیز تفاوت معناداری بین زمان شروع تفریح و زمان شروع دگردیسی نمونه‌های وزغ در نمونه‌های تیمار و کنترل مشاهده نشد. اما طول دوره گرماگذاری و دوران لاروی و دگردیسی در ظروف مختلف متفاوت بود.

از سوی دیگر، Arciszewski و همکاران (۲۰۱۴) [35]، اثر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مخازن آب را بر تراکم دوزیستان مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه مذکور اثر منفی یون‌های کلرید و آمونیوم بر تراکم *Rana temporaria* و *Triturus cristatus* و تأثیرگذاری مثبت یون منیزیم بر *Pelophylax esculentus* گزارش شد. از سوی دیگر، وجود یک رابطه مثبت بین pH و دما به ترتیب بر تراکم جمعیت‌های *Bombina bombina*، *Triturus cristatus* نیز مطرح شد. نتایج به دست آمده توسط Arciszewski و همکاران (۲۰۱۴) [35]، اثرات متضادی که خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف محیط آبی می‌تواند بر تراکم دوزیستان داشته باشد را برجسته می‌کند [35]. علاوه بر این، Park و همکارانش (۲۰۱۴)، اثر سمیت ناشی از پساب فاضلاب تصفیه شده شهری را بر جنین‌های وزغ شکم آتشین *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura) مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها حاکی از اثرات معنادار آلاینده‌های محیطی بر لارو *B. orientalis* بود. بطوری که بروز صفاتی چون ناهنجاری سر، دیسپلازی چشم، تاول شکمی، پیچ خوردگی غیرطبیعی روده در همه نمونه‌های تیمار به خوبی مشهود بود. از سوی دیگر، در مطالعه مذکور اثر منفی COD بر نرخ رشد و اندازه دم کوتاه

لاروهای تیمار نسبت به گروه کنترل گزارش شد [36]. در مطالعه حاضر با توجه به بالا بودن میزان PH، COD، و وجود بیش از حد مجاز فلزات سنگین در یک نمونه تیمار، کاهش نرخ رشد در نمونه آب‌های ظروف پرورش و بالاتر بودن نرخ رشد در آب کنترل و مشاهده‌ی ناهنجاری‌ها در نمونه‌های موجود در همه‌ی ظروف به جز ظرف کنترل قابل توجیه است.

علاوه بر این، در میان فاکتورهای مختلف مؤثر بر گروه‌های مختلف دوزیستان، مطالعات زیادی نقش نمک را بر افزایش نرخ مرگ و میر، ناهنجاری‌های رشدی، استرس فیزیولوژیکی و تغییر در میزان رشد و تکوین در طول مراحل زندگی دوزیستان نشان داده است [37]، [38]، [39]، [40]. در این میان، Hopkins و Brodie (۲۰۱۵) [41]، میزان سازگاری دوزیستان با شوری آب را با بررسی گزارشات تهیه شده در طی سال‌های ۱۹۵۰-۲۰۱۴، مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بازبینی آن‌ها گویای تحمل بالای دوزیستان بدون دم نسبت به طیف گسترده نمک موجود در محیط را نشان داد. با این حال، وجود تفاوت‌های معنادار مرتبط با ترکیبات نمکی مختلف بر رشد و نمو دوزیستان در مراحل لاروی به خوبی مشهود بود [41]. همچنین، در مطالعات مختلف وجود اثرات سوء قرار گیری در معرض غلظت‌های متفاوت نمک از جمله تغییر در نرخ رشد و نمو و وجود ناهنجاری، حساسیت به بیماری و افزایش نرخ مرگ و میر گزارش شده است [42]، [43]، [44]، [45]. در بخشی از مطالعات خود تأثیر نمک بر ویژگی‌های ریختی قورباغه‌های چوبی (Rana sylvatica) را بررسی کردند. نتایج آن‌ها اثر معنادار شوری را بر افزایش طول نسبی و عرض بدن نشان داد. Ocampo و همکاران (۲۰۲۲) [40]، تأثیر نمک جاده را بر روی دو گونه دوزیست سمندرهای خالدار (Ambystoma maculatum) و قورباغه‌های چوبی (Lithobates sylvaticus) بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که نمک منجر به تأخیر در زمان هتچ شدن و تغییر شکل در لارو سمندرهای خالدار می‌شود. از سوی دیگر، کاهش ۶۲ درصدی و ۳۰ درصدی نرخ بقا به ترتیب در نمونه‌های سمندر و قورباغه گزارش شد.

در پژوهش حاضر، مناطق M2، K و WK50 بالاترین سطح از نظر طول بدن لارو را نشان دادند. بطوری که از نظر فاکتور طول بدن در یک گروه مجزا قرار گرفته و با سایر تیمارها تفاوت معنادار را نشان دادند. علاوه بر این، وجود میزان بالای نمک موجود در سایت‌های M1، M2، K و WK50 (به ترتیب، ۲/۴، ۱/۲، ۰/۵، ۰/۴ درصد)، میزان بالای TDS (به ترتیب، ۲۹۸۰ و ۱۵۹۲ میلی گرم بر لیتر) و EC (به ترتیب، ۴۵۲۰ و ۲۴۱۰ میکروزیمنس)، حاکی از سختی و شوری بالای نمونه‌های مذکور بود. با توجه به مشاهدات آزمایشگاهی، نرخ بقاء بسیار پایین و میزان بالای ناهنجاری‌های رشدی در ظروف M1 و M2 بسیار پایین بود. از سوی دیگر، در نمونه تیمار چاه کزاز، مقادیر بالای دو فاکتور TDS و EC و نرخ پایین بقاء به خوبی مشهود بود. با توجه به مقادیر به دست آمده در سه سایت M1، M2 و K، میتوان ناهنجاری‌های مختلفی همچون بروز ادم یا تورم در ناحیه شکمی لاروهای وزغ سبز را در ظروف مذکور توجیه کرد.

طبق تحقیقات Beck و Congdon (۲۰۰۰)، قورباغه‌های بالغی که دوران لاروی طولانی‌تری داشته‌اند، در بزرگسالی نرخ متابولیسمی بالاتر، سرعت دویدن سریع‌تر، و استقامت بیشتری نشان می‌دهند. بنابراین دوره‌ی لاروی کوتاه و سرعت لاروها برای رسیدن به بلوغ، بر اساس انواعی از تنش‌ها، شاید لارو را به دگردیسی برساند، اما بقای قورباغه‌ی بالغ را کاهش می‌دهد [46]. یکی از مشاهدات مطالعه‌ی حاضر، دوران لاروی کوتاه‌تر در تمام نمونه‌ها نسبت به نمونه‌ی کنترل بود. به این معنا که دوره‌ی گرماگذاری که دوره‌ی جنینی و لاروی تمام نمونه‌های ظرف را شامل می‌شود، در ظرف کنترل طولانی‌ترین دوره بود. که می‌توان با در نظر گرفتن شرایط تنش در ظرف‌های تیمار، مکانیسم تلاش برای بقا را با تلاش لاروها برای زودتر رسیدن به دگردیسی تفسیر کرد. در مطالعه‌ی حاضر، دوره‌ی گرماگذاری ظرف کنترل، ۴ روز بیش‌تر از ظرف M2، ۶ روز بیش‌تر از ظرف K، ۱۰ روز بیش‌تر از ظرف WK50 بود. ظروف S1 و S2 و C هم که به دگردیسی نرسیدند و دوره‌ی گرماگذاری خیلی کوتاه‌تری از ظرف کنترل داشتند. این‌ها همه می‌تواند دلیلی بر شرایط تنش در ظروف پرورش باشد.

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، کمترین زمان انکوباسیون به آب منطقه S1 در دو تکرار تعلق داشت. فاز دگرذیسی در نمونه‌های منطقه مذکور بسیار زودتر از سایر مناطق آغاز شد. از این رو، مجاورت منطقه S1 با کارخانه مواد شوینده و ثبت میزان بالای فلزات Zn، Cr، Mg، Co، Na و نیز فاکتور COD به ایجاد تنش‌های فراوان بر لارو وزغ سبز و تلاش در جهت رشد کمتر در زمان کوتاه‌تر (طول لارو و زمان انکوباسیون به ترتیب: ۲/۹ میلی‌متر، ۱۵ روز) را می‌توان از دلایل مشاهدات حاصله بازگو کرد.

## اعلام تعارض منافع

در این پژوهش که مستخرج از پایان نامه است، تعارض منافع وجود ندارد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه افرادی که در انجام پژوهش حاضر مساعدت نمودند را به جای می‌آورند.

## منابع

- [1] Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *PNAS*, *114* (30), E6089–E6096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704949114>
- [2] Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J. B., & Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, *345* (6195), 401–406. <https://doi.org/10.1126/science.1251817>
- [3] Stillman, J.H. (2019). Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiology*, *34* (2), 86–100. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2018>
- [4] IPCC. (2021). Summary for policymakers. In V. Masson-Delmotte, P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J. B. R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, & B. Zhou (Eds.), *Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- [5] Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., & Zhang, Y. (2021). Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. *Journal of Hazardous Materials*, *405*, 124187. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124187>
- [6] Reid, L.M., & Dunne, T. (1984). Sediment production from forest road surfaces. *Water Resources Research*, *20* (11), 1753–1761. <https://doi.org/10.1029/WR020i011p01753>
- [7] Ruiz, G.M., Fofonoff, P.W., Carlton, J.T., Wonham, M.J., & Hines, A.H. (2000). Invasion of coastal marine communities in North America: Apparent patterns, processes, and biases. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *31*(1), 481–531.
- [8] Crain, C. M., Kroeker, K., & Halpern, B.S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, *11*(12), 1304–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x>
- [9] Gunderson, A.R., Armstrong, E.J., & Stillman, J.H. (2016). Multiple stressors in a changing world: The need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annual Review of Marine Science*, *8*, 357–378. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033953>
- [10] Todgham, A.E., & Stillman, J.H. (2013). Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: Relevance in a changing world. *Integrative and Comparative Biology*, *53* (4), 539–544. <https://doi.org/10.1093/icb/ict086>
- [11] Todgham, A.E., Schulte, P.M., & Iwama, G.K. (2005). Cross-tolerance in the tidepool sculpin: The role of heat shock proteins. *Physiological and Biochemical Zoology*, *78* (2), 133–144. <https://doi.org/10.1086/425205>
- [12] Gunderson, A.R., Tsukimura, B., & Stillman, J.H. (2017). Indirect effects of global change: From physiological and behavioral mechanisms to ecological consequences. *Integrative and Comparative Biology*, *57* (1), 48–54. <https://doi.org/10.1093/icb/ix056>
- [13] Harmon, J.P., Moran, N.A., & Ives, A.R. (2009). Species response to environmental change: Impacts of food web interactions and evolution. *Science (New York, N.Y.)*, *323* (5919), 1347–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1167396>
- [14] Gibbons, J.W., Winne, C.T., Scott, D.E., Willson, J.D., Glaudas, X., Andrews, K.M., Todd, B.D., Fedewa, L.A., Wilkinson, L., Tsaliagos, R.N. & Harper, S.J. (2006). Remarkable amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: Implications for wetland conservation. *Conservation Biology*, *20* (5), 1457–1465. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00443.x>
- [15] Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.
- [16] Hansen, N.A., Scheele, B.C., Driscoll, D.A., & Lindenmayer, D.B. (2018). Amphibians in agricultural landscapes: The habitat value of crop areas, linear plantings and remnant woodland patches. *Animal Conservation*, 1-11. <https://doi.org/10.1111/acv.12437>

- [17] Goldspiel, H.B., Cohen, J.B., Mcgee, G.G., & Gibbs, J.P. (2019). Forest land-use history affects outcomes of habitat augmentation for amphibian conservation. *Global Ecology and Conservation*, 19, e00686. <https://doi.org/10.1111/acv.12437>
- [18] IUCN. (2022). The IUCN red list of threatened species. Version 2022-1. ISSN 2307-8235. 2022.
- [19] Wake, D.B. (1991). Declining amphibian populations. *Science*, 253 (5022), 860-860. <https://doi.org/10.1126/science.253.5022.860>
- [20] Blaustein, A. R., Wake, D. B., & Sousa, W. P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8 (1), 60-71. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08010060.x>
- [21] Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., & Kuzmin, S.L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404 (6779), 752-755. <https://doi.org/10.1038/35008052>
- [22] Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischman, D.L., & Waller, R.W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306 (5702), 1783-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- [23] McDiarmid, R.W., & Altig, R. (1999). Tadpoles. The Biology of *Anuran Larvae*. 1st ed. The University of Chicago Press.
- [24] Figueroa, L. R., Acosta, N. R., & Nuñez, A. (2009). Effects of progressive desiccation on the larval development of *Pleurodema borellii*. *Methods in Ecology and Systematics*, 4 (2), 1–7.
- [25] Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S., Simoniello, M.F., Colussi, C.L., Boccioni, A.P. C., & Sigrist, M. (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: *Bufo*idae) tadpoles. *Heliyon*, 5 (10), e02601. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02601>
- [26] Chambers, DL. (2011). Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians. *Journal of Herpetology*, 45 (2), 219-223. <https://doi.org/10.1670/09-211.1>
- [27] Daam, M.A., Ilha, P., & Schiesari, L. (2020). Acute toxicity of inorganic nitrogen (ammonium, nitrate and nitrite) to tadpoles of five tropical amphibian species. *Ecotoxicology*, 29 (9). <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02247-8>
- [28] Peluso, J., Coll, C.S.P., & Aronzon, C.M. (2021). In situ exposure of amphibian larvae (*Rhinella fernandezae*) to assess water quality by means of oxidative stress biomarkers in water bodies with different anthropic influences. *Chemosphere*, 271, 129598. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129598>
- [29] Peluso, J., Chehda, A.M., Olivelli, M.S., Ivanic, F.M., Coll, C.S.P., Gonzalez, F., Valenzuela, L., Rojas, D., Cristos, D., Butler, M., Candal, R.J., & Aronzon, C.M. (2023). Metals, pesticides, and emerging contaminants on water bodies from agricultural areas and the effects on a native amphibian. *Environmental Research*, 226, 115692. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115692>
- [30] Beattie, R.C., Tyler-Tones, R., & Baxter, M.J. (1992). The effects of pH, aluminium concentration and temperature on the embryonic development of the European common frog, *Rana temporaria*. *Journal of Zoology*, 228, 557-570.
- [31] Ankley, G.T., Tietge, J.E., DeFoe, D.L., Jensen, K.M., Holcombe, G.W., Durhan, E.J., & Diamond, S. A. (2009). Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 2530-2542. <https://doi.org/10.1002/etc.5620171222>
- [32] Lambert, M.R.K. (2001): Residue loads in amphibians used as biomarkers of pesticide levels entering food chains in sub-Saharan Africa. *African Journal of Herpetology*, 50, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02601>
- [33] Ortiz-Santaliestra, M.E., Marco, A., & Lizana, M. (2005): Sensitivity and behavior of the Iberian newt, *Triturus boscai*, under terrestrial exposure to ammonium nitrate. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 662-669. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0803-z>
- [34] Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M., & Torralva, M. (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a met analytic review. *Ecology and evolution*, 2 (7),1382-97. <https://doi.org/10.1002/ece3.249>
- [35] Arciszewski, M., Chętnicki, W., Jekatierynczuk-Rudczyk, E., & Wereszczuk, A. (2014). Effect of physico-chemical parameters of water reservoirs on amphibian density. *North-Western Journal of Zoology*, 10 (1),167-72.
- [36] Park, C.J., Ahn, H.M., Cho, S.C., Kim, T.H., Oh, J.M., Ahn, H.K., Chun, S.H., & Gye, M.C. (2014). Developmental toxicity of treated municipal wastewater effluent on *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura) embryos. *Environmental toxicology and chemistry*, 33 (4),954-61. <https://doi.org/10.1002/etc.2519>
- [37] Mattheis, M. (2019). Road salt effects on larval performance traits and tail anatomy in the wood frog (*Rana sylvatica*). Southern Connecticut State University.
- [38] Schlarb, AM. (2021). The Effects of salinity on canadian toad (*Anaxyrus hemiophrys*) larvae and post-metamorphic juveniles (Doctoral dissertation, North Dakota State University).
- [39] Frymus, L.E., Goedert, D., Zamora-Camacho, F.J., Smith, P.C., Zeiss, C.J., Comas, M., & Brady, S.P. (2021). Salted roads lead to edema and reduced locomotor function in wood frogs. *BioRxiv*, 2021-03. <https://doi.org/10.1101/2021.03.23.436008>
- [40] Ocampo, M., Chuirazzi, C., & Takahashi, M.K. (2022). The effects of road salt (NaCl), predation, and competition on the growth and community interactions of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) and wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Environmental Pollution*, 315, 120349. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120349>
- [41] Hopkins, G.R., & Brodie, E.D. (2015). Occurrence of amphibians in saline habitats: a review and evolutionary perspective. *Herpetological Monographs*, 29 (1),1-27. <https://doi.org/10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-14-00006>
- [42] Karraker, NE., & Ruthig, GR. (2009). Effect of road deicing salt on the susceptibility of amphibian embryos to infection by water molds. *Environmental Research*, 109, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.09.001>
- [43] Brady, SP. (2013). Microgeographic maladaptive performance and deme depression in response to roads and runoff. *PeerJ*, 1, e163. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.09.001>

- [44] Scheuhammer, A., Braune, B., Chan, H.M., Frouin, H., Krey, A., Letcher, R., Loseto, L., Noel, M., Ostertag, S., Ross, P., & Wayland, M. (2015). Recent progress on our understanding of the biological effects of mercury in fish and wildlife in the Canadian Arctic. in *Science of the Total Environment*, 509–510, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.142>
- [45] Hopkins, G.R., Brodie, E., & French, S.S. (2014). Developmental and evolutionary history affect survival in stressful environments. *PLoS One*, 9, e95174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095174>
- [46] Beck, C.W., & Congdon, J.D. (2000). Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toad, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Functional ecology*, 14 (1),32-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00386.x>