

EFECTES DE L'AMONI SOBRE EL DESENVOLUPAMENT LARVARI DEL GRIPAUET COMÚ

(Pelodytes punctatus)



Mar González Colet
Institut Salvador Dalí
Departament de Biologia
Tutor: Albert Montori
2n de Batxillerat
Curs 2015 - 2016

Agraïments

Agraeixo a Albert Montori, el meu tutor del treball, tot l'esforç i la paciència que ha tingut, reunint-se amb mi quan ho he necessitat, contestant tots els correus fins i tot a les vacances, acompanyant-me a recollir els capgrossos al Garraf, enviant-me treballs relacionats i responent-me tots els dubtes que se m'han plantejat al llarg de tot el treball. També haig d'agrair a la meva amiga Raquel Fernández la seva ajuda i companyia mentre feia la part experimental del treball. Per últim, agraeixo als meus pares, Miguel González i Maria Colet, i a la meva germana, Alba González, la gran paciència que han tingut escoltant els meus dubtes sobre aspectes del treball i pel seu interès pel tema.

ÍNDIX

- Introducció pàg. 6

I. EFECTES DELS COMPOSTOS NITROGENATS I ELS FOSFATS SOBRE EL MEDI

1. La contaminació de l'aqüífer superficial	pàg. 7
1.1. Abocaments urbans	pàg. 9
1.2. Abocaments d'origen agrícola i ramader	pàg.10
1.3. Abocaments industrials	pàg.10
1.4. La salinització dels aqüífers	pàg.11
2. Problemàtica mediambiental dels compostos nitrogenats i els fosfats	pàg.12
2.1. Els compostos nitrogenats	pàg.12
2.2. El cicle del nitrogen	pàg.14
2.3. Els nitrats	pàg.16
2.4. Els nitrits	pàg.17
2.5. L'amoni	pàg.18
2.6. Els fosfats	pàg.18
3. L'eutrofització	pàg.19
3.1. Conseqüències de l'eutrofització	pàg.19
4. Principals causes del declivi dels amfibis	pàg.22
4.1. La pèrdua d'hàbitat	pàg.22
4.2. La introducció d'espècies	pàg.23
4.3. La qualitat del medi aquàtic	pàg.23
5. Efectes dels compostos nitrogenats i els fosfats sobre els amfibis	pàg.24

II. DISSENY EXPERIMENTAL

1. Espècie triada. El gripauet comú (<i>Pelodytes punctatus</i>)	pàg.25
1.1. Descripció i biologia	pàg.25
1.2. Hàbitat	pàg.27
1.3. Alimentació	pàg.27
1.4. Distribució	pàg.28
1.5. Amenaces	pàg.29
2. Elecció del contaminant: l'amoni	pàg.30
3. Hipòtesis del treball	pàg.32
4. Metodologia experimental	pàg.32
4.1. Metodologia general	pàg.32
4.2. Preparació de les dissolucions de clorur d'amoni	pàg.35
4.2.1. Objectius	pàg.35
4.2.2. Materials, aparells i productes	pàg.35
4.2.3. Procediment	pàg.35
4.2.4. Càlculs i tractament de dades	pàg.37
4.3. Metodologia específica per a l'anàlisi de la mortalitat (Hipòtesi 1)	pàg.39
4.3.1. Objectius	pàg.39
4.3.2. Materials, aparells i productes	pàg.39
4.3.3. Procediment	pàg.39
4.4. Metodologia específica per a l'anàlisi del creixement larvari (Hipòtesi 2)	pàg.40
4.4.1. Objectius	pàg.40

4.4.2. Materials, aparells i productes	pàg.40
4.4.3. Procediment	pàg.41
4.4.4. Càlculs i tractament de dades	pàg.42
4.5. Metodologia específica per a l'anàlisi de l'activitat (Hipòtesi 3)	pàg.43
4.5.1. Objectius	pàg.43
4.5.2. Materials, aparells i productes	pàg.43
4.5.3. Procediment	pàg.43
4.5.4. Càlculs i tractament de dades	pàg.43
5. Resultats	pàg.44
5.1. Hipòtesi 1	pàg.44
5.2. Hipòtesi 2	pàg.47
5.3. Hipòtesi 3	pàg.50
6. Conclusions	pàg.53
7. Referències bibliogràfiques	pàg.54
8. Webgrafia	pàg.55
9. Annex	pàg.58

Introducció

El principal objectiu d'aquest treball és iniciar-me en l'àmbit experimental de la biologia, pel qual sempre he tingut interès i familiaritzar-me amb el mètode científic.

Abans d'escollir un tema per al treball, tenia clar que volia que tingués una part pràctica, és a dir, volia fer un treball experimental. Aquest va ser el motiu principal pel qual vaig descartar tants possibles temes que em semblaven molt interessants, però que no tenien cap part pràctica que es pogués dur a terme amb els recursos dels que disposava. Així, després de donar força voltes al tema del treball, finalment vaig escollir fer-lo sobre "*La influència dels compostos nitrogenats en els amfibis*", proposat pel meu tutor del treball, l' Albert Montori. Aquest tema era perfecte perquè tenia molt treball de camp i a més era sobre un àmbit que m'agradava, com és la biologia animal i la contaminació de caràcter antròpic.

La finalitat del treball és donar una visió sobre les conseqüències de l'activitat antròpica sobre la natura i ampliar la informació existent sobre els efectes que els compostos nitrogenats produeixen en els amfibis. Els amfibis habiten medis aquàtics d'aigua dolça, que poden contenir altes concentracions de compostos nitrogenats i fosfats com a resultat de les pràctiques agrícoles i de les aigües residuals urbanes. Aquests excessos de compostos contaminants causen alteracions sobre les espècies aquàtiques i desequilibris dels ecosistemes. Un grup d'animals potencialment afectats als canvis del medi aquàtic són els amfibis, sobretot durant els seus estadis aquàtics. Però a més cal dir que, aquest grup són molt bons indicadors de "l'estat de salut de l'ecosistema" perquè tenen una fase de vida aquàtica (període larvari) i una altra terrestre, després de la metamorfosi. En conseqüència poden patir els efectes de l'alteració a qualsevol dels dos medis.

He estructural el treball en dues parts. La primera s'anomena "*Efectes dels compostos nitrogenats i els fosfats sobre el medi*", en la qual es troba tota la informació elaborada a partir de la recerca per Internet i per alguns documents. Aquesta secció serveix per a tenir el coneixement de l'àmbit del treball de recerca abans d'iniciar la part

experimental. És imprescindible per endinsar-se en la matèria i adquirir els coneixements necessaris per plantejar les hipòtesis de treball, dissenyar els experiments i saber interpretar els resultats. La segona part del treball s'anomena "Disseny experimental" i conté la informació sobre l'espècie *Pelodytes punctatus*, escollida per a dur a terme el treball de camp, els informes de les pràctiques dutes a terme i la conclusió final.

I. EFECTES DELS COMPOSTOS NITROGENATS I ELS FOSFATS SOBRE EL MEDI

1. La contaminació de l'aqüífer superficial

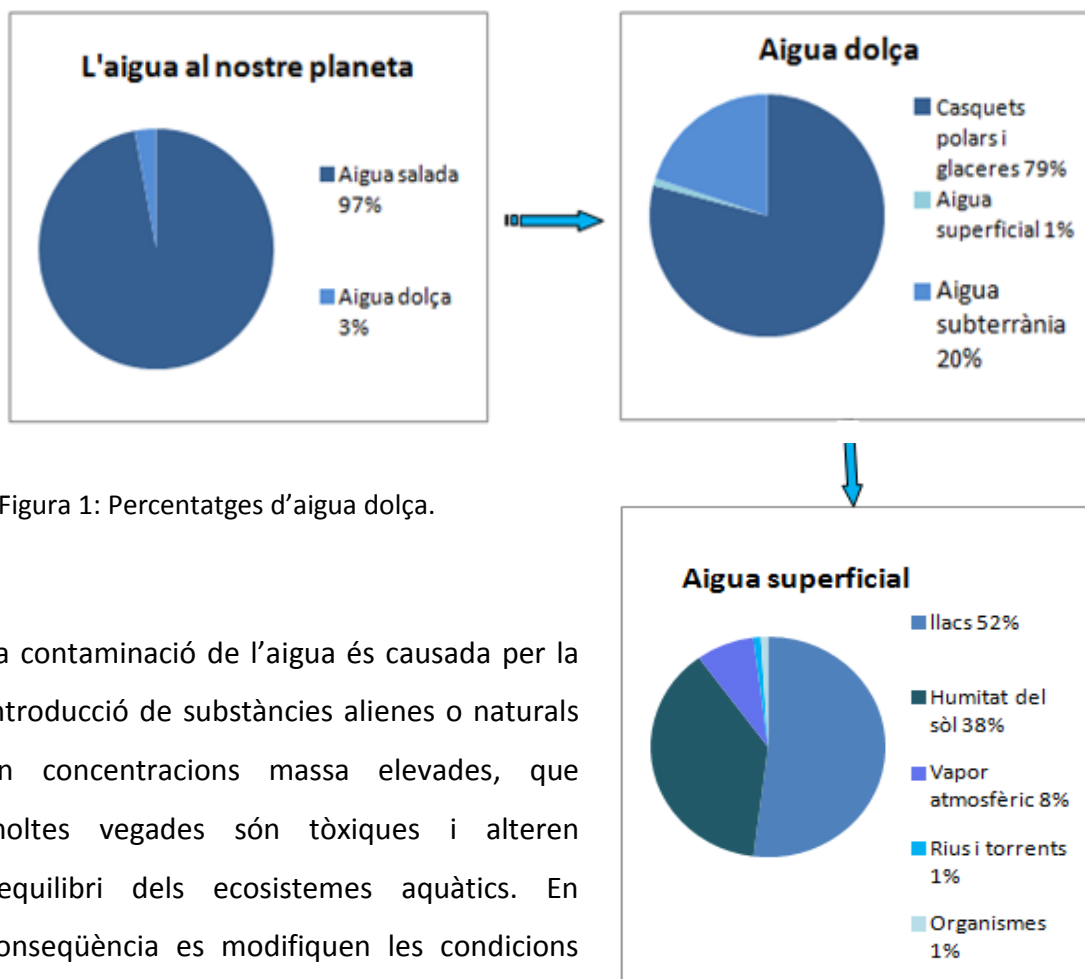


Figura 1: Percentatges d'aigua dolça.

La contaminació de l'aigua és causada per la introducció de substàncies alienes o naturals en concentracions massa elevades, que moltes vegades són tòxiques i alteren l'equilibri dels ecosistemes aquàtics. En conseqüència es modifiquen les condicions

naturals de l'ambient. Tothom associa la contaminació a abocaments antròpics, però també es pot considerar com a contaminació la natural produïda per fenòmens geològics com els volcans o fins i tot biològics com pot ser l'acumulació massiva de pol·len en el medi aquàtic en períodes concrets de l'any.

L'aigua és de gran importància per al desenvolupament de la vida ja que està basada en ella. Tots els éssers vius contenen una proporció d'aigua en major o menor quantitat, per exemple, els éssers humans estem formats per un 80% d'aigua. L'aigua dolça però, representa menys del 3% de tota l'aigua del nostre planeta (Figura 1) i la majoria es troba en forma de gel, formant els casquets polars.

L'aigua és un recurs renovable, ni es crea ni es destrueix, però cada vegada està més contaminada per l'activitat antròpica. La contaminació de les aigües altera els processos naturals per al desenvolupament de la vida. L'abocament de grans quantitats de residus generats per les activitats agrícoles i industrials contamina els oceans, mars, rius, llacs i aqüífers en general.

L'aigua dels mars i els rius ha estat escollida com el gran abocador de deixalles de tota mena: les industrials, les agrícoles o les urbanes. El volum de deixalles arriba a unes dimensions tals que no és exagerat dir que els rius i els mars ja s'han convertit en una gran claveguera de la humanitat.

L'aigua té una capacitat de depuració natural, ja que hi viuen bacteris descomponedors que transformen la matèria orgànica en sals minerals consumint oxigen. Abans els rius i els llacs es mantenien nets gràcies a aquest mecanisme, però és molt lent i l'aigua queda saturada perquè s'hi aboquen contínuament grans quantitats de residus.

La humanitat és la gran responsable de la contaminació, tot i que també pot tenir causes naturals, com les aigües contaminades amb materials com el sulfur d'hidrogen procedent de l'activitat volcànica o metalls pesants com el mercuri, que es troba naturalment a l'escorça de la terra.

Les principals causes de la contaminació antropogènica de l'aigua provenen d'origens diferents:

1.1. Abocaments urbans

Són les aigües procedents de la neteja personal i de la neteja de la llar. Provenen de cases, hospitals, escoles, carrers, etc. Contenen contaminants orgànics com orina, femta i restes de menjar. També contenen microorganismes patògens procedents de persones malaltes, productes de neteja amb una gran quantitat de fosfats, restes de pintura o fàrmacs que van a parar a rius, mars, llacs o embassaments i contaminen les aigües (Figura 2). L'Institut Català d'Investigació de l'Aigua (ICRA) juntament amb altres entitats, va participar en un treball en que es van analitzar mostres d'aigua en set punts al llarg del riu Llobregat i el seu afluent, l'Anoia. Es van detectar un total de 29 fàrmacs entre els quals es troben antiinflamatoris, analgèsics, antibiòtics i antidepressius. Els compostos químics analitzats són metabolitzats pel cos i expulsats a través de l'orina. La presència d'aquestes medicines ha provocat una disminució en la biodiversitat d'algunes espècies d'insectes aquàtics hi ha provocat una disminució en la biodiversitat d'algunes espècies d'insectes aquàtics. Les hormones provinents de les restes d'anticonceptius orals, que tenen propietats disruptores endocrines, produeixen alteracions greus en la reproducció i el desenvolupament de peixos com la feminització, la reducció de la fertilitat i l'hermafroditisme a concentracions en aigua molt baixes d'entre 0,1 i 1 ng/l¹.



Figura 2: Abocament d'aigües residuals urbanes.

¹ Un nanogram és una unitat de mesura de massa equivalent a la milmilionèsima part d'un gram.

1.2. Abocaments d'origen agrícola i ramader

Els abocaments d'origen ramader són els purins i els fems procedents del bestiar de les granges, que contaminen les aigües si s'aboquen als rius o rierols o si s'utilitzen en excés per adobar la terra.

El 65% del abocaments directes a Espanya són responsabilitat de la ramaderia. Aquests abocaments no es fan a través de xarxes urbanes de sanejament, i per tant, són més difícils de controlar i depurar. Els abocaments agrícoles i ramaders són un tipus de contaminació difusa, és a dir, que no té un origen definit, es duen a terme en zones amples i no tenen un focus emissor concret. Els fertilitzants i els plaguicides són la causa de la contaminació difusa a l'agricultura.

L'agricultura contamina les aigües per mitjà dels adobs químics, productes fitosanitaris i adobs d'origen animal amb els quals es tracten els terrenys. Els adobs comunament més utilitzats són les femtes de cavall, cabra, bous o vaques i no els purins, que tenen un excés de nitrogen. En les últimes dècades, la intensificació de la producció porcina en tota Europa és un fet evident. Produïm un excedent de nitrogen i fòsfor en forma de purins, més enllà del que es necessita per a l'agricultura. Els purins es tractaven en plantes de tractament integral de purins porcins mitjançant assecament tèrmic². Aquestes plantes se'ls va garantir un preu especial de l'energia que produïen per a un període de quinze anys, que la majoria de plantes ja han complert des de la seva posada en marxa. Els purins són emmagatzemats en piscines però sovint hi ha filtracions.

1.3. Abocaments industrials

La indústria també aboca als rius moltes substàncies residuals. Les més contaminants són els metalls pesants i alguns compostos orgànics tòxics. Les centrals tèrmiques

² A les plantes d'assecament tèrmic es redueix l'aigua continguda en els fangs, o purins en aquest cas, per evaporació mitjançant l'aportació de calor. Així s'aconsegueix disminuir la massa i el volum dels purins i obtenir un producte estable i higienitzat, apte per a la seva aplicació al sòl en profit de l'agricultura, en dipòsit controlat o com a font energètica.

també contaminen les aigües dels rius, abocant-hi aigua a temperatures molt elevades, i d'aquesta manera alteren les condicions naturals de l'ecosistema.

Segons el tipus d'indústria, es produeixen diferents tipus de residus. Normalment, en els països desenvolupats moltes indústries tenen sistemes de depuració de les aigües, sobretot si produeixen contaminants perillosos com poden ser els metalls tòxics. Alguns dels verins presents a les aigües residuals industrials són: l'arsènic, el cianur, el crom, el plom, el cadmi, l'anhídrid sulfúric, olis, diversos àcids, etc.

1.4. La salinització dels aqüífers

La salinització de l'aigua i dels sòls agrícoles és una forma de contaminació freqüent a les zones litorals. La salinització de pous o aqüífers a línia de costa es causat per una introgressió d'aigua marina quan aquests han estat sobre explotats. En zones més allunyades del mar també es pot produir salinització de les aigües, ja que l'extracció d'aigua de pous o de rius fa que es concentrin les sals dissoltes i en conseqüència, l'aigua esdevé cada cop més salada. També pot ocórrer que un curs d'aigua superficial passi per una area amb terrenys salins. Aquesta aigua amb elevades concentracions de sals dissoltes ja no serà potable. Si s'utilitza per regar cultius, provoca també la salinització i la conseqüent pèrdua de fertilitat del sòl.

La salinitat de l'aigua s'expressa habitualment en mil·ligrams de clorurs per litre (mg Cl/L). El límit màxim de clorurs per a les aigües potables és, segons estableix el Real Decret 140/2003 publicat el 21 de febrer del 2003, de 250 mg Cl/L. Fins aleshores, el Real Decret 1138/90 havia fixat el límit en 200 mg Cl/L, d'acord amb la recomanació de l'Organització Mundial de la Salut. El nivell màxim actualment admès d'ió sodi és de 200 mg Na/L, però havia estat de 150 mg Na/L fins abans de la publicació del Real Decret 140/2003. Actualment, l'ió potassi és un paràmetre analític que deixa de sotmetre's a control obligatori a les aigües destinades a potabilització. L'excés de potassi és una qüestió molt particular de la conca del Llobregat, no un problema de contaminació d'aigües general donat que a la conca hi ha diverses explotacions de

mines de sal. Com a referència, es pot utilitzar el valor màxim anteriorment autoritzat pel Real Decret 1138/90 de 12 mg K/L.

Amb menor propietat però d'anàlisi més ràpida, la salinitat de l'aigua pot estimar-se i expressar-se en termes de conductivitat, ja que la conductivitat de l'aigua és proporcional al seu contingut d'ions.

2. Problemàtica mediambiental dels compostos nitrogenats i els fosfats

La producció agropecuària té grans efectes sobre el medi ambient. És la principal font de contaminació per compostos nitrogenats (nitrits, nitrats, i amoni), fosfats i plaguicides a més de produir gasos responsables de l'efecte hivernacle com el metà i els òxids de nitrogen. La contaminació per compostos nitrogenats i fosfats es produeix a causa dels fertilitzants, quan aquests s'utilitzen en major quantitat de la que poden absorbir els cultius o quan s'eliminen per acció de l'aire o de l'aigua de la superfície del sòl abans de que puguin ser absorbits. El nitrogen té molta mobilitat al sòl, propietat que és de gran transcendència tant per a la nutrició dels cultius com per a les afeccions mediambientals. Els excessos de nitrogen i fosfats poden ser arrossegats a cursos d'aigua o infiltrar-se a aigües subterrànies, la qual cosa provoca una sobrecàrrega de nutrients a l'aigua i, en conseqüència pot provocar l'eutrofització del medi aquàtic.

2.1. Els compostos nitrogenats

El nitrogen és el compost més abundant de l'atmosfera del nostre planeta, ja que constitueix un 78,1% de l'aire atmosfèric. A més, està present en un 3% a l'organisme dels éssers humans i als altres éssers vius, ja que és un element essencial dels àcids nucleics i dels aminoàcids.

El nitrogen es troba formant una infinitat de compostos nitrogenats. Els principals compostos nitrogenats presents a la natura, a més de l'atmosfèric i del nitrogen presents en la matèria orgànica, són els nitrats, els nitrits i l'amoni.

A les terres de cultiu, els nutrients del sòl són absorbits per les plantes i aquesta va perdent la seva riquesa. Després de la collita el sòl es queda sense nutrients i per aquest motiu és necessari adobar els camps per a la propera sembra. En un bosc no cal enriquir la terra perquè quan les plantes moren o cauen les fulles, el fruits i les llavors, es queden al mateix bosc i retornen el nitrogen al sòl.

Les plantes només poden incorporar el nitrogen que es troba en forma de nitrats i el transformen en matèria orgànica (proteïnes i àcids nucleics). Es conegut que les plantes només aprofiten un 50% del nitrogen que és aportat a través de l'adobat. Això suposa que l'excés de nitrogen es perd i es arrossegat per l'aigua que es filtra al subsòl i arriba als aquífers subterranis, rius i embasaments, contaminant així les aigües continentals.

Es pot parlar de dos tipus principals de fonts de contaminació de les aigües continentals per compostos nitrogenats: la contaminació puntual i la difosa.

- La contaminació puntual té un focus emissor ben localitzat, afecta a zones concretes i té nivells elevats d'intensitat. S'associa a activitats d'origen industrial, ramader o urbà (abocament de residus industrials, d'aigües residuals urbanes o d'efluents orgànics de les explotacions ramaderes; lixiviació d'abocadors, etc.).
- En el cas de la contaminació dispersa o difosa, l'activitat agrícola n'és la causa principal. No té un focus emissor ben localitzat, és de baixa intensitat i de gran abast en l'espai.

Si bé les fonts de contaminació puntual poden exercir un gran impacte sobre les aigües superficials o sobre localitzacions concretes de les aigües subterrànies, les pràctiques d'adob amb fertilitzants orgànics o inorgànics (contaminació difosa) són generalment

les causants de la contaminació generalitzada de les aigües subterrànies i secundàriament dels aquífers superficials.

Segons FEFANA1 (European Federation of Animal Feed Additive Manufacturers) Catalunya es va situar l'any 2001 en segon lloc després d'Holanda en quant a l'excés de nitrogen valorat en kg/ha, força per sobre del màxim permès per la directiva que estableix en 170 kg/ha de terra cultivable el límit de nitrogen aplicable.

2.2. El cicle del nitrogen

El cicle del nitrogen és un dels processos biogeoquímics més importants en el qual el nitrogen es converteix en diverses formes químiques.

L'equilibri dinàmic de composició de la biosfera depèn d'aquests processos.

Aquest cicle es compon de diverses fases clarament delimitades sent la primera d'elles la que rep el nom de fixació i assimilació del nitrogen. A ella següen l'amonificació, la nitrificació i finalment la coneguda com desnitrificació, que és aquella en la qual es produeix la reducció de l'ió nitrat a nitrogen diatòmic.

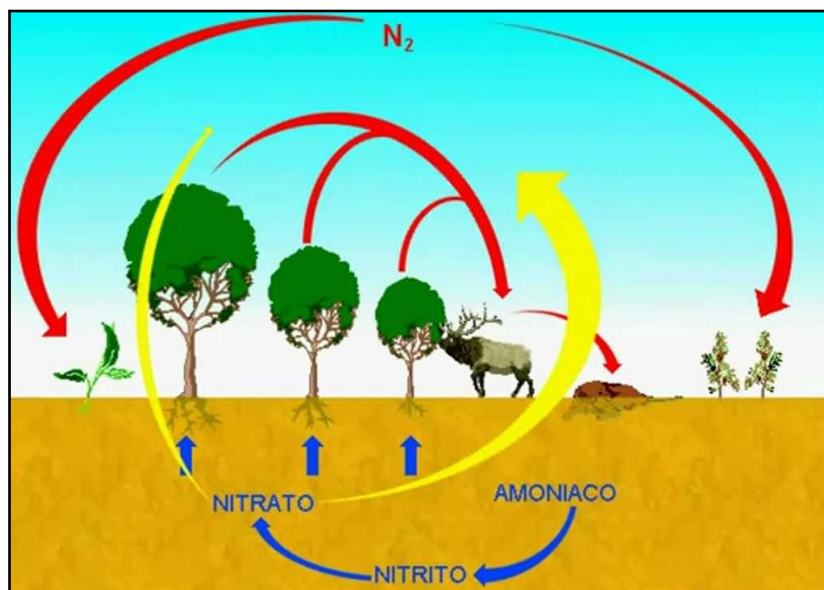
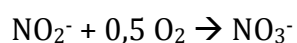


Figura 3: El cicle del nitrogen.

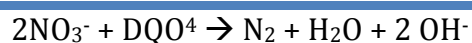
La font inicial i més abundant de nitrogen és l'atmosfera, on es troba en forma molecular (N₂). Els organismes encarregats de la seva introducció a la biosfera són les algues cianofícies³ i alguns bacteris. Alguns d'aquests bacteris es troben en simbiosis amb plantes lleguminoses com l'alfals o les mongetes. Aquesta simbiosis consisteix en que la planta proporciona nutrients als bacteris i aquests fixen el nitrogen al sòl a través de la planta. Per l'acció d'aquests organismes i també per les descàrregues elèctriques que es produeixen a l'atmosfera, el sòl s'enriqueix de compostos inorgànics nitrogenats. Aquests compostos, sobretot els nitrats, són absorbits pels vegetals, que fabriquen proteïnes i altres substàncies nitrogenades.

A l'alimentar-se, els herbívors, i a través d'aquests, els carnívors, incorporen el nitrogen al seu organisme. Al terra tornaran els vegetals que morin, així com els excrements i els cossos morts dels animals. En processos de descomposició de la matèria orgànica, el nitrogen tornarà a incorporar-se al sòl però ara ho farà en forma d'amoníac. Una sèrie de bacteris nitrosificants transformen l'amoníac en nitrit. Uns altres bacteris nitrificants transformen el nitrit en nitrat, i altres transformen a aquest últim (nitrat) en nitrogen gasós que tornarà a l'atmosfera (Figura 3).

Reaccions de nitrificació



Reacció de desnitrificació



³ Les algues cianofícies són individus procariotes que poden viure sols o en colònies filamentoses. Comparteixen amb diferents bacteris l'habilitat de prendre el N₂ de l'aire, on és el gas més abundant, i reduir-lo a amoni (NH₄⁺).

⁴ La demanda química d'oxigen (DQO) és un paràmetre que mesura la quantitat de substàncies que són susceptibles de ser oxidades als medis químics on són dissoltes.

2.3. Els nitrats

Els nitrats són sals o esters de l'àcid nítric HNO_3 . En els nitrats està present l'anió NO_3^- (Figura 4).

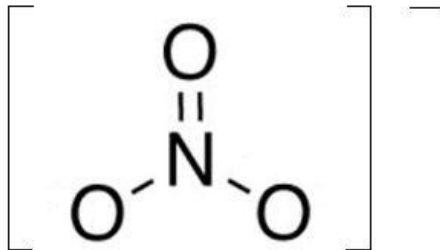


Figura 4: Ió nitrat.

Com ja hem explicat a l'apartat anterior, els nitrats es formen a la natura per la descomposició de compostos nitrogenats com les proteïnes i la urea, compost químic abundant a l'orina i a la matèria fecal. En aquesta descomposició es forma amoníac o amoni, el qual posteriorment és oxidat per microorganismes de tipus nitrobàcter nitrit. Finalment el nitrit es transforma en nitrat.

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) inclou els nitrats entre els components de l'aigua que poden ser nocius per a la salut. Són perillosos a concentracions superior a 50 mg/l i el seu efecte perjudicial es deu a que, per acció bacteriana, es redueixen a nitrits a l'estómac i aquests passen a la sang i són responsables de la formació de metahemoglobina en sang la qual disminueix la capacitat d'oxigenació.

Tradicionalment, els nitrats s'han emprat com a adob a l'agricultura. El seu ús es va

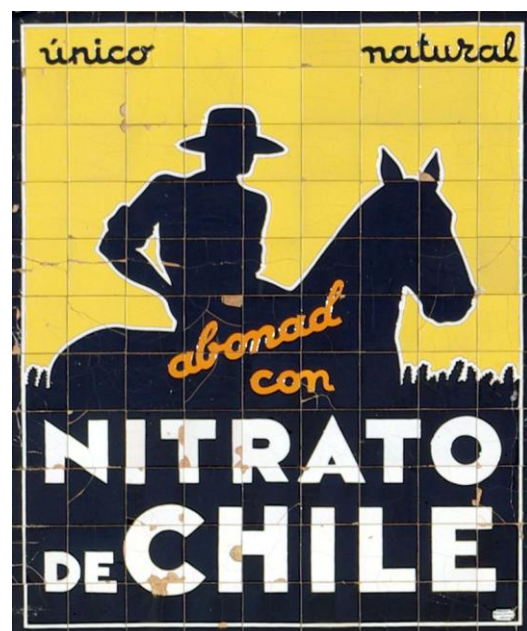


Figura 5: Anunci publicitari del nitrat de Xile.

generalitzar després de la segona Guerra Mundial ja que aconseguia mantenir els nivells de producció agrícola. El seu ús va esdevenir tan comú que es podien trobar cartells publicitaris a l'entrada dels pobles en què es recomanava l'ús del nitrat de Xile (Figura 5)

En un principi, l' utilització d'aquesta substància va suposar una millor gestió de la producció però amb el pas del temps es va apreciar que l'excés de nitrat es filtrava cap al freàtic i que s'acumulava en rius i llacs. Els nitrats provinents de l'abonament juntament amb els provinents dels purins, que s'acumulaven en excés, van causar un augment de la quantitat de nitrats al medi ambient.

2.4. Els nitrits

Els nitrits són sals o esters de l'àcid nítrós (HNO_2). L'ió nitrit és NO_2^- (Figura 6).

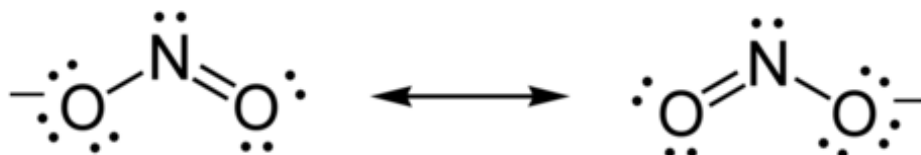


Figura 6: Ió nitrit.

És una espècie poc estable químicament. La seva presència en aigua sol indicar una contaminació de caràcter fecal recent.

Els nitrats resulten tòxics per als peixos. Una concentració de 0,2 - 0,4 mg/l mata al 70 % d'una població de truites i es dona una mortalitat alta de peixos a partir de 0,15 mg/l. Des del punt de vista fisiològic, l' NO_2^- al igual que l' NO_3^- tenen el poder de transformar l'hemoglobina de la sang en metahemoglobina, que és incapaç de fixar l'oxigen i de realitzar correctament la respiració cel·lular. A més els nitrits reaccionen dins de l'organisme amb amines i amides secundàries i terciàries formant nitrosamines, d'alt poder cancerigen.

2.5. L'amoni

L'amoni és un catió poliatòmic carregat positivament de fórmula NH_4^+ (Figura 7).

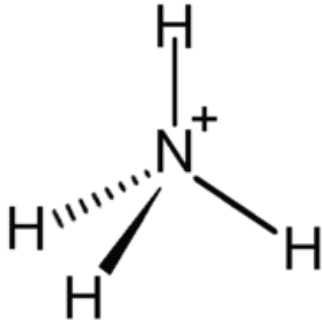


Figura 7: Ió amoni.

Els ions amoni són un producte tòxic, resultat del metabolisme dels animals.

L'amoni és un ió derivat de l'amoníac per adició d'un catió d'hidrogen procedent de l'aigua. L'amoni està contingut en les sals amòniques, que es troben en els fertilitzants i en la indústria, per a l'obtenció d'altres productes.

L'amoníac és enormement tòxic. A més, el nitrogen amoniacal es transforma primer en nitrats i posteriorment en nitrats, reaccions que es produeixen amb consum d'oxigen i per tant, es consumeix l'oxigen dissolt a l'aigua.

2.6. Els fosfats

Els fosfats són sals o esters de l'àcid fosfòric. Està format per un àtom de fòsfor envoltat per quatre àtoms d'oxigen en forma tetraèdrica (Figura 8).

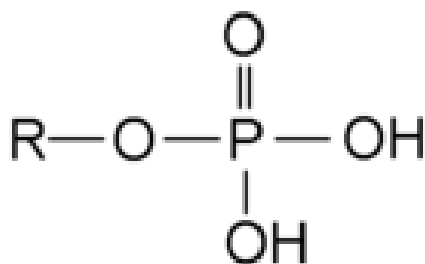


Figura 8: Fosfat.

Els fosfats inorgànics s'extreuen de mines a partir de les roques fosfòriques per tal d'obtenir fòsfor que es fa servir en l'agricultura i la indústria.

Els compostos de fòsfor provenen generalment de residus urbans, fosfats i polifosfats que es troben en la formulació dels detergents. Els fosfats s'afegeixen als detergents per tal que s'associïn als ions responsables de la duresa de l'aigua (ferro, calci, magnesi), que generalment precipiten en forma de sals entorpint la neteja de la roba. Els detergents i productes de neteja contribueixen amb un 20 % sobre el total d'abocaments de fosfats sobre el medi ambient.

Els fosfats també són compostos indispensables en la formulació d'adobs minerals. La seva absència limita el creixement de les plantes.

A la indústria alimentaria els ortofosfats (fosfats hidratats) s'utilitzen com a estabilitzants dels productes carnis envasats, com acidificant de begudes refrescants o formatges processats.

3. L'eutrofització

El problema ambiental dels fosfats i del nitrats és l'eutrofització de les aigües. Un riu, un llac o un embassament sofreixen eutrofització quan les seves aigües s'enriqueixen de nutrients. Qualsevol persona sense coneixements del tema podria pensar que tants nutrients a l'aigua són beneficiosos ja que així els éssers vius podrien viure més fàcilment, però la realitat és ben diferent.

3.1. Conseqüències de l'eutrofització

L'eutrofització, és un procés que es duu a terme en ecosistemes aquàtics en el que s'introdueixen excessius nutrients, principalment fosfats i nitrats, i que provoquen un creixement massiu d'algues verdes i plàncton (Figura 9). Quan aquests organismes fotosintètics moren, es descomponen gràcies a l'activitat dels bacteris, que consumeixen una gran quantitat d'oxigen dissolt en el procés. En el procés de

putrefacció, es produeixen males olors i un aspecte desagradable de l'aigua. També es crea una barrera que no deixa passar la llum, de manera que les aigües deixen de ser aptes per a la majoria dels éssers vius de l'ecosistema perquè es queden sense O_2 i sense llum i moren.



Figura 9: Canal agrícola eutrofitzat.

La dràstica alteració de l'ambient que suposen aquests canvis fa inviable l'existència de les espècies que prèviament formaven l'ecosistema. Es deterioren les comunitats biològiques amb la substitució d'espècies sensibles per espècies oportunistes més resistents. Per exemple, a causa de la disminució de l'oxigen, no podran viure peixos que necessiten aigües riques en oxigen, per tant trobarem principalment barbs, perca i altres organismes d'aigües poc ventilades i oxigenades.

Posteriorment, si l'enriquiment de nutrients persisteix, s'esgota per complet el contingut d'oxigen dissolt en l'aigua i moren la majoria dels organismes aquàtics. Es diposita la matèria inerta al fons de l'aigua, on els bacteris anaeròbics poden continuar la descomposició dels cadàvers.

En un ecosistema eutrofitzat solen quedar-hi només els organismes descomponedors, que al descompondre la matèria orgànica de l'aigua desprenen metà, àcid sulfúric i altres substàncies que poden arribar a ser tòxiques. També alliberen sofre, que tenyeix l'aigua de color verd (Figura 10).

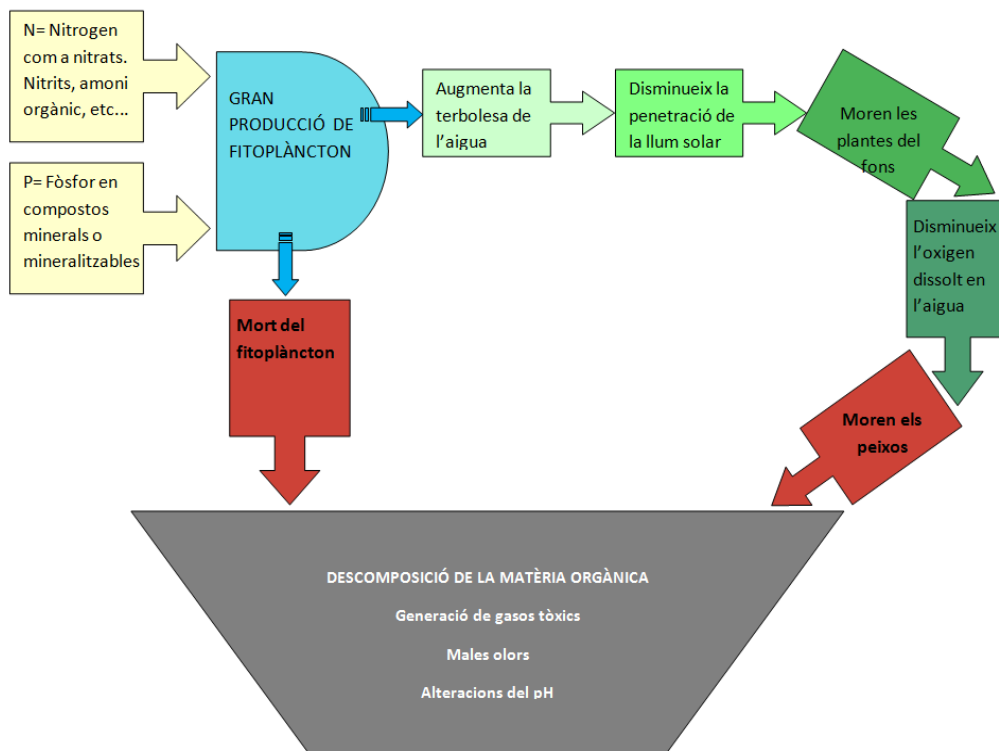


Figura 10: Esquema de l'eutrofització d'un llac.

Un cas molt conegut d'eutrofització marina són les famoses mareas roges (Figura 11), uns grans augments de la població de micro algues, que en gran part són conseqüència de l'abocament de residus al mar.



Figura 11: Marea roja.

4. Principals causes del declivi dels amfibis

Les causes de la regressió dels amfibis són:

- La pèrdua d'hàbitat
- L' introducció d'espècies
- La qualitat del medi aquàtic

Tots aquests canvis han comportat l'alteració de l'ecosistema i el delta del Llobregat ha esdevingut una zona empobrida d'amfibis, amb la desaparició del 70% d'aquestes espècies (dada de principis del segle XX).

4.1. La pèrdua d'hàbitat

A partir dels anys 50, la població del Baix Llobregat va augmentar respecte a la mitjana de Catalunya i als anys 60, va haver immigració, el que va provocar la necessitat d'ampliar la zona urbana. A finals del segle XX es van començar a planificar les ampliacions del port de Barcelona (la qual cosa va comportar la desviació del riu Llobregat), la construcció de l'aeroport, la creació de noves zones industrials i de serveis, l'augment de la xarxa viària, etc. Aquestes infraestructures han alterat el medi físic on es desenvolupava el cycle biològic de la fauna herpetològica⁵. Moltes espècies d'amfibis i rèptils han disminuït les seves poblacions en faltar el seu medi físic. La pèrdua d'hàbitat és la principal causa de pèrdua de biodiversitat. Les xarxes viàries han representat un factor de disminució directa de gran nombre d'exemplars a causa dels atropellaments i, de forma indirecta, a causa de l'efecte barrera que constitueixen en si mateixes.

Algunes petites basses on es reproduïxen els amfibis han estat tapades amb runes, utilitzades com a abocadors d'escombraries o s'han dessecat a causa de l'escalfament de la superfície terrestre.

⁵ Fauna herpetològica: relativa a amfibis i rèptils.

4.2. L' introducció d'espècies

Les espècies invasores, com ara la tortuga de Florida (alliberada per particulars), el cranc de riu americà, la gambusia (introduïda per l'home per combatre les plagues de mosquits), la granota pintada entre altres, són també una causa de risc de pèrdua de biodiversitat. Les espècies invasores afecten a les autòctones de diverses maneres com depredació, competència, introducció de malalties o contaminació genètica.

4.3. La qualitat del medi aquàtic

Ens referim al medi aquàtic quan parlem de tot el conjunt de canals i masses d'aigua que es localitzen a la plana deltaica.

Els factors que condicionen la qualitat del medi aquàtic són l'augment de la salinitat i la contaminació per productes fitosanitaris i matèria orgànica.

- Augment de la salinitat: la sobreexplotació de l'aquífer ha fet disminuir el nivell freàtic (nivell en que la pressió de l'aigua de l'aquífer és igual a la pressió atmosfèrica) i l'ha salinitzat. Aquest augment de salinització ha provocat que molts amfibis hagin desaparegut de la zona, que s'hagin relegat de la perifèria del delta i fins i tot que s'hagin extingit.
- Contaminació per productes fitosanitaris i matèria orgànica: un dels factors que més afecten els amfibis és la contaminació química i orgànica de l'aigua. Els abocaments de residus industrials, d'utilització desmesurada d'insecticides i herbicides als conreus i els abocaments de les aigües residuals urbanes als canals han afectat els amfibis. Per altra banda, també s'han vist afectades indirectament les seves fonts d'alimentació (invertebrats)

La neteja de canals i sèquies que es fa cada any ocasiona la destrucció dels habitats i l'eliminació de molts individus. Moltes espècies d'amfibis i rèptils aquàtics utilitzen aquests canals per viure-hi, especialment per alimentar-se, refugiar-se i com a

corredor biològic⁶. Molts individus, en amagar-se entre la vegetació i dins el terra per hibernar són aixafats per màquines segadores i excavadores.

5. Efectes dels compostos nitrogenats i els fosfats sobre els amfibis

Els amfibis passen gran part de la seva vida al medi aquàtic. Estan subjectes a l'aigua en la fase larvària, el que els fa especialment vulnerables als canvis en aquest medi.

Els amfibis no toleren la contaminació industrial de l'aigua, no viuen en aigua salinitzada ni contaminada per pesticides o per nitrats, ni en aigua clorada. Tots els efectes dels compostos nitrogenats i els fosfats resulten adversos per als amfibis. Diverses investigacions mostren les conseqüències d'exposar espècies concretes a substàncies tòxiques.

El nitrits causen alta mortalitat larvària, reducció de l'activitat i gran pèrdua de pes a les espècies *Rana pretiosa*, *Rana aurora*, *Bufo boreas*, *Hyla regilla* i *Ambystoma gracile* (Marco et al. 1999). Els nitrats causen reducció de l'activitat, desequilibris, malformacions i elevada mortalitat sobre *Rana pretiosa*, *Rana aurora*, *Bufo boreas*, *Pseudacris regilla* i *Ambystoma gracile* (Marco et al. 1999 and De Solla et al. 2002). L'amoni causa la disminució de la supervivència de les larves a la metamorfosis, disminució de l'activitat i ràpida pèrdua de pes en les espècies *Bufo americanus*, *Pseudachis triseriata*, *Rana pipiens* i *Rana clamitans* (Hecnar 1995).

⁶ Els corredors biològics són àrees, generalment allargades, que connecten dues o més regions. La funció dels corredors és mantenir la connectivitat entre els dos extrems per evitar l'aïllament de les poblacions. La seva rellevància rau en que en les zones aïllades s'observa una disminució del nombre d'espècies.

DISSENY EXPERIMENTAL

1. Espècie triada. El gripauet comú (*Pelodytes punctatus*)

L'espècie escollida com a subjecte d'estudi ha estat el gripauet comú, *Pelodytes punctatus*, la qual no havia estat utilitzada en estudis anteriors. A continuació es descriuen les característiques de l'espècie.

1.1. Descripció i biologia

El gripauet comú és una espècie molt semblant al gripauet ibèric. Fins fa poc temps aquestes dues espècies eren considerades com una de sola al ser extremadament semblants.

Fitxa tècnica:

Classe	Amfibis
Ordre	Anurs (amfibi sense cua)
Família	Peloditidae
Gènere	<i>Pelodytes</i>
Espècie	<i>Punctatus</i> (Daudin, 1802)

Pelodytes punctatus (Figura 12) és un gripau petit, de fins a 50 mm, de color ocre - terrós. La meitat inferior és de color blanquinós - grisenc. El més característic és la pell coberta de petites prominències de color verd, marró o negre, les quals el diferencien dels altres anurs. Té els ulls grans amb la pupil·la vertical. Té el cos i el cap aplanat i el morro prominent. Els mascles presenten, durant l'època de zel, rugositats de color fosc al segon dit de cada mà, braços i pit.

Les extremitats són llargues i poc robustes i les posteriors estan adaptades per al salt. En les potes anteriors tenen quatre dits i cinc dits en les posteriors, que presenten una

membrana interdigital⁷ reduïda. Les femelles tenen el cap i les extremitats més petites en proporció al cos. Els mascles no presenten sacs vocals aparents.



Figura 12: Gripauet comú, *Pelodytes punctatus*.

Les larves solen presentar tons marrons. Els ulls es situen a la part superior del cap i no en els laterals. L'espíacle (orifici respiratori) apareix al costat esquerre. És característica una filera de punts en la meitat superior del dors, visibles en larves amb gran desenvolupament. La cua és casi el doble de llarga que el cos i acaba amb una punta arrodonida. Les larves del gripauet comú es distingeixen del gripauet ibèric perquè són de mida més gran (aproximadament fins a 60 mm) i presenten un color més fosc. Abans de concloure la metamorfosi, ja presenten les típiques berruguetes a la zona dorsal.

Són animals nocturns i discrets perquè solen romandre quasi tot el temps en galeries o sota les roques i només es poden localitzar durant l'estació reproductora.

Els seus mecanismes de defensa són o bé la fugida a salts o submergint-se dins l'aigua, o bé adoptant una postura característica en la qual arqueja el dors i segrega una substància lleument tòxica per la pell.

⁷ La membrana interdigital és una capa de pell que uneix els dits de les potes posteriors dels amfibis (altres animals també en tenen). Aquesta membrana els facilita el trasllat dins l'aigua i el salt.

Per a reproduir-se, són dels amfibis més matinadors. Si octubre es plujós, emergeixen els primers mascles. Durant els mesos de baixes temperatures l'activitat decreix. La hibernació només es produeix en la part nord de la distribució de les espècies i, per un breu període de temps (de novembre a febrer - març). La reproducció comença a la primavera (finals de febrer a abril), quan es cria el major volum de gripaus i a la tardor. L'amplexus és inguinal⁸. La femella diposita diversos centenars d'ous que s'adhereix en grup a la vegetació aquàtica. Les postes d'ous es localitzen enroscades a les herbes. El desenvolupament larvari varia en funció de la disponibilitat d'aliment i del règim tèrmic del lloc on es desenvolupin però normalment està entre 2 i 4 mesos.

1.2. Hàbitat

El seu hàbitat preferit són les zones pedregoses i arenoses, incloent també parets de pedra seca. S'observen en les dunes, praderes inundables i àrees cultivades. Sovint és present en zones calcàries o de sorra. En la temporada de cria, trobem l'espècie en espais oberts on utilitza una gran varietat de medis aquàtics com poden ser en aigües efímeres o temporals, llacunes naturals, maresmes, tolls d'aigua, rases i rierols que flueixen feblement amb un substrat sorrenc. En els llocs on els medis aquàtics naturals són escassos, utilitza també bales de reg, estancs, piscines i altres punts d'aigua artificials.

No són amfibis exigents amb l'humitat ja que apareixen tant en serres amb un alt grau d'humitat i precipitacions com en depressions on aquestes són molt menors.

1.3. Alimentació

Durant els primers dies després de la desclosa, les larves viuen de les reserves que hi ha al vitel. Passats uns dies ja poden alimentar-se d'algues microscòpiques i matèria orgànica.

⁸ Acoblament sexual propi dels amfibis anurs, que s'efectua a l'aigua i és de fecundació externa.

Un cop feta la metamorfosi, porten vida terrestre i s'alimenten d'artròpodes, llimacs i cucs de terra de mida adequada a la seva talla, que capturen de forma activa.

1.4. Distribució

Aquesta espècie es troba a l'oest de Portugal, al nord, centre i est d'Espanya, a la major part de França i a la costa nord-occidental d'Itàlia (només a Ligúria i el sud de Piemont). A Espanya es distribueix per Castella i Lleó, Àlaba, La Rioja, Navarra, Aragó, Catalunya, Madrid (surest), Castella-La Mancha, Comunitat Valenciana i Murcia (Figura 13).

Es pot trobar fins als 1630 metres sobre el nivell del mar.

L'espècie no és abundant en el marge nord de la seva àrea de distribució ni en els paisatges antròpicament alterats.



Figura 13: Distribució de l'espècie *Pelodytes punctatus*.

1.5. Amenaces

En vista a la seva àmplia distribució i gran població, aquesta espècie està catalogada com a preocupació menor. És cert que l'espècie *Pelodytes punctatus* està en regressió però és poc probable que la disminució de l'espècie sigui prou ràpida com per qualificar-la d'una categoria més amenaçada.

És generalment abundant en la major part de la seva localització però l'espècie és generalment escassa a Portugal i està amenaçada a Itàlia a causa de la pèrdua de llocs de cria a la vora de la seva àrea de distribució. Les poblacions al sud d'Espanya i al nord de Portugal estan molt amenaçades i fragmentades.

El desenvolupament urbanístic experimentat per algunes ciutats i en les zones turístiques (per exemple a la costa mediterrània) ha determinat l'extinció de nombroses poblacions al llarg de les dues últimes dècades, a la mateixa vegada que, en zones rurals, les pràctiques d'agricultura intensiva, principalment de fruiters i cereals, han suposat l'alteració, desaparició i la contaminació severa d'infinat de medis aquàtics i, en conseqüència, l'extinció de moltes poblacions. Les prolongades sequeres també han suposat conseqüències negatives degut a que medis naturals aquàtics usats com a medis reproductius han desaparegut i fan que la reproducció de l'espècie depengui de la conservació d'antics estanys, bases de reg i d'altres construccions artificials en desús.

Les amenaces inclouen el drenatge de pantans i la canalització dels rius. La pèrdua d'hàbitats adequats de cria d'aigua dolça i la fragmentació de l'hàbitat⁹ són també amenaces. La intensificació de l'agricultura està amenaçant l'espècie a la Península Ibèrica. La desertificació és una amenaça en algunes parts de la seva àrea de distribució (Portugal meridional). La depredació de larves i adults per part de peixos exòtics i del cranc de riu, espècies introduïdes especialment a la Península Ibèrica, és també una amenaça. Els projectes hidroelèctrics estan conduint a la pèrdua d'hàbitat en parts de Portugal.

⁹ La fragmentació és el procés de divisió d'un hàbitat continu en seccions. S'origina per la transformació del paisatge al construir preses, carreteres, obrir terres de cultiu, pel desenvolupament urbà, etc.

2. Elecció del contaminant: L'amoní

Els experiments consistirien en diferents dissolucions d'un contaminant nitrogenat a les quals estarien exposats els capgrossos de *Pelodytes punctatus*. Abans d'iniciar els experiments, vam haver de plantejar-nos algunes qüestions com quina sal utilitzaríem com a solut, és a dir, com a font de nitrogen i en quina proporció ho faríem.

Es van trobar varies opcions com a font de N: el nitrit de sodi (NaNO_2), el nitrat de sodi (NaNO_3), el nitrat d'amoní (NH_4NO_3), el fosfat di amònic ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) i el clorur d'amoní (NH_4Cl), compostos normalment utilitzats per a l'abonament dels camps i que es trobaven, per tant, a les aigües.

El nitrat d'amoní va ser eliminat com a opció perquè al contenir dues espècies contaminants, el nitrat i l'amoní, no sabríem si els efectes sobre els capgrossos es deurien a l'ió nitrat o a l'ió amoní i a més es podrien produir efectes sinèrgics entre els dos contaminants. El mateix va passar amb el fosfat di amònic. El nitrit de sodi i el nitrat de sodi també van ser eliminats com a opció perquè en altres estudis fets amb altres espècies d'amfibis revelaven que tenien efectes a concentracions molt més elevades de les que es trobaven al medi ambient (Garriga, N., Montori, A., Llorente G.A., en premsa). Així doncs, el solut més adient era el clorur d'amoní, ja que així teníem una única font de N i sabíem que havia causat efectes negatius sobre altres espècies d'amfibi a valors que es trobaven al medi. El clorur d'amoní és un compost utilitzat com a fertilitzant agrícola i una de les principals fonts d'incorporació de nitrogen al medi.

La segona qüestió era saber quants mg de clorur d'amoní s'havien de posar a les diferents dissolucions. Com no hi havia cap treball experimental fet amb l'espècie *Pelodytes punctatus*, es van agafar com a referència les dades de tolerància d'altres espècies d'amfibis, que mostraven la LC_{50} (Montori, A.; Franch, M.; Llorente, G. A.; Richter, A; Sansebastian, O; Garriga, N; Pascual, G., 2009). Trobar els valors de LC_{50} (lethal concentration) és el test més comú per a determinar la sensibilitat d'una espècie a un contaminant. Aquests tests determinen la concentració a la qual el 50% de la població de la prova mor. Aquesta dada ens indica que, concentracions a la

natura que siguin iguals o que superin els valors de LC₅₀ podrien portar la població a l'extinció.

A continuació es mostra una taula amb els mg d'amoni que causen el 50% de la mortalitat (LC₅₀) a diverses espècies extretes del treball anteriorment citat:

Espècie	LC ₅₀ (mortalitat del 50%)
Gripau corredor (<i>Bufo calamita</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 8 - 10 mg/l (Gómez-Mestre & Tejedo, 2003) - 20,50 mg/l durant 15 dies, mortalitat del 13% (Ortiz, 2004)
Gripau d'esperons (<i>Pelobates cultripes</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 37 mg/l (Ortiz-Santaliestra, 2006)
Granota verda (<i>Pelophylax perezi</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 26,29 mg/l durant 72 hores - 31,37 mg/l durant 48 hores - 45,39 mg/l durant 24 hores <p>(Egea-Serrano, 2009)</p>
Tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 225.38 mg/l durant 14 dies (Gustavo Llorente, Albert Montori, Marc Franch i Núria Garriga, 2012)

Com es pot veure a la taula, les concentracions d'amoni afecten a diferents espècies a concentracions molt diferents, la qual cosa feia molt difícil escollir els mg necessaris per al meu treball de camp. Finalment es va decidir utilitzar els valors de 0, 10, 20, 40, 80 i 160 mg NH₄⁺/l.

3. HIPÒTESIS DEL TREBALL

Les hipòtesis plantejades en aquest treball van ser:

- La presència d'amoni afecta negativament a l'espècie *Pelodytes punctatus* provocant la mortalitat dels capgrossos a concentracions elevades.

En la comprovació de la primera hipòtesi, es va voler especificar en els següents apartats:

- Saber quins són els límits de tolerància larvària a l'amoni.
- La supervivència larvària.

- L'amoni provoca desequilibris en el creixement larvari provocant una disminució del creixement en els tractaments amb concentracions elevades.

- Els capgrossos exposats a concentracions elevades d'amoni es posicionen a prop de la superfície de l'aigua.

4. Metodologia experimental

4.1. Metodologia general

Les larves de *Pelodytes punctatus* van ser recollides de diverses basses del Garraf els dies 17 de setembre i 7 d'octubre (Figura 14). Van haver de recollir-se en dos dies diferents degut a que en la primera sortida no havia plogut prou i no vam trobar suficients exemplars.

El material utilitzat per a la recollida de capgrossos va ser unes botes d'aigua, un salabre i diversos recipients on abocar-los.

Tots els exemplars recollits van ser portats al laboratori de l'institut Salvador Dalí on es van deixar en diversos aquaris fins al inici de l'experiment.



Figura 14: Recollida de capgrossos i postes d'ous al Garraf.

Les larves recollides van ser utilitzades per a la realització dels experiments dissenyats per tal d'acceptar o rebutjar les hipòtesis del treball.

En primer lloc, es van preparar set dissolucions amb diferents concentracions de clorur d'amoni a les quals estarien exposades les larves. Cada dissolució, d'un volum de tres litres, es va distribuir en quatre rèpliques utilitzant quatre gots de plàstic (Figura 15). Es van introduir quatre larves a cada rèplica de manera que hi havia un total de setze larves a cada dissolució.

Les dissolucions consistien en un grup Control 1 (0 mg NH_4^+ /L), un Control 2 (0 mg NH_4^+ /L), un grup de 10 mg NH_4^+ /L, un grup de 20 mg NH_4^+ /L, un grup de 40 mg NH_4^+ /L, un de 80 mg NH_4^+ /L i per últim un grup de 160 mg NH_4^+ /L. Els grups control no tenien cap concentració d'amoni i servien com a referència de l'experiment, és a dir, eren el punt de comparació amb els altres grups als quals se'ls va aplicar el tractament.

Les rèpliques són indispensables en qualsevol investigació experimental. Són repeticions de l'experiment per a confirmar que les variables controlades, que en aquest experiment serien les diferents concentracions d'amoni esmentades anteriorment, es comporten sempre igual. Serveixen per evitar el factor de l'atzar. Les rèpliques permeten obtenir una estimació de l'error experimental i en el cas que hi

hagi uns valors molt allunyats en una de les rèpliques respecte de les altres, aquests resultats es poden suprimir i no resultarien nuls.

Les larves provenien de diferents postes d'ous per a que hi hagués variabilitat genètica i els resultats no estiguessin condicionats per la genètica d'una sola posta d'ous. A més, els gots amb diferents concentracions es van col·locar desordenats per si hi havia condicions externes que els poguessin influir, com podria ser una zona amb més llum que una altra.

Es va fer un seguiment de la mortalitat larvària durant els quinze dies que va durar l'experiment per comprovar la hipòtesi 1, així com de la posició dels capgrossos en els gots anotant la quantitat que es trobava a prop de la superfície de l'aigua o al fons (hipòtesi 3). Cada cinc dies es van prendre les mesures de la longitud del cap, de la cua, l'alçada de l'aleta i la longitud total dels capgrossos per afirmar o rebutjar la hipòtesi 2.



Figura 15: Totes les dissolucions repartides en quatre gots que conformen les rèpliques.

4.2. Preparació de les dissolucions de clorur d'amoni

4.2.1. OBJECTIUS

L'objectiu de la pràctica va ser elaborar diverses dissolucions amb clorur d'amoni en concentracions creixents de 0, 10, 20, 40, 80 i 160 mg d'amoni per litre.

4.2.2. MATERIALS, APARELLS I PRODUCTES

Els materials utilitzats per a fer les dissolucions:

- Clorur d'amoni
- Balança
- Vas de precipitats
- Espàtula
- Bidó amb aigua desclorada
- Proveta de 2 L
- Proveta d'1 L
- Garrafa de 5L buida
- Gots de plàstic de 995 mL

4.2.3. PROCEDIMENT

Uns dies abans de començar la part experimental, vam omplir un gran bidó amb aigua de l'aixeta per a que el clor es dissipés.

El dia 26 d'octubre vam preparar les dissolucions. Dos dies abans, l'Albert, tutor del treball, va pesar els mg de clorur d'amoni que necessitàvem a l' Universitat, ja que, la balança de l'Institut no tenia prou precisió (Figura 16).

Les quantitats que necessitàvem eren 29,69 mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$ (10 mg NH_4^+/l), 59,38 mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$ (20 mg NH_4^+/l), 118,77 mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$ (40 mg NH_4^+/l), 237,55 mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$ (80 mg NH_4^+/l), 475,11 mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$ (160 mg NH_4^+/l).

Tractament	mg NH_4^+/l	mg $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$
C1	0	0
C2	0	0
10	10	29,69
20	20	59,38
40	40	118,77
80	80	237,55
160	160	475,11



Figura 16: mg de clorur d'amoní per a la preparació de les dissolucions.

Vam repartir tres litres de dissolució de cada concentració entre les quatre rèpliques de cada grup.

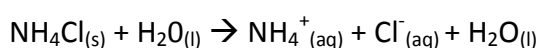
Vam calcular la concentració de solut que feia falta per obtenir tres litres de dissolució per a cada tractament. Al no disposar d'una proveta de tres litres, vam utilitzar dues provetes: una de dos litres i l'altra d'un litre per a obtenir els tres litres totals necessaris. Vam posar el solut dins la garrafa d'aigua buida. A continuació omplíem la proveta de dos litres amb aigua desclorada del bidó, preparat dies abans, i l'abocàvem

dins la garrafa. Després omplíem la proveta d'un litre amb aigua i també l'abocàvem a la garrafa. D'aquesta manera aconseguíem tres litres d'aigua dins la garrafa. El següent pas era tancar la garrafa i remoure-la fins que el clorur d'amoni estigués totalment dissolt en l'aigua. Finalment repartíem el contingut de la garrafa entre quatre gots de 995 ml que eren les rèpliques d'un mateix grup. D'aquesta manera vam aconseguir quatre gots, amb la mateixa proporció de dissolvent i solut.

Aquest procediment es va repetir per a les diferents concentracions de solut fins a tenir preparades totes les dissolucions de l'experiment. Les dissolucions es van preparar seguint l'ordre de menys concentració a més concentració, per tant, primer es van preparar el grup Control 1 i Control 2, que no van ser dissolucions perquè no contenien cap mg d'amoni. A continuació el grup de 10, 20, 40, 80 i 160 mg NH₄⁺/L successivament. Es va seguir aquest ordre per si quedaven restes de la dissolució feta anteriorment a la garrafa, aquestes no s'unissin amb una dissolució de menys concentració.

4.2.4. CÀLCULS I TRACTAMENT DE DADES

Càlcul dels grams de clorur d'amoni necessaris per a tenir els grams d'amoni desitjats:



$$M(\text{NH}_4\text{Cl}) = 53,45 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{NH}_4^+) = 18 \text{ g/mol}$$

$$\frac{10 \text{ mg NH}_4^+}{1 \text{ l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4^+}{18 \text{ g NH}_4^+} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \cdot \frac{53,45 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}} \cdot \frac{1000 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ g NH}_4\text{Cl}} = 29,69 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$\frac{20 \text{ mg NH}_4^+}{1 \text{ l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4^+}{18 \text{ g NH}_4^+} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \cdot \frac{53,45 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}} \cdot \frac{1000 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ g NH}_4\text{Cl}} = 59,38 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$\frac{40 \text{ mg NH}_4^+}{1 \text{ l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4^+}{18 \text{ g NH}_4^+} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \cdot \frac{53,45 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}} \cdot \frac{1000 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ g NH}_4\text{Cl}} = 118,77 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$\frac{80 \text{ mg NH}_4^+}{1 \text{ l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4^+}{18 \text{ g NH}_4^+} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \cdot \frac{53,45 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}} \cdot \frac{1000 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ g NH}_4\text{Cl}} = 237,55 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$\frac{160 \text{ mg NH}_4^+}{1 \text{ l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4^+}{18 \text{ g NH}_4^+} \cdot \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \cdot \frac{53,45 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}} \cdot \frac{1000 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ g NH}_4\text{Cl}} = 475,11 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

Com les dissolucions preparades van ser de tres litres, es va haver de multiplicar els grams obtinguts anteriorment per tres:

$$29,69 \frac{\text{mg NH}_4\text{Cl}}{\text{l}} \cdot 3 = 89,07 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$59,38 \frac{\text{mg NH}_4\text{Cl}}{\text{l}} \cdot 3 = 178,14 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$118,77 \frac{\text{mg NH}_4\text{Cl}}{\text{l}} \cdot 3 = 356,31 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$237,55 \frac{\text{mg NH}_4\text{Cl}}{\text{l}} \cdot 3 = 712,65 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

$$475,11 \frac{\text{mg NH}_4\text{Cl}}{\text{l}} \cdot 3 = 1425,33 \text{ mg NH}_4\text{Cl/l}$$

4.3. Metodologia específica per a l'anàlisi de la mortalitat (Hipòtesi 1)

4.3.1. OBJECTIUS

L'objectiu de la pràctica va ser determinar les concentracions a les quals l'espècie *Pelodytes punctatus* es veu afectada pel que fa a la concentració d'amoni.

4.3.2. MATERIALS, APARELLS I PRODUCTES

- Espàtula
- Pipeta de plàstic

4.3.3. PROCEDIMENT

Després de la recollida dels exemplars de les basses, vam esperar unes setmanes fins que van sortir dels ous perquè a més de capgrossos també vam recollir diverses postes d'ous. Quan ja tenien una mida adient, vam començar els experiments.

Seguidament, vam seleccionar els capgrossos de mida semblant per a posar-los dins els gots. Cada got va contenir quatre capgrossos (Figura 17). Els capgrossos eren procedents de diferents postes d'ous per evitar que els resultats estiguessin condicionats per la genètica d'una sola posta d'ous.

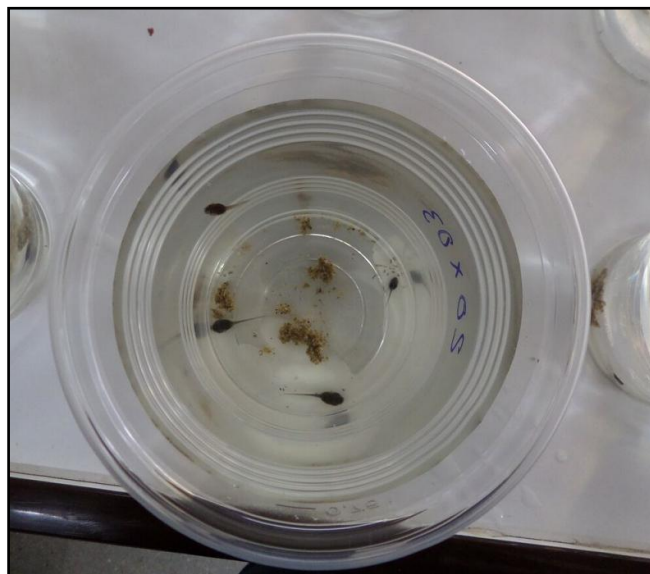


Figura 17: Cada got conté quatre capgrossos.

Els capgrossos van ser alimentats amb pinso i a cada got se li va administrar aproximadament la mateixa quantitat.

Els capgrossos van estar exposats a les proves experimentals durant quinze dies. Vam fer el seguiment de la mortalitat cada dia excepte els dies festius en els que l' institut roman tancat. Els capgrossos morts de cada tractament eren anotats i extrets de l'experiment amb l'ajuda d'una pipeta de plàstic o una espàtula.

4.4. Metodologia específica per a l'anàlisi del creixement larvari (Hipòtesi 2)

4.4.1. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta pràctica és veure se hi ha diferències entre el creixement de les larves de *Pelodytes punctatus* que han estat exposades a diferents concentracions d'amoni. Al mateix temps es va aprofitar per netejar els gots on residien els capgrossos.

4.4.2. MATERIALS, APARELLS I PRODUCTES

Els següents materials van ser emprats per agafar dades i per al manteniment dels gots en bon estat:

- Embut
- Got de plàstic
- Colador
- Peu universal
- Cèrcol
- Paper mil·limetrat
- Càmera digital
- Pipeta Pasteur

- Espàtula

4.4.3. PROCEDIMENT

Amb la finalitat d'estudiar el creixement dels capgrossos sota les concentracions de 0, 10, 20, 40, 80 i 160 mg NH_4^+ /l, aquests es van fotografiar cada cinc dies. Les fotografies de cada got es van fer els dies 1, 5, 10 i 15 de l'experiment. El procediment per a fer les fotografies va ser el següent:

En primer lloc, vam col·locar un peu universal amb un cercol acoblat. Sobre el cercol, vam posicionar una càmera fotogràfica. Al costat del peu universal, vam col·locar un paper mil·limetrat plastificat de manera que quedés posicionat sota la càmera.

A continuació, agafàvem els capgrossos de cada got, els col·locàvem sobre el paper mil·limetrat i els fèiem una foto.

Per tal d'extreure els capgrossos del got amb la dissolució, utilitzàvem un altre got de plàstic buit. Col·locàvem el colador sobre el got buit i hi abocàvem el contingut del got que contenia els capgrossos i la dissolució utilitzant un embut per a que no es vessés el contingut. D'aquesta manera, els quatre capgrossos es quedaven al colador.

A la vegada que dúiem a terme aquest procediment, aprofitàvem per netejar els gots de restes d'excrement i de pinso, ja que, al abocar el contingut d'un got a un altre, la brutícia es quedava al fons del got i era fàcil de rentar.

A continuació posàvem els capgrossos sobre el paper mil·limetrat procurant que es quedessin estirats i els fèiem una foto des de dalt amb la càmera recolzada sobre el cercol. Totes les fotografies van ser fetes des de la mateixa alçada per tal que fos més fàcil mesurar els capgrossos amb el programa d'ordinador Motic Images Plus. El paper mil·limetrat va servir per a tenir una referència de la mesura dels capgrossos per a poder calibrar el programa.

Per últim, passàvem la dissolució al got original i tornàvem a abocar els capgrossos.

El mateix procediment es va repetir amb totes les rèpliques de cada concentració i cada cinc dies.

Un cop preses totes les fotografies, mitjançant el programa Motic Images Plus vam mesurar cada capgròs al llarg dels cinc dies enregistrats. A partir de les mesures extretes, vam elaborar diversos gràfics per poder veure les diferències en el creixement dels capgrossos en les diferents concentracions.

4.4.4. CÀLCULS I TRACTAMENT DE DADES

Les dades de les mides mesurades amb el programa Motic (Figura 18), van ser enregistrades en una taula d'Excel. Es van prendre les mides de:

- Longitud del cap-cos
- Longitud de la cua
- Longitud total
- Alçada de l'aleta

L'alçada de l'aleta finalment no es va utilitzar perquè no es podia mesurar en gaires capgrossos i no vam tenir suficients mesures per a poder obtenir resultats.

A partir de les dades, es va calcular la mitjana aritmètica de la longitud del cap-cos, de la cua, la mitjana de la longitud total i de l'alçada de l'aleta per a cada tractament al llarg dels dies.

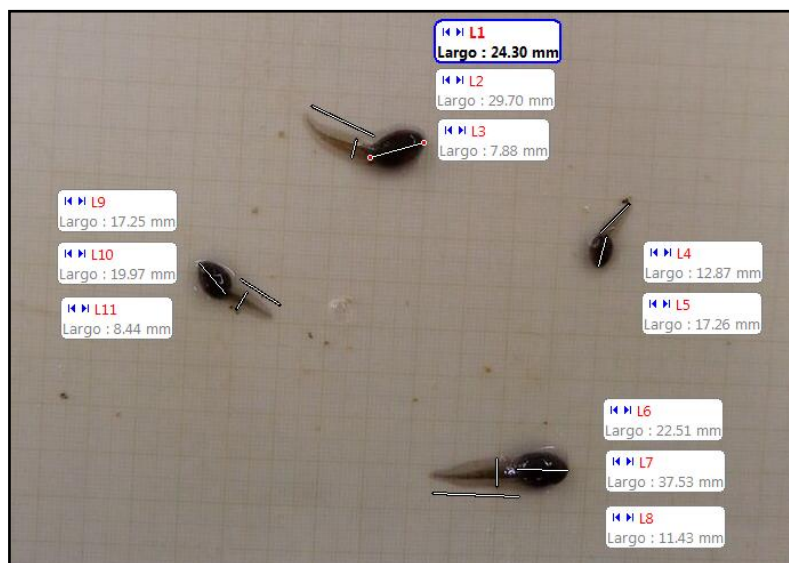


Figura 18: Presa de mides dels capgrossos amb el programa Motic Images Plus.

4.5. Metodologia específica per a l'anàlisi de l'activitat (Hipòtesi 3)

4.5.1. OBJECTIUS

Determinar si hi ha variacions en la posició dels capgrossos dins el got depenent de la concentració d'amoni a la que estiguin exposats.

4.5.2. MATERIALS, APARELLS I PRODUCTES

No es va utilitzar cap material ni producte.

4.5.3. PROCEDIMENT

El dia que vam iniciar l'experiment, ens vam adonar que en el tractament amb la màxima concentració, el de 160 mg/l, tots els capgrossos es tendien a posicionar a prop de la superfície de l'aigua del got. El menjar es trobava al fons del got, per tant, vam plantejar-nos que potser, els individus exposats a concentracions més altes eren més inactius i menjaven menys i per la qual cosa es trobaven la major part del temps prop de la superfície. En canvi els individus exposats a concentracions baixes es movien de dalt a baix del got.

Vam decidir, doncs, anotar la posició en que es trobaven els capgrossos de cada got durant els 15 dies que va durar l'experiment.

4.5.4. CÀLCULS I TRACTAMENT DE DADES

Les dades sobre la posició dels capgrossos van ser anotades sobre fulls de paper i un cop finalitzat l'experiment, es va elaborar una taula d'Excel i els gràfics corresponents.

5. Resultats

5.1. Hipòtesi 1

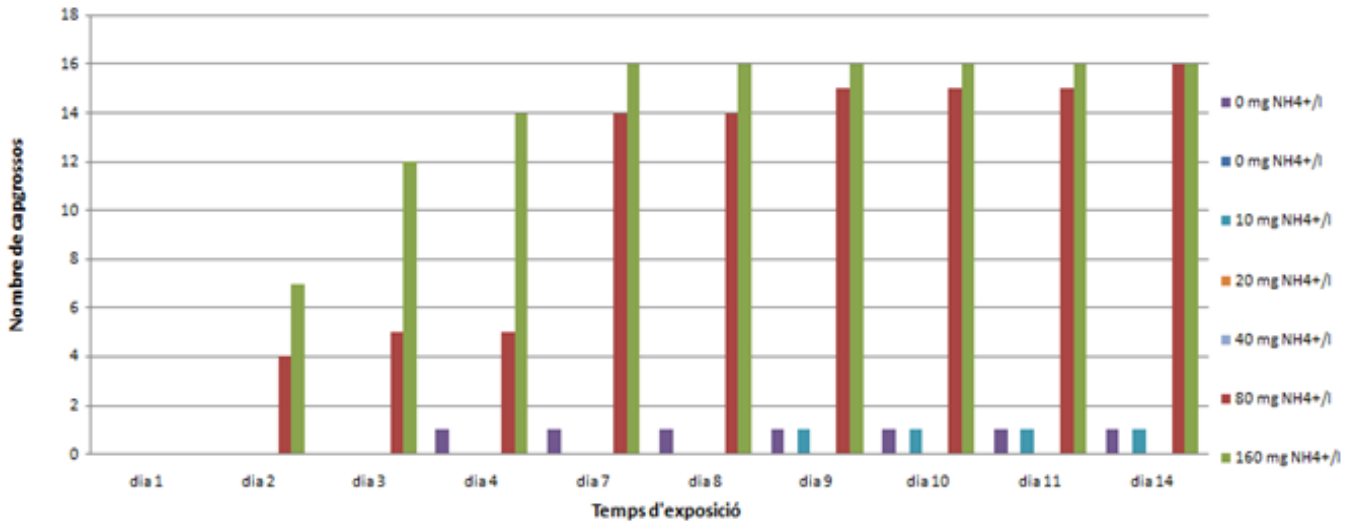


Figura 19: Mortalitat acumulada dels capgrossos expressada en un grafic de barres.

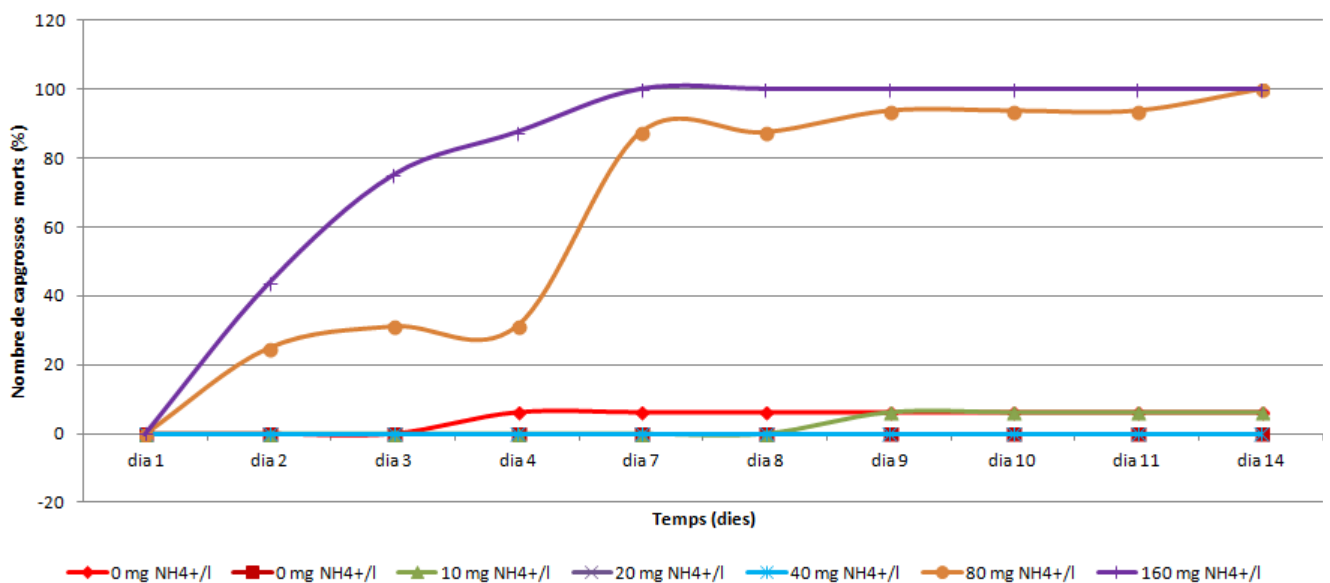


Figura 20: Mortalitat acumulada dels capgrossos expressada en un gràfic lineal.

Durant els 15 dies que va durar la part experimental, la mortalitat dels capgrossos va estar present a partir del tractament de 80 mg NH₄⁺/l i especialment al de 160 mg NH₄⁺/l. En el grup control 1 i el de 10 mg NH₄⁺/l, la mortalitat va ser d'un capgròs a

cada un dels grups, dada gens significativa, mentre que a la resta de grups no va morir cap capgròs.

Podem concloure que la mortalitat dels capgrossos de *Pelodytes punctatus*, durant el període de quinze dies, presenta mortalitat molt elevada a concentracions de 80 i 160 mg NH₄⁺/l. Els capgrossos exposats a 80 mg/l van morir per complet el dia 15 i el capgrossos exposats a 160 mg/l van morir per complet el dia 7. La mortalitat no és present a concentracions iguals o inferiors a 40 mg/l, per tant, podem afirmar que per sota d'aquestes concentracions no té efectes sobre els capgrossos en relació amb la mortalitat.

Com ja s'ha explicat a l'apartat 2, el test més comú per a determinar la sensibilitat d'una espècie a un contaminant és trobar els valors de LC₅₀ (lethal concentration).

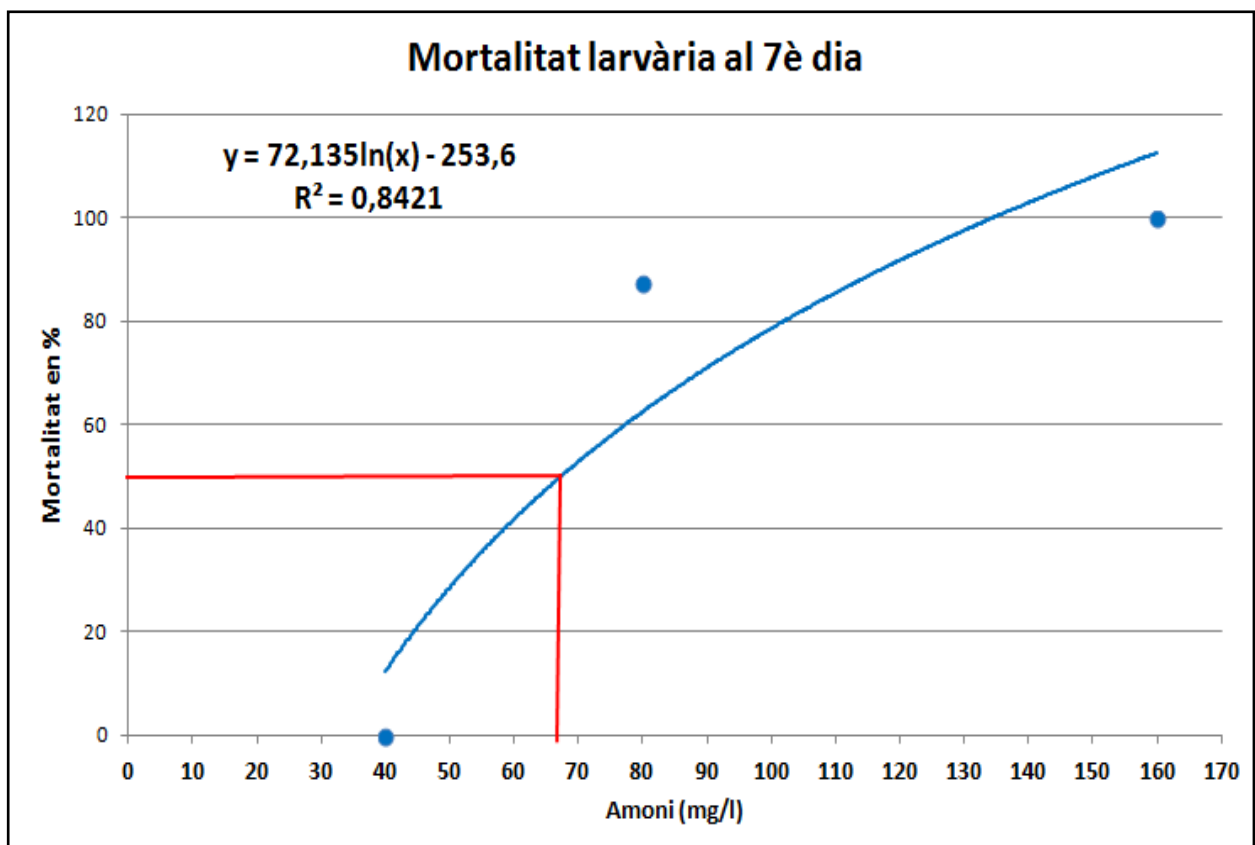


Figura 21: Funció logarítmica de la mortalitat al setè dia i valor de la LC₅₀.

Aquesta gràfica (Figura 21) mostra el càlcul de la LC50. Ens indica la concentració a la qual mor el 50% de la població de prova, és a dir, quina concentració d'amoni produeix la mortalitat del 50% de les larves de *Pelodytes punctatus*.

Aquesta dada s'ha calculat a partir dels valors de la mortalitat dels capgrossos al setè dia de l'experiment i s'han utilitzat tres valors (x,y) , que corresponen a la concentració d'amoni i el % de mortalitat respectivament: (160, 100), (80, 87,5) i (40, 0). L'equació que s'ha fet servir és una logarítmica degut a que és la que dona un valor més alt de la R². Altres equacions com la recta i la polinòmica no s'ajusten a les dades que tenim donant una R² de només 0,6597 en el cas de la recta i donant valors impossibles en el cas de la polinòmica.

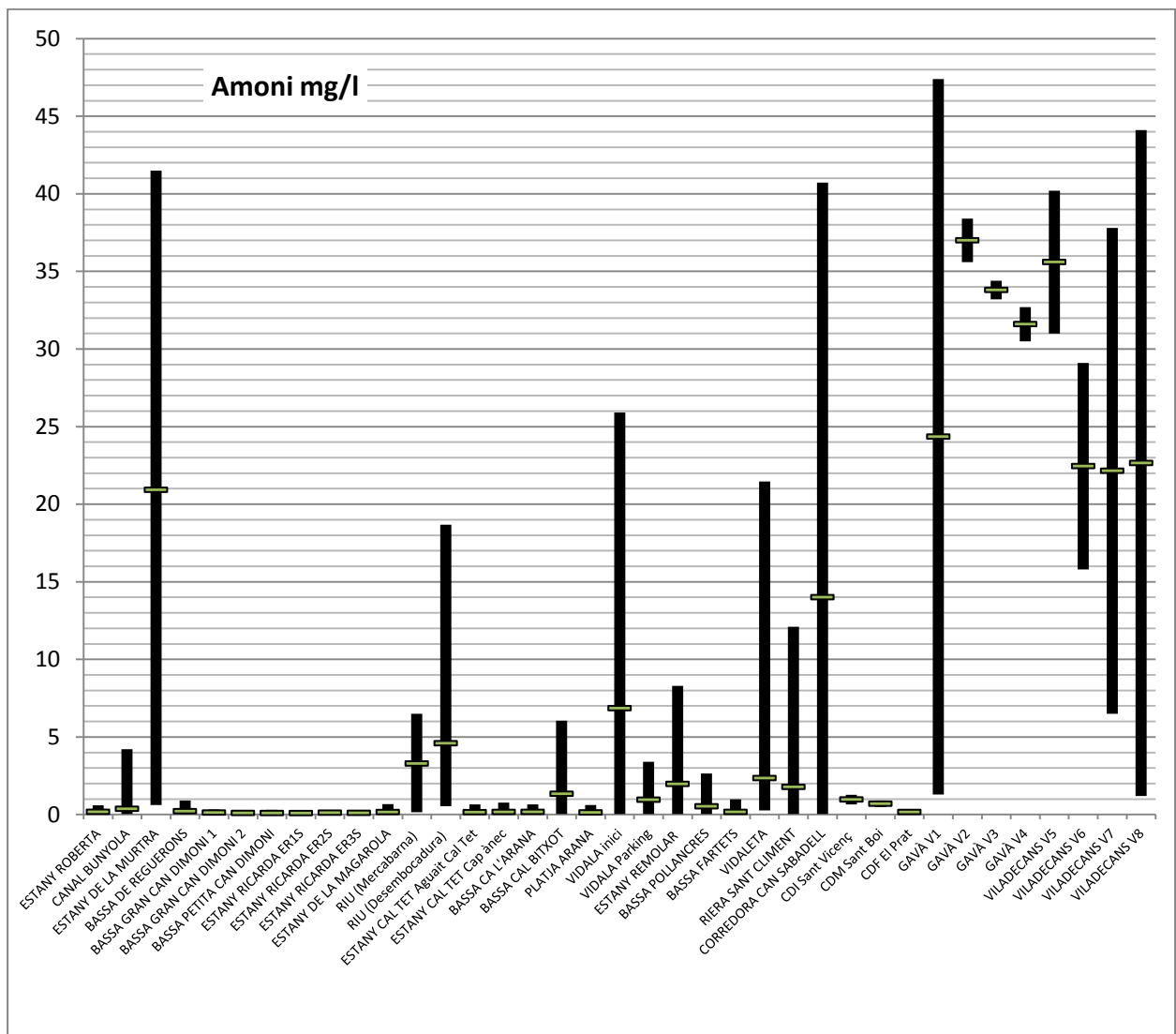


Figura 22: Nivells mitjans, màxims i mínims d'amoni (mg/l) en els diferents punts de mostreig. Dades procedents del PICMA.

Amb aquesta gràfica s'obté que la mortalitat del 50% de les larves es produeix a una concentració de 67 mg NH₄⁺/l. Aquesta dada ens indica que concentracions a la natura que siguin iguals o que superin els valors de LC₅₀ podrien portar la població a l'extinció.

Aquesta concentració no es dona de forma habitual als canals del delta analitzats (Figura 22) però puntualment es poden superar aquests valors. També cal tenir en compte que a la natura hi ha altres contaminants a més de l'ió amoni que poden actuar sinèrgicament i incrementar els efectes sobre les espècies.

5.2. Hipòtesi 2

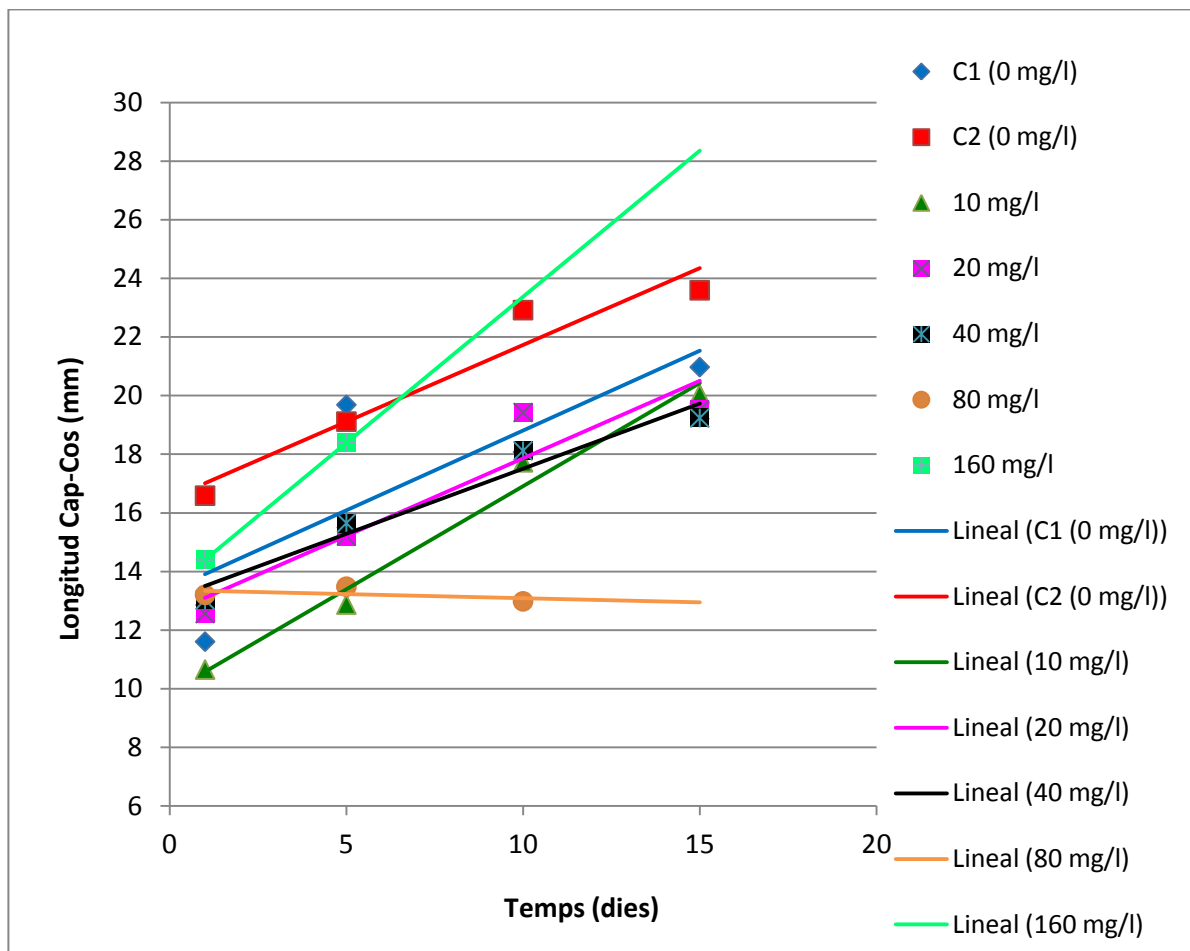


Figura 23: Rectes de regressió a partir de la mitjana de la longitud del cap-cos al llarg dels dies.

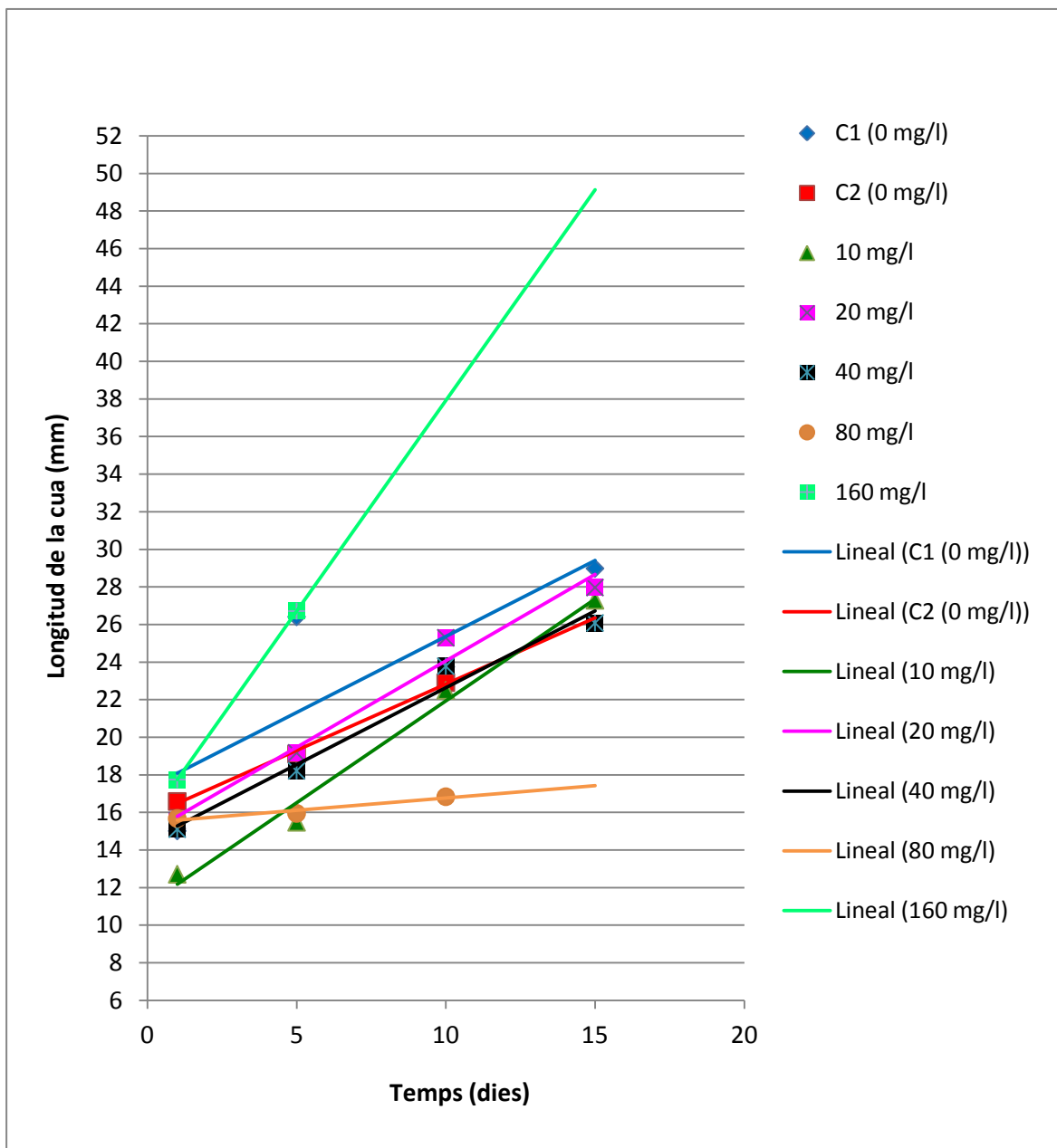


Figura 24: Rectes de regressió a partir de la mitjana de la longitud de la cua al llarg dels dies.

Els gràfics mostren les rectes de regressió de la mitjana de la longitud del cap-cos (Figura 23), cua (Figura 24) i longitud total (Figura 25) dels capgrossos al llarg dels dies. Els tres gràfics tenen un patró similar.

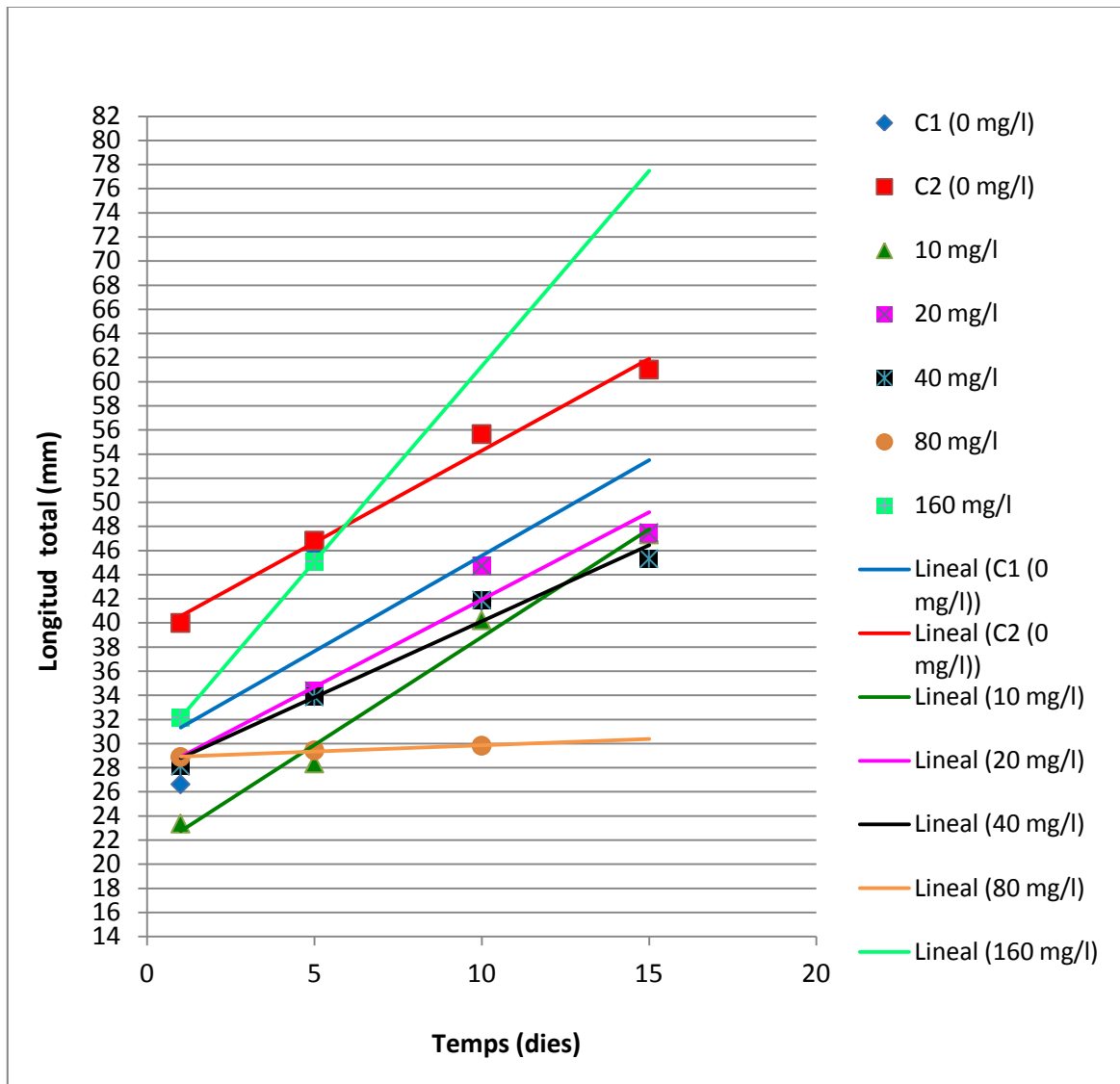


Figura 25: Rectes de regressió a partir de la mitjana de la longitud total dels capgrossos al llarg dels dies.

Si observem els grups control (C1 i C2) veiem que la recta de regressió és quasi paral·lela entre ells. Prenent aquests grups com a model, s'aprecia que els tractaments de 10, 20 i 40 mg NH_4^+ /l tenen un pendent semblant i per tant, tenen un creixement similar, sent el tractament de 10 mg NH_4^+ /l el que ha experimentat un creixement superior. En comparació, els tractaments de 80 i 160 mg NH_4^+ /l s'allunyen del patró: els capgrossos del tractament de 80 mg NH_4^+ /l quasi no han experimentat creixement i els capgrossos del tractament de 160 mg NH_4^+ /l presenten una recta de regressió amb molt de pendent, cosa que ens indicaria que han experimentat una gran crescuda però

aquests resultats no són vàlids perquè el dia 5, degut a la gran mortalitat en aquest tractament, només quedaven dos capgrossos que havien sobreviscut i eren els més grans que hi havia. Per aquest motiu, al fer la mitjana aritmètica va sortir tan elevada el dia 5 mentre que el dia 1 la mitjana inclou capgrossos més petits a més dels grans.

Per tant, excloent el tractament de 160 mg NH_4^+ /l, els capgrossos del tractament de 80 mg NH_4^+ /l són els que no experimenten creixement.

5.3. Hipòtesi 3

A continuació es mostren els gràfics resultat de l'estudi de la posició dels capgrossos.

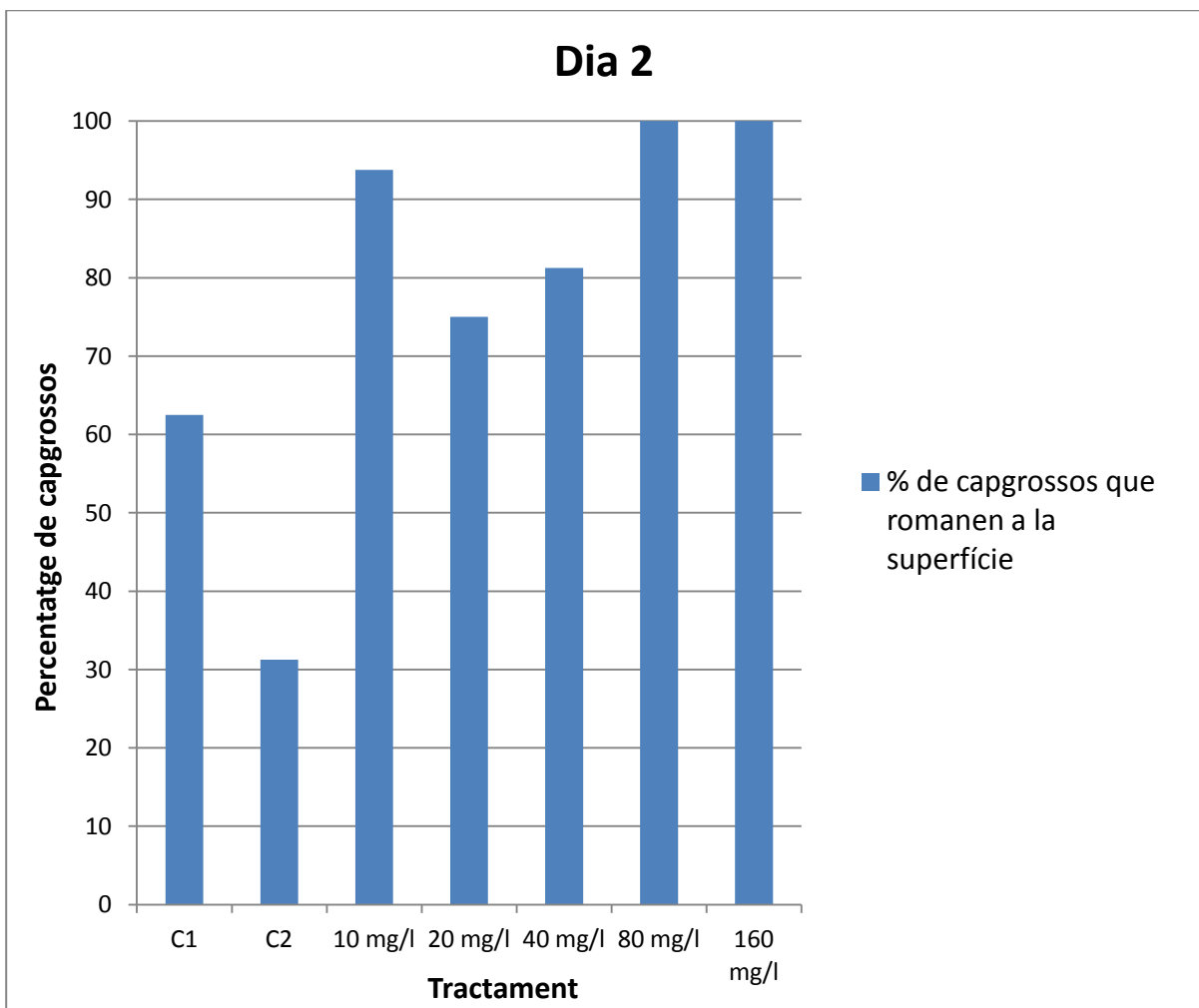


Figura 26: Tant per cent de capgrossos posicionats a prop de la superfície a cada tractament el dia 2.

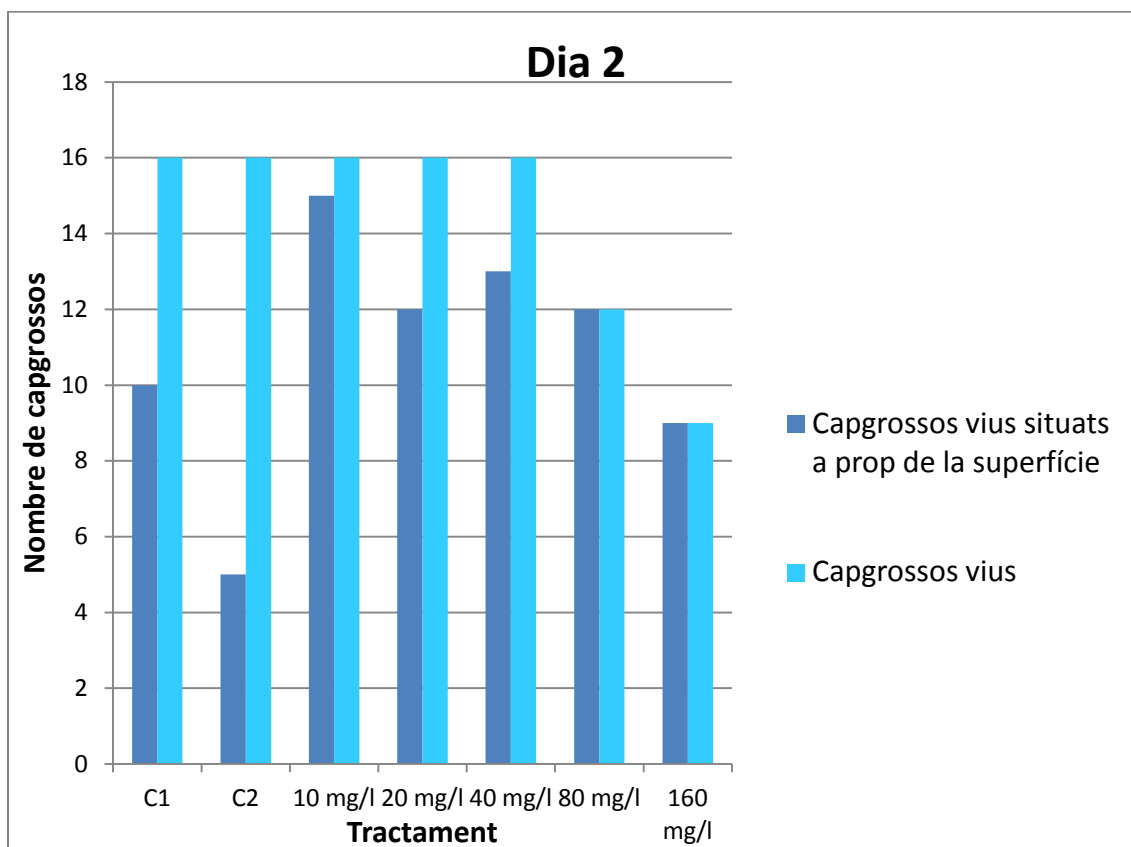


Figura 27: Capgrossoes situats a prop de la superfície en comparació amb els capgrossoes vius a cada tractament el dia 2.

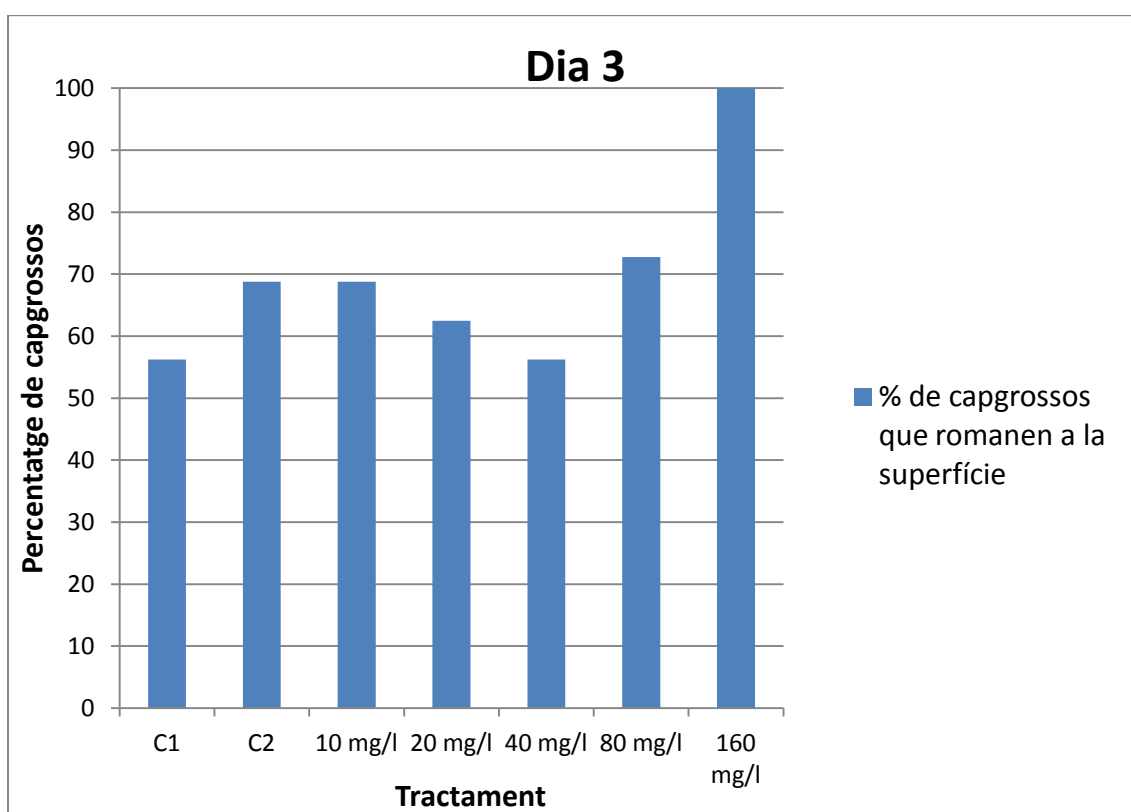


Figura 28: Tant per cent de capgrossoes posicionats a prop de la superfície a cada tractament el dia 2.

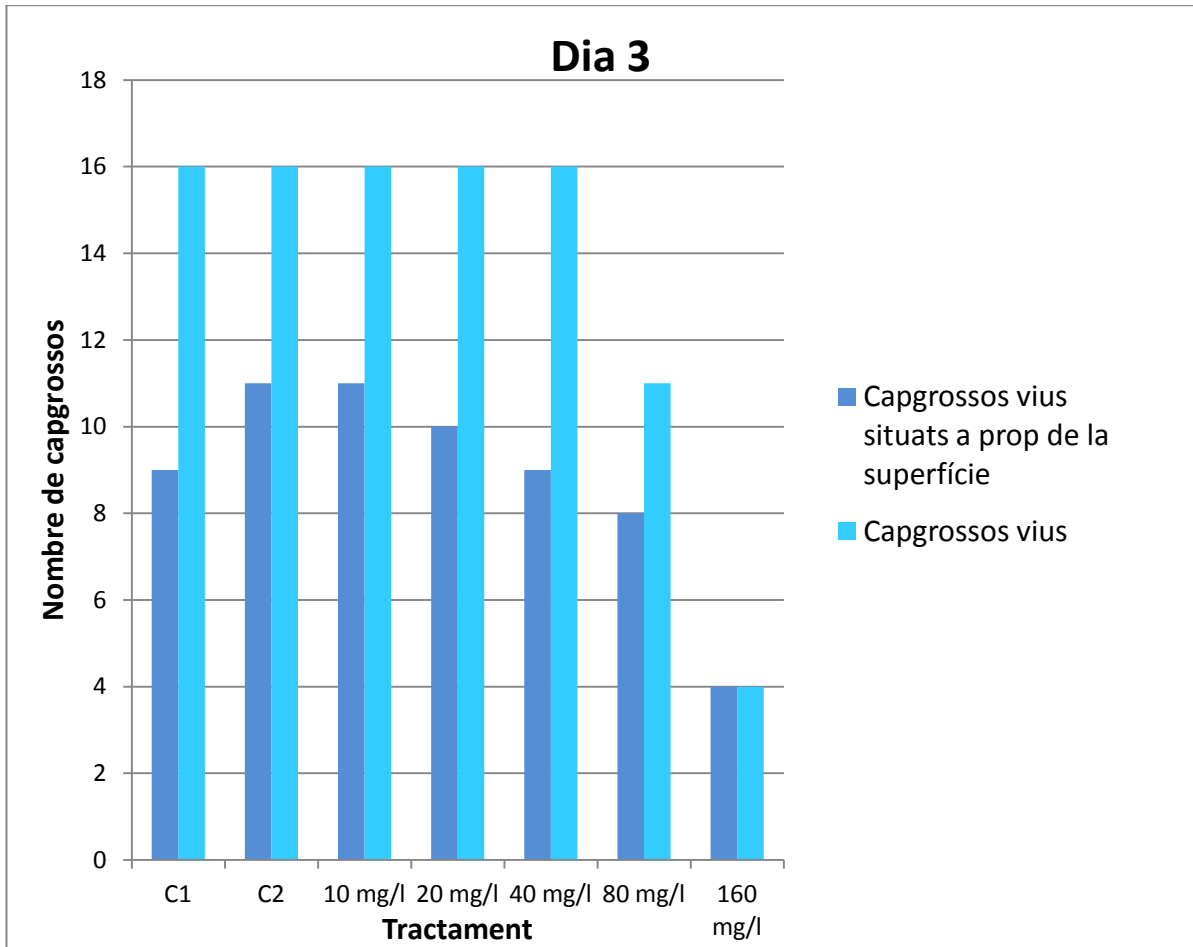


Figura 29: Capgrossos situats a prop de la superfície en comparació amb els capgrossos vius a cada tractament el dia 3

La posició dels capgrossos es va enregistrar tots els dies però, al haver mort la majoria dels capgrossos del tractament 160 mg NH_4^+ /l i molts del tractament de 80 mg NH_4^+ /l, només hem mostrat els gràfics dels dies 2 i 3 en que encara hi havia individus vius.

Als gràfics del dia 2 s'aprecia que el 100 % dels individus restants dels tractaments de 80 i 160 mg NH_4^+ /l es posicionen a prop de la superfície i que els grups control tenen valors clarament més baixos d'individus a prop de la superfície que la resta de tractaments. Això pot voler dir que encara que en concentracions baixes no produeixi mortalitat, sí que es produeixi alguna alteració del comportament o de la condició física.

Quan observem els gràfics del dia 3 podem veure que els individus del tractament de 160 mg NH_4^+ /l segueixen estant tots a la superfície tot i que ja només queden quatre vius. En el tractament de 80 mg NH_4^+ /l, a diferència del dia 2, han disminuït els capgrossos situats a prop de la superfície havent-hi un 72,7 %. A la resta de grups els valors són semblants.

En conclusió, la gran mortalitat a concentracions elevades no ens ha permès veure resultats clarament concloents. No podem afirmar amb contundència que a concentracions més elevades es mantinguin a la superfície perquè ens falten més dades però sí que és cert que els tractaments de 80 i 160 mg NH_4^+ /l tenen percentatges més alts de capgrossos situats a prop de la superfície.

6. Conclusions del treball

Els resultats experimentals ens permeten comprovar si les hipòtesis plantejades es poden acceptar o rebutjar. Començant per la primera hipòtesi plantejada sobre la mortalitat larvària a elevades concentracions en presència d'amoni, podem concloure que es corrobora. L'exposició a concentracions creixents d'amoni, així com l'augment del temps d'exposició, van incrementar significativament la mortalitat larvària a concentracions de 80 mg NH_4^+ /l i 160 mg NH_4^+ /l. En el càlcul de la LC50, gràfica s'obté que la mortalitat del 50% de les larves es produeix a una concentració de 67 mg NH_4^+ /l.

La segona hipòtesi, la qual afirmava que a concentracions elevades d'amoni es produïa una disminució del creixement larvari, es pot acceptar. Els tractaments de 0, 10, 20 i 40 mg NH_4^+ /l van experimentar un creixement similar, que es pot considerar com a normal. En el grup de 80 mg NH_4^+ /l i el de 160 mg NH_4^+ /l els resultats van ser molt diferents als grups anteriors. El tractament de 160 mg NH_4^+ /l es va descartar dels resultats degut a que la gran mortalitat dels capgrossos no permetia veure la progressió correcta del creixement. És cert que el grup de 80 mg NH_4^+ /l no va experimentar creixement, per la qual cosa es pot considerar la hipòtesi com a correcta, però tenint en compte que també hi va haver mortalitat en aquest grup, només es pot acceptar parcialment.

Per últim, la tercera hipòtesi plantejada sobre la posició dels capgrossos a prop de la superfície de l'aigua quan eren exposats a altes concentracions no es pot acceptar. S'ha vist una gran varietat de posicions en la majoria dels grups durant tots els dies. Tot i així, és cert que quasi la totalitat dels capgrossos que romanien vius als grups de 80 i 160 mg NH₄⁺/l es situaven surant vora la superfície de l'aigua, però la gran mortalitat que ha produït l'amoni en aquestes concentracions tant elevades no ha permès establir unes conclusions fermes.

El treball, igual que la resta d'estudis sobre la contaminació i els amfibis, reflecteix els danys de l'amoni sobre l'espècie *Pelodytes punctatus*, és a dir, mostra l'acció d'una substància tòxica de manera aïllada. Per tant, cal tenir en compte que a la natura no només es troba l'amoni, sinó que també hi ha altres ions que causarien un efecte sinèrgic i provocar majors efectes sobre les espècies.

7. Referències bibliogràfiques

BALLESTEROS, T; DEGOLLADA, A. *Distribució dels amfibis i rèptils al delta del Llobregat*, 12 de Desembre de 1995.

EGEA SERRANO, A. *Aspectos relevantes en la concentración de anfibios en la región de Murcia: efectos de la contaminación por fertilizantes sobre Pelophylax perezi (Seoane, 1885)*. Murcia: Universitat de Murcia, Març de 2010.

EGEA SERRANO, A; TEJEDO, M; TORRALVA, M. *Estimating mean lethal concentrations of the nitrogenous compounds for the Iberian waterfrog, Pelophilax perezi (Seoane, 1885), larvae*. 2009.

EGEA SERRANO, A; TEJEDO, M; TORRALVA. *Population divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog Pelophilax perezi (Seoane, 1885)*. 16 de Maig de 2009.

GARRIGA, N, MONTORI, A, LLORENTE G.A. *Impact of ammonium nitrate and sodium nitrate on tadpoles of Alytes obstetricians*, prensa.

LLORENTE, G.; MONTORI, A.; FRANCH, M I GARRIGA, N. *Amfibis i rèptils del delta del Llobregat. Història d'un declivi*, 14 de gener de 2012.

MONTORI, A; FRANCH, M; LLORENTE, G, A; RICHTER, A; SANSEBASTIAN, O; GARRIGA, N; PASCUAL, G. *Declivi de les poblacions d'amfibis al delta del Llobregat*, 4 de Novembre de 2009.

8. Webgrafia

<http://www.xtec.cat/~mferna99/projecte/dol%E7a2.htm>

https://ca.wikipedia.org/wiki/Contaminaci%C3%B3_de_l%27aigua

https://impactesbiodiversitat.wikispaces.com/file/view/g4_-contaminaci3b3-aigc3bces.pdf

<http://www4.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/11CAgu/120ProcC.htm#POBLACION>

http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/pdf/lib43/3_1.pdf

http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/pdf/lib43/3_1.pdf

<http://www.ca.globaltalentnews.com/actualitat/reportatges/5256/Rius-malalts-pero-amb-moltes-medicines.html>

<http://www.regio7.cat/arreu-catalunya-espanya-mon/2009/12/04/presencia-farmac-s-al-llobregat-hi-perdre-especies/57829.html>

<http://fgonzalesh.blogspot.com.es/2011/01/contaminacion-por-fertilizantes-un.html>

<https://es.wikipedia.org/wiki/Fosfato>

<http://imatgesitextosdeciencies.blogspot.com.es/2013/04/eutrofitzacio-quan-l-enriquiment-de.html>

<https://ca.wikipedia.org/wiki/Eutrofitzaci%C3%B3>

<https://elrincondedefranc.wordpress.com/2011/08/08/el-fenomeno-de-la-eutrofizacion/>

http://pendientedemigracion.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/contaminacion_riosy_lagos.html

<file:///D:/Download/Tema%208%20Contaminacion%20del%20agua%2007.pdf>

<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Salinizac.htm>

http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/Leaflets/B3_Leaflet_ES.pdf

<http://www.lasequia.cat/montsalat/Impactes/Salinitzacio.htm>

<http://definicion.de/nitrogeno/>

http://www.ruralcat.net/migracio_resources/Article_Joan_Capdevila_1.pdf

[\[web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P18401539711247500470258\]\(http://web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P18401539711247500470258\)](http://aca-</p></div><div data-bbox=)

<http://www.ugr.es/~mota/Parte2-Tema05.pdf>

<https://books.google.es/books?id=k8blixwJzYUC&pg=PA23&lpg=PA23&dq=los+compuestos+nitrogenados+presentes+en+el+agua+contaminada&source=bl&ots=l2lqMBp8H4&sig=YV71xc3TJyfUckKdh4TQBrEljmY&hl=ca&sa=X&ved=0CCcQ6AEwAWoVChMInZ3Uk766xwIVy7gUCh0l1QRC#v=onepage&q=los%20compuestos%20nitrogenados%20presentes%20en%20el%20agua%20contaminada&f=false>

<https://tecnologiaisostenibilitat.cus.upc.edu/continguts/fonaments-decologia/6.-cicles-biogeoquimics/6.2.-el-cicle-del-nitrogen-tendencies-recents-problemes-i-solucions.-eutrofitzacio>

<http://www.biodiversidad.gob.mx/corredor/quees.html>

<https://www.youtube.com/watch?v=Um3r116Wp4Y>

http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Agua/Documentacion/Parametros/ParametrosNutrientes.htm

<http://www.ca.globaltalentnews.com/reflexio/tribunes/2474/Nitrats-a-laigua-europea.html>

<http://www.gencat.es:8000/mediamb/revista/rev25-2.htm>

<http://www.iucnredlist.org/details/58056/0>

<http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=14800>

http://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?where-genus=Pelodytes&where-species=punctatus&rel-genus>equals&rel-species>equals

<http://www.sierradebaza.org/index.php/mapa-web/126-principal/fichas-tecnicas/f-fauna/anfibios/orden-anura-anfibios-sin-cola-ranas-y-sapos/familia-pelodytidae/205-sapillo-moteado-comun-pelodytes-punctatus-daudin-1802>

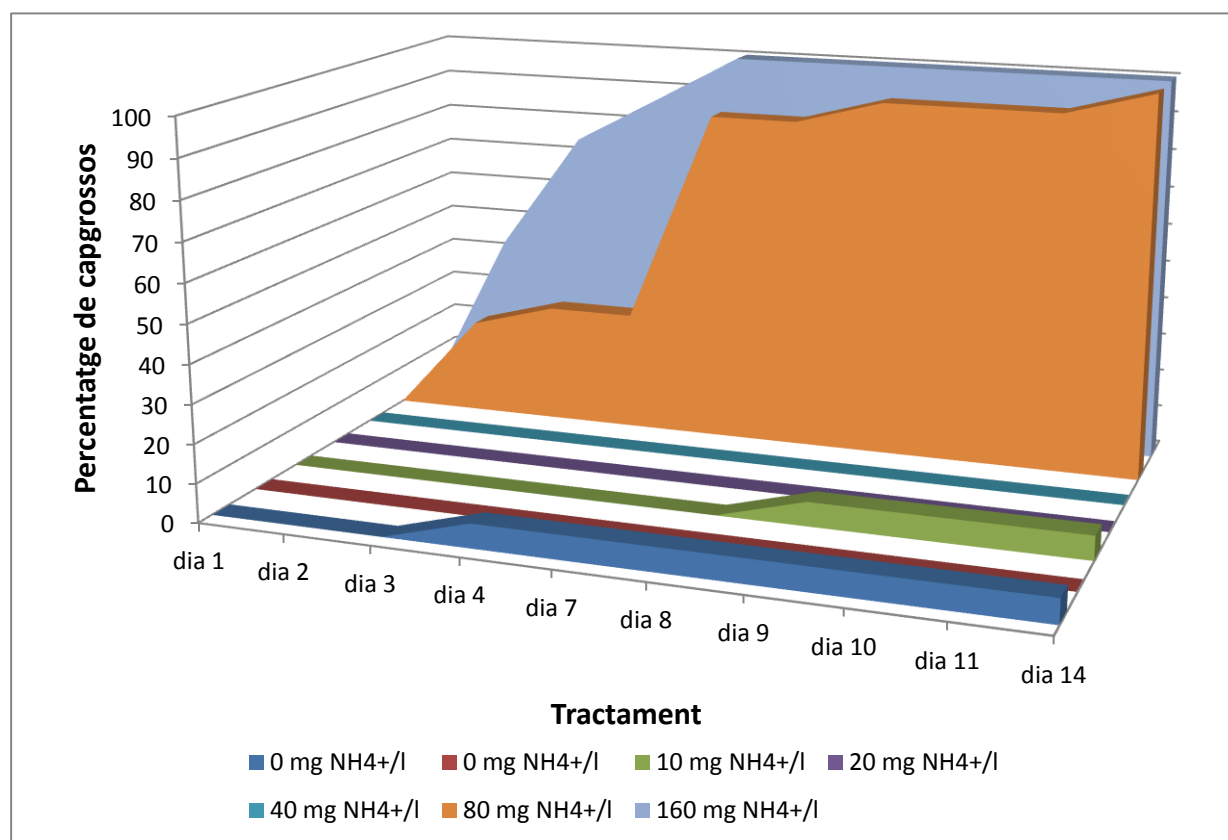
ANNEX

Concentració (mg NH4+/l)	Total de capgrossos	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	dia 11	dia 14
0 mg NH4+/l	16	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0 mg NH4+/l	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 mg NH4+/l	16	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
20 mg NH4+/l	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 mg NH4+/l	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 mg NH4+/l	16	0	4	5	5	14	14	15	15	15	16
160 mg NH4+/l	16	0	7	12	14	16	16	16	16	16	16

Taula 1: Nombre de capgrossos morts.

Concentració (mg NH4+/l)	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	dia 11	dia 14
0 mg NH4+/l	0	0	0	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
0 mg NH4+/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 mg NH4+/l	0	0	0	0	0	0	6.25	6.25	6.25	6.25
20 mg NH4+/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 mg NH4+/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 mg NH4+/l	0	25	31.25	31.25	87.5	87.5	93.75	93.75	93.75	100
160 mg NH4+/l	0	43.75	75	87.5	100	100	100	100	100	100

Taula 2: Tant per cent de capgrossos morts.



Gràfica 1: Tant per cent de capgrossos morts a cada tractament al llarg dels dies.

Concentració (mg NH4+/l)	Total de capgrossos	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	dia 11	dia 14
0 mg NH4+/l	16	16	16	16	15	15	15	15	15	15	15
0 mg NH4+/l	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
10 mg NH4+/l	16	16	16	16	16	16	16	15	15	15	15
20 mg NH4+/l	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
40 mg NH4+/l	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
80 mg NH4+/l	16	16	12	11	11	2	2	1	1	1	0
160 mg NH4+/l	16	16	9	4	2	0	0	0	0	0	0

Taula 3: Nombre de capgrossos vius.

Tractament	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10	dia11	dia 14
C1	7	10	9	7	2	14	3	13	11	2
C2	9	5	11	9	7	13	7	14	11	5
10 mg/l	12	15	11	10	6	13	9	13	12	3
20 mg/l	11	12	10	6	5	16	5	14	10	7
40 mg/l	13	13	9	2	8	15	14	15	10	13
80 mg/l	13	12	8	9	1	2	1	1	0	0
160 mg/l	14	9	4	2	0	0	0	0	0	0

Taula 4: Nombre de capgrossos situats a la superfície.

C1	C2	10mg/l	20mg/l	40mg/l	80mg/l	160mg/l
$y=0,5245x + 16,486$ $R^2=0,9337$	$y=0,5439x + 13,369$ $R^2=0,6318$	$y=0,7035x + 9,8725$ $R^2=0,9806$	$y=0,5289x + 12,576$ $R^2=0,8929$	$0,4445x + 13,063$ $R^2=0,9573$	$y=-0,0279x + 13,37$ $R^2=0,253$	$y=0,997x + 13,405$ $R^2=1$

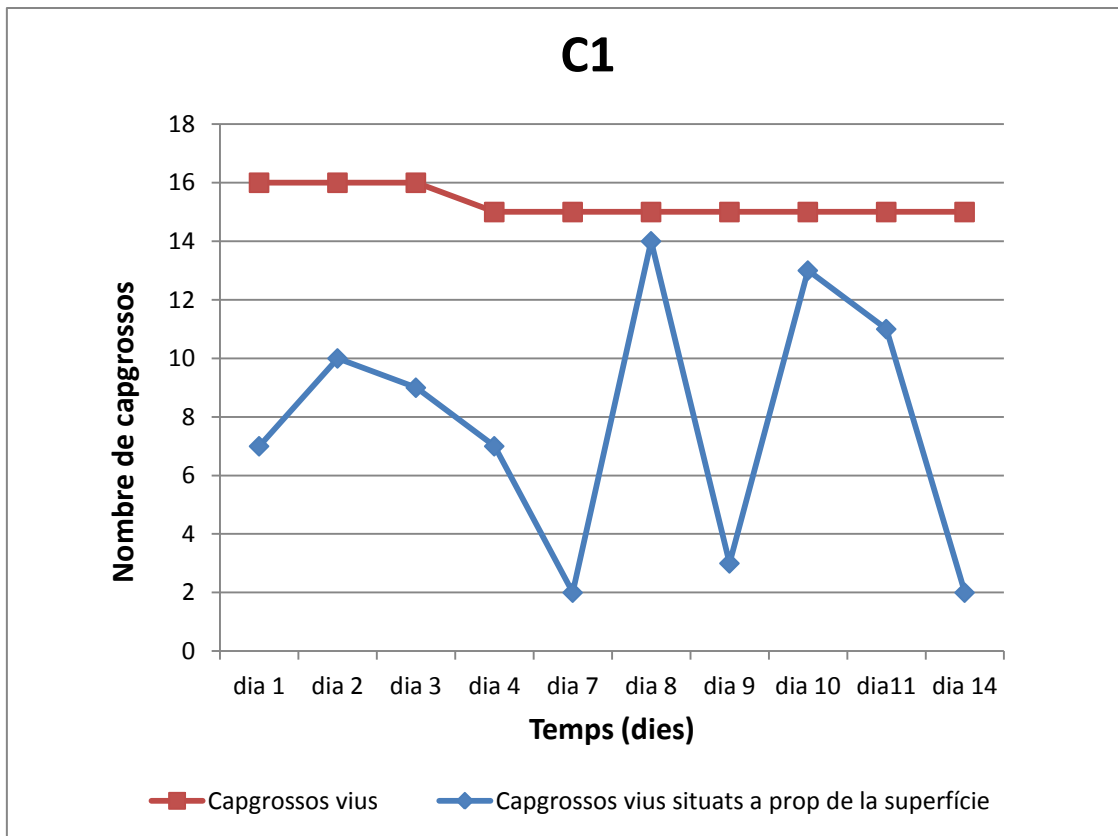
Taula 5: Equacions de les rectes de regressió de la longitud del cap-cos i valor R al quadrat.

C1	C2	10mg/l	20mg/l	40mg/l	80mg/l	160mg/l
$y=0,8087x + 17,275$ $R^2=0,6553$	$y=1,0132x + 22,517$ $R^2=0,9996$	$y=1,0844x + 11,093$ $R^2=0,9873$	$y=0,9199x + 14,873$ $R^2=0,9778$	$y=0,8173x + 14,466$ $R^2=0,9754$	$y=-0,1306x + 15,462$ $R^2=0,946$	$y=2,2419x + 15,511$ $R^2=1$

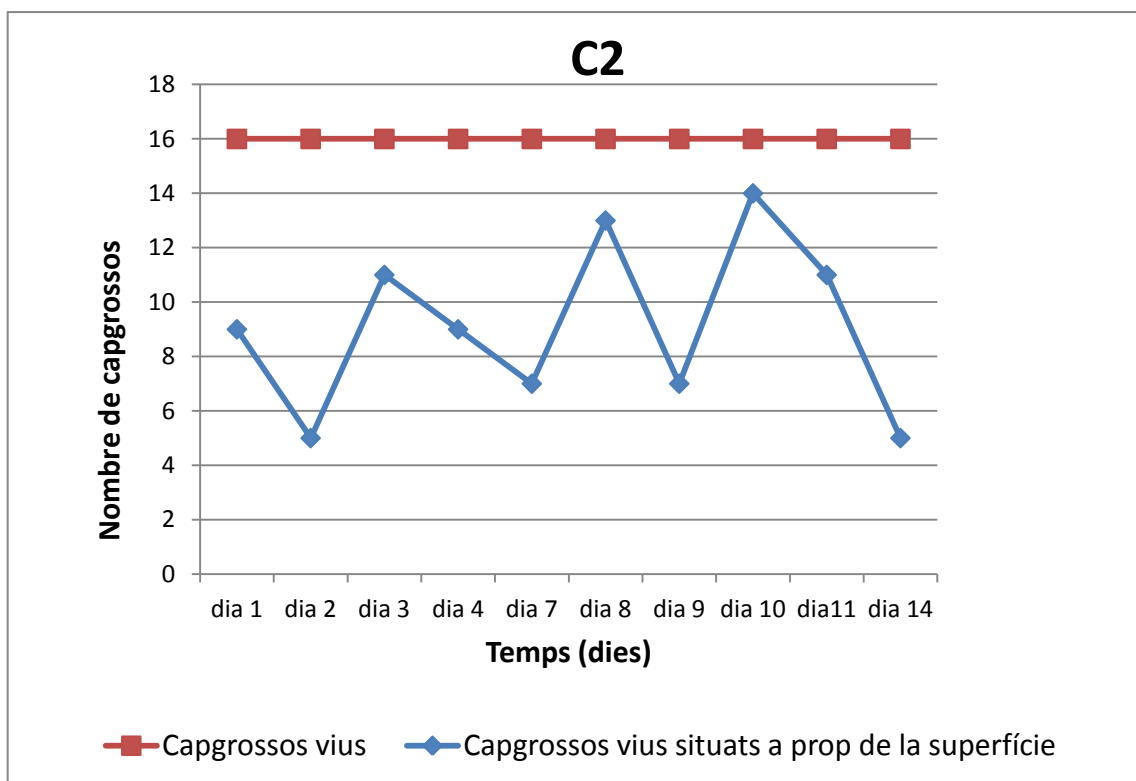
Taula 6: Equacions de les rectes de regressió de la longitud de la cua i valor R al quadrat.

C1	C2	10mg/l	20mg/l	40mg/l	80mg/l	160mg/l
$y=1,3527x + 30,644$ $R^2=0,6465$	$y=1,5237x + 39,059$ $R^2=0,9883$	$y=1,7879x + 20,965$ $R^2=0,9864$	$y=1,4488x + 27,449$ $R^2=0,9536$	$y=1,2619x + 27,529$ $R^2=0,9736$	$y=0,1027x + 28,832$ $R^2=0,9739$	$y=3,2389x + 28,915$ $R^2=1$

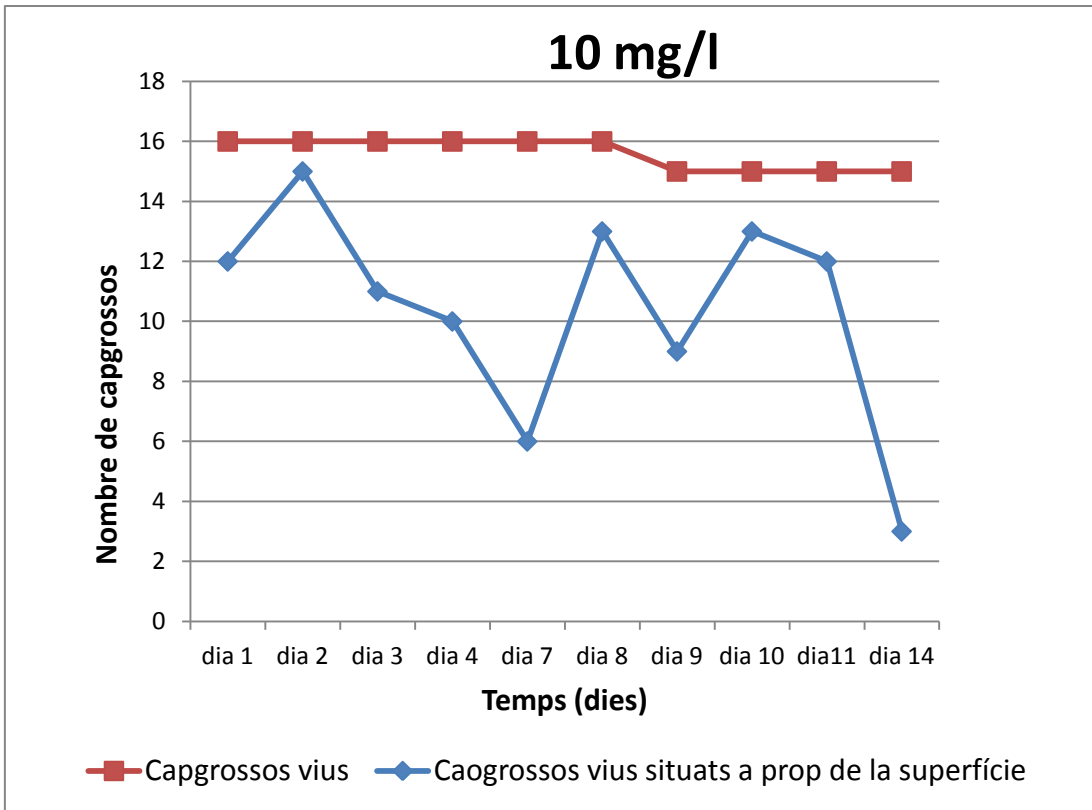
Taula 7: Equacions de les rectes de regressió de la longitud total i valor R al quadrat.



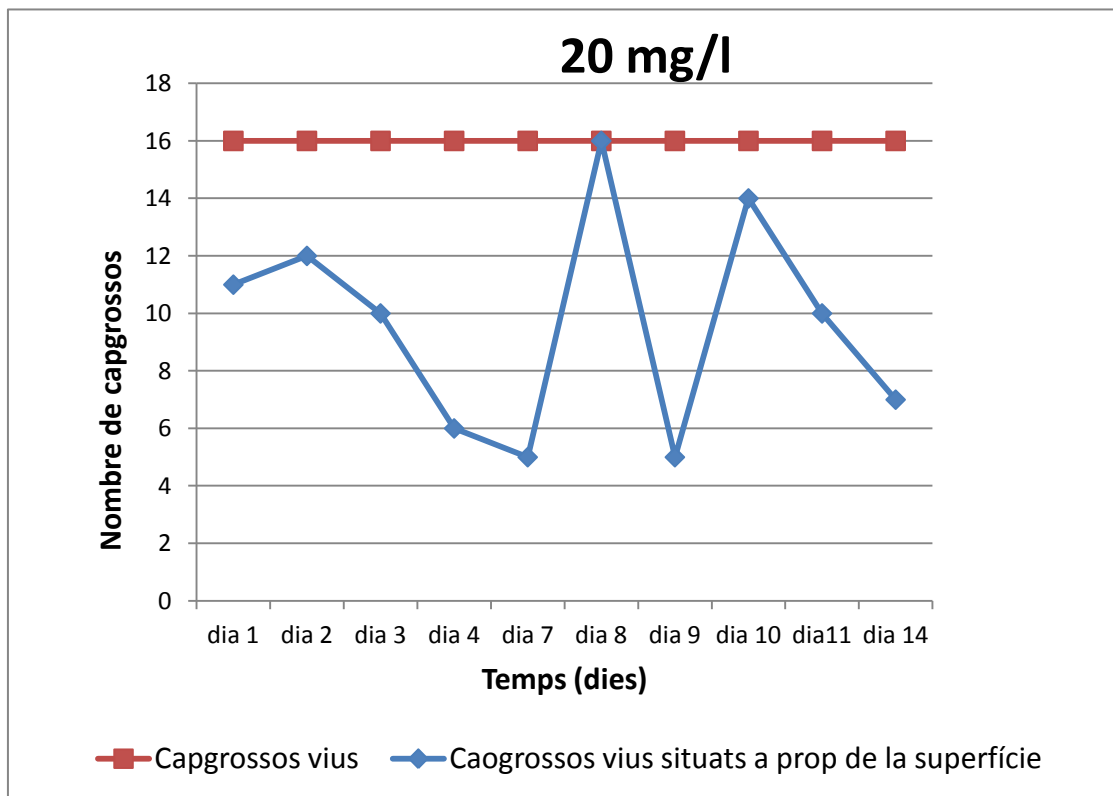
Gràfica 2: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al control 1 al llarg del dies.



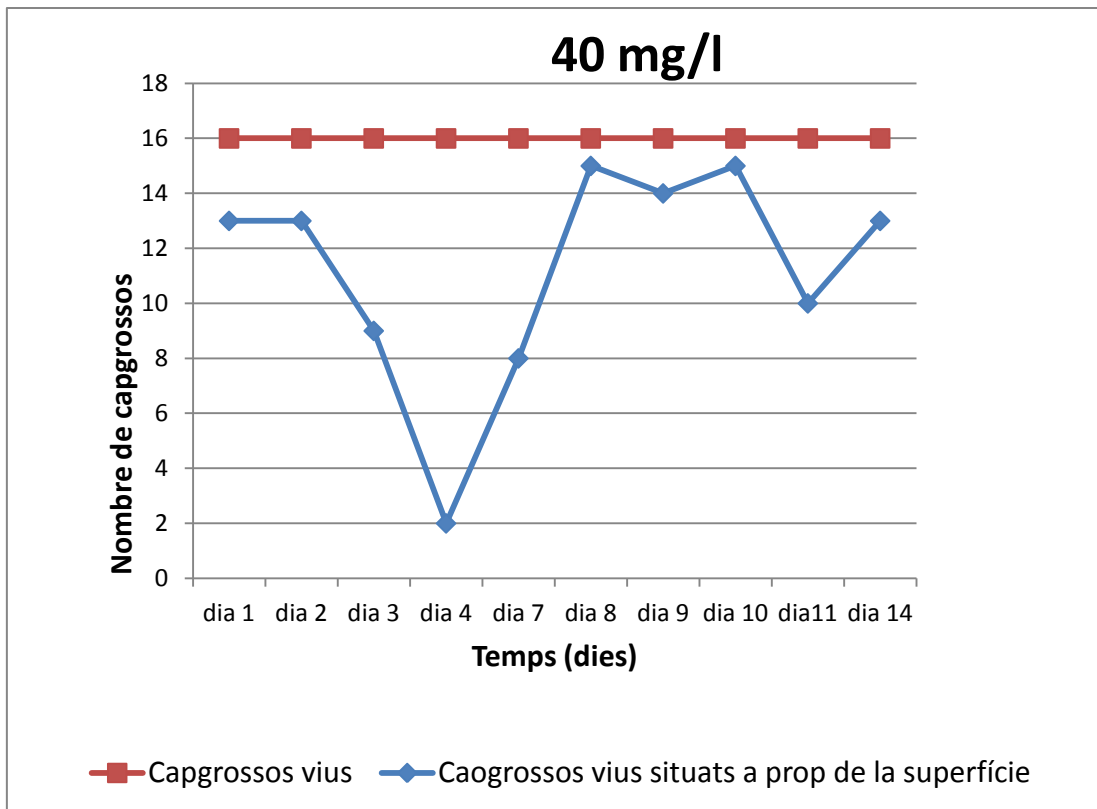
Gràfica 3: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al control 2 al llarg del dies.



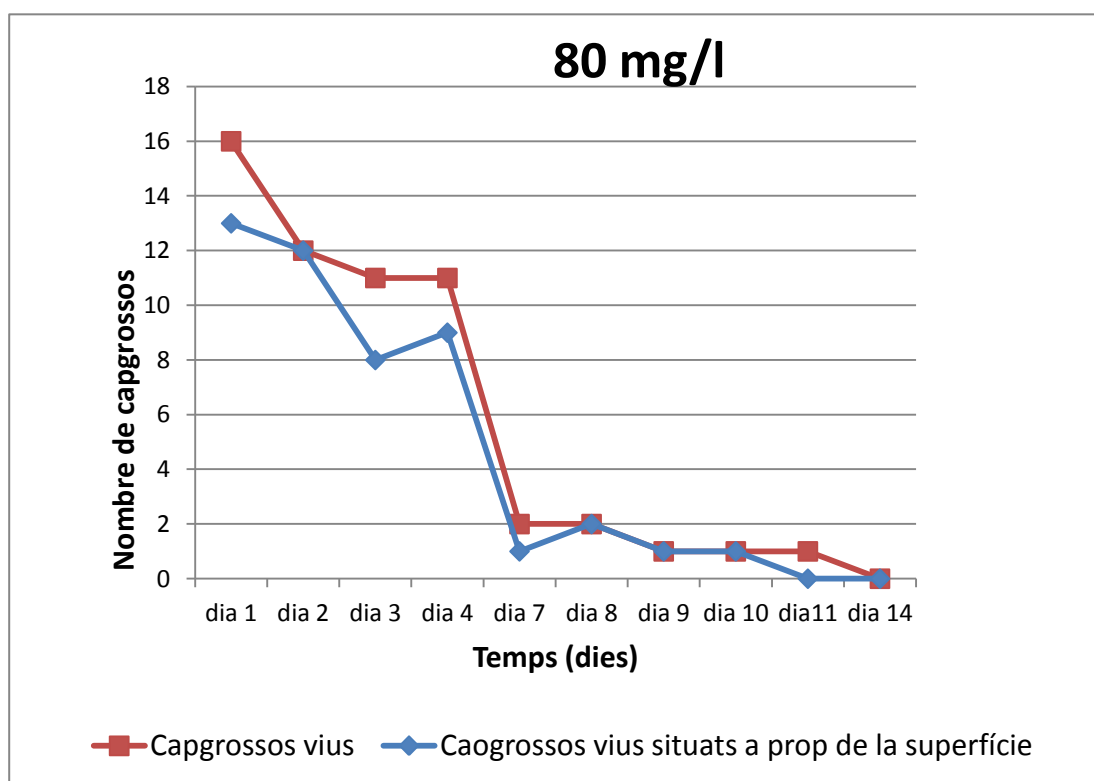
Gràfica 4: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al tractament de 10 mg NH₄⁺/l al llarg del dies.



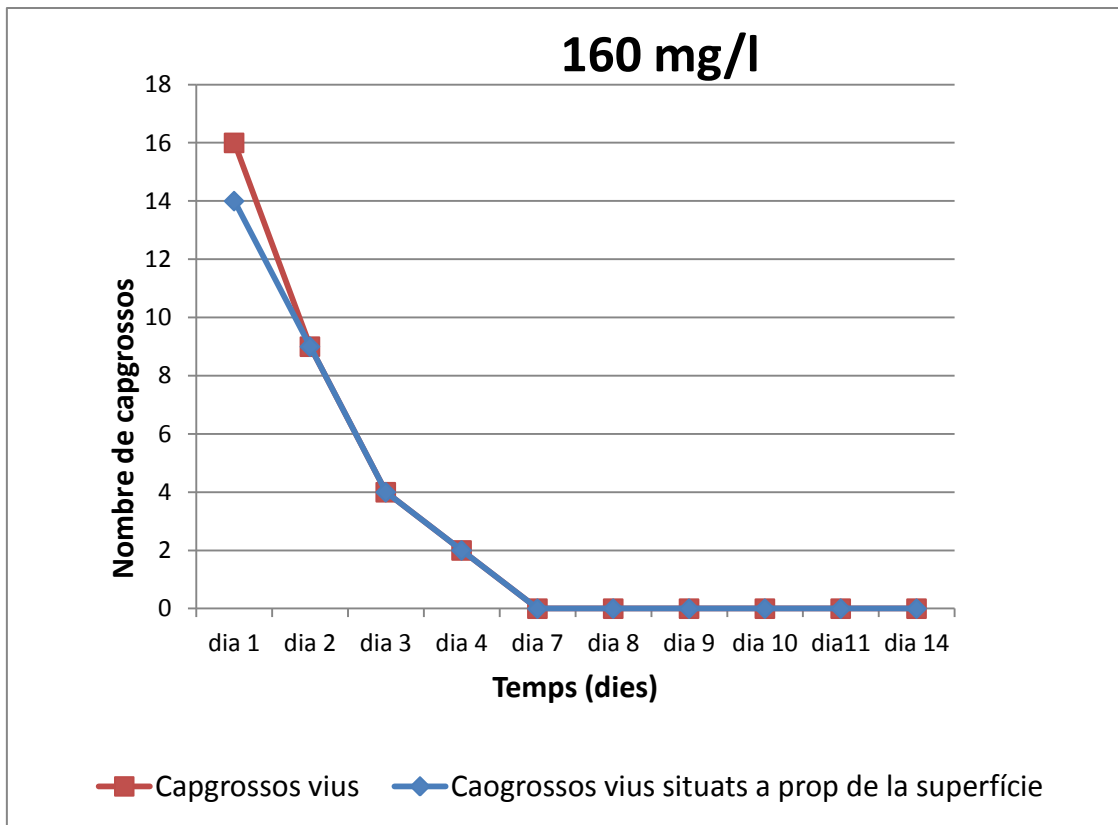
Gràfica 5: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al tractament de 20 mg NH₄⁺/l al llarg del dies.



Gràfica 6: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al tractament de 40 mg NH_4^+ /l al llarg del dies.



Gràfica 7: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al tractament de 80 mg NH_4^+ /l al llarg del dies.



Gràfica 8: Capgrossos vius i capgrossos situats a prop de la superfícies al tractament de 160 mg NH_4^+ /l al llarg del dies.