

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS COMO CONSECUENCIA
DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN SUCESSIVAS
GENERACIONES DE *Daphnia Magna*

MARÍA SÁNCHEZ MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D^a. María Dolores Garcerá Zamorano
- D^a. Encarnación Sancho Aguilar
- D. José María Carrasco Dorrien
- D. José Joaquín Cerón Madrigal
- D. José Vicente Tarazona Lafarga

Va ser dirigida per:

D. Enrique Andreu Moliner

D^a. María Dolores Ferrando Rodrigo

©Copyright: Servei de Publicacions
María Sánchez Martínez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6488-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

Departament de Biologia Funcional
i Antropologia Física



“Alteraciones fisiológicas como consecuencia de la
exposición a plaguicidas en sucesivas generaciones de
Daphnia magna”.

Memoria presentada por:
Dña. María Sánchez Martínez
Para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas.
Junio 2005.

Llegados a este punto, vuelvo mi mirada hacia todas aquellas personas que, de un modo u otro han influido en la realización de este trabajo, al menos configurando el clima que me ha rodeado durante todo este tiempo.

Me gustaría agradecer a los Profesores María Dolores Ferrando Rodrigo y Enrique Andreu Moliner, la oportunidad que me brindaron de poder trabajar en su equipo de investigación, y los consejos que dieron luz a los momentos de incertidumbre científica.

A mis compañeras de laboratorio, María José (cuántos "bichos" sufrimos y disfrutamos juntas!!), Cristina, Encarna y Susana su amistad y compañerismo.

Al Departamento de Biología Funcional y Antropología Física por cederme la infraestructura necesaria para el desarrollo de este trabajo.

A Jesús, por su contribución en el tratamiento estadístico de los resultados.

A Vicente por ayudarme a desentrañar los misterios inescrutables del mundillo informático.

A Paco (y al laboratorio de zoología marina) por su contribución en la obtención de las imágenes de este trabajo.

A Ame y Ana por las sobremesas y puntos de vista compartidos, y a los "nuevos fichajes" Neus y Rocío.

A Fina y las Isabeles por su paciencia y su buen hacer. Gracias por no desesperaros cuando os asalté con los mil y un papeleos que trae consigo la "burrocracia".

Fuera de este microcosmos en el que nos movemos, pero no por ello los siento más lejos: Paco, María José, Mari Luz y Jorge con quienes he mantenido un vínculo muy especial pese a que nuestros senderos se separaron después de estudiar. Gracias por estar ahí: os quiero.

A la gente de Sehumed, y en especial a Gemma, Maryland, Pau y María José, gracias por darme la oportunidad de levantar la vista un poco más allá, por tener otra visión de las cosas y por vuestra amistad.

A Cheli, Lara, Mónica, Salva, Javi, Tovarich, Davys, con quienes perdí mis pensamientos bajo la sombra de los árboles y con quienes compartí un sin fin de cosas sencillas que me ayudaron a crecer como persona.

A los personajes de las lejanas Tierras del Norte: Lydia, Marta, Paula, Raquel, Marcos y Jose. Vosotros me enseñáis que podemos hacer que la vida transcurra más despacio para poder disfrutar de las cosas pequeñas. Gracias por recibirme con los brazos abiertos entre los robles y los castaños.

A María Ángeles, Fina, Irene y Amalia: vosotras me ayudáis a creer en que se puede tener muchas cosas en común sin que la edad nos separe. Gracias por ser especiales. No cambiéis nunca.

Y a mi familia, que sufristeis de cerca (al principio) y de lejos (después) los altibajos de todo esto.

Todos me habéis ayudado a crecer. Gracias por vuestro apoyo, o simplemente por vuestra presencia.

*Al eterno buscador de respuestas.
Al alma de cabello plateado.
Al espíritu de ojos vivos y sensibles.
Al luchador infatigable.
A Bagheera, el guerrero de la constelación de Orión.*

*Y a todos los que, aún no estando aquí,
me ayudan a comprender el verdadero sentido de la vida
y a apreciar la verdadera esencia de lo que nos envuelve.*

ÍNDICE

Índice

1. ANTECEDENTES.	11
1.1. ¿Por qué la Ecotoxicología?.....	12
1.2. Importancia de los análisis multigeneracionales de toxicidad: situación actual de este tipo de ensayos en ecotoxicología.	13
1.3. Origen de los ensayos de toxicidad empleando biomarcadores.....	14
2. INTRODUCCIÓN.....	17
2.1. Organismo objeto de estudio.	18
2.1.1. Taxonomía y distribución geográfica.....	18
2.1.2. Morfología y fisiología.	18
2.1.3. Biología y ciclo reproductor.....	21
2.1.4. Importancia de <i>Daphnia magna</i> en ecotoxicología.	24
2.2. Ensayos de toxicidad aguda <i>v.s.</i> ensayos crónicos de toxicidad.....	26
2.3. Importancia de incluir una fase de recuperación en los estudios de toxicidad.	27
2.4. Papel de los biomarcadores en la toxicología. La actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE).....	29
2.4.1. Inhibición por exposición a compuestos organofosforados.....	30
2.4.2. Inhibición por exposición a compuestos carbamatos.	32
3. OBJETIVOS.	35
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
4.1. Animales experimentales: <i>Daphnia magna</i> Straus.....	38
4.2. Cultivo de <i>Nannochloris oculata</i>	39
4.3. Compuestos ensayados.....	41
4.3.1. Insecticida organofosforado: Diazinón.	41
4.3.2. Herbicida carbamato: Molinato.	43
4.4. Toxicidad aguda de los plaguicidas ensayados en <i>D. magna</i> . Cálculo de la CE ₅₀	44
4.5. Ensayo crónico multigeneracional para evaluar la toxicidad del diazinón y el molinato en <i>D. magna</i>	47
4.5.1. Cálculo de la concentración óptima de <i>N. oculata</i> para los ensayos crónicos de toxicidad.	51
4.5.2. Fase de exposición a los plaguicidas.	52
4.5.3. Fase de recuperación a los efectos de los plaguicidas ensayados.....	53

4.6. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido proteico de <i>D. magna</i>	55
4.7. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de <i>D. magna</i>	56
4.8. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de <i>D. magna</i>	57
4.9. Análisis estadístico.....	59
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Estudio de la toxicidad aguda del insecticida diazinón y el herbicida molinato en <i>D. magna</i>	61
5.2. Ensayo crónico multigeneracional de la toxicidad del diazinón y el molinato en <i>D. magna</i>	65
5.2.1. Fase de exposición al insecticida diazinón.....	65
5.2.1.1. Generación parental (F ₀).....	65
5.2.1.1.1. Supervivencia.....	65
5.2.1.1.2. Parámetros reproductivos.....	66
5.2.1.1.3. Longitud corporal.....	69
5.2.1.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	70
5.2.1.1.5. Cálculo de la MATC.....	71
5.2.1.1.6. Cálculo de la CE ₅₀	71
5.2.1.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	74
5.2.1.2.1. Supervivencia.....	74
5.2.1.2.2. Parámetros reproductivos.....	76
5.2.1.2.3. Longitud corporal.....	78
5.2.1.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	79
5.2.1.2.5. Cálculo de la MATC.....	80
5.2.1.2.6. Cálculo de la CE ₅₀	80
5.2.1.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	83
5.2.1.3.1. Supervivencia.....	83
5.2.1.3.2. Parámetros reproductivos.....	83
5.2.1.3.3. Longitud corporal.....	87
5.2.1.3.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	87
5.2.1.3.5. Cálculo de la MATC.....	88

5.2.1.3.6. Cálculo de la CE ₅₀	89
5.2.2. Fase de recuperación de <i>D. magna</i> tras exposición a diazinón.	91
5.2.2.1. Generación filial (F ₁ -1ª camada).....	91
5.2.2.1.1. Supervivencia.....	91
5.2.2.1.2. Parámetros reproductivos.	93
5.2.2.1.3. Longitud corporal.....	95
5.2.2.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	96
5.2.2.2. Generación filial (F ₁ -3ª camada).....	97
5.2.2.2.1. Supervivencia.....	97
5.2.2.2.2. Parámetros reproductivos.	97
5.2.2.2.3. Longitud corporal.....	99
5.2.2.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	100
5.2.3. Fase de exposición al herbicida molinato.....	102
5.2.3.1. Generación parental (F ₀).....	102
5.2.3.1.1. Supervivencia.....	102
5.2.3.1.2. Parámetros reproductivos.	104
5.2.3.1.3. Longitud corporal.....	106
5.2.3.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	107
5.2.3.1.5. Cálculo de la MATC.....	108
5.2.3.1.6. Cálculo de la CE ₅₀	108
5.2.3.2. Generación filial (F ₁ -1ª camada).....	111
5.2.3.2.1. Supervivencia.....	111
5.2.3.2.2. Parámetros reproductivos.	111
5.2.3.2.3. Longitud corporal.....	114
5.2.3.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	115
5.2.3.2.5. Cálculo de la MATC.....	116
5.2.3.2.6. Cálculo de la CE ₅₀	116
5.2.3.3. Generación filial (F ₁ -3ª camada).....	119
5.2.3.3.1. Supervivencia.....	119
5.2.3.3.2. Parámetros reproductivos.	119
5.2.3.3.3. Longitud corporal.....	122
5.2.3.3.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	123
5.2.3.3.5. Cálculo de la MATC.....	124

5.2.3.3.6. Cálculo de la CE ₅₀	124
5.2.4. Fase de recuperación de <i>D. magna</i> tras exposición a molinato.....	127
5.2.4.1. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	127
5.2.4.1.1. Supervivencia.....	127
5.2.4.1.2. Parámetros reproductivos.	127
5.2.4.1.3. Longitud corporal.....	130
5.2.4.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	131
5.2.4.2. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	132
5.2.4.2.1. Supervivencia.....	132
5.2.4.2.2. Parámetros reproductivos.	132
5.2.4.2.3. Longitud corporal.....	135
5.2.4.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).....	136
5.3. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido de proteínas totales de <i>D. magna</i>	137
5.3.1. Efecto del insecticida diazinón en los niveles proteicos de <i>D. magna</i>	137
5.3.1.1. Generación parental (F ₀).....	137
5.3.1.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	143
5.3.1.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	149
5.3.2. Efecto del herbicida molinato en los niveles proteicos de <i>D. magna</i>	155
5.3.2.1. Generación parental (F ₀).....	155
5.3.2.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	161
5.3.2.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	166
5.4. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de <i>D. magna</i>	172
5.4.1. Efecto del insecticida diazinón.	172
5.4.1.1. Generación parental (F ₀).....	172
5.4.2. Efecto del herbicida molinato.....	175
5.4.2.1. Generación parental (F ₀).....	175
5.5. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE de <i>D. magna</i>	180
5.5.1. Efecto del insecticida diazinón en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por individuo).....	180
5.5.1.1. Generación parental (F ₀).....	180
5.5.1.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	187
5.5.1.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	194

5.5.2. Efecto del herbicida molinato en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por individuo).....	200
5.5.2.1. Generación parental (F ₀).....	200
5.5.2.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	207
5.5.2.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	214
5.5.3. Efecto del insecticida diazinón en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por µg de proteína).....	222
5.5.3.1. Generación parental (F ₀).....	222
5.5.3.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	226
5.5.3.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	230
5.5.4. Efecto del herbicida molinato en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por µg de proteína).....	234
5.5.4.1. Generación parental (F ₀).....	234
5.5.4.2. Generación filial (F ₁ -1 ^a camada).....	238
5.5.4.3. Generación filial (F ₁ -3 ^a camada).....	242
6. DISCUSIÓN.....	245
6.1. Toxicidad aguda de los plaguicidas diazinón y molinato en <i>D. magna</i>	246
6.2. Ensayo crónico multigeneracional de la toxicidad del diazinón y el molinato en <i>D. magna</i>	247
6.3. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido proteico de <i>D. magna</i>	275
6.4. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de los parentales de <i>D. magna</i>	281
6.5. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por individuo)	285
6.6. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE de <i>D. magna</i> (expresado por µg de proteína).	294
7. CONCLUSIONES.	298
8. BIBLIOGRAFÍA.....	301
9. ANEXO ESTADÍSTICA.	327
• Ensayos crónicos	328
• Contenido proteico	354
• Peso de los parentales	370

- Actividad AChE expresada por individuo 375
- Actividad AChE expresada por μg de proteína 387

1. ANTECEDENTES

1.1. ¿Por qué la Ecotoxicología?

La ecotoxicología concierne a la protección de los sistemas ecológicos frente a los efectos adversos de los compuestos químicos de síntesis. Para ello, es necesario anticipar a qué zonas del medio natural acceden estas sustancias y cuáles son sus efectos ecológicos allá donde accedan (Calow, 1993).

En principio, existen dos necesidades prioritarias por las que se deben evaluar los efectos de los compuestos químicos en los ecosistemas. En primer lugar, es de vital importancia poder anticipar de qué manera los compuestos con capacidad tóxica pueden desarrollar un impacto en un ecosistema dado. Este tipo de estudios son llevados a cabo en el laboratorio. En segundo lugar, también es importante evaluar qué cambios tienen lugar en los ecosistemas bajo la influencia de sustancias tóxicas liberadas al medio natural.

La ecotoxicología trata, pues, de explicar y predecir los cambios que acontecen a nivel poblacional en relación a los efectos tóxicos sobre la supervivencia, crecimiento, reproducción, fisiología, comportamiento ... de los individuos que componen la población expuesta. Sin embargo, en la práctica, ciertos factores de los que se relacionan con la toxicidad “ambiental” de los compuestos químicos a nivel poblacional reciben más atención que otros. Tal es el caso de los estudios de toxicidad aguda, en los que se emplea la mortalidad como criterio para evaluar la toxicidad de estos compuestos, en detrimento de los estudios de los efectos subletales en los individuos expuestos.

Por tanto, se requiere un mayor desarrollo de estudios orientados a sentar las bases para establecer los niveles de tolerancia o aceptación de impactos ecológicos desencadenados por la presencia de compuestos con capacidad tóxica en el ambiente natural. Este tipo de estudios supone la exposición crónica de un organismo o grupo de organismos a concentraciones subletales de un determinado compuesto, cuya toxicidad se desea analizar.

1.2. Importancia de los análisis multigeneracionales de toxicidad: situación actual de este tipo de ensayos en ecotoxicología.

Un *xenobiótico* es un compuesto químico de procedencia externa al organismo y que, en general, no se considera que forma parte de un sistema biológico específico, ni es generado en la Naturaleza; es decir, se contempla que este término se aplica a compuestos químicos manufacturados (Rand, 1995).

Si un xenobiótico es incorporado a nivel de un determinado eslabón de la cadena trófica, por ejemplo como ocurre en este trabajo, a nivel del zooplancton de un ecosistema de agua dulce, todos los eslabones que dependen tróficamente de él (peces y otros depredadores zooplanctotrofos) irán incorporándolo a su vez. Siendo una sustancia más o menos persistente, se irá acumulando en concentraciones cada vez mayores según ascendemos en la pirámide trófica, este es el concepto de *biomagnificación*. Según Rand (1995), el proceso de biomagnificación implica una transferencia eficaz del compuesto químico desde el alimento al consumidor de manera que la concentración de este residuo aumenta sistemáticamente de un nivel trófico al inmediatamente superior.

Un aspecto realmente interesante de estudiar, dentro de los análisis de toxicidad crónica, es la posibilidad que puede existir de que, dada una población de organismos sometida a estrés tóxico, se dé una transferencia del tóxico acumulado por una generación a las sucesivas generaciones de descendientes. Hacer un intento por conocer más a fondo este aspecto de la toxicidad es de vital importancia pues, si efectivamente esta transferencia existe, el daño potencial de los compuestos con capacidad tóxica puede ser mucho mayor de lo que en un principio cabría esperar. Este tipo de ensayos multigeneracionales de toxicidad permitiría detectar esa posible biomagnificación similar a la que se da desde un nivel trófico a otro de una cadena alimentaria, pero de unas generaciones de organismos a las siguientes.

Si se produce una biomagnificación similar a la que se da entre un nivel trófico y otro de una cadena alimentaria, pero de unas generaciones de organismos a las siguientes, las poblaciones expuestas podrían sufrir un fuerte impacto, tanto a nivel de efectos a corto plazo (mortalidad) como a largo (posible transmisión de tóxico que

incidiría en las capacidades fisiológicas de crecimiento, reproducción ... de las generaciones sucesivas). Es esto precisamente lo que se trata de detectar, al tiempo que se evalúa su alcance, en los análisis de toxicidad crónica multigeneracionales.

Los ensayos de toxicidad crónica aportan una estimación de las concentraciones de tóxico que causan efectos subletales en un organismo. Sin embargo, estos ensayos iniciados con neonatos de parentales no expuestos al tóxico cuya toxicidad se quiere evaluar, no tienen en cuenta la exposición de los individuos durante la oogénesis y la embriogénesis así como la transferencia de tóxico de los parentales a los descendientes. De esta manera, los tests de toxicidad crónica convencionales, no reflejan fehacientemente el efecto a largo plazo de los tóxicos. Además, incluyendo más de una generación en los test de toxicidad crónica, se incrementa la efectividad del ensayo en esta determinación (Van Leeuwen *et al.*, 1985a; Baillieul *et al.*, 1993).

En el medio dulceacuícola, sólo se tiene referencia de algunos estudios de este tipo efectuados en dáfnidos. No obstante, a pesar de su supuesta importancia, son sorprendentemente escasas las referencias bibliográficas al respecto (Münzinger y Monicelli, 1992; Bervoets *et al.*, 1996; Caffrey y Keating, 1997; Sánchez *et al.*, 1999, 2000; Villarroel *et al.*, 2000 a,b; Muysen y Janssen, 2001; Muysen *et al.*, 2002; Sánchez *et al.* 2003).

Todavía son pocos los datos que se conocen en relación con los análisis crónicos de multigeneraciones en ecotoxicología acuática pero es seguro que los estudios que se han efectuado, y se efectuarán en este sentido, aportarán valiosa información para evaluar los daños que, a nivel poblacional, ocasionan los contaminantes en el medio acuático.

1.3. Origen de los ensayos de toxicidad empleando biomarcadores.

Un *biomarcador* es cualquier respuesta a nivel bioquímico o celular que pueda ser relacionada cuantitativa o cualitativamente con la exposición a un compuesto químico (o grupo de compuestos químicos), y que puede ser empleada como bioensayo de la

existencia en el medio de compuestos con capacidad tóxica, así como de sus efectos significativos sobre los organismos (Widdows, 1993).

A principios de los años 80, la toxicología acuática maduró considerablemente, con avances tan significativos como la identificación de biomarcadores adecuados para hacer un seguimiento a escala molecular de la toxicidad de ciertos compuestos, considerando como biomarcador cualquier cambio fisiológico, bioquímico o histológico como indicador de la exposición de un organismo a xenobióticos (Rand, 1995). La determinación de estos biomarcadores ha sido de gran utilidad para hacer seguimientos de la calidad medioambiental (Stegeman *et al.*, 1992).

La respuesta de los organismos, registrada a través de la respuesta bioquímica de los biomarcadores moleculares, permite detectar *a priori* la degradación potencial de los ecosistemas ocasionada por la exposición a elementos contaminantes. Así pues, aunque los biomarcadores no revelan directamente información acerca de los efectos de los compuestos químicos sobre los niveles superiores de organización biológica, pueden ser considerados como elementos tempranos de alarma en situaciones de impacto biológico. Además, diversos estudios han puesto de manifiesto la supuesta relación existente entre el estado fisiológico de los organismos y los parámetros a nivel poblacional; como consecuencia de ello, los biomarcadores pueden jugar un papel sumamente importante en la evaluación de situaciones de riesgo ecológico. De esta manera, basándose en la magnitud y el patrón de las respuestas de los biomarcadores, las especies configuran su potencial medioambiental sirviendo algunas de ellas como organismos “centinela”, ya que son capaces de anunciar la presencia de contaminantes en el medio así como el alcance de la exposición a los mismos (McCarthy y Shugart, 1990).

El uso de las respuestas bioquímicas y fisiológicas para evaluar biológicamente el impacto de los compuestos químicos en el medio natural ha ido en aumento en los últimos años (Ribeiro *et al.*, 1999). El desarrollo reciente de biomarcadores basados en el estudio de las respuestas fisiológicas de los organismos a los contaminantes a que están expuestos, ha proporcionado las herramientas bioquímicas necesarias para desarrollar programas de evaluación sobre los efectos de dichos compuestos (Bocquené *et al.*, 1997).

Un aspecto asociado a la contaminación ambiental es la neurotoxicidad contemplada como el efecto más importante de los plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre los organismos expuestos (Day, 1991). La inhibición de la actividad enzimática colinesterasa, se ha constituido como indicadora de la exposición a este tipo de compuestos, no solamente en humanos sino en diversas especies silvestres, con el fin de hacer un seguimiento de los efectos de los contaminantes en los organismos vivos (Bocquené *et al.*, 1997).

Desde sus comienzos, coincidiendo con la importancia del género *Daphnia* en los estudios ecotoxicológicos, la toxicología acuática se ha servido de este crustáceo cladóceros para efectuar ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro*, conducentes a esclarecer el efecto de diversos compuestos con capacidad tóxica en distintos parámetros bioquímicos. La actividad de la enzima acetilcolinesterasa ha sido uno de estos parámetros. Paralelamente al desarrollo creciente de estudios toxicológicos orientados en este sentido, se ha venido incrementando la utilización de *Daphnia magna* como organismo objeto de estos ensayos (Day y Scott, 1990; Abdullah *et al.*, 1994; Gälli *et al.*, 1994; Herbert *et al.*, 1995; Guilhermino *et al.*, 1996 a,b; Sturm y Hansen, 1999; Diamantino *et al.*, 2000; Guilhermino *et al.*, 2000).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Organismos objeto de estudio.

2.1.1. Taxonomía y distribución geográfica.

Daphnia magna Straus, es una especie perteneciente a la familia Daphnidae, incluida en la clase Crustacea, subclase Branchiopoda, orden Diplostraca, suborden Cladocera.

Propio de ambientes dulceacuícolas, el género *Daphnia* es especialmente abundante en charcas temporales de la región templada del globo (lagos de Norteamérica y, en Eurasia, desde Inglaterra y el Norte de África, hasta China y Manchuria), quedando excluido, generalmente, de los lagos tropicales por la intensa predación que ejerce la ictiofauna sobre él (Brooks, 1959).

2.1.2. Morfología y fisiología.

Los dáfnidos (figura 1) son crustáceos de pequeño tamaño, variando su longitud corporal entre 0.2 y 18 mm. El tamaño de *Daphnia* está estrechamente relacionado con la disponibilidad de alimento en el medio; en ambientes pobres en nutrientes, donde son escasos los cambios referentes a supervivencia y crecimiento, las hembras tienden a producir descendientes relativamente grandes que corresponden a camadas con un pequeño número de individuos, al contrario de lo que sucede en ambientes enriquecidos (Mc Kee y Ebert, 1996).

Poseen el cuerpo segmentado en tres regiones (céfalon, péreion y pleon), siendo esta segmentación poco evidente. El tagma cefálico está integrado por seis metámeros que tienden a fusionarse formando un caparazón bivalvo comprimido lateralmente que cubre el resto del cuerpo. Posteriormente se prolonga en una espina caudal. El caparazón no cubre el céfalon, siendo sustituido a este nivel por un escudo cefálico. Son evidentes dos pares de apéndices anteniformes: las anténulas, más reducidas en los adultos y con función sensorial en los juveniles, y las antenas con función trófica y locomotora en los juveniles y únicamente locomotora en los adultos, que proporcionan un desplazamiento por natación “a saltos espasmódicos”, de ahí que los dáfnidos sean conocidos bajo el nombre de “pulgas de agua”. La aclimatación a distinta temperatura

origina una variación en la frecuencia del batido antenal hasta que el animal se adapta a las nuevas condiciones térmicas (Lochhead, 1961).

En los adultos, la función trófica corresponde a los pereiópodos que generan una corriente de agua en sentido caudo-cefálico, la filtran y retiran los posos del filtrado que serán compactados con una secreción mucosa y posteriormente ingeridos. La furca situada al final del telson colabora en la natación, asegurando al mismo tiempo la evacuación de los productos de desecho fuera del caparazón.

La visión de los individuos de este género, reside en un único ojo compuesto de color oscuro localizado en la región antero-medial del céfalon, siendo el resultado de la fusión de dos ojos de color rosado al principio del segundo estadio del desarrollo embrionario (Sobral *et al.*, 2001). Algunas especies, poseen un ojo simple (ocelo), localizado entre la región bucal y el ojo compuesto. *Daphnia* presenta fototactismo positivo, detectando los cambios en la luminosidad del entorno a través del ojo compuesto. El ojo compuesto, en la mayoría de los cladóceros, funciona orientando al animal mientras nada (Ruppert y Barnes, 1996).

Entre el dorso del cuerpo y el caparazón, las hembras presentan la denominada cámara dorsal de incubación a la que se abren los orificios genitales. Cuando la reproducción es sexual, el macho introduce su postabdómen entre las valvas del caparazón de la hembra, y deposita el esperma en el interior de la cámara incubadora.

Los órganos excretores son glándulas antenales (Ruppert y Barnes, 1996). Se conoce poco acerca de los mecanismos de regulación del equilibrio hídrico, pero se sabe que *Daphnia* depende más de la absorción activa para mantener su equilibrio osmótico, que de su dieta. *Daphnia* pone en práctica tres estrategias para regular la concentración iónica interna. En primer lugar, la tasa de flujo osmótico es minimizada mediante una hemolinfa diluida (Waterman, 1961). En segundo lugar, a través de la fina cutícula de los sacos branquiales, a nivel de la base de los apéndices torácicos, se procede a la absorción activa de cloruro (Peters, 1987), incorporando así las sales perdidas al organismo. Finalmente, los productos nitrogenados son excretados como amoníaco a

través de las glándulas antenales y, en algunos casos, a través de la superficie corporal general (Peters, 1987; Thorp y Corvich, 1991).

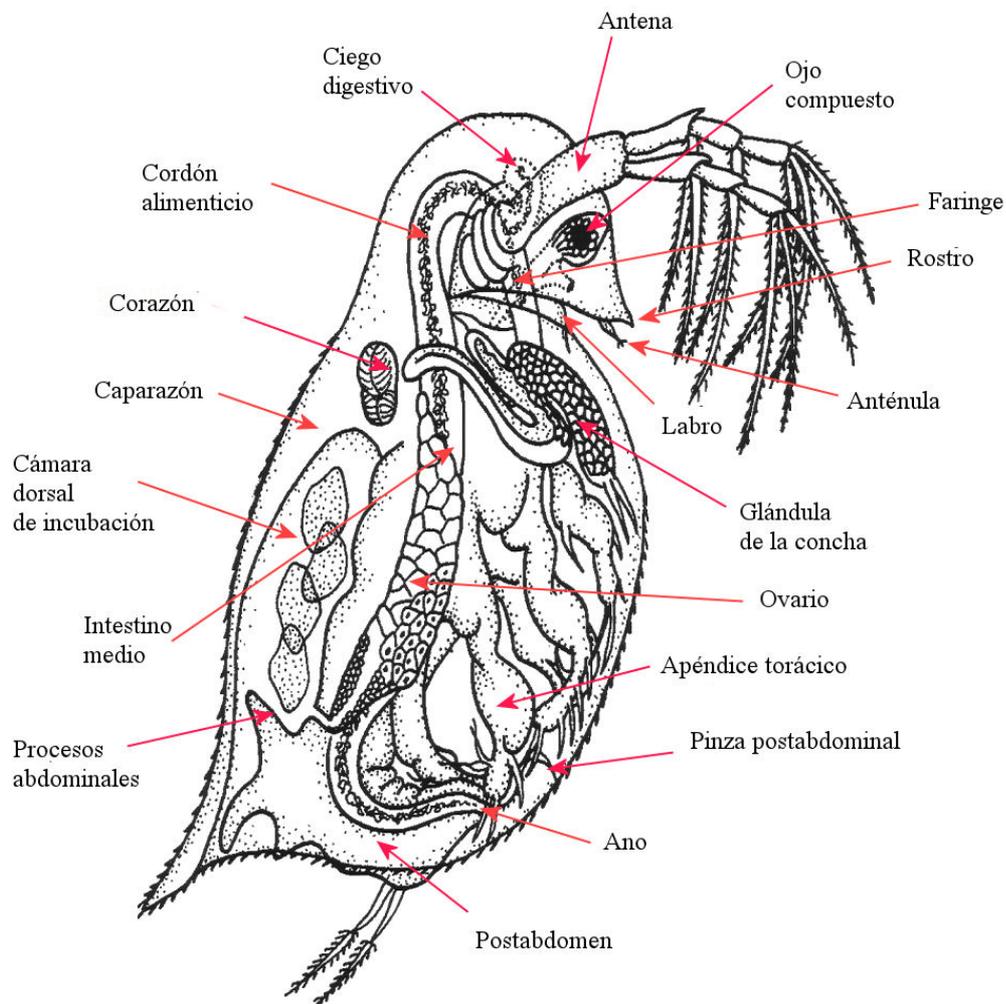


FIGURA 1. Morfología y anatomía interna del género *Daphnia*.

Los dáfnidos son de color transparente en el medio natural, pero en ambientes con escasez de oxígeno, adoptan un ligero tono rosado por la síntesis de hemoglobina para aumentar la eficacia en la captación del escaso oxígeno ambiental. Si el hábitat que ocupan se reoxigena, eliminan hierro. Parece ser que el ciego intestinal, los cuerpos grasos y las glándulas maxilares están implicados en la descomposición de la hemoglobina y la excreción de sus productos, aunque no se conoce bien cómo se

consigue este resultado. El hecho de que sinteticen hemoglobina como respuesta a situaciones de escasez de oxígeno es señal de que la utilizan para la respiración (Gardiner, 1978). Se ha encontrado hemoglobina en la hemolinfa, músculos y los huevos de muchos branquiópodos (Ruppert y Barnes, 1996).

Es probable que todo el apéndice branquial, e incluso la superficie integumentaria, sean importantes en el intercambio gaseoso (Brusca y Brusca, 1990; Ruppert y Barnes, 1996).

2.1.3. Biología y ciclo reproductor.

En el ciclo reproductivo de los dáfnidos se distinguen dos tipos de reproducción, con alternancia de generaciones (figura 2).

- Partenogénesis.- Cuando los recursos alimenticios son abundantes en el medio y la densidad poblacional es baja, las hembras producen huevos diploides que se desarrollan en la cámara dorsal de incubación. Una hembra adulta de *D. magna* alberga embriones en tres estadios diferentes de su desarrollo, a saber, producción de oocitos, vitelogénesis en algunos de estos oocitos (ambos estadios tienen lugar en el interior de los ovarios) y desarrollo de huevos (estadio que ocurre dentro de la cámara dorsal de incubación) (Zaffagnini, 1987). Se considera que el desarrollo embrionario ha concluido cuando tiene lugar la separación de la espina caudal y la liberación de la fina cutícula que envuelve el aparato digestivo, momento en que los juveniles son capaces de nadar desplazándose por la columna de agua y de alimentarse (Sobral *et al.*, 2001). Los neonatos abandonan la cámara dorsal de incubación con el desprendimiento del exoesqueleto del parental durante la muda, liberándose individuos (todas hembras), de morfología similar a la del adulto.

Los neonatos continúan su desarrollo con dos o tres estadios de intermuda, tras los cuales se suceden aproximadamente cinco estadios pre-reproductivos más antes de que se libere la primera camada una vez alcanzada la madurez sexual (generalmente entre el sexto y noveno día de vida).

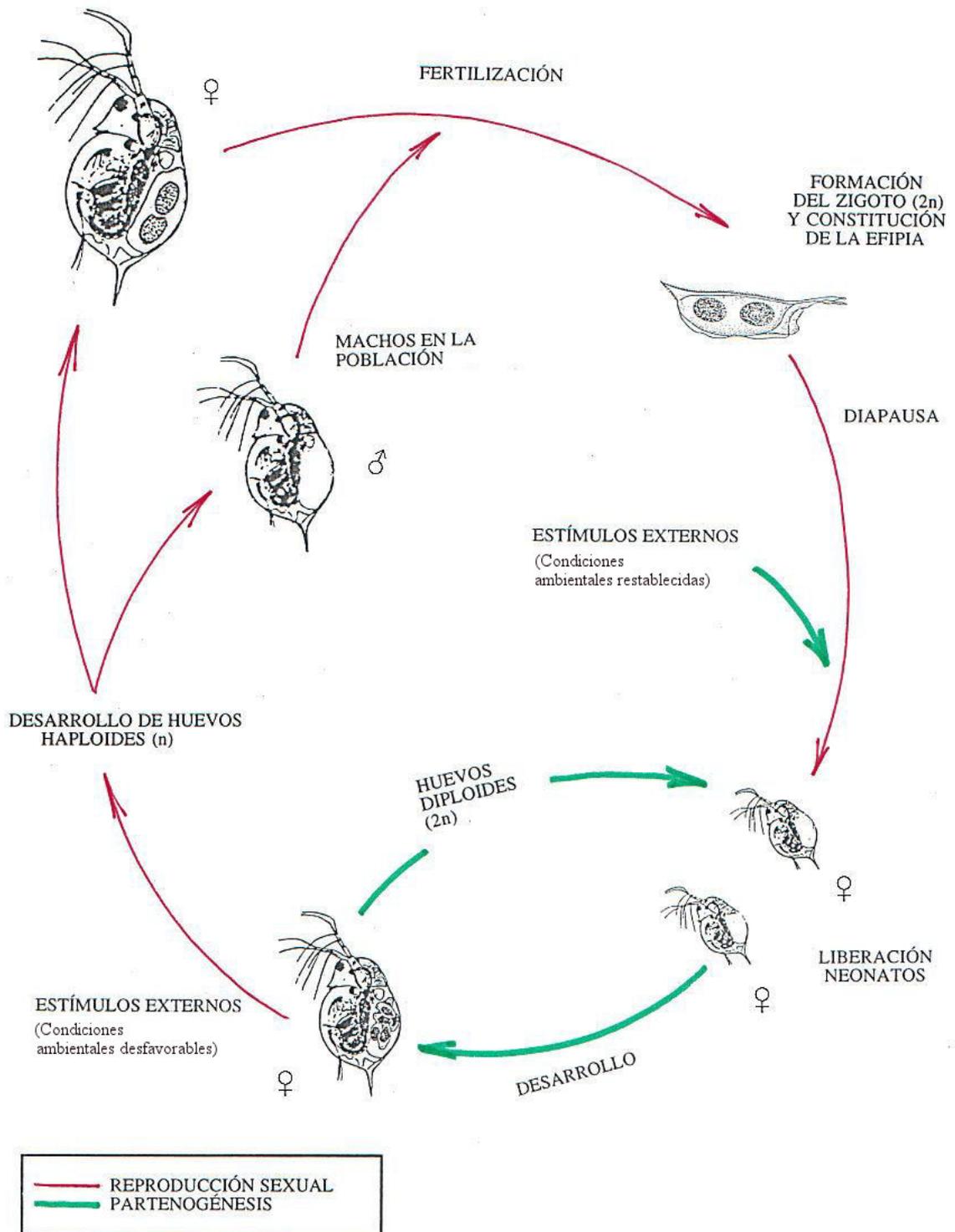


FIGURA 2. Ciclo reproductor del género *Daphnia* con alternancia de generaciones.

Si se alimentan correctamente, los dáfidos pueden liberar hasta 65 neonatos o más en cada camada aunque, en general, el tamaño medio de la camada es de 12 neonatos, pudiendo llegar a liberar hasta un número de camadas entre 17 y 20 a lo largo de toda su vida. El tamaño de la camada varía de acuerdo con el nivel de recursos disponibles en el medio y con la edad de la hembra. Generalmente el tamaño de la camada aumenta hasta alcanzar un máximo cerca de la quinta, después de la cual decrece, probablemente debido a la edad de la hembra (Hallam *et al.*, 1990). En condiciones de laboratorio, cada hembra puede generar entre 200 y 450 descendientes en toda su vida (ASTM, 1984).

- Reproducción sexual.- En el medio natural, durante la mayor parte del año, las poblaciones están integradas casi exclusivamente por hembras, siendo abundantes los machos únicamente en primavera u otoño. La aparición de machos en una población se asocia a la existencia de determinadas condiciones ambientales adversas tales como elevada densidad poblacional con el consiguiente acúmulo de productos de excreción que terminan resultando tóxicos para la población, deficiencia de recursos alimenticios en el medio, bajo contenido en oxígeno o temperaturas extremas. Estas condiciones inducen la aparición de huevos de resistencia, fruto de la reproducción sexual, envueltos por un ensanchamiento del caparazón denominado *efipia* y que requieren una menor inversión metabólica en la reproducción por parte de los parentales. Los huevos fecundados son grandes y sólo se producen dos en cada puesta, uno de cada ovario. Los huevos, tras un periodo de diapausa, eclosionan rápidamente cuando las condiciones ambientales favorables se restablecen. Los huevos de resistencia eclosionan liberando hembras que restituyen la reproducción partenogenética en la población (Thorp y Corvich, 1991).

Habiendo visto que los dáfnidos son muy sensibles a las condiciones ambientales y que su ciclo reproductivo se ve afectado por su variación, es conveniente, pues, mantener unas condiciones de cultivo en el laboratorio idóneas para que la población de *Daphnia magna* encuentre su crecimiento óptimo, evitando, en la medida de lo posible, que parámetros como la temperatura, el alimento, la concentración de oxígeno, o la densidad poblacional, dificulten el correcto desarrollo del cultivo, lo cual podría afectar a la obtención de neonatos en buenas condiciones para desarrollar los estudios de toxicidad.

2.1.4. Importancia de *Daphnia magna* en ecotoxicología.

Los invertebrados acuáticos constituyen un componente intermediario muy importante en las cadenas tróficas acuáticas, tanto del bentos como del pélagos. Su importancia en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos ha sido vital para que fueran escogidos como organismos bioindicadores en los test de toxicidad. Sin embargo, pese a su importante papel ecológico, los estudios de toxicidad aguda con invertebrados acuáticos son más escasos que con peces.

En las tres últimas décadas, únicamente un taxón de invertebrados ha emergido como grupo clave para la realización de ensayos ecotoxicológicos: los crustáceos cladóceros y más concretamente los dáfnidos (Calow, 1994). El uso de cladóceros para test de toxicidad está ampliamente extendido porque se trata de organismos cuya amplia distribución geográfica permite disponer de ellos con facilidad, se adaptan bien a las condiciones de laboratorio, requieren poco espacio para su cultivo, su ciclo de vida es corto y, frecuentemente, son uno de los grupos de animales más sensibles a los compuestos químicos (Mokry y Hoagland, 1990).

Dentro de los cladóceros, el género *Daphnia* se encuentra entre los consumidores dominantes de los productores primarios de las aguas dulces (Hebert, 1978). Se distribuye tanto en lagos oligotróficos como eutróficos y constituye un importante reservorio alimenticio tanto para otros invertebrados como para los predadores vertebrados como los peces.

Buikema *et al.* (1980), efectuaron una revisión bibliográfica sobre la biología de *Daphnia* y la toxicología de distintos compuestos para este crustáceo cladócer, describiendo el test de toxicidad para esta especie. *Daphnia magna* presenta una serie de ventajas que la hacen especialmente favorable como organismo bioindicador en dichos ensayos. Su sensibilidad a los tóxicos, su reproducción partenogenética y sus ciclos vital y reproductivo relativamente cortos, facilitan el desarrollo de experiencias de laboratorio presentándose, además, raramente en combinación con otras especies. *Daphnia sp.* ha sido históricamente utilizada en los tests de toxicidad aguda de sustancias químicas en el medio acuático (I.S.O., 1982; U.S. E.P.A., 1983; Enserink *et al.*, 1990; Fairchild *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1995; Van der Geest *et al.*, 1997; Weyers *et al.*, 2000; Utz y Bohrer, 2001), así como en estudios de carácter crónico (Fairchild *et al.*, 1992; Enserink *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1995; Tong *et al.*, 1996; Suedel *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1998, 1999, y 2003; Villarroel *et al.*, 1999).

El hecho de que *Daphnia magna* muestre una mayor sensibilidad a los plaguicidas que a otros contaminantes, permite que los tests de toxicidad crónicos que se llevan a cabo con esta especie sirvan para estimar los efectos a largo plazo sobre organismos acuáticos distintos de a los que va dirigida inicialmente la acción del plaguicida ensayado (Buhl *et al.*, 1993).

Al ser su ciclo vital relativamente corto, nos permite evaluar el efecto de un contaminante a lo largo de toda su vida en un breve espacio de tiempo y así la información es obtenida rápidamente. Además, esto permite disponer de manera continua de individuos neonatos (≤ 24 hr) para efectuar los test de toxicidad.

Por otra parte, al reproducirse partenogenéticamente, salvo en condiciones de estrés ambiental, permite disponer de individuos homogéneos genéticamente.

Los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* constituyen el único tipo de bioensayos con invertebrados acuáticos reconocidos por organizaciones internacionales como la U.S. *Environmental Protection Agency* (E.P.A.), la Comunidad Económica Europea (C.E.E.) y la *Organisation for Economic Cooperation and Development* (O.E.C.D.), siendo requeridos regularmente en todos los países. Los dáfidos son los

invertebrados principales en cualquier batería de test de toxicidad en evaluaciones iniciales de impacto ambiental de efluentes (Calow, 1994).

2.2. Ensayos de toxicidad aguda v.s. ensayos crónicos de toxicidad.

Los test de toxicidad aguda tienen como objetivo evaluar el potencial tóxico a corto plazo de un compuesto o sustancia sobre un determinado organismo, generalmente sobre su supervivencia. Sin embargo, en los últimos años, los investigadores en toxicología han apuntado que los test de toxicidad crónicos orientados a examinar los efectos en el comportamiento, crecimiento, reproducción y dinámica poblacional de concentraciones subletales de contaminantes sobre poblaciones de organismos, son mucho más útiles que los test de toxicidad aguda para establecer, desde un punto de vista ecológico, las concentraciones de seguridad del compuesto químico ensayado para la población expuesta a sus efectos.

Muchas veces, en el medio natural encontramos concentraciones de tóxico tan pequeñas que pueden resultar prácticamente inocuas a corto plazo, pero ser extremadamente peligrosas para la fauna y flora a largo plazo. De ahí la importancia de evaluar el impacto de concentraciones subletales de tóxico en poblaciones de organismos expuestas durante un periodo de tiempo suficientemente largo como para que se puedan contemplar los efectos en la capacidad reproductiva, tiempo de madurez reproductiva y esperanza de vida de esos organismos expuestos, parámetros de los que depende, en condiciones normales, la “salud” de una población natural (Walthall y Stark, 1997).

Uno de los grandes retos de la toxicología es cómo evaluar el efecto total de un xenobiótico en una población de organismos expuestos. Tener en cuenta el efecto de la toxicidad de un compuesto sobre una combinación de distintos parámetros es importante desde el momento en que una determinada concentración de tóxico puede afectar a algunos de ellos, pero a otros no. En este sentido, se consideró interesante encontrar parámetros que supusieran un compendio de otros, especialmente parámetros poblacionales que integraran la respuesta de diversos parámetros individuales,

pudiendo, de esta manera, prever la eficacia poblacional teniendo en cuenta la respuesta de los individuos que integran la población. Esta aproximación resulta verdaderamente interesante a nivel ecológico, pudiendo predecir el efecto potencial de la aplicación o vertido de un compuesto tóxico en el medio natural sobre una población de organismos que habiten en la zona afectada. Tal es el caso del parámetro poblacional *tasa intrínseca de incremento natural* (r), que supone un compendio de la *tasa de reproducción* (m_x), y la *supervivencia* (l_x), como parámetros individuales, de una cohorte de organismos expuestos. Este parámetro considera la capacidad reproductiva de una población, siendo este dato ecológicamente más relevante que el número de descendientes producidos en un intervalo de tiempo determinado (Van Leeuwen *et al.*, 1985a).

Forbes y Calow (1999) llegaron a la conclusión de que r integra potencialmente las interacciones complejas existentes entre los distintos aspectos de la historia vital de los organismos, teniendo una mayor relevancia a la hora de determinar el impacto ecológico de los compuestos con capacidad tóxica que los parámetros individuales (tales como supervivencia o capacidad reproductiva), considerados por separado.

A pesar de la relevancia ecológica del seguimiento de r en los estudios ecotoxicológicos, ha sido menos utilizado que la mortalidad como parámetro indicador de la toxicidad. Esto es debido, en parte, al tiempo que requieren los estudios crónicos para su realización, así como al coste asociado a la generación de esquemas de supervivencia y fecundidad, necesarios para valorar r (Walthall y Stark, 1997).

2.3. Importancia de incluir una fase de recuperación en los estudios de toxicidad.

La toxicidad de los plaguicidas para los organismos acuáticos depende de un gran número de factores incluidos la especie expuesta, el tamaño y la edad de los individuos utilizados para los ensayos, la formulación del compuesto testado, las características físico-químicas del agua y las propiedades intrínsecas del plaguicida (Nimmo, 1985; Mayer y Ellersieck, 1988).

En el medio natural, las condiciones ambientales están continuamente cambiando lo que hace necesaria una cierta capacidad de recuperación de las poblaciones para poder sobreponerse a periodos de estrés, como es el caso de periodos de exposición a agentes

tóxicos. De esta manera, las especies capaces de recuperar sus condiciones fisiológicas en un periodo de tiempo más corto, sobrevivirán y se reproducirán antes cuando se restablezcan las condiciones del medio en el que viven, pudiendo hacer frente a nuevos episodios adversos. Este hecho se considera de gran importancia, teniendo en cuenta que la contaminación del medio natural tiene lugar de forma periódica y no continua (Poirier y Surgeoner, 1988; Baughman *et al.*, 1989; Parsons y Surgeoner, 1991b; Buhl *et al.*, 1993). El hecho de que los organismos se vean expuestos a un compuesto en concentración más elevada, por un suceso esporádico o por la acción antrópica sobre el medio natural, provoca una respuesta a nivel bioquímico, fisiológico y comportamental por parte de los mismos, lo cual repercutirá a nivel poblacional y finalmente en la estabilidad del ecosistema del cual forman parte estas poblaciones.

La recuperación de una población después de estar expuesta a una situación de estrés tóxico en regiones con masas de agua de carácter temporal, como es el caso de algunas zonas lacustres de la región templada del globo en las que habitan los cladóceros objeto de este estudio, puede estar asociada a la aparición de adaptaciones que supongan una alteración del crecimiento y la capacidad reproductiva de los organismos (Lahr, 1997). Por todo lo expuesto, se considera interesante estudiar la dinámica poblacional de los descendientes en un medio exento de tóxico, afectados por la pre-exposición de sus parentales a una situación de estrés tóxico, contrastando los resultados con los derivados del seguimiento de la supervivencia, crecimiento y fecundidad de los mismos durante el periodo de exposición al contaminante.

Las experiencias de recuperación deben incluirse en cualquier análisis de toxicidad puesto que, fundamentalmente a nivel ecológico, la vulnerabilidad de las poblaciones y los ecosistemas frente a la exposición a un contaminante está determinada por la capacidad de sus individuos de recuperarse de la situación de estrés tóxico. Esta capacidad de recuperación tiene en consideración tanto los mecanismos que poseen los organismos para eliminar el contaminante incorporado al medio externo, como la propia capacidad de metabolizarlo y transformarlo en sustancias que no resulten tan tóxicas como el compuesto original, pese a no eliminarlo completamente.

2.4. Papel de los biomarcadores en la toxicología: La actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE).

Las variables bioquímicas han sido propuestas como indicadores de la exposición a compuestos químicos y a efectos subletales de los mismos por varias razones. Asumiendo que la toxicidad está controlada, en última instancia, por procesos bioquímicos, la respuesta a nivel bioquímico precede, teóricamente, a la respuesta a un nivel más alto de organización, como es el caso del nivel de *organismo* (Adams *et al.*, 1989). Además, la respuesta de variables bioquímicas específicas podría ayudar a entender los mecanismo de toxicidad (Di Giulio *et al.*, 1995).

Dada la importancia ecológica de los invertebrados limnéticos, su elevada susceptibilidad a diversos contaminantes y su empleo habitual como organismos objeto de estudio en los test de toxicidad, el conocimiento actual de los efectos a nivel bioquímico de los tóxicos en estos grupos es desproporcionadamente pequeño. Resulta pues obvia la necesidad de ahondar en los aspectos bioquímicos de la toxicología de estos organismos (Sturm y Hansen, 1999).

Los enzimas juegan un papel crucial en el funcionamiento vital de los organismos. En los crustáceos, a diferencia de los vertebrados, existen motoneuronas excitadoras e inhibitoras (neuronas periféricas) que utilizan generalmente otros neurotransmisores, apareciendo la acetilcolina (ACh) como neurotransmisor en las fibras sensoriales (Barker *et al.*, 1972; Hildebrand *et al.*, 1974). Las estererasas se han empleado en los últimos 20 años para determinar el potencial tóxico de los plaguicidas organofosforados y carbamatos utilizados en las tareas fitosanitarias, sobre los organismos vivos (Thompson, 1999). La acetilcolinesterasa es el enzima que hidroliza la ACh a los productos inactivos (que no estimulan a la membrana postsináptica) colina y ácido acético (tal y como se indica en la figura 3) en las sinapsis colinérgicas, tanto en vertebrados como en invertebrados, y en las uniones neuromusculares. Este enzima está fuertemente inhibido por los plaguicidas organofosforados y carbamatos (Fukuto,

1990), incluso a concentraciones muy bajas y, por esta razón, ha sido ampliamente utilizado como biomarcador para estos compuestos (Guilhermino *et al.*, 2000).

La inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) se ha utilizado como herramienta de diagnóstico de la contaminación por plaguicidas organofosforados en peces; pero los peces son capaces de destoxificar estas sustancias más fácilmente que los invertebrados. Por esta razón, una inhibición significativa de la actividad AChE en peces, generalmente es detectada a concentraciones del tóxico relativamente elevadas, lo que hace que los invertebrados sean más convenientes que los peces para hacer un seguimiento de situaciones de estrés tóxico por estas sustancias, considerando la actividad enzimática AChE como marcador bioquímico de la toxicidad de estos compuestos (Ibrahim *et al.*, 1998).

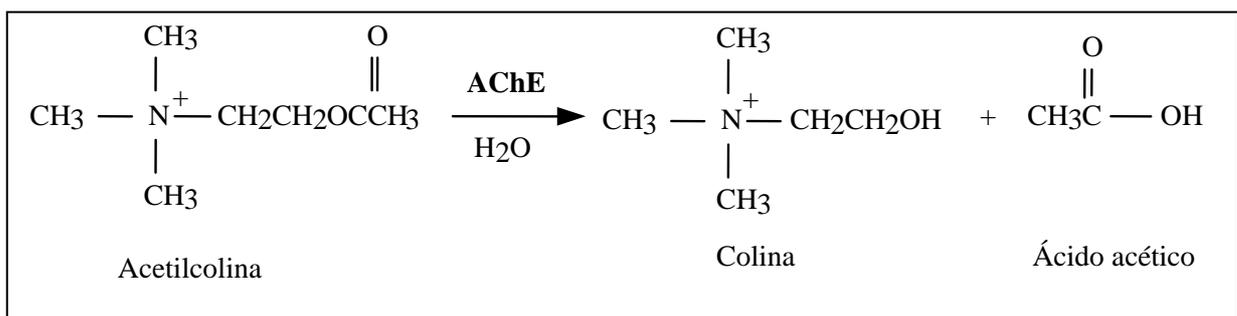


FIGURA 3. Reacción de hidrólisis de la acetilcolina por parte de la acetilcolinesterasa.

2.4.1. Inhibición por exposición a compuestos organofosforados.

La inhibición de las colinesterasas ha sido muy utilizada como biomarcador específico para plaguicidas organofosforados y carbamatos, siendo considerado un “biomarcador estándar de oro” (Peakal, 1994). Sin embargo, estudios publicados recientemente han indicado que algunos metales podrían también inhibir estas enzimas, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Labrot *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998). Si bien es cierto que algunos metales se ven implicados en rutas metabólicas (Sorensen, 1991) y a otros se les asocia directamente un cierto

comportamiento neurotóxico (Bocquené *et al.*, 1995), los compuestos organofosforados y carbamatos son agentes anticolinesterásicos directos (Forget *et al.*, 1999).

El efecto tóxico de los plaguicidas organofosforados por inhibición de las colinesterasas como consecuencia de la interrupción en la transmisión del impulso nervioso, está bien definido (Gallo y Lawryk, 1991). Los compuestos organofosforados tienen una estructura similar a la del neurotransmisor endógeno acetilcolina (figura 4). Debido a esta similitud, el grupo fosfato es atraído al sitio de esterificación de la AChE, fosforilando selectivamente la serina del centro activo del enzima (Sanz y Repetto, 1995; Thompson, 1999). De esta manera, el enzima es incapaz de hidrolizar ésteres de colina, conduciendo a un incremento de los niveles de acetilcolina en el espacio sináptico de las uniones neuromusculares, con la consiguiente sobrecarga colinérgica (Fukuto, 1990). La continua sobreestimulación del músculo o de la fibra nerviosa genera, en último término, exhausto y tetania, y dependiendo de la dosis, conduce finalmente a la muerte del organismo expuesto. Al contrario de lo que ocurre en la acetilación, reacción en la que rápidamente se rompe el enzima liberándose ácido acético, regenerándose el enzima, la fosforilación de la AChE es altamente estable y, en algunos casos, dependiendo de los grupos atacados por el átomo de fósforo, es irreversiblemente inhibido (Aldridge, 1950). El grupo *hidroxi* de la serina (en el centro activo de la enzima), bloqueado por la fosforilación, no puede participar en la hidrólisis de la acetilcolina.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la relación directa entre la actividad anticolinesterásica de un compuesto organofosforado y la reactividad de su átomo de fósforo. Habitualmente, los compuestos parentales son inhibidores débiles de esta actividad enzimática ya que, generalmente, los procesos de biotransformación están dirigidos a reducir la acumulación y la toxicidad de los xenobióticos en los organismos vivos. Sin embargo, existen numerosos ejemplos de compuestos cuyos productos de los procesos de destoxicación son mucho más tóxicos que los compuestos parentales (Guengerich y Liebler, 1985).

Algunos insecticidas organofosforados son inhibidores débiles de las colinesterasas, pero pueden ser biotransformados en compuestos más tóxicos. Los

insecticidas fosforotionatos con un enlace P=S son metabolizados a sus análogos oxigenados (con un enlace P=O) convirtiéndose en potentes inhibidores de la AChE (Chambers y Carr, 1995). En el caso del diazinón, es la formación del análogo *oxon* como consecuencia de la activación metabólica del compuesto original por parte del organismo (Fukuto, 1990), la que hace irreversible la inhibición del enzima AChE (Escartín y Porte, 1996). Se cree que en esta reacción de activación metabólica se encuentran implicadas las oxidasas de función mixta (MFO), sistema enzimático responsable de la oxidación metabólica de compuestos extraños al organismo (Jacoby, 1980). En distintos estudios, se ha comprobado la mayor toxicidad del diazoxón en relación con la del diazinón (Fujii y Asaka, 1982; Tsuda *et al.*, 1997).

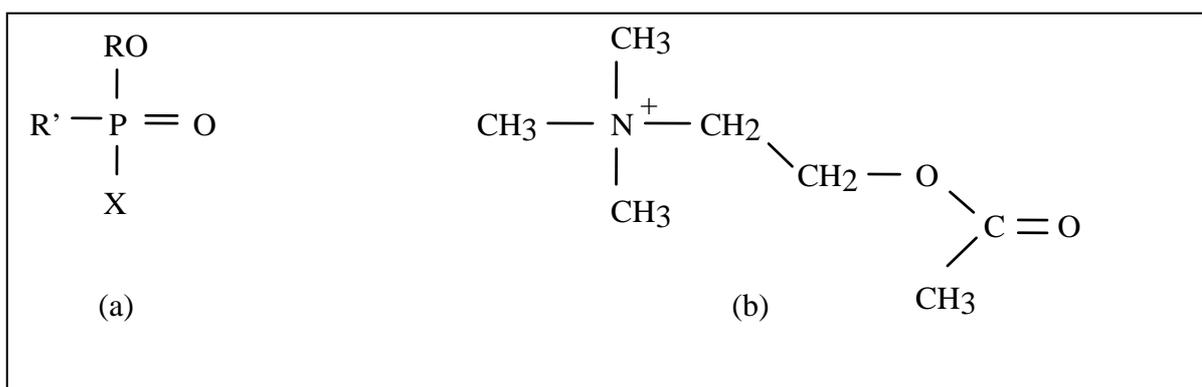


FIGURA 4. Estructura general de los insecticidas organofosforados (a) y del neurotransmisor acetilcolina (b).

La recuperación de la enzima AChE inhibida por la forma *oxon* del inhibidor es muy lenta, estando relacionada la recuperación de la actividad enzimática con la síntesis *de novo* de enzima (Boone y Chambers, 1996; Yuan y Chambers, 1996).

2.4.2. Inhibición por exposición a compuestos carbamatos.

La inhibición de la AChE por parte de los compuestos carbamatos (figura 5), sigue un mecanismo similar al que se ha descrito para el caso de la inhibición por organofosforados. Sin embargo, aquí se contempla una regeneración espontánea del

enzima a su forma activa (metilamina), produciéndose también dióxido de carbono en la reacción de regeneración. Esta regeneración resulta ser una reacción rápida. De ahí que se nombre a los carbamatos como compuestos anticolinesterásicos de acción reversible, contrariamente a lo que ocurre con los organofosforados cuya acción sobre la actividad enzimática objeto de este estudio se considera irreversible.

La explicación a esta inhibición reversible por parte de los carbamatos, más concretamente de los carbamatos derivados del ácido metilcarbámico, se apunta a continuación. La introducción de un sustituyente *nitro* en el anillo fenólico del fenilmetilcarbamato tiene como consecuencia la producción de un compuesto cuya elevada reactividad desaparece antes de que tenga la oportunidad de inhibir a la AChE (Nishioka *et al.*, 1977).

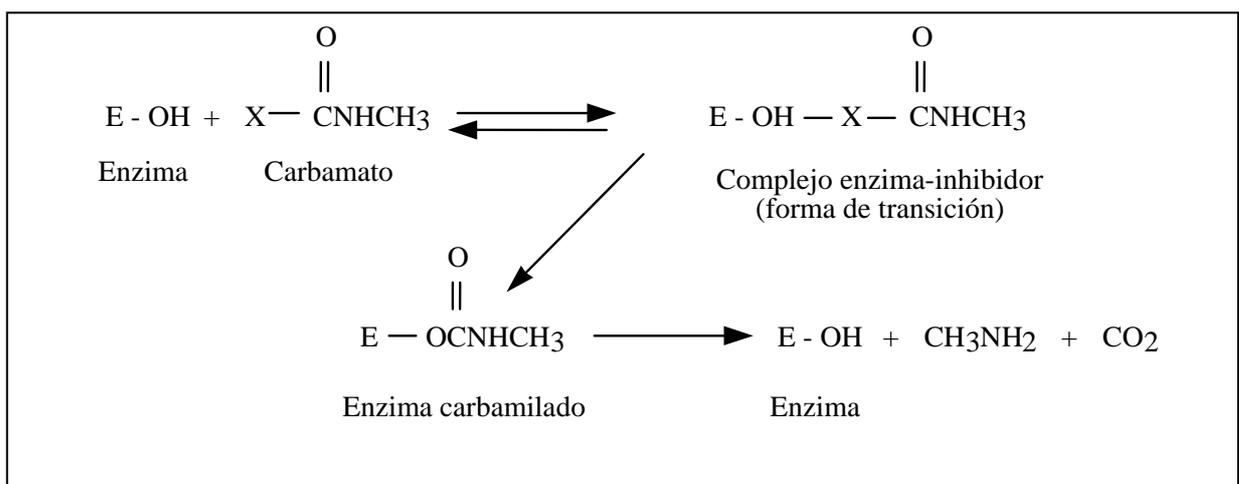


FIGURA 5. Carbamilación de la AChE por compuestos carbamatos.

En el caso de los compuestos organofosforados, su capacidad anticolinesterásica depende en gran parte de la reactividad química de los mismos, es decir, de la reactividad de los radicales de la molécula. Sin embargo, en el caso de los carbamatos, es esencial que exista una complementariedad molecular con la enzima o una capacidad del carbamato de ocupar el centro activo de la enzima AChE. Por ello, los ésteres

carbamatos con elevada actividad anticolinesterásica son aquellos que resultan ser estructuralmente similares a la acetilcolina (Fukuto, 1987).

3. OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden alcanzar en este estudio, son los siguientes:

1. Realizar un estudio comparado de la sensibilidad del crustáceo *D. magna* a los dos plaguicidas objeto de estudio (Diazinón y molinato) a través de ensayos de toxicidad aguda.
2. Caracterizar el efecto a largo plazo de los plaguicidas diazinón y molinato, a través de ensayos crónicos de toxicidad de 21 días de duración, sobre la longevidad, capacidad reproductiva y crecimiento corporal de *D. magna*, como parámetros individuales, y sobre la tasa intrínseca de incremento natural (r) como parámetro poblacional.
3. Evaluar el efecto de los plaguicidas diazinón y molinato sobre el contenido proteico de *D. magna* tras 120 horas de exposición a los mismos.
4. Determinar el efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de *D. magna* (generación parental) y la posible repercusión sobre la capacidad reproductiva de estos dáfidos.
5. Determinar el efecto de los plaguicidas objeto de estudio sobre la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* tras un periodo de exposición de 120 horas
6. Valorar la conveniencia de determinar la actividad acetilcolinesterasa en *D. magna* en relación con el contenido en proteínas totales de los organismos o asimilándola a la totalidad del individuo.
7. Realizar un estudio comparativo del efecto de ambos plaguicidas en varias generaciones de *D. magna* (generación parental y primera generación filial 1ª y 3ª camadas) a través de un estudio multigeneracional, y tomando en consideración los parámetros evaluados en los estudios crónicos, así como el contenido proteico y la actividad acetilcolinesterasa de los organismos expuestos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales experimentales: *Daphnia magna* Straus.

Los organismos que se han utilizado para desarrollar este trabajo pertenecen a la especie *Daphnia magna* Straus, 1820, clon K6 (Muysen y Janssen, 2001), cuyo cultivo se inició el año 1990 a partir de individuos procedentes del *Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution* (Gante, Bélgica). En nuestro laboratorio se mantiene un cultivo permanente en acuarios de seis litros de capacidad, según las normas de la C.E.E. (1984) (figura 6).

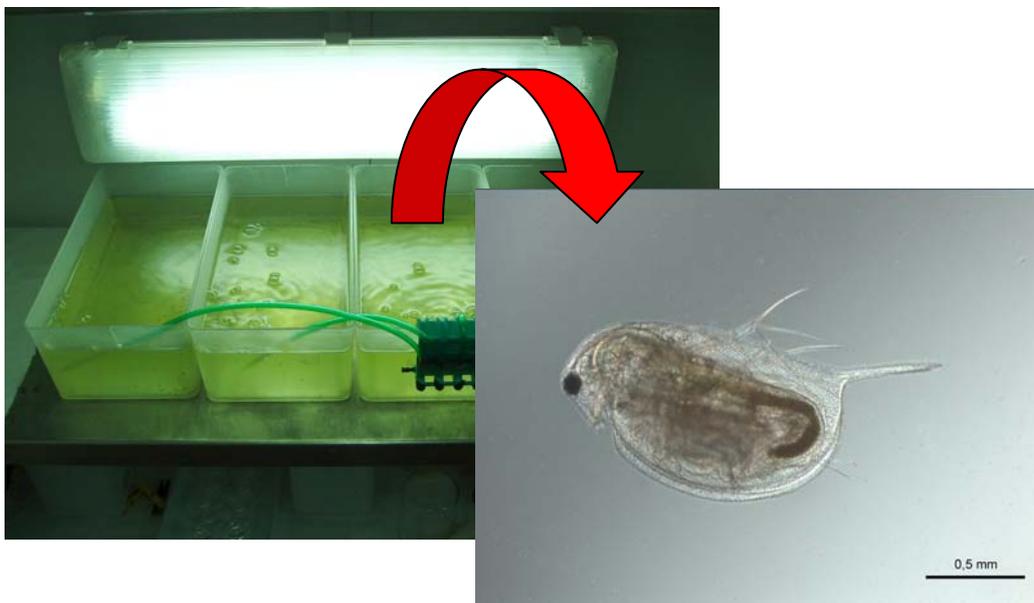


FIGURA 6. Cultivo de *Daphnia magna* Straus mantenido en el laboratorio de Ecotoxicología y Calidad del Agua de la Universidad de Valencia.

El medio de cultivo de los dáfidos es renovado dos veces por semana, utilizando agua de la red de suministro municipal previamente decolorada y aireada hasta alcanzar el nivel de saturación en oxígeno, manteniéndose en el cultivo una densidad que no excede de 50 animales por litro de agua. Se utilizaron mallas de distinto diámetro de poro para separar los adultos de los neonatos, manteniéndose únicamente los primeros en el cultivo. Para evitar el envejecimiento de la colonia, periódicamente se sustituyó un acuario de adultos por otro de neonatos.

Las condiciones físico-químicas del medio de cultivo son las siguientes: dureza total, 181.8 ± 18.8 mg/L de CaCO_3 ; pH 7.9 ± 0.2 ; alcalinidad, 4.1 mmol/L y O_2 disuelto hasta alcanzar al menos el 90% de saturación. La temperatura es de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, y el fotoperiodo de 12 hr luz : 12 hr oscuridad, mantenidas ambas condiciones alojando el cultivo en una cámara atemperada dotada de un temporizador para controlar el fotoperiodo. El crecimiento, la reproducción y la supervivencia de invertebrados en el laboratorio, pueden sufrir variaciones en función de distintos factores ambientales. Por ello, es importante controlar y mantener constantes, dentro de unos rangos aceptables, estos factores con el fin de que no interfieran en los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad (Buikema *et al.*, 1980; O.E.C.D., 2000).

Los dáfidos del cultivo son alimentados diariamente con el alga clorofícea *Nannochloris oculata*, siendo ésta suministrada *ad libitum*.

4.2. Cultivo de *Nannochloris oculata*.

Nannochloris oculata es un alga clorofícea que también se cultiva permanentemente en nuestro laboratorio. El cultivo se inició a partir de un inóculo cedido por el *Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution* de la Universidad de Gante, Bélgica, siendo transportado en cámara hermética y conservado en frigorífico a 4°C hasta el momento de su uso (figura 7).

El inóculo se resembró en condiciones de máxima esterilidad en un medio compuesto por 100 mL de medio BBM (Bischoff y Bold, 1983), 2 mL de solución de vitaminas y 2 mL de solución de metales esenciales, por litro de agua destilada. La composición de las soluciones de BBM, vitaminas y metales esenciales (O'Kelly, 1974) aparece en la tabla 1.

La colonia se renueva semanalmente mediante resiembras en medio fresco contenido en recipientes de 3 L de capacidad, manteniendo la población en la fase exponencial de crecimiento. El cultivo se mantiene en una cámara atemperada, manteniéndose una temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y proporcionando iluminación constante a los frascos de cultivo con una intensidad de 1000 luxes.

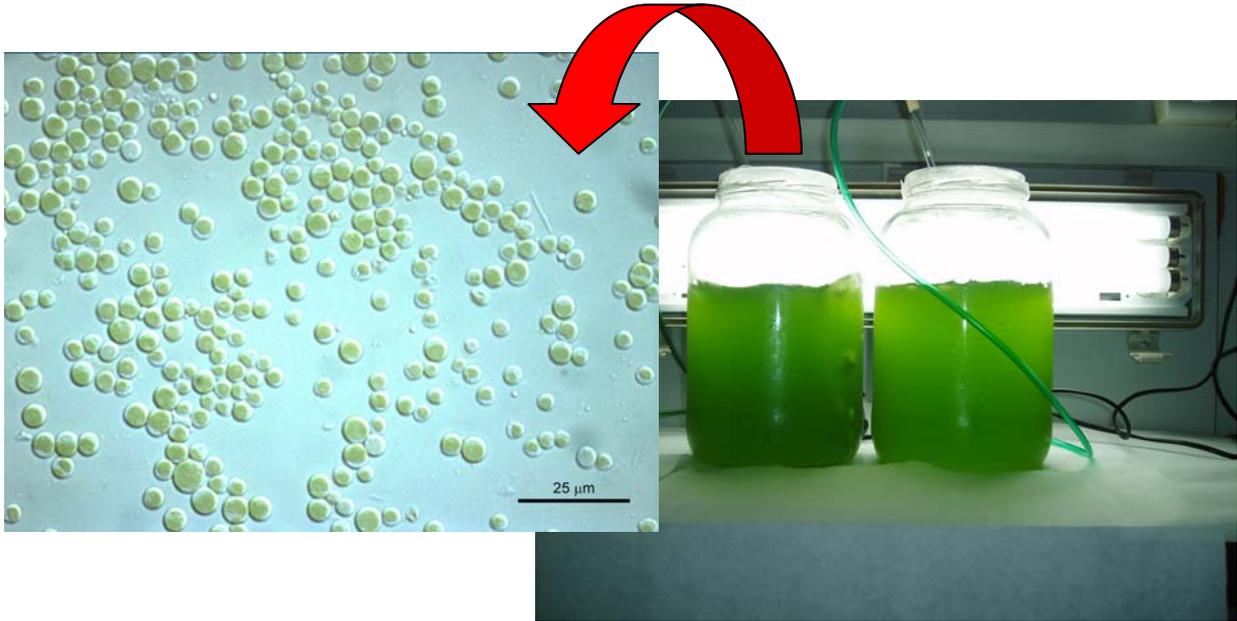


FIGURA 7. Cultivo de *Nannochloris oculata* mantenido en el Laboratorio de Ecotoxicología y Calidad del Agua de la Universidad de Valencia.

El motivo de haber seleccionado este alga cloroficea como fuente de alimento de *D. magna* es que al iniciar el cultivo del alga se efectuaban ensayos de toxicidad con este cladóceros y también con el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Por ello, se hizo necesaria la búsqueda de una fuente de alimento común a ambos organismos, facilitando el mantenimiento en el laboratorio. Derivada de esta necesidad surgió la idea de mantener el cultivo de *N. oculata*, puesto que su tamaño celular es aproximadamente de 1.5-2 μm (Yufera *et al.*, 1983), lo que la hacía ideal para ser utilizada tanto por *D. magna*, que es capaz de filtrar únicamente partículas de tamaño entre 1 y 35 μm (Geller y Müller, 1981), como por *B. calyciflorus*.

TABLA 1. Composición de las soluciones de BBM, metales y vitaminas para el cultivo de *Nannochloris oculata*.

Medio BBM	NaNO ₃	2500 mg/L
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	250 mg/L
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	750 mg/L
	K ₂ HPO ₄	750 mg/l
	KH ₂ PO ₄	1750 mg/L
	NaCl	250 mg/L
Metales	NaFe-EDTA	5 g/L
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	180 mg/L
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	10 mg/L
	ZnSO ₄ x 6H ₂ O	10 mg/L
	NaMoO ₄ x 2H ₂ O	6.4 mg/L
Vitaminas	Tiamina	200 mg/L
	Biotina	10 mg/L
	B ₁₂	10 mg/L

4.3. Compuestos ensayados.

4.3.1. Insecticida organofosforado: Diazinón.

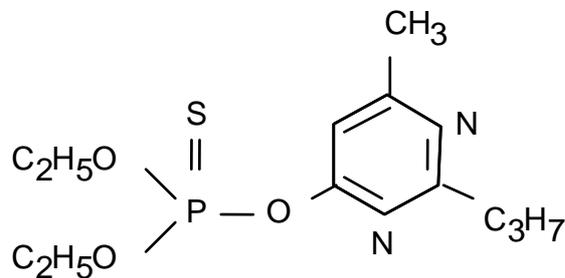
En el presente trabajo se ha empleado diazinón técnico (96.1% pureza), habiendo sido suministrado por la empresa CEQUISA. El producto técnico es un líquido de color ocre fácilmente fotodegradable. Asimismo es termosensible (se degrada por encima de los 100°C) y presenta una volatilidad moderada (1.4×10^{-4} mm Hg a 20°C). El diazinón es miscible en solventes orgánicos como la acetona (utilizada en este estudio).

La persistencia del diazinón en el agua depende del grado de acidez del medio, encontrándose vidas medias desde 12 hr, en aguas muy acidificadas, a 6 meses en aguas

de pH próximo al neutro. Este compuesto parece ser ligeramente menos persistente en el agua natural que en el agua experimental, siendo más rápida su degradación en el medio natural, presentando una vida media de 70.54 hr frente a las 79.19 hr que tiene en el agua experimental (Ferrando *et al.*, 1992). No obstante, se ha citado como uno de los organofosforados más persistentes en algunos estudios de degradación de plaguicidas (Frank *et al.*, 1991).

El diazinón es un compuesto organofosforado de amplio espectro empleado para controlar una extensa gama de plagas de cultivos y almacenados. Su aplicación, como compuesto con propiedades insecticidas y acaricidas, se ha efectuado contra plagas del suelo, frutales, maíz, patatas, arroz, caña de azúcar, tabaco y viñedos (Eisler, 1986; Robertson y Mazzella, 1989). La elección de este plaguicida como tóxico objeto de estudio se fundamenta en su aplicación en campos de cultivo de arroz, hortalizas y cítricos entre otros, cultivos que centran la actividad agrícola en la Comunidad Valenciana.

La fórmula de este plaguicida organofosforado, responde a la siguiente estructura:



Ácido tiofosfórico O,O-dietil-
O-(2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil) éster.

El uso extendido del diazinón en la práctica agrícola y su posterior acceso al medio acuático, puede poner en peligro las poblaciones de organismos a las que, en un principio, no va dirigida su aplicación, como es el caso de los crustáceos cladóceros y, así, alterar el equilibrio de las comunidades biológicas (Wong, 1997).

Los efectos del diazinón sobre los organismos acuáticos están asociados a reducciones de las tasas de crecimiento y reproducción, tanto en invertebrados marinos y dulceacuícolas como en peces teleósteos (Eisler, 1986). A nivel fisiológico el

diazinón, como compuesto organofosforado, centra su actuación sobre las enzimas colinesterasas (ChE), provocando su bloqueo y la consiguiente acumulación de acetilcolina en el espacio sináptico de las uniones nerviosas y neuromusculares. Esta situación revierte en una permanente excitación muscular, observándose rápidas contracciones de los músculos y, finalmente, la parálisis y la muerte de los organismos expuestos (Ware, 1983). Por sí mismo, el diazinón no es un inhibidor colinesterásico muy potente. Sin embargo, en los animales es metabolizado a diazoxón (siendo sustituido un átomo de oxígeno, por una molécula de azufre), un compuesto fuertemente anticolinesterásico.

4.3.2. Herbicida carbamato: Molinato.

El uso de los herbicidas ha venido creciendo como resultado de la necesidad de controlar selectivamente las plagas herbáceas en las regiones con actividad agrícola. La progresiva utilización de los compuestos con propiedades herbicidas ha incrementado el riesgo potencial de contaminación de los organismos acuáticos como consecuencia del efecto tóxico de estos compuestos. Por ello, se considera muy importante evaluar el impacto de estos compuestos químicos sobre la fauna acuática (Peterson *et al.*, 1994).

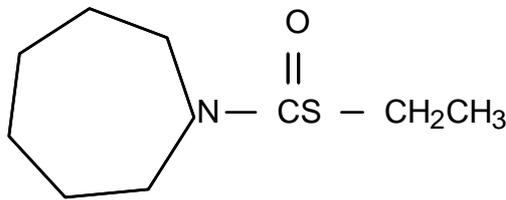
Los carbamatos herbicidas son generalmente selectivos. Se absorben en las hojas y actúan también en el suelo, cuando son arrastrados por el agua de lluvia o de riego hasta la zona de las raíces. Son traslocados y ocasionan transformaciones en el crecimiento y alteraciones de la mitosis dando lugar a un aumento del tamaño celular y a la formación de núcleos poliploides y células multinucleadas, siendo más eficaces durante la germinación, etapa del desarrollo en la cual la división celular es más activa. Finalmente también ocasionan deformaciones graves de las raíces que conducen a la destrucción de la planta o a la detención de su crecimiento (Yufero y Carrasco, 1986).

Pese a la condición herbicida del carbamato seleccionado para este trabajo (molinato), se ha comprobado su elevada toxicidad para la fauna acuática en algunos estudios (Brand *et al.*, 1993; Julli y Krassoi, 1995; Sancho *et al.*, 2003). Siendo empleado para controlar plagas en regiones donde se cultiva arroz, como es el caso de la Comunidad Valenciana, se ha considerado interesante seleccionarlo como tóxico objeto

de estudio para comparar su efecto tóxico sobre *D. magna* con el efecto producido por el organofosforado diazinón, compuesto al que se atribuye una clara acción insecticida.

El molinato empleado en este trabajo fue suministrado por la empresa ARGOS, S.A., siendo el producto técnico (98% de pureza) un líquido claro de olor fuerte. Su solubilidad en agua es baja (900 mg/L, 25°C) siendo miscible en acetona, etanol, queroseno y xileno (Worthing y Hance, 1991). En este estudio se empleó acetona como disolvente.

Su uso está autorizado para controlar plagas en cultivos de arroz, inhibiendo el desarrollo foliar de los vegetales cuya plaga se quiere controlar. De baja persistencia en el suelo, el molinato presenta una vida media de entre 5 y 21 días en el agua natural (Wauchope *et al.*, 1992), permaneciendo en el medio durante 24 horas el 99% de la concentración original en el agua experimental según Ferrando *et al.* (1992). Adsorbiéndose poco al sustrato, presenta una elevada movilidad siendo contaminante potencial de los acuíferos subterráneos. Es rápidamente volatilizado (5.6×10^{-3} mmHg, 25°C) y fotodegradado. Este herbicida carbamato, presenta la siguiente estructura:



S-etil hexahidro-1 H-azepina-1-carbotioato

4.4. Toxicidad aguda de los plaguicidas ensayados en *D. magna*.

Cálculo de la CE₅₀.

Las condiciones para desarrollar este tipo de ensayos de toxicidad aguda, así como los de tipo crónico que se llevaron a cabo posteriormente, aparecen publicadas en el protocolo de la OECD *Guidelines for testing of chemicals* (2000).

La CE₅₀ (Concentración Efectiva 50) se define como aquella que produce la inmovilidad del 50% de la población objeto de estudio por efecto del tóxico empleado en el ensayo (normativa OECD, 2000).

A continuación, se detalla el proceso que se siguió para realizar el estudio de la toxicidad aguda del molinato sobre *D. magna*, siendo aportados los resultados relativos al diazinón por un estudio previo (Fernández *et al.*, 1995) en el que se determinó un valor de 0.86 µg/L para la CE₅₀ a las 24 horas de exposición del cladócero *D. magna* al insecticida organofosforado diazinón. Durante este estudio, los dáfnidos fueron expuestos a las concentraciones 0.1, 0.18, 0.32, 0.56, 1, 1.8, 3.2 y 5.6 µg/L del plaguicida.

Los ensayos se realizaron utilizando neonatos (≤ 24 horas) de modo que se hace necesaria la separación previa, por diferencia en el tamaño con respecto al de los individuos adultos, de los juveniles del cultivo original. De esta manera se asegura que el día que se inicia el ensayo los neonatos empleados no excedan la edad recomendada. Este proceso se llevó a cabo empleando filtros de malla de nylon, adecuando el diámetro de poro al tamaño de los organismos que se quieren filtrar.

Se efectuaron, en primer lugar, una serie de experiencias preliminares para acotar el rango de concentraciones del plaguicida a ensayar en el test de toxicidad definitivo. De esta manera, se eligió un intervalo entre la concentración más alta de xenobiótico que no produjo efecto letal en los organismos expuestos y la concentración más baja que causó el 100% de mortalidad en el ensayo preliminar. El ensayo definitivo, condujo a la determinación del valor de la CE₅₀ (0.86 µg/L de diazinón, a las 24 horas de exposición).

Tanto en las experiencias preliminares, como en las definitivas, se utilizaron recipientes de vidrio de 30 mL de capacidad, conteniendo 25 mL de la dilución del tóxico correspondiente a cada una de las concentraciones a ensayar. Además, se efectuó un test de referencia con individuos control en el que la mortalidad no debe exceder el 10% de los individuos ensayados para que el cálculo de la CE₅₀ se acepte como válido. En cada recipiente se colocaron, escogidos al azar del cultivo original, 10 neonatos (≤ 24 h), efectuándose para cada concentración ensayada, tres réplicas. El control debe contener la máxima cantidad de disolvente (en nuestro estudio, acetona) utilizada en la dilución de los plaguicidas (377 µL/L, empleada para diluir el molinato).

La preparación de la solución del tóxico (disolviendo el stock inicial con acetona al 99.8%) debe ser efectuada inmediatamente antes de la transferencia de los dáfidos a los recipientes con el medio preparado (OECD, 2000).

Para realizar estos ensayos, se empleó agua de la red de suministros municipal, previamente declorada y oxigenada hasta saturación (90%) mediante aireación continua, con compresores, durante una semana.

Tras sumergir a los neonatos en el medio haciendo uso de pipetas Pasteur, se añadió una pequeña cantidad de lentejas de alcohol cetílico en cada frasco del ensayo para evitar que los neonatos quedaran atrapados en la superficie del agua. Si no se toma esta precaución, los neonatos podrían quedar retenidos por la fuerza de la tensión superficial, dificultando su total inmersión en el medio, hecho que interferiría en los resultados al tiempo que podría, incluso, ocasionarles la muerte. Se han hecho estudios para comprobar que el alcohol cetílico no produce efecto negativo alguno en los dáfidos (Cotou, 1993).

Las concentraciones de molinato para realizar el ensayo orientado a la determinación de la CE_{50} de este herbicida para *D. magna*, fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mg/L para el ensayo preliminar y 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42 mg/L para el ensayo definitivo.

Las condiciones a las que fueron efectuados los ensayos de toxicidad aguda fueron: $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura (en cámara atemperada); fotoperiodo de 12 horas de luz:12 horas de oscuridad; los organismos no fueron alimentados durante el ensayo, y el estudio tuvo lugar en condiciones estáticas (ausencia de cambio del medio de cultivo durante la duración del mismo) y sin aireación del medio.

A las 24 y 48 horas de iniciar el ensayo se registró la inmovilidad de los dáfidos en cada concentración de plaguicida. Se consideró como criterio de muerte (inmovilidad) la ausencia de movimiento al observar los individuos durante 15 segundos exponiendo los frascos a la luz o al hacerlos girar (Buikema *et al.*, 1980; OECD, 2000). Posteriormente, se procedió al cálculo de la CE_{50} del plaguicida ensayado sobre *D. magna* utilizando el método del *moving average* con un programa informático adaptado a PC (Stephan, 1977).

4.5. Ensayo crónico multigeneracional para evaluar la toxicidad del diazinón y el molinato en *D. magna*.

Se describe a continuación el esquema general que se siguió para efectuar los ensayos crónicos de toxicidad con *D. magna*, independientemente del plaguicida cuya toxicidad se quería evaluar.

Se utilizaron neonatos del cultivo original (≤ 24 h) para los ensayos. Basándose en el valor de las CE_{50} del diazinón y molinato sobre *D. magna*, se escogieron cinco concentraciones subletales de cada uno de los plaguicidas con el fin de llevar a cabo los ensayos crónicos: 0.05, 0.1, 0.5, 0.75 y 1.0 ng/L de diazinón, y 3.77, 4.71, 6.28, 9.42 y 18.85 mg/L de molinato. Además de estas cinco concentraciones de tóxico, se ensayaron las réplicas correspondientes a un control, con medio libre de plaguicida, y un control con acetona en cantidad igual a la mayor empleada para diluir los plaguicidas escogidos para este estudio (377 μ L/L) para comprobar la no-interferencia del disolvente en el correcto desarrollo de las experiencias.

Las diluciones del plaguicida se prepararon en matraces aforados de vidrio de 1L de capacidad inmediatamente antes de llevar a cabo los ensayos, constituyendo un *stock* inicial de 10 mg/L a partir del cual se fueron preparando las diluciones necesarias para tener las concentraciones de tóxico empleadas en el ensayo. El experimento para cada concentración de plaguicida estuvo integrado por cinco réplicas con tres individuos en cada una y dispuestos éstos individualmente en frascos de vidrio de 60 mL de capacidad, con 50 mL de medio, de manera que para cada concentración se obtenían los datos correspondientes a quince individuos.

Tras sumergir a los neonatos en el medio con pipetas Pasteur, se añadió alcohol cetílico con la misma finalidad con que se empleó en los ensayos de toxicidad aguda. Esta operación se repitió durante los tres primeros días de cada experimento, hasta que los dáfidos hubieron alcanzado el tamaño suficiente como para poder “escapar” por sí mismos de la fuerza de la tensión superficial. En este estudio, se comprobó que, en condiciones control (ausencia de plaguicida), el tamaño corporal (medido tal y como

indicó Zagatto, 1989) que debían alcanzar los juveniles de *D. magna* necesario para poder dejar de incorporar alcohol cetílico a los frascos donde se efectuaba el ensayo, fue de 0.197 cm, tamaño que era alcanzado a los tres días de vida. En presencia de contaminante, este tiempo se retrasó más o menos, en función de la capacidad tóxica del compuesto ensayado y de la concentración utilizada.

Diariamente se separaron y contaron los descendientes de cada individuo empleando pipetas Pasteur de polietileno de 3 mL de capacidad, adaptando el orificio de entrada al tamaño de los individuos a medida que éstos iban creciendo. Con la misma periodicidad con que se contaron los descendientes, se cambiaron los adultos a medio fresco, con el fin de mantener una concentración de plaguicida constante, asimismo se alimentó diariamente a los cladóceros, empleando una concentración de *Nannochloris oculata* equivalente a 5×10^5 cels./mL, después de efectuar el ensayo que se ha detallado anteriormente para determinar esta concentración óptima de alga. La transferencia de los individuos de un frasco a otro se efectuó con precaución evitando, en la medida de lo posible, el estrés mecánico producto del manejo y transferencia de los individuos.

Se hizo un seguimiento, durante los 21 días que duró el ensayo, de parámetros individuales como: el *crecimiento* (al finalizar el test: día 21), la *supervivencia* y la *capacidad reproductiva*, así como del parámetro poblacional *tasa intrínseca de incremento natural* (r). Van Leeuwen *et al.* (1985a) comprobaron que existía una correlación de más del 99% entre el valor obtenido para r a los 21 primeros días de vida de *Daphnia magna* y el valor correspondiente al mismo parámetro calculado para todo el ciclo de vida, lo que indica la importancia de la reproducción temprana para el crecimiento poblacional. Por esta razón, se aceptó que el test de tres semanas (21-d) era apropiado para calcular la *tasa intrínseca de incremento natural* de crecimiento para una población de *D. magna*. La utilización de r como parámetro demográfico en los estudios toxicológicos ha sido recomendada (Allan y Daniels, 1982), dado que su estadística está basada tanto en la supervivencia de los individuos de la población expuesta como en su fecundidad.

El *crecimiento* de los dáfidos se evaluó efectuando mediciones del caparazón (en cm) desde la base de la furca, hasta la región anterior del rostro (figura 8).

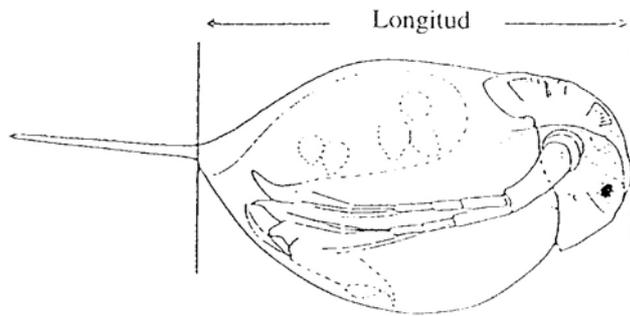


FIGURA 8. Medida del crecimiento efectuada en *D. magna* correspondiente a la longitud desde la base del apéndice caudal hasta la región anterior del rostro (Zagatto, 1989).

Estas mediciones se llevaron a cabo con un micrómetro acoplado a uno de los oculares de una lupa binocular. Se fueron colocando sobre un papel secante en una placa Petri, uno a uno, los individuos supervivientes a la totalidad del experimento. Se consigue así, eliminar los restos de líquido arrastrados al extraerlos de los frascos y favorecer su inmovilización, mejorando las mediciones bajo el objetivo de la lupa.

La supervivencia (días) de *D. magna* fue evaluada diariamente al efectuar la transferencia de los individuos parentales a frascos con medio fresco.

Para evaluar la capacidad reproductiva de los dafnidos, se estudiaron las variaciones del valor de los siguientes parámetros:

- **Tiempo medio para la primera puesta**, o tiempo de maduración reproductiva (días): tiempo transcurrido desde que se inicia el ensayo hasta que el individuo libera la primera camada de descendientes.
- **Número medio de camadas por hembra.**- Número medio de camadas de descendientes producidas durante los 21 días de duración del ensayo crónico, por cada una de las hembras expuestas a las condiciones del estudio.

- **Tamaño medio de la camada.**- Número medio de neonatos que integran las camadas de descendientes registradas durante los 21 días de duración del ensayo crónico.
- **Número medio de neonatos totales por hembra.**- Número total de descendientes producidos durante los 21 días de duración del ensayo crónico, por cada una de las hembras objeto de estudio.

Se efectuó un seguimiento del parámetro poblacional tasa intrínseca de incremento natural (r) mediante sucesivas aproximaciones a la fórmula de Lotka (1913):

$$\sum l_x m_x e^{-r} = 1$$

r : tasa intrínseca de incremento natural

l_x : supervivencia (número de individuos vivos / total)

m_x : reproducción (número de descendientes / número de hembras)

x : edad (días transcurridos desde el inicio del experimento)

Los datos obtenidos para cada uno de los parámetros apuntados, se recogieron en tablas de resultados y luego se procedió a efectuar el análisis estadístico de los mismos.

Basándose en los valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural, se estimó el valor de la concentración máxima aceptable (MATC) como la media geométrica de la mayor concentración de diazinón y de molinato que no produjeron efectos significativos en la r (NOEC), y la menor concentración para cada uno de los compuestos ensayados en este estudio que produjo efectos significativos en el mismo parámetro (LOEC). Aunque es más usual utilizar parámetros individuales para determinar la MATC, algunos autores han aportado estudios en los que se calculó la MATC basándose en el parámetro poblacional r (Buhl *et al.*, 1993; Ferrando *et al.*, 1995). La consideración del parámetro r para el cálculo de la MATC en este estudio

reside en la importancia ecológica de este parámetro dado que refleja el efecto de los tóxicos tanto en la supervivencia como en la fecundidad de los organismos expuestos.

Se determinaron los valores de la CE_{50} de diazinón y de molinato para aquellos parámetros en que fue posible su cálculo, utilizando para ello la ecuación de regresión $y = a + bx$, calculada en base a los valores obtenidos para cada uno de los parámetros citados, siendo x la concentración de tóxico ensayada e y el 50% de reducción en el valor del parámetro considerado en cada caso.

4.5.1. Cálculo de la concentración óptima de *N. oculata* para los ensayos crónicos de toxicidad.

Con el fin de determinar la concentración óptima de *N. oculata* para efectuar los ensayos crónicos de toxicidad, se realizaron previamente dos ensayos de 15 días de duración utilizando las concentraciones de alga 5×10^5 cels./mL y 5×10^6 cels./mL por ser las más recomendadas en la bibliografía (Allen *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1998). Esta determinación resulta ser uno de los puntos clave en el desarrollo de ensayos de toxicidad crónica efectuados con organismos filtradores debido a que si existe un exceso de alga en el medio, ésta puede adherirse a los apéndices filtradores de los dáfnidos impidiéndoles la correcta filtración e ingestión del alimento, mientras que si el alimento es escaso, el déficit nutricional debilita a los organismos.

Para preparar las concentraciones escogidas, se procedió, en primer lugar, a centrifugar el alga procedente del cultivo durante 10 minutos haciendo uso de una centrífuga KUBOTA 5100 con rotor de brazo libre RS-720, a 3500 rpm. Una vez centrifugada el alga, se resuspendió el precipitado en el mismo agua de clorada que, posteriormente, se empleó en los ensayos multigeneracionales. Seguidamente, se preparó una dilución del alga que facilitara el conteo de la misma con una cámara cuantaglobulos Bürker. Una vez efectuado el recuento, se procedió al cálculo de la concentración de células presente en la suspensión, y de la cantidad de alga que se debía añadir al medio del ensayo para que la concentración en el mismo fuera la deseada.

Para cada concentración de *Nannochloris* se efectuaron tres réplicas del estudio. Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron dáfidos neonatos (≤ 24 h) procedentes del cultivo original mantenido en el laboratorio. Los organismos se dispusieron individualmente en frascos de 60 mL de capacidad, en los que diariamente se renovó el medio (en cantidad de 50 mL), inoculando cada uno de los frascos con la cantidad de alga determinada para tener las concentraciones a ensayar, y registrándose el número de descendientes con la misma periodicidad.

Después de 15 días, se calculó el valor de la *tasa intrínseca de incremento natural* (r) para los dáfidos alimentados con cada una de las dos dietas, evaluándose cuál de las dos concentraciones de *N. oculata* mejoraba el crecimiento de *D. magna* respecto a la otra en las condiciones control (ausencia de tóxico en el medio), presentando una mayor tasa intrínseca de incremento natural. En nuestro caso esta concentración fue de 5×10^5 céls./mL.

4.5.2. Fase de exposición a los plaguicidas.

Inicialmente, neonatos procedentes del cultivo original (integrado por adultos sujetos a condiciones control) tomados como generación parental o F_0 , se expusieron a las condiciones del ensayo durante 21 días. Los dáfidos de la primera camada (F_1 -1ª camada) procedentes de esta parental fueron contados y separados, iniciándose un nuevo test crónico con estos individuos. Finalmente un tercer ensayo crónico se llevó a cabo con los neonatos pertenecientes a la tercera camada (F_1 -3ª camada) de la generación parental F_0 (figura 9).

La razón por la que se descartaron los individuos pertenecientes a la segunda camada para efectuar el análisis multigeneracional, utilizándose únicamente neonatos correspondientes a la primera y tercera camada, fue la de marcar una mayor distancia escogiendo camadas más distantes entre sí en el momento de su eclosión. Por ello, se consideró más interesante escoger para este estudio las generaciones F_1 -1ª y 3ª camadas que, por ejemplo la F_1 -1ª y 2ª camadas, o la F_1 -2ª y 3ª camadas.

A lo largo de los 21 días que duró cada ensayo crónico se efectuó un seguimiento de los parámetros *supervivencia*, *capacidad reproductiva*, *crecimiento* y *tasa intrínseca*

de incremento natural para los individuos pertenecientes a las generaciones F_0 , F_1 -1ª y F_1 -3ª camadas. De esta manera, los parámetros individuales evaluados y el parámetro poblacional r se determinaron para cada concentración de cada uno de los tóxicos ensayados y para cada generación de dáfidos expuesta. Posteriormente, se procedió a comparar los resultados obtenidos para cada una de ellas entre sí, evaluándose la posible transferencia intergeneracional de los tóxicos empleados en este estudio de la generación parental a las sucesivas generaciones de descendientes.

4.5.3. Fase de recuperación a los efectos de los plaguicidas ensayados.

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de comprobar la recuperación de la descendencia de los parentales pre-expuestos a los plaguicidas diazinón y molinato.

Los individuos sometidos a esta fase del estudio fueron los correspondientes a las camadas 1ª y 3ª procedentes de puestas efectuadas por parentales (F_0) expuestos a los plaguicidas hasta el momento de dichas puestas; de este modo, cuando se expuso una cohorte de parentales a una determinada concentración de tóxico los descendientes correspondientes a la 1ª camada fueron separados y divididos aleatoriamente en dos grupos. A uno de ellos se le sometió a estrés tóxico (exposición a diazinón o a molinato), mientras que los organismos del otro fueron transferidos a medio exento de plaguicida (experiencia de recuperación a los efectos de los plaguicidas). De este modo, únicamente permanecieron en contacto con él el tiempo transcurrido desde la eclosión hasta su transferencia a un nuevo recipiente (como máximo 24 horas). Se pretendió evaluar, a través de los mismos parámetros que en los ensayos de exposición, el efecto del tóxico presuntamente transferido desde los parentales a sus descendientes, así como la capacidad de éstos para recuperarse de la situación de estrés tóxico. El mismo procedimiento se llevó a cabo a la hora de desarrollar el estudio de la toxicidad del diazinón y del molinato sobre los descendientes correspondientes a la tercera camada.

La duración de estos ensayos también fue de 21 días, y se confeccionaron tablas de resultados del mismo modo a como se procedió en la primera fase del estudio (figura 9).

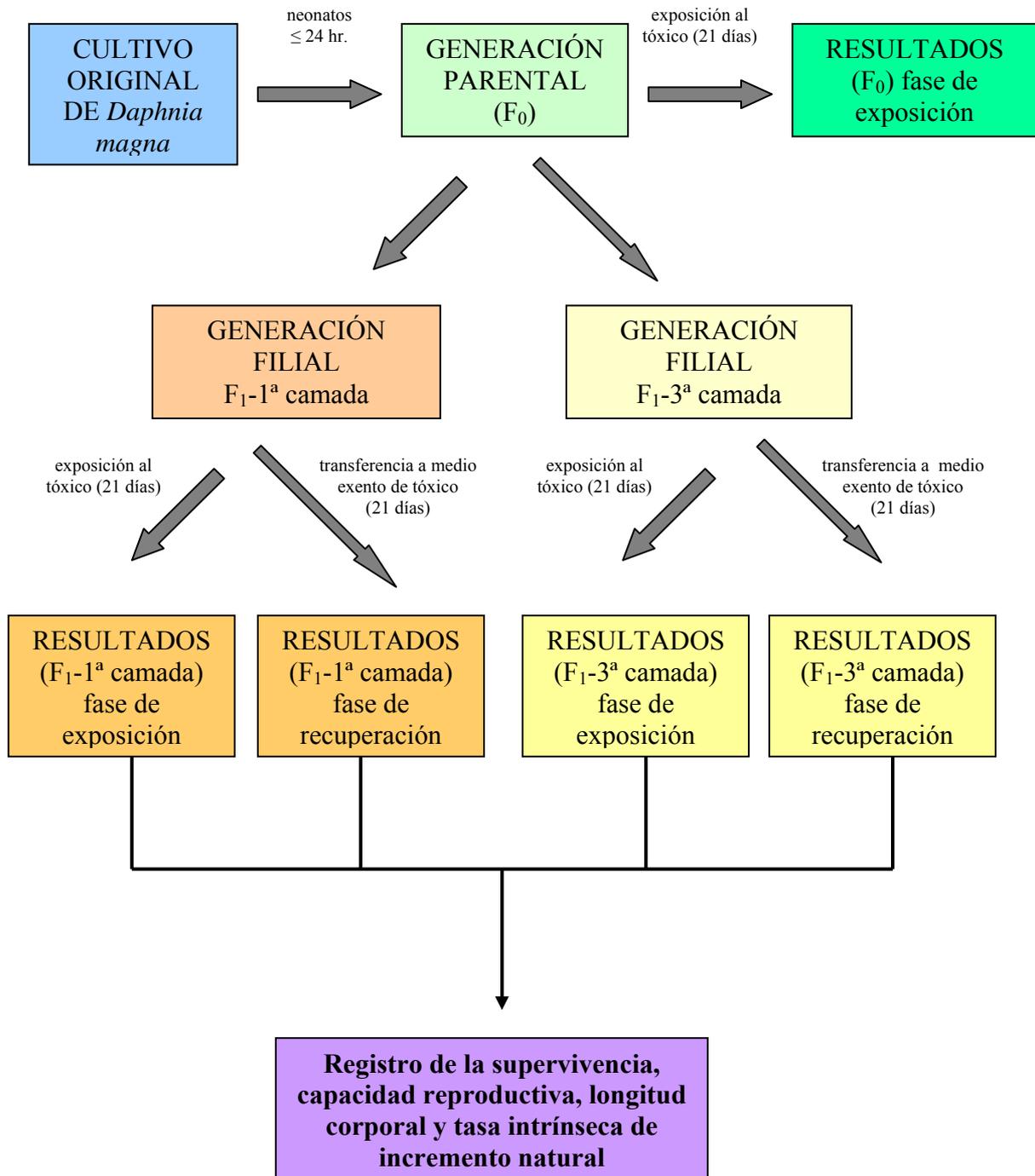
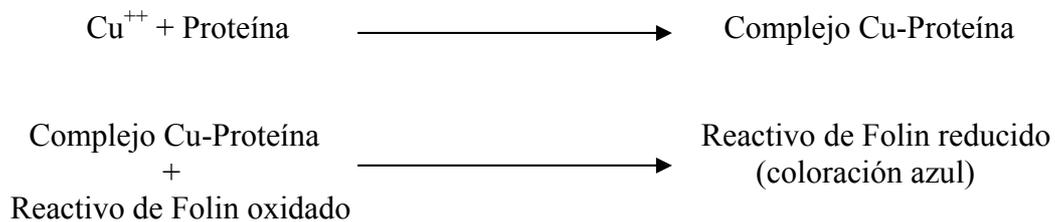


FIGURA 9. Diseño experimental del análisis multigeneracional de la toxicidad crónica en *Daphnia magna*.

4.6. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido proteico de *D. magna*.

Los niveles de proteínas en las muestras fueron determinados mediante la aplicación del *kit Protein assay* de *Sigma diagnostica* n° P 5656, basado en el método de Lowry *et al.* (1951), mediante el cual el reactivo con tartrato cúprico alcalino reacciona con las cadenas peptídicas dando lugar a un color purpúreo tras la adición del reactivo fenólico.

El fundamento del test es el siguiente: el cobre alcalino reacciona con la proteína; la adición de cobre provoca la formación de enlaces coordinados con los cuatro nitrógenos de los enlaces peptídicos. Posteriormente tiene lugar la reducción del reactivo de Folin por parte de la proteína tratada con cobre, obteniéndose la coloración azul propia de esta reacción que puede evaluarse con ayuda de un espectrofotómetro midiendo a una longitud de onda de 750 nm.



Tras la homogeneización de las muestras en tampón fosfato se tomó una alícuota de 25 μL de cada homogenado y se procedió a la aplicación del *kit* para el análisis de su contenido en proteínas totales, mezclándose con 0.5 mL de agua destilada y añadiéndose 0.5 mL del reactivo de Lowry a cada una de las muestras. Tras un periodo de 20 minutos en incubación, se añadió a las muestras 0.25 mL del reactivo de Folin. Transcurridos otros 30 minutos, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm. Los homogeneizados se mantuvieron sobre hielo picado en todo momento, teniendo lugar las reacciones posteriores a temperatura ambiente.

La concentración de proteína presente en las muestras se determinó por extrapolación de los valores de absorbancia a una curva patrón de seroalbúmina bovina ($y=a+bx$, donde y corresponde a la absorbancia medida en la muestra y el valor x es la

concentración de proteínas presente en dicha muestra en una concentración de $\mu\text{g/mL}$), la cual se obtiene por determinación de la absorbancia de distintas muestras cuya concentración de proteínas se conoce. Estos valores fueron utilizados para efectuar los cálculos orientados a expresar los resultados como μg de proteínas por individuo.

Al tratarse de un estudio multigeneracional aquí también se incluyeron tres generaciones de dáfidos: parental (F_0), y descendientes (F_1 -1ª camada y F_1 -3ª camada) para determinar el efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE y en el contenido de proteínas totales, al igual que para el ensayo crónico de 21 días de duración.

4.7. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de *D. magna*.

El peso seco de los dáfidos pertenecientes a la generación parental (F_0) (ver análisis multigeneracional de la toxicidad) fue determinado con el fin de establecer la posible correlación entre el efecto de los tóxicos ensayados en este estudio, y este parámetro, así como la presumible influencia del peso de los parentales sobre su capacidad reproductiva y la “salud” de los descendientes. El parámetro *peso seco* fue evaluado únicamente en los individuos pertenecientes a la generación parental de dáfidos, dado que el objetivo de la determinación de este parámetro fue la de tratar de establecer una relación entre el peso de los organismos parentales, y la mayor o menor sensibilidad a los tóxicos ensayados por parte de los descendientes de las 1ª y 3ª camadas.

Para efectuar las mediciones relativas a este parámetro, se expusieron grupos de animales a las distintas concentraciones de diazinón y de molinato (detalladas en el apartado donde se especifica el esquema de trabajo para efectuar los ensayos crónicos), durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas (ver apartado de análisis bioquímico de la actividad acetilcolinesterasa). Se expusieron 5 grupos de animales para cada concentración y tiempo de exposición, tomándose como valores definitivos las medias calculadas a

partir de estas cinco muestras. Ante la imposibilidad de determinar el peso de un solo individuo, se utilizaron 50 animales por réplica, para los tiempos ≤ 72 horas, para cada una de las concentraciones de los plaguicidas objetos de estudio; para los tiempos de ensayo de 96 y 120 horas se utilizaron solamente 25 individuos por réplica. Los ensayos se iniciaron con neonatos de ≤ 24 horas de vida, utilizando frascos de 3 L de capacidad con 300 animales en cada uno para los tiempos ≤ 72 horas, y de 1.5 L de capacidad con 150 animales en cada uno para los tiempos de ensayo de 96 y 120 horas.

Tras la exposición de los animales al tóxico correspondiente, se extrajeron del medio con una pipeta Pasteur de polietileno de 3 mL de capacidad, y se colocaron sobre un papel de filtro de 1.5 cm² de superficie para secar el líquido sobrante. Los papeles de filtro fueron colocados, individualmente, en placas Petri con tapa (4x1 cm) e introducidos en una estufa Memmert (ULE 400) para realizar el proceso de secado.

Los animales fueron pesados, junto con el papel de filtro, en una balanza de precisión Cobos (A-220-Csi) después de permanecer en la estufa durante 48 horas a 65°C de temperatura (medida 1) (modificado de Hosmer *et al.*, 1998). Tras la pesada de los animales con el papel de filtro, se desecharon los dáfidos y se volvió a secar el papel de filtro sólo, tras introducirlo en la estufa durante 24 horas más a la misma temperatura de 65°C (medida 2). Finalmente se calculó el peso seco de los animales como la diferencia entre las medidas 1 y 2, expresándose los valores obtenidos en μgr de materia seca por individuo.

4.8. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna*.

La actividad acetilcolinesterasa fue determinada a través de ensayos en los que se emplearon 40 dáfidos por réplica y concentración de tóxico.

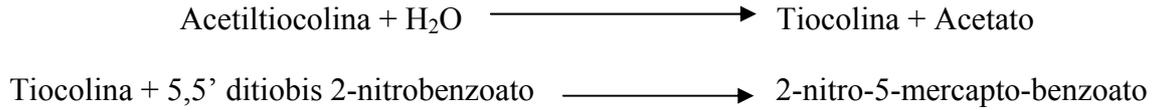
Se colocaron 5 neonatos ≤ 24 horas de vida en frascos de 50 mL de capacidad con agua, *N. oculata* y plaguicida en las distintas concentraciones a ensayar. Cada una de las cinco réplicas de las que constó el ensayo, estuvo integrada por 8 frascos, conteniendo 5 animales cada uno de ellos (40 animales por réplica). En una primera fase de exposición

a los plaguicidas los individuos fueron extraídos del medio a distintos tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 horas), introducidos en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad en los que se retiró el exceso de líquido, y congelados (-18°C) en grupos de 40 animales hasta procederse a los ensayos bioquímicos pertinentes. Los animales fueron alimentados diariamente con *N. oculata* (5×10^5 cels./mL). El motivo de ensayar tiempos de exposición ≤ 120 horas es que a partir de ese momento, las hembras de *Daphnia magna* empiezan a desarrollar huevos en la cámara de incubación, lo cual interfiere en la determinación enzimática en relación con la actividad acetilcolinesterasa.

Posteriormente, para determinar la actividad AChE y los niveles de proteínas totales en las muestras, éstas se descongelaron (nunca permanecieron en congelación más de tres días, habiéndose comprobado que en este tiempo la actividad enzimática no variaba significativamente), colocándose en tubos homogeneizadores de vidrio de 2 mL de capacidad. Las muestras fueron homogeneizadas en tampón fosfato (0.1 M; pH 7.2) empleando 0.25 mL de tampón para cada grupo de 40 animales y manteniendo los tubos en hielo picado durante el proceso de homogeneización. Es muy importante que durante la homogeneización la muestra se mantenga en hielo picado para asegurar que durante el proceso la muestra no se sobrecaliente, conduciendo a la desnaturalización proteica (Thompson, 1999).

Tanto la actividad AChE, como el contenido en proteínas totales, fueron determinadas inmediatamente después del proceso de homogeneización. Para la determinación de esta actividad enzimática en las muestras se utilizó el *kit* de medición de la actividad AChE de *Boehringer Mannheim* nº 124 117 (edición de 1992), basado en el método de Ellman *et al.* (1961), y utilizando acetiltiocolina como sustrato para la colinesterasa.

El fundamento de este método es el siguiente: la enzima acetilcolinesterasa presente en la muestra produce una hidrólisis del sustrato acetiltiocolina, liberándose tiocolina que al reaccionar con el cromógeno DTNB (ácido 5,5' ditiobis 2-nitrobenzoico), produce un compuesto de color amarillo que puede medirse a una longitud de onda de 412 nm.



Para llevar a cabo la determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE), se procedió, con cada muestra, de la siguiente forma. Tomándose una cubeta del foto colorímetro, se introdujeron 3 mL de tampón fosfato (0.1 M; pH 7.5), a los que se añadieron 100 μL de DTNB. Posteriormente se inoculó la cubeta con una alícuota de 10 μL de la muestra previamente homogeneizada en hielo picado, añadiéndose finalmente 20 μL de acetiltiocolina. Se mezcló bien la solución resultante en la propia cubeta, procediéndose inmediatamente después a la lectura en el espectrofotómetro (Hitachi U-1100) a 412 nm de longitud de onda, anotándose la extinción de la actividad enzimática a intervalos de 30 segundos durante 1.5 minutos. Las variaciones en la absorbancia fueron evaluadas frente a un blanco con agua destilada para corregir la extinción por hidrólisis espontánea de sustrato.

Finalmente, se efectuaron los cálculos con los datos obtenidos de las mediciones, expresándose la actividad de la enzima AChE en nmoles de acetiltiocolina hidrolizada por minuto y por individuo, así como en nmoles de sustrato hidrolizado por minuto y por μg proteína, para cada una de las generaciones ensayadas (F_0 , F_1 -1^a camada y F_1 -3^a camada).

4.9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) que permitió detectar si existían ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) o no diferencias significativas entre los parámetros de supervivencia, reproducción, crecimiento, tasa intrínseca de incremento natural, peso seco, actividad AChE y contenido de proteínas totales, obtenidos para el grupo control en relación con los distintos grupos tratados. Posteriormente, se procedió a efectuar el test de Duncan, de manera que se determinó entre qué grupos se encontraban las diferencias significativas

($p < 0.05$) detectadas con el análisis de la varianza. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS+.

Dado que el objetivo principal de este estudio fue evaluar los resultados derivados del análisis multigeneracional de la toxicidad de los compuestos ensayados, el análisis estadístico se hizo para cada una de las tres generaciones ensayadas (F_0 o generación parental, y F_1 1ª y 3ª camadas de descendientes) así como para cada uno de los compuestos cuya toxicidad se quería evaluar, a saber, el herbicida carbamato molinato y el insecticida organofosforado diazinón.

5. RESULTADOS

5.1. Estudio de la toxicidad aguda del insecticida diazinón y el herbicida molinato en *D. magna*.

Los resultados obtenidos en relación con la CE_{50} de diazinón en *Daphnia magna*, fueron de 0.86 y 0.16 mg/L a las 24 y 48 horas de exposición al insecticida respectivamente, según el estudio efectuado por Fernández *et al.* (1995).

En el presente estudio, se procedió a calcular la CE_{50} para *D. magna* a las 24 y 48 horas de exposición de los dáfidos al herbicida molinato, con el fin de establecer posteriormente las concentraciones subletales a emplear en los análisis crónicos de toxicidad y en los ensayos para estudiar el efecto del herbicida sobre la actividad AChE de los organismos expuestos. En la tabla 2, se muestran los porcentajes de inmovilidad observados en *D. magna* para cada una de las concentraciones de molinato ensayadas, así como los valores obtenidos para la CE_{50} a las 24 y 48 horas de exposición al herbicida.

TABLA 2. Porcentajes de inmovilidad y valores obtenidos para la CE_{50} en *D. magna* a las 24 y 48 horas de exposición a molinato.

24 horas		48 horas	
Concentración (ppm)	% inmovilidad	Concentración (ppm)	% inmovilidad
5	0	5	10
10	0	10	30
15	0	15	55
20	4	20	90
25	10	25	90
30	28.6	30	100
40	71.4		
50	68.2		
CE_{50}: 37.7 ± 0.07		CE_{50}: 12.46 ± 0.92	

Con los datos obtenidos se procedió a la elaboración de gráficas, en las que se representaron los porcentajes de inmovilidad en relación con las concentraciones de molinato ensayadas (figura 10). Las concentraciones ensayadas fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 ppm para determinar la CE₅₀ a las 24 horas, y 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppm para establecer el valor de la CE₅₀ a las 48 horas.

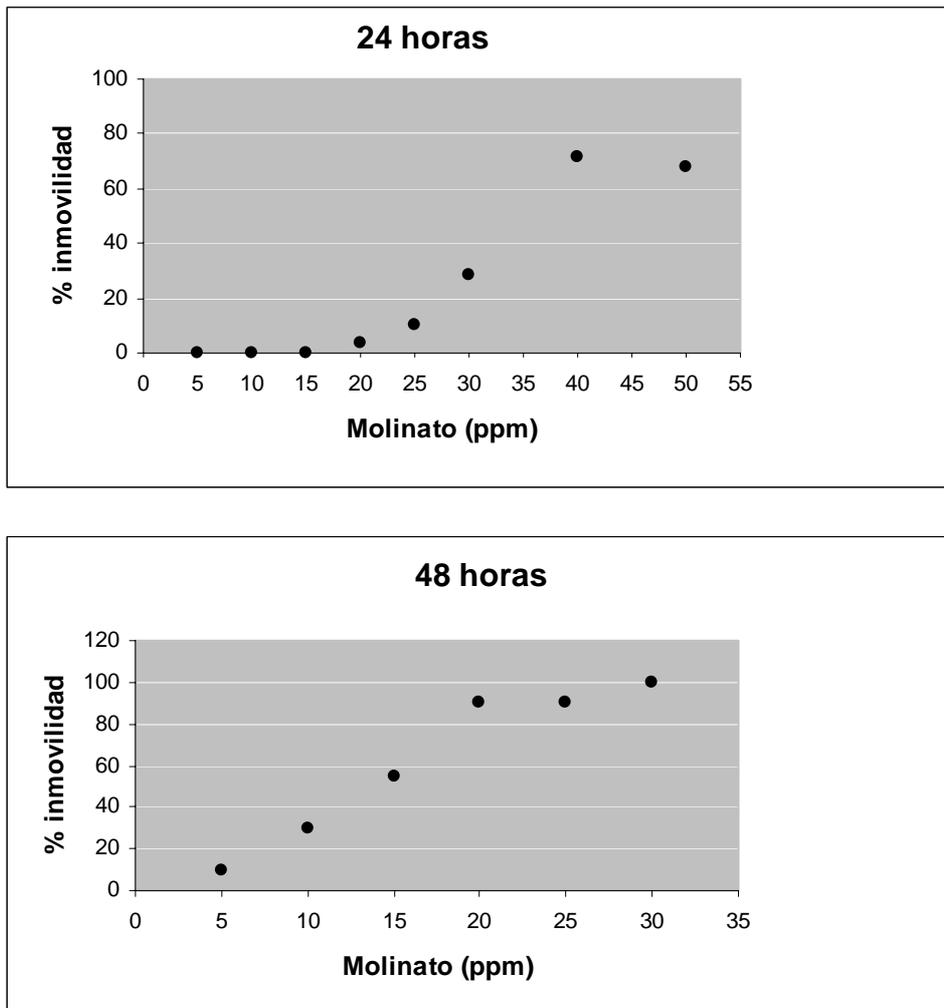


FIGURA 10. Porcentajes de inmovilidad de *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de molinato durante 24 y 48 horas de exposición al plaguicida.

Los datos obtenidos, revelan una mayor toxicidad del herbicida molinato para *D. magna* tras una exposición de 48 horas, obteniéndose una CE₅₀ de 12.46 ppm, mientras que para una exposición de 24 horas la CE₅₀ fue notablemente mayor (37.7 ppm de

molinato). Por lo tanto, el herbicida molinato provocó una mayor “mortalidad” (inmovilidad) de los dáfidos al aumentar el tiempo de exposición.

5.2. Ensayo crónico multigeneracional de la toxicidad del diazinón y el molinato en *D. magna*.

5.2.1. Fase de exposición al insecticida diazinón.

Habiendo sido escogidas las concentraciones subletales de diazinón (0.05, 0.1, 0.5, 0.75 y 1.0 ng/L) tal y como se apuntó en el apartado de material y métodos, se tomaron datos durante los 21 días de duración del ensayo crónico, en relación con la supervivencia y reproducción de los dáfidos expuestos a los distintos tratamientos. Asimismo, se realizaron medidas de la longitud corporal (asimilada con la del caparazón) de los individuos que alcanzaron el último día de cada ensayo. Con estos datos, se elaboraron las tablas de resultados correspondientes a cada una de las generaciones objeto de estudio (parental: F₀, primera y tercera camada de descendientes: F₁-1^a y 3^a) expuestas al organofosforado (tablas 3, 6 y 9).

Los animales de la generación parental (F₀) expuestos a 0.75 y 1.0 ng/L de diazinón murieron antes de tener una tercera camada de descendientes con los que llevar a cabo los ensayos. Además, las hembras de la generación F₀ expuestas a 1.0 ng/L de diazinón tampoco proporcionaron descendientes con los que desarrollar los ensayos correspondientes a la primera generación filial (generación F₁-1^a camada).

5.2.1.1 Generación parental (F₀).

5.2.1.1.1. Supervivencia.

En la tabla 3, aparecen los valores medios correspondientes a la longevidad (días) (LV) de los dáfidos de la generación F₀ expuestos a las diferentes concentraciones de diazinón. A la vista de los resultados obtenidos en relación con la supervivencia de los individuos expuestos, se observó una reducción del valor de dicho parámetro en consonancia con la creciente concentración de diazinón a la que se vieron expuestos. Se obtuvieron valores decrecientes para este parámetro, desde 21 días (control) a 7.14 días (1.0 ng/L).

Se observó una relación directa entre el descenso en el porcentaje de supervivientes y la concentración creciente de diazinón a la que fueron sometidos los dáfidos. Únicamente las hembras expuestas a 0.1 ng/L del insecticida mostraron valores para este parámetro que no se correspondían con el patrón general observado, presentando al finalizar el ensayo un porcentaje de supervivientes menor (0% supervivencia) que los individuos expuestos a la concentración de plaguicida inmediatamente superior (0.5 ng/L: 13.3% supervivencia). No obstante, el dato de la supervivencia de las hembras expuestas a 0.5 ng/L de diazinón corresponde tan sólo a dos individuos (sólo dos hembras alcanzaron el último día del ensayo).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los animales control y los tratados, tal y como se muestra en la tabla 1 del anexo.

El posterior test de Duncan detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores de la longevidad presentados por los animales expuestos a las cinco concentraciones de diazinón (figura 1 del anexo) en relación con los dáfidos control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.1.1.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores correspondientes a este parámetro (NH), aparecen en la tabla 3. Se observó una disminución del número medio de neonatos por hembra, que empezó con una diferencia entre 104.4 y 131.7 neonatos por hembra al comparar el valor de los individuos expuestos a la concentración más baja de diazinón (0.05 ng/L) con el valor del parámetro en el grupo control, haciéndose más acusada con la concentración de 0.75 ng/L (7.0 neonatos por hembra). Los animales expuestos a la concentración de insecticida más elevada (1.0 ng/L) no se reprodujeron.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los individuos control y los tratados, tal y como se detalla en la tabla 1 del anexo.

TABLA 3. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la generación parental (F₀) de *D. magna* expuestos a diazinón durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	N° Neonatos hembra	Tamaño de la camada	N° de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	131.7±15.1	25.9±2.5	5.1±0.1	7.8±0.1	0.49±0.01	0.32±0.01
c+a	18.7±2.1	136.8±21.0	30.2±1.7	4.4±0.5	8.2±0.3	0.51±0.01 *	0.32±0.02
0.05 ng/L	16.8±3.6 *	104.4±22.5 *	22.3±2.0	4.6±0.8	8.2±0.2	0.47±0.008 *	0.30±0.02
0.1 ng/L	15.6±0.6 *	66.6±14.2 *	19.3±3.0 *	3.4±0.2 *	8.0±0.5	—	0.32±0.01
0.5 ng/L	13.3±2.4 *	50.5±14.1 *	15.2±3.9 *	2.4±0.4 *	8.8±0.7 *	0.45±0.02 *	0.29±0.01
0.75 ng/L	8.9±2.5 *	7.0±2.3 *	5.8±3.0 *	0.8±0.1 *	8.2±0.2	—	0.23±0.02*
1.0 ng/L	7.1±0.7 *	0 *	0 *	0 *	—	—	0*

• p < 0.05 (c+a)

* p < 0.05

El test de Duncan ($p < 0.05$) apuntó que las diferencias significativas, detectadas con el análisis de la varianza, se situaban entre los grupos expuestos a las cinco concentraciones de diazinón ensayadas (figura 2 del anexo) y el valor control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA.

Los valores correspondientes a este parámetro (CDA) se detallan en la tabla 3. Se observó una disminución del tamaño medio de la camada en las hembras expuestas a diazinón, en relación a los animales control (25.86 neonatos por camada), siendo más acusado este efecto en los individuos expuestos a las concentraciones más altas de diazinón con valores entre 5.8 y 0 neonatos por camada (0.75 y 1.0 ng/L, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos, como se puede observar en la tabla 1 del anexo.

El test de Duncan ($p < 0.05$) permitió afirmar que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza correspondían a las existentes entre el valor presentado por los individuos expuestos a las cuatro concentraciones de tóxico más altas (figura 3 del anexo) y el valor control. Pese a observar que el valor del control con acetona es ligeramente superior al del grupo mantenido en condiciones control, sin disolvente, no se detectaron diferencias significativas entre ambos valores.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA.

Los datos correspondientes a este parámetro (NCDA) se han recogido en la tabla 3. Se observó una reducción en el número medio de camadas de cada dafnia expuesta al plaguicida, en relación con el valor control (5.1 camadas por hembra). Esta reducción fue mayor conforme aumentó la concentración de diazinón a la que fueron expuestos los dáfidos, llegando a 0 camadas por hembra en la población expuesta a 1.0 ng/L.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 1 del anexo.

Las diferencias detectadas con el análisis de la varianza fueron atribuidas ($p < 0.05$) a los grupos expuestos a 0.1, 0.5, 0.75 y 1.0 ng/L, en relación con los valores aportados por el grupo control, tal y como se aprecia en la figura 4 del anexo correspondiente al test de Duncan. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA.

En la tabla 3 se recogieron los valores correspondientes a este parámetro (TIPTA) para los diferentes grupos de dáfidos ensayados. No se observó una tendencia clara en el valor de este parámetro en relación con las concentraciones de plaguicida a las que fueron expuestos los dáfidos. Únicamente apareció un ligero aumento de los valores.

No se obtuvieron datos correspondientes al grupo de animales expuestos a 1.0 ng/L porque, tal y como ya se indicó, no sobrevivieron el tiempo suficiente como para liberar la primera camada de descendientes.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 1 del anexo.

Posteriormente se sometieron los resultados al test de Duncan ($p < 0.05$), observándose que estas diferencias se encontraban entre el valor obtenido en los animales expuestos a 0.5 ng/L (figura 5 del anexo) y el valor control, con valores de 8.8 y 7.8 días, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.1.1.3. Longitud corporal.

Las medidas de la longitud (L) de los animales que alcanzaron el último día del ensayo (día nº 21), se apuntan en la tabla 3. Se observó una tendencia a disminuir la longitud corporal de los dáfidos expuestos a diazinón, en relación a los animales

sometidos a condiciones control. Se obtuvieron longitudes desde 0.49 y 0.51 cm (control y control con acetona, respectivamente), hasta 0.45 cm (0.5 ng/L).

No se obtuvieron los datos correspondientes a los individuos expuestos a 0.1, 0.75 y 1.0 ng/L porque no alcanzaron el último día del ensayo crónico, de manera que no se pudieron efectuar las mediciones corporales correspondientes.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los datos estadísticos referentes a este análisis, aparecen en la tabla 1 del anexo.

Tras el procesado de los resultados con el test de Duncan, las diferencias significativas detectadas fueron atribuidas ($p < 0.05$) a los grupos expuestos a 0.05 y 0.5 ng/L en relación al grupo control (figura 6 del anexo). Además, se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el grupo control, observándose que los dáfidos expuestos al disolvente alcanzaron un tamaño final ligeramente superior (0.51 cm) al de los individuos control (0.49 cm).

5.2.1.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

Se observó una reducción del valor para este parámetro, en los animales expuestos a los tratamientos con 0.75 y 1.0 ng/L de diazinón respecto al valor control (figura 11), adoptando valores numéricos entre 0.32 (control) y 0 días⁻¹ (1 ng/L). Por otro lado, los dáfidos expuestos a 0.05, 0.1 y 0.5 ng/L de diazinón presentaron valores de r próximos al valor control.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) según se aprecia en la tabla 1 del anexo.

Tras analizar estos resultados con el test de Duncan (figura 7 del anexo), se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores de r de los grupos expuestos a 0.75 y 1.0 ng/L. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

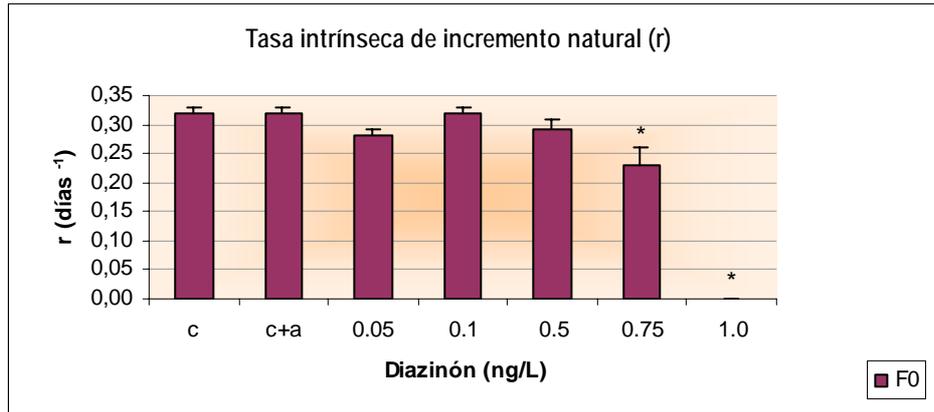


FIGURA 11. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfnidos de la generación parental (F_0) durante la fase de exposición a diazinón. (*) $p < 0.05$.

5.2.1.1.5. Cálculo de la MATC.

Basándonos en los valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural, se estimó el valor de la concentración máxima aceptable (MATC) como la media geométrica de la mayor concentración de diazinón que no produjo efectos significativos en este parámetro (NOEC), y la menor concentración de tóxico que produjo efectos significativos en el mismo parámetro (LOEC). De esta manera se obtuvieron unos valores de 0.5 y 0.75 para la NOEC y la LOEC, respectivamente, determinándose una MATC de 0.62 ng/L para la generación parental (F_0).

Esto nos indicaría que la concentración máxima aceptable de diazinón en el medio ambiente con la que no se detectarían efectos significativos sobre el parámetro poblacional considerado en este estudio sería de 0.62 ng/L para esta generación de *D. magna*.

5.2.1.1.6. Cálculo de la CE_{50} .

A partir de los resultados obtenidos en *D. magna* (generación F_0) tras exposición a diazinón, que aparecen reflejados en la tabla 3, se calculó la posible existencia de una correlación lineal entre el efecto del diazinón sobre los diferentes parámetros estudiados y la concentración de insecticida ensayada.

En la tabla 4 se expresan las ecuaciones de regresión calculadas para cada uno de los parámetros. Puesto que no se dispone de los datos correspondientes a la longitud del caparazón de los individuos expuestos a 0.1, 0.75 y 1.0 ng/L de diazinón, no se considera conveniente el cálculo de la recta de regresión relativa a este parámetro.

El cálculo de los índices de correlación y de las CE₅₀ para el parámetro “tiempo a la primera puesta” no se contempló para los dáfidos de esta generación expuesta a diazinón (F₀) porque no se observó una tendencia clara de los valores de este parámetro en relación con la creciente concentración de insecticida ensayada.

TABLA 4. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y los valores de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F₀.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
LV	$y = 18.52 - 11.85 x$	0.95
NH	$y = 107 - 117.6 x$	0.93
CDA	$y = 24.18 - 23.59 x$	0.98
NCDA	$y = 4.63 - 4.79 x$	0.98
r	$y = 0.34 - 0.25 x$	0.85

De entre los índices de correlación calculados, se observó que todos ellos mostraban una buena correlación entre los valores obtenidos para cada parámetro y las concentraciones de diazinón ensayadas, siendo $r^2 > 0.90$ para todos, a excepción de la tasa intrínseca de incremento natural. La razón de esta diferencia entre el parámetro poblacional (r) y los individuales puede ser debida a que, al ser el primero un compendio de parámetros reproductivos y de supervivencia, se encuentren algunos

valores con una mayor dispersión en relación con su correspondiente media que los de otros parámetros, lo cual se ve reflejado en una menor correlación de r con las concentraciones de tóxico ensayadas, frente a los otros parámetros monitorizados.

A partir de las ecuaciones de la tabla 4, se calcularon las CE_{50} que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (tabla 5), respecto de los valores control.

TABLA 5. CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F_0 .

Parámetro	CE_{50}
LV	0.67 ng/L
NH	0.35 ng/L
CDA	0.47 ng/L
NCDA	0.43 ng/L
r	0.72 ng/L

Habiendo calculado la CE_{50} , observamos que el parámetro que requiere una menor concentración de diazinón (0.35 ng/L) para reducir en un 50 % su valor, es el número total de neonatos por hembra necesiéndose, por otro lado, más del doble de diazinón (0.72 ng/L) para reducir a la mitad la tasa intrínseca de incremento natural (r) debido a la influencia que ejerce la supervivencia sobre este parámetro. De este modo, para una concentración dada de diazinón en el medio, el número total de neonatos por hembra de *D. magna* es el parámetro más sensible como indicador de contaminación por este plaguicida, seguido de los otros dos parámetros reproductivos (número medio de camadas por hembra y tamaño medio de la camada).

5.2.1.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

5.2.1.2.1. Supervivencia.

En la tabla 6, aparecen los valores medios correspondientes a la longevidad (LV) de los individuos de la generación F₁ (1^a camada) expuestos a las diferentes concentraciones de diazinón. A la vista de los resultados obtenidos en relación con la supervivencia de los dáfidos expuestos, se observó una reducción del valor de dicho parámetro en sentido creciente en consonancia con el aumento de la concentración de plaguicida a la que fueron sometidos los animales. Se obtuvieron valores comprendidos entre 21 (control) y 2.5 días (0.75 ng/L) de longevidad en la población objeto de estudio.

Se constató que, salvo para la concentración de 0.75 ng/L, grupo de individuos que no alcanzaron el séptimo día del ensayo, en los demás casos el porcentaje de supervivencia de los grupos tratados respecto del grupo control decreció a partir del séptimo día de exposición al organofosforado. Al finalizar el ensayo se registraron supervivencias entre el 100 y el 11.9 %, para el grupo control y para el grupo expuesto a 0.75 ng/L de diazinón. Para las concentraciones de 0.75 y 1 ng/L los parentales no sobrevivieron el tiempo suficiente como para proporcionar descendientes con los que efectuar el ensayo.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se muestra en la tabla 2 del anexo.

El test de Duncan detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores de longevidad de los animales expuestos a todas las concentraciones de diazinón en relación con el valor presentado por los dáfidos control (figura 8 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TABLA 6. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F_1 -1ª camada) de *D. magna* expuestos a diazinón durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	134.4±8.4	26.9±1.7	5.0±0	8.4±0.4	0.48±0.004	0.31±0.05
c+a	20.1±1.7	161.9±27.2	32.4±5.4	4.7±0.7	7.6±0.2 *	0.49±0.006	0.33±0.01
0.05 ng/L	17.8±1.8 *	85.9±33.8 *	20.7±4.8	3.9±0.6 *	8.5±0.3	0.46±0.01 *	0.31±0.006
0.1 ng/L	13.5±1.7 *	33.4±12.5 *	10.3±4.7 *	2.2±0.6 *	8.7±0.4	0.41±0.01 *	0.24±0.06
0.5 ng/L	10.7±2.4 *	28.5±19.4 *	10.2±7.2 *	1.6±0.8 *	8.1±0.8	—	0.23±0.13
0.75 ng/L	2.5±0.8 *	0 *	0 *	0 *	—	—	0*
1.0 ng/L	—	—	—	—	—	—	—

• $p < 0.05$ (c+a)

* $p < 0.05$

5.2.1.2.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro (NH), aparecen en la tabla 6. Se observó una notable reducción del valor de este parámetro en los dáfidos expuestos al plaguicida en relación a los individuos control, siendo más evidente para los animales expuestos a las concentraciones más altas de diazinón (0.1, 0.5 y 0.75 ng/L).

El parámetro “número total de neonatos por hembra” registró valores entre 134.4 neonatos por hembra (control) y 0 neonatos por hembra (0.75 ng/L). Las hembras expuestas a 0.75 ng/L no se reprodujeron, con lo que no se tienen datos de los parámetros relacionados con la reproducción de estos individuos.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 2 del anexo.

El test de Duncan ($p < 0.05$) apuntó que estas diferencias se encontraban entre el valor presentado por las hembras expuestas a todos los tratamientos con diazinón y el valor control (figura 9 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA.

Los valores correspondientes a este parámetro (CDA), se detallan en la tabla 6. Se observó una disminución del tamaño medio de la camada en las hembras expuestas a diazinón, en relación a los animales control, siendo más acusado este efecto en los individuos expuestos a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 0.75 ng/L. El tamaño de la camada osciló entre 26.9 y 0 neonatos por hembra (control y 0.75 ng/L, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 2 del anexo.

El test de Duncan permitió afirmar ($p < 0.05$) que las diferencias se correspondían a las existentes entre los valores de los grupos expuestos a 0.1, 0.5 y 0.75 ng/L del

organofosforado (figura 10 del anexo) y los individuos control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA.

En la tabla 6, aparecen los valores correspondientes a este parámetro para la generación F₁-1^a camada, expuesta a los distintos tratamientos. Se observó una reducción importante en el número medio de camadas por hembra en relación con el valor control en consonancia con la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestas. Se obtuvieron valores para este parámetro desde 5 a 0 camadas por hembra (control y 0.75 ng/L, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 2 del anexo.

Las diferencias significativas detectadas con este análisis fueron atribuidas ($p < 0.05$) a los valores determinados en los animales expuestos a todas las concentraciones del insecticida y el valor control (test de Duncan, figura 11 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA.

No se obtuvieron datos correspondientes al grupo de dáfidos expuestos a 0.75 ng/L porque, como se dijo con anterioridad, no sobrevivieron lo suficiente como para llegar a reproducirse.

En la tabla 6 se recogen los valores correspondientes a este parámetro (T1PTA) para los diferentes grupos de dáfidos ensayados.

No se observó una tendencia clara para este parámetro que se pueda relacionar con la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestos los dáfidos.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) permitió que se detectaran diferencias significativas ($p < 0.05$) (tabla 2 del anexo).

Los resultados analizados posteriormente con el test de Duncan ($p < 0.05$) (figura 12 del anexo), revelaron que las diferencias significativas detectadas con el ANOVA se

debían a las encontradas entre el valor del control con acetona y el del control (7.6 y 8.4 días, respectivamente), no existiendo diferencias significativas entre los animales expuestos a diazinón y los individuos control.

Estos resultados indicaron que los animales expuestos a una pequeña cantidad de disolvente (acetona) en su medio, pero sin tóxico, no resultaron perjudicados en relación al TIPTA, sino que el disolvente les indujo a la “puesta” con casi un día de antelación respecto a los animales control (blanco). Se ha visto que, en general, los valores de todos los parámetros reproductores anteriormente citados reflejan una mayor capacidad reproductiva de los animales expuestos a acetona en relación con los organismos control (blanco), aunque las diferencias para los demás parámetros no eran estadísticamente significativas.

5.2.1.2.3. Longitud corporal.

Las medidas de la longitud (L) de los animales que alcanzaron el último día del ensayo (día nº 21) aparecen reflejadas en la tabla 6. Se observó una reducción en el valor de este parámetro, desde 0.48 (control) a 0.41 cm (0.1 ng/L). No se obtuvieron datos correspondientes a los dáfidos expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L porque no alcanzaron el último día del ensayo crónico, y no se pudieron efectuar las medidas corporales correspondientes.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los datos estadísticos referentes a este análisis aparecen en la tabla 2 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan a los datos, las diferencias significativas detectadas fueron atribuidas ($p < 0.05$) a los grupos de dáfidos expuestos a 0.05 y 0.1 ng/L en relación al grupo control (figura 13 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.1.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

En la figura 12 y en la tabla 6 aparecen representados los valores de r para la población control y la expuesta a los diferentes tratamientos con diazinón. Únicamente se observó una reducción significativa de r para el grupo de dáfidos expuestos a 0.75 ng/L del insecticida, en relación con el valor control. La tasa intrínseca de incremento natural alcanza valores desde 0.31 y 0.33 días⁻¹ (control blanco y control con acetona, respectivamente) hasta 0 días⁻¹ (0.75 ng/L). Los dáfidos expuestos a 0.05 ng/L de diazinón presentaron una r igual al valor presentado por las hembras control. Los dáfidos expuestos a 0.1 y 0.5 ng/L de diazinón, mostraron valores de r inferiores al valor control, no obteniéndose diferencias significativas para estos grupos debido a la gran dispersión de los datos.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) según se aprecia en la tabla 2 del anexo.

Tras analizar estos resultados con el test de Duncan (figura 14 del anexo), se detectaron únicamente diferencias significativas ($p < 0.05$) en este parámetro en los animales expuestos a 0.75 ng/L con respecto al del control. No se detectaron, sin embargo, diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

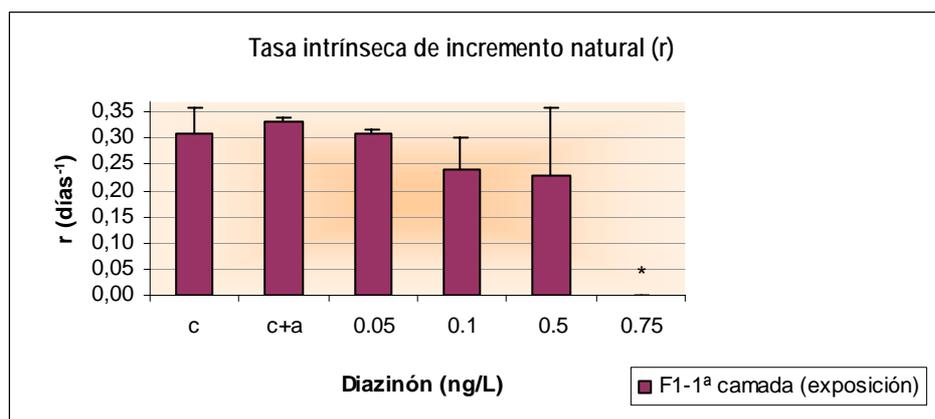


FIGURA 12. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfidos de la generación F_{1-1}^{a} camada durante la fase de exposición a diazinón. (*) $p < 0.05$.

5.2.1.2.5. Cálculo de la MATC.

Se estimó el valor de la concentración máxima aceptable de diazinón para la tasa intrínseca de incremento natural (r), de manera que resultó ser la media geométrica de los valores de la NOEC (concentración más alta de diazinón para la cual no se observó efecto) y la LOEC (concentración más baja de plaguicida para la cual se observó efecto sobre el parámetro estudiado), para este parámetro 0.5 y 0.75 ng/L, respectivamente. Para la generación F_1 -1ª camada, al igual que ocurrió para la generación parental (F_0), el valor estimado de la MATC fue de 0.62 ng/L.

5.2.1.2.6. Cálculo de la CE_{50} .

A partir de los resultados obtenidos para la generación F_1 -1ª camada de *D. magna* tras exposición a diazinón y que aparecen reflejados en la tabla 6, se calculó la posible existencia de una correlación lineal entre los valores de los diferentes parámetros estudiados y la concentración de insecticida ensayada.

En la tabla 7 aparecen las ecuaciones de regresión calculadas para cada uno de los parámetros. Puesto que no se dispone de los datos correspondientes a la longitud del caparazón de los individuos expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L de diazinón, no se consideró conveniente el cálculo de la recta de regresión relativa a este parámetro, al disponer únicamente de dos valores además del valor control.

A la vista de los coeficientes de regresión calculados y mostrados en la tabla 7, se observó, en general, una menor correlación entre los valores obtenidos y las concentraciones de diazinón ensayadas para la primera generación filial (F_1 -1ª camada) de dáfidos que para la generación parental (F_0) (tabla 4). En el transcurso del ensayo crónico se puso de manifiesto una menor sincronía entre las distintas hembras en relación tanto con el número total de neonatos por hembra, como con el momento de eclosionar estos neonatos. Este hecho, sin duda, ha favorecido la dispersión de los datos apareciendo coeficientes de correlación menores en los parámetros reproductivos, en relación a los correspondientes parámetros de los dáfidos de la generación parental (F_0).

A partir de las ecuaciones de la tabla 7, se calcularon las CE₅₀ que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (tabla 8), respecto de los valores control.

Al igual que sucedía para los dáfidos de la generación parental (tabla 5), los parámetros reproductivos se mostraron más afectados por la situación de estrés tóxico que generó la exposición a diazinón.

TABLA 7. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y valores de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F₁-1^a camada durante la fase de exposición a diazinón.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
LV	$y = 18.84 - 20.49 x$	0.95
NH	$y = 93.42 - 132.0 x$	0.81
CDA	$y = 21.31 - 27.48 x$	0.87
NCDA	$y = 4.05 - 5.41 x$	0.91
r	$y = 0.31 - 0.35 x$	0.90

Se observó, comparando las CE₅₀ calculadas para las generaciones F₁-1^a camada y F₀ (tablas 8 y 5, respectivamente), que se puede reducir a la mitad el valor de los parámetros monitorizados en F₁-1^a camada con menores concentraciones de diazinón en el medio; así pues, la primera generación filial parece más vulnerable al diazinón que la generación parental, lo cual podría explicarse si, efectivamente, existiera una transferencia de plaguicida de los parentales a los descendientes de manera que el efecto del insecticida presente en el medio sobre estos últimos se viera incrementado.

TABLA 8. CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F_1-1^a camada durante la fase de exposición a diazinón.

Parámetro	CE_{50}
LV	0.41 ng/L
NH	0.20 ng/L
CDA	0.29 ng/L
NCDA	0.29 ng/L
r	0.44 ng/L

5.2.1.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

5.2.1.3.1. Supervivencia.

En la tabla 9 aparecen los valores medios correspondientes a la longevidad (LV) de los individuos de la primera generación filial (F₁-3^a camada) expuestos a los distintos tratamientos con diazinón. Se observó que el valor de este parámetro fue decreciendo en consonancia con la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestos los organismos. Se obtuvieron valores medios para este parámetro desde 20.7 días (control) a 6.5 días (0.5 ng/L). La disminución de la supervivencia de los dáfidos fue proporcional a la creciente concentración de diazinón a la que éstos fueron expuestos. Los individuos expuestos a 0.5 ng/L de diazinón mostraron un claro descenso en la supervivencia (30.9% al finalizar el periodo de exposición: 21 días), incluso a partir del segundo día de exposición al insecticida.

No se obtuvieron datos de la supervivencia de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a 0.75 y 1 ng/L porque los parentales (F₀) correspondientes no sobrevivieron el tiempo suficiente para alcanzar la madurez reproductiva.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se muestra en la tabla 3 del anexo.

El test de Duncan detectó diferencias ($p < 0.05$) para los valores de la longevidad correspondientes a los animales expuestos a las concentraciones de diazinón de 0.1 y 0.5 ng/L, en relación al valor presentado por los dáfidos control (figura 15 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.1.3.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL MEDIO DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro (NH) se muestran en la tabla 9.

TABLA 9. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F₁-3^a camada) de *D. magna* expuestos a diazinón durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	20.7±0.5	114.7±4.8	23.2±0.5	4.9±0.1	8.1±0.1	0.48±0.007	0.31±0.004
c+a	19.7±2.5	157.3±18.6 *	31.4±3.7 *	4.7±0.7	7.6±0.5	0.49±0.008 *	0.33±0.02
0.05 ng/L	19.5±1.4	115.3±15.8	24.8±1.5	4.5±0.4	8.3±0.3	0.46±0.003 *	0.31±0.004
0.1 ng/L	16.1±2.1 *	31.6±18.0 *	9.8±4.2 *	2.1±0.9 *	11.2±3.2 *	0.40±0.005 *	0.20±0.07*
0.5 ng/L	6.5±3.1 *	10.2±6.8 *	4.5±2.5 *	0.9±0.6 *	8.2±0.4	—	0.15±0.10*
0.75 ng/L	—	—	—	—	—	—	—
1.0 ng/L	—	—	—	—	—	—	—

• p < 0.05 (c+a)

* p < 0.05

Se observó una reducción del valor de este parámetro relacionada directamente con la creciente concentración de diazinón a la que se vieron expuestos los dáfidos, obteniéndose valores medios desde 114.7 (control) a 10.2 neonatos por hembra (0.5 ng/L).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se puede apreciar en la tabla 3 del anexo.

El test de Duncan (figura 16 del anexo) apuntó que las diferencias ($p < 0.05$) detectadas con el análisis de la varianza, correspondían a las existentes entre el valor que presentaron para este parámetro las hembras expuestas a 0.1 y 0.5 ng/L, y el valor control. Asimismo, se detectaron diferencias significativas con el control con acetona que registró un valor significativamente mayor que el control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA.

El valor medio de este parámetro (CDA), correspondiente a cada uno de los tratamientos a los que fueron sometidos los dáfidos, aparecen en la tabla 9. Se observó una reducción del tamaño medio de la camada que resultó ser más acusada en las hembras expuestas a las concentraciones mayores de plaguicida (0.1 y 0.5 ng/L). Se obtuvieron valores medios desde 23.2 a 4.5 neonatos por camada (0.5 ng/L), lo que supuso una reducción de este parámetro del 80%.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se presenta en la tabla 3 del anexo.

El test de Duncan (figura 17 del anexo) permitió afirmar que las diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre los individuos expuestos a 0.1 y 0.5 ng/L y el grupo control. Se detectaron, del mismo modo, diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco presentando el primer grupo un valor significativamente mayor en relación con el presentado por las hembras mantenidas bajo condiciones control.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA.

En la tabla 9 aparecen los valores medios correspondientes a este parámetro (NCDA) para la generación F₁-3^a camada expuesta a los distintos tratamientos con diazinón. Se observó una reducción del valor medio del número de camadas por hembra siendo más notable esta reducción en aquellos grupos de hembras expuestas al insecticida en concentraciones superiores a 0.05 ng/L y el valor medio control. Se obtuvieron valores desde 4.9 (control) a 0.9 camadas por hembra (0.5 ng/L).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (ver tabla 3 del anexo).

Al procesar los resultados con el test de Duncan (figura 18 del anexo) se pudo afirmar ($p < 0.05$) que las diferencias las presentaban los grupos expuestos al insecticida en concentraciones de 0.1 y 0.5 ng/L al comparar el valor de NCDA con el valor obtenido para el grupo control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA.

Los valores medios presentados por los distintos grupos para este parámetro (TIPTA), aparecen en la tabla 9. No se observó una tendencia clara en relación con la creciente concentración de diazinón a la que expusimos a los dáfidos. En los animales expuestos a diazinón se observó un ligero aumento del tiempo a la primera puesta, que únicamente en el caso de 0.1 ng/L (11.2 días) fue significativamente mayor.

Así pues, el análisis estadístico de los resultados (ANOVA) manifestó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$), como se detalla en la tabla 3 del anexo.

Al tratar los resultados con el test de Duncan (figura 19 del anexo) se observó ($p < 0.05$) la existencia de diferencias significativas sólo en el grupo expuesto a 0.1 ng/L de diazinón al comparar su valor para TIPTA (11.2 días) con el del grupo control (8.1 días). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.1.3.3. Longitud corporal.

Este parámetro (L) se vió reducido en los grupos de dáfidos expuestos a las concentraciones de insecticida ensayadas (tabla 9). Se encontró una disminución del valor medio de este parámetro desde 0.48 y 0.49 (control y control con acetona, respectivamente) a 0.40 cm (0.1 ng/L). No se tuvo dato para el grupo expuesto a 0.5 ng/L, puesto que los animales no alcanzaron el final del ensayo (día n° 21) y no pudieron ser medidos.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) como se detalla en la tabla 3 del anexo.

Tras el procesado estadístico de los resultados con el test de Duncan (figura 20 del anexo), se matizó que las diferencias significativas detectadas con el ANOVA se presentaban ($p < 0.05$) entre los grupos expuestos a 0.05 y 0.1 ng/L y el valor control. Además se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco, en el sentido de que aquellos dáfidos expuestos al disolvente tuvieron una longitud corporal ligeramente superior.

5.2.1.3.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

Se observó un efecto similar al registrado para los dáfidos de la primera camada de descendientes (F_1-1^a), detectándose una mayor diferencia entre el valor registrado para las hembras expuestas a 0.1 ng/L de diazinón y el valor presentado por las expuestas a la siguiente concentración de insecticida en el caso de la generación F_1-3^a camada (figura 13) que en el caso de la generación F_1-1^a camada (figura 12). La reducción del valor de este parámetro poblacional tuvo lugar en consonancia con la concentración de plaguicida a la que fueron expuestos los dáfidos, obteniéndose valores desde 0.31 (control) a 0.15 días⁻¹ (0.5 ng/L).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) según se aprecia en la tabla 3 del anexo.

Tras analizar estos resultados con el test de Duncan (figura 21 del anexo), se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores de r de los grupos

expuestos a 0.1 y 0.5 ng/L, con respecto al control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

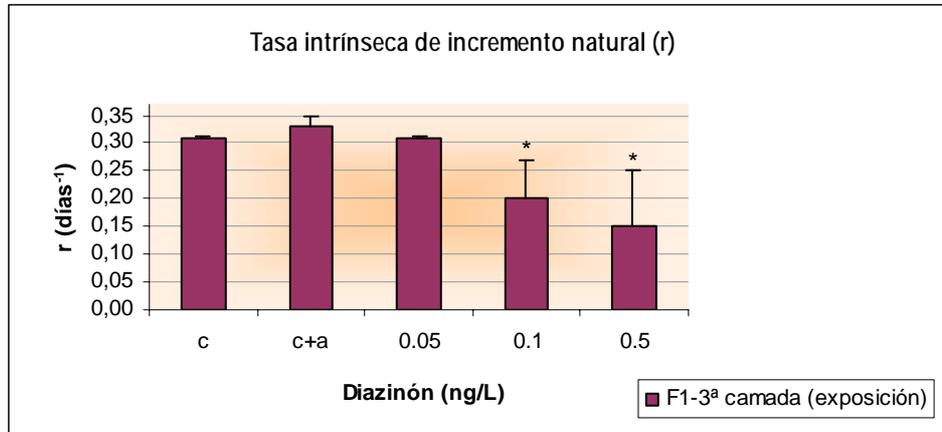


FIGURA 13. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfidos de la generación F₁-3^a camada durante la fase de exposición a diazinón. (*) p<0.05

5.2.1.3.5. Cálculo de la MATC.

Se calculó la concentración máxima aceptable de diazinón (MATC) para la primera generación filial (3^a camada) de *D. magna* expuesta a diazinón, en base a los valores obtenidos para la NOEC (concentración máxima de tóxico para la que no se observó efecto) y la LOEC (concentración de tóxico más baja para la que se observó efecto sobre el parámetro escogido) para la tasa intrínseca de incremento natural (r) (0.05 y 0.1 ng/L, respectivamente). Se obtuvo, de esta manera, un valor estimado de 0.075 ng/L para la MATC con esta tercera camada de descendientes. Este valor resultó ser menor que el obtenido para la MATC para el mismo parámetro para las generaciones parental y primera camada, con un valor de 0.62 ng/L para ambas, lo cual indicaría una mayor sensibilidad al diazinón por parte de esta tercera camada de descendientes en relación con el parámetro poblacional evaluado.

5.2.1.3.6. Cálculo de la CE₅₀.

A partir de los resultados obtenidos para la generación F₁-3^a camada de *D. magna* tras exposición a diazinón, que aparecen reflejados en la tabla 9, se calculó la posible existencia de una correlación lineal entre el valor de los diferentes parámetros estudiados y la concentración de insecticida ensayada.

En la tabla 10 aparecen las ecuaciones de regresión calculadas para cada uno de los parámetros. Puesto que no se dispone de los datos correspondientes a la longitud del caparazón de los individuos expuestos a 0.5 ng/L de diazinón, porque los animales expuestos a esta concentración de diazinón no alcanzaron el último día del ensayo y no fueron medidos, no se consideró conveniente el cálculo de la recta de regresión relativa a este parámetro.

TABLA 10. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y el valor de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F₁-3^a camada durante la fase de exposición a diazinón.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
LV	$y = 20.23 - 27.86 x$	0.99
NH	$y = 99.17 - 192.14 x$	0.80
CDA	$y = 21.43 - 36.04 x$	0.82
NCDA	$y = 4.27 - 7.20 x$	0.86
r	$y = 0.29 - 0.30 x$	0.85

A partir de las ecuaciones de la tabla 10, se calcularon las concentraciones de diazinón que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (CE₅₀) (tabla 11), respecto de los valores control.

La longevidad se mostró como un parámetro cuyos valores tuvieron una correlación prácticamente máxima ($r^2= 0.99$) con la creciente concentración de diazinón, mientras que el resto de coeficientes de correlación ponen de manifiesto la dispersión existente entre los distintos individuos afectados.

En la generación F₁-3^a camada, al igual que ocurrió con F₁-1^a camada y F₀, aparecen los parámetros relacionados con la reproducción como los más sensibles al plaguicida ensayado, con CE₅₀ entre 0.22 y 0.27 ng/L para el número total de neonatos por hembra y el tamaño medio de la camada, respectivamente.

TABLA 11. CE₅₀ (ng/L) de diazinón en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F₁-3^a camada durante la fase de exposición a diazinón.

Parámetro	CE ₅₀
LV	0.35 ng/L
NH	0.22 ng/L
CDA	0.27 ng/L
NCDA	0.25 ng/L
r	0.47 ng/L

5.2.2. Fase de recuperación de *D. magna* tras exposición a diazinón.

Durante los 21 días de duración del ensayo crónico, se tomaron datos diariamente en relación con la supervivencia y reproducción de los dáfidos correspondientes a la primera generación filial (F_1 -1^a y 3^a camadas) a los que se les permitió posteriormente una fase de recuperación en agua exenta de plaguicida tras haber eclosionado en un medio con diazinón. Del mismo modo que se efectuaron medidas corporales para los individuos expuestos directamente al diazinón, se hizo lo propio con los dáfidos de la fase de recuperación que alcanzaron el último día del ensayo crónico. Asimismo, se elaboraron tablas de resultados (tablas 12 y 13) siguiendo las mismas pautas que en la fase previa de exposición al insecticida.

De manera similar a como ocurrió en la fase de exposición, dado que los parentales pre-expuestos a 1.0 ng/L del insecticida murieron antes de alcanzar la madurez reproductiva, no se obtuvieron descendientes correspondientes a esta concentración de diazinón con los que llevar a cabo una fase de recuperación.

5.2.2.1. Generación filial (F_1 -1^a camada).

5.2.2.1.1. Supervivencia.

En la tabla 12 aparecen los valores medios correspondientes a la longevidad (LV) de los individuos de la generación F_1 -1^a camada, a los que se les permitió una fase de recuperación. A la vista de los resultados obtenidos en relación con este parámetro, se observó que únicamente los animales procedentes de parentales expuestos a 0.75 ng/L, tras el periodo de recuperación de 21 días en agua exenta de tóxico, no logran recuperarse totalmente de los efectos del diazinón transferido por los parentales, presentando un valor notablemente inferior al valor control. Se obtuvieron valores desde 21.0 (control) a 12.1 días (0.75 ng/L).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se muestra en la tabla 4 del anexo.

TABLA 12. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F_1 -1ª camada) de *D. magna* a los que se transfirió a medio exento de diazinón durante 21 días (fase de recuperación).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	134.4±8.4	26.9±1.7	5.0±0	8.4±0.4	0.48±0.004	0.31±0.01
0.05 ng/L	20.1±1.0	124.1±10.7	26.2±2.0	4.6±0.2	8.8±0.5	0.46±0.014 *	0.32±0.02
0.1 ng/L	21.0±0	109.5±8.2	21.9±1.6	5.0±0	8.9±0.1	0.44±0.006 *	0.29±0.02
0.5 ng/L	20.2±0.9	97.9±14.4 *	20.8±1.5 *	4.6±0.5	9.1±0.1	0.45±0.007 *	0.29±0.01
0.75 ng/L	12.1±4.3 *	47.6±28.5 *	10.1±5.8 *	2.2±1.3 *	8.6±0.2	0.44±0.01 *	0.21±0.01*
1.0 ng/L	–	–	–	–	–	–	–

* p < 0.05

Se observó que, salvo para los dáfidos descendientes de hembras pre-expuestas a 0.1 ng/L de diazinón cuyo porcentaje de supervivientes al finalizar el ensayo crónico fue máximo, para los descendientes pertenecientes a la generación F₁-1^a camada, cuyos parentales fueron pre-expuestos a las otras concentraciones de plaguicida, se registró un cierto porcentaje de mortalidad. Los descendientes cuyos progenitores fueron pre-expuestos a 0.05 y 0.5 ng/L de diazinón, presentaron un 20 y un 13.3 % de mortalidad respectivamente al finalizar el ensayo, concentrándose en los nueve últimos días del mismo en ambos casos. Sin embargo, los parentales pre-expuestos a la concentración de diazinón de 0.75 ng/L, tuvieron una primera generación filial que, pese a ser transferida a medio exento de insecticida, registró un porcentaje de mortalidad entre sus individuos al finalizar el ensayo más elevado (53.3 %), habiendo tenido lugar estas muertes durante los siete primeros días.

Tras analizar los resultados con el test de Duncan (figura 22 del anexo), únicamente se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el valor de la longevidad correspondiente a los individuos procedentes de parentales pre-expuestos a 0.75 ng/L, con respecto al valor control.

5.2.2.1.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO MEDIO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro (NH) en la generación F₁-1^a camada de *D. magna* aparecen en la tabla 12. Se observó todavía una reducción del valor de este parámetro en los grupos transferidos a medio exento de diazinón, respecto al valor medio del grupo control, pero esta reducción no fue tan notable como en la fase de exposición al plaguicida. Se obtuvieron valores entre 134.4 (control) y 47.6 (0.75 ng/L) neonatos por hembra. A diferencia de los resultados obtenidos en la fase de exposición, aquí los individuos procedentes de parentales pre-expuestos a 0.75 ng/L de diazinón sí se reprodujeron con lo que se dispuso de datos respecto a este parámetro, así como del resto de parámetros relacionados con la reproducción de los dáfidos descendientes de parentales pre-expuestos a esta concentración de diazinón.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 4 del anexo.

El test de Duncan ($p < 0.05$) apuntó que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza correspondían a las existentes entre el valor presentado por las hembras procedentes de dáfidos pre-expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L y las que fueron mantenidas en condiciones control (figura 23 del anexo).

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA.

Los valores obtenidos para este parámetro (CDA) en los dáfidos objeto de estudio se detallan en la tabla 12. Se observó una reducción del valor medio de este parámetro para las hembras transferidas a medio exento de diazinón en relación con el valor del grupo control, aunque esta reducción no fue tan acusada como en la fase de exposición al insecticida durante 21 días. Se obtuvieron valores entre 26.9 (control) y 10.1 (0.75 ng/L) neonatos por camada.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 4 del anexo.

El test de Duncan permitió afirmar ($p < 0.05$) que las diferencias se encontraban entre los grupos de dáfidos procedentes de parentales pre-expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L y el valor control (figura 24 del anexo).

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA.

A la vista de los datos recogidos en la tabla 12 para este parámetro (NCDA) en la 1ª camada de descendientes de *D. magna*, se apreció una ligera reducción del valor medio registrado en los grupos transferidos a medio exento de diazinón y procedentes de dáfidos pre-expuestos a las concentraciones de diazinón más altas, especialmente a 0.75 ng/L, en relación con el valor control. Esta reducción es notablemente menor que la determinada en la fase de exposición. Se obtuvieron valores entre 5.0 (control) y 2.2 (0.75 ng/L) camadas por hembra.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 4 del anexo.

Tras someter los resultados al test de Duncan, se encontró que las diferencias significativas se encontraban ($p < 0.05$) entre el valor correspondiente a las hembras procedentes de parentales pre-expuestos a 0.75 ng/L y el valor control (figura 25 del anexo).

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA.

Teniendo presentes los datos aportados para este parámetro (TIPTA) en la tabla 12, no se observó una tendencia clara del valor presentado por los dáfidos procedentes de parentales pre-expuestos al insecticida, en relación con los animales control, si bien es cierto que el valor que adopta este parámetro en los dáfidos transferidos a medio exento de diazinón, es mayor que el que presentan las hembras mantenidas en condiciones control. Esto indica que el insecticida provocaría un retraso en la llegada de la madurez sexual, en relación con el valor obtenido para este parámetro, para los individuos procedentes de parentales mantenidos en condiciones control, no siendo, sin embargo, este aumento estadísticamente significativo.

Por lo tanto, el análisis estadístico de los resultados (ANOVA), determinó que no existían diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos expuestos a los distintos tratamientos con diazinón y el valor control. Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 4 del anexo.

5.2.2.1.3. Longitud corporal.

En esta fase de recuperación, los dáfidos transferidos a medio exento de diazinón procedentes de parentales pre-expuestos a todas las concentraciones del insecticida alcanzaron el final del ensayo, momento en que se procedió a la medición de los mismos (tabla 12). A la vista de los resultados todavía se aprecia una ligera reducción de la longitud corporal (L) de los individuos “en recuperación” en relación con los que se mantuvieron en condiciones control. Esta reducción se relacionó directamente con la creciente concentración de plaguicida que había en el medio donde permanecieron los

parentales y los neonatos, previamente a la transferencia de estos últimos a medio exento de tóxico. Se obtuvieron valores entre 0.48 (control) y 0.44 (0.75 ng/L) cm.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los datos estadísticos referentes a este análisis de la varianza aparecen en la tabla 4 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan a los datos, las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza fueron atribuidas ($p < 0.05$) a los valores que tenía el parámetro en cuestión en los grupos procedentes de parentales pre-expuestos a todas las concentraciones de diazinón ensayadas en este estudio y el valor control (figura 26 del anexo).

5.2.2.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

A la vista de los resultados obtenidos (figura 14), se observó una reducción de la tasa intrínseca de incremento natural de los grupos cuyos parentales estuvieron previamente expuestos a diazinón. Para este parámetro se obtuvieron valores que oscilaron entre 0.31 (control) y 0.21 (0.75 ng/L) días⁻¹.

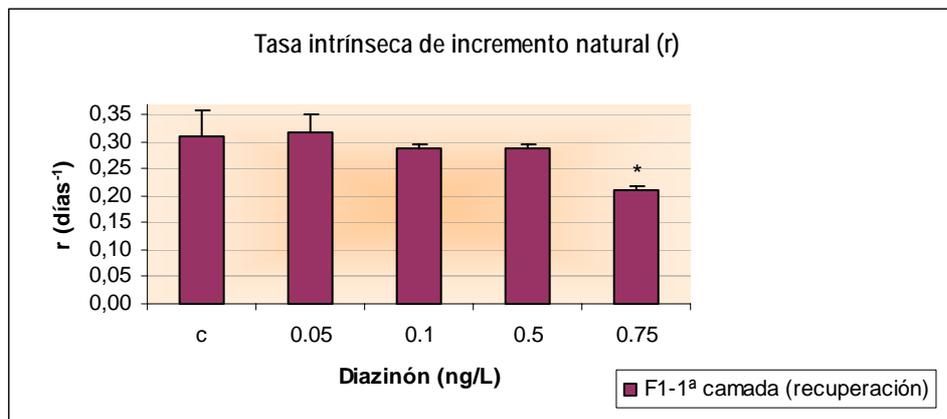


FIGURA 14. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfnidos de la generación F₁-1ª camada durante la fase de recuperación. (*) $p < 0.05$

5.2.2.2. Generación filial (F₁-3^a camada).

5.2.2.2.1. Supervivencia.

En la tabla 13 aparecen los valores medios correspondientes a la longevidad (LV) de los dáfidos procedentes de la generación F₁ (3^a camada), a los que se les transfirió a medio exento de diazinón (fase de recuperación a los efectos del plaguicida). Se observó que los animales procedentes de parentales previamente expuestos a diazinón mostraron una recuperación del valor de este parámetro, tras ser transferidos a medio exento de plaguicida y permanecer en él durante 21 días. Los valores obtenidos fueron muy parecidos al que se obtuvieron para el grupo control (20.7 días).

Hay que tener en cuenta que no se obtuvieron datos para los grupos procedentes de parentales pre-expuestos a 0.75 y 1.0 ng/L puesto que murieron antes de alcanzar la madurez reproductiva.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la no-existencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) tal y como se muestra en la tabla 5 del anexo.

5.2.2.2.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL MEDIO DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro (NH) aparecen en la tabla 13. No se observaron diferencias importantes entre los valores obtenidos en los animales procedentes de dáfidos pre-expuestos al insecticida y el valor control (114.7 neonatos por hembra). Se apreció una recuperación del valor medio de este parámetro en los dáfidos transferidos a medio exento de plaguicida, en relación con el grupo control, al contrastar los valores de la fase de exposición, con los determinados en la fase de recuperación. El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la no-existencia de diferencias significativas ($p > 0.001$) entre los valores presentados por los grupos cuyos parentales fueron pre-expuestos a los distintos tratamientos y el valor presentado por los organismos control. Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 5 del anexo.

TABLA 13. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F_1 -3^a camada) de *D. magna* a los que se transfirió a medio exento de diazinón durante 21 días (fase de recuperación).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	20.7±0.5	114.7±4.8	23.2±0.5	4.9±0.1	8.1±0.1	0.48±0.007	0.31±0.01
0.05 ng/L	19.6±1.9	125.3±10.9	25.7±3.1	4.3±0.6	8.7±0.4	0.46±0.01 *	0.31±0.01
0.1 ng/L	19.7±2.4	105.7±21.6	23.9±2.8	4.3±0.6	8.7±0.3	0.48±0.005	0.29±0.02
0.5 ng/L	21.0±0	119.9±11.1	24.9±1.8	4.8±0.3	8.6±0.7	0.48±0.01	0.29±0.01*
0.75 ng/L	–	–	–	–	–	–	–
1.0 ng/L	–	–	–	–	–	–	–

* $p < 0.05$

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA.

Los valores correspondientes a este parámetro (CDA) obtenidos en la 3ª camada de *D. magna*, se detallan en la tabla 13. No se observó una relación entre los valores obtenidos en los distintos grupos procedentes de parentales previamente tratados con respecto al grupo control (23.2 neonatos por camada).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.001$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 5 del anexo.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA.

Tras observar los datos aportados para este parámetro (NCDA) en la tabla 13, se apreció que los grupos procedentes de hembras pre-expuestas al organofosforado presentaron valores medios similares al valor control (4.9 camadas por hembra).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) tal y como se detalla en la tabla 5 del anexo.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para este parámetro (TIPTA) en la 3ª camada de *D. magna* y presentados en la tabla 13, observamos un ligero aumento del valor presentado por los animales transferidos a medio exento de plaguicida, en relación con los dáfidos control (8.1 días), lo cual indicaría un cierto retraso en el momento de liberar la primera puesta. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados (ANOVA) reveló que no existían diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dáfidos procedentes de parentales tratados y el grupo control. Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 5 del anexo.

5.2.2.2.3. Longitud corporal.

En la tabla 13 aparecen los datos registrados para los distintos grupos de dáfidos para este parámetro (L). Se observó que los valores medios presentados en esta

generación filial procedentes de parentales tratados son, en general, similares al valor medio control (0.48 cm).

Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.01$). Los datos estadísticos referentes a este análisis de la varianza aparecen en la tabla 5 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan (figura 28 del anexo) las diferencias significativas detectadas fueron atribuidas ($p < 0.05$) al grupo cuyos parentales fueron pre-expuestos a 0.05 ng/L (0.46 cm) y el valor control (0.48 cm); no se observaron diferencias entre el resto de grupos y el grupo control.

5.2.2.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

A la vista de los resultados obtenidos para este parámetro en *D. magna* (F_1-3^a camada) (figura 15), se observó una ligera reducción del valor obtenido para *r*, teniéndose valores entre 0.31 (control) y 0.29 días⁻¹ (0.1 ng/L).

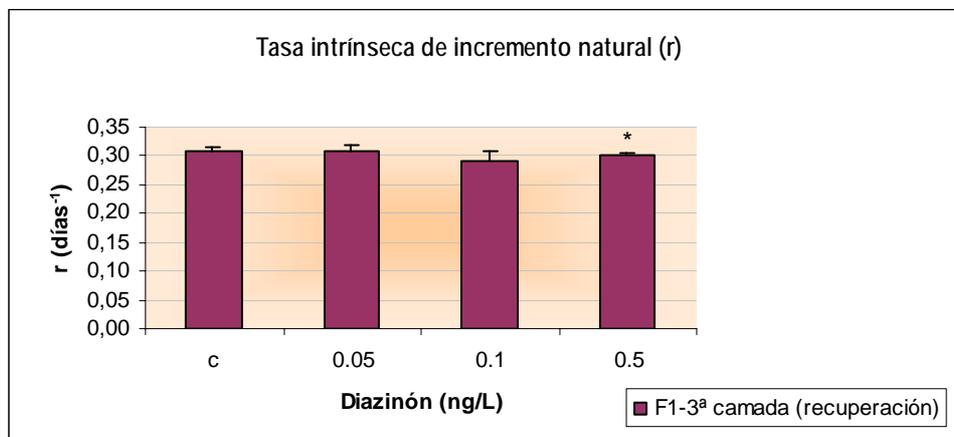


FIGURA 15. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (*r*) en los dáfidos de la generación F_1-3^a camada durante la fase de recuperación. (*) $p < 0.05$

El descenso en el valor de la tasa intrínseca de incremento natural es menor que el que se observó en la fase de exposición, encontrándose, para los dáfidos transferidos a medio exento de plaguicida valores muy próximos al de los individuos control. El

análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.01$) según se aprecia en la tabla 5 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan (figura 29 del anexo) las diferencias detectadas fueron atribuidas ($p < 0.05$) a las existentes entre el valor de r aportado por el grupo cuyos parentales fueron pre-expuestos a 0.5 ng/L de diazinón y el valor control (0.29 y 0.31 días⁻¹, respectivamente).

5.2.3. Fase de exposición al herbicida molinato.

Las concentraciones subletales del herbicida molinato seleccionadas para la realización del análisis multigeneracional de la toxicidad de este compuesto en *Daphnia magna* fueron: 3.77, 4.71, 6.28, 9.42 y 18.85 mg/L; tal y como se mencionó en el capítulo de material y métodos su selección se basó en el dato obtenido para la CE₅₀ de este herbicida para el cladóceros objeto de estudio, 3.77 mg/L (Sancho y cols., 2003).

En primer lugar se procedió al diseño de una serie de ensayos, del mismo modo que para el plaguicida diazinón, exponiendo también en este caso una generación parental de dáfidos (generación F₀) y dos generaciones filiales (generación F₁-1^a y 3^a camadas) durante 21 días al herbicida, y registrando los valores obtenidos para los mismos parámetros que en aquel caso (longevidad, número total de neonatos por hembra, número medio de camadas por hembra, tamaño medio de la camada, tiempo a la primera puesta, longitud corporal y tasa intrínseca de incremento natural).

Los parentales (F₀) expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L de molinato no alcanzaron la madurez reproductiva, por ello no se obtuvieron descendientes con los que efectuar los ensayos correspondientes a las generaciones filiales de la primera y tercera camadas.

Los resultados del análisis multigeneracional (fase de exposición al herbicida) efectuado en *D. magna* tras a exposición al herbicida molinato, se recogen en las tablas 14, 17 y 20.

5.2.3.1 Generación parental (F₀).

5.2.3.1.1. Supervivencia.

En la tabla 14 se detallan los resultados derivados del ensayo crónico efectuado exponiendo la generación parental (F₀) de *D. magna* al herbicida molinato.

A la vista de los resultados correspondientes al parámetro de longevidad (LV), se observó una notable reducción de la supervivencia de los animales expuestos a las mayores concentraciones de molinato ensayadas, obteniéndose valores entre 21 (control) y 4.5 días (18.85 mg/L de molinato).

TABLA 14. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la generación parental (F_0) de *D. magna* expuestos a molinato durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	N° Neonatos hembra	Tamaño de la camada	N° de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	131.7±15.1	25.9±2.5	5.1±0.1	7.8±0.1	0.49±0.01	0.33±0.001
c+a	21.0±0	127.8±4.0	25.0±0.7	4.9±0.1	8.3±0.4	0.47±0.01	0.32±0.02
3.77 mg/L	19.1±3.8	119.7±9.4	24.6±0.7	4.9±0.3	8.3±0.2*	0.44±0.005	0.29±0.001*
4.71 mg/L	19.3±2.0	73.5±14.6*	19.7±1.2*	3.7±0.9*	8.4±0.1*	0.46±0.01	0.30±0.001*
6.28 mg/L	19.4±2.0	55.3±12.4*	15.6±3.5*	3.4±0.5*	8.9±0.1*	0.46±0.01	0.27±0.020*
9.42 mg/L	10.3±2.8*	0*	0*	0*	—	0.37±0.01*	0*
18.85 mg/L	4.5±0.7*	0*	0*	0*	—	—	0*

* p < 0.05

Al finalizar el ensayo (día 21), únicamente las hembras expuestas a las dos concentraciones más altas de herbicida registraron porcentajes de supervivencia por debajo del 50% (13.32 y 0% para 9.42 y 18.85 mg/L de molinato, respectivamente), observándose que ninguno de estos parentales alcanzó la madurez reproductiva (registrada entre 7 y 8 días de vida para los animales control).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los animales control y los tratados, tal y como se observó en la tabla 6 del anexo.

Posteriormente, se efectuó el test de Duncan, detectándose diferencias significativas ($p < 0.05$) únicamente para los valores determinados en los grupos expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L de molinato en relación con el grupo control (figura 30 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.3.1.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores correspondientes a este parámetro (NH) aparecen en la tabla 14. Se observó una disminución del número medio de descendientes por hembra, en consonancia con la creciente concentración de molinato a la que fueron expuestos los dáfidos, observándose que los grupos más afectados fueron los expuestos a concentraciones iguales o superiores a 4.71 mg/L de molinato. Se obtuvieron valores desde 131.7 a 55.3 neonatos por hembra, para los grupos control y el expuesto a 6.28 mg/L del herbicida. Los parentales expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L de molinato no se reprodujeron.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los individuos control y los tratados, tal y como se detalla en la tabla 6 del anexo.

El posterior test de Duncan (figura 31 del anexo), reveló que las diferencias significativas ($p < 0.05$) detectadas con el análisis de la varianza, correspondieron a las existentes entre los valores generados por los grupos expuestos a concentraciones ≥ 4.71 mg/L de molinato, en relación con el valor control. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos control con acetona y control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA

Los valores registrados para este parámetro reproductivo (TCDA) se recogen en la tabla 14. Se observó una tendencia similar a la encontrada para el número de neonatos por hembra, disminuyendo el valor del parámetro conforme aumentó la concentración de herbicida ensayada, obteniéndose valores entre 25.9 y 15.6 neonatos (grupos control y expuesto a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el grupo control y los tratados (tabla 6 del anexo). El posterior test de Duncan (figura 32 del anexo) puso de manifiesto que las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraban entre los valores encontrados en los grupos expuestos a concentraciones de molinato ≥ 4.71 mg/L y el valor del grupo control. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos control con acetona y control blanco.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA

Se observó una reducción del número medio de camadas por hembra (NCDA), en relación al valor control (5.1 camadas por dáfido) en aquellos dáfidos expuestos a molinato (tabla 14). Esta reducción fue mayor, al igual que ocurrió con los dos anteriores parámetros reproductivos estudiados, para los grupos expuestos a concentraciones ≥ 4.71 mg/L de molinato.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 6 del anexo.

Posteriormente, se encontró que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza correspondían a los grupos tratados con ≥ 4.71 mg/L de molinato en relación al

valor control, tal y como reveló el test de Duncan (figura 33 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre los valores de los grupos control con acetona y control blanco.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA

Se observó un notable incremento del valor del tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la deposición de la primera puesta (TIPTA) en todos los grupos de animales tratados, en relación al valor control (7.8 días) (ver tabla 14). El herbicida molinato provocó, pues, un aumento del tiempo transcurrido hasta alcanzar la madurez reproductiva, notándose que este efecto fue más acusado en los grupos expuestos a las concentraciones más altas del herbicida.

No se obtuvieron datos correspondientes a los grupos de dáfidos expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L porque, como ya se dijo, no sobrevivieron el tiempo suficiente para reproducirse.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) permitió detectar diferencias significativas ($p < 0.001$), apareciendo los detalles de este análisis en la tabla 6 del anexo.

Posteriormente se sometieron los resultados al test de Duncan ($p < 0.05$) observándose que las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza correspondían a las existentes entre el valor obtenido en los animales expuestos a todas las concentraciones de molinato (figura 34 del anexo) y el valor control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.3.1.3. Longitud corporal.

Las medidas obtenidas para la longitud del caparazón (L) alcanzada el día 21 del ensayo por los dáfidos expuestos a los distintos tratamientos se indican en la tabla 14. Se observó una reducción de la longitud corporal, al comparar el valor control (0.49 cm) con los valores determinados en los grupos tratados con molinato, siendo 0.37 cm la menor longitud registrada en los animales expuestos a 9.42 mg/L de herbicida, lo que supone una reducción del tamaño corporal de un 24.5%. Cabe mencionar que el valor de la longitud correspondiente a los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L de molinato,

corresponde únicamente a la media de dos individuos que fueron los que alcanzaron el final del ensayo (21 días).

No se obtuvieron datos de los individuos expuestos a 18.85 mg/L de molinato, ya que murieron antes de finalizarse el ensayo, que es el momento en que se procedió a la medición de los animales supervivientes y se registró su longitud corporal.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los datos estadísticos referentes a este análisis aparecen detallados en la tabla 6 del anexo.

Tras el procesado de los resultados con el test de Duncan, las diferencias significativas ($p < 0.05$) detectadas con el análisis de la varianza previo fueron atribuidas a las presentadas por el grupo expuesto a 9.42 mg/L de molinato, en relación con el grupo control. No se detectaron diferencias significativas entre el tamaño final alcanzado por los animales del control con acetona y los del control blanco (figura 35 del anexo).

5.2.3.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

En la figura 16 aparecen representados gráficamente los valores obtenidos para el parámetro poblacional r calculados para los distintos grupos de la generación parental F_0 de *D. magna*. Se obtuvieron valores entre 0.33 y 0.27 días⁻¹ (control y 6.28 mg/L de molinato, respectivamente). Dado que el parámetro poblacional estudiado supone un compendio de los parámetros individuales “supervivencia” y “reproducción”, y que los individuos tratados con 9.42 y 18.85 mg/L del herbicida no se reprodujeron, el valor determinado en estos animales para la tasa intrínseca de incremento natural resultó ser 0 días⁻¹.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) según se aprecia en la tabla 6 del anexo.

Tras analizar estos resultados con el test de Duncan (figura 36 del anexo) se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de r determinados en los animales expuestos a todas las concentraciones de molinato y el valor control. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

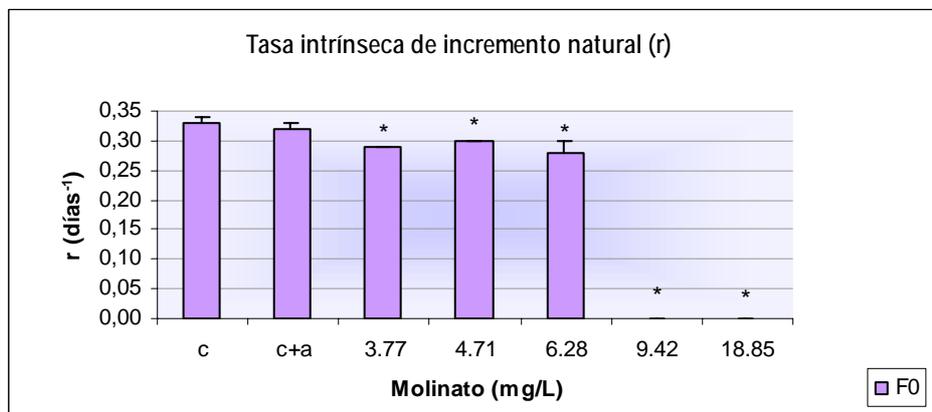


FIGURA 16. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfidos de la generación parental (F_0) expuestos a los distintos tratamientos de molinato. (*) $p < 0.05$

5.2.3.1.5. Cálculo de la MATC

Para los dáfidos de la generación parental de *D. magna* expuestos a concentraciones crecientes de molinato, todas las concentraciones ensayadas produjeron una reducción significativa del crecimiento poblacional (r) de las poblaciones expuestas, de manera que no se consideró el cálculo de la máxima concentración aceptable de herbicida para esta generación, al no existir una concentración de molinato que no produjera efectos significativos (NOEC).

5.2.3.1.6. Cálculo de la CE_{50}

A partir de los datos aportados en la tabla 14, en la que se refleja el efecto del molinato sobre *D. magna* (F_0) en relación con los parámetros estudiados, se procedió a establecer la posible correlación lineal entre la creciente concentración de molinato ensayada y el resultado obtenido para cada uno de los parámetros.

En la tabla 15 aparecen las ecuaciones de regresión calculadas para cada uno de los parámetros, así como los correspondientes coeficientes de correlación.

Respecto de los índices de correlación calculados, se obtuvieron $r^2 \geq 0.90$ para los parámetros LV, NH, NCDA y TIPTA. Únicamente para CDA se obtuvo un valor de 0.75. Asimismo, para el parámetro poblacional evaluado (r) se registró una correlación de 0.86 (tabla 15).

A partir de las ecuaciones de la tabla 15 se calcularon las CE_{50} que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (tabla 16) respecto de los valores control. Se observó que los parámetros reproductivos, número de neonatos por hembra, tamaño de la camada y número de camadas por hembra, fueron los parámetros más sensibles a los efectos del molinato en esta generación parental, requiriéndose menores concentraciones de molinato (5.35 – 5.67 mg/L) para reducir a la mitad el valor de este parámetro.

TABLA 15. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y el valor de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F_0 de *D. magna*.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
LV	$y = 22.5 - 0.97 x$	0.95
NH	$y = 146.48 - 14.57 x$	0.95
CDA	$y = 26.49 - 2.53 x$	0.75
NCDA	$y = 6.0 - 0.53 x$	0.90
TIPTA	$y = 7.74 + 0.16 x$	0.97
r	$y = 0.34 - 0.02 x$	0.86

El parámetro poblacional r parece más robusto (CE_{50} de 8.75 mg/L) que cualquiera de los parámetros reproductivos considerados puesto que r considera, además de los efectos del molinato sobre la fecundidad de los animales expuestos, los efectos sobre la

longevidad de los mismos y éste fue un parámetro menos sensible a los efectos del herbicida ensayado (CE_{50} de 12.37 mg/L).

TABLA 16. CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F_0 de *D. magna*.

Parámetro	CE_{50}
LV	12.37
NH	5.53
CDA	5.35
NCDA	5.67
T1PTA	49.12
r	8.75

5.2.3.2 Generación filial (F₁-1^a camada).

5.2.3.2.1. Supervivencia.

En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos relativos a la longevidad registrada para los dáfnidos de la primera generación filial (F₁-1^a camada) expuestos a los distintos tratamientos con molinato. Se observaron resultados muy similares entre los animales tratados en relación con el valor control (21 días), siendo el mínimo valor registrado de 20.5 días para los individuos expuestos a 6.28 mg/L.

Los porcentajes de supervivencia registrados en los dáfnidos expuestos a las distintas concentraciones de molinato fueron muy similares al registrado en los animales control, debiéndose las pequeñas diferencias encontradas a lo sumo en dos individuos, lo que no resultó ser significativo. No se tienen datos de la supervivencia de los individuos de la generación F₁-1^a camada expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L, porque los parentales (F₀) correspondientes no sobrevivieron el tiempo suficiente para alcanzar la madurez reproductiva.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) tal y como se muestra en la tabla 7 del anexo.

5.2.3.2.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios registrados para este parámetro (NH) se recogen en la tabla 17. Se observó una reducción del número de descendientes registrados en los distintos grupos tratados, en relación al valor control (134.4 neonatos por hembra), siendo el menor valor determinado el número de juveniles procedentes de los animales expuestos a la mayor concentración de molinato, 6.28 mg/L (99.5 neonatos por hembra).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$), tal y como se detalla en la tabla 7 del anexo.

TABLA 17. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F₁-1ª camada) de *D. magna* expuestos a molinato durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	134.4±8.4	26.9±1.7	5.0±0	8.4±0.4	0.48±0.004	0.31±0.001
c+a	20.9±0.3	131.6±4.3	32.4±0.7*	4.9±0.1	8.5±0.3	0.49±0.009	0.32±0.03
3.77 mg/L	20.8±0.4	102.1±8.4*	26.4±2.3	3.9±0.3*	10.2±0.3*	0.41±0.006*	0.28±0.04
4.71 mg/L	21.0±0	104.3±14.6*	25.2±3.1	4.1±0.4*	9.1±0.2*	0.44±0.008*	0.30±0.01
6.28 mg/L	20.5±1.1	99.5±19.8*	26.1±3.5	3.8±0.2*	9.8±0.1*	0.44±0.008*	0.28±0.001*
9.42 mg/L	–	–	–	–	–	–	–
18.85 mg/L	–	–	–	–	–	–	–

* p < 0.05 (c+a)

* p < 0.05

El test de Duncan apuntó que estas diferencias ($p < 0.05$) se correspondían a las existentes entre el valor presentado por las hembras expuestas a todos los tratamientos con molinato y el valor control (figura 37 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA

El tamaño medio de la camada (CDA) de los individuos expuestos a los distintos tratamientos con molinato se apunta en la tabla 17. No se observaron desviaciones importantes de los valores registrados por los grupos tratados con molinato en relación con el valor registrado por el grupo control (26.9 neonatos por camada).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 7 del anexo.

El posterior test de Duncan permitió confirmar ($p < 0.05$) la existencia de diferencias significativas entre los dáfidos pertenecientes al grupo del control con acetona y el grupo control blanco (figura 38 del anexo), encontrándose un valor ligeramente más elevado en los dáfidos expuestos al disolvente.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA

En la tabla 17 se resumen los valores registrados para este parámetro (NCDA) en la primera camada de descendientes de *D. magna* expuesta al herbicida molinato. Los animales expuestos al herbicida tuvieron un menor número de camadas por hembra que aquellos sujetos a las condiciones control (5 camadas), teniéndose como valor mínimo (3.8 camadas) el registrado por el grupo expuesto a 6.28 mg/L de molinato.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 7 del anexo. Estas diferencias ($p < 0.05$) se determinaron entre todos los grupos tratados y el grupo control, tras la aplicación del test de Duncan. Los detalles de este análisis aparecen en la figura 39 del

anexo. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA

Los valores registrados para el tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la aparición de la primera puesta (tiempo a la primera puesta o TIPTA) aparecen en la tabla 17. Los animales tratados con molinato retrasaron su primera puesta en relación a los animales control (8.4 días). Se observa, pues, un retraso en alcanzar la madurez reproductiva por parte de los dáfidos tratados con el herbicida ensayado en relación con los individuos considerados como grupo control.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) permitió detectar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los detalles de este análisis aparecen en la tabla 7 del anexo.

Posteriormente, se sometieron los resultados al test de Duncan (figura 40 del anexo) que puso de manifiesto que las diferencias detectadas correspondían a todos los grupos de animales tratados y los animales control. No se detectaron diferencias entre el grupo control con acetona y el grupo control blanco.

5.2.3.2.3. Longitud corporal.

Las medidas de la longitud (L) de los animales que sobrevivieron los 21 días que duró el ensayo crónico se recogen en la tabla 17. Se observó una menor longitud corporal de los dáfidos tratados con molinato en relación con la de los animales control, encontrándose valores desde 0.48 hasta 0.44 cm para el grupo control y el expuesto a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). Los datos estadísticos relativos a este análisis se detallan en la tabla 7 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan a los datos recogidos las diferencias significativas fueron atribuidas ($p < 0.05$) a las presentadas por los grupos expuestos a todos los

tratamientos con molinato en relación al grupo control (figura 41 del anexo). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control blanco.

5.2.3.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

En la figura 17 se han representado los valores determinados para el parámetro poblacional tasa intrínseca de incremento natural (r), para la población control y la expuesta a los distintos tratamientos con molinato. Se detectó una ligera reducción del valor de este parámetro en las poblaciones tratadas con el herbicida en relación con la población control.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$), según se detalla en la tabla 7 del anexo.

El posterior test de Duncan (figura 42 del anexo) reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores proporcionados por el grupo expuesto a 6.28 mg/L de molinato (0.28 días^{-1} para ambos grupos) y el valor control (0.31 días^{-1}). No se detectaron diferencias significativas entre los valores del control con acetona y el control blanco.

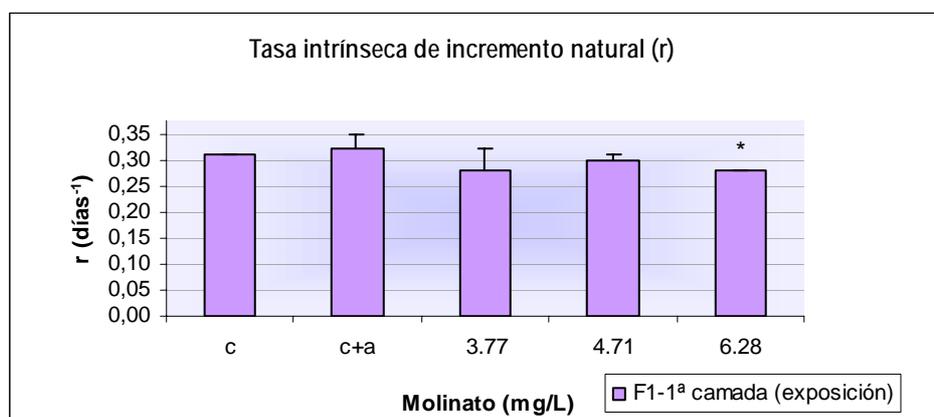


FIGURA 17. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfnidos de la generación F_1-1^a camada durante la fase de exposición a molinato. (*) $p < 0.05$

5.2.3.2.5. Cálculo de la MATC

Se estimó el valor de la concentración máxima aceptable (MATC) de molinato para el parámetro poblacional r en la generación F_1 -1ª camada, teniendo en cuenta los valores de la LOEC (concentración de tóxico más baja que ocasionó efecto sobre el parámetro seleccionado) y la NOEC (máxima concentración de herbicida que no ocasionó efecto significativo sobre el parámetro considerado). De esta manera, habiéndose estimado una LOEC de 6.28 mg/L y una NOEC de 4.71 mg/L de molinato, la MATC alcanzó un valor de 5.49 mg/L.

5.2.3.2.6. Cálculo de la CE_{50} .

A partir de los resultados obtenidos para esta primera camada de la generación filial (F_1) de dáfidos expuestos a molinato, se trató de establecer la posible correlación lineal entre los valores de los diferentes parámetros estudiados y la concentración de molinato ensayada.

En la tabla 18 se apuntan las ecuaciones de regresión calculadas para cada uno de los parámetros estudiados.

A la vista de los datos aportados en la tabla 18, se puede observar que son los parámetros reproductivos n° de neonatos y n° de camadas por hembra los que mostraron una buena correlación con la creciente concentración de molinato ensayada, registrándose índices de correlación de 0.94. El parámetro poblacional r mostró una r^2 de 0.75, resultando un coeficiente de correlación bajo debido a la influencia del parámetro “longevidad” en la tasa intrínseca de incremento natural. La longevidad, al contrario de lo que se observó para la generación parental F_0 , no mostró una correlación lineal con la concentración de herbicida ensayada ya que no se registró un descenso significativo de la misma, registrándose igualmente un mayor efecto del molinato sobre los parámetros reproductivos que sobre la supervivencia de los individuos expuestos.

A partir de las ecuaciones de la tabla 18 se calcularon las CE_{50} que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (tabla 19), respecto de los valores control. No se consideró el cálculo de este valor para los parámetros

“longevidad” y “tamaño de la camada” puesto que no hubo efecto significativo del molinato sobre estos dos parámetros.

Los parámetros NH y NCDA son los que mejor apuntaron el efecto del herbicida en esta primera camada de dáfidos, mostrando menores CE_{50} ; sin embargo, cuando *D. magna* es expuesta a molinato, la supervivencia no se vio afectada, de ahí que no procedió el cálculo de la CE_{50} . La longevidad y el tamaño de la camada no fueron incluidos para el cálculo de la CE_{50} ya que, como comentamos previamente, el herbicida no produjo efectos significativos sobre estos parámetros.

TABLA 18. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y el valor de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F_1-1^a camada durante la fase de exposición a molinato.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
NH	$y = 131.4 - 5.78 x$	0.94
NCDA	$y = 4.91 - 0.19 x$	0.94
T1PTA	$y = 8.60 + 0.21 x$	0.71
r	$y = 0.308 - 4.22 x$	0.75

TABLA 19. CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F_1-1^a camada durante la fase de exposición a molinato.

Parámetro	CE_{50}
NH	11.10
NCDA	12.68
T1PTA	39.05
r	38.75

Comparando la generación parental (tabla 16) y la primera generación filial (1ª camada) (tabla 19) expuestas a molinato, observamos que esta segunda resultó ser más resistente al herbicida, mostrando CE_{50} más elevadas que para el caso de la generación F_0 . Este efecto es, justamente, el inverso al que se observó para el caso de los dáfidos expuestos al insecticida diazinón. Parece, pues, que el contacto con el herbicida molinato de los dáfidos de la generación F_1 -1ª camada, tras haberse encontrado también sus parentales en contacto con el herbicida, generó en ellos una cierta resistencia a este compuesto de la cual carecía la generación parental previamente expuesta.

5.2.3.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

5.2.3.3.1. Supervivencia.

En la tabla 20 se muestran los valores relativos a la longevidad (L) de los dáfidos de la generación filial (F₁-3^a camada) expuestos a molinato durante 21 días. Se observó que, tanto los grupos de dáfidos expuestos a las distintas concentraciones de molinato, como los dos grupos control (con disolvente y control blanco), mostraron valores muy similares para este parámetro, lo que denotó el efecto mínimo del herbicida sobre la supervivencia de estos organismos pertenecientes a la tercera camada de descendientes.

Las curvas de supervivencia fueron muy similares para todos los grupos ensayados; registrándose únicamente un porcentaje de supervivencia por debajo del 100% para los individuos expuestos a 4.71 y 6.28 mg/L de molinato. No se obtuvieron datos de la supervivencia de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L porque los parentales (F₀) correspondientes no sobrevivieron el tiempo suficiente para alcanzar la madurez reproductiva.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) tal y como se muestra en la tabla 8 del anexo.

5.2.3.3.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL MEDIO DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios del número de neonatos por hembra (NH) aparecen en la tabla 20. El número medio de descendientes por hembra descendió en relación con la concentración de molinato a la que fueron expuestos los dáfidos, obteniéndose valores que oscilaron desde 117.9 a 84.1 neonatos para los grupos control y expuesto a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente. Tampoco pudieron obtenerse datos de los parámetros reproductivos referidos a las concentraciones más elevadas de molinato por lo anteriormente mencionado.

TABLA 20. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F₁-3^a camada) de *D. magna* expuestos a molinato durante 21 días (fase de exposición).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	20.7±0.5	117.9±2.2	25.9±2.5	5.1±0.1	8.1±0.1	0.48±0.007	0.31±0.02
c+a	21.0±0	115.6±17.1	24.9±0.7	4.9±0.1	8.2±0.3	0.47±0.01	0.32±0.01
3.77 mg/L	21.0±0	98.2±8.3*	24.1±1.8	4.1±0.1*	9.3±0.9*	0.44±0.007*	0.29±0.02
4.71 mg/L	19.9±1.8	87.2±13.2*	24.4±1.1	3.5±0.6*	9.3±0.4*	0.45±0.005*	0.30±0.01
6.28 mg/L	20.0±1.3	84.1±11.3*	22.6±2.1	3.7±0.4*	9.3±0.5*	0.43±0.004*	0.28±0.001*
9.42 mg/L	–	–	–	–	–	–	–
18.85 mg/L	–	–	–	–	–	–	–

* p < 0.05

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$), tal y como se detalla en la tabla 8 del anexo. El posterior test de Duncan (figura 43 del anexo), reveló que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza se encontraban entre los valores presentados para el parámetro NH por todos los grupos de dáfidos expuestos a molinato, y el valor del grupo control ($p < 0.05$).

No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y control blanco.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA

El valor medio de este parámetro (CDA) registrado para cada uno de los grupos de dáfidos ensayados se muestra en la tabla 20. Los resultados obtenidos para los distintos grupos de dáfidos expuestos a molinato fueron muy parecidos entre sí, y sólo ligeramente inferiores al control.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) reveló la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$), tal y como se presenta en la tabla 8 del anexo.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA

Las hembras de la generación F₁-3^a camada expuestas a concentraciones crecientes de molinato proporcionaron entre 5.1 y 3.7 camadas (valores control y del grupo expuesto a 6.28 mg/L del herbicida, respectivamente) por término medio (NCDA), tal como se apunta en la tabla 20.

El análisis estadístico (ANOVA) de los resultados puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$), como se detalla en la tabla 8 del anexo.

El posterior test de Duncan (figura 44 del anexo) evidenció que las diferencias previamente detectadas correspondían a las existentes entre los valores proporcionados por los grupos de animales expuestos a todas las concentraciones de molinato y el valor

suministrado por el grupo control ($p < 0.05$). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el grupo mantenido en condiciones control sin disolvente.

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA

El tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la aparición de la primera puesta (TIPTA) para cada grupo de organismos ensayado se muestra en la tabla 20. El tiempo que tardan en alcanzar la madurez reproductiva los animales expuestos al herbicida molinato fue mayor que para los animales mantenidos en condiciones control, encontrándose valores entre 9.3 y 8.1 para los dáfidos expuestos a 6.28 mg/L de molinato y para el grupo control, respectivamente.

El análisis estadístico (ANOVA) de los resultados, cuyos detalles se muestran en la tabla 8 del anexo, puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tras el procesado de los resultados con el test de Duncan (figura 45 del anexo) se concluyó que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza se debían a las existentes entre los valores correspondientes a todos los grupos tratados y el correspondiente al grupo control ($p < 0.05$). No se detectaron diferencias significativas entre los valores determinados en los animales pertenecientes a los dos grupos control (con y sin disolvente).

5.2.3.3.3. Longitud corporal.

A la vista de los valores obtenidos para este parámetro (tabla 20), se observó una reducción de la longitud corporal, asimilada a la del caparazón (L), en consonancia con la creciente concentración de molinato a la que fueron expuestos los organismos. Se obtuvieron, así, valores comprendidos entre 0.48 y 0.44 cm (para los animales control y los expuestos a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 8 del anexo.

Al tratar los resultados con el test de Duncan (figura 46 del anexo), se pudo observar que las diferencias correspondían a las existentes entre los grupos tratados con molinato y el grupo control ($p < 0.05$). No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el valor control.

5.2.3.3.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

Al igual que ocurrió en los individuos de la primera generación filial (F_1 -1ª camada), se observó en esta 3ª camada una cierta disminución del valor presentado para la tasa intrínseca de incremento natural (r) para algunos de los grupos tratados (figura 18), obteniéndose también variaciones en los valores de r entre 0.31 (control) y 0.28 días⁻¹ (6.28 mg/L de molinato).

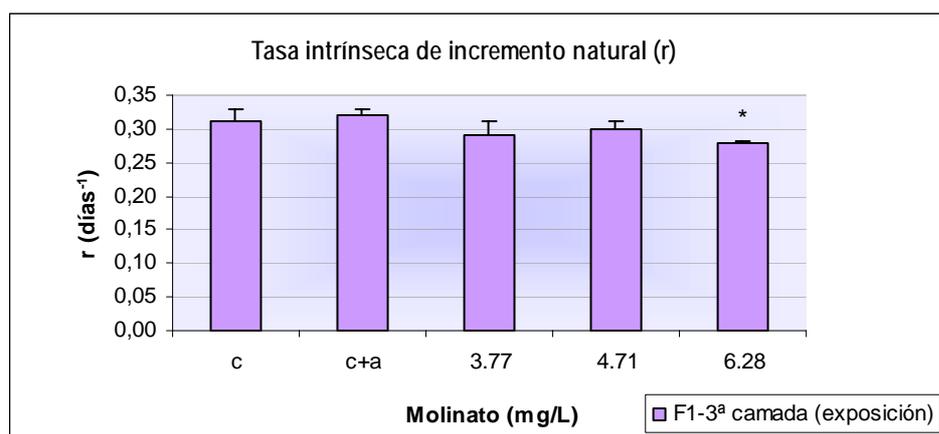


FIGURA 18. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfidos de la generación F_1 -3ª camada durante la fase de exposición a molinato. (*) $p < 0.05$

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos tratados y el valor control, tal y como se detalla en la tabla 8 del anexo. Posteriormente se efectuó el test de Duncan (figura 47 del anexo) que certificó que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza correspondían a las existentes entre el grupo expuesto a 6.28 mg/L y el grupo control.

5.2.3.3.5. Cálculo de la MATC

Al igual que para la primera camada de descendientes, para los dáfidos de la tercera camada (F_1-3^a) se estimó una concentración máxima aceptable de molinato (MATC) de 5.49 mg/L, puesto que los valores de la NOEC (4.71 mg/L) y la LOEC (6.28 mg/L) coincidieron en ambas camadas de descendientes para el parámetro seleccionado (r). De esta manera ambas camadas mostraron una tolerancia similar al herbicida en relación con el parámetro “tasa intrínseca de incremento natural”.

5.2.3.3.6. Cálculo de la CE_{50}

A partir de los resultados obtenidos para todos los parámetros estudiados en la generación F_1-3^a camada tras su exposición a molinato (tabla 20) se procedió a establecer la posible correlación entre los valores determinados en estos parámetros y la concentración de molinato a la que fueron expuestos los animales. En la tabla 21 se detallan las ecuaciones de regresión calculadas al igual que se hizo para las generaciones parental (F_0) y descendientes F_1-1^a camada.

En general, igual que ocurría para la primera camada de descendientes, los parámetros reproductivos analizados mostraron una mayor correlación con la concentración de herbicida a la que fueron expuestos los dáfidos. El parámetro poblacional r muestra una correlación ligeramente menor a la presentada por los parámetros reproductivos con un valor de r^2 de 0.86 debido a la importancia de la supervivencia en este parámetro. La longevidad y el tamaño de la camada no fueron incluidos para el cálculo de la CE_{50} ya que el herbicida no produjo efectos significativos sobre estos parámetros.

A partir de las ecuaciones de regresión de la tabla 21 se calcularon las concentraciones de molinato que producían un 50% de reducción en cada uno de los parámetros señalados (CE_{50}) (tabla 22) respecto de los valores control.

TABLA 21. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x), y el valor de los diferentes parámetros evaluados (y) en *D. magna*. Corresponde a la generación F₁₋₃^a camada durante la fase de exposición a molinato.

Parámetro	Ecuación de regresión	r^2
NH	$y = 117.6 - 5.6 x$	0.98
NCDA	$y = 5.21 - 0.25 x$	0.81
T1PTA	$y = 8.23 + 0.21 x$	0.92
r	$y = 0.31 - 0.004 x$	0.86

TABLA 22. CE₅₀ (mg/L) de molinato en *D. magna* para cada uno de los parámetros estudiados. Corresponde a la generación F₁₋₃^a camada durante la fase de exposición a molinato.

Parámetro	CE ₅₀
NH	10.47
NCDA	10.64
T1PTA	37.95
r	37.80

Comparando los datos que aparecen en la tabla 21 con los de la tabla 18 (F₁₋₁^a camada) se obtienen valores similares de la CE₅₀ en la tercera camada de dáfidos respecto a la primera. En ambos casos el parámetro “neonatos por hembra” es el más sensible mostrando CE₅₀ de 10.47 y 11.10 para la F₁₋₃^a y 1^a camadas, respectivamente. De esta manera, siendo el molinato un herbicida y no teniendo efecto significativo sobre la supervivencia de las generaciones descendientes de *D. magna* como lo tenía el insecticida diazinón, muestra una toxicidad importante para los parámetros reproductivos estudiados en este organismo. No obstante, la ausencia de efecto

significativo sobre la supervivencia de los dáfnidos repercute sobre r y la CE_{50} estimada para el parámetro poblacional, determinándose un valor de 37.80 mg/L de molinato.

5.2.4. Fase de recuperación de *D. magna* tras exposición a molinato.

De manera similar a como se describió para el caso del insecticida diazinón, individuos de la especie *D. magna* pertenecientes a la primera generación filial (1ª y 3ª camadas), procedentes de parentales pre-expuestos a molinato fueron transferidos a medio exento de herbicida. Con estos neonatos se llevó a cabo un ensayo crónico de 21 días de duración, en el que se hizo un seguimiento de los parámetros relativos a la longevidad y reproducción. Del mismo modo, también se efectuaron medidas de la longitud corporal de los animales que alcanzaron el último día del ensayo. Siguiendo el mismo esquema que para la fase de exposición a molinato se recogieron los datos de los parámetros estudiados en las tablas 23 y 24.

5.2.4.1. Generación filial (F₁-1ª camada).

5.2.4.1.1. Supervivencia.

En la tabla 23 se muestran los valores obtenidos para la longevidad (LV) en los dáfnidos de la generación F₁-1ª camada a los que se permitió una fase de recuperación de los efectos del herbicida. Se observó que el valor obtenido para este parámetro no varió de los grupos procedentes de parentales tratados con molinato al grupo control, obteniéndose los mismos valores en el grupo control y en los tratados (ver tabla 17).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$), tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

5.2.4.1.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO MEDIO TOTAL DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro reproductivo (NH) en *D. magna* aparecen en la tabla 23. Para esta fase de recuperación al herbicida molinato se registró un descenso de los valores reproductivos en función de la concentración de molinato a la que fueron pre-expuestos los parentales; si bien es cierto que esta reducción fue algo menos acusada que para el caso de los individuos de esta misma generación filial expuestos al herbicida (tabla 17).

TABLA 23. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F_1 -1ª camada) de *D. magna*, a los que se transfirió a medio exento de molinato durante 21 días (fase de recuperación).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	21.0±0	134.4±8.4	26.9±1.7	5.0±0	8.4±0.4	0.48±0.004	0.31±0.01
3.77 mg/L	19.9±1.3	105.1±13.0*	26.9±1.4	3.8±0.5*	10.0±0.4*	0.43±0.01	0.30±0.01
4.71 mg/L	21.0±0	115.4±13.7*	26.6±1.6	4.3±0.5*	9.1±0.2*	0.47±0.01	0.30±0.01
6.28 mg/L	21.0±0	113.2±7.6*	28.3±1.9	4.0±0*	10.0±0.2*	0.47±0.01	0.30±0.01
9.42 mg/L	–	–	–	–	–	–	–
18.85 mg/L	–	–	–	–	–	–	–

* p < 0.05

Se obtuvieron valores entre 134.4 y 113.2 neonatos por hembra (control y grupo procedente de parentales pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

El posterior test de Duncan (figura 48 del anexo) aclaró que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza eran las existentes entre los valores obtenidos en todos los grupos de descendientes procedentes de parentales tratados con las distintas concentraciones de molinato y los individuos control ($p < 0.001$).

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA

En la tabla 23 se indican los valores obtenidos en la primera generación filial (1ª camada) de *D. magna* en relación al tamaño medio de la camada (CDA). Se observaron valores bastante homogéneos entre los grupos procedentes de parentales previamente expuestos a molinato y el procedente de parentales mantenidos en condiciones control.

El análisis estadístico (ANOVA) de los resultados puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$), tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

Recordemos que previamente, en la fase de exposición, los descendientes pertenecientes a la generación F_1 -1ª camada tratada con distintas concentraciones de molinato también aportaron valores que no difirieron significativamente del valor control. No obstante, en esta fase de recuperación, se pudo observar que los valores registrados para este parámetro CDA fueron algo mayores a los registrados en la fase de exposición, lo que indicó una cierta recuperación del tamaño medio de la camada en los animales a los que se permitió una fase de recuperación a los efectos del herbicida.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA

A la vista de los datos recogidos en la tabla 23 en relación con el número medio de camadas por hembra (NCDA) de la generación F_1 -1ª camada en la fase de recuperación del molinato, se determinó que aún existía una reducción de los valores registrados para este parámetro, al igual que ocurría en la fase de exposición. En esta fase de

recuperación se obtuvieron valores entre 5.0 y 4.0 camadas por hembra para los grupos control y procedente de parentales pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se observa en la tabla 9 del anexo, donde aparecen los detalles de este análisis.

El posterior test de Duncan (figura 49 del anexo), permitió atribuir estas diferencias a los grupos de descendientes de parentales tratados con las distintas concentraciones de molinato y los procedentes de parentales mantenidos en condiciones control ($p < 0.05$).

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA

Los valores relativos al tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la deposición de la primera puesta (tiempo a la primera puesta o TIPTA), por parte de los individuos de la primera generación filial (1ª camada) durante la fase de recuperación, se recogen en la tabla 23. Se obtuvieron valores entre 8.4 y 10 días para los descendientes de parentales mantenidos en condiciones control y los procedentes de parentales pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente. Se pudo constatar que el tiempo a la primera puesta no logró recuperarse de los efectos ocasionados por el molinato, mostrando valores similares a los registrados durante la fase de exposición al herbicida (tabla 17).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA), permitió detectar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

Tras aplicar el test de Duncan a los datos, las diferencias detectadas con el análisis de la varianza fueron atribuidas ($p < 0.05$) a las existentes entre todos los grupos de descendientes, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos, y el valor control (figura 50 del anexo).

5.2.4.1.3. Longitud corporal.

Las mediciones de las longitudes corporales de los descendientes de la primera generación filial (1ª camada) durante la fase de recuperación, asimilada a la longitud del

caparazón (L), se recogen en la tabla 23. Los resultados fueron muy similares entre sí, obteniéndose longitudes que oscilaron entre 0.48 y 0.47 cm para los animales procedentes de parentales mantenidos en condiciones control y pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.001$), tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

5.2.4.1.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

En la figura 19 se representa la tasa intrínseca de incremento natural (r) calculada para los descendientes de la primera generación filial (1ª camada) de *D. magna* durante la fase de recuperación a los efectos del molinato. Se observó que los valores obtenidos (0.30 días^{-1}) para el parámetro poblacional de los individuos procedentes de parentales tratados con molinato son muy similares al valor control (0.31 días^{-1}).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.005$), tal y como se detalla en la tabla 9 del anexo.

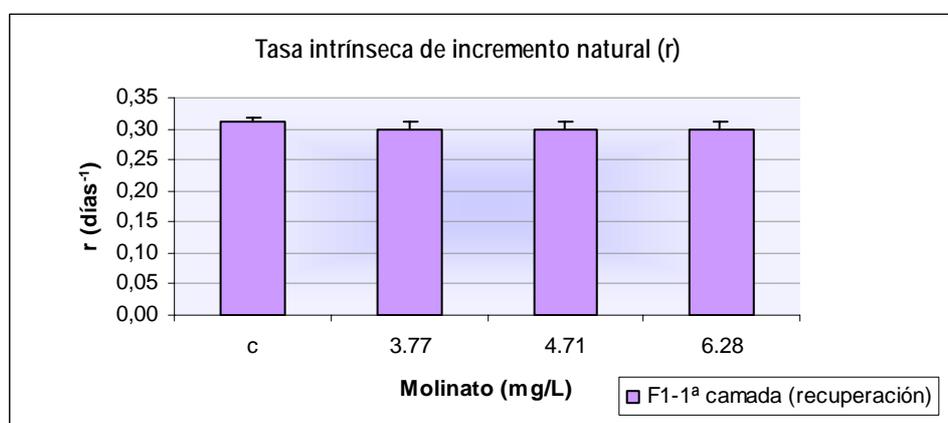


FIGURA 19. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfnidos de la primera generación filial (F_1 -1ª camada), durante la fase de recuperación. (*) $p < 0.05$

5.2.4.2. Generación filial (F₁-3^a camada).

5.2.4.2.1. Supervivencia.

En la tabla 24 aparecen los valores correspondientes a la longevidad (LV) de los descendientes de la generación filial (F₁-3^a camada) transferidos a medio exento de molinato para efectuar la fase de recuperación de este estudio crónico de toxicidad. Al igual que ocurrió para el caso de la primera generación filial F₁-1^a camada (tabla 23), los animales procedentes de parentales tratados con diferentes concentraciones de molinato presentaron longevidades similares a la de los descendientes de los progenitores mantenidos en condiciones control.

Al finalizar el ensayo se observó que el índice de supervivencia de los dáfnidos de todos los grupos fue casi del 100%. No se tienen datos de la supervivencia de los individuos de la generación F₁-3^a camada procedentes de parentales pre-expuestos a 9.42 y 18.85 mg/L molinato porque los parentales (F₀) correspondientes no sobrevivieron el tiempo suficiente para alcanzar la madurez reproductiva.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores encontrados en los descendientes de parentales tratados y el valor control (tabla 10 del anexo).

5.2.4.2.2. Parámetros reproductivos.

NÚMERO TOTAL MEDIO DE NEONATOS POR HEMBRA.

Los valores medios correspondientes a este parámetro en *D. magna* (NH) aparecen en la tabla 24. No se registraron diferencias entre los valores para este parámetro reproductivo en los descendientes de parentales pre-expuestos a concentraciones crecientes de molinato en relación con los procedentes de parentales mantenidos en condiciones control. Esta observación puso de manifiesto una recuperación del número de neonatos por hembra en relación con la misma generación de descendientes durante la fase de exposición a molinato (ver tabla 20). Así mismo, se detectó que esta capacidad de recuperación fue mayor en esta tercera camada de descendientes que en la

primera (ver tablas 23 y 17, correspondientes a los valores recogidos para F₁-1^a camada durante las fases de recuperación y exposición a molinato, respectivamente).

Se obtuvieron valores entre 117.9 y 112.2 neonatos por hembra (para los descendientes de parentales control y tratados con 6.28 mg/L de molinato, respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p>0.05$), tal y como se detalla en la tabla 10 del anexo.

TAMAÑO MEDIO DE LA CAMADA

Los valores medios correspondientes a este parámetro en *D. magna* (CDA), se muestran en la tabla 24. Se registró una gran homogeneidad entre los valores de los distintos grupos de descendientes procedentes de parentales tratados y el valor del grupo control; este comportamiento también se observó en la primera camada de descendientes, durante la fase de recuperación a los efectos del herbicida (ver tabla 23).

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p>0.05$), tal y como se detalla en la tabla 10 del anexo.

NÚMERO MEDIO DE CAMADAS POR HEMBRA

A la vista de los datos recogidos en la tabla 24 para este parámetro reproductivo (NCDA), se observa que no se registró un menor número de camadas por hembra para los descendientes de la tercera camada procedentes de parentales pre-expuestos a concentraciones crecientes de molinato en relación con los descendientes de parentales control, no registrándose diferencias significativas ($p>0.05$) entre estos datos y el valor control (ver tabla 10 del anexo). Además, atendiendo a los datos reflejados en la tabla 23, donde se recogen los valores pertenecientes a la primera generación filial (1^a camada) durante esta fase de recuperación a los efectos del molinato, se observa que, para F₁-3^a camada, se registró un mayor número de camadas por hembra que para F₁-1^a camada lo cual indicó una mayor recuperación de la capacidad reproductiva de esta camada de descendientes más tardía en relación con el número medio de camadas por hembra.

TABLA 24. Valores medios acompañados de las desviaciones típicas de los parámetros correspondientes a los individuos de la primera generación filial (F_1 -3ª camada) de *D. magna*, a los que se transfirió a medio exento de molinato durante 21 días (fase de recuperación).

Tratamiento	Longevidad (días)	Nº Neonatos hembra	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la 1ª puesta (días)	Longitud (cm)	r (días ⁻¹)
control	20.7±0.5	117.9±2.2	25.9±2.5	5.1±0.1	8.1±0.1	0.48±0.01	0.31±0.02
3.77 mg/L	21.0±0	100.9±18.2	23.0±2.6	4.1±0.8	8.4±0.5	0.45±0.01	0.30±0.005
4.71 mg/L	20.9±0.3	114.8±8.6	24.7±0.6	4.7±0.2	9.0±0*	0.48±0.007	0.31±0.01
6.28 mg/L	21.0±0	112.2±8.9	25.6±1.1	4.5±0.3	9.3±0.3*	0.47±0.01	0.32±0.02
9.42 mg/L	–	–	–	–	–	–	–
18.85 mg/L	–	–	–	–	–	–	–

* p < 0.05

TIEMPO A LA PRIMERA PUESTA

Los valores registrados para el tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la aparición de la primera puesta (T1PTA) para esta tercera camada de descendientes de *D. magna* se detallan en la tabla 24. Se evidenció un retraso, por parte de los dáfidos procedentes de parentales tratados, en alcanzar la madurez reproductiva, dilatándose en el tiempo el valor de T1PTA. Se registraron valores entre 8.1 y 9.3 días (para los descendientes de parentales control, y pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente). Sin embargo, éste es menor al observado durante la fase de exposición a molinato (ver tabla 20) y al encontrado para la primera camada durante la fase de recuperación (ver tabla 23); esto indicaría una cierta recuperación de este parámetro a los efectos del herbicida, siendo esta recuperación mayor para la tercera camada.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$), tal y como se detalla en la tabla 10 del anexo.

El posterior test de Duncan (figura 51 del anexo) apuntó que las diferencias observadas con el análisis de la varianza, correspondían a las existentes entre los valores de los descendientes de parentales tratados con 4.71 y 6.28 mg/L de molinato y el valor control.

5.2.4.2.3. Longitud corporal.

En la tabla 24, aparecen los valores determinados en los distintos grupos de descendientes de la tercera camada durante la fase de recuperación a los efectos del molinato para la longitud corporal de *D. magna* (L). Se observó un patrón similar para este parámetro respecto al que se observó para el caso de la generación F₁-1^a camada (ver tabla 23), siendo todos los valores muy similares al valor control.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.001$) como se puede observar en la tabla 10 del anexo.

5.2.4.2.4. Tasa intrínseca de incremento natural (r).

En la tabla 24 y en la figura 20, se indican los resultados calculados para la tasa intrínseca de incremento natural (r) de las poblaciones de descendientes de la tercera camada de dáfidos durante la fase de recuperación a los efectos del herbicida ensayado. Se obtuvieron valores ligeramente superiores a los registrados durante la fase de exposición al herbicida, muy próximos todos al valor control, indicando que existe una recuperación de las poblaciones durante esta fase en medio exento de molinato.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores aportados por los grupos procedentes de parentales tratados y el valor control, tal y como se detalla en la tabla 10 del anexo.

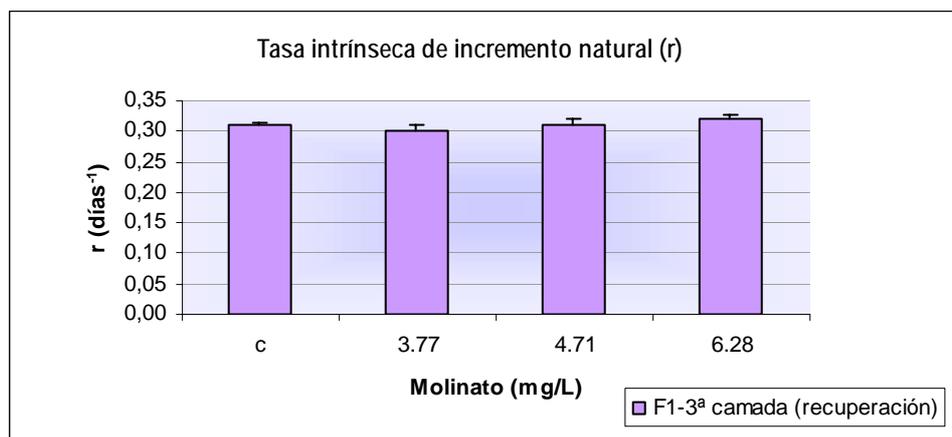


FIGURA 20. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r) en los dáfidos de la generación F₁-3^a camada, durante la fase de recuperación. (*) $p < 0.05$.

5.3. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido de proteínas totales de *D. magna*.

5.3.1. Efecto del insecticida diazinón en los niveles proteicos de *D. magna*.

En las tablas 25, 28 y 31 se muestran los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales registrado para los dáfidos de la generación parental, primera y tercera camadas de descendientes de dáfidos expuestos a los distintos tratamientos con diazinón.

Tal y como se argumentó en la parte correspondiente al análisis de los resultados de la actividad AChE por dafnia, las concentraciones a las que fueron expuestos los organismos fueron: 0.05, 0.1, 0.5 y 0.75 ng/L de diazinón para los animales pertenecientes a la generación parental y a la primera camada de descendientes; a las mismas concentraciones del insecticida, exceptuando la más alta (0.75 ng/L), se expusieron los integrantes de la tercera camada de descendientes, contemplándose también un control y un control con disolvente para cada una de las generaciones expuestas. Asimismo, los dáfidos se expusieron a los mismos tiempos de exposición al organofosforado que para las determinaciones enzimáticas de este estudio (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas).

5.3.1.1. Generación parental (F_0).

Los resultados recogidos en la tabla 25 (generación parental expuesta a los distintos tratamientos) mostraron un aumento progresivo del contenido en proteínas totales conforme los organismos aumentaron de tamaño (de edad) registrándose, al finalizar el periodo de exposición, valores mayores en los organismos control (desde 1.13 (0 horas) hasta 7.32 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales a las 120 horas de iniciarse el ensayo); en los individuos expuestos a diazinón se obtuvieron valores entre 1.13 (0 horas) y 6.50 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas en los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón durante 120 horas).

TABLA 25. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.13 \pm 0.15	2.80 \pm 0.03	4.31 \pm 0.14	6.35 \pm 0.20	7.32 \pm 0.04	7.32 \pm 0.08
c+a	1.13 \pm 0.15	2.74 \pm 0.02	4.22 \pm 0.25	5.85 \pm 0.18	7.33 \pm 0.37	7.27 \pm 0.05
0.05 ng/L	1.13 \pm 0.15	2.76 \pm 0.02	4.01 \pm 0.34 *	5.41 \pm 0.41 *	6.63 \pm 0.28 *	7.21 \pm 0.13
0.1 ng/L	1.13 \pm 0.15	2.58 \pm 0.12 *	3.06 \pm 0.17 *	5.83 \pm 0.11 *	6.53 \pm 0.20 *	6.37 \pm 0.18 *
0.5 ng/L	1.13 \pm 0.15	2.31 \pm 0.10 *	3.05 \pm 0.16 *	5.81 \pm 0.03 *	6.06 \pm 0.17 *	6.37 \pm 0.21 *
0.75 ng/L	1.13 \pm 0.15	2.03 \pm 0.09 *	3.16 \pm 0.07 *	5.46 \pm 0.21 *	6.38 \pm 0.19 *	6.50 \pm 0.07 *

*p < 0.05

Al analizar la variación de los resultados en relación con el tiempo de exposición al insecticida se observó una mayor diferencia entre los valores aportados por los dáfidos al finalizar el ensayo que los obtenidos al inicio del mismo. De esta manera, se obtuvieron valores entre 2.80 y 2.03 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas (exposición durante 24 horas en condiciones control y a 0.75 ng/L de diazinón, respectivamente), y entre 7.32 y 6.50 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas para los dáfidos expuestos a las condiciones control y a 0.75 ng/L durante 120 horas, respectivamente.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores de los dáfidos expuestos a diazinón en relación con los valores control (ver tabla 11 del anexo). Tras aplicar el correspondiente test de Duncan (figuras 52 a 56 del anexo) se determinó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la mayor parte de los grupos tratados con diazinón y los grupos control, salvo para aquellos dáfidos expuestos a la menor concentración de insecticida (0.05 ng/L) a las 24 y 120 horas de exposición. No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control para ninguno de los tiempos de exposición empleados.

En la figura 21 se muestran, en forma de porcentajes, los niveles de proteínas totales vs control para la generación F_0 de *D. magna* expuesta a las distintas concentraciones de diazinón y a distintos tiempos. Se observó una reducción del contenido en proteínas en los organismos expuestos durante las 24 y 48 primeras horas al insecticida, obteniéndose valores de hasta el 72.5 y el 73.32% respecto del valor control para los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón durante 24 y 48 horas, respectivamente. Para tiempos de exposición más largos se registraron mayores % en el contenido de proteínas totales vs control (hasta del 88.8% vs control para los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L del insecticida durante 120 horas) por lo que este parámetro se vio más afectado en los organismos de menor edad expuestos al insecticida organofosforado.

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

A partir de los resultados recogidos en la tabla 25 se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación correspondientes para determinar la posible relación entre los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales y

las concentraciones de diazinón a las que fueron expuestos los dáfidos de la generación parental (tabla 26).

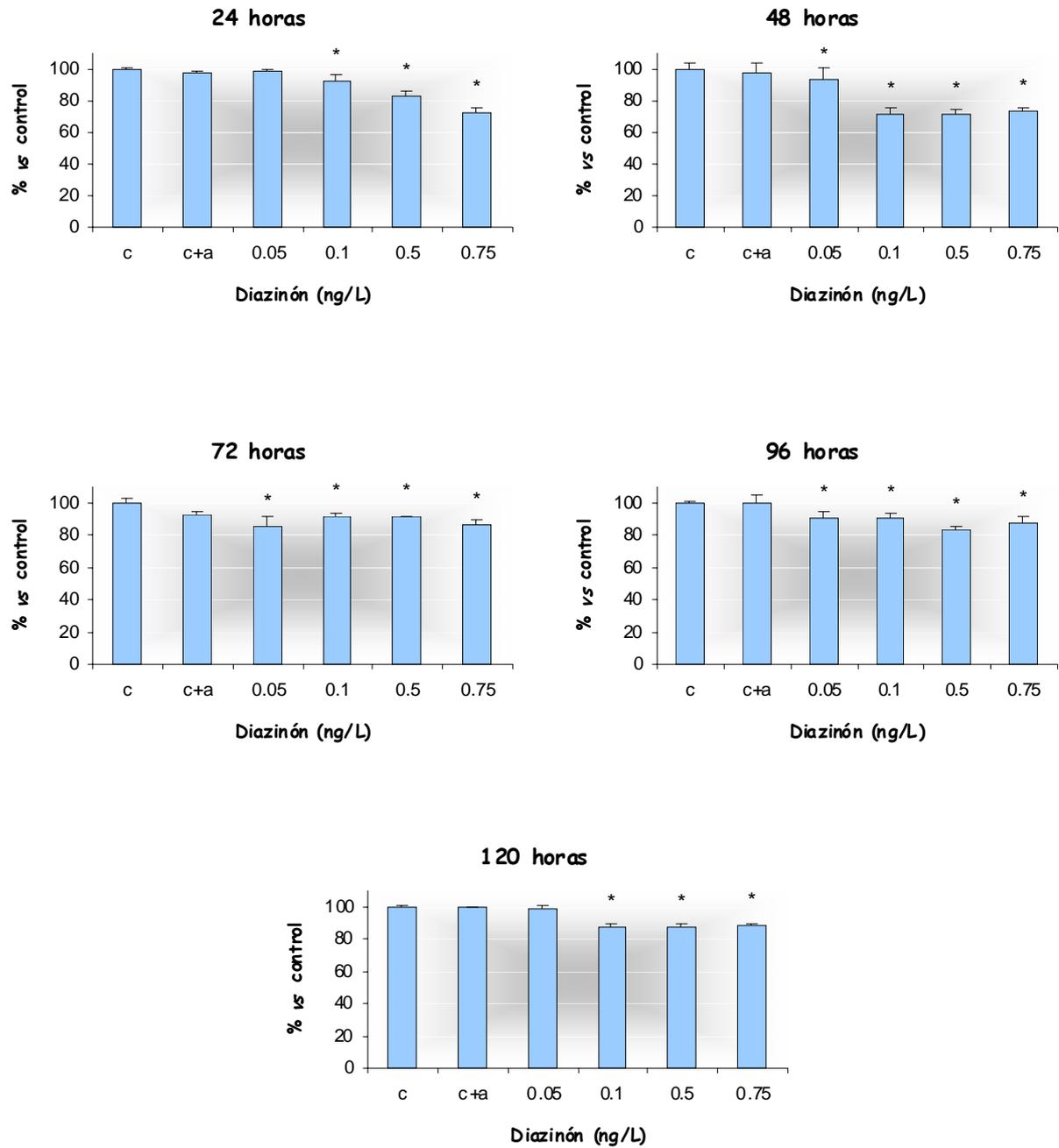


FIGURA 21. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0). * $p < 0.05$

Se observó que, para los organismos expuestos durante 24 horas al insecticida, se obtuvo un coeficiente de correlación más alto ($r^2 = 0.98$) que para los demás tiempos de exposición, indicando un mayor ajuste de los valores obtenidos para el contenido en proteínas a la ecuación de regresión planteada para los individuos mantenidos durante este tiempo bajo los efectos del plaguicida organofosforado.

TABLA 26. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F₀.

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 2.77 - 0.97 x$	0.98
48 hr	$y = 3.86 - 1.21 x$	0.67
72 hr	$y = 5.92 - 0.52 x$	0.46
96 hr	$y = 6.85 - 0.96 x$	0.68
120 hr	$y = 7.01 - 0.92 x$	0.64

Posteriormente, se procedió al cálculo de las CE₅₀, determinándose las concentraciones de diazinón que reducían en un 50% el contenido en proteínas obtenido para el grupo control para cada uno de los tiempos de exposición establecidos (tabla 27).

Los valores calculados mostraron una mayor sensibilidad de los dáfidos al iniciarse el ensayo (CE₅₀-24 y 48 h = 1.41 ng/L de diazinón) cuando son más jóvenes que al finalizar el periodo de exposición (CE₅₀-120 h = 3.64 ng/L), necesiándose menores concentraciones del insecticida para reducir a la mitad el contenido proteico de los dáfidos expuestos.

Los resultados obtenidos a las 72 horas de exposición a diazinón no se ajustaron convenientemente a una regresión lineal ($r^2 = 0.46$), es por ello que el cálculo posterior

de la CE_{50} utilizando la ecuación obtenida no se consideró acertado. En cuanto a las LOEC obtenidas, en la tabla 27 se puede observar que en la mayoría de los casos la concentración de diazinón más baja utilizada ya produjo un descenso significativo en el contenido proteico de los dáfnidos.

TABLA 27. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F_0 .

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	0.05	0.1	1.41
48 hr	—	0.05	1.41
72 hr	—	0.05	5.28
96 hr	—	0.05	3.32
120 hr	0.05	0.1	3.64

5.3.1.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

En la tabla 28 se recogen los valores registrados para el contenido en proteínas totales en los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes de *D. magna* expuestos a las condiciones del estudio. Se observó un incremento en el contenido proteico de los organismos expuestos, de acuerdo con la edad de los mismos.

Al iniciarse el periodo de exposición (0 horas), los niveles de proteínas de los dáfidos control aumentaron considerablemente, mientras que los procedentes de dáfidos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón, oscilaron únicamente entre 0.19 y 4.72 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas. Si se contrastan los resultados tomando como referencia el tiempo de exposición, se observó una reducción del 56.82% vs control, en los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón que iniciaron el ensayo, y del 70% tras 24 horas de exposición. Sin embargo, la reducción fue de sólo un 31.49% vs control a las 120 horas de exposición al insecticida. El efecto del insecticida quedó patente, pues, al observarse un descenso en el contenido proteico conforme se incrementó la concentración de diazinón a la que fueron expuestos los individuos, siendo este efecto más acusado en los individuos más jóvenes.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas para todos los tiempos de exposición al insecticida tal y como se muestra en la tabla 12 del anexo.

El posterior test de Duncan (figuras 57 a 62 del anexo) puso de manifiesto que las diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaban mayoritariamente en los dáfidos expuestos a concentraciones iguales o superiores a 0.1 ng/L de diazinón, salvo algunas excepciones. Además, el grupo de dáfidos cuya edad era 120 horas fue el menos afectado por el insecticida.

No se detectaron diferencias significativas entre el control con acetona y el control para ninguno de los tiempos de exposición.

En la figura 22 se muestra el porcentaje del contenido proteico registrado para cada uno de los grupos de dáfidos expuestos y cada uno de los tiempos de exposición respecto de los valores control.

TABLA 28. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.44 \pm 0.15	1.05 \pm 0.19	2.50 \pm 0.19	3.28 \pm 0.22	5.87 \pm 0.19	6.89 \pm 0.04
c+a	0.35 \pm 0.15	0.96 \pm 0.22	2.40 \pm 0.18	3.30 \pm 0.35	5.78 \pm 0.22	7.04 \pm 0.15
0.05 ng/L	0.36 \pm 0.02	0.54 \pm 0.21 *	2.41 \pm 0.13	2.98 \pm 0.32	5.39 \pm 0.27 *	6.93 \pm 0.08
0.1 ng/L	0.19 \pm 0.04 *	0.53 \pm 0.21 *	2.12 \pm 0.15 *	2.70 \pm 0.12 *	5.16 \pm 0.35 *	6.81 \pm 0.21
0.5 ng/L	0.16 \pm 0.12 *	0.60 \pm 0.09 *	2.39 \pm 0.07 *	2.36 \pm 0.14 *	5.45 \pm 0.02 *	6.71 \pm 0.07
0.75 ng/L	0.19 \pm 0.04 *	0.31 \pm 0.10 *	2.06 \pm 0.27 *	2.57 \pm 0.07 *	5.23 \pm 0.05 *	4.72 \pm 0.27 *

*p < 0.05

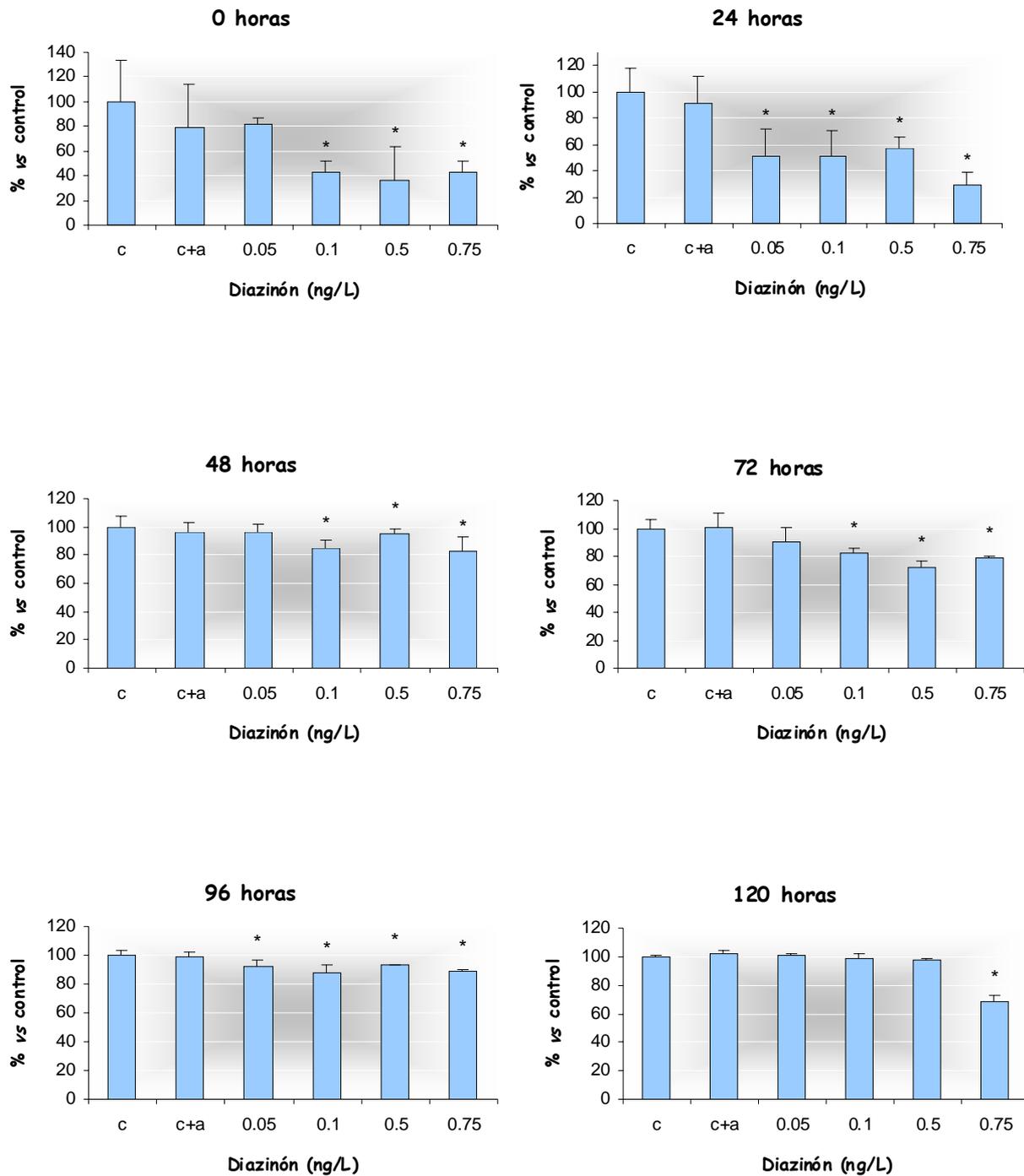


FIGURA 22. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a). * $p < 0.05$

Para los tiempos de exposición menores (edad de los dáfidos entre 0 y 24 horas) se obtuvieron porcentajes del contenido de proteínas totales *vs* control inferiores (entre el 57.14 y el 29.52%) mientras que para tiempos de exposición mayores los % registrados no fueron inferiores al 68.5 y 72 % *vs* control. Esto pone de manifiesto el mayor efecto del insecticida sobre el contenido proteico para tiempos cortos de exposición (menor edad de los dáfidos), al igual que ocurrió para los organismos pertenecientes a la generación parental (F_0) (ver figura 21).

No obstante, esta primera generación de descendientes parece ser más resistente al diazinón, sobre todo al finalizar el ensayo, registrándose porcentajes en el contenido proteico *vs* control mayores que en el caso de la generación parental, para los tiempos de exposición de 96 y 120 horas (ver figuras 22 y 21, respectivamente).

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Tomando como referencia los datos recogidos en la tabla 28 se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación correspondientes a cada uno de los tiempos de exposición al insecticida, para establecer la posible relación entre los valores obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos pertenecientes a la primera generación de descendientes y la concentración de diazinón a la que fueron expuestos cada grupo de dáfidos (tabla 29).

Los datos que parecen ajustarse mejor a las ecuaciones de regresión calculadas fueron los procedentes de los descendientes expuestos durante 120 horas, presentando un índice de correlación más alto ($r^2 = 0.84$).

Seguidamente, se procedió al cálculo de la concentración de diazinón que reduciría en un 50% el valor control obtenido para cada uno de los tiempos de exposición ensayados (tabla 30), de esta manera se obtuvieron las correspondientes CE_{50} . A la vista de los resultados, y tal y como cabía esperar, los dáfidos más jóvenes (24 horas) fueron mucho más sensibles al insecticida que el resto de grupos, obteniéndose una CE_{50} notablemente menor (0.43 ng/L).

Cabe resaltar que en los dáfidos de mayor edad (120 horas) la CE_{50} fue baja, debido únicamente a la gran reducción proteica que produjo la mayor concentración utilizada (0.75 ng/L). Estos dáfidos (los expuestos durante 120 horas al insecticida) fueron los únicos que presentaron una LOEC de 0.75 ng/L, esto es, la concentración de diazinón más alta utilizada, fue la única que redujo significativamente el contenido proteico de estos organismos.

El cálculo de la CE_{50} correspondiente a las 96 horas de exposición a diazinón no se considera muy acertado, puesto que el índice de correlación lineal entre las concentraciones de diazinón ensayadas y el contenido proteico registrado para este tiempo en cada uno de los grupos expuestos, fue sólo de 0.42 (r^2).

TABLA 29. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.76 - 0.54 x$	0.66
48 hr	$y = 2.39 - 0.33 x$	0.56
72 hr	$y = 3.01 - 0.84 x$	0.77
96 hr	$y = 5.52 - 0.36 x$	0.42
120 hr	$y = 7.09 - 2.43 x$	0.84

TABLA 30. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	–	0.05	0.43
48 hr	0.05	0.1	3.45
72 hr	0.05	0.1	1.63
96 hr	–	0.05	7.18
120 hr	0.5	0.75	1.5

5.3.1.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

En la tabla 31 se muestran los resultados relativos al contenido en proteínas totales de los dáfidos pertenecientes a la tercera generación de descendientes (F₁-3^a camada). A la vista de los valores obtenidos para el contenido proteico en esta generación de dáfidos, se observa un aumento de los mismos en relación con la edad de los individuos, registrándose valores entre 0.54 y 7.67 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales para los individuos control a 0 y 120 horas, respectivamente.

Al inicio del ensayo (0 horas), el contenido proteico de los dáfidos procedentes de parentales expuestos a diazinón era menor que en los dáfidos control, obteniéndose valores entre 0.54 y 0.20 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas, para los organismos control y para los correspondientes a 0.5 ng/L diazinón, respectivamente. Pese a registrarse esta diferencia en el contenido proteico de los dáfidos al iniciarse el ensayo, al finalizar éste (120 horas de exposición) los valores obtenidos para los grupos tratados en relación con este parámetro fueron bastante similares al valor control (7.67 y 7.07 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ para los organismos control y para los expuestos a 0.5 ng/L diazinón).

Esta similitud entre el contenido proteico de los dáfidos control y el de los expuestos a la concentración más alta de diazinón ensayada no se puso de manifiesto en los individuos de la primera camada de descendientes, ni en los organismos pertenecientes a la generación parental para los que se obtuvieron, respectivamente, valores entre 6.89 y 4.72 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$, y entre 7.32 y 6.50 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas tras 120 horas de exposición (ver tablas 25 y 28, respectivamente). Por lo tanto, se observó un menor efecto en esta tercera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a diazinón en el contenido proteico, en relación con los individuos pertenecientes a las generaciones F₀ y F₁-1^a camada.

Los valores registrados en la tabla 31 fueron analizados con el análisis de la varianza (ANOVA) observándose diferencias significativas entre el contenido proteico registrado en los dáfidos expuestos a diazinón durante todos los tiempos ensayados, en relación con los correspondientes valores control (ver tabla 13 del anexo).

TABLA 31. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.54 ± 0.16	1.69 ± 0.12	3.07 ± 0.12	4.20 ± 0.07	5.65 ± 0.08	7.67 ± 0.17
c+a	0.42 ± 0.07	1.64 ± 0.11	3.09 ± 0.21	4.41 ± 0.18	5.50 ± 0.26	7.26 ± 0.07
0.05 ng/L	$0.37 \pm 0.07^*$	1.69 ± 0.08	$2.75 \pm 0.33^*$	$3.53 \pm 0.28^*$	5.60 ± 0.16	$6.19 \pm 0.23^*$
0.1 ng/L	$0.38 \pm 0.13^*$	$1.30 \pm 0.02^*$	$2.72 \pm 0.08^*$	$3.71 \pm 0.16^*$	$5.14 \pm 0.12^*$	$6.79 \pm 0.26^*$
0.5 ng/L	$0.20 \pm 0.09^*$	$1.46 \pm 0.11^*$	$2.61 \pm 0.12^*$	$3.91 \pm 0.07^*$	$5.15 \pm 0.17^*$	$7.07 \pm 0.19^*$

* $p < 0.05$

El posterior test de Duncan (figuras 63 a 68 del anexo) puso de manifiesto que las diferencias detectadas previamente con el análisis de la varianza se encontraban entre los valores presentados por los dáfidos expuestos a todos los tratamientos y los correspondientes valores control, para los tiempos de 0, 48, 72 y 120 horas, y entre los registrados para los dáfidos expuestos a concentraciones iguales o superiores a 0.1 ng/L de diazinón y los valores control para los grupos expuestos a las condiciones del ensayo durante 24 y 96 horas ($p < 0.05$).

No se detectaron diferencias significativas entre el contenido proteico registrado para el control con acetona y el del grupo control.

En la figura 23 se muestran los porcentajes *vs* control del contenido proteico de los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes. A la vista de los resultados, se observa que los niveles proteicos (en % respecto al control) más bajos se determinaron en los dáfidos que iniciaron el ensayo (0 horas) obteniéndose valores que llegaron a representar hasta el 37.4% del contenido proteico registrado en los organismos control para los dáfidos expuestos a 0.5 ng/L del insecticida. A lo largo del periodo de exposición al diazinón, estos valores fueron recuperándose, registrándose un contenido proteico que nunca estuvo por debajo del 80% del valor control. Este efecto contrasta con el encontrado para el caso de los descendientes pertenecientes a la primera camada (ver figura 22), para los que el contenido proteico llegó a representar porcentajes $< 30\%$ para todos los grupos (por ejemplo para los organismos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón). Este análisis vuelve a poner de manifiesto la menor sensibilidad de los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes en relación con el contenido proteico, en relación con los organismos pertenecientes a la primera camada de descendientes. Asimismo, queda patente la mayor resistencia de los dáfidos descendientes en relación con la generación parental de *D. magna* expuesta a diazinón (ver figura 21).

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE_{50} .

Tras analizar el contenido en proteínas totales de los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes, se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión e

índices de correlación correspondientes a los valores obtenidos para cada uno de los tiempos de exposición ensayados (tabla 32).

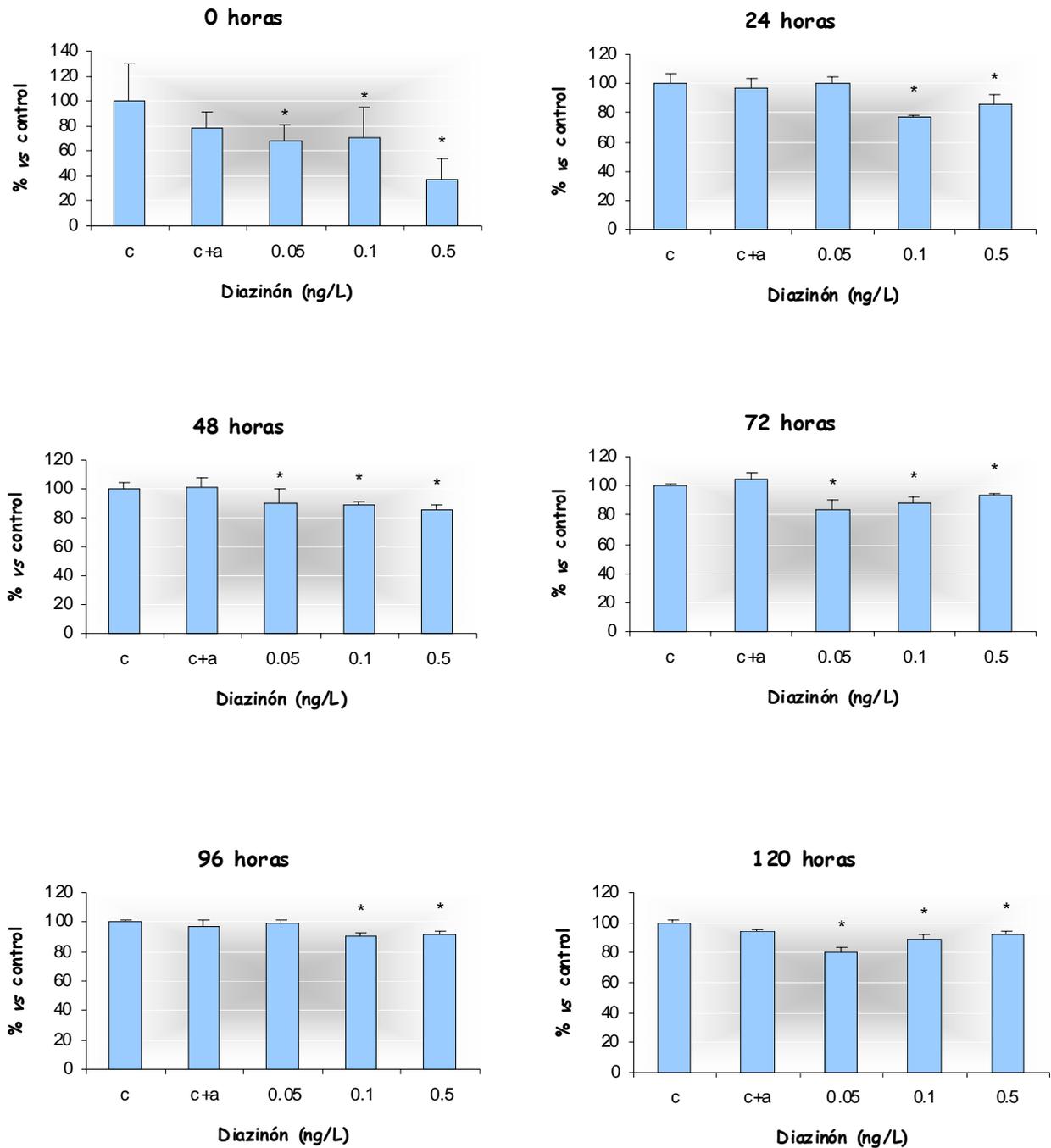


FIGURA 23. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_{1-3}^a). * $p < 0.05$

TABLA 32. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 1.59 - 0.34 x$	0.41
48 hr	$y = 2.89 - 0.62 x$	0.72
72 hr	$y = 3.83 - 0.05 x$	0.04
96 hr	$y = 5.52 - 0.84 x$	0.69
120 hr	$y = 6.91 - 0.12 x$	0.04

Para los tiempos de exposición de 72 y 120 horas se comprobó que no existía correlación lineal entre los valores obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos y el aumento de la concentración de diazinón ensayada, registrándose coeficientes de correlación (r^2) próximos a 0.

Posteriormente, se calcularon las concentraciones de diazinón a las que se vería reducido el contenido proteico en un 50% (CE_{50} de la tabla 33). No se calcularon las CE_{50} correspondientes a las 72 y 120 horas de exposición debido a que los resultados no se ajustaron a una regresión lineal. Para los demás tiempos de exposición, los valores obtenidos fueron muy similares y las CE_{50} para los individuos más jóvenes fueron menores indicando una mayor sensibilidad de estos dáfidos.

En relación con las otras dos generaciones de dáfidos contempladas en este estudio, las CE_{50} calculadas a las 24 horas de exposición a diazinón sobre el contenido proteico de la generación parental (F_0) y la generación F_1-1^a camada de descendientes, revelaron también una mayor sensibilidad a los efectos del insecticida de los organismos más jóvenes (ver tablas 27 y 30).

En la tabla 33 aparecen detallados, también, los valores para las LOEC y NOEC a los distintos tiempos de exposición ensayados. Se observa que para todos los tiempos de exposición ensayados, se encontró un descenso significativo en los niveles proteicos de los dáfidos expuestos a 0.05 ó 0.1 ng/L de diazinón.

TABLA 33. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	0.05	0.1	2.19
48 hr	—	0.05	2.18
72 hr	—	0.05	(*)
96 hr	0.05	0.1	3.21
120 hr	—	0.05	(*)

(*) ver aclaración en el texto.

5.3.2. Efecto del herbicida molinato en los niveles proteicos de *D. magna*.

En las tablas 34, 37 y 40 se detallan los valores obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos pertenecientes a la generación parental (F_0), primera (F_1-1^a) y tercera camada de descendientes (F_1-3^a) habiendo sido expuestos a concentraciones crecientes del herbicida carbamato molinato, y ensayando los mismos tiempos de exposición que para el caso del insecticida diazinón.

5.3.2.1. Generación parental (F_0).

Los valores registrados en la tabla 34 ponen de manifiesto un aumento del contenido en proteínas totales para los dáfidos de la generación parental de *D. magna* expuestos a molinato en relación con el aumento de tamaño (edad) de los organismos. Se obtuvieron valores entre 1.41 y 9.17 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas, para el caso de los individuos mantenidos en condiciones control.

El efecto de las crecientes concentraciones de herbicida ensayadas, se puso de manifiesto detectándose un descenso en el contenido proteico de los dáfidos, siendo este efecto más acusado en los organismos más jóvenes o expuestos a molinato durante periodos cortos de tiempo. Así, se obtuvieron valores de entre 3.49 y 1.94 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales (individuos control y expuestos a 9.42 mg/L de molinato, respectivamente), para los organismos expuestos durante 24 horas al plaguicida, y entre 9.17 y 8.70 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ para los expuestos durante 120 horas.

Al analizar los resultados de la tabla 34 con el análisis de la varianza ANOVA se detectaron diferencias significativas para el contenido en proteínas totales presentado por los dáfidos expuestos al herbicida para todos los tiempos de exposición ensayados (ver tabla 14 del anexo).

Posteriormente, se aplicó el test de Duncan (figuras 69 a 73 del anexo) para determinar entre qué grupos se encontraban las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza ($p < 0.05$).

TABLA 34. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.41 \pm 0.19	3.49 \pm 0.04	5.29 \pm 0.27	7.79 \pm 0.12	9.15 \pm 0.05	9.17 \pm 0.10
c+a	1.41 \pm 0.19	3.43 \pm 0.02	5.27 \pm 0.31	7.31 \pm 0.26	9.16 \pm 0.47	9.11 \pm 0.07
3.77 mg/L	1.41 \pm 0.19	2.50 \pm 0.21 *	4.78 \pm 0.30 *	6.02 \pm 0.09 *	7.73 \pm 0.26 *	8.95 \pm 0.44
4.71 mg/L	1.41 \pm 0.19	1.90 \pm 0.04 *	4.59 \pm 0.17 *	5.36 \pm 0.29 *	7.05 \pm 0.16 *	9.11 \pm 0.40
6.28 mg/L	1.41 \pm 0.19	2.00 \pm 0.11 *	4.19 \pm 0.20 *	5.35 \pm 0.21 *	7.12 \pm 0.11 *	8.43 \pm 0.14 *
9.42 mg/L	1.41 \pm 0.19	1.94 \pm 0.08 *	3.99 \pm 0.18 *	5.24 \pm 0.21 *	6.93 \pm 0.26 *	8.70 \pm 0.34 *

*p < 0.05

Tras efectuar el análisis estadístico se pudo apreciar que, a excepción del grupo de dáfidos expuestos durante 120 horas al herbicida, para los demás tiempos de exposición, los animales expuestos a todos los tratamientos con molinato presentaron valores significativamente diferentes en relación con los valores control correspondientes. Para los individuos expuestos al tiempo más largo ensayado en este estudio, únicamente los expuestos a 6.28 y 9.42 mg/L de molinato presentaron contenidos proteicos significativamente diferentes del valor control ($9.17 \mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas).

El análisis estadístico efectuado no detectó la existencia de diferencias significativas entre el valor correspondiente al contenido proteico de los animales pertenecientes al grupo “control con acetona” y el valor del grupo control para ninguno de los tiempos ensayados.

Al contrastar los valores obtenidos en esta parte del estudio (tabla 34) con los resultados obtenidos al exponer a una generación de parentales de *D. magna* al insecticida diazinón (ver tabla 25), se observó que el molinato provocó un mayor efecto en el contenido proteico de los dáfidos expuestos al iniciarse el ensayo (primeras 24 horas de exposición), mientras que el diazinón tuvo un efecto más leve sobre este parámetro para el mismo tiempo de exposición (se obtuvieron valores entre 2.80 y 2.03 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales para los parentales mantenidos en condiciones control y para los expuestos a la concentración más alta de diazinón ensayada, respectivamente). Al finalizar el ensayo (120 horas de exposición a los plaguicidas), se obtuvieron mayores reducciones del contenido proteico en el caso del insecticida diazinón que en los dáfidos expuestos al herbicida molinato.

En la figura 24 se detallan los porcentajes del contenido proteico de los dáfidos de la generación parental expuestos a molinato vs control. A la vista de los porcentajes representados se observa que, a las 24 horas de exposición a molinato, los parentales registraron contenidos proteicos que llegaron a suponer menos del 60% del valor presentado por el grupo control, obteniéndose un valor del 55.6% para los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L del herbicida.

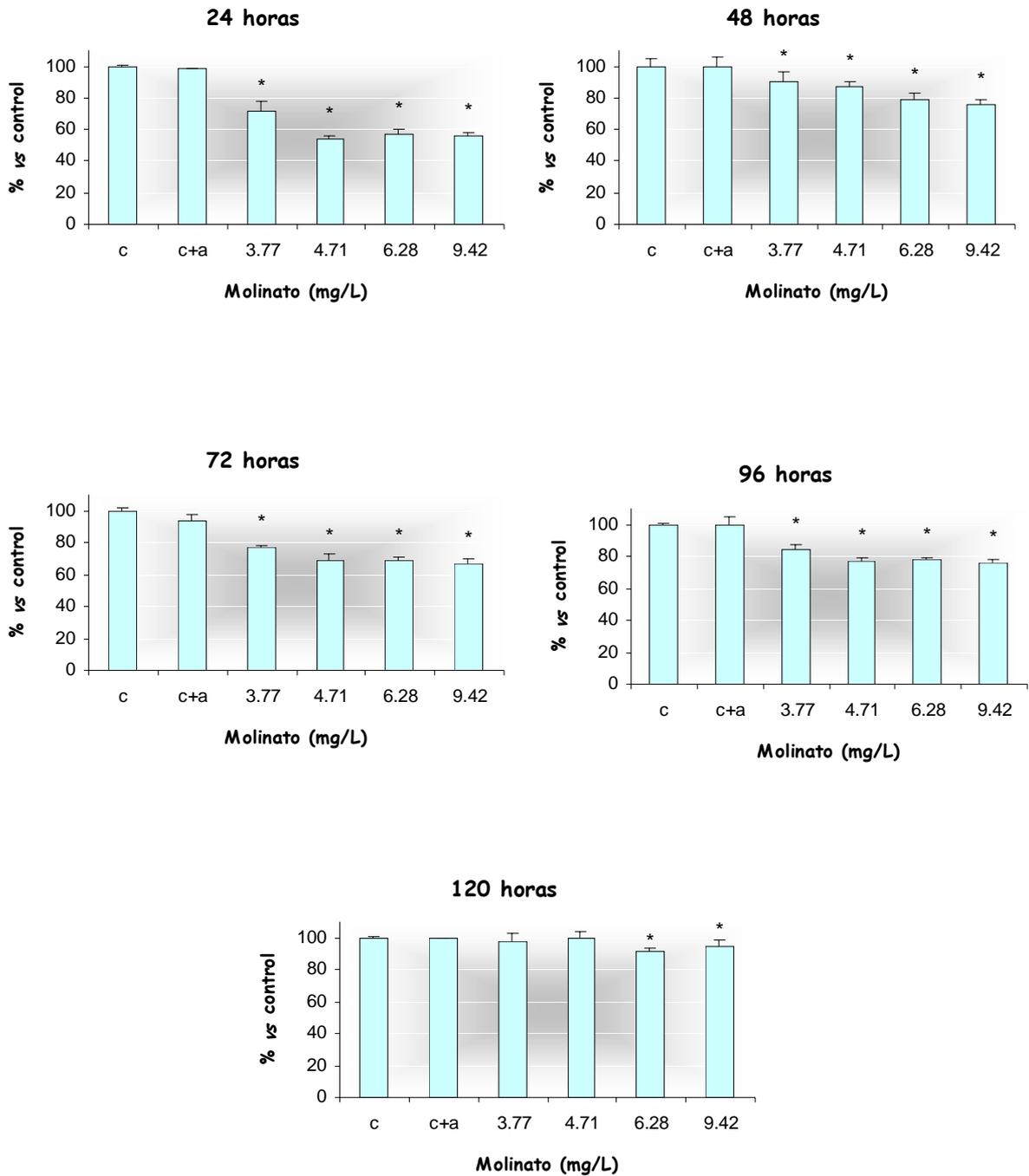


FIGURA 24. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0). * $p < 0.05$

En el caso de la mayor concentración de molinato ensayada, se obtuvieron valores de hasta el 94.87% vs control para los dáfidos expuestos durante 120 horas a 9.42 mg/L de molinato.

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Para estudiar la relación entre los valores obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos de la generación parental de *D. magna* y las concentraciones de molinato ensayadas, se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión y los correspondientes índices de correlación para cada uno de los tiempos de exposición al herbicida (tabla 35).

TABLA 35. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F₀.

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 3.18 - 0.17 x$	0.86
48 hr	$y = 5.27 - 0.14 x$	0.98
72 hr	$y = 7.27 - 0.27 x$	0.88
96 hr	$y = 8.75 - 0.24 x$	0.89
120 hr	$y = 9.17 - 0.06 x$	0.70

Para todos los tiempos de exposición ensayados se obtuvieron índices de correlación ≥ 0.70 , indicando un buen ajuste lineal de los resultados obtenidos a las ecuaciones de regresión determinadas.

Posteriormente, se calcularon las CE₅₀ para este parámetro (tabla 36), encontrándose valores entre 8.44 y 76.42 mg/L de molinato, para los dáfidos expuestos durante 24 y 120 horas, respectivamente, al herbicida. Estos valores ponen de manifiesto la mayor sensibilidad de los dáfidos jóvenes (24 horas) de la generación F₀ al plaguicida

molinato, de tal forma que este herbicida indujo un mayor descenso de los niveles de proteínas en los dáfidos de corta edad y, por lo tanto, se registraron menores CE_{50} para tiempos cortos de exposición. Este efecto también fue observado en el caso de los parentales que se expusieron a diazinón (ver tabla 27), aunque en aquel caso las diferencias encontradas entre los diferentes tiempos no fueron tan grandes.

TABLA 36. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F_0 .

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	—	3.77	8.44
48 hr	—	3.77	18.75
72 hr	—	3.77	12.5
96 hr	—	3.77	17.39
120 hr	4.71	6.28	76.42

Por otra parte, en la tabla 36 se puede observar también que hasta las 96 horas de exposición al herbicida la concentración más baja ensayada produjo diferencias significativas (LOEC = 3.77 mg/L molinato) en el contenido proteico de los dáfidos de la generación parental, mientras que para el tiempo de exposición más largo (120 horas), donde los dáfidos eran de mayor edad, la LOEC fue de 6.28 mg/L del plaguicida.

5.3.2.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

Los resultados relativos al contenido proteico de los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a los efectos del molinato, se detallan en la tabla 37.

Se observó un aumento del contenido en proteínas totales en los dáfidos de mayor tamaño habiéndose registrado valores comprendidos entre 1.15 y 7.89 $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales para los animales control a las 0 y 120 horas.

Para un mismo tiempo de exposición al herbicida, se detectó un descenso en el contenido proteico en consonancia con la creciente concentración de molinato ensayada. Así, se obtuvieron valores entre 1.15 (control) y 0.29 (6.28 mg/L molinato), y entre 7.89 (control) y 6.00 (6.28 mg/L molinato) $\mu\text{g dafnia}^{-1}$ de proteínas totales para los dáfidos al inicio del estudio (0 horas) y al finalizar éste (120 horas de exposición al plaguicida), respectivamente. Las mayores reducciones en el contenido proteico se detectaron, pues, en los dáfidos más jóvenes obteniéndose para los individuos expuestos a la mayor concentración del herbicida contenidos proteicos 3.96 y 1.31 veces menores que los correspondientes valores control al inicio del periodo de exposición (0 horas) y al finalizar el mismo (120 horas), respectivamente.

Los datos recogidos en la tabla 37 fueron analizados con el análisis de la varianza (ANOVA) detectándose diferencias significativas entre el contenido proteico de los dáfidos expuestos a molinato y los animales control para todos los tiempos de exposición ensayados (ver tabla 15 del anexo).

Posteriormente, se efectuó un test de Duncan (figuras 74 a 79 del anexo) poniéndose de manifiesto que las diferencias detectadas correspondían a las existentes entre todos los grupos tratados y los correspondientes valores control para todos los tiempos de exposición, a excepción del tiempo de 72 horas para el que se registraron diferencias significativas únicamente entre el valor determinado en los animales expuestos a ≥ 4.71 mg/L herbicida y el valor control ($p < 0.05$).

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el contenido proteico registrado para los dáfidos pertenecientes al grupo “control con acetona” y el grupo control.

TABLA 37. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.15 \pm 0.12	1.28 \pm 0.12	2.65 \pm 0.14	4.21 \pm 0.10	7.70 \pm 0.18	7.89 \pm 0.15
c+a	1.17 \pm 0.06	1.14 \pm 0.12	2.63 \pm 0.10	4.13 \pm 0.44	7.25 \pm 0.52	7.27 \pm 0.07
3.77 mg/L	0.55 \pm 0.08 *	1.04 \pm 0.08 *	2.22 \pm 0.12 *	4.12 \pm 0.07	6.38 \pm 0.33 *	7.00 \pm 0.21 *
4.71 mg/L	0.31 \pm 0.11 *	0.72 \pm 0.10 *	2.28 \pm 0.11 *	3.82 \pm 0.23 *	5.56 \pm 1.06 *	6.60 \pm 0.56 *
6.28 mg/L	0.29 \pm 0.04 *	0.67 \pm 0.02 *	0.81 \pm 0.15 *	3.54 \pm 0.11 *	5.40 \pm 0.38 *	6.00 \pm 0.62 *

*p < 0.05

En la figura 25, se detallan los porcentajes del contenido proteico vs control de los dáfnidos de la primera generación de descendientes de *D. magna* expuestos a molinato.

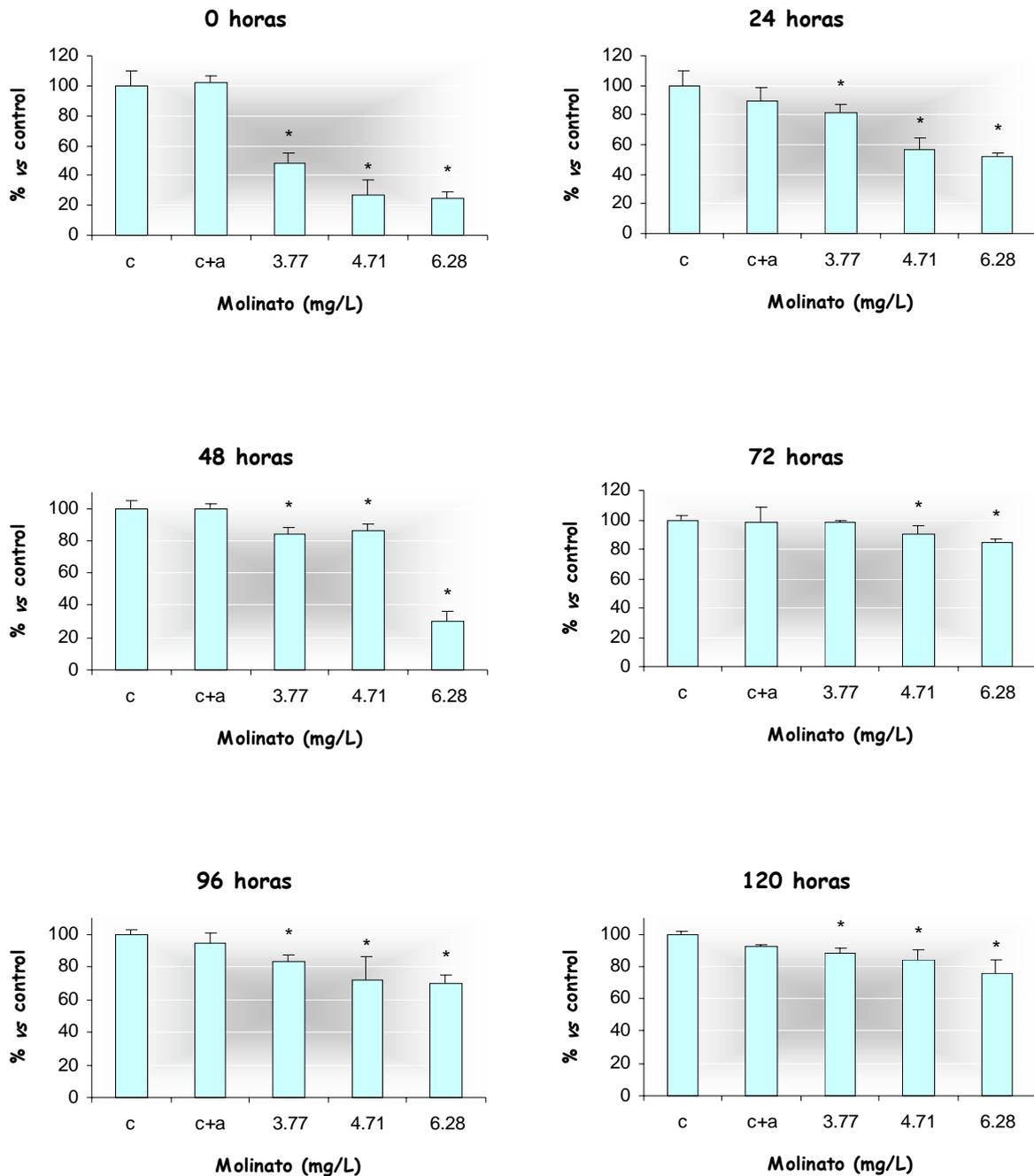


FIGURA 25. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a). * $p < 0.05$

Se observan % vs control de más del 30% para los organismos cuyos parentales fueron expuestos a 4.71 y 6.28 mg/L de molinato, al iniciarse el ensayo (0 horas), siendo los porcentajes > 70% vs control para todos los grupos expuestos al herbicida durante ≥ 72 horas. Este último dato contrasta con el efecto observado sobre el contenido proteico de la generación parental expuesta a molinato (ver figura 24), en la que se detectaron porcentajes vs control < 70% para los animales expuestos durante 72 horas a los efectos del plaguicida.

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE_{50}

Se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión y de los correspondientes índices de correlación para determinar la posible correspondencia entre los valores obtenidos para el contenido proteico de los dáfnidos expuestos y la concentración de molinato ensayada (ver tabla 38). Los índices de correlación comprendidos entre 0.80 y 0.99, indicaron un buen ajuste de los resultados obtenidos.

TABLA 38. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 1.30 - 0.10 x$	0.95
48 hr	$y = 2.88 - 0.24 x$	0.80
72 hr	$y = 4.29 - 0.10 x$	0.88
96 hr	$y = 7.68 - 0.38 x$	0.98
120 hr	$y = 7.96 - 0.29 x$	0.99

Posteriormente, se procedió al cálculo de las CE_{50} (tabla 39), obteniéndose valores de 6.60 y 6.48 mg/L para los organismos más jóvenes (24-48 horas). Así pues, se observó una mayor sensibilidad al molinato en los dáfidos jóvenes en relación con los de mayor edad.

TABLA 39. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	—	3.77	6.60
48 hr	—	3.77	6.48
72 hr	3.77	4.71	21.85
96 hr	—	3.77	10.08
120 hr	—	3.77	13.84

Además, en la tabla 39 también se puede observar que, para todos los tiempos de exposición salvo el de 72 horas, la concentración de molinato más baja utilizada (3.77 mg/L) ya produjo una reducción significativa del contenido proteico en los dáfidos objeto de estudio.

5.3.2.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

En la tabla 40 se recogen los resultados obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes (F₁-3^a) expuestos a molinato. Se observó un incremento en el contenido en proteínas totales asociado al crecimiento de los dáfidos, registrándose valores entre 1.21 y 7.77 µg dafnia⁻¹ de proteínas totales para los organismos control a las 0 y 120 horas de iniciarse el ensayo, respectivamente. Este incremento también se observó para cada uno de los grupos expuestos a los distintos tratamientos con el herbicida. A las 120 horas de exposición a molinato, los dáfidos de mayor edad presentaron un contenido proteico próximo al de los organismos control, que fue sólo menor al control en aquellos dáfidos expuestos a la mayor concentración de herbicida (6.28 mg/L).

Los resultados de la tabla 40 fueron contrastados con un análisis de la varianza (ANOVA) que puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los grupos de dáfidos expuestos a molinato y el valor control (tabla 16 del anexo).

Finalmente, se aplicó un test de Duncan ($p < 0.05$) para determinar entre qué grupos se encontraban estas diferencias (figuras 80 a 85 del anexo). De esta manera, para los tiempos de 0, 24, 48 y 96 horas, todos los grupos tratados con molinato presentaron diferencias significativas con los valores control correspondientes; para el tiempo de exposición de 72 horas los organismos que presentaron diferencias significativas fueron los expuestos a ≥ 4.71 mg/L de molinato, mientras que para los expuestos durante 120 horas al plaguicida únicamente los descendientes expuestos a 6.28 mg/L del herbicida presentaron diferencias significativas con el valor control.

En la figura 26, se muestran los porcentajes *vs* control para el contenido proteico de los organismos de la tercera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a molinato. Para todos los grupos ensayados se detectaron valores proteicos superiores al 60% en relación con los valores control correspondientes, registrándose porcentajes inferiores únicamente para los dáfidos expuestos a la concentración de 6.28 mg/L de molinato al iniciarse el ensayo (0 horas: 43% *vs* control) y a las 96 horas de exposición al herbicida (53.21% *vs* control).

TABLA 40. Contenido en proteínas totales ($\mu\text{g} \times \text{dafnia}^{-1}$) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.21 \pm 0.12	1.35 \pm 0.18	3.66 \pm 0.32	5.62 \pm 0.20	8.10 \pm 0.10	7.77 \pm 0.04
c+a	1.18 \pm 0.15	1.26 \pm 0.15	3.74 \pm 0.37	5.65 \pm 0.31	7.26 \pm 0.34	7.68 \pm 0.26
3.77 mg/L	0.76 \pm 0.07 *	1.00 \pm 0.12 *	2.94 \pm 0.29 *	5.62 \pm 0.12	6.87 \pm 0.45 *	7.19 \pm 0.21
4.71 mg/L	0.74 \pm 0.06 *	0.86 \pm 0.08 *	2.56 \pm 0.19 *	4.91 \pm 0.27 *	6.87 \pm 0.24 *	7.36 \pm 0.04
6.28 mg/L	0.52 \pm 0.11 *	0.93 \pm 0.20 *	2.39 \pm 0.12 *	3.95 \pm 0.47 *	4.31 \pm 0.23 *	6.98 \pm 0.85 *

*p < 0.05

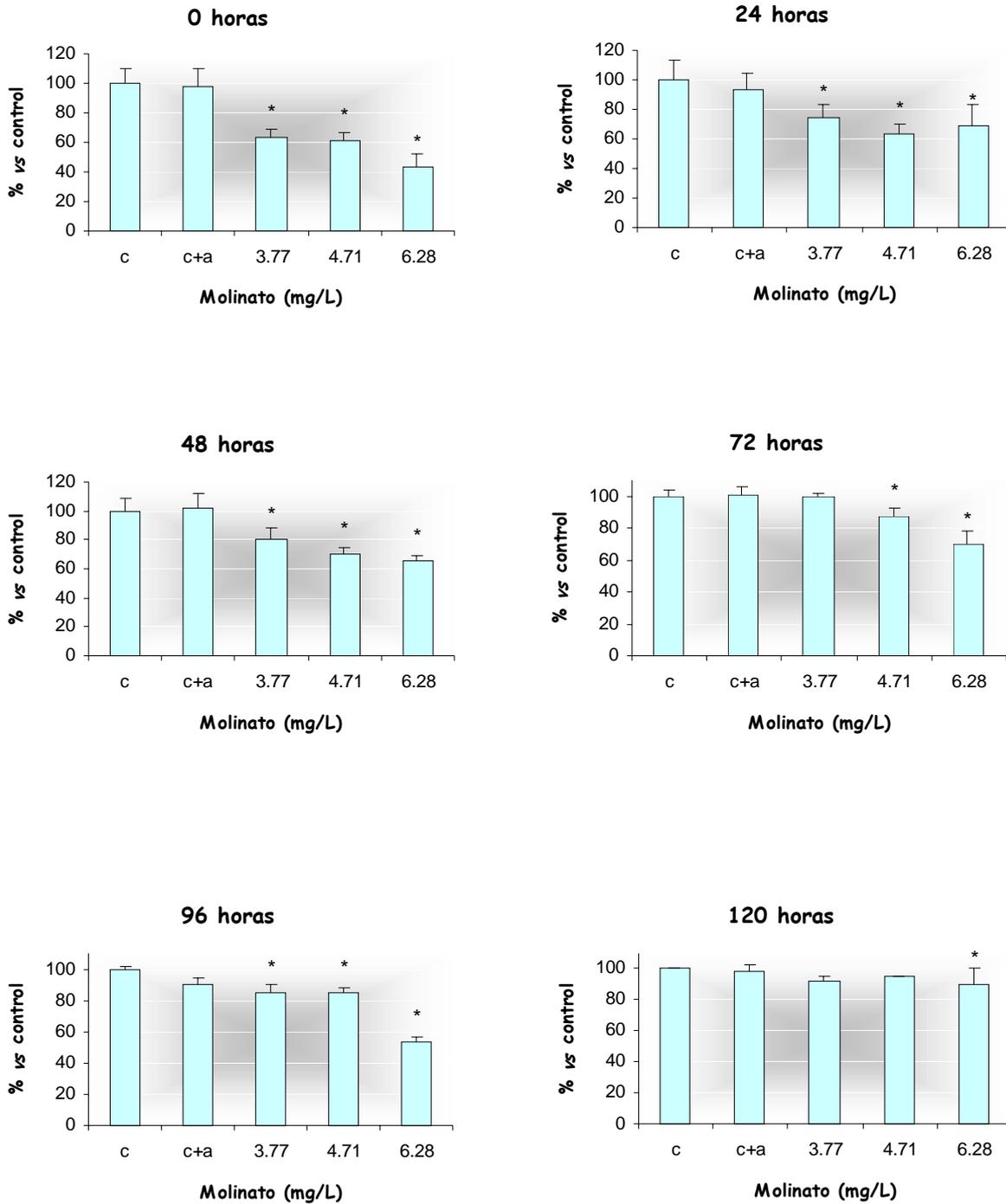


FIGURA 26. Contenido en proteínas totales (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a). * $p < 0.05$

El efecto del herbicida encontrado sobre el contenido proteico de esta tercera camada de descendientes contrasta con lo observado para las generaciones F₁-1^a camada y generación parental (F₀). Para la primera generación de descendientes (ver figura 25) se detectaron porcentajes inferiores al 60% respecto al control para los organismos expuestos a todas las concentraciones de molinato al iniciarse el ensayo. Esto pone de manifiesto una mayor sensibilidad de los descendientes de la primera camada al molinato sobre el contenido proteico en relación con los de la tercera camada de descendientes. La generación parental, sin embargo, únicamente registró valores que supusieron <60% vs control para los grupos expuestos durante 24 horas al plaguicida a concentraciones iguales o superiores a 4.71 mg/L de molinato (ver figura 24), siendo pues, más resistente a los efectos de éste que los dáfidos de la generación F₁-1^a camada. De esta manera, los individuos integrantes de la tercera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a molinato resultan ser más resistentes al herbicida molinato en relación con su contenido proteico que los de la primera camada, pero siguen siendo más sensibles que los dáfidos de la generación parental.

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Se calcularon las ecuaciones de regresión y los índices de correlación correspondientes a los resultados recogidos en la tabla 40 obteniéndose para todos los tiempos de exposición ensayados r^2 superiores a 0.80, lo cual indica un buen ajuste de los resultados obtenidos a las ecuaciones calculadas (tabla 41).

Posteriormente, se procedió al cálculo de las CE₅₀ correspondientes a las concentraciones de molinato que reducirían en un 50% los valores control obtenidos para el contenido proteico de los dáfidos de la generación F₁-3^a camada de *D. magna* (tabla 42). Se observó que el valor calculado tras 120 horas de exposición a molinato (CE₅₀ = 32.29 mg/L) fue el más elevado, lo que indicaría una mayor resistencia de estos dáfidos al herbicida y por lo tanto un menor descenso del contenido en proteínas totales en los individuos de mayor edad expuestos al herbicida.

TABLA 41. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y el contenido en proteínas totales de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 1.31 - 0.07 x$	0.93
48 hr	$y = 3.66 - 0.214 x$	0.99
72 hr	$y = 5.90 - 0.24 x$	0.80
96 hr	$y = 8.47 - 0.52 x$	0.87
120 hr	$y = 7.76 - 0.12 x$	0.94

TABLA 42. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para el contenido en proteínas totales y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	—	3.77	9.07
48 hr	—	3.77	8.71
72 hr	3.77	4.71	12.87
96 hr	—	3.77	8.50
120 hr	4.71	6.28	32.29

El efecto observado en la tercera camada de descendientes también fue observado para la generación parental de dáfidos expuestos a molinato (ver tabla 36), aunque el

valor calculado para esta generación de descendientes (F_1 -3ª camada) es notablemente inferior al calculado para la generación F_0 ($CE_{50} = 76.42$ mg/L molinato), lo cual indica una mayor sensibilidad de la tercera camada de descendientes en relación con la de parentales.

En la mayoría de los casos, el herbicida provocó un descenso significativo en el contenido proteico de los dáfidos expuestos a la concentración más baja ensayada, presentando, pues, un valor menor para la LOEC (3.77 mg/L).

5.4. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de *D. magna*.

5.4.1. Efecto del insecticida diazinón.

5.4.1.1. Generación parental (F₀).

En la tabla 43 se detallan los valores obtenidos para el peso (μg de peso seco dafnia⁻¹) de los dáfidos de la generación parental (F₀) de *D. magna* expuestos a distintas concentraciones de diazinón, y en relación con la edad de los organismos.

Se observó un incremento del peso de los dáfidos en consonancia con la edad de los individuos, obteniéndose valores entre 11.0 (0 horas) y 149.6 μg de peso dafnia⁻¹ (120 horas) para los organismos control. En los dáfidos expuestos a las distintas concentraciones del insecticida se detectó también un incremento del peso aunque de menor magnitud, especialmente en los animales expuestos a la concentración de diazinón más alta (0.75 ng/L de diazinón) el incremento de peso fue notablemente inferior. De esta manera, para este grupo de dáfidos se obtuvieron valores entre 11.0 (0 horas) y 103.6 μg de peso dafnia⁻¹ (120 horas).

El efecto del insecticida diazinón se puso de manifiesto al registrarse valores decrecientes en el peso de los dáfidos expuestos a concentraciones crecientes del insecticida, efecto que resultó ser más acusado para tiempos de exposición más largos. Así, se obtuvieron valores entre 24.8 y 16.8 μg de peso dafnia⁻¹ para los organismos expuestos a las condiciones control y a 0.75 ng/L del insecticida, respectivamente, durante 24 horas, y entre 149.6 y 103.6 μg de peso dafnia⁻¹ para los mismos grupos a las 120 horas de iniciarse el ensayo.

Los datos de la tabla 43 fueron analizados estadísticamente con un análisis de la varianza (ANOVA), detectándose diferencias significativas entre los valores registrados para los grupos de dáfidos tratados con diazinón, y los registrados para los dáfidos control (ver tabla 17 del anexo).

TABLA 43. Peso ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	11.0 \pm 0.7	24.8 \pm 1.1	35.2 \pm 4.1	72.2 \pm 2.9	108.0 \pm 3.8	149.6 \pm 10.8
c+a	11.0 \pm 0.7	25.6 \pm 2.6	33.4 \pm 1.3	71.0 \pm 4.4	91.2 \pm 3.1	142.4 \pm 6.1
0.05 ng/L	11.0 \pm 0.7	24.8 \pm 5.4	31.8 \pm 1.8	66.0 \pm 2.3 *	78.4 \pm 9.2 *	132.0 \pm 5.6 *
1.0 ng/L	11.0 \pm 0.7	23.7 \pm 7.3	30.4 \pm 4.3	63.0 \pm 1.7 *	74.2 \pm 3.9 *	111.6 \pm 4.8 *
0.5 ng/L	11.0 \pm 0.7	23.0 \pm 3.0	22.6 \pm 5.6 *	62.4 \pm 2.4 *	75.0 \pm 4.4 *	110.5 \pm 4.5 *
0.75 ng/L	11.0 \pm 0.7	16.8 \pm 2.9 *	21.6 \pm 6.1 *	62.3 \pm 3.3 *	58.9 \pm 11.6 *	103.6 \pm 3.3 *

*p < 0.05

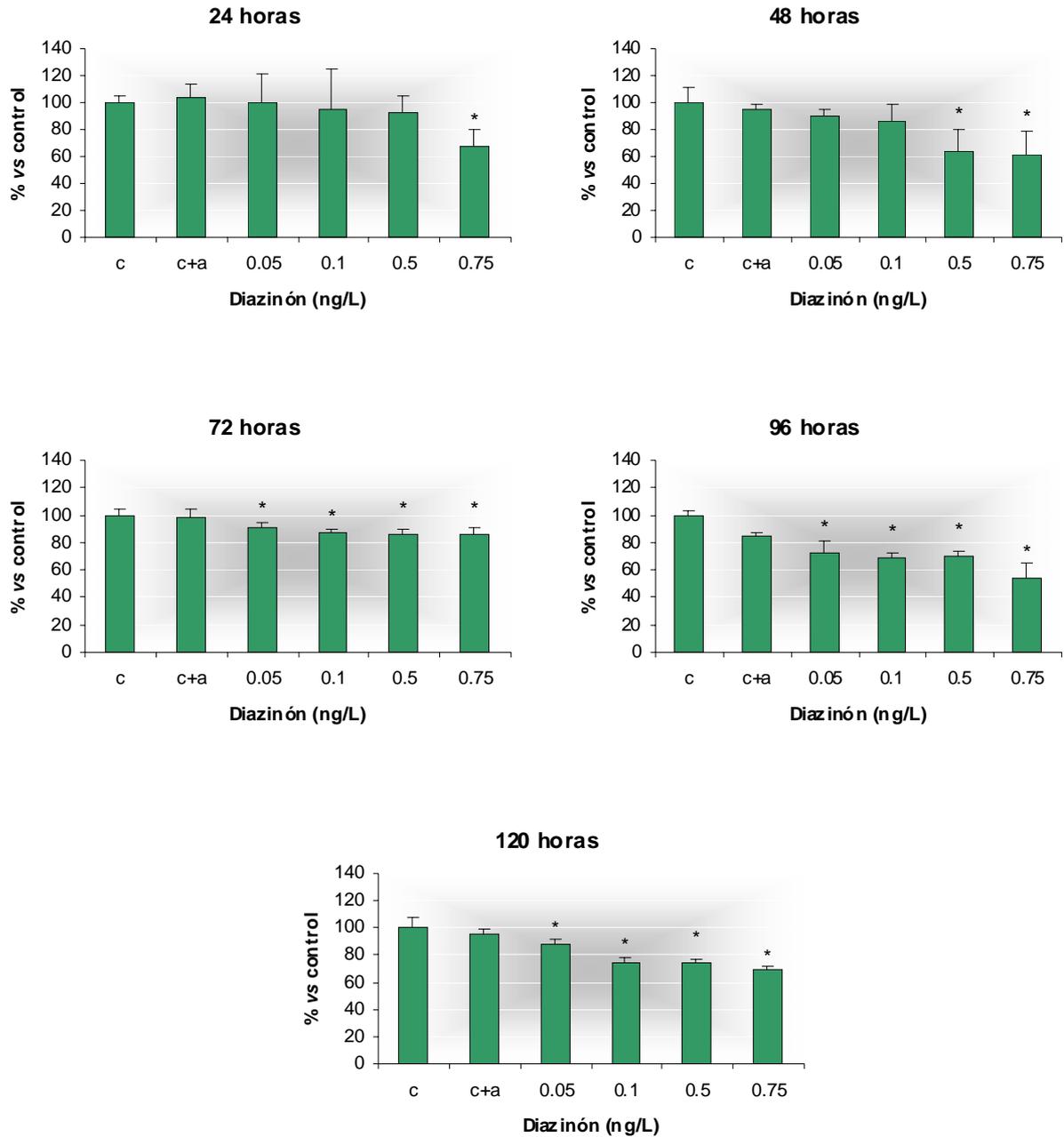


FIGURA 27. Peso (% vs control) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0). * $p < 0.05$

Posteriormente, se aplicó el test de Duncan (figuras 86 a 90 del anexo) confirmándose que las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza se situaban entre el valor presentado por los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón y el valor control para el tiempo de 24 horas; entre el peso de los grupos expuestos a ≥ 0.5 ng/L del insecticida y los correspondientes valores control para un tiempo de

exposición de 48 horas; y entre los valores aportados por todos los grupos tratados y los controles respectivos para tiempos de exposición ≥ 72 horas ($p < 0.05$). En ningún caso se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo expuesto al disolvente (acetona) utilizado.

En la figura 27 se muestran los porcentajes del peso de los dáfidos *vs* control a los distintos tiempos de exposición al diazinón que se ensayaron en esta parte del estudio. Para el primer tiempo de exposición (24 horas) únicamente el grupo de dáfidos expuestos a la concentración más alta del insecticida (0.75 ng/L) mostró un porcentaje *vs* control $< 80\%$. Sin embargo para tiempos más largos, el porcentaje *vs* control presentado por los organismos expuestos fue disminuyendo, estando comprendidos entre un 88.23 y un 69.25% *vs* control para los dáfidos expuestos a 0.05 y 0.75 ng/L, respectivamente, durante 120 horas. Esta observación pone de manifiesto el mayor efecto del diazinón sobre el peso de los parentales expuestos al insecticida durante periodos largos de tiempo, en relación con los organismos expuestos durante periodos más cortos de tiempo. Para tiempos de exposición intermedios se llegaron a alcanzar porcentajes *vs* control de hasta el 54.5% para los organismos expuestos a 0.75 ng/L del insecticida durante 96 horas al diazinón.

5.4.2. Efecto del herbicida molinato.

5.4.2.1. Generación parental (F_0).

Los datos relativos al peso registrado en los dáfidos de la generación parental expuestos al herbicida molinato, aparecen detallados en la tabla 44. Se observó un aumento del peso de los dáfidos en consonancia con la edad de los mismos, obteniéndose valores comprendidos entre los 11.0 (0 horas) y los 172 μg de peso seco *dafnia*⁻¹ (120 horas) para los organismos control. Este aumento también fue observado en los grupos de parentales tratados, registrándose, no obstante, valores más bajos al finalizar el ensayo de acuerdo con la concentración de herbicida a la que fueron expuestos los animales (entre 11.0 y 120.7 μg de peso *dafnia*⁻¹, respectivamente, para los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L molinato).

TABLA 44. Peso ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	11.0 \pm 0.7	25.0 \pm 1.1	60.2 \pm 4.0	105.0 \pm 3.3	127.2 \pm 11.2	172.0 \pm 10.2
c+a	11.0 \pm 0.7	25.6 \pm 2.6	59.2 \pm 4.3	98.1 \pm 7.4	113.6 \pm 16.1	171.0 \pm 7.7
3.77 mg/L	11.0 \pm 0.7	23.4 \pm 3.6	40.4 \pm 2.6 *	61.7 \pm 4.6 *	110.8 \pm 11.4	167.8 \pm 20.4
4.71 mg/L	11.0 \pm 0.7	23.4 \pm 1.7	39.3 \pm 1.6 *	58.8 \pm 10 *	97.0 \pm 27.2 *	149.6 \pm 10.8 *
6.28 mg/L	11.0 \pm 0.7	21.2 \pm 3.0	35.2 \pm 4.1 *	61.7 \pm 4.6 *	97.0 \pm 27.2 *	142.4 \pm 6.1 *
9.42 mg/L	11.0 \pm 0.7	21.6 \pm 3.3	31.8 \pm 1.8 *	60.5 \pm 3.6 *	76.8 \pm 3.3 *	120.7 \pm 4.4 *

*p < 0.05

Si se contrastan los resultados obtenidos para el peso de los dáfidos expuestos al insecticida diazinón y los expuestos al herbicida molinato, se observa que, al finalizar el ensayo (120 horas de exposición), los dáfidos expuestos a molinato alcanzan un peso mayor (167.8 y 120.7 $\mu\text{g}/\text{dafnia}$ para los individuos expuestos a 3.77 y a 9.42 mg/L de molinato, respectivamente) que el peso registrado para los expuestos a diazinón (132.0 y 103.6 $\mu\text{g}/\text{dafnia}$ para los individuos expuestos a 0.05 y 0.75 ng/L de diazinón, respectivamente).

Se obtuvieron valores entre 25.0 y 21.6 μg de peso dafnia⁻¹ para los parentales expuestos a las condiciones control y a 0.75 ng/L del insecticida, respectivamente, durante 24 horas, y entre 172.0 y 120.7 μg de peso dafnia⁻¹ para los mismos grupos tras 120 horas de exposición a molinato.

Los datos de la tabla 44 fueron analizados estadísticamente con el análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los valores aportados por los grupos de dáfidos tratados con molinato y los registrados para los organismos control (ver tabla 18 del anexo).

A continuación, se procedió a efectuar el test de Duncan para certificar entre qué grupos se encontraban las diferencias detectadas con el análisis de la varianza previo (ver figuras 91 a 94 del anexo). De esta manera se encontró que las diferencias se localizaban entre el peso de los dáfidos de todos los grupos tratados y el de los correspondientes controles para los tiempos de 48 y 72 horas de exposición; y para los valores aportados por los organismos expuestos a ≥ 4.71 mg/L del herbicida para los tiempos de 96 y 120 horas de exposición ($p < 0.05$). En ningún caso el control con disolvente presentó diferencias significativas con el grupo control.

En la figura 28 se detallan los porcentajes *vs* control de este parámetro para cada uno de los tiempos de exposición a molinato. Al contrastar los resultados encontrados al iniciar el ensayo y al finalizar el mismo, encontramos menores porcentajes *vs* control para las 120 horas de exposición al herbicida (hasta un 70.2% *vs* control para los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L de molinato) en relación con los porcentajes encontrados en las primeras 24 horas de exposición al plaguicida (hasta un 86.4% *vs*

control para el mismo grupo). Para tiempos de exposición entre 48 y 96 horas (tiempos intermedios del estudio) se llegaron a alcanzar porcentajes vs control algo más bajos, siendo en este caso de hasta el 52.8% vs control en los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L de molinato durante 48 horas.

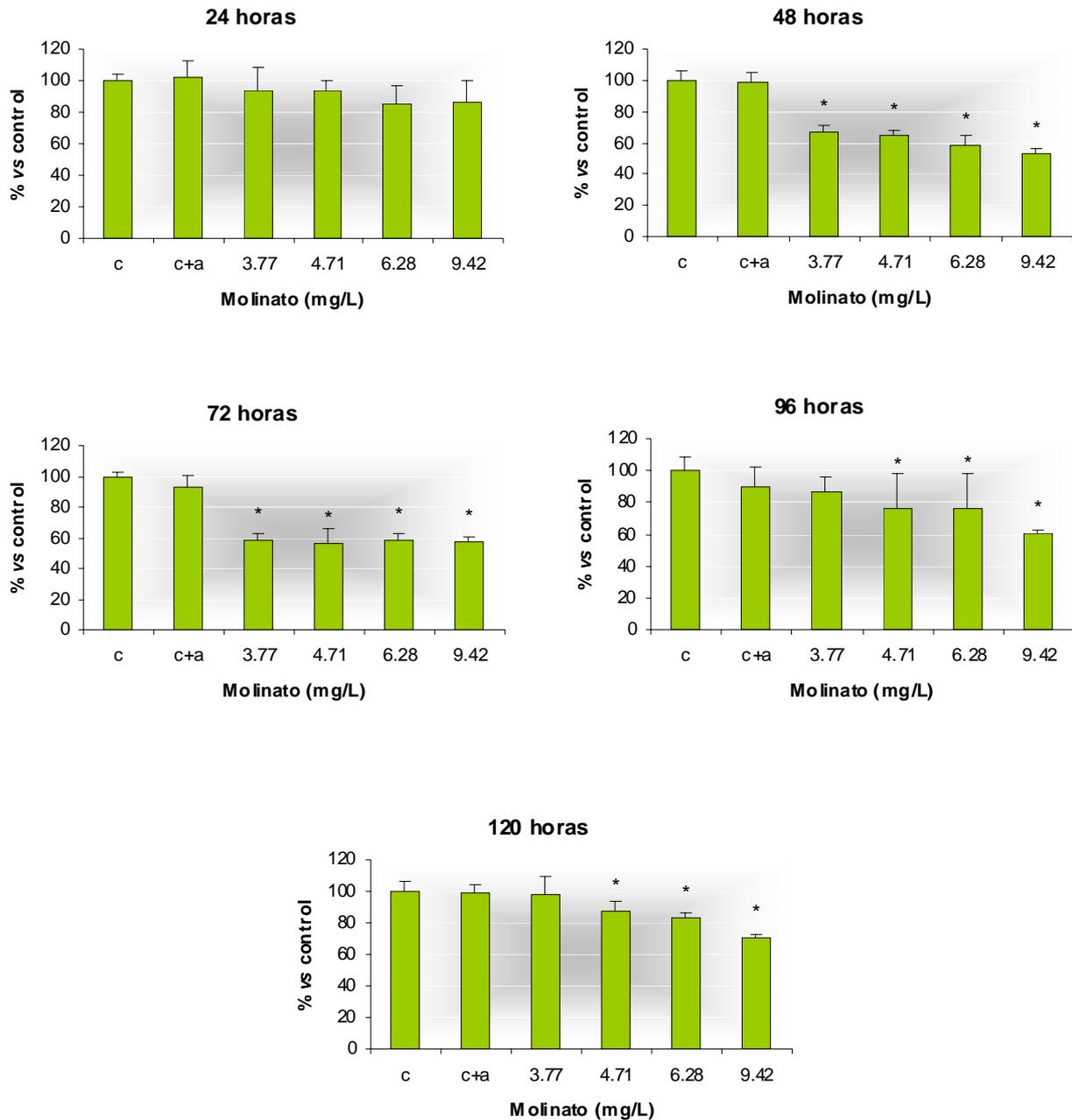


FIGURA 28. Peso (% vs control) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F₀). * $p < 0.05$

El efecto del molinado sobre el peso de los parentales expuestos fue, pues, más acusado en los tiempos intermedios de exposición, mientras que para el caso de los organismos expuestos al insecticida diazinón (ver figura 27) el mayor efecto se observó para los dáfidos expuestos a ≥ 96 horas.

5.5. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna*.

5.5.1. Efecto del insecticida diazinón en la actividad AChE de *D. magna* (expresado por individuo).

Los ensayos para comprobar el efecto del plaguicida organofosforado diazinón sobre la actividad AChE de distintas generaciones de *D. magna*, se efectuaron utilizando las mismas concentraciones del plaguicida empleadas en los ensayos crónicos de toxicidad tal y como se detalló en el apartado de material y métodos; a saber, 0.05, 0.1, 0.5 y 0.75 ng/L, además del control blanco y el control con acetona. El motivo de no ensayar en esta parte del estudio la concentración de 1.0 ng/L de diazinón, fue la comprobación durante el ensayo crónico de toxicidad efectuado previamente, del fuerte efecto del insecticida sobre los dáfidos expuestos, observándose que únicamente 2 de los 15 animales expuestos a aquel ensayo alcanzaron una edad dentro del periodo de tiempo que comprendería los ensayos enzimáticos posteriores (120 horas), de modo que se requeriría un gran número de organismos para poder llevar a cabo un ensayo en el que se obtuvieran datos suficientes para procesar los resultados.

Además, los animales de la generación parental (F_0) expuestos a 0.75 ng/L de diazinón murieron antes de tener una tercera camada de descendientes con los que llevar a cabo los correspondientes ensayos, de manera que no se tienen datos de la actividad enzimática evaluada en este estudio correspondientes a los dáfidos pertenecientes a la F_1 -3ª camada expuestos a concentraciones > 0.5 ng/L del organofosforado.

5.5.1.1. Generación parental (F_0).

En la tabla 45 aparecen los resultados obtenidos de la actividad AChE medida en los individuos pertenecientes a la generación parental (F_0) de *D. magna* expuestos a concentraciones crecientes de diazinón dentro de las primeras 24 horas de vida (0 horas de exposición), y después de 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición al plaguicida.

TABLA 45. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.38 ± 0	0.69 ± 0.10	0.88 ± 0.21	1.11 ± 0.16	1.20 ± 0.09	1.26 ± 0.25
c+a	0.38 ± 0	0.80 ± 0.28	0.80 ± 0.21	1.07 ± 0.21	0.95 ± 0.16	1.15 ± 0.13
0.05 ng/L	0.38 ± 0	0.76 ± 0.19	0.76 ± 0.13	0.99 ± 0.16	$0.92 \pm 0.16 *$	$0.80 \pm 0.25 *$
0.1 ng/L	0.38 ± 0	0.61 ± 0.16	0.80 ± 0.16	$0.76 \pm 0.23 *$	$0.80 \pm 0.25 *$	$0.69 \pm 0.29 *$
0.5 ng/L	0.38 ± 0	0.72 ± 0.26	0.69 ± 0.29	$0.76 \pm 0.23 *$	$0.46 \pm 0.10 *$	$0.52 \pm 0.08 *$
0.75 ng/L	0.38 ± 0	0.57 ± 0	$0.42 \pm 0.08 *$	$0.69 \pm 0.10 *$	$0.57 \pm 0 *$	$0.61 \pm 0.15 *$

* $p < 0.05$

Se observó una actividad enzimática creciente en consonancia con la edad de los individuos, obteniéndose valores desde 0.38 a 1.26 nmol de sustrato hidrolizado por minuto y por dafnia, para los organismos de entre 0 y 120 horas de edad, respectivamente, sometidos a las condiciones control.

En los organismos expuestos a las distintas concentraciones de diazinón, se observó una tendencia similar a la observada en los individuos control, registrándose, no obstante, en algunos casos, una actividad AChE creciente hasta un determinado tiempo de exposición, momento a partir del cual se vio disminuida esta actividad.

Para un mismo tiempo de exposición, se observó una correlación entre la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestos los organismos y el valor registrado para la actividad AChE, observándose un descenso en dicha actividad. Así, para el máximo tiempo de exposición (120 horas), se registraron actividades de entre 1.26 (animales control) y 0.61 (organismos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón) nmol de sustrato hidrolizado por minuto y por dafnia.

El análisis de la varianza (ANOVA) a la que fueron sometidos los valores registrados en la tabla 45, apuntó la existencia de diferencias significativas (tabla 19 del anexo) entre los valores registrados para los organismos control y los dáfidos expuestos durante ≥ 48 horas al organofosforado. El posterior test de Duncan (figuras 95 a 98 del anexo) permitió certificar que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza se encontraban ($p < 0.05$) entre el valor de la actividad AChE de los organismos expuestos a 0.75 ng/L de diazinón y la de los animales control, para los dáfidos expuestos durante 48 horas; entre el valor obtenido para los organismos expuestos a ≥ 0.1 ng/L de diazinón y el valor obtenido para los organismos control, para los expuestos durante 72 horas (a los efectos del tóxico); y entre la actividad AChE de los organismos expuestos a todas las concentraciones de diazinón ensayadas y la de los individuos control, para los expuestos durante 96 y 120 horas. En ningún caso se obtuvieron diferencias significativas entre los organismos control y los correspondientes al control con acetona.

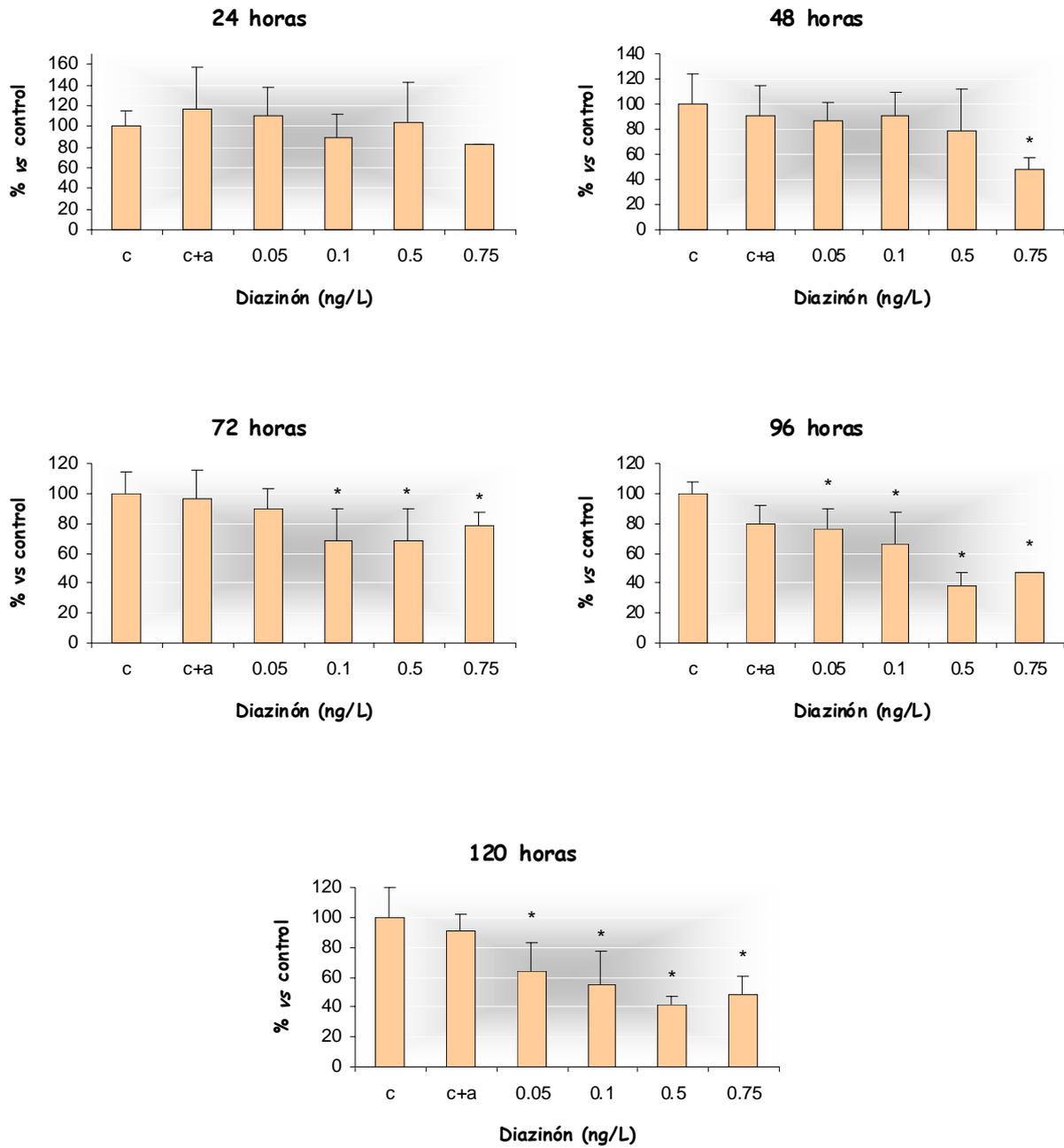


FIGURA 29. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0). * $p < 0.05$

En la figura 29 se representaron gráficamente los porcentajes de la actividad AChE en los grupos tratados frente a la actividad registrada en el correspondiente grupo control. Se observó una mayor depresión de la actividad AChE para los grupos expuestos a las concentraciones más altas de diazinón, así como para los tiempos más largos de exposición, registrándose índices de hasta el 48.85% de la actividad registrada en el grupo control, para los dáfidos expuestos durante 120 horas a la concentración de 0.75ng/L de diazinón.

En la tabla 46 se detallan los porcentajes de inhibición registrados para los individuos pertenecientes a la generación parental (F₀) al inicio del periodo de exposición a los efectos del diazinón (0 horas) y al finalizar dicho periodo (120 horas). Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron tras exposición a 0.5 y 0.75 ng/L de diazinón durante 96 y 120 horas.

TABLA 46. Porcentajes (%) de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F₀).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.05 ng/L	0	0	13.64	10.81	23.33	36.51
0.1 ng/L	0	11.59	9.09	31.53	33.33	45.24
0.5 ng/L	0	0	21.59	31.53	61.57	58.73
0.75 ng/L	0	17.39	52.27	21.59	52.50	51.59

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC y CE₅₀

A partir de los resultados obtenidos para la actividad AChE de la generación parental (F₀) de *D. magna* expuesta al organofosforado diazinón, se procedió al cálculo de la posible existencia de una correlación lineal entre el efecto del insecticida sobre la

actividad enzimática evaluada, y la concentración de diazinón ensayada. En la tabla 47, aparecen las ecuaciones de regresión calculadas para los diferentes tiempos de exposición. Se observan variaciones en los coeficientes de correlación calculados para los distintos tiempos, observándose que entre las 48 y las 96 horas de exposición se registraron mayores coeficientes (r^2).

A partir de las ecuaciones de la tabla 47, se calcularon las CE_{50} que producían un 50% de reducción en la actividad AChE para cada uno de los tiempos de exposición seleccionados, respecto de la actividad enzimática registrada en los animales control (tabla 48). En la tabla 48 se incluyen también, los datos correspondientes a la NOEC (máxima concentración de plaguicida que no produjo efecto sobre el parámetro estudiado) y la LOEC (menor concentración de plaguicida que produce un efecto significativo).

TABLA 47. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F_0 .

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.70 - 0.12 x$	0.50
48 hr	$y = 0.85 - 0.50 x$	0.93
72 hr	$y = 0.98 - 0.43 x$	0.78
96 hr	$y = 1.00 - 0.74 x$	0.84
120 hr	$y = 0.94 - 0.60 x$	0.68

TABLA 48. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE₅₀ (ng/L) de diazinón en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F₀.

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE ₅₀
24 hr	0.75	–	2.96
48 hr	0.50	0.75	0.82
72 hr	0.05	0.10	0.99
96 hr	–	0.05	0.54
120 hr	–	0.05	0.52

Se observó que, para organismos expuestos durante más tiempo al tóxico (120 horas), se necesitó una menor cantidad del organofosforado para reducir en la misma proporción (50%) el valor de la actividad AChE registrado en los organismos control, que para el caso de animales más jóvenes, o expuestos durante menos tiempo al plaguicida (24 horas). Para estos casos, se obtuvieron CE₅₀ de 0.52 y 2.96 ng/L de diazinón, respectivamente.

Los resultados también indicaron que tras 120 horas de exposición a diazinón, una concentración de plaguicida de sólo 0.05 ng/L (LOEC) produjo un descenso significativo de la actividad enzimática AChE en la generación parental de *D. magna*.

5.5.1.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

En la tabla 49 aparecen los valores registrados para la actividad AChE en los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes (F₁-1^a camada) expuestos a las distintas concentraciones de diazinón ensayadas, manteniéndose los animales en exposición al plaguicida durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Además, existe un valor de partida para los organismos pertenecientes a esta generación de descendientes antes de iniciar el periodo de exposición de los mismos al organofosforado, de manera que se registra un valor de la actividad enzimática estudiada a las 0 horas (aunque realmente los individuos ya han estado expuestos al tóxico durante ≤ 24 horas desde su eclosión, en los frascos de los parentales).

Se registraron valores entre 0.57 y 1.15 nmoles de sustrato hidrolizado por minuto y por dafnia para los animales mantenidos bajo las condiciones control del ensayo, entre las 0 y 120 horas del periodo de tiempo evaluado, respectivamente. Se observó un mayor efecto del diazinón sobre la actividad AChE, para un mismo tiempo de exposición, en consonancia con la creciente concentración de plaguicida ensayada. Así, se obtuvieron valores entre 0.76 y 0.49, y entre 1.15 y 0.61 nmoles de sustrato hidrolizado por minuto y por dafnia, para los organismos control y los expuestos a 0.75 ng/L de diazinón a las 48 y 120 horas del periodo de exposición.

Se observó también que, al aumentar la concentración de diazinón a la que fueron expuestos los organismos de esta 1^a camada de descendientes, el aumento registrado en la actividad AChE observada conforme los individuos son más grandes, es menor. De esta manera, mientras que para los organismos control se duplica la actividad enzimática registrada a las 120 horas de iniciarse el ensayo ($1.15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$) en relación con el valor registrado al iniciarse éste ($0.57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$), para los dáfidos expuestos a la mayor concentración testada (0.75 ng/L de diazinón), al finalizar el periodo de exposición (120 horas) se registra una actividad enzimática notablemente menor ($0.61 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$) a la que se hubiera registrado ($0.98 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$) en caso de doblarse el valor registrado al iniciarse el ensayo ($0.49 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$).

TABLA 49. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.57 ± 0	0.65 ± 0.10	0.76 ± 0.13	0.77 ± 0	0.99 ± 0.16	1.15 ± 0.13
c+a	0.57 ± 0.13	0.61 ± 0.08	0.76 ± 0	0.69 ± 0.09	0.92 ± 0.16	1.11 ± 0.16
0.05 ng/L	0.46 ± 0.10	0.65 ± 0.10	0.67 ± 0.09	$0.57 \pm 0 *$	0.95 ± 0	1.03 ± 0.17
0.1 ng/L	0.53 ± 0.16	0.65 ± 0.21	$0.53 \pm 0.08 *$	$0.42 \pm 0.08 *$	0.88 ± 0.21	1.03 ± 0.25
0.5 ng/L	0.53 ± 0.08	0.61 ± 0.16	$0.49 \pm 0.17 *$	$0.49 \pm 0.10 *$	$0.69 \pm 0.10 *$	1.04 ± 0.09
0.75 ng/L	0.49 ± 0.10	0.61 ± 0.16	$0.49 \pm 0.10 *$	$0.53 \pm 0.08 *$	$0.76 \pm 0.16 *$	$0.61 \pm 0.16 *$

* $p < 0.05$

El análisis de la varianza (ANOVA) a la que fueron sometidos los valores registrados en la tabla 49, puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas (ver tabla 20 del anexo). Posteriormente se analizaron los resultados con el test de Duncan (figuras 99 a 102 del anexo), permitiendo certificar que las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza correspondieron ($p < 0.05$) a las existentes entre los grupos pertenecientes a la primera camada de descendientes expuestos a ≥ 0.1 ng/L de diazinón y el valor control (48 horas de exposición); entre los grupos expuestos a todas las concentraciones de diazinón ensayadas y el grupo control, a las 72 horas de iniciarse el periodo de exposición; entre los valores aportados por los dáfidos expuestos a ≥ 0.5 ng/L de diazinón y el valor control, durante 96 horas de exposición al tóxico; y entre el valor registrado para los animales expuestos a la concentración más alta de diazinón (0.75 ng/L) y el valor control, para un tiempo de exposición al diazinón de 120 horas.

No se detectaron diferencias significativas entre los valores registrados por los grupos incluidos en el control con acetona y los valores control para ninguno de los tiempos ensayados.

En la figura 30, se han representado los valores (en forma de porcentaje) de la actividad AChE registrada para los animales pertenecientes a la primera camada de descendientes, a los diferentes tiempos de exposición, en relación con los valores registrados para los correspondientes grupos control.

A la vista de los datos, se observó una mayor depresión de la actividad enzimática evaluada para los tiempos de exposición intermedios (48 y 72 horas), en relación al valor control, obteniéndose valores de 64.47 y 68.83% de la actividad AChE registrada en los grupos control para los animales expuestos durante 48 y 72 horas a 0.75ng/L de diazinón, respectivamente. Sin embargo, para tiempos de exposición más largos, se observó una ligera reducción sobre la actividad AChE (76.77% del valor control, para una exposición de 96 horas a la concentración de 0.75 ng/L de diazinón), obteniéndose actividades enzimáticas que representan hasta el 53.04% del valor control para los animales expuestos a la concentración más alta de diazinón a las 120 horas de iniciarse el periodo de exposición.

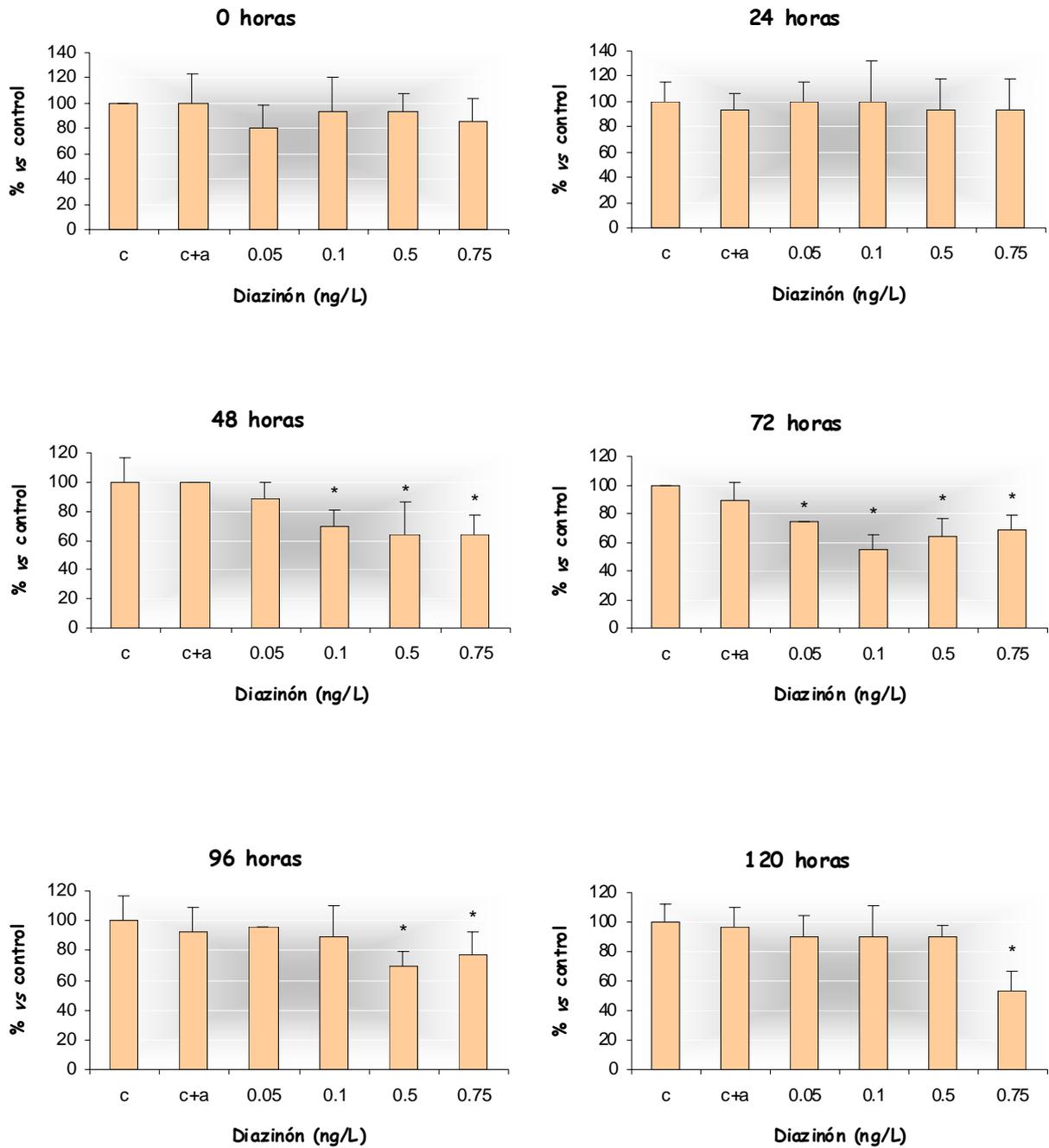


FIGURA 30. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a). * $p < 0.05$

Para los animales expuestos a concentraciones < 0.75ng/L de diazinón, se registraron actividades AChE de ≥ 90% de la actividad registrada en el grupo control durante 120 horas de exposición a los efectos del plaguicida, mientras que para los organismos expuestos a concentraciones ≥ 0.1 ng/L de diazinón los % de la actividad AChE vs control fueron ≤ 70% para tiempos de 48 y 72 horas.

Si comparamos, pues, los valores registrados para esta primera camada de descendientes expuestos a diazinón al finalizar el ensayo y al iniciarse el periodo de exposición, con los obtenidos para la generación parental en el mismo sentido (ver figura 29), se observa una cierta recuperación de la actividad AChE al finalizar el ensayo para esta generación de descendientes, teniéndose menores porcentajes de reducción de la actividad en relación con los valores control en este caso (F₁-1^a camada).

Esta evolución en la actividad enzimática AChE a lo largo del periodo de exposición a diazinón en relación con las concentraciones crecientes de tóxico, puede verse también en la tabla 50, en la que se recogen los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática evaluada para esta primera camada de descendientes.

TABLA 50. Porcentajes de inhibición (%) de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F₁-1^a).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.05 ng/L	19.30	0	11.84	25.98	4.04	10.44
0.1 ng/L	7.02	0	30.26	45.46	11.11	10.44
0.5 ng/L	7.02	6.15	35.53	36.36	30.30	9.57
0.75 ng/L	14.04	6.15	35.53	31.17	23.23	46.96

CÁLCULO DE LA LOEC, NOEC Y CE₅₀

A la vista de los resultados recogidos en la tabla 49 para la actividad AChE, se procedió a comprobar la posible existencia de correlación lineal entre el efecto del diazinón sobre la actividad enzimática, y la concentración de organofosforado ensayada. En la tabla 51 se detallan las ecuaciones de regresión calculadas para los diferentes tiempos de exposición a diazinón. Se registraron coeficientes de correlación (r^2) mayores de 0.70 para todos los tiempos de exposición, a excepción de las 72 horas, donde r^2 fue 0.38, prueba de que los valores obtenidos para este tiempo no siguieron un patrón de variación coherente con la creciente concentración de tóxico ensayada.

TABLA 51. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F₁-1^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.65 - 0.06 x$	0.96
48 hr	$y = 0.67 - 0.29 x$	0.78
72 hr	$y = 0.60 - 0.15 x$	0.38
96 hr	$y = 0.95 - 0.33 x$	0.87
120 hr	$y = 1.12 - 0.53 x$	0.83

A partir de las ecuaciones de la tabla 51, se calcularon las CE₅₀ para cada uno de los tiempos de exposición del ensayo, respecto de la actividad enzimática registrada en los animales control (tabla 52). Al igual que ocurrió para la generación parental (tabla 48), se observó que para reducir a la mitad la actividad enzimática AChE registrada en los animales control, se requieren menores concentraciones de diazinón para tiempos de

exposición al insecticida largos (120 horas). De esta manera, se registraron CE_{50} entre 5.42 y 1.03 ng/L de diazinón (24 y 120 horas de exposición, respectivamente). Sin embargo, con la generación parental F_0 (tabla 48) la CE_{50} a las 120 horas fue de 0.52 ng/L y con la generación F_1-1^a camada la CE_{50} , para el mismo tiempo de exposición, fue notablemente mayor (1.03 ng/L).

TABLA 52. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	0.75	—	5.42
48 hr	0.05	0.10	1.00
72 hr	—	0.05	1.43
96 hr	0.10	0.50	1.38
120 hr	0.50	0.75	1.03

En esta misma tabla 52, se observan también los valores de la NOEC y la LOEC para cada uno de los tiempos de exposición estudiados. A diferencia de lo observado para la generación parental (F_0), para la primera camada de dáfidos, a las 120 horas de exposición al insecticida, son necesarios 0.75 ng/L (LOEC) de diazinón para observar diferencias significativas en la actividad enzimática AChE.

5.5.1.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

Los valores obtenidos para la actividad AChE registrada en los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes (generación F₁-3^a), aparecen detallados en la tabla 53. A la vista de los datos obtenidos en los animales pertenecientes a los grupos mantenidos en condiciones control, a los distintos tiempos del ensayo, se observó un ligero incremento en la actividad enzimática. Se obtuvieron actividades entre 0.65 y 0.88 nmol de sustrato hidrolizado por minuto y por individuo, para los tiempos de 0 y 120 horas, respectivamente.

Si se observan los valores obtenidos para un mismo tiempo de exposición y tratamos de ver la evolución de los mismos en relación con la creciente concentración de plaguicida a la que fueron expuestos los dáfidos, se detecta una menor actividad enzimática de los organismos expuestos a las concentraciones mayores de diazinón, en relación con el valor control correspondiente. No obstante, este efecto es menos acusado en los organismos de mayor edad, viéndose que, por el contrario, es más acusado en los individuos más jóvenes. Así, se obtuvieron actividades AChE de entre 0.88 y 0.86 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹, para los animales control y expuestos a 0.5 ng/L de diazinón respectivamente, a las 120 horas de exposición al insecticida; y entre 0.61 y 0.34 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹ a las 24 horas para los animales expuestos a las mismas condiciones. Este efecto es contrario al que se detectó en los dáfidos pertenecientes a la generación parental (F₀) (tabla 45).

Los datos de la tabla 53, fueron sometidos al correspondiente análisis estadístico de la varianza (ANOVA), detectándose diferencias significativas (tabla 21 del anexo) entre los valores para la actividad AChE en los grupos tratados, y los valores control correspondientes en relación con los tiempos de exposición de 24 y 48 horas.

El posterior test de Duncan (figuras 103 y 104 del anexo) permitió determinar que las diferencias se encontraban, para el caso del periodo de exposición de 24 horas, entre los valores de los animales expuestos a todas las concentraciones de diazinón ensayadas, y el valor control correspondiente (0.61 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹), y para los individuos expuestos durante 48 horas a las condiciones del ensayo, para el valor registrado para la actividad AChE de los dáfidos expuestos a 0.5 ng/L de diazinón, y el valor control (0.57 y 0.88 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹, respectivamente) ($p < 0.05$).

TABLA 53. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.65 ± 0.17	0.61 ± 0.08	0.88 ± 0.17	0.69 ± 0.10	0.88 ± 0.10	0.88 ± 0.17
c+a	0.65 ± 0.10	0.57 ± 0	0.88 ± 0.29	0.69 ± 0.10	0.88 ± 0.17	0.84 ± 0.17
0.05 ng/L	0.61 ± 0.08	$0.38 \pm 0 *$	0.80 ± 0.16	0.69 ± 0.10	0.80 ± 0.08	0.67 ± 0.09
0.1 ng/L	0.61 ± 0.16	$0.34 \pm 0.08 *$	0.76 ± 0.23	0.65 ± 0.10	0.72 ± 0.16	0.76 ± 0.13
0.5 ng/L	0.49 ± 0.10	$0.34 \pm 0.08 *$	$0.57 \pm 0 *$	0.60 ± 0.07	0.76 ± 0.13	0.86 ± 0.09

*p < 0.05

No se detectaron diferencias significativas entre los valores de la actividad AChE registrada en los individuos del control con acetona, en relación con los animales correspondientes al control blanco, para ningún tiempo de exposición.

En la figura 31, se representan los % de la actividad AChE registrada para los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes, en relación con los valores control correspondientes. Se observó que los porcentajes de actividad AChE registrados en los animales pertenecientes a la F₁-3^a camada de descendientes fueron mayores del 60% para los animales expuestos a diazinón durante todos los tiempos de exposición, registrándose únicamente % de esta actividad menores (nunca < 50%) para el tiempo de exposición de 24 horas. Esto contrasta con los % de la actividad AChE registrados para los dáfidos de la generación parental (figura 29), para los que se obtuvieron % de la actividad menores (entre el 30 y el 49%, para los parentales expuestos a ≥ 0.5 ng/L de diazinón durante 96 y 120 horas).

TABLA 54. Porcentajes (%) de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F₁-3^a).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0.05 ng/L	6.15	37.71	9.09	0	9.09	23.86
0.1 ng/L	6.15	44.26	13.64	5.80	18.18	13.64
0.5 ng/L	24.61	44.26	35.23	13.04	13.64	2.27

Este efecto puede también analizarse a la vista de los porcentajes de inhibición de la actividad AChE recogidos en la tabla 54. Se observa que todos los % de inhibición registrados fueron < 50%, al igual que para los animales de la generación F₁-1^a camada (tabla 50), mientras que los individuos pertenecientes a la generación parental (tabla 46) registraron % de inhibición de la actividad AChE > 50% cuando fueron expuestos

durante 96 y 120 horas a concentraciones ≥ 0.5 ng/L de diazinón. También se observa que los mayores porcentajes de inhibición de la actividad AChE se determinaron en dáfidos de 24 horas. Se apunta, pues, una mayor resistencia de los descendientes de *D. magna* (F_1-1^a y 3^a camadas) expuestos al diazinón durante 120 horas, en relación con la actividad AChE registrada en la generación parental (F_0).

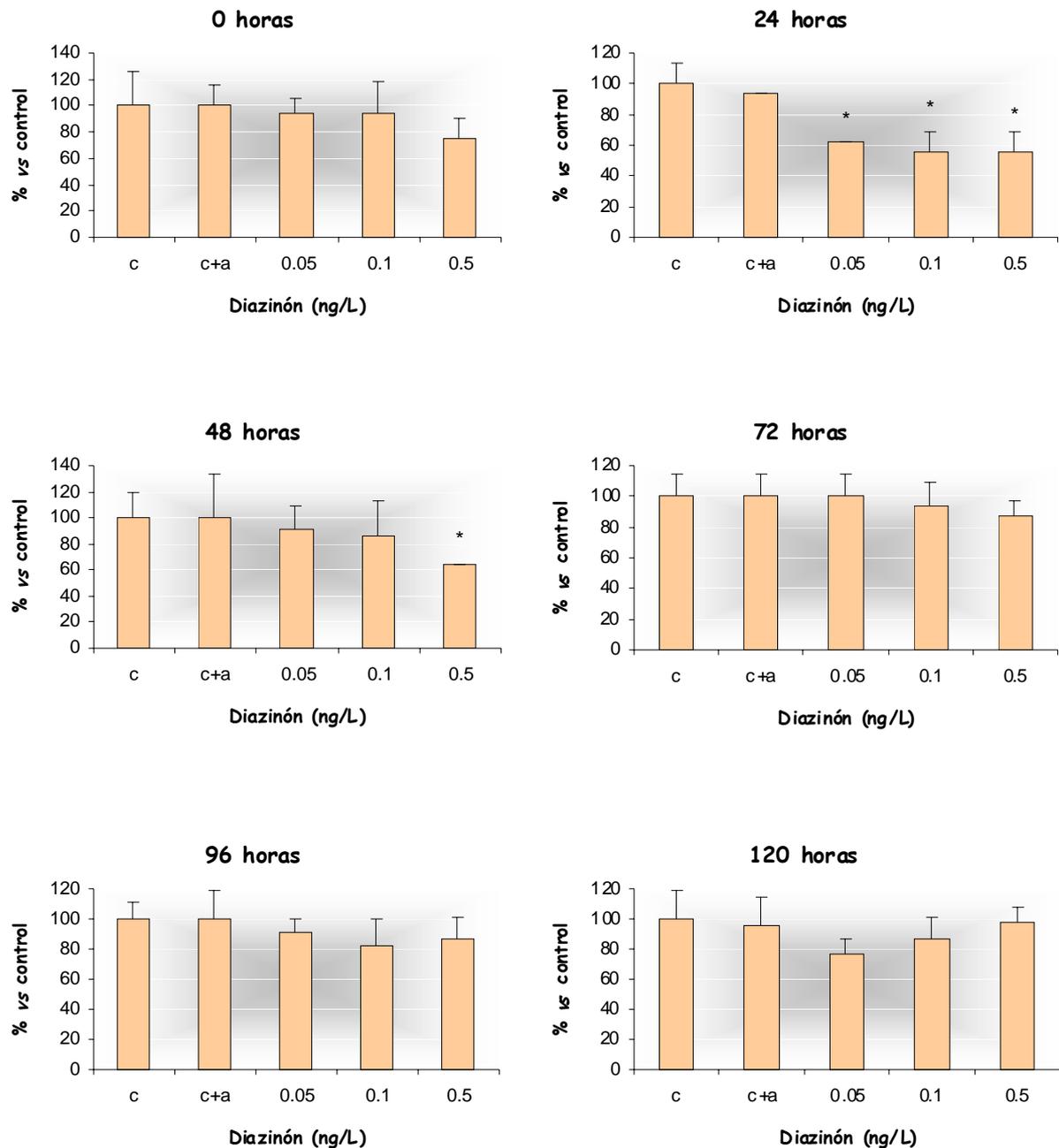


FIGURA 31. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de diazinón, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a). * $p < 0.05$

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Para comprobar la correlación lineal entre los valores obtenidos para la actividad AChE y la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestos los dáfidos de la tercera camada de descendientes (F₁-3ª camada), se procedió al cálculo de las correspondientes ecuaciones de regresión e índices de correlación (tabla 55).

TABLA 55. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de diazinón (ng/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al insecticida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F₁-3ª).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.47 - 0.31 x$	0.54
48 hr	$y = 0.84 - 0.56 x$	0.98
72 hr	$y = 0.69 - 0.18 x$	0.95
96 hr	$y = 0.81 - 0.14 x$	0.46
120 hr	$y = 0.77 - 0.15 x$	0.36

Se registraron índices de correlación > 0.9 para los tiempos de exposición de 48 y 72 horas, mientras que para las 24, 96 y 120 horas de exposición al tóxico se detectaron índices de correlación bajos (entre 0.36 y 0.54) debido a que se registró un descenso de la actividad AChE para los animales expuestos a concentraciones bajas de diazinón a estos tiempos de exposición, mientras que para las concentraciones más altas (0.5 y ≥ 0.1 ng/L de diazinón a las 96 y 120 horas de exposición, respectivamente) se registró una recuperación de los valores para la actividad enzimática evaluada.

En la tabla 56 se muestran los valores para la CE₅₀ a los distintos tiempos de exposición a diazinón que provocarían el 50% de reducción en la actividad AChE de los animales pertenecientes a la tercera camada de descendientes. A diferencia de lo

observado para la generación parental y la primera generación de descendientes (F_1-1^a camada), para esta tercera camada, se determinaron CE_{50} mayores. De tal forma que serían necesarias concentraciones de diazinón de 2.64 y 2.20 ng/L para reducir la actividad AChE de estos dáfidos en un 50% tras 96 y 120 horas de exposición, respectivamente. Este resultado confirmaría la mayor resistencia de la tercera camada de descendientes de *D. magna* a los efectos del diazinón, en relación con la generación parental y la primera camada de descendientes.

TABLA 56. NOEC (ng/L), LOEC (ng/L) y CE_{50} (ng/L) de diazinón en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	—	0.05	0.53
48 hr	0.10	0.50	0.71
72 hr	0.50	—	1.92
96 hr	0.50	—	2.64
120 hr	0.50	—	2.20

Se observa también, que en el periodo comprendido entre las 72 y las 120 horas de exposición al insecticida no fue posible determinar un valor para la LOEC ya que no se registraron diferencias significativas en el valor de la actividad enzimática AChE para ninguna de las concentraciones de diazinón utilizadas.

5.5.2. Efecto del herbicida molinato en la actividad AChE de *D. magna* (expresado por individuo).

Para efectuar los ensayos y determinar la actividad enzimática AChE en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del herbicida molinato, se seleccionaron las mismas concentraciones subletales de tóxico empleadas en el ensayo crónico (3.77, 4.71, 6.28 y 9.42 mg/L del herbicida), además de ensayar un control blanco y un control con acetona. Fueron expuestos al herbicida, animales pertenecientes a la generación parental (F_0), y animales pertenecientes a las generaciones de descendientes F_1-1^a y F_1-3^a camadas. A la vista de los resultados derivados del ensayo crónico de la toxicidad del molinato sobre estas generaciones de dáfidos, el ensayo multigeneracional para determinar la actividad AChE en los mismos no contempló la exposición de las generaciones de descendientes a la concentración más alta de molinato ensayada para los parentales (9.42 mg/L), dado que las hembras pertenecientes a la generación F_0 expuestas a esta concentración, no sobrevivieron lo suficiente como para proporcionar descendientes con los que efectuar el correspondiente análisis. De esta manera, para los organismos pertenecientes a las generaciones F_1-1^a y F_1-3^a camadas, la concentración más alta de molinato empleada en los ensayos orientados a la determinación de la actividad AChE fue 6.28 mg/L del herbicida.

5.5.2.1. Generación parental (F_0).

En la tabla 57 se recogen los resultados de la actividad AChE para los dáfidos de la generación parental expuestos a concentraciones crecientes de molinato. Se observa un incremento de la actividad AChE en los animales de 120 horas de edad, en relación con la actividad enzimática registrada para los individuos más jóvenes. Este incremento relativo es mayor en los dáfidos expuestos a concentraciones bajas de molinato, disminuyendo al aumentar la concentración del herbicida a la que son expuestos los animales. De esta manera, se obtuvieron actividades AChE entre 0.38 y 0.92 $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$ (multiplicándose 2.4 veces el valor registrado al inicio del ensayo), para los individuos expuestos a 3.77 mg/L del herbicida durante 0 y 120 horas, respectivamente, y entre 0.38 y 0.68 $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$ para los organismos expuestos a 9.42 mg/L de

molinato durante los mismos periodos de tiempo (multiplicándose 1.8 veces el valor registrado a las 0 horas de iniciarse el periodo de exposición al tóxico).

Observando los valores alcanzados por la actividad AChE de los dáfnidos de la generación parental (F_0), y evaluándose el efecto de las concentraciones seleccionadas de diazinón y molinato, el efecto fue menor para el caso del herbicida carbamato que para el organofosforado. Este efecto es más evidente en el caso de las concentraciones bajas seleccionadas, mientras que queda algo más enmascarado cuando se observan los valores determinados en los animales expuestos a las concentraciones más altas de los plaguicidas. De esta manera, para las mayores concentraciones de los plaguicidas ensayados (0.75 ng/L de diazinón y 9.42 mg/L de molinato), se observó un aumento de la actividad enzimática evaluada desde 0.38 (0 horas) a 0.61 $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$ (120 horas) para el caso del diazinón, y desde 0.38 (0 horas) a 0.68 (120 horas) $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$, para el caso del molinato (tablas 42 y 54, respectivamente). Sin embargo, para la concentración más baja de ambos plaguicidas (0.05 ng/L de diazinón y 3.77 mg/L de molinato), se observó un aumento de la actividad AChE desde 0.38 a 0.80 $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$, para el organofosforado, y desde 0.38 a 0.92 $\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$ para el caso del herbicida (1.15 veces más que para el caso del diazinón).

A esto hay que añadir que se han ensayado concentraciones mucho menores de diazinón que de molinato (en términos de ng/L en el primer caso y de mg/L, en el segundo), y se puede percibir el mayor efecto del organofosforado sobre la actividad AChE de los dáfnidos de la generación parental, en relación con la actividad enzimática registrada para los organismos expuestos a molinato.

Al tratar estadísticamente los resultados de la tabla 57 con el análisis de la varianza (ANOVA), se apuntó la existencia de diferencias significativas (ver tabla 22 del anexo) entre los valores de la actividad AChE de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de molinato y los valores de los correspondientes grupos control. El posterior test de Duncan (figuras 105 a 109 del anexo) puso de manifiesto que las diferencias detectadas por el análisis de la varianza se encontraban ($p < 0.05$) entre los valores encontrados en los dáfnidos expuestos a ≥ 4.71 mg/L de molinato y el valor control, durante 24 horas, y con todas las concentraciones de molinato y el valor control, para periodos de exposición ≥ 48 horas.

TABLA 57. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.38 ± 0	0.69 ± 0.10	0.88 ± 0.21	1.11 ± 0.16	1.20 ± 0.09	1.26 ± 0.25
c+a	0.38 ± 0	0.66 ± 0.21	0.80 ± 0.21	1.07 ± 0.21	0.99 ± 0.11	1.15 ± 0.13
3.77 mg/L	0.38 ± 0	0.53 ± 0.16	$0.62 \pm 0.08 *$	$0.67 \pm 0.09 *$	$0.80 \pm 0.08 *$	$0.92 \pm 0.16 *$
4.71 mg/L	0.38 ± 0	$0.46 \pm 0.10 *$	$0.61 \pm 0.16 *$	$0.66 \pm 0.09 *$	$0.81 \pm 0.15 *$	$0.84 \pm 0.10 *$
6.28 mg/L	0.38 ± 0	$0.46 \pm 0.10 *$	$0.61 \pm 0.08 *$	$0.65 \pm 0.10 *$	$0.71 \pm 0.08 *$	$0.74 \pm 0.13 *$
9.42 mg/L	0.38 ± 0	$0.47 \pm 0.09 *$	$0.53 \pm 0.08 *$	$0.61 \pm 0.08 *$	$0.76 \pm 0.13 *$	$0.68 \pm 0.21 *$

*p < 0.05

No se detectaron diferencias significativas entre la actividad AChE registrada para los dáfidos del grupo control con acetona y la registrada para los organismos del grupo control.

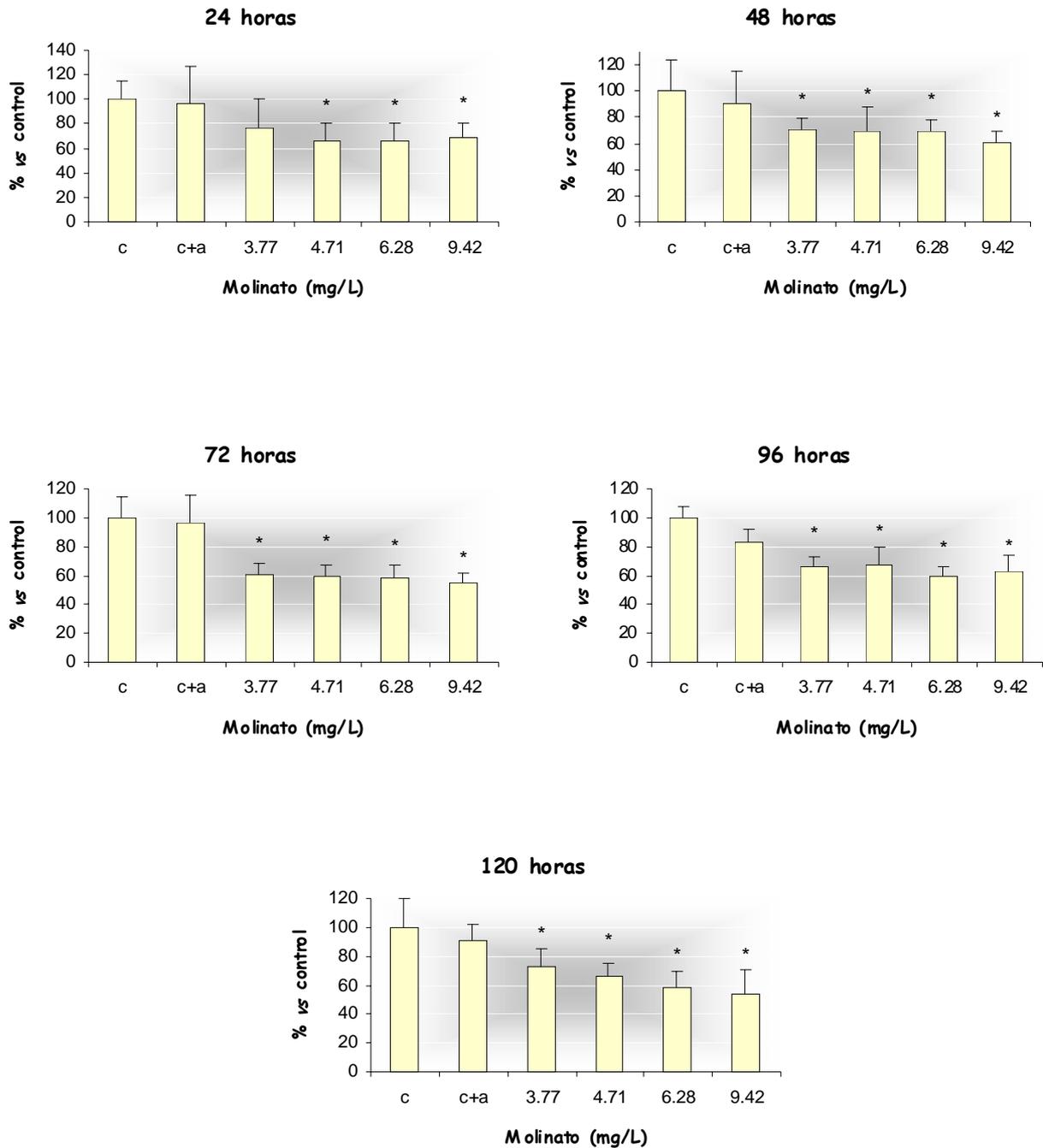


FIGURA 32. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0). * $p < 0.05$

En la figura 32 se representan los % de la actividad AChE a los distintos tiempos de exposición, respecto de los valores control. Al igual que se observó para el caso de los dáfidos (F_0) expuestos al organofosforado diazinón (figura 29), para la concentración más alta ensayada (9.42 mg/L de molinato), tanto al inicio del ensayo como al finalizar el periodo de exposición a los efectos del herbicida, el % de actividad AChE vs control registrado fue menor que para la concentración más baja (3.77 mg/L del herbicida). Se obtuvieron 76.81 y 73.01% actividad AChE vs control para los organismos expuestos durante 24 y 120 horas a 3.77 mg/L de molinato, y 69.13 y 54.39% actividad AChE vs control para los parentales expuestos a 9.42 mg/L de molinato durante los mismos tiempos de exposición. Sin embargo, en el ensayo de exposición de los parentales de *D. magna* a los efectos del organofosforado diazinón, la reducción del % de la actividad AChE en relación con los valores control fue de casi el 50% pasando del 82.61% de la actividad AChE control (24 horas) al 48.41% (120 horas) para el caso de los organismos expuestos a la concentración más alta del plaguicida, mientras que en el ensayo de exposición al molinato varió desde el 68.11% (24 horas) al 53.97% de la actividad AChE control (120 horas), tal y como se ha apuntado anteriormente.

TABLA 58. Porcentajes (%) de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
3.77 mg/L	0	23.19	29.55	39.64	33.33	26.99
4.71 mg/L	0	33.33	30.68	40.54	32.50	41.27
6.28 mg/L	0	33.33	30.68	41.44	40.83	41.27
9.42 mg/L	0	31.89	39.78	45.05	36.67	46.03

En la tabla 58 se detallan los porcentajes de inhibición de la actividad AChE en los dáfidos expuestos a molinato. Se observó una variación en los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática evaluada entre el 23.19 y el 46.03% para los parentales expuestos a las concentraciones de 3.77 (24 horas de exposición) y 9.42 mg/L de molinato (120 horas de exposición), respectivamente, no alcanzándose el 50% de inhibición respecto de los valores control para ningún tiempo de exposición. Sin embargo, para el caso del ensayo con el diazinón, se alcanzaron inhibiciones > 50% para los grupos de dáfidos (F_0) expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L de diazinón (tabla 46), lo cual prueba el mayor efecto del plaguicida organofosforado sobre la actividad AChE de los dáfidos parentales en relación con los del herbicida.

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Para comprobar la posible correlación lineal entre los valores determinados para la actividad AChE en los animales pertenecientes a la generación F_0 de *D. magna* y las concentraciones de molinato a las que fueron expuestos, se procedió al cálculo de las correspondientes ecuaciones de regresión, así como de los índices de correlación (tabla 59). Se observó que, para todos los tiempos de exposición, se registraron índices de correlación > 0.8, indicando una buena correlación entre el valor obtenido para la actividad enzimática evaluada y la concentración creciente de molinato a la que fueron expuestos los dáfidos.

Posteriormente, se procedió al cálculo de la CE_{50} como la concentración de herbicida que reduciría en un 50% la actividad AChE registrada en los grupos control (tabla 60). Las CE_{50} calculadas mostraron valores más bajos al aumentar el periodo de exposición a molinato, poniendo de manifiesto la mayor sensibilidad de los individuos de mayor edad. Para los tiempos de exposición de 24 y 120 horas, se obtuvieron CE_{50} de 14.75 y 9.33 mg/L de molinato, respectivamente. Para el caso de los parentales expuestos a diazinón, también se apuntó un efecto similar, registrándose CE_{50} entre 2.96 (24 horas) y 0.52 ng/L de diazinón (120 horas).

Tal y como se observa en la tabla 60, a partir de las 48 horas de exposición al herbicida, la concentración más baja utilizada (3.77 mg/L de molinato) produjo

diferencias significativas (LOEC) en la actividad enzimática AChE de la generación parental de *D. magna*.

TABLA 59. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F₀.

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.64 - 0.02 x$	0.84
48 hr	$y = 0.82 - 0.03 x$	0.91
72 hr	$y = 0.99 - 0.05 x$	0.85
96 hr	$y = 1.08 - 0.05 x$	0.83
120 hr	$y = 1.19 - 0.06 x$	0.95

TABLA 60. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE₅₀ (mg/L) de molinato en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la generación F₀.

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE ₅₀
24 hr	3.77	4.71	14.75
48 hr	—	3.77	12.67
72 hr	—	3.77	8.7
96 hr	—	3.77	9.6
120 hr	—	3.77	9.33

5.5.2.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

En la tabla 61 se recoge la actividad AChE registrada en los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes de *D. magna* expuestos a molinato, sobre la actividad enzimática evaluada.

Se observan valores crecientes de la actividad AChE en consonancia con el aumento de tamaño de los organismos expuestos, al igual que ocurría con los animales pertenecientes a la generación parental (tabla 57), obteniéndose valores entre 0.65 y 1.00 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹ para los organismos control expuestos a las condiciones del ensayo durante 0 y 120 horas, respectivamente. Al analizar la actividad enzimática correspondiente a los dáfidos de la F₁-1^a camada expuestos a 6.28 mg/L de molinato, se observó una variación creciente de los valores, si bien es cierto que dicha variación no fue tan llamativa como en el caso de los animales control, registrándose valores menores que fluctuaron entre 0.46 (0 horas) y 0.72 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹ (120 horas). No obstante, el valor encontrado para la actividad AChE de esta primera camada de descendientes al iniciarse el ensayo (0 horas), es algo mayor al encontrado para la misma concentración de molinato (6.28 mg/L) en el caso de los dáfidos parentales (0.38 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹), indicando una mayor resistencia de los animales de esta primera generación a los efectos del molinato en relación con la respuesta mostrada por sus parentales.

El análisis de la varianza (ANOVA) al que fueron sometidos los resultados de la tabla 61, puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas (ver tabla 23 del anexo) entre los valores de la actividad AChE registrados para los diferentes tratamientos con molinato, y los valores control a las 0, 72, 96 y 120 horas de iniciarse el periodo de exposición.

El posterior test de Duncan (figuras 110 a 113 del anexo) evidenció que las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza, correspondían a las existentes entre la actividad AChE de los descendientes de la 1^a camada expuestos a \geq 72 horas a los efectos del molinato, en relación con los correspondientes valores control ($p < 0.05$).

TABLA 61. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^{a}).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.65 ± 0.10	0.69 ± 0.10	0.69 ± 0.17	0.95 ± 0.13	0.92 ± 0.16	1.00 ± 0.20
c+a	0.61 ± 0.08	0.69 ± 0.10	0.69 ± 0.10	0.95 ± 0	0.95 ± 0.13	1.05 ± 0.09
3.77 mg/L	$0.46 \pm 0.10^*$	0.57 ± 0.19	0.69 ± 0.10	$0.76 \pm 0.13^*$	0.76 ± 0.13	$0.71 \pm 0.08^*$
4.71 mg/L	$0.49 \pm 0.10^*$	0.57 ± 0.13	0.61 ± 0.08	$0.76 \pm 0.19^*$	$0.71 \pm 0.08^*$	$0.72 \pm 0.08^*$
6.28 mg/L	$0.46 \pm 0.10^*$	0.62 ± 0.08	0.62 ± 0.08	$0.76 \pm 0^*$	$0.71 \pm 0.08^*$	$0.72 \pm 0.16^*$

*p < 0.05

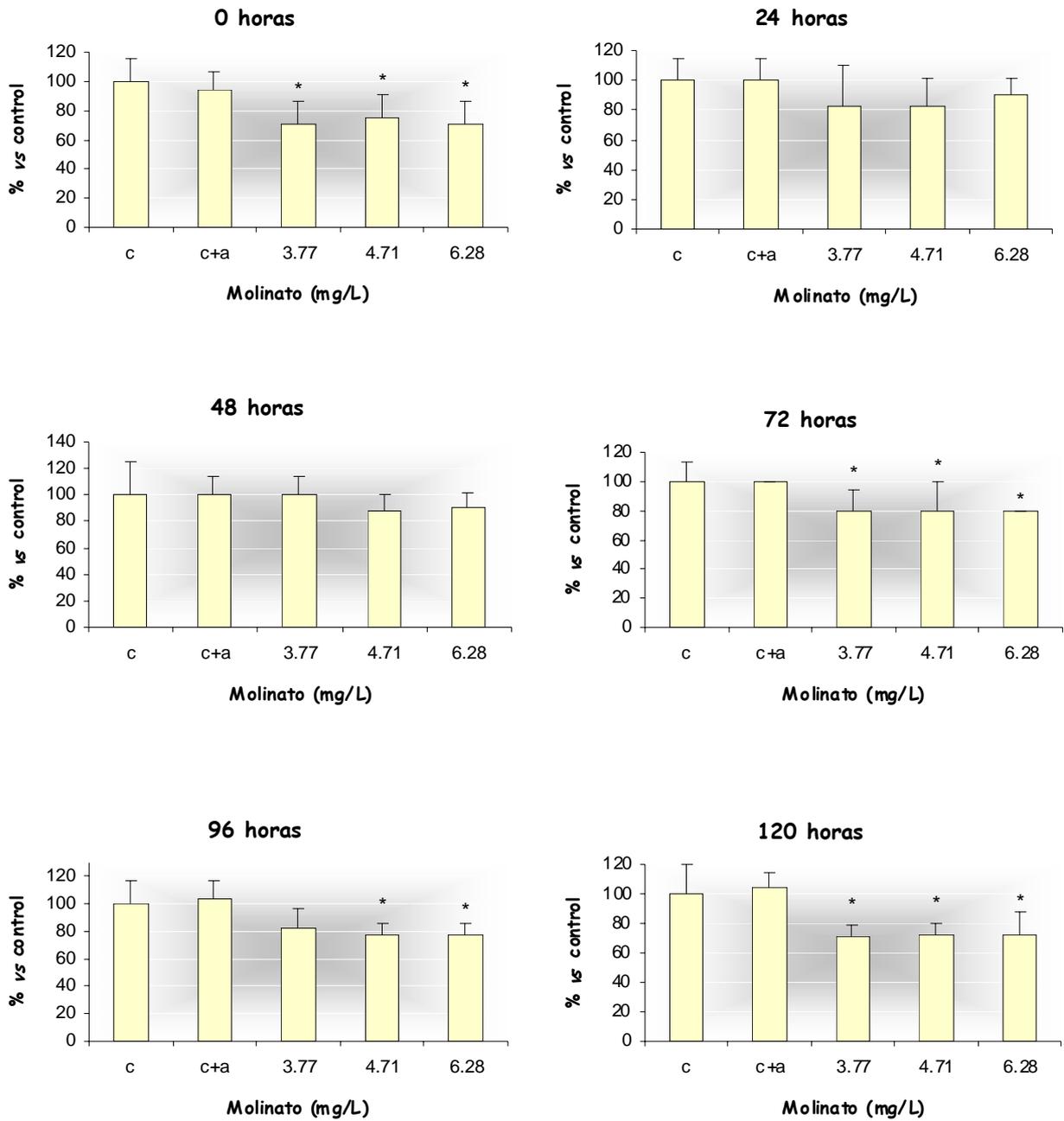


FIGURA 33. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a). * $p < 0.05$

Para una exposición de 72 horas, las diferencias fueron encontradas al exponer a los dáfidos a concentraciones ≥ 3.77 mg/L de molinato. También se detectaron diferencias significativas para los animales expuestos a 4.71 y 6.28 mg/l del herbicida durante 96 horas, y para los expuestos durante 120 horas a las tres concentraciones de molinato testadas.

No se detectaron diferencias significativas entre la actividad AChE registrada para los dáfidos del grupo control con acetona y la registrada para los organismos del grupo control.

Los descendientes de la primera camada que fueron expuestos a 6.28 mg/L de molinato mostraron un % actividad AChE *vs* control de 72%, apreciándose una menor reducción de la actividad enzimática estudiada que en el caso de los parentales, que registraron un % actividad AChE *vs* control del 53.97% para los organismos expuestos a esta misma concentración de molinato. Este efecto puede apreciarse en la figura 29, en la que se recogen los % de la actividad AChE *vs* control para los dáfidos de la generación F₀.

Comparando el efecto del organofosforado diazinón sobre la actividad AChE de los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes (figura 30) con los efectos del herbicida molinato sobre la misma actividad enzimática, se observó que, para el caso del herbicida, se detectaron mayores % de la actividad AChE *vs* control al finalizar el periodo de exposición a las concentraciones ensayadas del insecticida (hasta del 90% para concentraciones ≤ 0.5 ng/L de diazinón) que para el caso del molinato (72% *vs* control para los animales expuestos durante 120 horas a 6.28 mg/L de molinato). Sin embargo, a lo largo del periodo de exposición, y para tiempos intermedios, mientras que el diazinón llegó a reducir la actividad AChE hasta un 54.54% *vs* control en los dáfidos expuestos a 0.1 ng/L de diazinón durante 72 horas, el molinato únicamente ocasionó una reducción de hasta el 77.17% para los animales expuestos a 6.28 mg/L de molinato durante 96 horas de exposición a los efectos del herbicida.

En la tabla 62, se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad AChE en los dáfidos de la 1ª camada de descendientes expuestos a los efectos del molinato.

A la vista de estos resultados, se observa que, si bien es cierto que el molinato provoca mayores % de inhibición en la actividad enzimática estudiada en los dáfidos de la generación F₁-1ª camada al inicio del periodo de exposición que el diazinón (porcentajes de hasta el 29.23% de inhibición a las 0 horas de iniciarse el periodo de exposición a 6.28 mg/L de molinato que contrasta con el 13.39% de inhibición en los animales cuyos parentales fueron pre-expuestos a 0.75 ng/L de diazinón), a lo largo del periodo de exposición a los efectos del herbicida no se sobrepasa el 30% de inhibición de la actividad AChE, que registra % de inhibición de hasta el 46.7 y 45.46% para los organismos expuestos a 0.75 y 0.1 ng/L de diazinón, a las 120 y 72 horas de iniciarse el ensayo respectivamente (tabla 50). Por lo tanto, pese a que el efecto a corto plazo sobre la actividad AChE de los dáfidos de la primera camada de descendientes expuestos a los efectos del herbicida es mayor que para los expuestos al diazinón (se registran % de inhibición de la actividad enzimática estudiada menores para animales expuestos al organofosforado durante 0 y 24 horas), para exposiciones ≥ 48 horas, se registra un mayor efecto del diazinón sobre la actividad AChE que el del molinato.

TABLA 62. Porcentajes (%) de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F₁-1ª).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
3.77 mg/L	29.23	17.39	0	20	17.39	29
4.71 mg/L	24.62	17.39	11.16	20	22.83	28
6.28 mg/L	29.23	10.15	10.15	20	22.83	28

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

En la tabla 63 se registran las ecuaciones de regresión y los índices de correlación calculados con el objeto de evaluar la posible correlación lineal existente entre los valores de la actividad AChE en los dáfnidos de la primera camada de descendientes, y la creciente concentración de molinato a la que fueron expuestos. Se observa que, a excepción del índice de correlación calculado para las 24 horas de exposición a molinato ($r^2 = 0.69$), se registraron índices superiores a 0.70.

Posteriormente, se calcularon las CE₅₀ correspondientes a los distintos tiempos de exposición al herbicida (tabla 64), encontrándose valores entre 32.5 y 35.5 mg/L de molinato para los tiempos de 24 y 48 horas, respectivamente, y 9.4 mg/L para un tiempo de exposición de 120 horas.

Los resultados de la tabla 64 pusieron de manifiesto que tras 120 horas de exposición al herbicida son necesarios 9.4 mg/L para reducir en un 50% la actividad AChE en la primera camada de *D. magna* (CE₅₀), sin embargo, con sólo 3.77 mg/L de molinato (LOEC) la reducción de la actividad enzimática AChE ya fue significativa.

TABLA 63. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F₁-1^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.67 - 0.01 x$	0.69
48 hr	$y = 0.70 - 0.01 x$	0.75
72 hr	$y = 0.93 - 0.03 x$	0.92
96 hr	$y = 0.91 - 0.04 x$	0.97
120 hr	$y = 0.97 - 0.05 x$	0.92

TABLA 64. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al herbicida. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	6.28	—	32.5
48 hr	6.28	—	35.5
72 hr	—	3.77	15.17
96 hr	3.77	4.71	11.25
120 hr	—	3.77	9.4

5.5.2.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

En la tabla 65, se muestran los valores obtenidos para la actividad AChE registrada en los dáfidos pertenecientes a la tercera camada de descendientes de *D. magna*. Para los organismos expuestos a las condiciones control del ensayo, se observó un aumento en la actividad enzimática evaluada al comparar individuos de 120 horas con individuos al inicio del ensayo (0 horas), obteniéndose valores que varían entre 0.88 y 0.67 nmol de sustrato hidrolizado por minuto y por dafnia, respectivamente. Para los organismos expuestos a concentraciones crecientes de molinato, se observó también este incremento en la actividad AChE, registrándose aumentos en la actividad enzimática del mismo orden del observado en los individuos control pero teniéndose valores progresivamente más bajos (de acuerdo a la concentración creciente de molinato ensayada) en relación con los obtenidos para los animales control. De esta manera, para los dáfidos expuestos a 6.28 mg/L del herbicida, se obtuvieron valores entre 0.46 y 0.69 nmol min⁻¹ dafnia⁻¹, para los organismos expuestos durante 0 y 120 horas, respectivamente.

El análisis de la varianza (ANOVA) efectuado para contrastar estadísticamente los resultados de la tabla 65, puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas (tabla 24 del anexo) entre la actividad AChE obtenida para los organismos sometidos a los distintos tratamientos con molinato, y la registrada en los organismos control.

El posterior test de Duncan (figuras 114 y 115 del anexo) mostró que las diferencias detectadas con el análisis de la varianza previo, correspondían a las existentes entre los datos obtenidos para los organismos expuestos a 6.28 mg/L de molinato, y el obtenido para el grupo control ($p < 0.05$) antes de iniciarse el periodo de exposición (0 horas), así como entre los tres grupos de dáfidos tratados con molinato durante 120 horas y el grupo control ($p < 0.05$). No se detectaron diferencias significativas (tabla 24 del anexo) entre la actividad AChE registrada para los dáfidos del grupo control con acetona y la registrada para los organismos del grupo control.

TABLA 65. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{dafnia}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.67 ± 0.09	0.67 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.76 ± 0.13	0.76 ± 0.13	0.88 ± 0.10
c+a	0.67 ± 0.09	0.69 ± 0.17	0.61 ± 0.16	0.76 ± 0	0.76 ± 0.13	0.88 ± 0.10
3.77 mg/L	0.57 ± 0.13	0.67 ± 0.09	0.57 ± 0.13	0.76 ± 0.13	0.76 ± 0.19	$0.69 \pm 0.17 *$
4.71 mg/L	0.53 ± 0.08	0.62 ± 0.17	0.57 ± 0.13	0.71 ± 0.08	0.69 ± 0.10	$0.71 \pm 0.08 *$
6.28 mg/L	$0.46 \pm 0.10 *$	0.59 ± 0.04	0.53 ± 0.08	0.66 ± 0.09	0.72 ± 0.16	$0.69 \pm 0.10 *$

*p < 0.05

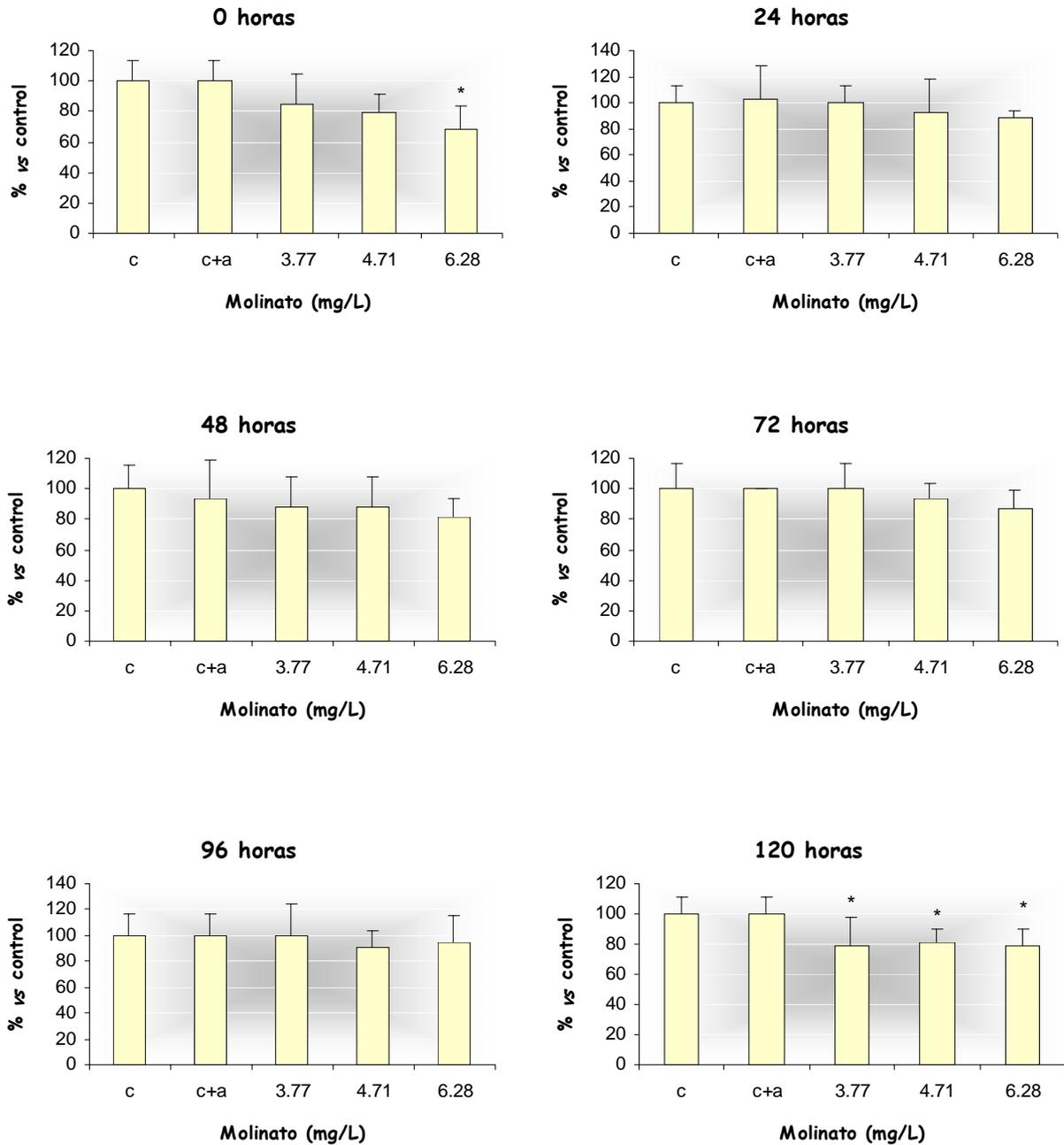


FIGURA 34. Actividad acetilcolinesterasa (% vs control) en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de molinato, a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a). * $p < 0.05$

Se observa, pues, que la primera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a los efectos del herbicida molinato registró mayores diferencias significativas con los correspondientes valores control (ver tabla 61) en relación con esta tercera camada de descendientes, de manera que estos últimos dáfidos parecen mostrar una mayor resistencia a los efectos del herbicida sobre la actividad AChE. También cabe citar que, cualquiera de las dos camadas de descendientes cuya actividad AChE fue evaluada, mostró menores diferencias significativas en relación con los valores control que la generación parental (tabla 67), lo cual apunta la mayor sensibilidad de los dáfidos de la generación F_0 frente a los efectos del molinato sobre la actividad enzimática evaluada en relación con los individuos integrantes de las F_1 -1ª y 3ª camadas, efecto que ya se detectó al analizar los resultados derivados de los ensayos crónicos de toxicidad (fase de exposición del análisis multigeneracional de toxicidad del molinato sobre *D. magna*) efectuados en este estudio (tablas 14, 17 y 20).

En la figura 34 se representan gráficamente los % de la actividad AChE vs la actividad enzimática control para los dáfidos de la tercera camada de descendientes. Los porcentajes de la actividad AChE vs control obtenidos, indican grandes similitudes entre los valores de la actividad AChE de los dáfidos control y el de los expuestos a molinato a diferentes tiempos, salvo en aquellos individuos expuestos al herbicida durante 120 horas en los que la actividad AChE registrada fue inferior.

Tras 24 de exposición al herbicida, los organismos pertenecientes a la tercera camada de descendientes registraron % actividad AChE vs control similares a los obtenidos para los individuos de la primera camada (88.06 y 89.85% actividad AChE vs control, para F_1 -3ª y 1ª camada expuesta a 6.28 mg/L de molinato durante 24 horas, respectivamente), siendo estos porcentajes superiores a los encontrados para los parentales correspondientes (66.67% actividad AChE vs control). Estos datos denotan de nuevo la mayor resistencia de los dáfidos descendientes en relación con la actividad AChE registrada en sus parentales, dándose esta resistencia a partir de los primeros tiempos de exposición al tóxico.

En la tabla 66 se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad AChE de los dáfidos de la tercera camada de descendientes expuestos a las distintas concentraciones de molinato ensayadas. Durante todo el periodo de exposición al herbicida, se observó que los individuos de F₁-3^a camada registraron porcentajes de inhibición de la actividad enzimática evaluada menores que los registrados anteriormente para F₁-1^a camada, no alcanzándose, salvo en el caso de los organismos expuestos 6.28 mg/L de molinato (0 horas) porcentajes de inhibición superiores al 21.59% (valor obtenido para los descendientes expuestos a 6.28 mg/L de molinato durante 120 horas).

Como ya comentamos a la vista de los resultados aportados en la tabla 62, la primera camada de descendientes de *D. magna* expuesta a molinato, registraba % inhibición de la actividad AChE menores que para el caso de la generación parental (tabla 58), de manera que se vuelve a poner de manifiesto la mayor resistencia de los descendientes a los efectos del herbicida ensayado sobre la actividad AChE en relación con la generación parental de dáfidos, siendo, además, la camada más tardía (F₁-3^a camada), la más resistente de las dos camadas de descendientes expuestas a molinato en este estudio.

TABLA 66. Porcentajes (%) de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (expresada por individuo) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F₁-3^a).

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
3.77 mg/L	14.93	0	12.31	0	0	21.59
4.71 mg/L	20.90	7.46	12.31	6.58	9.21	19.32
6.28 mg/L	31.34	11.94	18.46	13.16	5.26	21.59

CÁLCULO DE LA NOEC, LOEC Y CE₅₀

Para comprobar la existencia de una correlación entre los valores obtenidos para la actividad AChE de los dáfidos de la tercera camada de descendientes y la creciente concentración de molinato a la que fueron expuestos estos organismos, se procedió al cálculo de las ecuaciones de regresión y de los índices de correlación para cada uno de los tiempos de exposición al herbicida (tabla 67).

Se obtuvieron índices de correlación >0.80 , excepto para el tiempo de exposición de 96 horas, para el que se obtuvo un $r^2 = 0.64$, valor obtenido como consecuencia del descenso inicial en la actividad AChE para los organismos expuestos a 4.71 mg/L de molinato ($6.90 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$) en relación con la actividad registrada para los animales expuestos a 3.77 mg/L del herbicida ($7.67 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$), y el posterior incremento de la actividad enzimática evaluada para los organismos expuestos a 6.28 mg/L del herbicida ($7.28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ dafnia}^{-1}$), fluctuaciones que afectan a la consistencia de los datos.

TABLA 67. Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (r^2) que describen la relación entre la concentración de molinato (mg/L) (x) y la actividad AChE de *D. magna* (y) a distintos tiempos de exposición (horas) al plaguicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F₁-3^a).

Tiempo de exposición	Ecuación de regresión	r^2
24 hr	$y = 0.68 - 0.01 x$	0.82
48 hr	$y = 0.65 - 0.02 x$	0.99
72 hr	$y = 0.78 - 0.01 x$	0.81
96 hr	$y = 0.76 - 0.008 x$	0.64
120 hr	$y = 0.86 - 0.03 x$	0.92

Posteriormente se procedió al cálculo de las CE_{50} , como las concentraciones de molinato que generaron una reducción en la actividad AChE del 50% en los organismos ensayados (tabla 68). No se observó un patrón uniforme de variación del valor de la CE_{50} calculada para los distintos tiempos de exposición que nos permitiera establecer una tendencia clara entre la concentración de herbicida necesaria para reducir en un 50% la actividad AChE de los dáfidos de la tercera camada de descendientes de *D. magna*, y el tiempo de exposición al molinato, entre otras cosas, debido a que en el periodo comprendido entre las 24 y las 96 horas de exposición, ninguna de las concentraciones de molinato utilizadas produjeron efectos significativos sobre la actividad AChE. Lo que sí parece claro es que para el tiempo de exposición al herbicida de 120 horas, se necesitan concentraciones menores de molinato para reducir en un 50% la actividad AChE registrada para los dáfidos control, que para reducir en la misma proporción la actividad enzimática de los individuos expuestos al molinato durante tiempos de exposición intermedios. Este mismo efecto fue observado a la vista de las CE_{50} calculadas para la primera camada de descendientes expuesta a los efectos del herbicida (tabla 60), para la que se obtuvieron concentraciones de 9.4 mg/L de molinato.

TABLA 68. NOEC (mg/L), LOEC (mg/L) y CE_{50} (mg/L) de molinato en *D. magna* para la actividad AChE y a distintos tiempos de exposición (horas) al herbicida. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tiempo de exposición	NOEC	LOEC	CE_{50}
24 hr	6.28	—	34.5
48 hr	6.28	—	16.25
72 hr	6.28	—	40
96 hr	6.28	—	47.5
120 hr	—	3.77	14

Los resultados de la tabla 68 también indicaron que sólo tras 120 horas de exposición al herbicida pudo ser determinada la LOEC como 3.77 mg/L, mientras que para tiempos de exposición inferiores (24 - 96 horas) ninguna de las concentraciones de molinato ensayadas produjeron descensos significativos en la actividad enzimática AChE de la tercera camada de descendientes de *D. magna*.

5.5.3. Efecto del insecticida diazinón en la actividad AChE de *D. magna* (expresado por μg de proteína).

En las tablas 69, 70 y 71 se detallan los resultados obtenidos para la actividad enzimática AChE de *Daphnia magna* evaluada en este estudio, expresada en nmol de sustrato hidrolizado por minuto y por μg de proteína, para las generaciones parental (F_0) y filial F_1 (1ª y 3ª camadas) tras 120 horas de exposición al insecticida.

5.5.3.1. Generación parental (F_0).

Los valores obtenidos para la actividad enzimática AChE registrada en los dáfidos de la generación parental (F_0) expuesta al insecticida diazinón (tabla 69), muestran un descenso de la misma al analizar los resultados obtenidos para el grupo control a lo largo del tiempo, en las condiciones del ensayo. Se obtuvieron valores comprendidos entre 0.34 y 0.17 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$ para los organismos al inicio del ensayo (0 horas) y al finalizar el mismo (120 horas), respectivamente. Este mismo efecto se detectó para los grupos de dáfidos expuestos a los distintos tratamientos con diazinón, incrementándose la diferencia entre el valor obtenido al inicio del ensayo y el registrado al incrementarse la concentración del insecticida a la que eran expuestos. De este modo, a las 120 horas de exposición, se llegó a registrar un valor 3.8 veces menor que el registrado al inicio del ensayo para los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L diazinón (0.09 y 0.34 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$, respectivamente).

El descenso en la actividad AChE en relación con la edad de los dáfidos corresponde al mayor contenido proteico de los organismos de mayor edad (120 horas), que supera al valor de la actividad enzimática (expresada por individuo) en % vs control, lo cual se tradujo en un descenso del cociente entre la actividad AChE y el contenido en proteínas (actividad AChE expresada por μg de proteína) a lo largo del tiempo que duró el ensayo. En la figura 35 se observa este fenómeno, habiéndose representado los porcentajes de los valores de los parámetros “actividad AChE expresada por individuo” y “contenido proteico” vs control.

TABLA 69. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g proteína}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.34 ± 0	0.26 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.03
c+a	0.34 ± 0	0.29 ± 0.10	0.19 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02
0.05 ng/L	0.34 ± 0	0.28 ± 0.07	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.02	$0.11 \pm 0.03^*$
0.1 ng/L	0.34 ± 0	0.24 ± 0.06	0.25 ± 0.04	$0.13 \pm 0.04^*$	$0.12 \pm 0.04^*$	$0.11 \pm 0.04^*$
0.5 ng/L	0.34 ± 0	0.28 ± 0.13	0.20 ± 0.07	$0.13 \pm 0.04^*$	$0.07 \pm 0.02^*$	$0.08 \pm 0.01^*$
0.75 ng/L	0.34 ± 0	0.28 ± 0	$0.13 \pm 0.03^*$	$0.13 \pm 0.02^*$	$0.09 \pm 0^*$	$0.09 \pm 0.02^*$

* $p < 0.05$

Al contrastar los resultados obtenidos para un mismo tiempo de exposición se observó que, para tiempos iguales o superiores a 48 horas, la actividad enzimática AChE disminuyó al aumentar la concentración de insecticida a la que fueron expuestos los dáfidos, obteniéndose valores entre 0.17 y 0.09 nmol min⁻¹ µg proteína⁻¹ para los animales mantenidos en condiciones control y para los expuestos a 0.75 ng/L del insecticida durante 120 horas, respectivamente.

Tras analizar los resultados con el análisis de la varianza ANOVA (tabla 25 del anexo) y comprobar la existencia de diferencias significativas entre los animales tratados con diazinón durante 48, 72, 96 y 120 horas y los correspondientes organismos control, se procedió a efectuar el test de Duncan (ver figuras 116 a 119 del anexo), el cual puso de manifiesto entre qué grupos ($p < 0.05$) se localizaban las diferencias detectadas con el análisis estadístico previo. De esta manera se confirmó que, para el tiempo de exposición de 48 horas, únicamente el grupo de dáfidos expuesto a la concentración de diazinón más alta (0.75 ng/L del insecticida) fue diferente significativamente del valor control; para los tiempos de 72 y 96 horas los dáfidos expuestos a concentraciones de diazinón ≥ 0.1 ng/L registraron actividades AChE diferentes de los correspondientes valores control; para un tiempo de exposición de 120 horas, todos los grupos tratados mostraron diferencias significativas con el valor control. Este análisis puso, pues, de manifiesto el mayor efecto del insecticida sobre la actividad enzimática AChE (expresada por µg de proteína) en los dáfidos expuestos a diazinón a tiempos más largos. No se detectaron diferencias significativas entre el grupo “control con acetona” y el grupo mantenido en condiciones control.

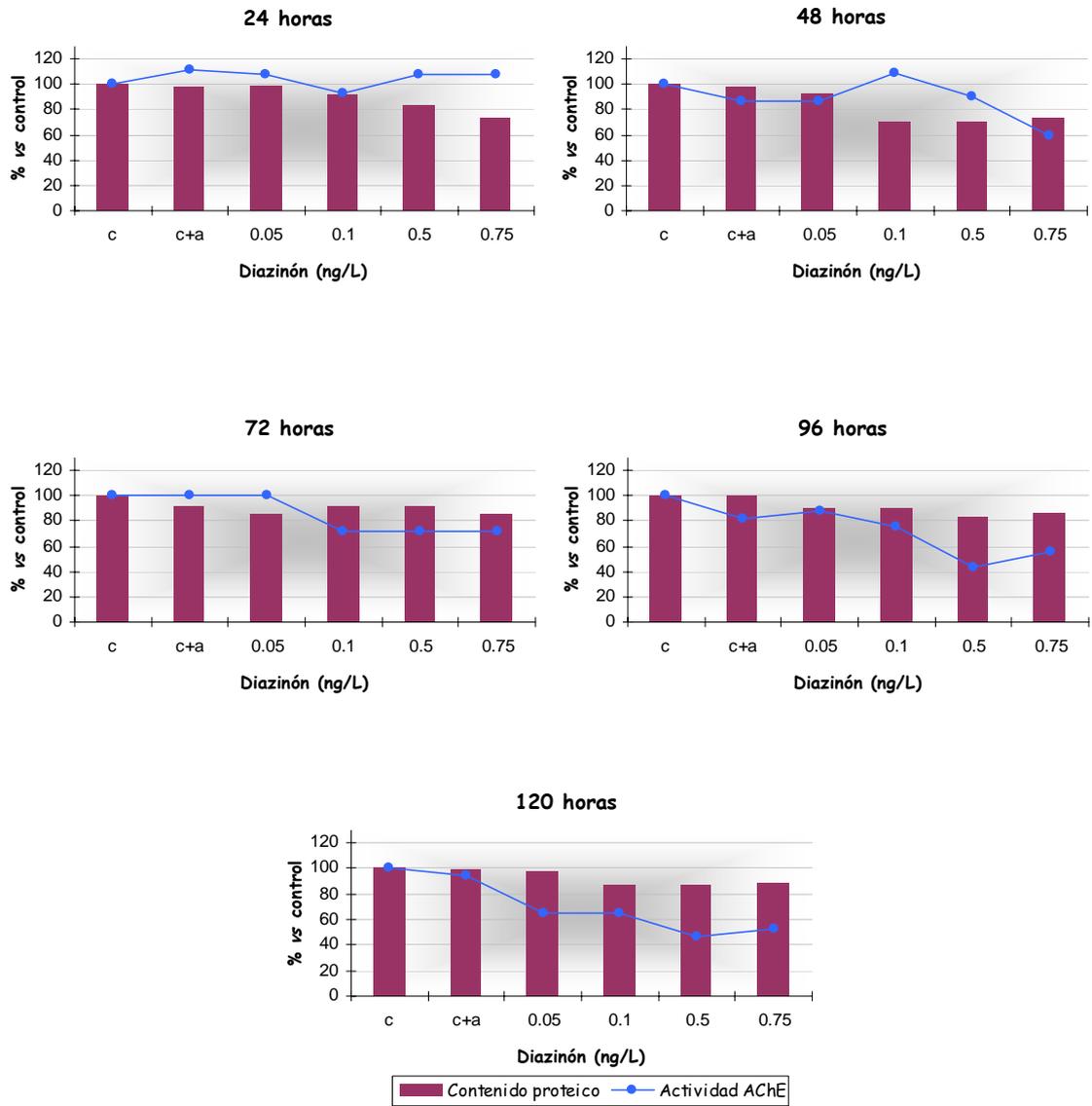


FIGURA 35. Efecto del insecticida diazinón sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (FO).

5.5.3.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

En la tabla 70 se recogen los resultados obtenidos para la actividad AChE, expresada por μg de proteína, en los dáfidos de la primera camada de descendientes (F₁-1^a) de *D. magna* expuesta al insecticida diazinón.

Al igual que ocurrió para los organismos parentales (generación F₀) expuestos al organofosforado (ver tabla 69), los dáfidos pertenecientes a la generación F₁-1^a camada registraron valores decrecientes para la actividad enzimática evaluada en este estudio en consonancia con la edad de los individuos, obteniéndose valores comprendidos entre 1.31 y 0.17 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ para los dáfidos control al inicio del ensayo (0 horas) y a las 120 horas de iniciarse el mismo, respectivamente. Este efecto fue debido a que en los dáfidos expuestos durante 120 horas a las condiciones del ensayo, se registró un mayor porcentaje *vs* control para el contenido proteico que para la actividad AChE expresada por individuo (ver figura 36).

La actividad enzimática también disminuyó en aquellos dáfidos expuestos al insecticida al aumentar el tiempo de exposición al mismo, siendo mayor la diferencia entre el valor registrado al inicio del ensayo y al final del mismo para los dáfidos expuestos a 0.75 ng/L del insecticida (2.77 y 0.13 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$, respectivamente).

En la figura 36 se representaron los porcentajes *vs* control del contenido proteico y la actividad AChE en los dáfidos de la primera camada (F₁-1^a) de descendientes expuestos a concentraciones crecientes de diazinón. Para los grupos de dáfidos expuestos a concentraciones del insecticida iguales o superiores a 0.1 ng/L se observó que el porcentaje *vs* control de la actividad AChE quedó por encima del correspondiente al contenido proteico de los dáfidos a las 0 y 24 horas de exposición, lo que provocó un aumento de la actividad AChE expresada por μg de proteína en consonancia con la creciente concentración de diazinón a la que fueron expuestos los organismos.

TABLA 70. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g proteína}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazinón a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.31 ± 0	0.62 ± 0.10	0.33 ± 0.04	0.23 ± 0	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02
c+a	1.64 ± 0.39	0.64 ± 0.09	0.32 ± 0	0.21 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02
0.05 ng/L	1.28 ± 0.29	$1.21 \pm 0.19^*$	$0.27 \pm 0.04^*$	$0.19 \pm 0^*$	0.18 ± 0	0.15 ± 0.02
0.1 ng/L	$2.82 \pm 0.84^*$	$1.23 \pm 0.41^*$	$0.25 \pm 0.04^*$	$0.16 \pm 0.03^*$	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.04
0.5 ng/L	$3.29 \pm 0.60^*$	$1.12 \pm 0.18^*$	$0.22 \pm 0.08^*$	$0.19 \pm 0.03^*$	0.14 ± 0.005	0.15 ± 0.01
0.75 ng/L	$2.77 \pm 0.50^*$	$1.85 \pm 0.50^*$	$0.23 \pm 0.05^*$	$0.20 \pm 0.03^*$	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03

* $p < 0.05$

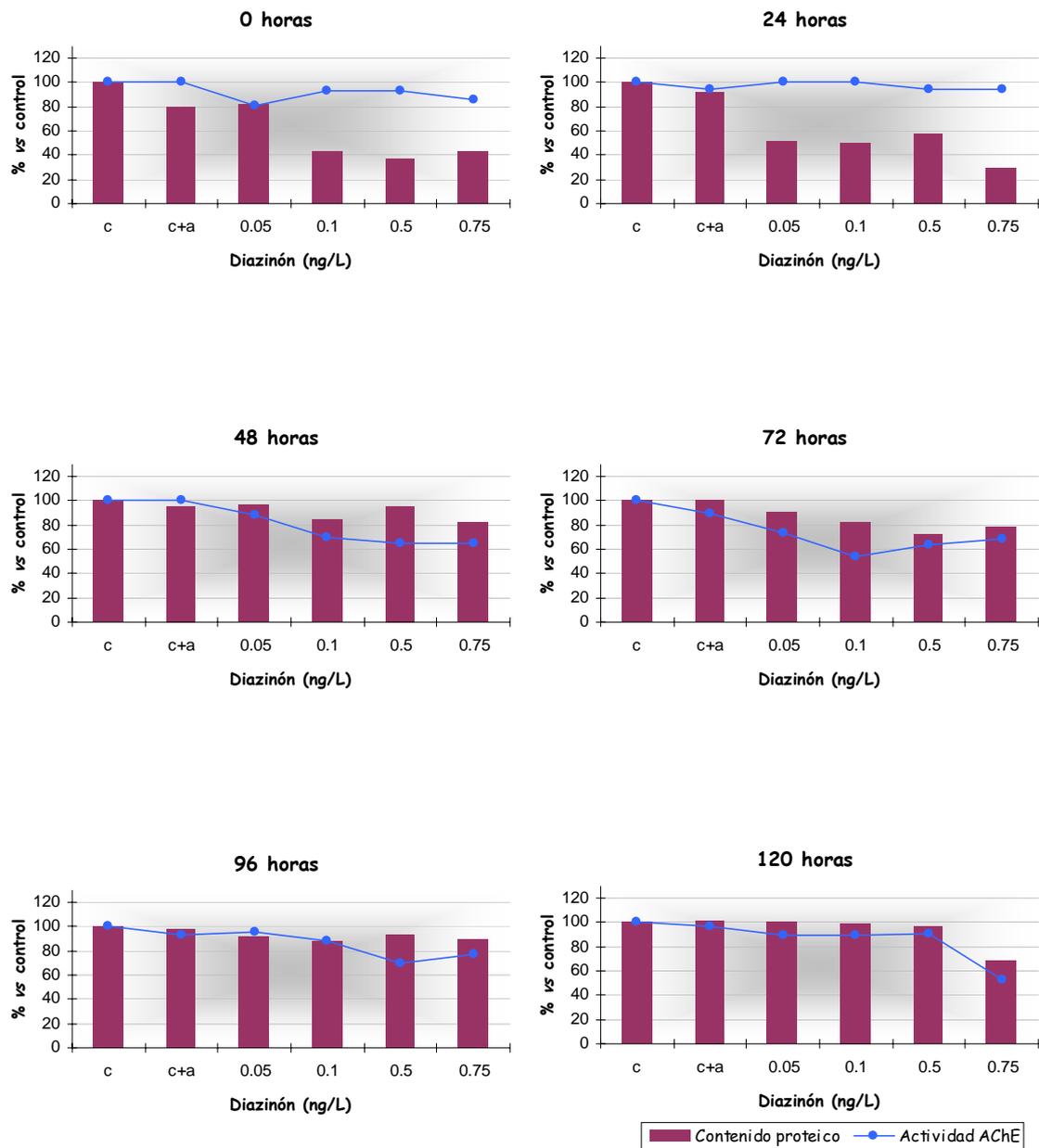


FIGURA 36. Efecto del insecticida diazinón sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Para tiempos de exposición iguales o superiores a 48 horas, los valores obtenidos para esta actividad enzimática AChE fueron disminuyendo al aumentar la concentración de diazinón a la que fueron expuestos los dáfidos de esta primera camada de descendientes. De esta manera, se obtuvieron valores entre 0.33 y 0.23 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}$ de proteína⁻¹ para los organismos control y para los expuestos a la concentración más alta de diazinón ensayada (0.75 ng/L) tras 48 horas de exposición, respectivamente.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores registrados para los dáfidos tratados y los obtenidos por los organismos control (ver tabla 26 del anexo).

El posterior test de Duncan (ver figuras 120 a 123 del anexo) confirmó que las diferencias significativas correspondían a las encontradas entre los valores registrados en los dáfidos tratados con diazinón y el valor control correspondiente para los tiempos de exposición de 48 y 72 horas. Para tiempos de exposición superiores a 72 horas la actividad enzimática AChE, expresada en relación con el contenido proteico de los organismos, no registró diferencias significativas al contrastarla con los correspondientes valores control ($p > 0.1$) a pesar de que los datos mostraban un cierto descenso.

No se registraron diferencias significativas entre los valores aportados por el grupo “control con acetona” y el grupo control.

5.5.3.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

En la tabla 71 se muestran los valores obtenidos para la actividad enzimática AChE (expresada en $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$) registrada en los dáfnidos de la tercera camada de descendientes (F₁-3^a camada) expuestos a las distintas concentraciones de diazinón ensayadas. No se tienen datos correspondientes a los dáfnidos expuestos a 0.75 ng/L porque los parentales no sobrevivieron el tiempo suficiente como para alcanzar la madurez reproductiva y proporcionar descendientes con los que efectuar el ensayo.

Al analizar los resultados obtenidos para el grupo control se observó una reducción en la actividad enzimática evaluada, en consonancia con la creciente edad de los organismos, habiéndose obtenido valores entre 1.21 y 0.11 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ para los animales expuestos al organofosforado al iniciarse el ensayo (0 horas) y al finalizar el mismo (120 horas de exposición), del mismo modo que ya se observó para la generación parental y la filial F₁-1^a camada. De igual forma, para los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de diazinón ensayadas también se observó este efecto llegándose a obtener valores entre 2.49 (0 horas) y 0.12 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ (120 horas) para los dáfnidos expuestos a 0.5 ng/L del insecticida, lo que indicó un mayor distanciamiento entre los valores de la actividad enzimática AChE registrada al iniciarse el ensayo y al finalizar el mismo.

En la figura 37 se observó un mayor efecto del insecticida diazinón sobre el contenido proteico de los dáfnidos al iniciarse el ensayo (0 horas) que sobre su actividad AChE expresada por individuo, de modo que al calcular la actividad AChE, expresada por $\mu\text{g de proteína}$ como el cociente de ambos parámetros, se registró una mayor actividad enzimática en los dáfnidos expuestos a la concentración más alta de diazinón, siendo ésta significativamente mayor que la de los dáfnidos control ($p < 0.001$). Para los demás tiempos de exposición los dáfnidos expuestos a la mayor concentración de diazinón ensayada (0.5 ng/L) vieron más afectada la actividad AChE expresada por individuo que su contenido proteico, de manera que la actividad enzimática expresada por mg de proteína no fue significativamente mayor que para los otros grupos de dáfnidos (tratados y control).

TABLA 71. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida diazin\u00f3n a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	1.21 \pm 0.32	0.36 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05	0.16 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02
c+a	1.55 \pm 0.25	0.35 \pm 0	0.28 \pm 0.09	0.16 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
0.05 ng/L	1.66 \pm 0.23	0.23 \pm 0 *	0.29 \pm 0.06	0.19 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
0.1 ng/L	1.61 \pm 0.42	0.26 \pm 0.06 *	0.28 \pm 0.09	0.17 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02
0.5 ng/L	2.49 \pm 0.52 *	0.23 \pm 0.06 *	0.22 \pm 0	0.16 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01

*p < 0.05

Los datos recogidos en la tabla 71 fueron analizados estadísticamente con un análisis de la varianza (ANOVA), comprobándose la existencia de diferencias significativas entre los grupos tratados con el insecticida y el grupo control (ver tabla 27 del anexo).

Al analizarse los resultados con el test de Duncan (figuras 124 y 125 del anexo) se puso de manifiesto que las diferencias detectadas correspondían a las existentes entre los dáfidos expuestos a 0.5 ng/L de diazinón y el valor control al iniciarse el ensayo, y entre los dáfidos expuestos a todos los tratamientos y el correspondiente valor control para el tiempo de exposición de 24 horas ($p < 0.05$). No se registraron diferencias significativas entre la actividad enzimática de los organismos del grupo “control con acetona” y los del grupo control.

Teniendo en cuenta la reducción en la actividad AChE expresada por μg de proteína registrada para los distintos grupos de dáfidos de las tres generaciones ensayadas, se observó un desplazamiento de las diferencias significativas detectadas hacia los primeros tiempos ensayados al comparar las generaciones de dáfidos estudiadas expuestas al insecticida, obteniéndose diferencias significativas en la actividad AChE respecto del valor control para tiempos de exposición iguales o superiores a 48 horas en el caso de la generación parental (F_0); para los tiempos de exposición de 48 y 72 horas para la primera camada de descendientes (F_1-1^a) y para las 24 horas en el caso de los dáfidos de la generación F_1-3^a camada. Según se comentó en los apartados correspondientes, la tercera camada de descendientes (F_1-3^a) se mostró más resistente que la primera generación filial (F_1-1^a camada) y que la generación parental de dáfidos para ambos parámetros (actividad AChE y contenido proteico) lo que explicaría que también para la actividad enzimática, expresada por μg de proteína, se haya registrado un menor número de diferencias significativas, concentrándose éstas para los dáfidos más jóvenes (24 horas) puesto que son más sensibles que los adultos.

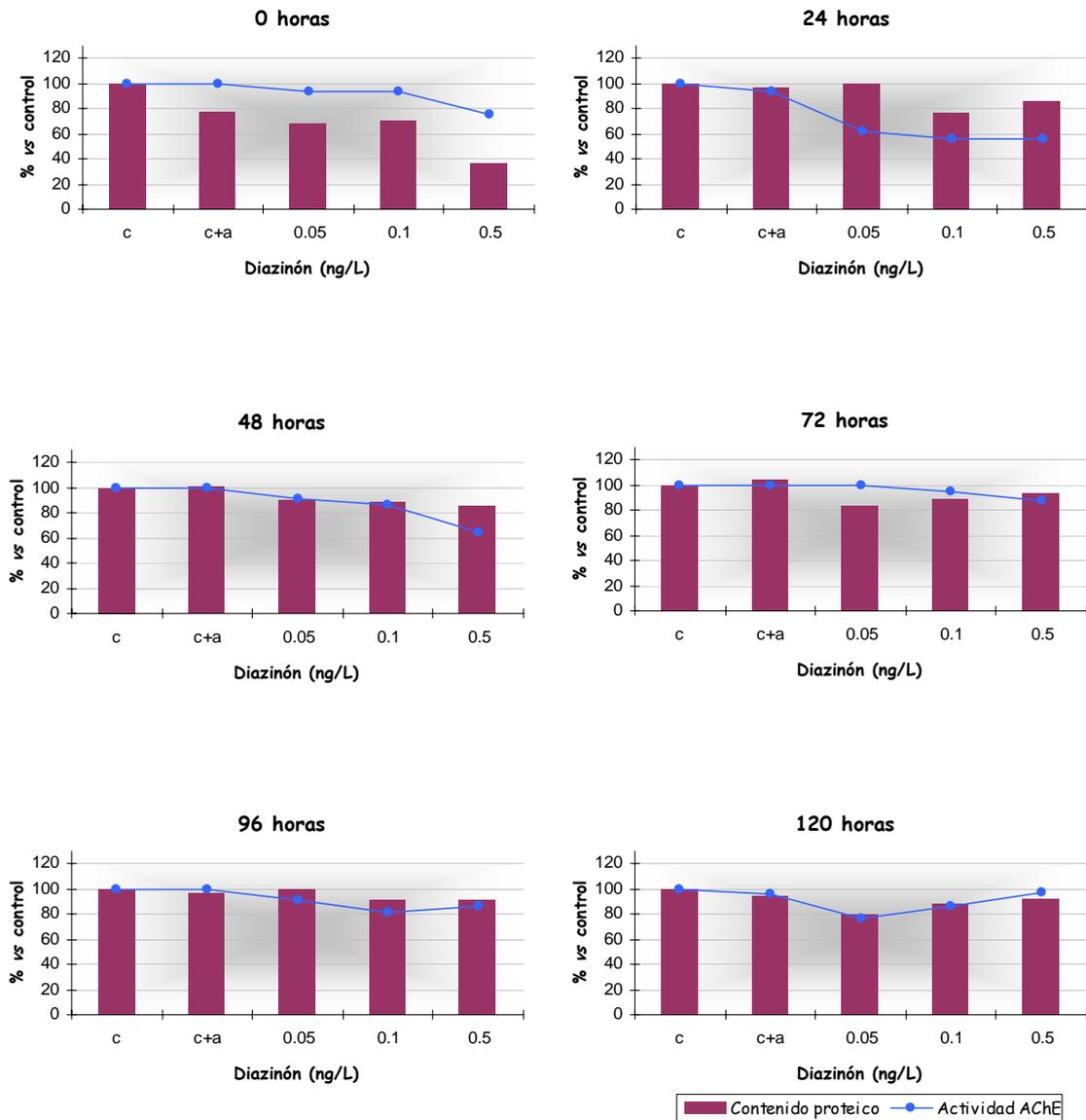


FIGURA 37. Efecto del insecticida diazinón sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_{1-3}^a).

5.5.4. Efecto del herbicida molinato en la actividad AChE de *D. magna* (expresado por μg de proteína).

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática AChE (expresada en $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$) de las generaciones parental (F_0) y filial (F_1 -1ª y 3ª camadas) de dáfidos expuestos al herbicida molinato, se recogen en las tablas 72, 73 y 74.

5.5.4.1. Generación parental (F_0).

Los datos recogidos en la tabla 72 muestran una menor actividad enzimática AChE en los dáfidos de mayor edad en relación con los más jóvenes al contrastar los valores obtenidos al iniciarse el ensayo (0 horas) y al finalizar éste (120 horas). De esta manera, los dáfidos control presentaron actividades entre 0.27 y 0.14 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$. Este resultado se corresponde con un menor incremento en la actividad AChE, expresada por individuo a lo largo del tiempo, y un mayor incremento en el contenido proteico de los dáfidos al aumentar de edad (ver tablas 57 y 34, respectivamente) de manera que el cociente resultante da lugar a un descenso en la actividad AChE expresada por μg de proteína.

Los dáfidos expuestos al herbicida molinato registraron actividades enzimáticas AChE más bajas que las de los grupos control correspondientes al analizar los resultados obtenidos para un mismo tiempo de exposición. De esta manera, se obtuvieron valores entre 0.17 y 0.13 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ para los dáfidos control y los expuestos a 9.42 mg/L molinato respectivamente durante 48 horas, y entre 0.14 y 0.08 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ para los expuestos a las mismas condiciones durante 120 horas.

En la figura 38 se han representado los porcentajes, en relación con el grupo control, del contenido proteico y la actividad AChE expresada por individuo.

TABLA 72. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g proteína}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la generación parental (F_0).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.27 ± 0	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.009	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.03
c+a	0.27 ± 0	0.19 ± 0.06	0.15 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01
3.77 mg/L	0.27 ± 0	0.21 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01 *	0.10 ± 0.01 *	0.10 ± 0.02 *
4.71 mg/L	0.27 ± 0	0.24 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.01 *	0.11 ± 0.02 *	0.09 ± 0.01 *
6.28 mg/L	0.27 ± 0	0.23 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.002 *	0.10 ± 0.01 *	0.09 ± 0.02 *
9.42 mg/L	0.27 ± 0	0.24 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0 *	0.11 ± 0.02 *	0.08 ± 0.02 *

*p < 0.05

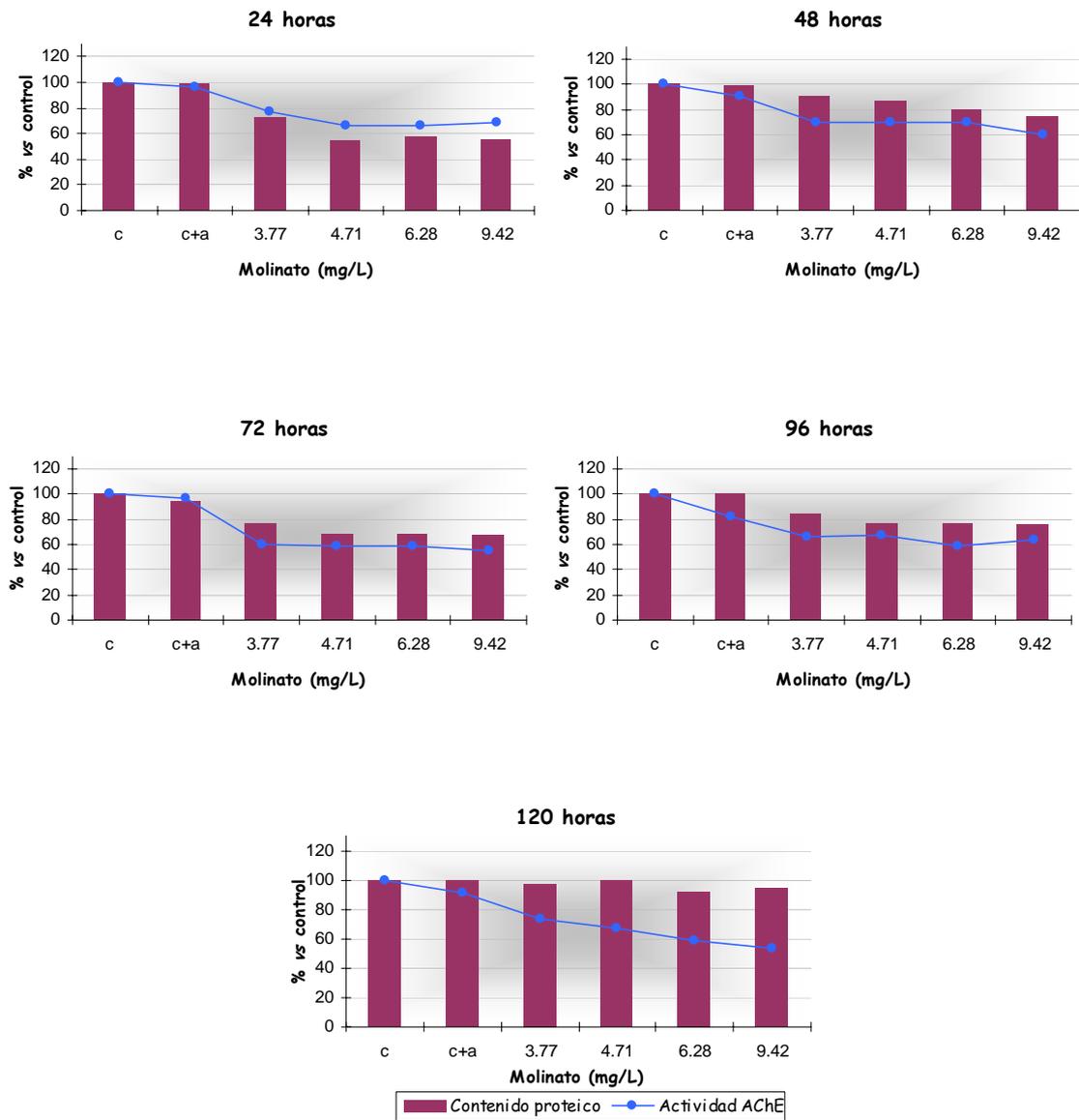


FIGURA 38. Efecto del herbicida molinato sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la generación parental (F_0).

Se observa que a las 24 horas de exposición al herbicida, los dáfidos de la generación parental registraron porcentajes *vs* control del contenido proteico progresivamente menores en relación con la creciente concentración de molinato a la que fueron expuestos, siendo porcentajes menores que los obtenidos para la actividad AChE expresada por individuo. Este dato explica el aumento de la actividad AChE, expresada por μg de proteína, registrado para este tiempo de exposición (ver tabla 72).

Sin embargo, para tiempos de exposición más prolongados, el porcentaje relativo al contenido proteico se mantuvo por encima del referido a la actividad AChE, obteniéndose unos valores para la actividad enzimática expresada por μg de proteína descendiente en consonancia con el aumento de la concentración de molinato ensayada.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con un análisis de la varianza (ANOVA), poniéndose de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los dáfidos tratados y los correspondientes valores control (ver tabla 28 del anexo).

El posterior test de Duncan permitió comprobar que las diferencias significativas encontradas con el análisis de la varianza previo correspondían a las existentes todos los grupos de dáfidos tratados y los correspondientes valores control para los tiempos de exposición iguales o superiores a 72 horas ($p < 0.05$).

Los detalles estadísticos de este test se recogen en las figuras 126 a 128 del anexo. No se detectaron diferencias significativas entre los valores correspondientes al control con acetona y los controles respectivos para ninguno de los tiempos de exposición.

5.5.4.2. Generación filial (F₁-1^a camada).

En la tabla 73 se detallan los resultados obtenidos para la actividad enzimática AChE expresada en $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$, medida en los dáfidos pertenecientes a la primera camada de descendientes (F₁-1^a) de *D. magna* expuestos al herbicida molinato. No se obtuvieron valores para los dáfidos expuestos a 9.42 mg/L de molinato porque los parentales correspondientes no sobrevivieron el tiempo suficiente como para alcanzar la madurez reproductiva.

A la vista de los datos obtenidos para el grupo control, se observó un descenso de la actividad evaluada en consonancia con la edad de los dáfidos, obteniéndose valores entre 0.57 (0 horas) y 0.13 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ (120 horas). Al igual que ocurrió en los dáfidos de la generación F₀ (ver tabla 37), el incremento en el contenido proteico para esta primera camada de descendientes (F₁-1^a) fue mayor que el registrado a lo largo del tiempo para la actividad AChE expresada por individuo, de manera que la actividad enzimática expresada por $\mu\text{g de proteína}$ resultó ser más baja en consonancia con el aumento de la edad de los dáfidos (ver tabla 61).

La actividad enzimática AChE de los organismos tratados con las distintas concentraciones de molinato también presentó este comportamiento, detectándose mayores diferencias entre el valor registrado al inicio del ensayo (0 horas) y el correspondiente a las 120 horas de exposición al herbicida. De este modo, se llegaron a obtener valores entre 1.59 y 0.12 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$ para los dáfidos expuestos a 6.28 mg/L de molinato, lo que supone una diferencia de 1.47 puntos frente a los 0.44 puntos de diferencia entre ambos valores registrados en los dáfidos control.

Si contrastamos estos datos con los detallados en la tabla 72 (generación parental, F₀) observamos que para la generación F₀ también se observó un mayor distanciamiento entre el valor para la actividad AChE al inicio del ensayo (0 horas) y el registrado al finalizar éste (120 horas) en los dáfidos expuestos a la mayor concentración de molinato ensayada (0.27 y 0.08 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$, respectivamente), en relación con la diferencia existente entre ambos valores en el grupo control (0.27 y 0.14 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g de proteína}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, en los dáfidos de la generación F₁-1^a camada, estas diferencias fueron mayores.

TABLA 73. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.57 \pm 0.09	0.54 \pm 0.08	0.26 \pm 0.06	0.23 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03
c+a	0.52 \pm 0.07	0.60 \pm 0.09	0.26 \pm 0.04	0.23 \pm 0	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01
3.77 mg/L	0.83 \pm 0.19	0.55 \pm 0.18	0.30 \pm 0.04	0.18 \pm 0.04	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01
4.71 mg/L	1.61 \pm 0.34 *	0.80 \pm 0.19 *	0.27 \pm 0.04	0.20 \pm 0.05	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
6.28 mg/L	1.59 \pm 0.37 *	0.93 \pm 0.12 *	0.72 \pm 0.03 *	0.22 \pm 0	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03

*p < 0.05

Los resultados recogidos en la tabla 73 fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) que determinó la existencia de diferencias significativas entre los valores presentados por los organismos tratados y los correspondientes valores control (ver tabla 29 del anexo). El posterior test de Duncan (figuras 129 a 131 del anexo) confirmó que las diferencias se encontraban entre los valores de los dáfidos expuestos a ≥ 4.71 mg/L de molinato y el correspondiente valor control para los tiempos de 0 y 24 horas; y entre el presentado por los dáfidos expuestos a la concentración más alta de molinato ensayada (6.28 mg/L) y el valor control para las 0, 24 y 48 horas de exposición ($p < 0.05$).

No se registraron diferencias significativas entre la actividad enzimática AChE registrada para el grupo “control con acetona” y la registrada para el grupo control (blanco) para ninguno de los tiempos de exposición ensayados.

Los dáfidos expuestos a molinato (F_1-1^a camada) registraron una actividad AChE (expresada por μg de proteína) mayor que los grupos de dáfidos control para los tiempos de 0, 24 y 48 horas, efecto que reflejó un mayor efecto del herbicida sobre el contenido proteico que sobre la actividad AChE expresada por individuo (ver figura 39). Este hecho provocó que el cociente entre ambos parámetros (actividad AChE expresada por μg de proteína) fuera mayor en aquellos casos en los que el contenido proteico disminuyó considerablemente (dáfidos expuestos a molinato entre las 0 y las 48 horas).

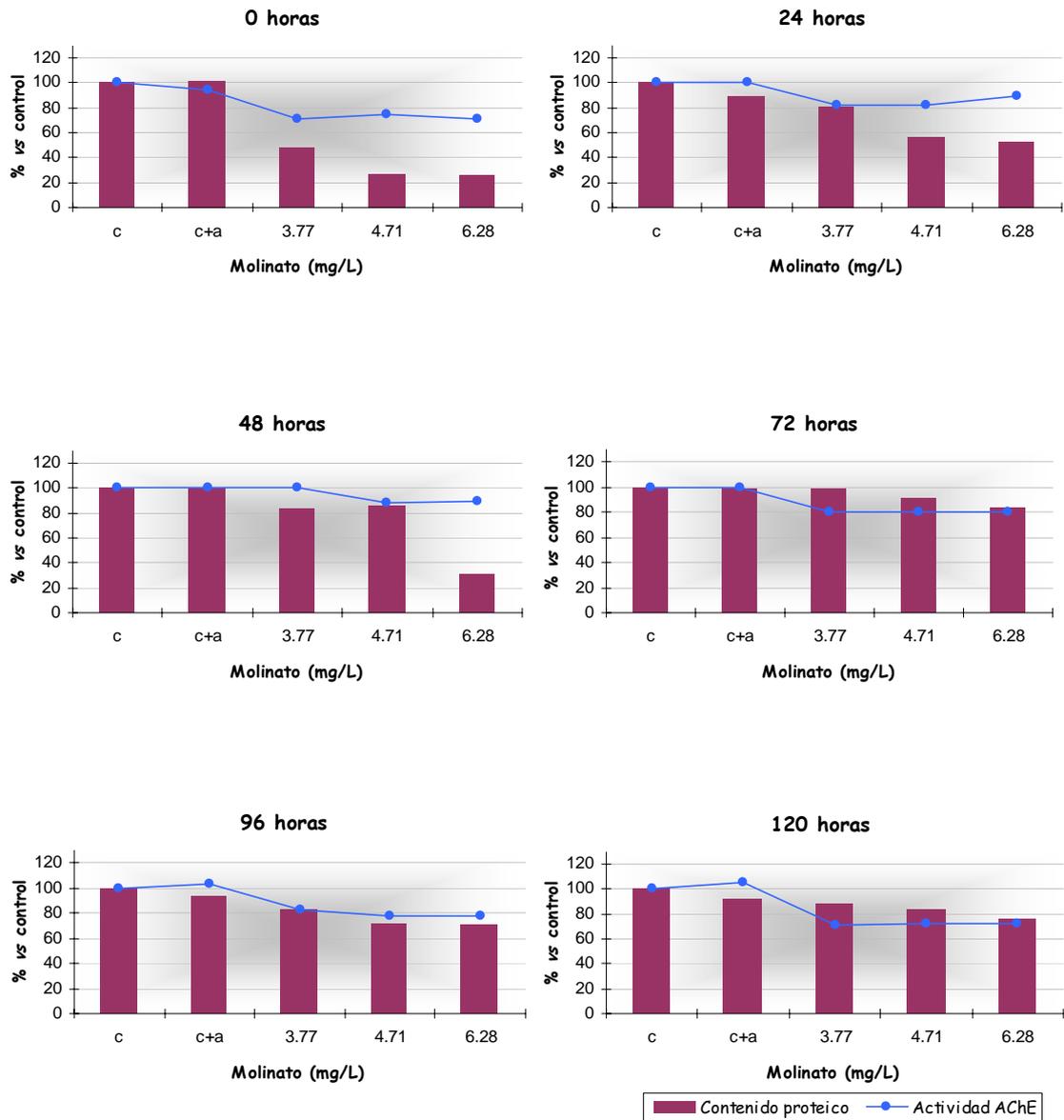


FIGURA 39. Efecto del herbicida molinato sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la primera camada de descendientes (F_1-1^a).

5.5.4.3. Generación filial (F₁-3^a camada).

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}$ de proteína⁻¹) de los dáfidos de la tercera camada de descendientes (F₁-3^a) de *D. magna* expuestos al herbicida molinato, aparecen detallados en la tabla 74.

La actividad AChE evaluada disminuyó a lo largo del tiempo al aumentar la edad de los dáfidos, registrándose secuencias entre 0.55 y 0.11 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}$ de proteína⁻¹, para los dáfidos control, y entre 0.83 y 0.10 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}$ de proteína⁻¹ para los descendientes expuestos a 6.28 mg/L de molinato. De esta manera, aunque se percibe un aumento de la actividad enzimática AChE en relación con la concentración creciente de molinato ensayada, para los tiempos ≤ 96 horas, los valores van asemejándose más entre sí conforme se aproxima el final del ensayo. A las 120 horas de iniciarse el periodo de exposición, la actividad enzimática AChE registrada en los distintos grupos de dáfidos es prácticamente la misma (entre 0.11 y 0.10 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}$ de proteína⁻¹), no afectando la concentración de molinato ensayada a los valores obtenidos.

Para los dáfidos de esta tercera camada de descendientes expuestos a molinato durante tiempos de exposición menores o iguales a 96 horas, se registraron valores crecientes de la actividad AChE expresada por μg de proteína al aumentar la concentración de molinato. Este efecto viene caracterizado por un mayor efecto del herbicida sobre el contenido proteico que sobre la actividad AChE individual, obteniéndose porcentajes vs control más reducidos para el parámetro enzimático en los dáfidos expuestos durante 120 horas que para el contenido en proteínas (figura 40).

El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado a los datos de la tabla 74, puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores presentados por los dáfidos tratados y los valores control (ver tabla 30 del anexo).

Posteriormente el test de Duncan (figuras 132 a 136 del anexo) certificó que las diferencias detectadas correspondían a las detectadas entre los valores presentados por los tres grupos tratados con molinato y los controles correspondientes (para los tiempos de 0 y 24 horas), y entre la actividad enzimática AChE de los dáfidos expuestos a 6.28 mg/L del herbicida y los valores control para los tiempos de 0, 24, 48, 72 y 96 horas ($p < 0.05$).

TABLA 74. Actividad acetilcolinesterasa ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$) de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del plaguicida molinato a distintos tiempos. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
control	0.55 \pm 0.08	0.48 \pm 0.07	0.14 \pm 0.07	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
c+a	0.57 \pm 0.08	0.49 \pm 0.08	0.16 \pm 0.04	0.14 \pm 0	0.10 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
3.77 mg/L	0.74 \pm 0.03 *	0.67 \pm 0.10 *	0.19 \pm 0.05	0.13 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02
4.71 mg/L	0.78 \pm 0 *	0.72 \pm 0.20 *	0.22 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
6.28 mg/L	0.83 \pm 0.1 *6	0.64 \pm 0.05 *	0.24 \pm 0 *	0.17 \pm 0.02 *	0.15 \pm 0.02 *	0.10 \pm 0.01

*p < 0.05

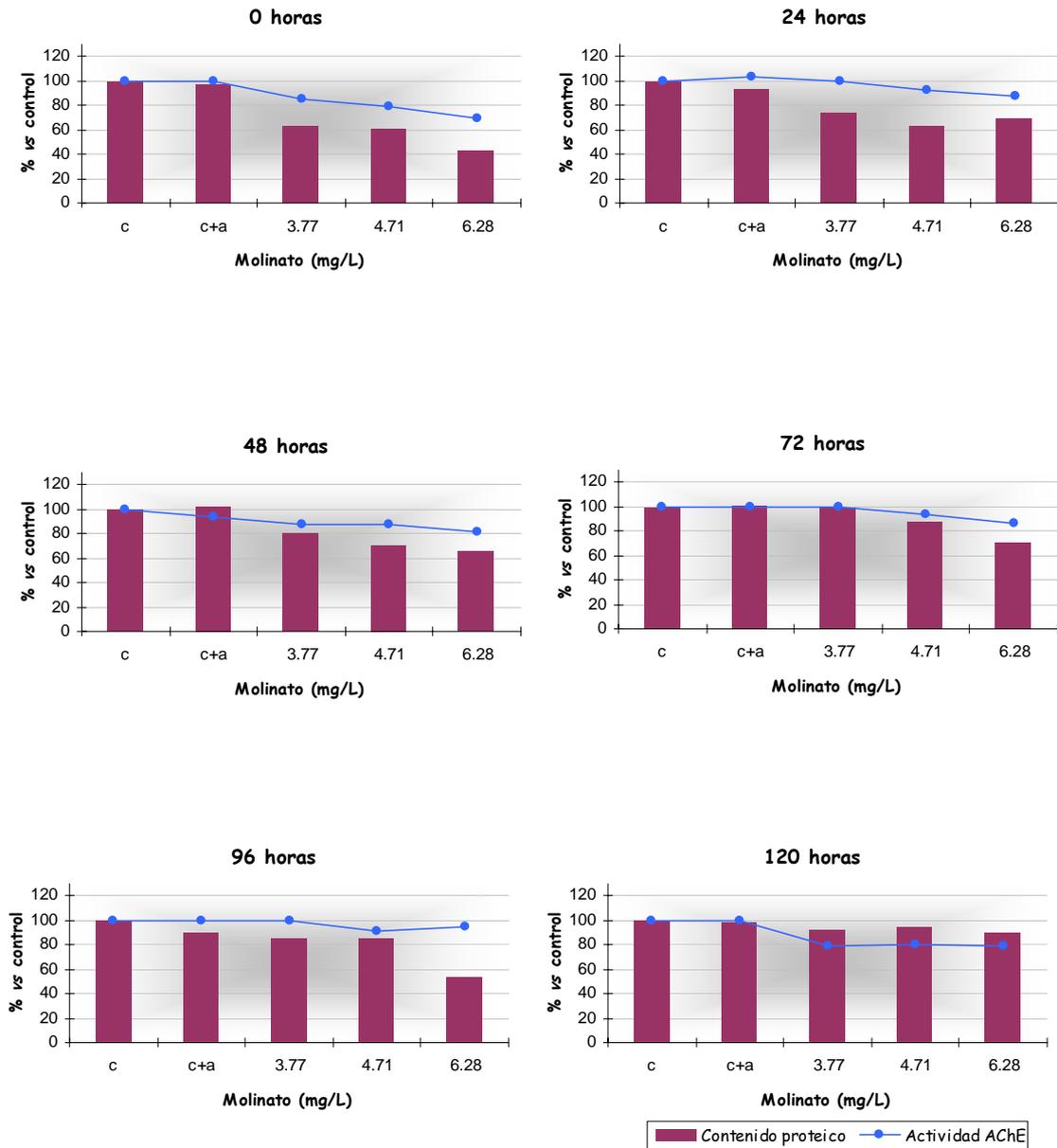


FIGURA 40. Efecto del herbicida molinato sobre la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido proteico de *D. magna* (% vs control), a distintos tiempos de exposición. Corresponde a la tercera camada de descendientes (F_1-3^a).

6. DISCUSIÓN

En la discusión de este trabajo se efectuará una comparación de los distintos parámetros estudiados para cada una de las generaciones de *D. magna* incluidas en el mismo (generación parental, F₀, y generación filial F₁, 1ª y 3ª camadas de descendientes).

Previamente procederemos a la discusión de los resultados derivados del ensayo de toxicidad aguda en *Daphnia magna* con ambos plaguicidas, y posteriormente, se discutirán los resultados obtenidos para los diferentes parámetros en el ensayo crónico de toxicidad, así como los obtenidos en los ensayos en los que se evaluó el efecto de los plaguicidas ensayados (el insecticida diazinón y el herbicida molinato) sobre el contenido proteico, y sobre la actividad enzimática AChE de los dáfnidos.

En un capítulo aparte, se analizarán los datos derivados del estudio del efecto de los plaguicidas empleados sobre el peso de los dáfnidos parentales.

6.1. Toxicidad aguda de los plaguicidas diazinón y molinato en *D. magna*.

Tras la exposición de *D. magna* a concentraciones crecientes de los plaguicidas seleccionados para el presente trabajo durante un periodo de 48 horas, se determinó el efecto a corto plazo (CE₅₀-24 y 48 horas) del diazinón y el molinato empleándose como criterio de estudio la inmovilidad de los dáfnidos expuestos.

A la vista de los resultados obtenidos, se evidenció un mayor efecto de ambos plaguicidas tras 48 horas de exposición (CE₅₀'s = 12.46 mg/L de molinato y 0.16 µg/L de diazinón) que después de 24 horas (37.7 mg/L de molinato y 0.86 µg/L de diazinón), conclusión a la que se llegó tras obtener menores CE₅₀ para el tiempo más largo de exposición ensayado. Por lo tanto, se apunta una mayor sensibilidad de los dáfnidos expuestos a ambos plaguicidas durante tiempos más prolongados, siendo, de los plaguicidas ensayados en este trabajo, el insecticida diazinón el más tóxico por presentar CE₅₀ menores en relación con las obtenidas para el herbicida molinato. Este dato parece lógico teniendo en cuenta que el diazinón tiene capacidad insecticida, mientras que el molinato es un plaguicida diseñado con carácter herbicida.

Las referencias que se tienen de estudios efectuados para determinar la toxicidad relativa de los plaguicidas empleados en este estudio también apuntan a la mayor toxicidad del insecticida organofosforado en relación con la del herbicida.

Para el caso del insecticida diazinón se tienen referencias relativas a valores para la CE_{50} del organofosforado para *Daphnia magna*, obteniéndose valores de 0.1 $\mu\text{g/L}$ del ingrediente activo (US Department of Labor, 2002). En el mismo estudio, se detallaron las CL_{50-96} h para diversas especies de peces expuestas a diazinón, teniéndose valores entre 0.21 mg/L para *Lepomis macrochirus* y 1.8 mg/L para *Oncorhynchus mykiss*. Por otro lado, Banks *et al.* (2005) determinaron una CL_{50-48} horas para el cladóceros *Ceriodaphnia dubia* de 0.21 $\mu\text{g/L}$ de diazinón, siendo un valor, aunque del mismo orden, algo superior al que se determinó en el presente estudio para *D. magna*.

En cualquier caso, para el grupo de los crustáceos cladóceros, y en particular para los dáfnidos, siempre se han detectado CL_{50} inferiores a 1 $\mu\text{g/L}$ (Bailey *et al.*, 1997; U.S. EPA, 2000).

Otros autores han estudiado el efecto a corto plazo del herbicida molinato sobre diversas especies de *Daphnia* registrando valores entre 18.3 y 33.6 mg/L para la CE_{50} a las 48 horas de exposición (Phyu *et al.*, 2004).

Los valores de la toxicidad del molinato para diversos organismos acuáticos, tales como algas, cladóceros, rotíferos y peces, fluctúan entre 0.017 y 43.0 mg/L (Finlayson y Faggella, 1986; Fernández-Casalderrey *et al.*, 1992; Kasai y Hatakeyama, 1993; Sabater y Carrasco, 1998; Tomlin, 2000).

6.2. Ensayo crónico multigeneracional de la toxicidad del diazinón y el molinato en *D. magna*.

Tal y como se apuntó en el apartado de resultados, los parámetros evaluados en el ensayo crónico multigeneracional de toxicidad fueron: supervivencia, fecundidad (estudiada a través de los parámetros reproductivos: número total de neonatos por

hembra, tamaño y número total de camadas por hembra, y tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta la primera reproducción), crecimiento corporal y el parámetro poblacional “tasa intrínseca de incremento natural”. Estos parámetros fueron evaluados en una primera fase de exposición a los plaguicidas, y posteriormente, y únicamente para la generación filial de dáfidos (F_1 -1^a y 3^a camadas), en una fase de recuperación a los efectos de los mismos en la que los organismos fueron transferidos a medio exento de plaguicida. De este modo, tratamos de comprobar la capacidad de los descendientes de *D. magna* de recuperarse a los efectos del diazinón y del molinato siendo transferidos a medio exento de contaminante pero procediendo de parentales expuestos a los plaguicidas, de manera que se contempló la posibilidad de una mayor sensibilidad de los descendientes de parentales expuestos o una aclimatación por parte de los mismos en relación con los descendientes de parentales control.

Para el caso del **DIAZINÓN**, y durante la **FASE DE EXPOSICIÓN** de los dáfidos, se observó un mayor efecto del insecticida en los descendientes que en los organismos parentales, especialmente a la vista de los datos obtenidos para los parámetros de supervivencia y fecundidad. Si comprobamos la máxima concentración del insecticida a la que pudieron ser expuestas las generaciones de dáfidos estudiadas (0.5 ng/L de diazinón), se observa que la longevidad media de los parentales fue de 13.3 días, mientras que la de ambas camadas de descendientes fue de 10.7 y 6.5 días, para los dáfidos procedentes de la 1^a y 3^a camada, respectivamente. Bossuyt *et al.* (2003) también encontraron una reducción en la supervivencia de tres generaciones sucesivas de *D. magna* expuestas a concentraciones crecientes de cobre entre 0 y 150 µg/L.

No obstante, también se tienen referencias de la ausencia de efecto en la longevidad de sucesivas generaciones de *D. magna* expuestas a distintos contaminantes. Villarroel *et al.* (2000b) no detectaron reducciones en la supervivencia de *D. magna* al exponer a una generación de parentales y sus descendientes a concentraciones del acaricida tetradifón comprendidas entre 0.10 y 0.44 mg/L. Hosmer *et al.* (1998) alcanzaron la misma conclusión que Villarroel *et al.* (2000b) al exponer a una generación de parentales y una de descendientes de dáfidos a concentraciones crecientes del

insecticida fenoxycarb pese al efecto del contaminante sobre el proceso de muda en los primeros estadios larvales.

En relación con los parámetros reproductivos, se observó también un mayor efecto del insecticida en los datos obtenidos para los dáfnidos descendientes que en los parentales. De esta manera el número de neonatos por hembra que aparece como el parámetro reproductivo más sensible al diazinón mostrando CE_{50} menores para las diferentes generaciones de dáfnidos, fue de 50.5, 28.5 y 10.2 neonatos por hembra para los dáfnidos de la generación parental, F_1-1^a y F_1-3^a camadas expuestas a 0.5 ng/L de diazinón, respectivamente. Además de verse afectado el número total de descendientes por hembra, la menor fecundidad de los individuos de la 1^a y 3^a camadas se debió a una reducción tanto en el tamaño de la camada como en el número de camadas depositadas por hembra.

Diversos autores (Cowgill *et al.*, 1984) han afirmado la importancia de la fracción lipídica en el desarrollo de los embriones, y han sugerido que, en los dáfnidos adultos, la mayoría del contenido lipídico está estrechamente relacionado con la producción de huevos. Por otro lado, según Bhavan y Geraldiner (2001), existe una aceleración progresiva de la hidrólisis de los niveles de lípidos en relación con el aumento de la demanda energética por el efecto del estrés tóxico. Si se tiene en cuenta que, bajo condiciones de estrés, los lípidos son la primera fuente de energía empleada dado que son productos de almacenamiento energético más eficientes que los carbohidratos o las proteínas (Tessier *et al.*, 1983), se puede plantear la idea de que, bajo condiciones de estrés tóxico el *status* energético de las hembras se ve alterado, existiendo un mecanismo que deriva la energía obtenida y/o almacenada con el fin de garantizar la supervivencia de las mismas (Muysen y Janssen, 2001), lo cual repercutirá en la capacidad reproductiva de los dáfnidos expuestos a condiciones de estrés tóxico.

Bradley *et al.* (1991) postularon acerca del mecanismo de aprovisionamiento de reservas de los huevos de *Daphnia* apuntando dos teorías al respecto: aprovisionamiento “en paralelo” o al mismo tiempo de todos los huevos, lo cual llevaría a que no se observara efecto alguno de la falta de alimentación de los progenitores sobre el tamaño de la puesta (consecuencia de las condiciones de estrés tóxico); y aprovisionamiento “en

serie”, detectándose un efecto sobre el número de huevos (juveniles) por camada (tamaño de la camada) tal y como pasa en nuestro estudio siendo liberados únicamente los huevos que se hayan aprovisionado completamente y que, por tanto, resultarán viables.

Stark y Vargas (2003) efectuaron un estudio para comprobar los cambios demográficos en una población de *Daphnia pulex* expuesta a diazinón. Una de las conclusiones de este estudio fue que al aumentar la concentración del insecticida a la que fueron expuestos los dáfnidos, en la población se observaba un aumento de la proporción de juveniles de estados tempranos de crecimiento (hasta un 30% de juveniles de primer estadio en poblaciones expuestas a 0.5 µg/L del insecticida), disminuyendo considerablemente el porcentaje de dáfnidos en fase adulta (7.3% para las poblaciones expuestas a 0.5 µg/L de diazinón), mientras que en el grupo control se registraba una proporción similar de ambos grupos siendo algo superior el porcentaje de adultos en la población (31.22% adultos vs 20.76% de juveniles de primer estadio). Esto apunta hacia un efecto del diazinón sobre el desarrollo de los juveniles que repercute en un descenso del número de organismos que alcanzan la edad adulta, con la consiguiente repercusión negativa en la totalidad de la población.

Se tienen referencias del efecto del diazinón en la reproducción de diversas especies de ictiofauna, entre las que se encuentran reducciones en la producción de esperma por parte de machos de poblaciones de salmón atlántico (*Salmo salar*) expuesto a concentraciones del insecticida por encima de 300 ng/L (Moore y Waring, 1996).

En relación con el parámetro “tiempo a la 1ª puesta”, se observó que los dáfnidos pertenecientes a las dos camadas filiales, pese a tener más afectados el resto de parámetros reproductivos que los parentales, presentaron valores más similares a los valores control, mientras que los dáfnidos parentales tratados con diazinón retrasan en mayor medida la primera puesta en relación con el valor control. Así pues, la fecundidad de los dáfnidos descendientes se vio más afectada que la de los parentales proporcionando un menor número de neonatos que los parentales, pese a que éstos (F₀) retrasan más su primera puesta.

No se tienen referencias bibliográficas del efecto sobre el tiempo a la primera puesta en varias generaciones de *D. magna* expuestas a plaguicidas. No obstante, se tiene constancia de algunos estudios efectuados con metales pesados.

Cleuvers *et al.* (1997) observaron que el retraso en la primera puesta de *D. magna* incrementaba la posibilidad de que los neonatos nacieran en un periodo de tiempo en el cual se hubieran recuperado las condiciones óptimas en el medio, hecho que aumentaba su viabilidad. Una población de dáfidos expuesta a un tóxico podría retrasar la primera puesta de manera que, cuando se restablecieran las condiciones óptimas en el medio, los neonatos nacieran teniendo una mayor tasa de supervivencia y su desarrollo fuera más rápido (Ebert, 1993).

Pane *et al.* (2004) registraron un retraso en la primera puesta de los parentales (F_0) de *D. magna* expuestos a 85 $\mu\text{g/L}$ de níquel de hasta 12.4 días, lo cual repercutió negativamente en la recogida de descendientes procedentes de esta concentración de níquel con los que poder continuar el estudio.

Al igual que ocurrió para el parámetro “longevidad”, se observó un mayor efecto del insecticida sobre los parámetros reproductivos correspondientes a la tercera camada de descendientes, lo cual podría entenderse teniendo en cuenta que los parentales estuvieron más tiempo expuestos al diazinón y, por lo tanto, estuvieron más afectados por el insecticida. Esta mayor sensibilidad, se traduce en valores más bajos para los parámetros estudiados en esta camada más tardía (F_{1-3^a}), en relación con la más temprana (F_{1-1^a}).

Bervoets *et al.* (1993) comprobaron el mayor efecto de una dilución del 0.5% de un efluente industrial sobre la reproducción de la segunda generación de descendientes de *D. magna*, en relación con los dáfidos parentales expuestos a las mismas condiciones del ensayo. Baldwin *et al.* (1995) también observaron un mayor efecto del estrógeno dietilstilbestrol (DES) en la reproducción de la segunda generación de descendientes de *D. magna* al comprobar una mayor reducción de la fecundidad a través de un menor número de descendientes por hembra, en relación con los dáfidos parentales y los correspondientes a la primera generación de descendientes.

Al comparar el número de descendientes por organismo en un estudio en el que fueron expuestas una generación de parentales de *D. magna* y varias sucesivas de descendientes (Muysen y Janssen, 2004), se observó que la generación parental expuesta a 25 µg/L de cadmio proporcionó 62 neonatos por hembra, mientras que los dáfnidos de la primera generación de descendientes, registraron un valor de 56 neonatos por hembra. Esta diferencia aumentó al exponer los dáfnidos a 50 µg/L de cadmio, en cuyo caso se obtuvieron valores de 84 y 55 neonatos por hembra para los parentales y los animales pertenecientes a la primera generación de descendientes, respectivamente.

Se pueden, pues, concluir dos posibles hipótesis para explicar la mayor sensibilidad al diazinón de los descendientes de *D. magna* en relación con la generación parental, y de la camada más tardía de descendientes en relación con la más temprana. Se podría pensar que existiese una transferencia del plaguicida de los parentales a los descendientes, o simplemente que la mayor sensibilidad de los parentales por haber estado un tiempo más (en el caso de la camada de descendientes más tardía) o menos (en el caso de la más temprana) largo en contacto con el diazinón, repercutiría en una mayor sensibilidad de las generaciones filiales en relación con sus progenitores. No obstante, para comprobar la posible transferencia de plaguicida intergeneracional, se debería efectuar un estudio de bioacumulación y una extracción posterior del plaguicida de los organismos y certificar si efectivamente la cantidad de diazinón acumulada en las generaciones descendientes es mayor que la de los parentales, habiendo estado el mismo tiempo (21 días) en contacto con el tóxico del medio circundante.

El efecto del diazinón sobre los parámetros reproductivos en *D. magna* puede estar mediado por una reducción en la tasa de filtración de los dáfnidos, lo cual repercute directamente en la cantidad de alga asimilada por parte de los organismos expuestos.

La filtración del alimento por parte del zooplankton filtrador requiere el movimiento coordinado de diversos apéndices y su coordinación por parte del sistema nervioso. Los compuestos con capacidad neurotóxica, como es el caso del diazinón, podrían causar la pérdida de coordinación y/o parálisis, reduciendo las tasas de filtración (Ware, 1983).

Algunos autores (Day y Kaushik, 1987) han puesto de manifiesto el efecto del plaguicida fenvalerato induciendo la adhesión de materia particulada (alga y detritus) en las sedas de los apéndices de *Daphnia galeata mendotae*, observando que el grado de adhesión era mayor al aumentar la concentración de fenvalerato a la que eran expuestos los dáfidos. La reducción en la movilidad de los apéndices repercutía negativamente en la captura del alimento, reduciéndose la tasa de filtración e ingestión de los organismos.

Durante el desarrollo del presente estudio se observó una progresiva decoloración y un debilitamiento creciente de los dáfidos (capacidad de natación reducida) posiblemente asociados a la reducción en la ingesta del alga *Nannochloris oculata*, efecto que fue más llamativo en los dáfidos expuestos a concentraciones altas de insecticida. Fernández *et al.* (1994) encontraron que el insecticida diazinón reducía la tasa de filtración de *D. magna* después de ser expuesta a concentraciones de 0.45, 0.60 y 0.90 $\mu\text{g/L}$ del insecticida.

La longitud corporal de los dáfidos también se vio afectada por el insecticida diazinón, observándose en las generaciones de *D. magna* expuestas un menor crecimiento de los organismos tratados con el insecticida que en los organismos control. En el presente estudio se encontró una correlación positiva entre el tamaño corporal de los dáfidos al finalizar el ensayo (21 días) y su capacidad reproductiva, observándose que ambos parámetros se reducían en las diferentes generaciones estudiadas (F_0 , F_1 -1ª y F_1 -3ª camadas). El mayor efecto del diazinón sobre la longitud corporal de los dáfidos descendientes de *D. magna* en relación con los parentales, se correspondió también con un mayor efecto en los parámetros reproductivos de la 1ª generación (1ª y 3ª camadas). Hanazato (1998) también detectó una correlación positiva entre el tamaño corporal de las hembras y el tamaño de sus camadas cuando *D. magna* fue expuesta a diferentes concentraciones del insecticida carbaryl, afirmando la correlación entre el parámetro “tamaño corporal” y la fecundidad de los dáfidos expuestos al insecticida. Barry (1999) también observó reducciones significativas en la longitud corporal y en el tamaño de las camadas de *Daphnia longicephala* al ser expuesta a concentraciones de carbaryl entre 0.1 y 3.2 $\mu\text{g/L}$.

En el presente estudio, se observó un mayor efecto del insecticida diazinón en el crecimiento de los descendientes (F_1 -1ª y 3ª camadas) de *D. magna* que en la generación parental F_0 , registrándose un valor de 0.47 cm para los parentales expuestos a la concentración más baja de diazinón (0.05 ng/L) y de 0.46 cm para los dáfidos de las dos camadas de descendientes ensayadas. Por otro lado, para los parentales expuestos a 0.5 ng/L del insecticida, cuyos descendientes no pudieron ser medidos porque murieron antes de alcanzar el último día del ensayo (día n° 21), se obtuvo una longitud corporal de 0.45 cm.

Tras exponer a siete generaciones de *D. magna* a níquel, Münzinger (1990) encontró que la longitud corporal de los descendientes se reducía de acuerdo a las sucesivas generaciones. Pane *et al.* (2004), también expusieron una generación de parentales (F_0) de *D. magna* a níquel, así como a su primera generación de descendientes (F_1), y encontraron que el tamaño corporal de estos últimos se reducía en un 20% en relación con el de los controles, mientras que los progenitores (F_0) expuestos a la misma concentración del metal (42 $\mu\text{g/L}$) presentaban un tamaño corporal similar al de los controles. Los autores alertaron sobre la importancia de incluir más de una generación de dáfidos en los ensayos crónicos de toxicidad a la vista de los resultados obtenidos.

Tal y como comentamos anteriormente, la longitud corporal se vincula con la masa corporal y esta última se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad de recursos disponibles (Taylor, 1985; Lynch, 1989; Mc Cauley *et al.*, 1990), de manera que la existencia en el medio de compuestos con capacidad neurotóxica, afectaría a la coordinación de los apéndices filtradores de *Daphnia magna* repercutiendo en una menor tasa de filtración de alga y en un menor crecimiento de los dáfidos expuestos.

En cuanto al parámetro poblacional evaluado (tasa intrínseca de incremento natural), también se observó un mayor efecto del insecticida sobre la tercera camada de descendientes ($r = 0.15 \text{ días}^{-1}$) en relación con los dáfidos de la primera camada ($r = 0.23 \text{ días}^{-1}$) y con los de la generación parental ($r = 0.29 \text{ días}^{-1}$), siendo en cualquier caso los descendientes más sensibles al diazinón que sus parentales, como en el caso del resto de parámetros. Este hecho tiene una connotación ecológica muy importante puesto que, el parámetro poblacional evaluado engloba el efecto ocasionado por un agente

estresante (en este caso el diazinón) sobre la capacidad reproductora y la supervivencia de los organismos expuestos, y teniendo en cuenta el mayor efecto del insecticida sobre los descendientes en relación con la generación parental, podríamos aventurarnos a comentar el posible efecto irreversible sobre una población de estas características como consecuencia de una exposición a diazinón prolongada en el tiempo.

No se han encontrado referencias relativas a ensayos en los que se haya estudiado la toxicidad de plaguicidas sobre diferentes generaciones de *D. magna* a partir de la evaluación de la tasa de crecimiento (r). No obstante, se tienen referencias de estudios efectuados para ensayar la toxicidad de metales a este nivel.

El efecto del cadmio en sucesivas generaciones de *D. magna* fue comprobado en un estudio en el que siete generaciones de dáfidos fueron expuestas a distintas concentraciones del metal (Muyssen y Janssen, 2004). En este estudio se encontró una reducción del crecimiento poblacional de los dáfidos descendientes en relación con el de sus progenitores al ser expuestos a 50 $\mu\text{g/L}$ de cadmio. De esta manera, para la tasa intrínseca de incremento natural, se obtuvieron valores comprendidos entre 0.35 y 0.31 días^{-1} para los dáfidos parentales y para los pertenecientes a la séptima generación de descendientes, respectivamente.

Constituyendo el parámetro poblacional evaluado (r) un compendio de los efectos producidos por un contaminante sobre la supervivencia y la reproducción de los organismos expuestos a nivel individual (Allan y Daniels, 1982), se procedió a calcular la concentración máxima aceptable (MATC) de diazinón en relación con la tasa intrínseca de incremento natural, al igual que realizaron autores como (Buhl *et al.*, 1993; Ferrando *et al.*, 1995). Para la generación parental de dáfidos (F_0) y para la primera camada de descendientes (F_{1-1^a}) se obtuvo un valor de 0.62 ng/L de diazinón, mientras que para la tercera camada de descendientes (F_{1-3^a}) este valor bajó hasta 0.075 ng/L de diazinón, lo cual indica una mayor sensibilidad del parámetro poblacional para los dáfidos de la tercera camada de descendientes expuestos al insecticida. Por otro lado, se registró una menor CE_{50} (0.47 ng/L) para el parámetro r en los dáfidos de la F_{1-3^a} camada en relación con la CE_{50} determinada para la generación parental ($CE_{50} = 0.72$ ng/L). En ambas camadas de descendientes, no obstante, las CE_{50} determinadas para r

fueron prácticamente iguales (0.47 y 0.44 ng/L para los descendientes de la primera y de la tercera camada, respectivamente).

La diferencia registrada entre los valores obtenidos para las MATC calculadas en ambas camadas de descendientes reside en que, para la tercera camada de descendientes, se detectaron diferencias significativas ($p < 0.001$) para los grupos expuestos a concentraciones de diazinón iguales o superiores a 0.1 ng/L, mientras que los dáfidos de la primera camada presentaron una r significativamente diferente del valor control ($p < 0.001$) únicamente para el grupo expuesto a 0.75 ng/L.

Diversos autores (Baldwin *et al.*, 1995) han manifestado que la capacidad de los organismos neonatos para metabolizar xenobióticos puede ser muy elevada cuando estos organismos son expuestos prenatalmente a los compuestos químicos. Sin embargo, en el presente estudio, los efectos del diazinón en la reproducción de los dáfidos se han detectado en concentraciones tan bajas como 0.05 ng/L del insecticida para los dáfidos de la primera camada de descendientes (F_1 -1ª camada).

Durante la **FASE DE EXPOSICIÓN** en la que *D. magna* fue expuesta a concentraciones crecientes del herbicida **MOLINATO**, se observó un descenso de la longevidad de los dáfidos parentales desde 21 a 4.5 días para los organismos control y para los expuestos a 18.85 mg/L de molinato, respectivamente. Bailey (1993) encontró que la supervivencia de *Neomysis mercedis* se reducía significativamente ($p < 0.05$) al exponer a este crustáceo estuarino al herbicida molinato en concentraciones de 45.2 a 173.7 $\mu\text{g/L}$.

Para la concentración de herbicida de 6.28 mg/L se registraron supervivencias de 19.4, 20.5 y 20 días para los dáfidos de las generaciones parental (F_0), F_1 -1ª y F_1 -3ª camadas respectivamente. Se observó, pues, una supervivencia ligeramente superior en los dáfidos descendientes, en relación con el valor obtenido en los organismos control. No obstante, salvo para los valores registrados en los grupos de parentales expuestos a las dos concentraciones mayores de molinato (9.42 y 18.85 mg/L), concentraciones a las que no fueron expuestos los descendientes porque estos parentales murieron antes de

alcanzar la edad reproductora, no se registraron diferencias significativas para la longevidad en ninguna de las generaciones estudiadas.

El efecto encontrado sobre la longevidad de los dáfidos expuestos a molinato, es contrario al observado para el caso del diazinón, ensayo en el que la supervivencia registrada para los dáfidos descendientes era bastante menor a la registrada para los parentales. Parece lógico pensar que la capacidad de aclimatación de las generaciones descendientes a los tóxicos del medio pueda desarrollarse con mayor eficacia si los dáfidos están expuestos a un plaguicida menos específico, como es el caso del molinato (herbicida) cuyo principal mecanismo de acción es inhibir la división celular en las plantas contra las que se aplica, que con un plaguicida con acción insecticida como el diazinón.

En relación con los parámetros reproductivos, observamos que, tanto para el número total de neonatos por hembra, como para el tamaño de la camada y el número total de camadas por hembra, los valores registrados para los dáfidos de la primera camada de descendientes son relativamente más altos que los registrados para la generación parental al contrastar los grupos expuestos a las mismas concentraciones de molinato. Así, se obtuvieron, por ejemplo, entre 131.7 y 55.3 neonatos por hembra en la generación F_0 (control y 6.28 mg/L molinato, respectivamente), y entre 134.4 y 99.5 neonatos por hembra en la primera generación de descendientes (F_1 -1ª camada).

Para el caso de las hembras de la generación parental (F_0) expuestas a 9.42 mg/L de molinato, no se observaron huevos en la cámara dorsal de incubación hasta el día 10 del experimento. Estos huevos fueron liberados con la exuvia el día 17 del ensayo, alcanzando esta edad únicamente dos de las quince hembras expuestas al herbicida. No obstante, estos huevos resultaron inviables, no teniéndose descendientes con los que poder efectuar el ensayo multigeneracional correspondiente a esta concentración de molinato (1/4 de la CE_{50} -24 horas).

Los dáfidos de la tercera camada de descendientes (F_1 -3ª camada), proporcionaron resultados que reflejaban un efecto similar del molinato sobre los tres parámetros reproductivos (NH, TCDA y CDA) respecto a los procedentes del ensayo con los

descendientes de la primera camada, registrándose para ambas camadas de descendientes, no obstante, valores más altos que los registrados para la generación parental (F_0). De esta manera, para la mayor concentración a la que fueron expuestas las generaciones de dáfidos estudiadas (6.28 mg/L de molinato), se obtuvieron 15.6, 26.1 y 22.6 neonatos por camada para las generaciones parental (F_0), F_1-1^a y F_1-3^a camada, respectivamente; y 3.4 (F_0), 3.8 (F_1-1^a camada) y 3.7 camadas por hembra (F_1-3^a camada). Contrariamente a lo que se observó para el caso de los dáfidos expuestos a diazinón, los descendientes (F_1-1^a y 3^a camadas) mostraron una mayor fecundidad que sus parentales, a la vista de los valores registrados para cada uno de los parámetros reproductivos seleccionados en este estudio, lo cual denota la aparición de una cierta aclimatación de los dáfidos al herbicida por parte de los dáfidos descendientes (F_1-1 y 3^a camadas), o bien que no existiera transferencia del contaminante de las hembras parentales a sus descendientes.

Entre los descendientes, la primera camada tiene una capacidad reproductora ligeramente mayor que la tercera, lo cual podría entenderse, tal y como ya se apuntó para el caso del diazinón, teniendo en cuenta que los parentales pasaron más tiempo en contacto con el herbicida (tratándose de una camada de descendientes más tardía como es F_1-3^a), y que una exposición más prolongada de los parentales puede repercutir en una mayor sensibilidad de estos descendientes.

Autores como Le Blanc (1982) encontraron que la exposición de generaciones sucesivas de *D. magna* al cobre derivó en la generación de una cierta resistencia al metal. Bodar *et al.* (1990) también observaron que los dáfidos pre-expuestos a concentraciones subletales de cadmio eran más resistentes a los efectos tóxicos del cadmio. Sin embargo, estos autores determinaron que la resistencia de *D. magna* al cadmio se perdía si la descendencia de las hembras expuestas al metal era transferida a medio exento de tóxico. Esta observación sugirió que la resistencia al cadmio adquirida no era hereditaria, sino que era el resultado de una adaptación fisiológica de cada generación, esto es una aclimatación del organismo a las condiciones ambientales. Esta adaptación se detectó como resultado de una exposición a corto plazo a concentraciones subletales del metal. Van Leeuwen *et al.* (1985a) demostró que la respuesta de los dáfidos expuestos a un tóxico desde los estadios tempranos del desarrollo proporciona una mejor estimación de la toxicidad crónica que la respuesta de la descendencia de

parentales que previamente no habían sido expuestos al mismo. Otros estudios han demostrado también que la capacidad de los organismos neonatos para metabolizar los xenobióticos puede incrementarse cuando los organismos son expuestos a los compuestos prenatalmente (Baldwin *et al.*, 1995).

A la vista de los resultados de este estudio, observamos que el molinato afecta a la capacidad reproductora de *D. magna* a través de una reducción, tanto del número de neonatos por hembra, como del número y tamaño de las camadas, pero no ocasiona un efecto significativo sobre la longevidad de los dáfnidos para ninguna de las generaciones estudiadas para concentraciones de molinato iguales o inferiores a 6.28 mg/L. Hosmer *et al.* (1998) también encontraron esta diferencia al exponer a *D. magna* a concentraciones crecientes del plaguicida carbamato fenoxycarb, no registrando diferencias significativas ($p > 0.05$) en la supervivencia de los dáfnidos pero sí encontrando reducciones del número medio de neonatos por hembra.

Villaruel *et al.* (2003) también encontraron que el herbicida propanil afectaba de manera significativa ($p \leq 0.05$) a los parámetros relacionados con la reproducción de *D. magna* expuesta al plaguicida para concentraciones iguales o superiores a 0.07 mg/L del herbicida, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0.05$) para la supervivencia de los dáfnidos excepto para la concentración más alta de propanil ensayada (0.55 mg/L).

Para el parámetro “tiempo a la primera puesta”, se observó un efecto del molinato ligeramente superior sobre los descendientes que sobre los parentales encontrándose, no obstante, que los dáfnidos de la F₁-3^a camada registraban un retraso algo menor al contrastar los resultados de esta tercera camada de descendientes con los de la primera camada. De esta manera, se obtuvieron retrasos en la deposición de la primera puesta que alcanzaron los 8.9 días para los parentales expuestos a 6.28 mg/L del herbicida, y los 9.8 y 9.3 días para los dáfnidos de la primera y tercera camada de descendientes expuestos a la misma concentración de molinato, respectivamente.

Se tienen referencias del efecto de este herbicida sobre el desarrollo de otros invertebrados. Burdett *et al.* (2001) determinaron el efecto de este carbamato sobre el

invertebrado *Chironomus tepperi* habiendo registrado retrasos en el desarrollo tanto de las hembras como de los machos expuestos a concentraciones crecientes de molinato en el medio. Esta prolongación del tiempo para completar el desarrollo de los organismos expuestos fue relacionada con una mayor exposición a la acción de depredadores en el medio y la consiguiente reducción de la población en el medio natural. En el presente estudio ya pusimos de manifiesto el retraso en el tiempo de maduración de *D. magna* expuesta a molinato lo cual apuntaría en la misma dirección que las conclusiones de Burdett *et al.* (2001).

Los datos obtenidos para el parámetro de la longitud corporal, reflejaron un mayor efecto del herbicida sobre el crecimiento de las camadas F_1-1^a y F_1-3^a que sobre la generación parental (F_0), encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los grupos tratados con molinato y el valor control para las dos primeras, y tan sólo para los parentales expuestos a la máxima concentración de molinato a la que sobrevivieron dáfidos que pudieron ser medidos al finalizar el ensayo (6.28 mg/L de molinato). Los valores obtenidos para este parámetro fueron muy similares en ambas camadas de descendientes (entre 0.48 y 0.44 (F_1-1^a) ó 0.43 (F_1-3^a) cm para el grupo control y el expuesto a 6.28 mg/L de molinato, respectivamente) y menores que los registrados para la generación parental (entre 0.49 y 0.46 cm, para los mismos tratamientos).

Meyerhoff *et al.* (1985) observaron una longitud significativamente menor en dáfidos expuestos al herbicida tebuthiuron en concentraciones iguales o superiores a 44.2 mg/L, en relación con el tamaño de los dáfidos control. En otro estudio, Hanazato (1998) indicó que el tamaño corporal de los neonatos de *Daphnia* determinaba la edad a la que alcanzarían la madurez reproductiva. Una baja tasa de crecimiento debida a la exposición a agentes químicos en el medio, puede conducir a un tamaño menor de los adultos los cuales liberarán un menor número de camadas integradas, a su vez, por un menor número de descendientes (Baird *et al.*, 1990). Sin embargo, en nuestro estudio se comprobó que, aunque la longitud que alcanzaron los dáfidos descendientes al finalizar el ensayo (21 días) fue menor que la de los parentales, la capacidad reproductora de las generaciones filiales fue mayor que la de sus progenitores tal y como se comentó previamente.

Se observó que los parentales expuestos a 6.28 mg/L de molinato, registraban una longitud corporal notablemente menor el séptimo día del ensayo que los expuestos a concentraciones del herbicida menores, lo cual pareció repercutir directamente sobre la capacidad reproductora de *D. magna*. Los dáfnidos de la generación parental expuestos a 4.71 y 3.77 mg/L de molinato, portaban huevos en la cámara dorsal de incubación el sexto día del ensayo, mientras que los expuestos a 6.28 mg/L no fueron portadores de huevos hasta el 7° día de iniciarse la exposición al herbicida. Este retraso en el desarrollo de los huevos explicaría el retraso en la primera puesta por parte de los parentales expuestos a 6.28 mg/L del herbicida, que finalmente se tradujo en una reducción de la reproducción para estos individuos.

En el presente estudio se observó una relación inversa entre el efecto del molinato sobre los parámetros longevidad y crecimiento corporal, estando afectado este último, y teniendo un efecto mínimo sobre la supervivencia de los dáfnidos. No obstante en otros estudios en los que se expuso a otros invertebrados al mismo herbicida, se encontró el efecto inverso. De esta manera, Bailey (1993) encontró que la supervivencia de *Neomysis mercedis* estaba afectada en mayor grado por el herbicida molinato que el crecimiento de los crustáceos.

Tal y como vimos en el apartado de resultados, la tasa intrínseca de incremento natural disminuyó al aumentar la concentración de molinato a la que fueron expuestos los dáfnidos de la generación parental (F_0) obteniéndose un valor de 0.27 días^{-1} para los progenitores expuestos a 6.28 mg/L de molinato, frente al valor de 0.32 días^{-1} que se registró para los dáfnidos mantenidos en condiciones control. Este efecto fue consecuencia de un efecto combinado del herbicida sobre la longevidad y la capacidad reproductiva de los organismos.

Villarroel *et al.* (2003) registraron un descenso en la tasa de crecimiento poblacional de *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes del herbicida propanil, obteniendo valores entre 0.33 (control) y 0.14 días^{-1} (dáfnidos expuestos a 0.55 mg/L del herbicida).

Por otro lado, puesto que la supervivencia no se vio afectada en los dáfnidos descendientes (F_1 -1ª y 3ª camadas) expuestos a molinato y la capacidad reproductiva sí fue reducida, aunque no en los primeros días, los valores de r para los grupos ensayados fueron similares al valor control; esto indicaría que el crecimiento poblacional de los descendientes no estuvo afectado de manera significativa con las concentraciones de molinato ensayadas.

Julli y Krassoi (1995) encontraron resultados similares, detectando un menor número de neonatos por hembra en tres camadas del crustáceo cladóceros *Moina australiensis* cuando fueron expuestas a molinato. Cochran *et al.* (1997) determinaron una reducción en la fertilidad de diversas especies de laboratorio expuestas a molinato..

Por otra parte, parece lógico pensar que el herbicida molinato afecte a la fuente algal de alimento de *D. magna* (Sabater y Carrasco, 1998), especialmente a elevadas concentraciones (Tarazona *et al.*, 2003), de manera que la reproducción de los cladóceros se vería influida por cambios en la cantidad y/o calidad del alga (Julli y Krassoi, 1995). Sancho *et al.* (2003) encontraron que el crecimiento del alga *Nannochloris oculata* expuesta a una concentración de molinato de 1 mg/L era inhibido hasta en un 53.60% después de 24 horas de exposición. Como ya se comentó anteriormente, la filtración del alimento por parte del zooplancton filtrador, como es el caso de *D. magna*, requiere un movimiento de los apéndices filtradores coordinado por el sistema nervioso. De este modo, los compuestos neurotóxicos tal y como es el caso del tiocarbamato molinato (Cochran *et al.*, 1997; CPR, 2003), podrían ocasionar la pérdida de coordinación y/o parálisis, reduciendo la tasa de filtración de los dáfnidos expuestos, tal y como se avanzó al comentar los resultados obtenidos al exponer los dáfnidos al insecticida diazinón. Allen *et al.* (1995) sugirieron que el proceso de alimentación en *Daphnia* era determinante en su supervivencia y que tenía una incidencia directa sobre la fisiología de los dáfnidos en relación con su crecimiento, metabolismo y reproducción.

La concentración máxima aceptable de molinato (MATC) calculada para la tasa intrínseca de incremento natural (r), fue calculada para las generaciones de dáfnidos expuestas a molinato, obteniéndose el mismo valor para ambas camadas de

descendientes (MATC = 5.49 mg/L del herbicida). Para la generación parental de dáfidos (F_0) no se pudo calcular el valor de este parámetro porque todas las concentraciones de molinato produjeron diferencias significativas con el valor control ($p < 0.001$). Ambas camadas de descendientes registraron una tolerancia similar a los efectos del herbicida sobre r (mismo valor de MATC), los dáfidos de la tercera camada de descendientes (F_{1-3^a}) registraron una CE_{50} para este parámetro ligeramente menor para este parámetro (37.80 mg/L), lo cual podría apuntar a una sensibilidad ligeramente superior al molinato respecto al crecimiento poblacional de estos dáfidos en relación con los de la primera camada ($CE_{50} = 38.75$ mg/L de molinato).

En cualquier caso, de las generaciones de dáfidos expuestas a molinato contempladas en este estudio, la generación parental fue evidentemente la que presentó una menor CE_{50} (8.75 mg/L), dándose el efecto inverso al observado para los dáfidos expuestos a diazinón, para los que la generación parental fue la más resistente a los efectos del insecticida en relación con r .

Tras el periodo de exposición a los plaguicidas diazinón y molinato, se transfirieron los dáfidos descendientes (1ª y 3ª camadas) a medio exento de tóxico, analizándose la evolución de los mismos parámetros que durante la fase de exposición. De esta manera, durante la **FASE DE RECUPERACIÓN** a los efectos del **DIAZINÓN** se observó que la longevidad de ambas camadas de descendientes alcanzaba valores muy próximos a los valores control. En el caso de la primera camada (F_{1-1^a}), únicamente el grupo procedente de parentales expuestos a la concentración más alta de diazinón (0.75 ng/L) mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) con el valor control, siendo de 12.1 y 21 días respectivamente. Sin embargo, para los dáfidos de la tercera camada (F_{1-3^a}) no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.1$) entre la longevidad de los dáfidos procedentes de parentales pre-expuestos a diazinón y los dáfidos control.

Estos resultados reflejan una importante diferencia respecto al efecto causado por el insecticida durante la fase de exposición sobre la supervivencia de los dáfidos descendientes, recordando que para la primera camada de descendientes se registraron diferencias significativas ($p < 0.001$) para todos los grupos expuestos, y para los dáfidos de la tercera camada expuestos a concentraciones de diazinón iguales o superiores a 0.1

ng/L ($p < 0.001$). De esta manera, si el insecticida fue acumulado en las hembras progenitoras (F_0) y posteriormente transferido a la progenie (F_1-1^a y 3^a camadas), habría sido eliminado o detoxificado por el organismo en los dáfnidos descendientes al ser transferidas a medio exento de plaguicida.

Para la generación F_1-1^a camada se detectó una mayor sensibilidad de *D. magna* en los primeros estadios de vida, cuando los progenitores habían sido expuestos a concentraciones altas de diazinón (0.75 ng/L) y registrándose mortandades entre los descendientes de esta primera camada transferida a medio exento de insecticida en la primera semana de vida de los dáfnidos, mientras que para concentraciones de diazinón iguales o inferiores a 0.75 ng/L los descendientes registraron mayores índices de supervivencia. Esta observación pone de manifiesto que los primeros estadios de vida serían los más sensibles a los efectos del plaguicida en la supervivencia de los neonatos expuestos en el momento de la eclosión, probablemente como consecuencia del mayor número de mudas efectuadas en estos estadios y habiéndose propuesto por parte de otros autores la fase de muda de los dáfnidos como la más sensible a los efectos en la supervivencia bajo situaciones de estrés tóxico (Lee y Buikema, 1979; Reading y Buikema, 1983; Münzinger, 1990).

Es importante tener en cuenta también que algunos autores han encontrado que, pese a la sensibilidad de los juveniles de *Daphnia magna* a distintos tóxicos, la sensibilidad de ciertos estadios del desarrollo de los embriones es todavía mayor, recomendando el estudio de la toxicidad de los compuestos con acción tóxica sobre *D. magna* también en los huevos, antes de ser liberados de la cámara de incubación materna (Sobral *et al.*, 2001).

Se han encontrado diversas referencias a estudios efectuados para estudiar la capacidad de recuperación de invertebrados acuáticos tras un periodo de exposición a distintos plaguicidas, aunque no se trata de estudios multigeneracionales. Así, Mc Henerey *et al.* (1996) registraron una cierta recuperación de las larvas del crustáceo *Homarus gammarus* L. tras haber sido expuestas puntualmente al plaguicida diclorvos.

En relación con los parámetros reproductivos, se observaron también valores muy similares al control para el número de neonatos por hembra, tamaño de la camada y número de camadas por hembra, registrándose una mayor capacidad reproductiva (relacionada con estos tres parámetros) durante el periodo de tiempo que los dáfidos de la primera y tercera camada de descendientes pasaron en medio exento de tóxico que durante la fase de exposición al diazinón. Los dáfidos de la generación de descendientes más tardía (F_1-3^a camada) no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) respecto al control para ninguna de las concentraciones del insecticida a la que fueron expuestos sus progenitores. Para el número de neonatos por hembra y el tamaño de la camada, los dáfidos de la primera camada de descendientes (F_1-1^a) registraron diferencias significativas para los grupos cuyos parentales fueron expuestos a concentraciones de diazinón iguales o superiores a 0.5 ng/L, mientras que para el número de camadas por hembra únicamente el grupo procedente de hembras expuestas a 0.75 ng/L del insecticida presentó diferencias significativas vs control ($p<0.001$).

Algunos autores han apuntado que, tras exponer una población de organismos a un compuesto tóxico, los supervivientes extraídos del medio contaminado y transferidos a medio exento del mismo, sostendrían una mayor tasa reproductiva y los descendientes serían de mayor tamaño y más vigorosos que en la fase de exposición. Nosotros comprobamos este mismo efecto habiendo empleado en los ensayos dáfidos que eclosionaron en medio con plaguicida pero que fueron transferidos a medio exento de tóxico en las 24 primeras horas de vida.

En relación con el tiempo a la primera puesta, se observan también valores más próximos al valor control para ambas camadas de descendientes pese a haber detectado durante la fase de exposición un cierto retraso en el momento de la primera puesta, retraso que resultó ser más llamativo en los dáfidos de la tercera camada de descendientes tal y como se apuntó al discutir los resultados de la fase de exposición al diazinón. Al ser transferida a medio exento de insecticida, la progenie de *D. magna* (1^a y 3^a camadas) no se registraron diferencias significativas ($p>0.05$) para ninguna de las concentraciones de diazinón a la que fueron pre-expuestos los parentales correspondientes.

El hecho de que un organismo clave en la cadena trófica de las masas temporales de agua dulce, como es el caso de *D. magna*, sea capaz de recuperarse a situaciones transitorias de estrés resulta de gran importancia para el restablecimiento del equilibrio ecológico de la cadena alimenticia de estos ecosistemas. El registro de la recuperación de la capacidad reproductora de las generaciones descendientes mantenidas en medio exento de tóxico tras un periodo de exposición de sus progenitores a una situación de estrés tóxico, se considera un hecho positivo en la recuperación de la población de dáfidos.

El crecimiento de los descendientes de las dos camadas de *D. magna* incluidas en este estudio, se vio incrementado al transferir a los dáfidos neonatos a medio exento de diazinón. De esta manera, los valores obtenidos en esta fase de recuperación fueron mayores que los registrados durante la fase de exposición al insecticida. La longitud corporal de los organismos procedentes de parentales tratados con el insecticida alcanzó valores similares al grupo control, registrándose, no obstante, diferencias significativas para los dáfidos de la primera camada (F_1-1^a) procedentes de parentales expuestos a todas las concentraciones del organofosforado ($p < 0.001$) y únicamente para los de la tercera camada procedentes de hembras expuestas a 0.05 ng/L de diazinón ($p < 0.01$). Por lo tanto, observamos que la tercera camada de descendientes se recupera en mayor medida del efecto del diazinón sobre este parámetro, en relación con los dáfidos de la primera camada.

Cabe destacar también que, aunque en la fase de exposición hubieron grupos tratados que murieron antes de finalizar el ensayo (expuestos a concentraciones del insecticida iguales o superiores a 0.5 ng/L), en esta fase de recuperación se pudieron registrar datos para la longitud corporal de todos los grupos de dáfidos de la primera y tercera camada de descendientes procedentes de los progenitores pre-expuestos a todas las concentraciones de diazinón, ya que sobrevivieron todo el tiempo estipulado del ensayo.

El tamaño corporal por sí solo, influye en los procesos fisiológicos que contribuyen a la absorción, distribución y excreción de los plaguicidas (Mineau, 1991), de manera que la no recuperación de este parámetro podría afectar aumentando la sensibilidad de los

organismos a una segunda exposición al plaguicida. Este hecho es verdaderamente importante si se tiene en cuenta que la exposición de las comunidades acuáticas a los contaminantes es habitualmente pulsátil, y no siempre continua (Siem *et al.*, 1984; Poirier y Surgeoner, 1988; Baughman *et al.*, 1989; Parsons y Surgeoner, 1991b).

El parámetro poblacional, tasa intrínseca de incremento natural, muestra una evolución similar a la presentada por el resto de parámetros, en el sentido que aporta valores más próximos a los valores control de los que se registraron durante el periodo de exposición al diazinón. Este comportamiento se observó para las dos camadas de descendientes ensayadas, hecho que concuerda con el resto de resultados obtenidos en esta fase de recuperación a los efectos del insecticida puesto que la tasa de crecimiento poblacional considera tanto el parámetro “longevidad” como la capacidad reproductiva de los dáfidos.

Se observó una mayor recuperación de la tasa de crecimiento poblacional en los dáfidos de la F₁-3^a camada, habiéndose obtenido valores entre 0.31 y 0.15 días⁻¹ para los dáfidos de esta generación filial mantenidos en condiciones control y para los expuestos a 0.5 ng/L de diazinón (fase de exposición), respectivamente; y entre 0.31 y 0.29 días⁻¹ para los correspondientes dáfidos transferidos a medio exento de tóxico (fase de recuperación). Para la primera camada de descendientes se obtuvieron valores entre 0.31 y 0 días⁻¹ para los mantenidos en condiciones control y para los expuestos a 0.75 ng/L de diazinón, y entre 0.31 y 0.21 días⁻¹ para los mismos grupos en esta fase de recuperación.

Al examinar el efecto que tuvo la exposición a diazinón sobre los parámetros estudiados en las generaciones de *D. magna* que se han considerado en este estudio, se observó que los valores correspondientes a estos parámetros se veían más disminuidos en relación con los valores control en las camadas de descendientes (F₁-1^a y 3^a camada) que en la generación parental (F₀). Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que existiera una transferencia intergeneracional del insecticida de la generación F₀ a las sucesivas de descendientes, de manera que, el efecto del tóxico ensayado sobre las

generaciones F_1-1^a y 3^a camada se viera incrementado en relación con el producido sobre la generación parental.

Por otra parte, al observar que la disminución de los valores para los parámetros considerados era mayor en los grupos tratados de la tercera camada de descendientes que en los de la primera, se pensó en la posibilidad de que una permanencia de los progenitores en contacto con el insecticida más prolongada en el tiempo, contribuiría a que las camadas de descendientes más tardías (en nuestro caso, F_1-3^a camada) manifestaran un mayor efecto como consecuencia de la mayor exposición de los parentales a la situación de estrés tóxico, que las más tempranas (F_1-1^a camada).

Posteriormente, teniendo presentes los resultados derivados de la fase de recuperación del estudio, hemos visto que la generación F_1-3^a camada, que en la fase de exposición apareció como la más afectada por el insecticida, manifestó una buena capacidad de recuperación, mostrando al término de esta fase del estudio valores similares a los que presentó la generación F_1-1^a , e incluso para muchas concentraciones de diazinón, superiores a ellos. Sin embargo, aquellos descendientes (F_1-1^a y 3^a camada) procedentes de parentales expuestos a concentraciones de diazinón iguales o superiores a 0.5 ng/L, todavía mostraron una reducción en sus parámetros reproductivos tras la fase de recuperación.

Según esto, únicamente cabría decir que la capacidad de recuperación de cada camada de descendientes, siendo transferidos a medio exento de plaguicida, y tras la permanencia de los progenitores (F_0) en presencia de diazinón en el medio hasta el momento de la eclosión de los neonatos, es intrínseca a cada una de ellas, no pudiéndose relacionar con el registro de un mayor efecto del insecticida ensayado sobre la tercera camada (F_1-3^a camada) en relación con la primera (F_1-1^a camada) cuando estos mismos descendientes permanecieron durante 21 días en medio con tóxico (fase de exposición). Este tipo de adaptación intrínseca de cada camada (aclimatación) de descendientes es a la que hacían referencia Bodar *et al.* (1990) al exponer generaciones sucesivas de *D. magna* a los efectos del cadmio cuando discutían la existencia de una adaptación hereditaria a la presencia del metal en el medio.

Durante la **FASE DE RECUPERACIÓN** a los efectos producidos por el herbicida **MOLINATO** en la fase previa de exposición de los dáfidos parentales, se observó que la longevidad de los dáfidos de ambas camadas de descendientes (F_1 -1^a y 3^a camada), que no manifestaron diferencias significativas ($p>0.5$) con el valor control durante la fase de exposición, alcanzaron en esta fase de recuperación el mismo valor que el valor control (21 días) incluso en aquellos organismos procedentes de parentales expuestos a la concentración más alta del herbicida (6.28 mg/L).

Se concluye, pues, que el efecto del herbicida molinato en la supervivencia de los dáfidos expuestos fue menor que en aquellos expuestos a diazinón. Este hecho parece lógico dado que cada uno de estos plaguicidas está diseñado con un objetivo distinto: con acción herbicida en el caso del molinato, y con acción insecticida el diazinón. No obstante, no hay que menospreciar la toxicidad que tiene este herbicida para algunas especies de peces y de invertebrados, encontrándose que puede ser más alta que la encontrada para algunas especies de algas tales como *Chlorella saccharophila*, *Chlorella vulgaris* y *Pseudoanabaena galeata* (Sabater y Carrasco, 1998).

En relación con los parámetros reproductivos, encontramos una recuperación notable en los valores del número de neonatos por hembra y número y tamaño de las camadas en relación con los obtenidos durante la fase de exposición al herbicida. La recuperación registrada para el caso de los dáfidos de la tercera camada de descendientes fue mayor que para los de la primera camada, no detectándose diferencias significativas para ninguno de los tres parámetros señalados ($p>0.05$) para la camada más tardía (F_1 -3^a camada). Para el caso de los dáfidos de la primera camada de descendientes (F_1 -1^a camada), todos los grupos procedentes de parentales tratados registraron diferencias significativas ($p<0.001$) en relación con los valores control para el número de neonatos y para el de camadas por hembra. De esta manera, los dáfidos de la primera camada de descendientes transferidos a medio exento de molinato, y procedentes de parentales pre-expuestos a 6.28 mg/L de molinato, registraron un número total de neonatos y de camadas por hembra cuyos valores eran hasta un 16 y un 20% más bajos que los obtenidos para el grupo control respectivamente, si bien es cierto que los valores obtenidos fueron mayores que durante la fase de exposición.

La mayor capacidad de recuperación de los dáfnidos de la tercera camada de descendientes después de haber sido transferidos a medio exento de tóxico también fue apuntada al analizar los resultados obtenidos para las diferentes generaciones de *D. magna* expuestas al insecticida diazinón.

Según el protocolo de la OECD (OECD, 2000) un número de neonatos viables por parental superior a 60 (en un periodo de 21 días) es indicativo de que los progenitores se encuentran en buenas condiciones fisiológicas. En el presente estudio, y para los dos plaguicidas ensayados, se observó que tras un periodo de tiempo en medio exento de plaguicida de 21 días, los descendientes de *D. magna* eran capaces de alcanzar esta cifra e incluso superarla (en mayor medida para los descendientes de parentales pre-expuestos a molinato), lo cual indicaría una vuelta a las condiciones óptimas de reproducción de los dáfnidos transferidos a medio exento de contaminante.

Para el tiempo a la primera puesta se observó que, tanto para los dáfnidos de la primera como para los de la tercera camada de descendientes, se registraron valores que pusieron de manifiesto un cierto retraso en el momento en que los organismos alcanzaron la madurez reproductiva. De esta manera el tiempo a la primera puesta de los dáfnidos de la generación F₁ (1^a y 3^a camada) procedentes de parentales pre-expuestos a 6.28 mg/L del herbicida, registró valores hasta un 19% y un 15% por encima del valor control, respectivamente, pese a que los organismos fueron transferidos a medio exento del herbicida.

La longitud corporal de los dáfnidos durante la fase de recuperación mostró valores que indicaban una clara recuperación respecto de los registrados durante la fase de exposición a molinato. Heath *et al.* (1997) expusieron larvas de *Pimephales promelas* a molinato, encontrando, tras un periodo de recuperación a los efectos del herbicida de 10 días, que los peces prácticamente duplicaban su longitud e incrementaban su peso de 6 a 18 veces el peso registrado durante la fase de exposición.

No obstante la recuperación de los valores para este parámetro, para las dos camadas de descendientes ensayadas en este estudio, se registraron diferencias significativas ($p < 0.001$) para el grupo de dáfnidos procedentes de parentales pre-expuestos a la

concentración más baja de molinato (3.77 mg/L), mientras que para concentraciones más altas del herbicida todos los descendientes de parentales pre-expuestos alcanzaron el último día del ensayo (21 días) y se registraron longitudes corporales mayores que para los procedentes de 3.77 mg/L de molinato. Esta observación apunta a una mayor resistencia de los dáfnidos procedentes de parentales pre-expuestos a las concentraciones más altas de molinato, mientras que para la más baja todavía se detectan efectos significativos sobre el crecimiento de los mismos.

Muysen y Janssen (2004) expusieron a siete generaciones sucesivas de *D. magna* a concentraciones crecientes de cadmio entre 0 y 250 µg/L del metal con el fin de estudiar la aclimatación de las generaciones descendientes a la presencia de cadmio en el medio. En ese estudio, los dáfnidos expuestos a 25 µg/L de cadmio presentaron un menor número de juveniles por hembra que los expuestos a concentraciones de cadmio más altas. Chapman (1985) describió la teórica aclimatación a un tóxico y el patrón de respuesta del organismo expuesto; de esta manera describió una franja en la que se potencia la tolerancia al tóxico, y dentro de esta franja existe una zona de “alta” y otra de “baja” tolerancia, correspondiéndose esta última con una exposición a concentraciones de tóxico tan bajas que resultan insuficientes para desencadenar la inducción de los mecanismos de detoxificación que acompañan al fenómeno de la aclimatación. En el presente estudio, no obstante, únicamente el parámetro “longitud corporal” ha puesto de manifiesto este comportamiento de modo que no podemos generalizar la reflexión de Chapman.

Después de un periodo de recuperación de 21 días, los dáfnidos de la 1ª y 3ª camadas de descendientes mostraron valores algo mayores que los registrados durante la fase de exposición en relación con la tasa intrínseca de incremento natural, no registrándose diferencias significativas ($p > 0.005$) para ninguno de los grupos cuyos parentales fueron tratados con molinato. Los dáfnidos de la generación F₁-3ª camada presentan, no obstante, tasas de crecimiento poblacional algo más altas que las de la primera camada. Este apunte es importante, teniendo en cuenta que durante la fase de exposición ambas camadas de descendientes mostraron la tasa de crecimiento poblacional afectada en un orden similar, por lo tanto, de nuevo la tercera camada vuelve a mostrar una mayor

capacidad de recuperación a los efectos del herbicida, al igual que ocurrió en el caso del ensayo con diazinón.

Julli y Krassoi (1995) observaron que, tras ocho días de exposición a molinato, la fuente algal de alimento de *D. magna* consistente en diversas especies de clorofíceas, se veía afectada por las crecientes concentraciones del herbicida ensayadas. Estos autores apuntaron una pérdida progresiva del color verde característico de las microalgas y la adopción de una coloración amarillenta acompañada de fenómenos de precipitación en el fondo de los frascos del ensayo, efectos que se hacían más acusados al incrementar la concentración de molinato a la que eran expuestos los dáfidos.

En la fase de exposición del presente estudio, también se detectaron cambios en la calidad de *Nannochloris oculata* similares a los descritos por Julli y Krassoi. No obstante, considerando que los dáfidos de la primera y tercera camada de descendientes fueron transferidos a medio exento de tóxico para efectuar una fase de recuperación, el efecto que éste pudiera causar sobre la fuente de alimento quedaría suprimida de manera que *D. magna* recuperaría la disponibilidad de alga en buenas condiciones, hecho que favorecería la recuperación de su capacidad reproductiva, de crecimiento y supervivencia.

Haciendo una visión retrospectiva de los resultados obtenidos para el ensayo de toxicidad (fase de exposición y de recuperación) del molinato sobre *D. magna*, se ha observado que durante la fase de exposición al herbicida, la longevidad y la capacidad reproductiva de los organismos expuestos se vio más afectada en los individuos pertenecientes a la generación parental que en los dáfidos de las camadas de descendientes. De esta manera, podríamos decir que los dáfidos descendientes se muestran más resistentes al molinato que la generación parental, aclimatándose en mayor medida la camada más tardía (F_1 -3ª camada) que la más temprana (F_1 -1ª camada). Dada la importancia de la longevidad y la reproducción temprana en el parámetro poblacional evaluado, la tasa de crecimiento poblacional no se vio tan afectada en las camadas de descendientes como en la de parentales. Sin embargo, la longitud corporal de los dáfidos descendientes se vio más afectada en relación con la de sus progenitores.

Durante la fase posterior en medio exento de herbicida, se observó una total recuperación de la longevidad y la longitud corporal de las dos camadas de descendientes de *D. magna*. La fecundidad de los descendientes también se recuperó, observándose valores más altos para la camada más tardía de descendientes (F_1-3^a camada); así mismo la tasa de crecimiento poblacional también se recuperó en mayor medida en la generación F_1-3^a camada que en la primera, observándose, no obstante, recuperación en ambas camadas de descendientes en relación con los valores registrados durante la fase de exposición al herbicida.

Al igual que ocurrió para el caso de los dáfidos expuestos a concentraciones crecientes de diazinón, la tercera camada de descendientes (F_1-3^a camada) cuyos parentales fueron pre-expuestos a molinato se recuperó en mayor medida que los dáfidos pertenecientes a la primera camada (F_1-1^a) para algunos parámetros, lo cual nos hace pensar en que la adaptación mostrada por los dáfidos sea intrínseca a cada generación, y no de carácter hereditario.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio de la toxicidad del insecticida diazinón y el herbicida molinato sobre *Daphnia magna*, se postula la siguiente hipótesis de reparto energético: siendo sometida una población a una situación de estrés tóxico por presencia de diazinón o molinato en el medio, tras restablecerse las condiciones de ausencia de tóxico en el medio, los esfuerzos energéticos se conducen, en primer lugar a mantener el metabolismo basal (cubrir las necesidades mínimas para subsistir individualmente) y en segundo lugar a mantener un cierto crecimiento poblacional a través de la reproducción; por último, la energía está orientada a aumentar el tamaño corporal de los individuos con el fin de favorecer indirectamente la consecución de los dos objetivos anteriores.

En general, el efecto residual observado en las camadas de descendientes mantenidas durante 21 días en medio exento de tóxico fue mayor sobre los parámetros estudiados en los dáfidos procedentes de parentales pre-expuestos a concentraciones crecientes del insecticida diazinón, que los procedentes de una generación parental de *D. magna* pre-expuesta al herbicida molinato.

Este resultado es comprensible a la vista de los efectos caracterizados para cada uno de los plaguicidas ensayados en este estudio. El efecto más importante descrito para el molinato es su capacidad de reducir el crecimiento algal (Sancho *et al.*, 2003), efecto que revierte en una reducción de la tasa de filtración e ingestión de *D. magna*. Así mismo, se plantea la posibilidad de precipitación de *N. oculata* observada durante este estudio, precipitación que propiciaría la adhesión del alga a las setas de los apéndices de *Daphnia*, reduciendo su capacidad de natación. Por lo tanto, el efecto del molinato sobre *Daphnia magna* sería un efecto indirecto a través del ocasionado sobre la calidad de su alimento. Se reconoce también la capacidad neurotóxica del herbicida (Cochran *et al.*, 1997), así como su acción anticolinesterásica reversible (Nishioka, 1977).

Para el caso del diazinón, es clara su capacidad como compuesto neurotóxico, siendo un inhibidor irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (Kwan *et al.*, 2004), lo cual genera una descoordinación del movimiento de los apéndices filtradores y locomotores con las consiguientes reducciones en la tasa de filtración y en la capacidad de natación de *D. magna*. De esta manera, el efecto del insecticida diazinón sería un efecto directo sobre los organismos expuestos.

Además de su capacidad para inhibir la actividad acetilcolinesterasa, cualquier clase de serina-hidrolasa puede ser objeto de inhibición por parte de los plaguicidas organofosforados, como es el caso del diazinón. Las serina-hidrolasas juegan un papel muy importante en el sistema inmunitario, de modo que la exposición a altas concentraciones de plaguicidas organofosforados puede causar efectos directos sobre las células asociadas al sistema inmunitario, deprimiendo la función inmune en las especies de invertebrados acuáticos expuestas (Galloway y Handy, 2003).

6.3. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el contenido proteico de *D. magna*.

Los dáfidos expuestos a concentraciones crecientes de **DIAZINÓN** mostraron, para cada uno de los tiempos de exposición ensayados, un contenido proteico progresivamente menor, relacionándose directamente este descenso con la concentración de insecticida ensayada. Knowles *et al.* (1987) encontraron una relación semejante entre el descenso registrado en el contenido proteico de *D. magna* y la creciente concentración de di-2-etilhexil-ftalato, siendo esta relación directa tras 7 días de exposición al contaminante pero no siendo tan clara después de 21 días de exposición. Esta observación fue atribuida a que, para un tiempo de 21 días, en los dáfidos se ha activado el fenómeno reproductivo con las interferencias correspondientes que conlleva este proceso a nivel energético. Elendt (1989) relacionó la liberación de juveniles desde la cámara dorsal de incubación de *D. magna* durante el proceso reproductivo con una pérdida importante de proteínas de los parentales. Por lo tanto resulta importante tener en cuenta el proceso reproductivo y su influencia sobre los niveles de proteínas de *D. magna*, recomendándose su medición antes de iniciarse éste tal y como se procede en el presente estudio (6º-7º día de vida).

Se encontraron resultados semejantes al exponer la misma especie a concentraciones crecientes de los plaguicidas clordecone (Mc Kee y Knowles, 1986a) y fenvalerato (Mc Kee y Knowles, 1986b).

Cauchie *et al.* (1999) relacionaron directamente el contenido proteico de *D. magna* con la incorporación de algas del medio, de modo que la presencia de neurotóxicos en el ambiente, como es el caso del insecticida diazinón, que afectan a la coordinación de los apéndices filtradores e indirectamente a la ingesta de alimento influirían en una alimentación deficitaria ocasionando la bajada del contenido proteico de los organismos expuestos.

Tras un periodo de ingesta limitada, los dos primeros días *D. magna* recurre a los carbohidratos como fuente principal de energía, siendo las proteínas la principal fuente energética entre los días 3º y 5º (72 y 120 horas, respectivamente). Esta conclusión, aportada por un estudio de Elendt (1989) explicaría la mayor reducción del contenido

proteico de los dáfidos de la generación parental (F_0) para los tiempos más largos de exposición registrada en el presente estudio. Villarroel (2004) estudió la variación en el contenido calórico de *D. magna* expuesta a los plaguicidas tetradifón y propanil, encontrando que la primera fuente energética la constituían los lípidos y el glucógeno, siendo metabolizadas las proteínas en último lugar como fuente de energía. Esta conclusión también fue puesta de manifiesto por otros autores con anterioridad (Bodar *et al.*, 1988).

Para los dáfidos parentales (F_0), se observó un mayor efecto del diazinón para tiempos de exposición entre 48 y 96 horas, mientras que para los descendientes de la primera camada (F_1-1^a) se registró una mayor reducción del contenido proteico en los animales expuestos durante 24 y 96 horas al insecticida. Por otro lado, se comprobó un incremento del contenido proteico de los dáfidos paralelo a la edad de los individuos para las generaciones de *D. magna* expuestas al insecticida. Los dáfidos tratados con diazinón presentaron un contenido proteico en aumento al incrementarse la edad de los individuos, siendo este aumento menor al registrado en los dáfidos control. No obstante, los dáfidos de la tercera camada de descendientes, tratados con diazinón, mostraron una evolución similar del contenido proteico con la edad de los individuos en relación con el de los dáfidos control especialmente para el último tiempo de exposición (120 horas). Esto sugiere la mayor adaptación de estos dáfidos a los efectos del insecticida en relación con las generaciones F_0 y F_1-1^a camada.

Elendt (1989) explicó que, durante los dos primeros días de ingesta limitada, *D. magna* recurre a los carbohidratos como fuente principal de alimento, siendo las proteínas la principal fuente energética entre las 72 y las 120 horas. Esta reflexión explicaría, tal y como apuntamos anteriormente, la mayor reducción en el contenido proteico para los tiempos más largos de exposición de F_0 al insecticida diazinón (menores % *vs* control). Sin embargo, hemos de tener en cuenta que el estudio de Elendt se efectuó con una única generación parental de dáfidos. Posiblemente, para los dáfidos descendientes que se presentan como más sensibles al diazinón (F_1-1^a), el efecto sobre el contenido proteico se adelanta en el tiempo, aunque posteriormente (F_1-3^a) los dáfidos se adapten ligeramente y por eso no se registraron diferencias

significativas ($p < 0.05$) para el tiempo de exposición de 120 horas; de hecho para la tercera camada de descendientes, se observó un menor efecto del diazinón de modo que el contenido proteico registrado para los dáfidos tratados se aproximó más a los valores control que en el caso de los descendientes de la primera camada.

En otro estudio, los investigadores Printes y Callaghan (2003) expusieron a *Daphnia magna* a distintas concentraciones de fenobarbital y etil-paratión observando que, en los organismos control el contenido proteico aumentaba con la edad de los dáfidos, siendo menor este aumento en los dáfidos tratados con ambos tóxicos.

En el presente trabajo, al exponer individuos de la generación parental (F_0) de *D. magna* a concentraciones crecientes del herbicida **MOLINATO**, se observó una reducción de su contenido proteico que resultó ser más acusada entre las 24 y las 72 horas de exposición. El mayor efecto sobre el contenido en proteínas de los dáfidos de esta generación tuvo lugar durante las primeras 24 horas de exposición al herbicida, registrándose valores de hasta el 55.6% vs control (ver tabla 34). Hemos de tener en cuenta que el compuesto afecta a la calidad del alga por su carácter herbicida de modo que es comprensible que *D. magna* se vea afectada desde las primeras 24 horas de exposición al tóxico. Posteriormente, para tiempos de exposición más largos, el contenido proteico se aproximó más a los valores control.

Para las generaciones de descendientes (F_1 -1ª y 3ª camadas) de *D. magna* se obtuvieron reducciones del contenido proteico en consonancia con la concentración creciente de molinato al igual que ocurrió para la generación parental de dáfidos. Para las dos camadas de descendientes contempladas en este trabajo, las mayores reducciones del contenido en proteínas se registraron durante las primeras 24 horas de exposición al herbicida. De esta manera, se obtuvieron porcentajes vs control de hasta el 52.34 y el 68.89% para los dáfidos de la 1ª y 3ª camada, respectivamente, expuestos durante 24 horas a 6.28 mg/L del herbicida.

Al finalizar el ensayo de exposición (120 horas), los parentales expuestos a la concentración más alta de herbicida (9.42 mg/L) alcanzaron contenidos proteicos de hasta el 94.9% vs control, recuperándose prácticamente los valores registrados para el

grupo control. De las dos camadas de descendientes, los pertenecientes a la primera camada expuestos durante 120 horas a 6.28 mg/L registraron % *vs* control más bajos que los de la tercera camada, obteniéndose valores de 76.04 y 89.8% *vs* control, respectivamente. Este efecto pone de manifiesto la mayor repercusión del herbicida sobre el contenido proteico de los descendientes en relación con el de los parentales, siendo la primera camada la más afectada.

Distintos estudios han puesto de manifiesto el efecto de condiciones de estrés tóxico en la reducción del contenido proteico de *Daphnia* en relación con el contenido registrado en condiciones control. De esta manera, Barber *et al.* (1990) encontraron un contenido proteico creciente con la edad para distintos clones de *D. magna* expuestos a cadmio y a 3,4-dicloroanilina, siendo menos notorio este aumento para los dáfidos tratados que para los organismos control. La pérdida de contenido en proteínas registrado para los dáfidos expuestos a los dos compuestos ensayados en el estudio de Barber *et al.* (1990), en relación con los dáfidos control, se relaciona con una pérdida de peso durante la exposición a condiciones de estrés tóxico. Es decir, se produce un aumento de la degradación de las proteínas (aumento del catabolismo) destinadas a la obtención de energía de mantenimiento del organismo, puesto que el proceso de asimilación de alimento disminuye durante las condiciones de estrés.

En un estudio anterior, Elendt (1989) ya había constatado una disminución del contenido en proteínas en relación con el peso de *D. magna* al reducirse la alimentación de los dáfidos, y posteriormente también se ha puesto de manifiesto la reducción del contenido proteico en *D. magna* bajo condiciones de ayuno prolongado (Tessier y Goulden, 1982; Guisande *et al.*, 1991).

Sancho *et al.* (2003) estudiaron el efecto del herbicida molinato sobre las tasas de filtración e ingestión de alimento en *D. magna*, comprobándose un descenso de ambas de acuerdo con el aumento de la concentración del plaguicida. En dicho estudio se obtuvieron unos valores de 14.4 y 17.0 mg/L de molinato para las CE₅₀ (5 horas) del herbicida sobre las tasas de filtración e ingestión, respectivamente. Estos resultados

sugieren que las concentraciones de molinato ensayadas en un tiempo de 5 horas son suficientes para reducir las tasas de alimentación de *D. magna*.

El efecto del diazinón sobre las tasas de filtración e ingestión de *Nannochloris oculata* por parte de *D. magna* fue estudiado en un trabajo efectuado por Fernández *et al.* (1994) en el que se determinaron unas CE_{50} (5h) de 0.47 y 0.60 $\mu\text{g/L}$ de diazinón para ambos parámetros. De esta manera se observó que el efecto del insecticida a corto plazo sobre la tasa de alimentación de los dáfidos era más acusado que sobre la supervivencia de los mismos, habiéndose determinado una CE_{50-24} horas de 0.86 $\mu\text{g/L}$ (Fernández *et al.*, 1995).

Por lo tanto, los plaguicidas ensayados en el presente estudio deben reducir las tasas de alimentación de *D. magna*, lo que repercutirá en un descenso de las reservas proteicas de los dáfidos con las consiguientes consecuencias sobre la reproducción y la supervivencia de los mismos registradas en los ensayos crónicos de este trabajo.

Villarroel *et al.* (2004) encontraron una reducción del contenido proteico de *D. magna* que osciló entre el 13 y el 25% *vs* control al ser expuesta a 0.07 y 0.55 mg/L del plaguicida tetradifón. En este estudio, los autores apuntaron que el descenso registrado en el contenido proteico de los animales expuestos a situaciones de estrés tóxico podría deberse a diferentes mecanismos fisiológicos entre los que se encuentran la formación de lipoproteínas utilizadas para reparar los daños ocasionados a nivel celular y tisular, así como también a su utilización por parte de las células con requerimientos energéticos (Rambabu y Rao, 1994).

Tanto para el caso de las generaciones de dáfidos expuestos a diazinón, como para las expuestas a molinato, en general se observaron mayores porcentajes del contenido proteico *vs* los valores control al aumentar el tiempo de exposición a los plaguicidas. Este efecto podría explicarse por la síntesis de proteínas de estrés, teniendo en cuenta que el procedimiento empleado en el presente estudio para determinar el contenido proteico de los dáfidos registra las variaciones en la concentración de proteínas totales

de los organismos, de manera que si existiera síntesis de proteínas de estrés, el contenido proteico evaluado aumentaría pese a disminuir las proteínas estructurales.

Las denominadas proteínas de estrés son proteínas que, en condiciones normales están vinculadas a una serie de funciones relacionadas con la síntesis y el plegamiento de los péptidos (Craig, 1993) pero que en presencia de contaminantes en el medio adoptan otras funciones secundarias como la reparación, renaturalización, resolubilización ... de las proteínas dañadas (Rothman, 1989; Ellis, 1990; Nover, 1991; Gething y Sambrook, 1992). En diversas especies de peces y de invertebrados, concentraciones subletales de diazinón en el medio afectan al proceso de traslación normal de los genes, aumentando la traslación de los genes que codifican para la síntesis de proteínas de estrés (Dyer *et al.*, 1993).

En general, se alcanzaron menores porcentajes *vs* control para el contenido proteico de los dáfnidos expuestos al herbicida molinato que para los expuestos al insecticida diazinón, conclusión razonable considerando que, pese a que ambos compuestos afectan las tasas de filtración e ingestión de *D. magna* de acuerdo con Fernández *et al.* (1994) y Sancho *et al.* (2003), el molinato debido a su carácter herbicida afecta directamente a la calidad de la fuente de alimento de los dáfnidos tal y como se observó en el presente estudio en el que se anotaron reducciones en la coloración del alga y un aumento de la sedimentación en los frascos durante los ensayos. Julli y Krassoï (1995) apuntaron un cambio de coloración en las algas *Selenastrum capricornatum* y *Ankistrodesmus* sp. empleadas como fuente de alimento del crustáceo cladóceros *Moina macrocopa* al que expusieron a concentraciones crecientes de molinato. En dicho estudio se registró una coloración amarillenta de las especies algales empleadas como consecuencia de la toxicidad ocasionada por el herbicida, así mismo se observó una sedimentación de las mismas en el fondo de los frascos del ensayo que aumentaba al incrementar la concentración de molinato a la que eran expuestos los crustáceos.

6.4. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en el peso de los parentales (F₀) de *D. magna*.

A la vista de los resultados obtenidos para el peso de los dáfidos de la generación parental expuestos a concentraciones crecientes de *DIAZINÓN*, se observó un aumento en los valores de dicho parámetro en consonancia con la edad de los organismos, detectándose aumentos menores para el peso de los dáfidos expuestos a las concentraciones más altas del insecticida lo cual pone de manifiesto el efecto del diazinón sobre el crecimiento de *D. magna*.

Así mismo, se apuntó un mayor efecto del diazinón sobre el peso de los dáfidos expuestos durante tiempos largos, registrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los tratamientos para un tiempo de exposición de 120 horas.

Vink *et al.* (1995) también encontraron una reducción significativa del peso del isópodo *Porcelloionides pruinosus* cuando fue expuesto a concentraciones crecientes de diazinón.

A medida que aumenta el tiempo de exposición es de suponer que aumente la cantidad de tóxico acumulada en el interior del organismo lo cual favorecería la unión del organofosforado al enzima AChE frente a la unión enzima-acetilcolina. La unión del organofosforado al enzima afecta el sistema de filtración de *Daphnia* debido a la pérdida de coordinación en el movimiento de los apéndices filtradores de los organismos expuestos. El mal funcionamiento del sistema de incorporación de alimento al interior del organismo ocasiona una reducción en el peso de los dáfidos lo cual repercute negativamente sobre la capacidad reproductiva de los mismos, y conduce en última instancia a la muerte de los organismos expuestos a diazinón.

Son diversas las referencias relativas a estudios efectuados con dáfidos expuestos a plaguicidas en los que se ha asociado la inhibición del crecimiento de los organismos expuestos con una reducción de la reproducción de los mismos (Van Leeuwen *et al.*, 1985b; Ferrando *et al.*, 1996; Hanazato, 1998). De esta manera, la reducción del peso de *Daphnia* podría interpretarse como un indicador temprano del efecto de los tóxicos sobre la capacidad reproductiva de este cladóceros a largo plazo.

En el caso de los dáfidos expuestos al herbicida **MOLINATO**, también se detectó un aumento del peso de *D. magna* en consonancia con la edad de los individuos, aumento que resultó ser menor para los dáfidos expuestos a las concentraciones de molinato más altas. No obstante, a diferencia del efecto observado para el caso del insecticida para el que el mayor efecto sobre el peso de *D. magna* se registró para tiempos de exposición ≥ 72 horas, el herbicida molinato tuvo un mayor efecto durante los tiempos intermedios de exposición (48 y 72 horas).

El efecto del herbicida molinato sobre el contenido proteico y sobre el peso de los parentales expuestos entre 48 y 72 horas podría correlacionarse, detectándose para ambos parámetros el mayor número de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores registrados para los dáfidos tratados y los correspondientes a los dáfidos control.

Por otro lado, si bien es cierto que la reducción en el contenido proteico de los parentales provocada por el insecticida diazinón para tiempos de exposición de 72 y 96 horas se corresponde con una reducción en su peso, el efecto que tuvo el compuesto organofosforado fue más significativo sobre el peso de todos los grupos de dáfidos expuestos, no pudiéndose relacionar directamente con una reducción en el contenido proteico puesto que el mayor efecto se registró para tiempos de exposición comprendidos entre 48 y 96 horas. Esto nos hace pensar que el insecticida ensayado en el presente estudio puede afectar a alguna otra fuente energética distinta de las proteínas y que repercute directamente sobre la reducción del peso de los organismos expuestos.

Khangarot y Rathone (2003) encontraron una reducción del peso de *D. magna* cuando fue expuesta a concentraciones de cobre ≥ 0.032 mg/L durante un periodo de 48 horas. En este mismo estudio, se registraron reducciones de más del 45% en el peso de los dáfidos expuestos durante 48 horas a 0.18 mg/L de cobre.

En otro estudio (Villaruel, 2004) se comprobó el efecto del herbicida propanil sobre el peso de *Daphnia magna* registrándose diferencias significativas con el valor control ($p < 0.05$) para todos los tratamientos ensayados (concentraciones entre 0.07 y 0.55 mg/L

del herbicida), efecto que fue relacionado con una reducción en el contenido proteico de los dáfidos expuestos al tóxico.

El herbicida molinato tiene un efecto directo sobre la fuente de alimento de *Daphnia* tal y como se comentó al discutir los resultados de los ensayos crónicos de toxicidad de este estudio. Este efecto directo sobre la calidad de *Nannochloris* incluye una mayor deposición del alga sobre las sedas de los apéndices filtradores de *Daphnia* (Day y Kaushik, 1987), de modo que para individuos más jóvenes (hasta 72 horas) la fijación del alga a los apéndices filtradores impide el correcto movimiento de los mismos que propicia la incorporación de alimento al interior del organismo. Sin embargo, conforme los organismos aumentan de tamaño (120 horas), el aumento de la potencia del movimiento de los apéndices reduce en cierto modo el efecto negativo sobre la capacidad de filtración ejercido por la deposición de *N. oculata* sobre las sedas de los mismos. Esto conduce a una recuperación del peso de los dáfidos durante los tiempos largos de exposición que coinciden con la mayor edad de los dáfidos. Esta recuperación se relaciona con el menor efecto del molinato sobre el contenido proteico de la generación parental de *D. magna* expuesta durante 120 horas al herbicida en relación con los niveles de proteínas registrados para tiempos de exposición inferiores, de modo que conforme se registra una mayor incorporación de alimento al organismo, aumenta el contenido proteico en los dáfidos lo cual revierte en un aumento del peso de los mismos.

Considerando que el crecimiento corporal de *Daphnia* y su peso son parámetros directamente dependientes (Bottrell *et al.*, 1976), son numerosos los estudios que establecen una relación directa entre el efecto de diversos contaminantes sobre el crecimiento de *Daphnia* y la reducción en su capacidad reproductiva. De esta manera, Kamaya *et al.* (2005) detectaron una reducción del número de mudas de *D. magna* expuesta a la resina ABA (ácido abiético), relacionándose directamente con un incremento en el tiempo transcurrido hasta la alcanzar la madurez reproductiva.

Bradley *et al.* (1991) establecieron que el aumento del peso de los huevos de *Daphnia* tenía lugar a costa de las reservas maternas. De este modo, es lógico pensar

que una reducción en el peso de los progenitores se vea reflejado en una reducción en su capacidad reproductiva.

Podríamos, pues, argumentar que, en términos generales, el efecto ocasionado por el diazinón y el molinato sobre el peso de los parentales de *Daphnia magna* podría ser el responsable de la reducción en el contenido proteico de los mismos, reduciéndose la capacidad reproductiva y afectando, por tanto, a la estabilidad de las poblaciones naturales que se vieran expuestas a los tóxicos empleados en este estudio.

6.5. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE de *D. magna* (expresada por individuo).

En la fase del estudio en la que se evaluó la toxicidad del insecticida **DIAZINÓN** sobre la actividad AChE en los dáfidos pertenecientes a las diferentes generaciones estudiadas (F₀, F₁-1^a y F₁-3^a camadas), se comprobó el mayor efecto de las concentraciones elevadas de diazinón para cada uno de los tiempos ensayados con respecto a las concentraciones más bajas del insecticida. No se tienen otras referencias del efecto del diazinón sobre la actividad AChE de *D. magna* pero sí de estudios en los que se ensayó el efecto de surfactantes (Guilhermino *et al.*, 2000) y de metales pesados (Diamantino *et al.*, 2000), habiéndose encontrado una relación clara entre el aumento de la concentración de los tóxicos anticolinesterásicos empleados y el descenso de la actividad AChE de los dáfidos.

Barata *et al.* (2001) encontraron también una correlación positiva entre la reducción de la actividad AChE de *D. magna* y la concentración creciente de los plaguicidas etilparatión y paraoxón a la que fueron expuestos los dáfidos.

Denton *et al.* (2003) estudiaron la toxicidad del diazinón sobre la actividad AChE de larvas de peces de la especie *Pimephales promelas*. En dicho estudio, se encontró una inhibición de la actividad enzimática evaluada que podía relacionarse de una forma directa con la concentración de diazinón empleada en el estudio. De esta manera, se registraron inhibiciones de cerca del 30% para las larvas expuestas a 50 µg/L del insecticida, encontrándose la máxima inhibición al exponer a los organismos a 250 µg/L de diazinón.

Tanto para los dáfidos tratados con las distintas concentraciones del insecticida como para los organismos control se observó que la actividad AChE era creciente en consonancia con la edad de los individuos. Este mismo efecto fue descrito por Guilhermino *et al.* (1996b) al contrastar la actividad AChE de dáfidos de 24 y 48 horas de edad.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos para este parámetro en cada una de las generaciones de dáfidos contempladas en el presente trabajo, los resultados apuntan

hacia un desplazamiento de la sensibilidad de *D. magna* desde los tiempos más largos de exposición hacia los más tempranos, al considerar la generación parental en relación con las de descendientes (1ª y 3ª camadas). Esta conclusión se extrae a la vista de la mayor sensibilidad de los parentales (F_0) al diazinón durante los tiempos más largos a los que fueron expuestos (mayor número de diferencias significativas), mientras que la de los descendientes de la primera camada (F_1-1^a) resultaron ser más sensibles al insecticida durante los tiempos intermedios de exposición a diazinón, y para los dáfidos de la tercera camada (F_1-3^a) para los que se registró un mayor efecto del tóxico durante los primeros tiempos del ensayo.

Se apunta también una capacidad de adaptación de los descendientes de *D. magna* en relación con su actividad AChE, observándose que los valores obtenidos para la tercera camada de descendientes indican una mayor actividad enzimática respecto a los de la primera. Este dato es importante teniendo en cuenta que los dáfidos de la tercera camada (F_1-3^a) proceden de parentales (F_0) expuestos durante un mayor tiempo al insecticida, de manera que, si existiera una transferencia de tóxico intergeneracional, cabría esperar *a priori* una menor actividad enzimática en los dáfidos de las generaciones de descendientes más tardías. No obstante, es posible que, si existe dicha transferencia de tóxico, los organismos se aclimaten a la presencia de diazinón en el medio en el sentido de desarrollar mecanismos de detoxificación más activos o que, si no existe tal transferencia, la aclimatación resida en una mayor capacidad de síntesis enzimática de manera que el número de moléculas enzimáticas en el espacio sináptico sea mayor que las de insecticida, uniéndose con más éxito al sustrato acetilcolina y neutralizando, de alguna manera, la acción del neurotóxico.

Bond y Bradley (1997) estudiaron el efecto del plaguicida organofosforado malatión en la actividad AChE de *D. magna*, encontrando que la actividad del complejo glutatión-S-transferasa se veía incrementada en respuesta a la exposición al tóxico lo que denota la implicación de este complejo enzimático en los procesos de detoxificación en *D. magna* (LeBlanc y Cochrane, 1987; Baldwin y LeBlanc, 1996)

Pese a la importancia del insecticida diazinón como compuesto anticolinesterásico, cabe considerar el efecto de este plaguicida a otros niveles en la fisiología de los

invertebrados expuestos. Tales efectos están asociados con la inhibición de otras enzimas como las esterasas alifáticas (Ali-E) o la estimulación del consumo de oxígeno (Winteringham y Lewis, 1959). Day y Scott (1990) estudiaron los efectos de diversos compuestos organofosforados en invertebrados de agua dulce, no registrando inhibiciones de la actividad AChE para concentraciones por debajo de las que se detectaban efectos a corto plazo sobre la mortalidad de los organismos. Este efecto fue atribuido a que en la capacidad tóxica de estos compuestos estaba implicada la inhibición de otras esterasas.

Barata *et al.* (2001) apuntaron la existencia de diversos mecanismos bioquímicos cuya existencia explicaría las diferencias registradas en la tolerancia de distintas poblaciones tanto de vertebrados como de invertebrados, a la presencia de compuestos organofosforados en el medio. Estos mecanismos comprenderían la existencia de mutaciones específicas que harían disminuir la sensibilidad de la enzima AChE a los organofosforados; un aumento en la producción de esterasas no específicas y de aliesterasas implicadas en procesos de detoxificación, y un aumento en la producción de enzimas del complejo citocromo P450 (Roush y Mc Kenzie, 1987; Morton, 1993; Scott, 1995; Taylor y Feyereisen, 1996).

Numerosos autores han afirmado la importancia de la evaluación de la actividad AChE en organismos expuestos a concentraciones subletales de organofosforados que no tienen efectos sobre la supervivencia de los mismos pero ocasionan inhibiciones importantes en esta actividad enzimática (Diamantino *et al.*, 2000; Fulton y Key, 2001).

Day y Scott (1990) manifestaron en un estudio que reducciones de la actividad AChE superiores al 20% se podrían considerar indicativas de exposiciones significativas a compuestos organofosforados en el medio para aves, peces e invertebrados. Sin embargo, a lo largo de la bibliografía consultada, se han encontrado posiciones enfrentadas acerca de la correlación entre letalidad e inhibición de la actividad AChE tal y como se comentará a continuación, no pudiendo establecerse ninguna conclusión clara que defina un comportamiento homogéneo de ambos parámetros.

Por otro lado, es importante considerar el carácter *in vivo* o *in vitro* del estudio, puesto que muchos compuestos son biotransformados en potentes inhibidores de la

actividad AChE dentro de los organismos resultando compuestos con mayor capacidad tóxica que los compuestos parentales y, concretamente los organofosforados lo son. Por ello, es lógico encontrar que los estudios *in vivo* suponen ensayos más sensibles para detectar la toxicidad sobre la actividad enzimática evaluada indicando efectos significativos a concentraciones más bajas que las que inducen la muerte de los organismos expuestos (Diamantino *et al.*, 2000).

En el presente estudio, cuyos ensayos se efectuaron *in vivo*, obtuvimos inhibiciones de la actividad AChE de más del 50% para los dáfidos parentales expuestos a 0.5 y 0.75 ng/L de diazinón durante 96 y 120 horas de exposición a las condiciones del ensayo, mientras que este porcentaje bajó en los descendientes, F₁-1^a y 3^a camadas, registrándose los menores porcentajes de inhibición para los dáfidos de la tercera camada (sin rebasar el 30% de inhibición). En estudios efectuados con invertebrados acuáticos, se detectaron inhibiciones de la actividad AChE por parte de diversos compuestos organofosforados comprendidas en un rango entre el 40 y el 100% (Detra y Collins, 1991; Abdullah *et al.*, 1994; Escartín y Porte, 1996).

Los porcentajes de mortalidad registrados fueron mucho menores, alcanzándose un valor del 13.3 % de mortalidad para los parentales (F₀) expuestos durante 7 días (168 horas) a 0.5 ng/L de diazinón. En los descendientes el mayor porcentaje de mortalidad registrado para una exposición de 168 horas, fue del 46.7% para los dáfidos de la tercera camada (F₁-3^a) expuestos a 0.5 ng/L del insecticida, por lo tanto, pese a que en la generación parental de dáfidos resultó más sensible el parámetro “actividad AChE (expresada por dafnia)”, para los descendientes (F₁-1^a y 3^a camadas) la supervivencia de los dáfidos estuvo más afectada por el diazinón que el parámetro enzimático evaluado.

Tradicionalmente la inhibición de la actividad AChE ha sido considerada el principal efecto en los organismos expuestos a compuestos organofosforados en el medio, sin embargo, estos compuestos pueden ejercer su efecto, de forma secundaria, sobre otros sistemas enzimáticos (Cuany *et al.*, 1993). De esta manera, puede ser necesaria una alta concentración de plaguicida organofosforado para alcanzar el 50% de inhibición de la actividad AChE estando asociada a efectos letales en las poblaciones expuestas debido a los efectos secundarios del tóxico. Este apunte podría explicar la pérdida de correlación

en la literatura entre el nivel de inhibición de la actividad AChE y los registros de mortalidad en los organismos expuestos.

Rompas *et al.* (1989) hicieron un estudio acerca de la toxicidad del insecticida diazinón sobre el crustáceo *Penaeus japonicus* encontrando que era necesario emplear niveles del plaguicida de hasta 300 veces superiores a la CL₅₀ para poder alcanzar reducciones del 50% de la actividad AChE en los invertebrados expuestos.

Algunos estudios con crustáceos han descrito efectos letales sobre organismos expuestos a insecticidas organofosforados en los que se registraban inhibiciones de las colinesterasas del 40% o inferiores (Bocquené y Galgani, 1991; Escartín y Porte, 1996), mientras que otros estudios han concluido que reducciones de la actividad AChE del 30% en *Carcinus maenas* (Lundebye *et al.*, 1997) o de hasta el 80 y el 90% en *Artemia salina* y *Artemia partenogenetica* (Varó *et al.*, 2002) no resultaban ser letales para los crustáceos objeto de estudio.

Villar *et al.* (1994) registraron actividades AChE de hasta el 53.7% vs control al exponer a la planaria *Dugesia tigrina* a 0.1 mg/L del insecticida diazinón durante tan sólo 2 horas. Según este estudio, los animales expuestos a diazinón que registraron actividades AChE tan bajas como del 10% de la actividad AChE normal, fueron capaces de moverse con normalidad. La aparente pérdida de correlación entre la inhibición de la actividad enzimática evaluada y el comportamiento de las planarias fue atribuida a la existencia de isoenzimas con funciones solapadas (o con capacidades compensatorias) pero diferente resistencia a la inhibición por parte de los organofosforados, tal y como apuntaron Chang y Opperman (1991) en un estudio efectuado con el nematodo *Meloidogyne sp.*

Le Bris *et al.* (1995) no registraron mortalidades significativas al estudiar el efecto del plaguicida diclorvos en dos especies de bivalvos de interés comercial: *Ruditapes philippinarum* y *Crassostrea gigas*. Sin embargo, registraron inhibiciones en la actividad AChE de ambas especies de entre el 40 y el 65% para concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/L de diclorvos. Los autores de este estudio sugirieron que el descenso de la

actividad AChE se anticipaba al posterior efecto deletéreo que afectaría a otras funciones como podía ser el crecimiento de los organismos expuestos.

Los dáfnidos expuestos a **MOLINATO**, al igual que ocurrió para el caso de los dáfnidos expuestos a diazinón, presentaron actividades AChE crecientes de acuerdo a la mayor edad de los individuos.

Por otro lado, se detectó que las mayores concentraciones de molinato ejercieron un mayor efecto sobre la actividad AChE que las más bajas, lo que pone de manifiesto el efecto neurotóxico de este herbicida carbamato empleado en este estudio. No se tienen otras referencias del efecto del herbicida sobre la actividad AChE de *Daphnia* pero se dispone de datos relativos a la toxicidad de otros carbamatos sobre la actividad AChE de este cladóceros. Ibrahim *et al.* (1998) registraron mayores reducciones en la actividad AChE de *Chironomus riparius* expuesto al organofosforado metil-pirimifós que al compuesto carbamato carbofurán. Sturm y Hanssen (1999) registraron un descenso concentración-dependiente de la actividad enzimática estudiada al exponer durante 24 horas a *Daphnia* al carbamato aldicarb. En el estudio de Sturm y Hanssen se puso de manifiesto la necesidad de concentraciones más altas del compuesto carbamato aldicarb para obtener un mismo patrón de inhibición de la actividad AChE de *D. magna* en relación con las concentraciones empleadas de los organofosforados paratión y diclorvos. Por último, Yoo *et al.* (2002) también observaron una mayor sensibilidad del homóptero *Nilaparvata lugens* al metabolito diazoxón del diazinón que al compuesto carbamato carbofurán, siendo necesarias menores concentraciones del primero que de carbofurán para reducir a la mitad la actividad AChE de los organismos objeto de estudio. Todos estos datos apuntan a la mayor toxicidad de los compuestos organofosforados para la actividad AChE de los invertebrados que la de los compuestos carbamatos, entendiéndose esta relación puesto que la inhibición de la enzima por parte de los primeros es de carácter irreversible, siendo reversible la inhibición ocasionada por parte de los carbamatos tal y como se apuntó en el apartado “introducción” del presente trabajo.

La irreversibilidad de la unión AChE-diazinón provoca una acumulación del sustrato acetilcolina en el espacio sináptico de las uniones neuromusculares que deriva en una

contracción muscular continuada lo cual afecta, tal y como se comentó en la discusión de los resultados de los ensayos crónicos, a la movilidad de los apéndices filtradores. Este efecto repercute, finalmente, en una reducción de la captación de alimento y de la incorporación de oxígeno al organismo (Pirrow *et al.*, 1999).

Se observó que la generación parental (F_0) mostraba una mayor sensibilidad al herbicida que la generación de descendientes estudiada (F_1-1^a y 3^a camadas). Este efecto quedó patente, además de por el registro de actividades de la enzima AChE más altas, por un menor número de diferencias significativas en los dáfidos descendientes.

Para los dáfidos de la primera camada de descendientes (F_1-1^a), la actividad AChE registrada para los tiempos de exposición a molinato de 24 y 48 horas mostró valores más próximos a los correspondientes valores control, manteniéndose para el resto de los tiempos ensayados un cierto grado de inhibición de la actividad enzimática. Por su parte, para los dáfidos de la tercera camada de descendientes (F_1-3^a), únicamente los expuestos al tiempo más largo (120 horas), así como los más jóvenes (0 horas de exposición), se mantuvieron sensibles a los efectos del molinato presentando diferencias significativas con los valores control. Por lo tanto, al igual que se apuntó para el caso del ensayo con diazinón, la camada más tardía (F_1-3^a) de *D. magna* fue la más resistente al herbicida molinato.

Pese a presentar valores más elevados de la actividad AChE en los dáfidos expuestos a molinato que a diazinón, lo que resulta comprensible puesto que el molinato es un compuesto carbamato y se define como inhibidor reversible de la enzima objeto de estudio en este trabajo (mientras que el organofosforado causa una inhibición de la enzima de carácter irreversible), en general, no podemos decir que se obtuvieran mayores porcentajes de inhibición de la actividad AChE para ninguno de los dos plaguicidas ensayados pese a que las generaciones expuestas al herbicida registraran diferencias significativas para más grupos.

Los compuestos carbamatos no requieren ser activados en su forma de metabolito *oxon* de manera que la recuperación de la actividad AChE inhibida por la presencia de estos compuestos en el medio es mucho más rápida que en los organismos expuestos a

compuestos organofosforados (Zinkl *et al.*, 1991). Del mismo modo se espera que el efecto de la intoxicación por exposición a compuestos carbamatos se registre con anterioridad al registro de la inhibición de la actividad AChE como consecuencia de la exposición a compuestos organofosforados puesto que los compuestos carbamatos no requieren ser bioactivados para ejercer su acción inhibitoria sobre la actividad enzimática evaluada.

Yoo *et al.* (2002) apuntaron el desarrollo de una resistencia más lenta por parte del homóptero *Nilaparvata lugens* expuesto a los carbamatos carbofuran y fenobucarb que al diazinón, sugiriendo que el mecanismo de generación de resistencia para ambos tipos de inhibidores no debía ser el mismo pese a que ambos grupos de inhibidores desarrollan el mismo modo de acción como agentes anticolinesterásicos.

Si se estudia la evolución de los índices de inhibición de la actividad AChE observamos que para la generación parental de dáfidos (F_0) expuestos al herbicida se obtuvieron inhibiciones comprendidas entre el 30 y el 47% excepto para el grupo expuesto a la concentración más baja de molinato (3.77 mg/L) para el que se registraron porcentajes de inhibición más bajos (entre el 20 y el 40%). Por lo tanto, el efecto del molinato sobre estos dáfidos fue bastante homogéneo para todos los grupos tratados y para todos los tiempos de exposición.

Para la generación de descendientes se registraron inhibiciones entre el 10 y el 30% para el caso de los dáfidos de la generación F_1 -1ª camada, y entre el 6 y el 32% para los individuos de la tercera camada de descendientes (F_1 -3ª). Esto indica un rango más amplio de variación en el efecto producido por el herbicida sobre los dáfidos descendientes contemplados en este estudio, en relación con la generación de parentales. Para ambas camadas de descendientes, los dáfidos más afectados (presentaron mayores porcentajes de inhibición de la actividad AChE) fueron los incluidos en los tiempos 0 y 120 horas, resultado que parece lógico a la vista de la mayor sensibilidad de los organismos más jóvenes (0 horas) y de los expuestos durante más tiempo al herbicida (120 horas). Los dáfidos incluidos en los tiempos de exposición intermedios (24-96 horas) registraron menores índices de inhibición de la actividad AChE, probablemente debido a la reversibilidad de la unión molinato-enzima,

siendo una exposición de 120 horas suficiente como para eludir el carácter reversible de esta unión dejando paso a una mayor inhibición de la actividad enzimática. Podríamos aventurar que una posible explicación a este efecto sería la presencia de mayor cantidad de moléculas de molinato incorporadas al interior del organismo tras 120 horas de exposición, siendo más rápida la unión al sitio activo de la enzima que la velocidad de liberación del mismo, lo cual repercutiría en una inhibición *quasi* permanente de la enzima, aproximándose al carácter irreversible descrito para el diazinón.

La generación parental de *Daphnia magna* no deja entrever el carácter reversible de la unión molinato-enzima puesto que serían las generaciones descendientes las que presentarían una mayor capacidad de adaptación a la presencia de molinato en el medio registrándose inhibiciones inferiores al 20% para tiempos cortos de exposición, y entendiendo esta capacidad de adaptación tal y como fue descrita para el caso de los dáfnidos expuestos a diazinón: mayor velocidad de síntesis de enzima y/o mayor efectividad de los procesos de detoxificación del organismo. En el caso del molinato, como compuesto carbamato, estos procesos de detoxificación incluyen la participación de los sistemas multienzimáticos de oxidasas, MFO, o citocromo P450 (Casida y Quistad, 1998).

Probablemente, los individuos parentales (F_0) requieran un tiempo más prolongado de exposición al tóxico para presentar inhibiciones inferiores a las registradas en este estudio, dando paso a la reversibilidad de la unión enzima-herbicida.

6.6. Efecto de los plaguicidas diazinón y molinato en la actividad AChE de *D. magna* (expresada por μg de proteína).

Tal y como se detalló al discutir los resultados obtenidos para el contenido proteico de las generaciones de *Daphnia* expuestas tanto a **DIAZINÓN** como a **MOLINATO**, el contenido proteico aumentaba al aumentar el tamaño (edad) del organismo. Por otro lado, al analizar los datos derivados de las determinaciones de la actividad AChE expresada por μg de proteína, se encontró un descenso de la actividad enzimática en consonancia con la edad de los organismos.

En esta parte del estudio, en que se contrastan los resultados obtenidos para la actividad enzimática AChE expresada por μg de proteína con los obtenidos al expresar la misma actividad enzimática por individuo, se observa que en el primer caso se obtuvieron valores más bajos que al expresar la actividad enzimática evaluada por individuo, lo cual refleja el mayor aumento del contenido proteico en relación con la actividad enzimática AChE (por individuo).

La razón de la correlación negativa entre la edad de *D. magna*, correspondiente a longitudes corporales progresivamente mayores, y la actividad AChE registrada para la que se obtuvieron valores decrecientes al ser expresada en función del contenido proteico de los dáfnidos, estriba en que, aunque el contenido proteico aumenta proporcionalmente a la edad de los organismos, no se registra un aumento tan elevado en la tasa de hidrólisis de sustrato (actividad AChE expresada por individuo). Una relación inversa similar fue encontrada por Sturm *et al.* (1999) entre el tamaño corporal y la actividad AChE de los peces objeto de estudio, detectándose un aumento progresivo de la longitud de los peces, así como un incremento en el contenido proteico de los mismos acompañados de una reducción de la actividad enzimática estudiada.

Para un mismo tiempo de exposición de los dáfnidos de la primera y tercera camada de descendientes (F_1-1^a y 3^a), al aumentar la concentración de tóxico a la que se expusieron los dáfnidos, disminuyó su contenido proteico y la actividad AChE determinada por individuo, reduciéndose mucho más rápido el primer parámetro de modo que el resultado fue un aumento de la actividad enzimática expresada por μg de proteína. De esta manera, se obtuvieron actividades AChE entre 1.31 y 2.77 nmol min^{-1}

$\mu\text{g prot}^{-1}$ por ejemplo, para los descendientes de la primera camada (F_1-1^a) de *D. magna* pertenecientes al grupo control y para los expuestos a 0.75 ng/L de diazinón respectivamente, mientras que para los mismos descendientes expuestos a molinato se registraron valores entre 0.57 (control) y 1.59 (expuestos a 6.28 mg/L de molinato) $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$. Para la tercera camada de descendientes (F_1-3^a) se obtuvieron valores entre 1.21 y 2.49 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$ para los grupos control y para el expuesto a 0.5 ng/L de diazinón, y entre 0.55 y 0.83 $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$ para los dáfidos control y el expuesto a 6.28 mg/L en el ensayo de toxicidad con molinato.

No obstante, habiéndose detectado este efecto para ambos plaguicidas, persistió durante más tiempo en el caso de los dáfidos expuestos a molinato. Así, para los dáfidos de la tercera camada de descendientes expuestos a molinato, a las 96 horas de exposición al herbicida todavía se registraron diferencias significativas en este sentido ($p < 0.005$) entre la actividad AChE de los dáfidos control ($0.10 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) y los expuestos a 6.28 mg/L del herbicida ($0.15 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$); mientras que los descendientes de esta tercera camada expuestos a diazinón, presentaron mayor actividad enzimática en relación con los valores control únicamente para los tiempos de 0 y 24 horas de exposición al insecticida.

En el ensayo en el que se empleó molinato como compuesto contaminante, se redujo la calidad de la fuente de alimento (*N. oculata*) debido al carácter herbicida del compuesto, tal y como se comentó con anterioridad. Este efecto repercutió sobre el contenido proteico en mayor medida que en el ensayo en que se utilizó diazinón, donde el principal efecto del insecticida fue sobre la actividad AChE de los dáfidos expuestos y no directamente sobre *N. oculata* como en el caso del molinato. Posiblemente esta sea la causa de que se haya registrado durante más tiempo un aumento de la actividad AChE expresada por μg de proteína en los dáfidos expuestos a molinato que en los expuestos a diazinón.

Printes y Callaghan (2003) estudiaron la variabilidad intraclonal de *Daphnia* en relación con su actividad AChE registrando un aparente incremento de la actividad

AChE tras exposición a fenobarbital, estando relacionado este incremento, supuestamente, con un descenso en el crecimiento corporal y en el contenido proteico de los dáfidos. Por otro lado, estos mismos autores no encontraron efecto significativo sobre el crecimiento de *Daphnia* ni sobre su contenido proteico como resultado de su exposición a paratión registrando, sin embargo, una reducción significativa en la actividad AChE. El fenobarbital es un modulador del citocromo P450 y un inductor del sistema glutatión-S-transferasa, de manera que parece activar los sistemas de detoxificación de *D. magna* (Baldwin y LeBlanc, 1994 y 1996). El efecto asociado a la exposición a fenobarbital y traducido en una reducción del crecimiento de los dáfidos parece deberse a una reducción en la tasa de alimentación de los animales expuestos (Printes *et al.*, observación sin publicar). Por otro lado, el efecto del paratión como inhibidor de la actividad AChE de *D. magna* está bien documentada (Guilhermino *et al.*, 1996a; Sturm y Hansen, 1999; Barata *et al.*, 2000).

Utilizar el contenido proteico como referente para expresar las actividades enzimáticas ha sido ratificado a nivel internacional (Dixon y Webb, 1979). No obstante, se ha de tener en cuenta que las determinaciones enzimáticas en *Daphnia* comprenden la utilización de la totalidad del organismo, a diferencia de las determinaciones efectuadas en vertebrados o en partes de invertebrados de mayor tamaño que *Daphnia*. Por tanto, las proteínas totales cuantificadas en los homogenados están relacionadas con la totalidad de las estructuras corporales de estos invertebrados, incluidos los huevos y los embriones en desarrollo, estando sujetos a una mayor variabilidad. Esta es la razón por la que en el presente estudio se emplearon individuos inmaduros sexualmente o menores de 168 horas de edad (7 días). Por otro lado, como ya se ha comentado, cuando se expresa la actividad AChE en *Daphnia* en términos de proteínas totales, se está contemplando la variación de la actividad enzimática en función de un parámetro cuya fluctuación tiene lugar en un rango de unidades muy diferente al de la cinética de la enzima por sí misma (en términos de hidrólisis de sustrato).

Por todo ello, se recomienda la expresión de la actividad AChE de *Daphnia* en términos de unidades por dafnia o, al menos, efectuar un estudio paralelo de la

evolución del contenido proteico de los animales expuestos con el objetivo de relacionarlo correctamente con la variación en la actividad AChE producto de la exposición a compuestos con capacidad neurotóxica.

7. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de toxicidad aguda pusieron de manifiesto que la mortalidad del crustáceo *D. magna* tras 24 y 48 horas de exposición al insecticida diazinón, fue mayor que la producida por el herbicida molinato.

2. Concentraciones subletales del insecticida diazinón provocaron un descenso en la supervivencia de los dáfidos de la generación parental. No obstante, los descendientes de la 1ª y 3ª camadas mostraron una sensibilidad aún mayor al insecticida, siendo su longevidad considerablemente inferior.

3. La capacidad reproductiva de *D. magna* se vió claramente reducida por el diazinón en las diferentes generaciones de dáfidos estudiadas, siendo el efecto mucho mayor en los descendientes que en los parentales.

4. La tasa intrínseca de crecimiento natural (r) es un buen indicador de contaminación por diazinón en *D. magna*, ya que se combina el efecto de este insecticida sobre la supervivencia y la reproducción de la población. En el presente trabajo se mostró como un parámetro muy sensible al efecto de este plaguicida en todas las generaciones estudiadas.

5. El insecticida diazinón afectó al crecimiento de *D. magna* produciendo una reducción significativa de la longitud media del caparazón siendo más acusado el efecto de este plaguicida en los dáfidos descendientes que en los parentales.

6. El efecto del herbicida molinato en la supervivencia, longitud corporal y reproducción de *D. magna* no fue tan acusado como en el caso del plaguicida diazinón. Sin embargo, también los dáfidos de la 1ª y 3ª camadas fueron más sensibles al herbicida que los propios parentales.

7. La tasa intrínseca de incremento natural (r) disminuyó en todas las generaciones objeto de estudio en los dáfidos expuestos a molinato, sin embargo el descenso no fue tan acusado como en el caso del diazinón debido a un menor efecto del herbicida en la supervivencia de *D. magna*.

8. En general, el efecto residual observado en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los dáfidos descendientes (1ª y 3ª camadas) procedentes de

progenitores que habían sido pre-expuestos al insecticida diazinón, fue mayor que en los procedentes de progenitores pre-expuestos al herbicida molinato.

9. La 3ª camada de descendientes (F₁-3ª) procedente de parentales pre-expuestos a diazinón y molinato, fue la que experimentó una mayor recuperación, lo que apuntó a que dicha recuperación respondiera a un factor intrínseco propio a cada una de las camadas.

10. El insecticida diazinón y el herbicida molinato produjeron un descenso general en el contenido proteico de las diferentes generaciones de *D. magna* estudiadas, que fue más acusado por exposición al herbicida, probablemente debido al efecto que éste produjo en la calidad del alga utilizada como alimento.

11. El peso en *D. magna* sufrió reducciones significativas cuando los organismos se vieron expuestos a ambos plaguicidas, y podría explicar la reducción en la capacidad reproductiva de los cladóceros.

12. Los plaguicidas diazinón y molinato provocaron una inhibición de la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE) en las generaciones de *D. magna* estudiadas, siendo el efecto más acusado (en ambos casos) en la generación parental que en los descendientes, y mayor la inhibición producida por el insecticida que por el herbicida molinato.

13. En los descendientes de *D. magna* expuestos a ambos plaguicidas, al aumentar la concentración del contaminante disminuyó el contenido proteico y también la actividad AChE, sin embargo la reducción fue más acusada en el primer parámetro lo que resultó, en esos casos, en un incremento de la actividad AChE de *D. magna* expresada por µg de proteína.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ ABDULLAH, A.R.; KUMAR, A.; CHAPMAN, J.C. (1994). "Inhibition of acetylcholinesterase in the australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos". *Environ. Toxicol. Chem.* **13** (11): 1861-1866.
- ✓ ADAMS, S.M.; SHEPARD, K.L.; GREELEY, M.S.J.; JIMENEZ, B.D., RYON, M.G.; SHUGART, L.R.; McCARTHY, J.F. (1989). "The use of bioindicators for assessing the effects of pollutants stress on fish". *Mar. Environ. Res.* **28**: 459-464.
- ✓ ALDRIDGE, A.N. (1950). "Some properties of specific cholinesterase from *Drosophila*". *J. Biol. Chem.* **26**: 451-460.
- ✓ ALLAN, J.D.; DANIELS, R.E. (1982). "Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to kepone[®]". *Mar. Biol.* **66**: 179-184.
- ✓ ALLEN, Y.; CALOW, P.; BAIRD, D.J. (1995). "A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.* **14** (9): 1625-1630.
- ✓ A.S.T.M. (American Society for Testing and Materials) (1984). *Standard practice for conducting static acute toxicity tests on waste waters with Daphnia*. ASTM D4229-84. Vol. 10.01. pp. 48-59.
- ✓ BAILEY, H.C. (1993). "Acute and chronic toxicity of the rice herbicides thiobencarb and molinate to opossum shrimp (*Neomysis mercedis*)". *Mar. Environ. Res.* **36**: 197-215.
- ✓ BAILEY, H.C.; MILLER, J.L.; MILLER, M.J.; WIBORG, L.C.; DEANOVIC, L.; SHED, T. (1997). "Joint acute toxicity of diazinon and chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*". *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 2304-2308.
- ✓ BAILLIEUL, M.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; DE BOECK, G. (1993). "Assessment of the toxicity of an industrial effluent with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*". *Sci. Total Environ. Supp.*: 1159-1164.
- ✓ BAIRD, D.J.; BARBER, I.; CALOW, P. (1990). "Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects". *Funct. Ecol.* **4**: 399-407.

- ✓ BALDWIN, W.S.; LeBLANC, G.A. (1994). "Identification of multiple steroid hydroxylases in *D. magna* and their modulation by xenobiotics". *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 1013-1021.
- ✓ BALDWIN, W.S.; MILAM, D.L.; LeBLANC, G.A. (1995). "Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol". *Environ. Toxicol. Chem.* **14** (6): 945-952.
- ✓ BALDWIN, W.S.; LeBLANC, G.A. (1996). "Expression and induction of all immunochemically related class of glutathione S-transferases in *D. magna*". *Comp. Biochem. Phys.* **113**: 261-267.
- ✓ BANKS, K.E.; TURNER, P.K.; WOOD, S.H.; MATTHEWS, C. (2005). "Increased toxicity of *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations". *Ecotox. Environ. Safety* **60** (1): 28-36.
- ✓ BARATA, C.; BAIRD, D.J.; AMAT, F.; SOARES, A.M.V.M. (2000). "Comparing population response to contaminants between laboratory and field: an approach using *Daphnia magna* ephippial eggs banks". *Funct. Ecol.* **14**: 513-523.
- ✓ BARATA, C.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L. (2001). "Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion". *Ecotox. Environ. Safety* **49**: 155-163.
- ✓ BARBER, I.; BAIRD, D.J.; CALOW, P. (1990). "Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects". *Funct. Ecol.* **4**: 409-414.
- ✓ BARKER, D.L.; HERBERT, E.; HILDEBRAND, J.; KRAVITZ, E.A. (1972). "Acetylcholine and lobster sensory neurones". *J. Physiol., London*, **226**: 205-229.
- ✓ BARRY, M.J. (1999). "The effects of a pesticide on inducible phenotypic plasticity in *Daphnia*". *Environ. Pollution* **104**: 217-224.

- ✓ BAUGHMAN, D.S.; MOORE, D.W.; SCOTT, G.I. (1989). "A comparison and evaluation of field and laboratory tests with fenvalerate on an estuarine crustacean". *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 417-429.
- ✓ BERVOETS, L.; BAILLIEUL, M.; BLUST, R.; De BOECK, G., VERHEYEN, R. (1993). "Impact assessment of industrial effluents on freshwater ecosystems". *Sci. Total Environ. Suppl.*: 1123-1128.
- ✓ BERVOETS, L.; BAILLIEUL, M.; BLUST, R.; VERHEYEN, R. (1996). "Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river". *Environ. Pollut.* **91** (3): 333-341.
- ✓ BHAVAN, P.S.; GERALDINER, P. (2001). "Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsolii* on exposure to endosulfan." *Pestic. Biochem. Physiol.* **70**: 27-41.
- ✓ BISCHOFF, H.W.; BOLD, H.C. (1983). *Physiological studies. IV. Some algae from enched rock and relate algae species*. Univ. Texas Publ. 6318, 95 pp.
- ✓ BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. (1991). "Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection effects." *Ecotox. Environ. Safety* **22** (3): 1-8.
- ✓ BOCQUENÉ, G.; BELLANGER, C.; CADIOU, Y.; GALGANI, F. (1995). "Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species". *Ecotoxicology* **4**: 266-279.
- ✓ BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. (1997). "Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors". *FEBS Letters* **407**: 261-266.
- ✓ BODAR, C.W.M.; VAN DER SLUIS, J.A.; VOOGT, P.A.; ZANDEE, D.I. (1988). "Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction". *Comp. Biochem. Physiol.* **C90**: 341-346.

- ✓ BODAR, C.W.M.; VAN DER SLUIS, J.A.; VAN MONTFORT, J.C.P.; VOOGT, P.A.; ZANDEE, D.I. (1990). "Cadmium resistance in *Daphnia magna*". *Aquat. Toxicol.* **16**: 33-40.
- ✓ BOND, J.A.; BRADLEY, B.P. (1997). "Resistance to malathion in heat-shocked *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.* **16** (4): 705-712.
- ✓ BOONE, J.S.; CHAMBERS, J.E. (1996). "Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, an nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in Mosquitofish (*Gambusia affinis*)". *Fund. Appl. Toxicol.* **29**: 202-207.
- ✓ BOSSUYT, B.T.A.; JANSSEN, C.R. (2003). "Acclimation of *Daphnia magna* to realistic copper concentrations". *Comp. Biochem. Physiol.* **C136**: 253-264.
- ✓ BOTTRELL, H.H.; DUNCAN, A.; GLIWICZ, Z.M.; GRYGIEREK, E.; HERZIG, A.; HILLBRICHT-ILKOWSKA, A.; KURASAWA, H.; LARSSON, P.; WEGLENSKA, T. (1976). "A review of some problems in zooplankton production studies". *Norw. J. Zool.* **24**: 419-456.
- ✓ BRADLEY, M.C.; BAIRD, D.J.; CALOW, P. (1991). "Mechanism of energy allocation to reproduction in the cladoceran *Daphnia magna* Straus". *Biol. J. Lin. Soc.* **44**: 325-333.
- ✓ BRAND, O.M.; FUJIMURA, R.W.; FINLAYSON, B.J. (1993). "Use of *Neomysis mercedis* (Crustacea, Mysidacea) for estuarine toxicity tests". *Trans. Am. Fish Soc.* **122**: 279-288.
- ✓ BROOKS, J.L. (1959). "Cladocera". En: *Freshwater Biology*. W.T. Edmonson, ed. Wiley, New York, N.Y. pp.: 587-656.
- ✓ BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. (1990). "The Crustaceans". En: *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 922 pp.
- ✓ BUHL, K.J.; HAMILTON, S.J.; SCHMULBACH, J.C. (1993). "Acute toxicity of the herbicide bromoxynil to *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.* **12**: 1455-1468.

- ✓ BUIKEMA, A.L.; GEIGER, J.G.; LEE, D.R. (1980). “*Daphnia* toxicity tests”. En: *Aquatic invertebrate bioassays*. A.L. Buikema Jr., John Cairns Jr. eds., ASTM STP 715, American Society for Testing and Materials, Pennsylvania. pp. 48-69.
- ✓ BURDETT, A.S.; STEVENS, M.M.; Mc MILLAN, D.L. (2001). “Laboratory and field studies on the effect of molinate, clomazone, and thiobencrab on nontarget aquatic invertebrates”. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (10): 2229-2236.
- ✓ CAFFREY, P.B.; KEATING, K.I. (1997). “Results of zinc deprivation in daphnid culture”. *Environ. Toxicol. Chem.* **16** (3): 572-575.
- ✓ CALOW, P. (1993). “General principles and overview”. En: *Handbook of ecotoxicology*. Vol. I. P. Calow ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford. 478 pp.
- ✓ CALOW, P. (1994). “Overview with observations on risk assessment and management”. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. II. P. Calow ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford. 416 pp.
- ✓ CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. (1998). “Golden age of insecticide research: past, present or future?”. *Ann. Rev. Entomol.* **43**: 1-16.
- ✓ CAUCHIE, H.M.; JASPAR-VERSALI, M.F.; HOFFMAN, L.; THOMÉ, J.P. (1999). “Analysis of the seasonal variation in biochemical composition of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Branchipoda: Anomopoda) from an aerated wastewater stabilisation pond”. *Annl. Limnol.* **35** (4): 223-231.
- ✓ C.E.E., C2. (1984). “84/449/EEC: Commission Directive of 25 April 1984 adapting to technical progress for the sixth time Council directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification packing and labelling of dangerous substances”. *Offic. Jour. Europ. Commun.* L251, **27**: 155-159.
- ✓ CHAMBERS, J. E., CARR, R. L. (1995). “Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity”. *Toxicol.* **105**, 291–304.

- ✓ CHANG, S.; OPPERMAN, C. (1991). "Characterisation of acetylcholinesterase molecular forms of the root-knot nematode, *Meloidogyne*". *Mol. Biochem. Parasit.* **49**: 205-214.
- ✓ CHAPMAN, G.A. (1985). "Acclimation as a factor influencing metal criteria". En: *Aquatic toxicology and hazard assessment: 8th symposium. ASTM STP 891*. R.C. Bahner y D.J. Hansen. eds., American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, pp. 119-136.
- ✓ CLEUVERS, M.; GOSER, B.; RATTE, H.T. (1997). "Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: change in reproduction from quantity and quality". *Oecologia* **110**: 337-345.
- ✓ COCHRAN, R.C., FORMOLI, T.A., PFEIFER, K.F., ALDOUS, C.N. (1997). "Characterization of risks associated with the use of molinate". *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **25**: 146-157.
- ✓ COTOU, E. (1993). "The controlled production of dormant eggs of *Daphnia pulex* (Leydig) as biological starting material for toxicity testing". PhD Thesis, University of Ghent, Belgium, 284 pp.
- ✓ COWGILL, U.M.; WILLIAMS, D.M.; ESQUIVEL, J.B. (1984). "Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*". *J. Crustac. Biol.* **4**: 173-190.
- ✓ CPR (Californians for Pesticide Reform) (2003). *Secondhand pesticides. Airborne pesticide drift in California*. Pesticide Action Network North America ed. 18 pp.
- ✓ CRAIG, E.A. (1993). "Chaperones: helpers along the pathways to protein folding". *Science* **260**: 1902-1904.
- ✓ CUANY, A.; HANDANI, J.; BERGE, J.; FOURNIER, D.; RAYMOND, M.; GEORGHIOU, G.P.; PASTEUR, N. (1993). "Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes". *Pestic. Biochem. Physiol.* **45**: 1-6.
- ✓ DAY, K.E.; KAUSHIK, N.K. (1987). "Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effect on the rates and

assimilation of the algae, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **16**: 423-432.

✓ DAY, K.E.; SCOTT, I.M. (1990). "Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides". *Aquat. Toxicol.* **15**: 101-114.

✓ DAY, K.E. (1991). "Pesticide transformation products in surface waters: effects on aquatic biota". En: *Pesticides transformation products. Fate and significance in the environment*. L. Somasundaram; Jr. Coats. Eds. ACS Symposium Series. N° 459.

✓ DENTON, D.L.; WHEELOCK, C.E., MURRAY, S.A., DEANOVIC, L.A.; HAMMOCK, B.D.; HINTON, D.E. (2003). "Join acute toxicity of fenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*)". *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (2): 336-341.

✓ DETRA, R.L.; COLLINS, W.J. (1991). "The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae (Chironomidae: Diptera)". *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 1089-1095.

✓ Di GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. (1995). "Biochemical mechanisms. Metabolisms, adaptation, and toxicity". En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. G.M. Rand, ed. pp.: 523-561.

✓ DIAMANTINO, T.C.; GUILHERMINO, L.; ALMEIDA, E.; SOARES, A.M.V.M. (2000). "Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests". *Ecotox. Environ. Safety* **45**: 253-259.

✓ DIXON, M.; WEBB, E.C. (1979). *Enzymes*. 3ª edición. Longman ed. London, UK. 476 pp.

✓ DYER, S.D.; DICKSON, K.L.; ZIMMERMAN, E.G. (1993). *A laboratory evaluation of the use of stress proteins in fish to detect changes in water quality*. ASTM Spec. Tech. Publ. 1179. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. pp.: 247-261.

- ✓ EBERT, D. (1993). "The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: the influence of genetic, environmental and maternal effects". *Arch. Hydrobiol.* **4**: 453-473.
- ✓ EISLER, R. (1986). *Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synopsis review*. U.S. Department of the Interior, 37 pp.
- ✓ ELENDT, B.P. (1989). "Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*". *Arch. Hydrobiol.* **116**: 415-433.
- ✓ ELLIS, R.J. (1990). "The molecular chaperon concept". *Sem. Cell Biol.* **1**: 1-9.
- ✓ ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.O.; ANDRÉS, V., FEATHERSTONE, R-M- (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- ✓ ENSERINK, L.; LUTTMER, W.; MAAS, H. (1990). "Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests". *Aquat. Toxicol.* **17**: 15-26.
- ✓ ENSERINK, L.; DE LA HAYE, M.; MAAS, H. (1993). "Reproductive strategy of *Daphnia magna*: implications for chronic toxicity tests". *Aquat. Toxicol.* **25**: 111-124.
- ✓ ESCARTÍN, E.; PORTE, C. (1996). "Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion". *Ecotox. Environ. Safety* **34**: 160-164.
- ✓ FAIRCHILD, J.F.; LITTLE, E.E.; HUCKINS, J.N. (1992). "Aquatic hazards assessment of the organophosphorus insecticide fonofos". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **22**: 375-379.
- ✓ FERNÁNDEZ, A.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. (1992). "Acute toxicity of several pesticides to rotifer (*Brachionus calyciflorus*)". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**: 14-17.

- ✓ FERNÁNDEZ, A.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. (1994). "Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behaviour of *Daphnia magna*". *Ecotox. Environ. Safety* **27**: 82-89.
- ✓ FERNÁNDEZ, A.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. (1995). "Chronic toxicity of diazinon to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth". *Toxicol. Environ. Chem.* **49**: 25-32.
- ✓ FERRANDO, M.D.; ANDREU, E.; FERNÁNDEZ, A. (1992). "Persistence of some pesticides in the aquatic environment". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**: 747-755.
- ✓ FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDRE-MOLINER, E. (1995). "Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure". *J. Environ. Sci. Health* **B30** (6): 815-825.
- ✓ FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU-MOLINER, E. (1996). "Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*) and the cladoceran (*Daphnia magna*)". *Ecotox. Environ. Safety.* **35**: 112-120.
- ✓ FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; VILLARROEL, M.J.; SÁNCHEZ, M.; ANDREU, E. (1999). "Comparative toxicity of two herbicides, molinate and thiobencarb to *Brachionus calyciflorus*". *J. Environ. Sci. Health*, **B34** (4): 569-586.
- ✓ FINLAYSON, B.J.; FAGGELLA, G.A. (1986). "Comparison of laboratory and fields observation of fish exposed to the herbicides molinate and benthocarb". *Trans. Am. Fish Soc.* **115**: 882-890.
- ✓ FORBES, V.E.; CALOW, P. (1999). "Is the *per capita* rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology?". *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 1544-1556.
- ✓ FORGET, J.; PAVILLON, J.F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. (1999). "Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida)". *Environ. Toxicol. Chem.* **18** (5): 912-918.

- ✓ FRANK, R.; BRAUN, H.E.; CHAPMAN, N.; BURCHAT, C. (1991). "Degradation of parent compounds of nine organophosphorus insecticides of chronic stress in *Daphnia magna* Straus". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11**: 457-463.
- ✓ FUJII, Y.; ASAKA, S. (1982). "Metabolism of diazinon and diazoxon in fish liver preparations". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: 453-460.
- ✓ FUKUTO, T.R. (1987). "Organophosphorus and carbamate esters: the anticholinesterase insecticides". En: *Fate of pesticides in the environment: proceedings of a technical seminar*. J.W. Biggar y J.N. Seiber, eds. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Agricultural Experiment Station Publication 3320. pp.: 5-18.
- ✓ FUKUTO, T.R. (1990). "Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides". *Environ. Health Perspectives* **87**: 245-254.
- ✓ FULTON, M.H., KEY, P.B. (2001). "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects". *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (1): 37-45.
- ✓ GÄLLI, R.; RICH, H.W.; SCHOLTZ, R. (1994). "Toxicity of organophosphate insecticides and their metabolites to the water flea *Daphnia magna*, the Microtox tests and an acetylcholinesterase inhibition test". *Aquat. Toxicol.* **30**: 259.
- ✓ GALLO, M.A.; LAWRYK, N.J. (1991). "Organic phosphorus pesticides". En: *Handbook of pesticide toxicology*. Hayes W.J. y Laws, E.R., eds. Academic Press, San Diego. pp.: 917-1123.
- ✓ GALLOWAY, T.; HANDY, R. (2003). "Immunotoxicity of organophosphorus pesticides". *Ecotoxicology* **12**: 345-363.
- ✓ GARDINER, M.S. (1978). *Biología de los invertebrados*. Ed. Omega, S.A., Barcelona. 940 pp.
- ✓ GELLER, W.; MÜLLER, H. (1981). "The filtration apparatus of Cladocera: filter mesh-sizes and their implication on food selectivity". *Oecologia* **49**: 316-321.

- ✓ GETHING, M.J.; SAMBROOK, J. (1992). "Protein folding in the cell". *Nature* **355**: 33-45.
- ✓ GUENGERICH, F.P.; LIEBLER, D.C. (1985). "Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites". *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **14**: 259-307.
- ✓ GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M.V.M. (1996a). "Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*". *Chemosphere* **32** (4): 727-738.
- ✓ GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M.V.M. (1996b). "Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 979-985.
- ✓ GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C.; SOARES, A.M.V.M. (1998). "Should the use of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?". *Biomarkers* **3** (2): 157-163.
- ✓ GUILHERMINO, L.; LACERDA, M.N.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. (2000). "In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactants agents: possible implications for contamination biomonitoring". *Sci. Total Environ.* **247**: 137-141.
- ✓ GUISANDE, C.; TOJA, J.; MAZUELOS, N. (1991). "The effects of food on protein content in rotifer and cladoceran species: a field correlation study". *Freshwat. Biol* **26**: 433-438.
- ✓ HALLAM, T.G.; LASSITER, R.R.; LI, J.; SUÁREZ, L.A. (1990). "Modelling individuals employing an integrated energy response: application to *Daphnia*". *Ecology* **71** (3): 938-954.
- ✓ HANAZATO, T. (1998). "Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals". *Chemosphere* **36** (8): 1903-1909.
- ✓ HEATH, A.G.; CECH, J.J.; BRINK, L.; MOBERG, P.; ZINKL, J.G. (1997). "Physiological responses of fathead minnow larvae to rice pesticides". *Ecotox. Environ. Safety* **37**: 280-288.

- ✓ HEBERT, P.D.N. (1978). "The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae)". *Biol. Rev.* **53**: 387-426.
- ✓ HERBERT, A.; GUILHERMINO, L.; DA SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. (1995). "Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker". *Z. Angew. Zool.* **3**: 157-163.
- ✓ HILDEBRAND, J.G.; TOWNSED, J.C.; KRAVITZ, E.A. (1974). "Distribution of acetylcholine, choline, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in regions and single identified axons of the lobster nervous system". *J. Neurochem.* **23**: 951-963.
- ✓ HOSMER, A.J.; WARREN, L.W.; WARD, T.J. (1998). "Chronic toxicity of pulse-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations". *Environ. Toxicol Chem.* **17** (9): 1860-1866.
- ✓ IBRAHIM, H.; KHEIR, R.; HELMI, S.; LEWIS, J.; CRANE, M. (1998). "Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides, and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 448-455.
- ✓ I.S.O. (International Organization for Standardization) (1982). *Water quality determination of the inhibition of the mobility to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, crustacea)*. I.S.O. 6341-1982. pp. 1-10.
- ✓ JACOBY, W.B. (1980). "Detoxification enzymes". En: *Enzymatic basis of detoxification*, vol. 1. W.B. Jacoby, ed. Academic Press, New York. pp.: 1-6.
- ✓ JULLI, M.; KRASSOI, F.R. (1995). "Acute and chronic toxicity of the thiocarbamate herbicide molinate, to the cladoceran *Moina australiensis* Sars". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**: 690-694.
- ✓ KAMAYA, Y.; TOKITA, N.; SUZUKI, K. (2005). "Effects of dehydroabiatic acid and abiatic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*". *Ecotox. Environ. Safety* **61** (1): 83-88.

- ✓ KASAI, F.; HATAKEYAMA, S. (1993). "Herbicides susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus capricornutum*". *Chemosphere* **27** (5): 889-904.
- ✓ KHANGAROT, B.S.; RATHORE, R.S. (2003). "Effects of copper on respiration, reproduction and some biochemical parameters of water flea *Daphnia magna*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 112-117.
- ✓ KNOWLES, C.O.; Mc KEE, M.J.; PALAWSKI, D.U. (1987). "Chronic effects of di-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 201-208.
- ✓ KWAN H.P.; YOUNG-SUK K.; EE-YUNG C.; SUN-NAM C.; JONG-JAE C. (2004). "Cardiac responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to agents modulating cholinergic function". *Comp. Biochem. Physiol.* **C139** (4): 303-308.
- ✓ LABROT, F.; RIBERA, D.; SAINT DENIS, M.; NARBONNE, J.F. (1996). "*In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase, and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species". *Biomarkers* **1**: 21-28.
- ✓ LAHR, J. (1997). "Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**: 50-57.
- ✓ Le BLANC, G.A. (1982). "Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants". *Environ. Pollut. Ser. A.* **27**: 309-322.
- ✓ Le BLANC, G.A.; COCHRANE, B.J. (1987). "Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*". *Comp. Biochem. Physiol.* **B88** (1): 39-45.
- ✓ Le BRIS, H.; MAFFART, P.; BOCQUENÉ, G.; BUCHET, V.; GALGANI, F.; BLANC, F. (1995). "Laboratory study on the effect of dichlorvos on two comercial bivalves". *Aquaculture* **138**: 139-144.

- ✓ LEE, D.R.; BUIKEMA, A.L.Jr. (1979). "Molt-related sensitivity of *Daphnia pulex* in toxicity testing". *J. Fish. Res. Biol. Can.* **36**: 1129-1133.
- ✓ LOCHHEAD, J.H. (1961). "Locomotion". En: *The Physiology of Crustacea. Vol. II. Sense organos, integration, and behaviour*. T.H. Waterman, ed. Academic Press Inc. (London) Ltd., 681 pp.
- ✓ LOTKA, A.J. (1913). "A natural population norm". *J. Wash. Acad. Sci.* **3**: 241-248, 289-293.
- ✓ LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- ✓ LUNDEBYE, A.K.; CURTIS, T-M.; BRAVEN, J.; DEPLEDGE, M.H. (1997). "Effects of the organophosphorus pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*". *Aquat. Toxicol.* **40**: 23-36.
- ✓ LYNCH, M. (1989). "The life-story consequences of resource depression in *Daphnia pulex*". *Ecology* **70**: 246-256.
- ✓ MAYER, F.L. Jr.; ELLERSIECK, M.R. (1988). "Experiences with single-species tests for acute toxic effects on freshwater animals". *Ambio* **17**: 367-375.
- ✓ Mc. CARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (1990). "Biological markers of environmental contamination". En: *Biomarkers of environmental contamination*. J.F. McCarthy and L.R. Shugart, eds. Lewis, Boca Raton. pp.: 3-14.
- ✓ Mc. CAULEY, E.; MURDOCH, W.W.; NISBET, R.M.; GURNEY, W.S.C. (1990). "The physiological ecology of *Daphnia*: Development of a model of growth and reproduction". *Ecology* **71**: 703-715.
- ✓ Mc. HENEREY, J.G.; FRANCIS, C.; DAVIES, I.M. (1996). "Threshold toxicity and repeated studies of dichlorvos to the larvae of the common lobster (*Homarus gammarus* L.)". *Aquat. Toxicol.* **34**: 237-251.

- ✓ Mc. KEE, M.J.; KNOWLES, C.O. (1986a). "Protein, nucleic acid and adenylate levels in *Daphnia magna* during chronic exposure to chlordecone". *Environ. Pollut.* **A42**: 335-351.
- ✓ Mc. KEE, M.J.; KNOWLES, C.O. (1986b). "Effects of fenvalerate on biochemical parameters, survival and reproduction of *Daphnia magna*". *Ecotox. Environ. Safety* **12**: 70-84.
- ✓ Mc. KEE, D.; EBERT, D. (1996). "The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*". *Oecologia* **107**: 189-196.
- ✓ MEYERHOFF, R.D.; GROTHE, D.W.; SAUTER, S.; DORULLA, G.K. (1985). "Chronic toxicity of tebutiuron to an alga (*Selenastrum capricornotum*), a cladoceran (*Daphnia magna*), and the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". *Environ. Toxicol. Chem.* **4**: 695-701.
- ✓ MINEAU, P. (1991). *Chemicals in agriculture. Vol. 2.: Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment*. Elsevier Science Publishers, The Netherlands. 348 pp.
- ✓ MOKRY, L.E.; HOAGLAND, K.D. (1990). "Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*". *Environ. Tox. Chem.* **9**: 1045-1051.
- ✓ MOORE, A.; WARING, C.P. (1996). "Sublethal effects of the pesticide diazinon on olfactory function in mature male Atlantic parr". *J. Fish. Biol.* **48**: 758-775.
- ✓ MORTON, R.A. (1993). "Evolution of *Drosophila* insecticide resistance". *Genome* **36**: 1-7.
- ✓ MÜNZINGER, A. (1990). "Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel". *Water Res.* **24**: 845-852.
- ✓ MÜNZINGER, A.; MONICELLI, F. (1992). "Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of *Daphnia magna*". *Aquat. Toxicol.* **23**: 203-216.

- ✓ MUYSSSEN, B.T.A.; JANSSEN, C.R. (2001). "Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment". *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (9): 2053-2060.
- ✓ MUYSSSEN, B.T.A.; JANSSEN, C.R.; BOSSUYT, B.T.A. (2002). "Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations". *Aquat. Toxicol.* **56**: 69-79.
- ✓ MUYSSSEN, B.T.A.; JANSSEN, C.R. (2004). "Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus". *Environ. Pollut.* **130**: 309-316.
- ✓ NIMMO, D.R. (1985). "Pesticides". En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. G.M. Rand y S.R. Petrocelli, eds. Hemisphere, Washington, DC. pp.: 335-373.
- ✓ NISHIOKA, T.; FUJITA, T.; KAMOSHITA, K.; NAKAJIMA, M. (1977). "Mechanism of inhibition reaction of acetylcholinesterase by phenyl N-methylcarbamates". *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 107-121.
- ✓ NOVER, L. (1991). *The heat shock response*. CRC Press, Cold Spring Harbor, NY.
- ✓ O.E.C.D. (Organization for Economic Co-operation and Development) (2000). "Section 2. Guideline 202. *Daphnia* sp. Acute immobilisation Test and Reproduction Test". En: *Guidelines for testing chemicals*. OECD. París (Francia).
- ✓ O'KELLY, J.C. (1974). "Inorganic nutrients. Algal physiology and biochemistry". W.D.P. Steward ed., *Botanical Monographs* **10**: 610-635.
- ✓ PANE, E.F., Mc GEER, J.C., WOOD, C.M. (2004). "Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.* **23** (4): 1051-1056.
- ✓ PARSONS, J.T.; SURGEONER, G.A. (1991a). "Effect of exposure time on the acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae". *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 1219-1227.

- ✓ PARSONS, J.T.; SURGEONER, G.A. (1991b). "Acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae during single- or multiple-pulse exposures". *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 1229-1233.
- ✓ PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. (1996). "Acetylcholinesterase: an old biomarker with a new future?. Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* **32**: 225-231.
- ✓ PEAKALL, D.B. (1994). "Biomarkers: the way forward in environmental assessment". *Toxicol. Environ. News* **1**: 55-60.
- ✓ PETERS, R.H. (1987). "Metabolism in *Daphnia*". En: *Daphnia*. R.H. Peters y R. De Bernardi, eds. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. Vol. 45. pp.: 193-243.
- ✓ PETERSON, H.G.; BOUTIN, C.; MARTIN, P.A.; FREEMARK, K.E.; RUECKER, N.J.; MOODY, M.J. (1994). "Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at EEC". *Aquat. Toxicol.* **28**: 275-292.
- ✓ PHYU, L.; WARNE, M.ST.; LIM, R.P. (2004). "Toxicity of atrazine and molinate to the cladoceran *Daphnia carinata* and the effect of river water and bottom sediment on their bioavailability". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **46** (3): 2004.
- ✓ PIROW, R., WOLLINGER, F.; PAUL, R.J. (1999). "The importance of the feeding current for oxygen uptake in the water flea *Daphnia magna*". *J. Exp. Biol.* **202**: 553-562.
- ✓ POIRIER, D.G.; SURGEONER, G.A. (1988). "Evaluation of a field bioassay technique to predict the impact of aerial applications of forestry insecticides on stream invertebrates". *Can. Entomol.* **120**: 627-637.
- ✓ PRINTES, L.B.; CALLAGHAN, A. (2003). "Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker". *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (9): 2042-2047.
- ✓ RAMBABU, J.P.; RAO, M.B. (1994). "Effects of organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipids and proteins contents in

tissues of the freshwater snail *Bellamyia dissimilis* (Müller)". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: 142-148.

✓ RAND, G.M. (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment* (2^a ed.). Ed. Taylor y Francis, Washington, D.C. 1125 pp.

✓ READING, J.T.; BUIKEMA, A.L. Jr. (1983). "Chronic effects of selenite-selenium on *Daphnia pulex*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12**: 399-404.

✓ RIBEIRO, S.; GUILHERMINO, L.; SOUSA, J.P.; SOARES, A.M.V.M. (1999). "Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods". *Ecotox. Environ. Safety* **44**: 287-293.

✓ ROBERTSON, J.B.; MAZZELLA, C. (1989). "Acute toxicity of the pesticide diazinon to the freshwater Snail *Gillia altilis*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **42**: 320-324.

✓ ROMPAS, R.M.; KOBAYASHI, K.; OSHIMA, Y.; IMADA, N.; YAMATO, K.; MITSUYASU, Y. (1989). "Relationship between toxicity and acetylcholinesterase inhibition of some thiono- and oxo-form organophosphates in tiger shrimp larvae at different stages". *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**: 669-673.

✓ ROTHMAN, J.E. (1989). "Polypeptide chain binding proteins: catalysis of protein folding and related processes in cells". *Cell* **59**: 591-601.

✓ ROUSH, R.T.; Mc KENZIE, J.A. (1987). "Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance". *Annu. Rev. Entomol.* **32**: 361-380.

✓ RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. (1996). "Crustáceos". En: *Zoología de los invertebrados*. 6^a edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México, 1114 pp.

✓ SABATER, C., CARRASCO, J.M.; (1998). "Effects of molinate on growth of five freshwater species of phytoplankton". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**: 534-540.

- ✓ SÁNCHEZ, M.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU.MOLINER, E. (1998). "Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with diazinon". *J. Environ. Sci. Health*, **B33** (6): 785-797.
- ✓ SÁNCHEZ, M.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU, E. (1999). "Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*". *Comp. Biochem. Physiol.* **C124**: 247-252.
- ✓ SÁNCHEZ, M., FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU, E. (2000). "Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* Straus exposed to diazinon". *Ecotox. Environ. Safety* **46**: 87-94.
- ✓ SÁNCHEZ, M.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. (2003). "Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate". *Ecotox. Environ. Safety* **59**: 316-323.
- ✓ SANCHO, E.; SÁNCHEZ, M.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. (2003). "Comparative study of the toxicity of molinate for freshwater organisms". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 723-730.
- ✓ SANZ, P.; REPETTO, M. (1995). "Implicaciones toxicológicas de las enzimas colinesterasas". En: *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de santos, S.A., Madrid. pp.: 117-145.
- ✓ SCOTT, J.L. (1995). "The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress". *Florida Entom.* **78**: 399-414.
- ✓ SIEM, W.K.; CURTIS, L.R.; GLENN, S.W. (1984). "Growth and survival of developing steelhead trout (*Salmo gairdneri*) continuously or intermittently exposed to copper". *J. Fish. Aquat. Sci.* **41**: 433-438.
- ✓ SOBRAL, O.; CHASTINET, C.; NOGUEIRA, A.; SOARES, A.M.V.M.; GONÇALVES, F.; RIBEIRO, R. (2001). "In vitro development of partenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*?". *Ecotox. Environ. Safety* **50**: 174-179.
- ✓ SORENSEN, E.M. (1991). *Metal poisoning in fish*. CRC, Boca Raton, Florida, E.E.U.U. 374 pp.

- ✓ STARK, J.D.; VARGAS, R.I. (2003). "Demographic changes in *Daphnia pulex* (leydig) after exposure to the insecticides spinosad and diazinon". *Ecotox. Environ. Safety* **56**: 334-338.
- ✓ STEGEMAN, J.J.; BOUWER, M.; Di GIULIO, R.T.; FORLIN, L.; FOWLER, B.; SANDERS, B.; VAN VELD, P.A. (1992). *Molecular responses to environmental contamination: proteins and enzymes as indicators of contaminant exposure and effects. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Ed. R.J. Huggett; R.A. Kimerle; P.M. Mehrle, Jr.; H.L. Bergman. Boca Raton, FL: Lewis. pp.: 235-335.
- ✓ STEPHAN, E.C. (1977). *Aquatic toxicology and hazard evaluation. Methods for calculating an LC₅₀*. Philadelphia, Pennsylvania. Library of Congress Catalog Card Number: 77-075532.
- ✓ STURM, A.; HANSEN, P.D. (1999). "Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants". *Ecotox. Environ. Safety* **42**: 9-15.
- ✓ STURM, A.; WOGRAM, J.; HANSEN, P.D., LIESS, M. (1999). "Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution". *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 194-200.
- ✓ SUEDEL, B.C.; RODGERS, J.H. Jr.; DEEVER, E. (1997). "Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 188-193.
- ✓ TARAZONA, C.; CARRASCO, J.M.; SABATER, C. (2003). "Monitoring of rice pesticides in an aquatic system of natural park of Albufera, Valencia, Spain. Hazard evaluation". En: *XII Symposium Pesticide Chemistry. Pesticides in air, plant, soil and water system*". Piacenza (Italy). pp. 727-735.
- ✓ TAYLOR, B.E. (1985). "Effects of food limitation on growth and reproduction of *Daphnia*". *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **21**: 285-296.

- ✓ TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M. (1998): "Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus". *Environ. Toxicol. Chem.* **17** (3): 412-419.
- ✓ TAYOR, M.; FEYEREISEN, R. (1996). "Molecular biology and evolution of resistance to toxicants". *Mol. Biol. Evol.* **13**: 719-734.
- ✓ TESSIER, A.J.; GOULDEN, C.E. (1982). "Estimating food limitation in cladoceran populations". *Limnol. Oceanogr.* **27**: 707-717.
- ✓ TESSIER, A.J.; HENRY, L.L.; GOULDEN, C.E. (1983). "Starvation in *Daphnia*: energy reserves and reproductive allocation". *Limnol. Oceanogr.* **28**: 667-676.
- ✓ THOMPSON, H.M. (1999). "Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates". *Ecotoxicology* **8**: 369-384.
- ✓ THORP, J.H.; CORVICH, A.P. (1991). "Cladocera and other Branchiopoda". En: *Ecology and classification of northamerican freshwater invertebrates*. Academic Press, Inc. U.S.A. 911 pp.
- ✓ TOMLIN, C. (2000). *The pesticide manual*. Tomlin, C. XIIª edición. Ed. The British Crop Protection Council. 1250pp.
- ✓ TONG, Z.; HUAILAN, Z.; HONGJUN, J. (1996). "Chronic toxicity of Acrylonitrile and acetonitrile to *Daphnia magna* in 14-d and 21-d toxicity tests". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 655-659.
- ✓ TSUDA, T.; KOJIMA, M.; HARADA, H.; NAKAJIMA, A.; ACKI, S. (1997). "Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorus insecticides and their oxidation products in killifish". *Chemosphere* **35** (5): 939-949.
- ✓ U.S. Department of Labor (revisión 2002). "Prentox (R) Diazinon AG-500". En: *Material safety data sheet*. OSHA 29 CFR 1910.1200. Department of Labor, U.S.A. 6 pp.
- ✓ U.S. E.P.A. (Environmental Protection Agency) (1975). *Initial scientific and mini-economic review of methyl-parathion*. U.S. Env. Prot. Agency. 176 pp.

- ✓ U.S. EPA. (Environmental Protection Agency) (1983). *Water quality criteria, 1972*. National Academy of Sciences, U.S. E.P.A. Research Series. (Washington, D.C., U.S.A.). pp.: 1-6.
- ✓ U.S. EPA (Environmental Protection Agency) (2000). *Environmental risk assessment for diazinon. (Preliminary)*. Washington, D.C. Released May 19. pp. 94-95.
- ✓ UTZ, L.R.P.; BOHRER, M.B.C. (2001). "Acute and chronic toxicity of potassium chloride (KCl) and potassium acetate (KC₂H₃O₂) to *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea; cladocera)". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**: 379-385.
- ✓ VAN DER GEEST, H.G.; STUIJFZAND, S.C.; KRAAK, M.H.S.; ADMIRAAL, W. (1997). "Impact of a diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the river meuse, The Netherlands". *Netherl. J. Aq. Ecol.* **30** (4): 327-330.
- ✓ VAN LEEUWEN, C.J.; LUTTMER, W.J.; GRIFFIOEN, P.S. (1985a). "The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: a cadmium example". *Ecotox. Environ. Safety* **9**: 26-39.
- ✓ VAN LEEUWEN, C.J.; MOBERTS, F.; NIEBEEK, G. (1985b). "Aquatic toxicology aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna*". *Aquat. Toxicol.* **8**: 165-175.
- ✓ VARÓ, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. (2002). "Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*". *Chemosphere* **48** (6): 563-569.
- ✓ VILLAR, D.; GONZÁLEZ, M., GUALDA, M.J.; SCHAEFFER, D.J. (1994). "Effects of organophosphorus insecticides on *Dugesia tigrina*: cholinesterase activity and head regeneration". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 319-324.

- ✓ VILLARROEL, M.J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. (1999). "Effect of an acaricide on the reproduction and survival of *Daphnia magna*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63**: 167-173.
- ✓ VILLARROEL, M.J.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; ANDREU, E. (2000a). "Population dynamics in *Daphnia magna* as modified by chronic tetradifon stress". *J. Environ. Sci. Health*, **B35** (2): 211-227.
- ✓ VILLARROEL, M.J.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E., ANDREU, E. (2000b). "Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide". *Aquat. Toxicol.* **49**: 39-47.
- ✓ VILLARROEL, M.J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. (2003). "Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*". *Chemosphere* **53**: 857-864.
- ✓ VILLARROEL, M.J. (2004). "Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas". *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia. 212 pp.
- ✓ VINK, K.; BEDAUX, J.; TOMPOT, A.; HERMANS, M.; VAN STRAALLEN, N.M. (1995). "The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods". *Environ. Toxicol. Chem.* **14** (7): 1225-1232.
- ✓ WALTHALL, W.K.; STARK, J.D. (1997). "A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect". *Ecotox. Environ. Safety* **37**: 45-52.
- ✓ WARE, G.W. (1983). *Pesticide. Theory and applications*. W.H. Freeman and Company, ed., New York, 308 pp.
- ✓ WATERMAN, T. (1961). "Comparative Physiology". En: *The Physiology of Crustacea*. Vol. 1. Academic Press, New York. 681 pp.
- ✓ WAUCHOPE, R.D.; BUTTLER, T.M.; HORNSBY, A.G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P.W.M.; BURT, J.P. (1992). "SCS/ARS/CES Pesticide

properties database for environmental decisionmaking”. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **123**: 1-157.

✓ WEYERS, A.; SOKUL-KLÜTTGEN, B.; BARAIBAR-FENTANES, J.; VOLLMER, G. (2000). “Acute toxicity data: a comprehensive comparison of results of fish, *Daphnia*, and algae tests with new substances notified in the European Union”. *Environ. Toxicol. Chem.* **19** (7): 1931-1933.

✓ WIDDOWS, J. (1993). “Marine and estuarine invertebrates toxicity tests”. En: *Handbook of ecotoxicology*. Vol. I. Ed. Peter Calow. Balckwell Scientific Publications, 160 pp.

✓ WINTERINGHAM, F.P.W.; LEWIS, S.E. (1959). “On the mode of action of insecticides”. *Ann. Rev. Entomol.* **4**: 303-318.

✓ WONG, C.K. (1997). “Effects of diazinon on some population parameters of *Moina macrocopa* (Cladocera)”. *Water Air Soil Pollut.* **393**: 393-399.

✓ WORTHING, C.R.; HANCE, R.J. (1991). *The pesticide manual: a world compendium* (9ª edición). Farnham, Surry: The British Crop Council, U.K., 1141 pp.

✓ YOO, J.K.; LEE, S.W.; AHN, Y.J.; NAGATA, T.; SHONO, T. (2002). “Altered acetylcholinesterase as a resistance mechanism in the brown planthopper (homoptera: delphacidae), *Nilaparvata lugens* Stal”. *Appl. Entomol. Zool.* **37** (1): 37-41.

✓ YUAN, J.; CHAMBERS, H.W. (1996). “Toxicology and biochemistry of two aliesterase inhibitors as synergist of four organophosphorus insecticides in Boll Weevils (Coleoptera: curculionidae)”. *Pestic. Biochem. Phys.* **54**: 210-219.

✓ YUFERA, M.; LUBIAN, L.M.; PASCUAL, E. (1983). “Efecto de cuatro algas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) en cultivo”. *Invest. Pesq.* **47**: 325-337.

✓ YUFERA, E.P.; CARRASCO, J.M. (1986). “Carbamatos y tiocarbamatos herbicidas”. En: *Química agrícola II. Plaguicidas y fitorreguladores*. Ed. Alambra. Madrid, 497 pp.

✓ ZAFFAGNINI, F. (1987). "Reproduction in *Daphnia*". En: *Daphnia*. R.H. Peters y R. De Bernardi, eds. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. Vol. 45. pp.: 245-284.

✓ ZAGATTO, P.A. (1989). *Aspects theoriques et pratiques inherents a l'homologation des pesticides. Vol.1. Etude comparative de la toxicite chronique du pentachlorophenol vis-a-vis de Daphnia magna et de Ceriodaphnia dubia*. Centre des Sciences de l'Environnement. Universite de Metz. France. p.: 37.

✓ ZINKL, J.G.; LOCKHART, W.L.; KENNY, S.A.; WARD, F.J. (1991). "The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish". En: *Cholinesterase-inhibiting insecticides: Their impact on wildlife and the environment. Vol. 2-Chemicals in agriculture*. Mineau, P. ed. Elsevier, New York, U.S.A. pp.: 233-254.

9. ANEXO ESTADÍSTICA

TABLA 1. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida diazinón sobre *D. magna* (F₀) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV *	6	766.2160	127.7027	23.5366
Error	28	151.9200	5.4257	p < 0.001
NH *	6	93528.7794	15588.1299	55.0907
Error	28	7922.7080	282.9539	p < 0.001
CDA *	6	3510.7994	585.1332	69.7988
Error	28	234.7280	8.3831	p < 0.001
NCDA *	6	117.0829	19.5138	87.7871
Error	28	6.2240	0.2223	p < 0.001
TIPTA *	5	2.8497	0.5699	2.6863
Error	24	5.0920	0.2122	p < 0.05
L *	4	0.0060	0.0015	9.0726
Error	15	0.0025	0.0002	p < 0.001
r *	6	0.4012	0.0669	101.9826
Error	28	0.0184	0.0007	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	1.0	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
7.14	1.0							
8.90	0.75							
13.26	0.5							
15.58	0.1							
16.80	0.05							
18.68	c+a							
21.00	control	*	*	*	*	*		

FIGURA 1. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la longevidad (LV) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	1.0	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0.0	1.0							
7.00	0.75							
50.52	0.5							
66.62	0.1							
104.44	0.05							
131.66	control	*	*	*	*	*		
136.82	c+a							

FIGURA 2. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total de neonatos por hembra (NH)**, de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	1.0	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0.0	1.0							
5.82	0.75							
15.20	0.5							
19.32	0.1							
22.28	0.05							
25.86	control	*	*	*	*			
30.16	c+a							

FIGURA 3. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)**, de las hembras de la generación F₀ expuestas a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	1.0	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0	1.0							
0.80	0.75							
2.40	0.5							
3.42	0.1							
4.44	c+a							
4.60	0.05							
5.06	control	*	*	*	*			

FIGURA 4. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	0.1	0.05	0.75	c+a	0.5
7.80	control						
7.98	0.1						
8.16	0.05						
8.16	0.75						
8.20	c+a						
8.80	0.5	*					

FIGURA 5. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (T1PTA)**, de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.05	control	c+a
0.45	0.5				
0.47	0.05				
0.49	control	*	*		
0.51	c+a			*	

FIGURA 6. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)**, de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	1.0	0.75	0.05	0.5	0.1	c+a	control
0	1.0							
0.23	0.75							
0.28	0.05							
0.29	0.5							
0.32	0.1							
0.32	c+a							
0.32	control	*	*					

FIGURA 7. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

TABLA 2. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida diazinón sobre *D. magna* (F_1-1^a camada) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; T1PTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV *	5	1222.8990	244.5798	73.0307
Error	24	80.3760	3.3490	p < 0.001
NH *	5	103578.2347	20715.6469	39.9475
Error	24	12445.7240	518.5718	p < 0.001
CDA *	5	3644.3630	728.8726	27.1427
Error	24	644.4800	26.8533	p < 0.001
NCDA *	5	95.0907	19.0181	47.4268
Error	24	9.6240	0.4010	p < 0.001
T1PTA *	4	3.7576	0.9394	3.1909
Error	20	5.8880	0.2944	p < 0.05
L *	3	0.0167	0.0056	50.2628
Error	14	0.0015	0.0001	p < 0.001
r *	5	0.3786	0.0757	18.0279
Error	24	0.1008	0.0042	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
2.46	0.75						
10.68	0.5						
13.46	0.1						
17.84	0.05						
20.06	c+a						
21.00	control	*	*	*	*		

FIGURA 8. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la longevidad (LV) de los individuos de la generación F_1-1^a camada, expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0	0.75						
28.54	0.5						
33.40	0.1						
85.86	0.05						
134.42	control	*	*	*	*		
161.94	c+a						

FIGURA 9. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total medio de neonatos por hembra (NH)**, de los individuos de la generación F₁-1^a camada, expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0	0.75						
10.16	0.5						
10.26	0.1						
20.68	0.05						
26.90	control	*	*	*			
32.38	c+a						

FIGURA 10. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)**, de las hembras de la generación F₁-1^a camada, expuestas a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0	0.75						
1.60	0.5						
2.20	0.1						
3.86	0.05						
4.66	c+a						
5.00	control	*	*	*	*		

FIGURA 11. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F₁-1^a camada, expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	c+a	0.5	control	0.05	0.1
7.64	c+a					
8.06	0.5					
8.40	control	*				
8.54	0.05					
8.74	0.1					

FIGURA 12. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (TIPTA)**, de los individuos de la generación F_1-1^a camada, expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.05	control	c+a
0.41	0.1				
0.46	0.05				
0.48	control	*	*		
0.49	c+a				

FIGURA 13. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud media del caparazón (L)**, de los individuos de la generación F_1-1^a camada, expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0	0.75						
0.23	0.5						
0.24	0.1						
0.31	0.05						
0.31	control	*					
0.33	c+a						

FIGURA 14. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

TABLA 3. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida diazinón sobre *D. magna* (F_{1-3^a} camada) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; T1PTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV *	4	687.5440	171.8860	29.7339
Error	20	115.6160	5.7808	p < 0.001
NH *	4	77335.3176	19333.8294	78.1709
Error	20	4946.5520	247.3276	p < 0.001
CDA *	4	2497.6616	624.4154	62.0506
Error	20	201.2600	10.0630	p < 0.001
NCDA *	4	66.5976	16.6494	35.0809
Error	20	9.4920	0.4746	p < 0.001
T1PTA *	4	39.9876	9.9969	3.5555
Error	19	53.4220	2.8117	p < 0.05
L *	3	0.0164	0.0050	92.8176
Error	13	0.0008	0.0001	p < 0.001
r *	4	0.1316	0.0329	8.2939
Error	20	0.0794	0.0040	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	c+a	control
6.52	0.5					
16.06	0.1					
19.54	0.05					
19.70	c+a					
20.74	control	*	*			

FIGURA 15. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longevidad (LV)** de los individuos de la generación F_{1-3^a} camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	c+a	0.05	control
10.16	0.5					
31.62	0.1					
114.66	control	*	*	*		
115.26	0.05					
157.28	c+a					

FIGURA 16. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de neonatos por hembra (NH)**, de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	c+a	control	0.05
4.54	0.5					
9.80	0.1					
23.18	control	*	*	*		
24.82	0.05					
31.44	c+a					

FIGURA 17. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)**, de las hembras de la generación F_1-3^a camada expuestas a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.86	0.5					
2.08	0.1					
4.48	0.05					
4.66	c+a					
4.94	control	*	*			

FIGURA 18. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	c+a	control	0.5	0.05	0.1
7.64	c+a					
8.12	control					*
8.25	0.5					
8.34	0.05					
11.20	0.1					

FIGURA 19. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (TIPTA)**, de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.05	c+a	control
0.40	0.1				
0.46	0.05				
0.48	control	*	*	*	
0.49	c+a				

FIGURA 20. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud media del caparazón (L)**, de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	control	c+a
0.15	0.5					
0.20	0.1					
0.31	0.05					
0.31	control	*	*			
0.33	c+a					

FIGURA 21. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

TABLA 4. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida diazinón sobre *D. magna* (F₁-1ª camada) durante la fase de recuperación a los efectos del tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV *	5	299.8096	59.9619	11.8518
Error	24	121.4235	5.0593	p < 0.001
NH *	5	37468.7840	7493.7568	17.8855
Error	24	10055.6640	418.9860	p < 0.001
CDA *	5	1426.8190	285.3638	18.3094
Error	24	374.0560	15.5857	p < 0.001
NCDA *	5	28.9827	5.7965	11.1365
Error	24	12.4920	0.5205	p < 0.001
TIPTA	5	6.5864	1.3173	5.4380
Error	23	5.5715	0.2422	p > 0.05
L *	5	0.0114	0.0023	22.7115
Error	23	0.0023	0.0001	p < 0.001
r *	5	0.0505	0.0101	3.9600
Error	24	0.0612	0.0025	p < 0.01

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.05	0.5	0.1	control
12.06	0.75					
20.13	0.05					
20.20	0.5					
21.00	0.1					
21.00	control	*				

FIGURA 22. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la longevidad (LV) de los individuos de la generación F₁-1ª camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) p<0.05

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control
47.58	0.75					
97.94	0.5					
109.54	0.1					
124.06	0.05					
134.42	control	*	*			

FIGURA 23. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total de neonatos por hembra (NH)**. Corresponde a los individuos de la generación F_1-1^a camada procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control
10.12	0.75					
20.80	0.5					
21.90	0.1					
26.20	0.05					
26.90	control	*	*			

FIGURA 24. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)**, de la generación F_1-1^a camada-recuperación procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.05	0.1	control
2.18	0.75					
4.60	0.5					
4.64	0.05					
5.00	0.1					
5.00	control	*				

FIGURA 25. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.1	0.5	0.05	control
0.44	0.75					
0.44	0.1					
0.45	0.5					
0.46	0.05					
0.48	control	*	*	*	*	

FIGURA 26. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)**, de los individuos de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	control	0.05
0.21	0.75					
0.29	0.5					
0.29	0.1					
0.31	control	*				
0.32	0.05					

FIGURA 27. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

TABLA 5. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida diazinón sobre *D. magna* (F₁-3^a camada) durante la fase de recuperación a los efectos del tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1^a puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	4	9.5496	2.3874	0.9804
Error	20	48.7040	2.4352	p > 0.1
NH	4	12269.2984	3067.3246	15.7598
Error	20	3892.5920	194.6296	p > 0.05
CDA	4	375.9296	93.9824	16.2684
Error	20	115.5400	5.7770	p > 0.05
NCDA	4	2.2984	0.5746	2.5470
Error	20	4.5120	0.2256	p > 0.05
TIPTA	4	4.3224	1.0806	4.5595
Error	20	4.7400	0.2370	p > 0.05
L *	4	0.0026	0.0006	5.2951
Error	20	0.0024	0.0001	p < 0.01
r *	4	0.0064	0.0016	5.9259
Error	20	0.0054	0.0003	p < 0.01

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	control
0.46	0.5				
0.48	0.1				
0.48	0.05				
0.48	control	*			

FIGURA 28. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)**. Corresponde a la generación F₁-3^a camada procedente de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	0.05	control
0.29	0.1				
0.30	0.5				
0.31	0.05				
0.31	control	*			

FIGURA 29. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F₁-3^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L). (*) $p < 0.05$

TABLA 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida molinato sobre *D. magna* (F₀) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCD: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV *	6	1224.3909	204.0651	36.5961
Error	28	156.1320	5.5861	p < 0.001
NH *	6	96443.1017	16073.8503	129.3408
Error	28	3479.7040	124.2751	p < 0.001
CDA *	6	3880.3309	646.7218	175.2837
Error	28	103.3080	3.6896	p < 0.001
NCD *	6	149.9800	24.9967	118.9508
Error	28	5.8840	0.2101	p < 0.001
TIPTA *	6	497.8789	82.9798	1627.0551
Error	28	1.4280	0.0510	p < 0.001
L *	6	1.1359	0.1893	31.7117
Error	28	0.1672	0.0060	p < 0.001
r *	6	0.6458	0.1076	380.8322
Error	28	0.0079	0.0003	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	18.85	9.42	6.28	4.71	3.77	control	c+a
4.5	18.85							
10.3	9.42							
19.3	4.71							
19.4	6.28							
19.1	3.77							
21.0	c+a							
21.0	control	*	*					

FIGURA 30. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longevidad** (LV) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	18.85	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0	18.85							
0	9.42							
55.32	6.28							
73.46	4.71							
119.70	3.77							
127.80	c+a							
131.66	control	*	*	*	*			

FIGURA 31. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total de neonatos por hembra (NH)** de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	18.85	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0	18.85							
0	9.42							
15.60	6.28							
19.66	4.71							
24.56	3.77							
24.96	c+a							
25.86	control	*	*	*	*			

FIGURA 32. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)** de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	18.85	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0	18.85							
0	9.42							
3.42	6.28							
3.70	4.71							
4.86	3.77							
4.94	c+a							
5.06	control	*	*	*	*			

FIGURA 33. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)** en los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	3.77	c+a	4.71	6.28
7.80	control		*		*	*
8.26	3.77					
8.30	c+a					
8.38	4.71					
8.88	6.28					

FIGURA 34. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (T1PTA)** de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	3.77	6.28	4.71	c+a	control
0.37	9.42						
0.44	3.77						
0.46	6.28						
0.46	4.71						
0.46	c+a						
0.49	control	*					

FIGURA 35. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)** de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	18.85	6.28	3.77	c+a	4.71	control
0	9.42							
0	18.85							
0.27	6.28							
0.29	3.77							
0.29	c+a							
0.30	4.71							
0.33	control	*	*	*	*	*	*	

FIGURA 36. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

TABLA 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida molinato sobre *D. magna* (F₁-1ª camada) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; T1PTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	4	0.9816	0.2454	0.6987
Error	24	7.0240	0.3512	p > 0.05
NH *	4	5869.2184	1467.3046	5.9396
Error	20	4940.7160	247.0358	p < 0.005
CDA *	4	165.7336	41.4334	5.4808
Error	20	151.1960	7.5598	p < 0.005
NCDA *	4	4.5104	1.1276	20.1357
Error	24	1.1200	0.0560	p < 0.001
T1PTA *	4	12.6576	3.1644	8.7754
Error	20	7.2120	0.3606	p < 0.001
L *	4	0.0192	0.0048	92.2308
Error	20	0.0010	0.0001	p < 0.001
r *	4	0.0071	0.0018	16.3777
Error	20	0.0022	0.0001	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
99.5	6.28					
102.1	3.77					
104.3	4.71					
131.6	c+a					
134.4	control	*	*	*		

FIGURA 37. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número total de neonatos por hembra (NH)**, de los individuos de la generación F₁-1ª camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	4.71	6.28	3.77	control	c+a
25.2	4.71					
26.1	6.28					
26.4	3.77					
26.9	control					*
32.4	c+a					

FIGURA 38. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tamaño medio de la camada (CDA)**, de las hembras de la generación F₁-1ª camada expuestas a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
3.8	6.28					
3.9	3.77					
4.1	4.71					
4.9	c+a					
5.0	control	*	*	*		

FIGURA 39. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F₁-1ª camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	4.71	6.28	3.77
8.4	control			*	*	*
8.5	c+a					
9.1	4.71					
9.8	6.28					
10.2	3.77					

FIGURA 40. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (TIPTA)**, de los individuos de la generación F₁-1ª camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	3.77	6.28	4.71	control	c+a
0.41	3.77					
0.44	6.28					
0.45	4.71					
0.48	control	*	*	*		
0.49	c+a					

FIGURA 41. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)**, de los individuos de la generación F₁-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	control	c+a
0.28	6.28					
0.28	3.77					
0.30	4.71					
0.31	control	*				
0.32	c+a					

FIGURA 42. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de incremento natural (r)** de los individuos de la generación F₁-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

TABLA 8. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida molinato sobre *D. magna* (F₁-3ª camada) durante la fase de exposición al tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; T1PTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	4	6.0760	1.5190	1.1368
Error	20	26.7240	1.3362	p > 0.1
NH *	4	5938.3160	1484.5790	12.0694
Error	20	2460.0640	123.0032	p < 0.001
CDA	4	21.6624	5.4156	1.8193
Error	20	59.5360	2.9768	p > 0.01
NCDA *	4	7.3216	1.8304	10.2371
Error	20	3.5760	0.1788	p < 0.001
T1PTA *	4	8.1176	2.0294	5.7785
Error	20	7.240	0.3512	p < 0.005
L *	4	0.0059	0.0015	11.9355
Error	20	0.0025	0.0001	p < 0.001
r	4	0.0028	0.0007	2.7065
Error	20	0.0051	0.0003	p > 0.05

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
84.1	6.28					
87.2	4.71					
98.2	3.77					
115.7	c+a					
117.9	control	*	*	*		

FIGURA 43. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el número total de neonatos por hembra (NH), de los individuos de la generación F₁-3ª camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	4.71	6.28	3.77	c+a	control
3.5	4.71					
3.7	6.28					
4.1	3.77					
4.9	c+a					
5.1	control	*	*	*		

FIGURA 44. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)**, de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	3.77	4.71	6.28
8.1	control			*	*	*
8.2	c+a					
9.3	3.77					
9.3	4.71					
9.3	6.28					

FIGURA 45. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (T1PTA)**, de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
0.43	6.28					
0.44	3.77					
0.45	4.71					
0.47	c+a					
0.48	control	*	*	*		

FIGURA 46. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la **longitud corporal (L)**, de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	c+a	control	4.71	3.77	6.28
0.32	c+a					
0.31	control					
0.30	4.71					
0.29	3.77					
0.28	6.28		*			

FIGURA 47. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la tasa intrínseca de incremento natural (r), de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

TABLA 9. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida molinato sobre *D. magna* (F_1-1^a camada) durante la fase de recuperación a los efectos del tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1ª puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	4	4.9576	1.2394	3.6539
Error	20	6.7840	0.3392	p > 0.005
NH *	4	3162.6904	790.6726	7.3017
Error	20	2165.7320	108.2866	p < 0.001
CDA	4	119.5256	29.8814	11.7164
Error	20	51.0080	2.5504	p > 0.05
NCDA *	4	4.1864	1.0466	10.3829
Error	20	2.0160	0.1008	p < 0.001
TIPTA *	4	11.6320	2.9080	26.1041
Error	20	2.2280	0.1114	p < 0.001
L	4	0.0098	0.0024	17.1831
Error	20	0.0028	0.0001	p > 0.001
r	4	0.0030	0.0007	5.0952
Error	20	0.0029	0.0001	p > 0.005

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	3.77	6.28	4.71	control
105.1	3.77				
113.20	6.28				
115.46	4.71				
134.42	control	*	*	*	

FIGURA 48. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el número total de neonatos por hembra (NH) de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	3.77	6.28	4.71	control
3.8	3.77				
4.0	6.28				
4.3	4.71				
5.0	control	*	*	*	

FIGURA 49. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **número medio de camadas por hembra (NCDA)** en los individuos de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	4.71	3.77	6.28
8.40	control		*	*	*
9.1	4.71				
10	3.77				
10	6.28				

FIGURA 50. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (T1PTA)** de los individuos de la generación F_1-1^a camada, procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) $p < 0.05$

TABLA 10. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en el estudio crónico de la toxicidad del plaguicida molinato sobre *D. magna* (F₁-3^a camada) durante la fase de recuperación a los efectos del tóxico. LV: longevidad; NH: n° neonatos por hembra; CDA: tamaño de la camada; NCDA: n° camadas por hembra; TIPTA: tiempo a la 1^a puesta; L: longitud corporal; r: tasa intrínseca de incremento natural.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	4	0.2760	0.0690	0.7913
Error	20	1.7440	0.0872	p > 0.5
NH	4	1226.2520	306.5630	2.3385
Error	20	2621.9080	131.0954	p > 0.05
CDA	4	22.1256	5.5314	2.4205
Error	20	45.7040	2.2852	p > 0.05
NCDA	4	1.8616	0.4654	2.6413
Error	20	3.5240	0.1762	p > 0.05
TIPTA *	4	5.6456	1.4114	13.2630
Error	20	2.1280	0.1064	p < 0.001
L	4	0.0044	0.0011	11.9130
Error	20	0.0018	0.0001	p > 0.001
r	4	0.0008	0.0002	1.8498
Error	20	0.0022	0.0001	p > 0.1

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	control	3.77	4.71	6.28
8.1	control		*	*	
8.4	3.77				
9.0	4.71				
9.3	6.28				

FIGURA 51. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el **tiempo a la primera puesta (TIPTA)** de los individuos de la generación F₁-3^a camada procedentes de parentales pre-expuestos a los distintos tratamientos de molinato (ppm). (*) p < 0.05

TABLA 11. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F₀.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas *	5	2.3244	0.4649	80.4648
Error	24	0.1387	0.0058	p < 0.01
48 horas *	5	9.1357	1.8271	43.0249
Error	24	1.0192	0.0425	p < 0.01
72 horas *	5	2.8336	0.5667	11.3806
Error	24	1.1951	0.0498	p < 0.01
96 horas *	5	6.5007	1.3001	23.5895
Error	24	1.3228	0.0551	p < 0.05
120 horas *	5	5.5739	1.1148	62.7791
Error	24	0.4262	0.0178	p < 0.05

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	c+a	0.05	control
2.03	0.75						
2.31	0.5						
2.58	0.1						
2.74	c+a						
2.76	0.05						
2.80	control	*	*	*			

FIGURA 52. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.75	0.05	c+a	control
3.05	0.5						
3.06	0.1						
3.16	0.75						
4.01	0.05						
4.22	c+a						
4.31	control	*	*	*	*		

FIGURA 53. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.05	0.75	0.5	0.1	c+a	control
5.41	0.05						
5.46	0.75						
5.81	0.5						
5.83	0.1						
5.85	c+a						
6.35	control	*	*	*	*		

FIGURA 54. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	control	c+a
6.06	0.5						
6.38	0.75						
6.59	0.1						
6.63	0.05						
7.32	control	*	*	*	*		
7.33	c+a						

FIGURA 55. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	0.75	0.05	c+a	control
6.37	0.1						
6.37	0.5						
6.50	0.75						
7.21	0.05						
7.27	c+a						
7.32	control	*	*	*			

FIGURA 56. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 12. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-1^{a} camada.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	5	0.3445	0.0689	6.4634
Error	24	0.2559	0.0107	$p < 0.01$
24 horas *	5	2.0060	0.4012	12.6430
Error	24	0.7616	0.0317	$p < 0.01$
48 horas *	5	0.7859	0.1572	5.1098
Error	24	0.7383	0.0308	$p < 0.05$
72 horas *	5	3.7426	0.7485	14.2735
Error	24	1.2586	0.0524	$p < 0.01$
96 horas *	5	2.0476	0.4095	8.6848
Error	24	1.1317	0.0472	$p < 0.01$
120 horas *	5	19.5743	3.9149	151.3268
Error	24	0.6209	0.0259	$p < 0.05$

* Diferencias significativas

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.75	c+a	0.05	control
0.16	0.5						
0.19	0.1						
0.19	0.75						
0.35	c+a						
0.36	0.05						
0.44	control	*	*	*			

FIGURA 57. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **0 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.1	0.05	0.5	c+a	control
0.31	0.75						
0.53	0.1						
0.54	0.05						
0.60	0.5						
0.96	c+a						
1.05	control	*	*	*	*		

FIGURA 58. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.1	0.5	c+a	0.05	control
2.06	0.75						
2.12	0.1						
2.39	0.5						
2.40	c+a						
2.41	0.05						
2.50	control	*	*	*			

FIGURA 59. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	control	c+a
2.36	0.5						
2.57	0.75						
2.70	0.1						
2.98	0.05						
3.28	control	*	*	*			
3.30	c+a						

FIGURA 60. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.75	0.05	0.5	c+a	control
5.16	0.1						
5.23	0.75						
5.39	0.05						
5.45	0.5						
5.78	c+a						
5.87	control	*	*	*	*		

FIGURA 61. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	control	0.05	c+a
4.72	0.75						
6.71	0.5						
6.81	0.1						
6.89	control	*					
6.93	0.05						
7.04	c+a						

FIGURA 62. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 13. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F₁-3^a camada.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	0.2947	0.0737	5.7832
Error	20	0.2548	0.0127	p < 0.01
24 horas *	4	0.5835	0.1459	17.7674
Error	20	0.1642	0.0082	p < 0.001
48 horas *	4	0.9721	0.2430	8.4523
Error	20	0.5750	0.0288	p > 0.001
72 horas *	4	2.5354	0.6338	22.0263
Error	20	0.5755	0.2880	p < 0.001
96 horas *	4	1.2112	0.3028	10.4815
Error	20	0.5778	0.0289	p < 0.001
120 horas *	4	6.0892	1.5223	41.9140
Error	20	0.7264	0.0630	p < 0.001

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.5	0.05	0.1	c+a	control
0.20	0.5					
0.37	0.05					
0.38	0.1					
0.42	c+a					
0.54	control	*	*	*		

FIGURA 63. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **0 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	c+a	control	0.05
1.30	0.1					
1.46	0.5					
1.64	c+a					
1.69	control	*	*			
1.69	0.05					

FIGURA 64. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	control	c+a
2.61	0.5					
2.72	0.1					
2.75	0.05					
3.07	control	*	*	*		
3.09	c+a					

FIGURA 65. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.05	0.1	0.5	control	c+a
3.53	0.05					
3.71	0.1					
3.91	0.5					
4.20	control	*	*	*		
4.41	c+a					

FIGURA 66. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	c+a	0.05	control
5.14	0.1					
5.15	0.5					
5.50	c+a					
5.60	0.05					
5.65	control	*	*			

FIGURA 67. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.05	0.1	0.5	c+a	control
6.19	0.05					
6.79	0.1					
7.07	0.5					
7.26	c+a					
7.67	control	*	*	*		

FIGURA 68. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 14. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F₀.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas *	5	13.8029	2.76060	245.0264
Error	24	29	14.0733	p < 0.001
48 horas *	5	7.2649	1.4530	24.1682
Error	24	1.4429	0.0601	p < 0.001
72 horas *	5	30.6919	6.1383	148.6752
Error	24	0.9909	0.0413	p < 0.001
96 horas *	5	27.1797	5.4359	82.0618
Error	24	1.5898	0.0662	p < 0.05
120 horas *	5	2.1295	0.4259	5.4755
Error	24	1.8668	0.0778	p < 0.05

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	4.71	9.42	6.28	3.77	c+a	control
1.90	4.71						
1.94	9.42						
2.00	6.28						
2.50	3.77						
3.43	c+a						
3.49	control	*	*	*	*		

FIGURA 69. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
3.99	9.42						
4.19	6.28						
4.59	4.71						
4.78	3.77						
5.27	c+a						
5.29	control	*	*	*	*		

FIGURA 70. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
5.24	9.42						
5.35	6.28						
5.36	4.71						
6.02	3.77						
7.31	c+a						
7.79	control	*	*	*	*		

FIGURA 71. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	control	c+a
6.93	9.42						
7.05	6.28						
7.12	4.71						
7.73	3.77						
9.15	control	*	*	*	*		
9.16	c+a						

FIGURA 72. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	9.42	3.77	4.71	c+a	control
8.43	6.28						
8.70	9.42						
8.95	3.77						
9.11	4.71						
9.11	c+a						
9.17	control	*	*				

FIGURA 73. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 15. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-1^{a} camada.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	5	3.8192	0.9548	122.0832
Error	20	0.1564	0.0078	$p < 0.01$
24 horas *	5	1.6001	0.4000	27.4168
Error	20	0.2918	0.0146	$p < 0.01$
48 horas *	5	11.5001	2.8750	176.7538
Error	20	0.3253	0.0163	$p < 0.01$
72 horas *	5	1.3538	0.3385	4.6131
Error	20	1.4674	0.0734	$p < 0.01$
96 horas *	5	20.4233	5.1058	15.2326
Error	20	6.7038	0.3352	$p < 0.01$
120 horas *	5	10.4805	2.6201	16.4048
Error	20	3.1943	0.1597	$p < 0.01$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	control	c+a
0.29	6.28					
0.31	4.71					
0.55	3.77					
1.15	control	*	*	*		
1.17	c+a					

FIGURA 74. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **0 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.67	6.28					
0.72	4.71					
1.04	3.77					
1.14	c+a					
1.28	control	*	*	*		

FIGURA 75. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
0.81	6.28					
2.22	3.77					
2.28	4.71					
2.63	c+a					
2.65	control	*	*	*		

FIGURA 76. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
3.54	6.28					
3.82	4.71					
4.12	3.77					
4.13	c+a					
4.21	control	*	*			

FIGURA 77. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
5.40	6.28					
5.56	4.71					
6.38	3.77					
7.25	c+a					
7.70	control	*	*	*		

FIGURA 78. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
6.00	6.28					
6.60	4.71					
7.00	3.77					
7.27	c+a					
7.89	control	*	*	*		

FIGURA 79. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 16. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el contenido en proteínas totales de *D. magna*, tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F₁-3^a camada.

Contenido proteico	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	1.8311	0.4578	38.2953
Error	20	0.2391	0.0120	p < 0.01
24 horas *	4	0.9191	0.2298	9.5917
Error	20	0.4791	0.0240	p < 0.01
48 horas *	4	7.6712	1.9178	25.6034
Error	20	1.4981	0.0749	p < 0.01
72 horas *	4	10.9017	2.7254	30.0326
Error	20	1.8150	0.0907	p < 0.01
96 horas *	4	40.1488	10.0372	95.8938
Error	20	2.0934	0.1047	p < 0.01
120 horas *	4	1.6819	0.4205	2.2721
Error	20	3.7012	0.1851	p < 0.1

* Diferencias significativas

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.52	6.28					
0.74	4.71					
0.76	3.77					
1.18	c+a					
1.21	control	*	*	*		

FIGURA 80. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 0 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	4.71	6.28	3.77	c+a	control
0.86	4.71					
0.93	6.28					
1.00	3.77					
1.26	c+a					
1.35	control	*	*	*		

FIGURA 81. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	control	c+a
2.39	6.28					
2.56	4.71					
2.94	3.77					
3.66	control	*	*	*		
3.74	c+a					

FIGURA 82. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	control	c+a
3.95	6.28					
4.91	4.71					
5.62	3.77					
5.62	control	*	*			
5.65	c+a					

FIGURA 83. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
4.31	6.28					
6.87	3.77					
6.87	4.71					
7.26	c+a					
8.10	control	*	*	*		

FIGURA 84. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	control	c+a
6.98	6.28					
7.36	3.77					
7.36	4.71					
7.68	c+a					
7.77	control	*				

FIGURA 85. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el contenido en proteínas totales ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 17. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el peso de la generación parental (F_0) de *D. magna*, tras exposición a diazinón a diferentes tiempos.

Peso	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas *	5	260.6817	52.1363	2.9076
Error	24	430.3520	17.9313	$p < 0.05$
48 horas *	5	815.7667	163.1533	8.9318
Error	24	438.4000	18.2667	$p < 0.001$
72 horas *	5	493.9947	98.7989	11.6818
Error	24	202.9800	8.4575	$p < 0.001$
96 horas *	5	6838.1750	1367.6350	23.8667
Error	24	1375.2720	57.3030	$p < 0.001$
120 horas *	5	9023.3750	1804.6750	45.1263
Error	24	959.8000	39.9917	$p < 0.001$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	control	c+a
16.80	0.75						
23.00	0.5						
23.74	0.1						
24.80	0.05						
24.80	control	*					
25.60	c+a						

FIGURA 86. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante 24 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
21.60	0.75						
22.60	0.5						
30.40	0.1						
31.80	0.05						
33.40	c+a						
35.20	control	*	*				

FIGURA 87. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
62.34	0.75						
62.38	0.5						
63.00	0.1						
66.00	0.05						
71.00	c+a						
72.20	control	*	*	*	*		

FIGURA 88. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.1	0.5	0.05	c+a	control
58.94	0.75						
74.20	0.1						
75.00	0.5						
78.40	0.05						
91.24	c+a						
108.00	control	*	*	*	*		

FIGURA 89. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
103.60	0.75						
110.50	0.5						
111.60	0.1						
132.00	0.05						
142.40	c+a						
149.60	control	*	*	*	*		

FIGURA 90. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante 120 horas. (*) $p < 0.05$

TABLA 18. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el peso de la generación parental (F_0) de *D. magna*, tras exposición a molinato a diferentes tiempos.

Peso	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas	5	74.2667	14.8533	2.0440
Error	24	174.4000	7.2667	$p > 0.1$
48 horas *	5	3770.3750	754.0750	69.5534
Error	24	260.2000	10.8417	$p < 0.001$
72 horas *	5	10466.8707	2093.3741	51.1752
Error	24	981.7440	40.9060	$p < 0.001$
96 horas *	5	7570.2667	1514.0533	4.5131
Error	24	8051.6000	335.4833	$p < 0.005$
120 horas *	5	10310.9377	2062.1875	16.4428
Error	24	3009.9840	125.4160	$p < 0.001$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
31.80	9.42						
35.20	6.28						
39.30	4.71						
40.40	3.77						
59.20	c+a						
60.20	control	*	*	*	*		

FIGURA 91. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	4.71	9.42	6.28	3.77	c+a	control
58.80	4.71						
60.48	9.42						
61.72	6.28						
61.72	3.77						
98.10	c+a						
105.00	control	*	*	*	*		

FIGURA 92. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
76.80	9.42						
97.00	6.28						
97.00	4.71						
110.80	3.77						
113.60	c+a						
127.20	control	*	*	*			

FIGURA 93. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso (μg dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
120.74	9.42						
142.40	6.28						
149.60	4.71						
167.80	3.77						
170.96	c+a						
172.00	control	*	*	*			

FIGURA 94. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para el peso ($\mu\text{g dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 120 horas. (*) $p < 0.05$

TABLA 19. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F₀.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas	5	19.6738	3.9348	0.9893
Error	24	95.4553	3.97730	p > 0.1
48 horas *	5	66.1020	13.2204	3.4826
Error	24	91.1083	3.7962	p < 0.05
72 horas *	5	81.9918	16.3984	4.4634
Error	24	88.1745	3.6739	p < 0.01
96 horas *	5	186.3769	37.2754	16.5085
Error	24	54.1907	2.2579	p < 0.01
120 horas *	5	224.2442	44.8488	10.2130
Error	24	105.3928	4.3914	p < 0.01

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.05	0.1	c+a	control
0.42	0.75						
0.69	0.5						
0.76	0.05						
0.80	0.1						
0.80	c+a						
0.88	control	*					

FIGURA 95. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE (nmol min⁻¹ dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.69	0.75						
0.76	0.5						
0.76	0.1						
0.99	0.05						
1.07	c+a						
1.11	control	*	*	*			

FIGURA 96. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	c+a	control
0.46	0.5						
0.57	0.75						
0.80	0.1						
0.92	0.05						
0.95	c+a						
1.20	control	*	*	*	*		

FIGURA 97. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	c+a	control
0.52	0.5						
0.61	0.75						
0.69	0.1						
0.80	0.05						
1.15	c+a						
1.26	control	*	*	*	*		

FIGURA 98. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 20. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F₁-1ª camada.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas	5	5.0279	1.0056	0.8207
Error	24	29.4069	1.2253	p > 0.5
24 horas	5	1.1021	0.2204	0.1032
Error	24	51.2800	2.1367	p > 0.5
48 horas *	5	40.9329	8.1866	6.5279
Error	24	30.0982	1.2541	p < 0.01
72 horas *	5	46.0843	9.2169	13.0742
Error	24	16.9192	0.7050	p < 0.01
96 horas *	5	34.9318	6.9864	3.2579
Error	24	51.4671	2.1445	p < 0.05
120 horas *	5	94.3570	18.8714	6.4887
Error	24	69.8001	2.9083	p < 0.01

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.49	0.75						
0.49	0.5						
0.53	0.1						
0.67	0.05						
0.76	c+a						
0.76	control	*	*	*			

FIGURA 99. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE (nmol min⁻¹ dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₁-1ª camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	0.75	0.05	c+a	control
0.42	0.1						
0.49	0.5						
0.53	0.75						
0.57	0.05						
0.69	c+a						
0.77	control	*	*	*	*	*	

FIGURA 100. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	c+a	0.05	control
0.69	0.5						
0.76	0.75						
0.88	0.1						
0.92	c+a						
0.95	0.05						
0.99	control	*	*				

FIGURA 101. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.1	0.05	0.5	c+a	control
0.61	0.75						
1.03	0.1						
1.03	0.05						
1.04	0.5						
1.11	c+a						
1.15	control	*					

FIGURA 102. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 21. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F₁-3^a camada.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas	3	7.9120	1.9780	1.1736
Error	20	33.7080	1.6854	p > 0.1
24 horas *	4	34.4510	8.6127	19.6054
Error	20	8.7861	0.4393	p < 0.01
48 horas *	4	31.6619	7.9155	2.03114
Error	20	77.9292	3.8965	p < 0.5
72 horas	4	2.3348	0.5837	0.5714
Error	20	20.4294	1.0215	p > 0.5
96 horas	4	9.3942	2.3486	1.2776
Error	20	36.7644	1.8382	p > 0.1
120 horas	4	15.0376	3.7594	1.9678
Error	20	38.2086	1.9104	p > 0.1

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.34	0.5					
0.34	0.1					
0.38	0.05					
0.57	c+a					
0.61	control	*	*	*		

FIGURA 103. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE (nmol min⁻¹ dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₁-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) p < 0.05

MEDIA	GRUPO	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.57	0.5					
0.76	0.1					
0.80	0.05					
0.88	c+a					
0.88	control	*				

FIGURA 104. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 22. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F₀.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas *	5	27.0617	5.1423	2.8444
Error	24	45.6674	1.9028	p < 0.05
48 horas *	5	44.5467	8.9093	3.8418
Error	24	55.6577	2.3191	p < 0.05
72 horas *	5	130.8710	26.1742	14.2439
Error	24	44.1017	1.8376	p < 0.01
96 horas *	5	85.4384	17.0877	10.8805
Error	24	37.6915	1.5705	p < 0.01
120 horas *	5	129.9429	25.9886	8.3880
Error	24	74.3593	3.0983	p < 0.01

* *Diferencias significativas*

MEDIA GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.47	9.42					
0.46	6.28					
0.46	4.71					
0.53	3.77					
0.66	c+a					
0.69	control	*	*	*		

FIGURA 105. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE (nmol min⁻¹ dafnia⁻¹) de los individuos de la generación F₀ expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) p<0.05

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.53	9.42						
0.61	6.28						
0.61	4.71						
0.62	3.77						
0.80	c+a						
0.88	control	*	*	*	*		

FIGURA 106. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.61	9.42						
0.65	6.28						
0.66	4.71						
0.67	3.77						
1.07	c+a						
1.11	control	*	*	*	*		

FIGURA 107. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	9.42	3.77	4.71	c+a	control
0.71	6.28						
0.76	9.42						
0.80	3.77						
0.81	4.71						
0.99	c+a						
1.20	control	*	*	*	*		

FIGURA 108. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.68	9.42					
0.74	6.28					
0.84	4.71					
0.92	3.77					
1.15	c+a					
1.26	control	*	*	*	*	

FIGURA 109. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 120 horas. (*) $p < 0.05$

TABLA 23. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1 -1ª camada.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	16.1645	4.0411	3.9286
Error	20	20.5729	1.0286	$p < 0.05$
24 horas	4	6,6493	1.6623	0.9891
Error	20	33.6147	1.6807	$p > 0.1$
48 horas	4	3.1226	0.7807	0.5944
Error	20	26.2667	1.3133	$p > 0.5$
72 horas *	4	22.0408	5.5102	3.7499
Error	20	29.3884	1.4694	$p < 0.05$
96 horas *	4	26.2106	6.5526	4.2981
Error	20	30.4907	1.5245	$p < 0.05$
120 horas *	4	56.5806	14.1451	7.6242
Error	20	37.1061	1.8553	$p < 0.01$

* Diferencias significativas

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	c+a	control
0.46	6.28					
0.46	3.77					
0.49	4.71					
0.61	c+a					
0.65	control	*	*	*		

FIGURA 110. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **0 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.76	6.28					
0.76	4.71					
0.76	3.77					
0.95	c+a					
0.95	control	*	*	*		

FIGURA 111. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	control	c+a
0.71	6.28					
0.71	4.71					
0.76	3.77					
0.92	control	*	*			
0.95	c+a					

FIGURA 112. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	3.77	6.28	4.71	control	c+a
0.71	3.77					
0.72	6.28					
0.72	4.71					
1.00	control	*	*	*		
1.05	c+a					

FIGURA 113. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1 -1ª camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 120 horas. (*) $p < 0.05$

TABLA 24. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por individuo), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1 -3ª camada.

AChE	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	16.3847	4.0962	3.7166
Error	20	22.0424	1.1021	$p < 0.05$
24 horas	4	3.1594	0.7898	0.4971
Error	20	31.7771	1.5889	$p > 0.5$
48 horas	4	3.8207	0.9552	0.5909
Error	20	32.3289	1.6164	$p > 0.5$
72 horas	4	3.5409	0.8852	0.8362
Error	20	21.1733	1.0587	$p > 0.5$
96 horas	4	2.3510	0.5878	0.2667
Error	20	44.0829	2.2041	$p > 0.5$
120 horas *	4	20.3430	5.0858	3.6646
Error	20	27.7562	1.3878	$p < 0.05$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	6.28	4.71	3.77	control	c+a
0.46	6.28					
0.53	4.71					
0.57	3.77					
0.67	c+a					
0.67	control	*				

FIGURA 114. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **0 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	6.28	3.77	4.71	control	c+a
0.69	6.28					
0.69	3.77					
0.71	4.71					
0.88	c+a					
0.88	control	*	*	*		

FIGURA 115. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \text{dafnia}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 25. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F_0 .

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas	5	0.0106	0.0021	0.3527
Error	24	0.1448	0.0060	$p > 0.5$
48 horas *	5	0.0371	0.0074	3.1719
Error	24	0.0561	0.0023	$p < 0.05$
72 horas *	5	0.0212	0.0042	4.0328
Error	24	0.0253	0.0011	$p < 0.01$
96 horas *	5	0.0260	0.0052	11.0259
Error	24	0.0113	0.0005	$p < 0.001$
120 horas *	5	0.0327	0.0065	6.9748
Error	24	0.0225	0.0009	$p < 0.001$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.75	0.05	c+a	0.5	control	0.1
0.13	0.75						
0.19	0.05						
0.19	c+a						
0.20	0.5						
0.22	control	*					
0.25	0.1						

FIGURA 116. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.75	0.5	0.1	0.05	c+a	control
0.13	0.75						
0.13	0.5						
0.13	0.1						
0.18	0.05						
0.18	c+a						
0.18	control	*	*	*			

FIGURA 117. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	c+a	0.05	control
0.07	0.5						
0.09	0.75						
0.12	0.1						
0.13	c+a						
0.14	0.05						
0.16	control	*	*	*			

FIGURA 118. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	c+a	control
0.08	0.5						
0.09	0.75						
0.11	0.1						
0.11	0.05						
0.16	c+a						
0.17	control	*	*	*	*		

FIGURA 119. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 26. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-1^{a} camada.

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	5	19.3165	3.8633	16.4079
Error	24	5.6509	0.2355	$p < 0.001$
24 horas *	5	5.1968	1.0394	14.0772
Error	24	1.7720	0.0738	$p < 0.001$
48 horas *	5	0.0500	0.0100	5.8137
Error	24	0.0412	0.0017	$p < 0.005$
72 horas *	5	0.0148	0.0030	4.9122
Error	24	0.0145	0.0006	$p < 0.005$
96 horas	5	0.0078	0.0016	4.2801
Error	24	0.0087	0.0004	$p > 0.005$
120 horas	5	0.0038	0.0008	1.0514
Error	24	0.0174	0.0007	$p > 0.1$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	0.05	control	c+a	0.75	0.1	0.5
1.28	0.05						
1.31	control				*	*	*
1.64	c+a						
2.77	0.75						
2.82	0.1						
3.29	0.5						

FIGURA 120. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante 0 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	0.5	0.05	0.1	0.75
0.62	control			*	*	*	*
0.64	c+a						
1.12	0.5						
1.21	0.05						
1.23	0.1						
1.85	0.75						

FIGURA 121. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.75	0.1	0.05	c+a	control
0.22	0.5						
0.23	0.75						
0.25	0.1						
0.27	0.05						
0.32	c+a						
0.33	control	*	*	*	*		

FIGURA 122. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.1	0.5	0.05	0.75	c+a	control
0.16	0.1						
0.19	0.5						
0.19	0.05						
0.20	0.75						
0.21	c+a						
0.23	control	*	*	*	*		

FIGURA 123. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^a camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 27. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a diazinón a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-3^{a} camada.

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	3	4.5006	1.1251	8.3702
Error	20	2.6884	0.1344	$p < 0.001$
24 horas *	4	0.0826	0.0206	9.9671
Error	20	0.0414	0.0021	$p < 0.001$
48 horas	4	0.0181	0.0045	0.9933
Error	20	0.0911	0.0046	$p > 0.1$
72 horas	4	0.0041	0.0010	1.5954
Error	20	0.0128	0.0006	$p > 0.1$
96 horas	4	0.0013	0.0003	0.4898
Error	20	0.0128	0.0006	$p > 0.5$
120 horas	4	0.0003	0.0001	0.1759
Error	20	0.0074	0.0004	$p > 0.5$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	control	c+a	0.1	0.05	0.5
1.21	control					*
1.55	c+a					
1.61	0.1					
1.66	0.05					
2.49	0.5					

FIGURA 124. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante 0 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	0.5	0.05	0.1	c+a	control
0.23	0.5					
0.23	0.05					
0.26	0.1					
0.35	c+a					
0.36	control	*	*	*		

FIGURA 125. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de diazinón (ng/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 28. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación F_0 .

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
24 horas	5	0.0125	0.0025	0.8764
Error	24	0.0685	0.0029	$p > 0.5$
48 horas	5	0.0050	0.0010	1.0458
Error	24	0.0228	0.0009	$p > 0.1$
72 horas *	5	0.0039	0.0008	4.5771
Error	24	0.0041	0.0002	$p < 0.005$
96 horas *	5	0.0039	0.0008	3.1200
Error	24	0.0060	0.0002	$p < 0.05$
120 horas *	5	0.0154	0.0031	8.5685
Error	24	0.0086	0.0004	$p < 0.001$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	6.28	9.42	4.71	3.77	control	c+a
0.10	6.28						
0.11	9.42						
0.11	4.71						
0.11	3.77						
0.13	control	*	*	*	*		
0.14	c+a						

FIGURA 126. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.11	9.42						
0.10	6.28						
0.11	4.71						
0.10	3.77						
0.10	c+a						
0.13	control	*	*	*	*		

FIGURA 127. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	9.42	6.28	4.71	3.77	c+a	control
0.08	9.42						
0.09	6.28						
0.09	4.71						
0.10	3.77						
0.13	c+a						
0.14	control	*	*	*	*		

FIGURA 128. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_0 expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **120 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 29. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-1^{a} camada.

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	5.7727	1.4432	24.0414
Error	20	1.2006	0.0600	$p < 0.001$
24 horas *	4	0.5903	0.1476	7.3708
Error	20	0.4004	0.0200	$p < 0.001$
48 horas *	4	0.8170	0.2042	106.6257
Error	20	0.0383	0.0019	$p < 0.001$
72 horas	4	0.0074	0.0019	1.9836
Error	20	0.0187	0.0009	$p > 0.1$
96 horas	4	0.0009	0.0002	0.6587
Error	20	0.0068	0.0003	$p > 0.5$
120 horas	4	0.0056	0.0014	3.6448
Error	20	0.0076	0.0004	$p > 0.01$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	c+a	control	3.77	6.28	4.71
0.52	c+a					
0.57	control				*	*
0.83	3.77					
1.59	6.28					
1.61	4.71					

FIGURA 129. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 0 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	3.77	c+a	4.71	6.28
0.54	control				*	*
0.55	3.77					
0.60	c+a					
0.80	4.71					
0.93	6.28					

FIGURA 130. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	4.71	3.77	6.28
0.26	control					*
0.26	c+a					
0.27	4.71					
0.30	3.77					
0.72	6.28					

FIGURA 131. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-1^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

TABLA 30. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* (expresada por μg de proteína), tras exposición a molinato a diferentes tiempos. Corresponde a la generación de descendientes F_1-3^{a} camada.

AChE por μg de prot.	G.L.	S.C.	C.M.	F
0 horas *	4	0.2990	0.0747	7.3952
Error	20	0.2022	0.0101	$p < 0.001$
24 horas *	4	0.2392	0.0598	5.0343
Error	20	0.2376	0.0119	$p < 0.01$
48 horas *	4	0.0202	0.0050	3.3103
Error	20	0.0305	0.0015	$p < 0.05$
72 horas *	4	0.0070	0.0018	5.8055
Error	20	0.0060	0.0003	$p < 0.005$
96 horas *	4	0.0102	0.0026	6.5322
Error	20	0.0078	0.0004	$p < 0.005$
120 horas	4	0.0017	0.0004	1.5961
Error	20	0.0053	0.0003	$p > 0.1$

* *Diferencias significativas*

MEDIA	GRUPO	control	c+a	3.77	4.71	6.28
0.55	control			*	*	*
0.57	c+a					
0.74	3.77					
0.78	4.71					
0.83	6.28					

FIGURA 132. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante 0 horas. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	6.28	3.77	4.71
0.48	control			*	*	*
0.49	c+a					
0.64	6.28					
0.67	3.77					
0.72	4.71					

FIGURA 133. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **24 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	c+a	control	3.77	4.71	6.28
0.16	c+a					
0.18	control					*
0.19	3.77					
0.22	4.71					
0.24	6.28					

FIGURA 134. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **48 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	3.77	c+a	4.71	6.28
0.12	control					*
0.13	3.77					
0.14	c+a					
0.15	4.71					
0.17	6.28					

FIGURA 135. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^a camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **72 horas**. (*) $p < 0.05$

MEDIA	GRUPO	control	c+a	4.71	3.77	6.28
0.10	control					*
0.10	c+a					
0.10	4.71					
0.11	3.77					
0.15	6.28					

FIGURA 136. Resultado del test de Duncan aplicado a los valores obtenidos para la actividad AChE ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) de los individuos de la generación F_1-3^{a} camada expuestos a los distintos tratamientos de molinato (mg/L) durante **96 horas**. (*) $p < 0.05$