

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS EN EL CRUSTÁCEO
Daphnia magna POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS

M^a JOSÉ VILLARROEL UTRILLAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 4 de Juny de 2004 davant un tribunal format per:

- Dra. D^a. Dolores Garcerá Zamorano
- Dr. D. José María Carrasco Dorrien
- Dr. D. Juan Peña Forner
- Dr. D. José Vicente Tarazona Lafarga
- Dr. D. Antonio Camacho González

Va ser dirigida per:

D^a. Dolores Ferrando Rodrigo

D. Enrique Andreu Moliner

©Copyright: Servei de Publicacions

M^a José Villarroel Utrillas

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-1453-0

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 en el crustáceo
Daphnia magna por exposición a
plaguicidas”**

Memoria presentada por:
Dña. M^a José Villarroel Utrillas
Para optar al grado de Doctora en
Ciencias Biológicas.
Junio 2004.

Los Drs. **D. ENRIQUE ANDREU MOLINER**, Catedrático de Fisiología y **Dña. M^a DOLORES FERRANDO RODRIGO**, Profesora Titular de Fisiología, del Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que, la memoria de Tesis Doctoral titulada: “**Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas.**” Presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Dña. M^a José Villarroel Utrillas**, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la normativa vigente firmamos el presente certificado en,

Burjassot, 8 de Enero de 2004.

Fdo: Prof. Dr. Enrique Andreu Moliner Fdo: Prof. Dra. M^a Dolores Ferrando Rodrigo

Es un honor para mí expresar la gratitud y el aprecio que siento hacia todas estas personas que desinteresadamente han estado a mi lado, ayudándome en los momentos más difíciles y acompañándome en los más gratos, sin ellos sería imposible haber realizado este trabajo, a todos gracias de corazón.

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento a los directores de este trabajo; al Dr. Enrique Andreu Moliner por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por sus acertadas correcciones, por sus consejos, por confiar en mí y por que en ningún momento me faltó su ayuda y apoyo. A la Dra. M^a Dolores Ferrando, no sólo debo darle las gracias por su confianza, apoyo y ayuda constante, sino también por enseñarme a realizar una investigación, por estar cerca siempre que la he necesitado y por darme esta oportunidad. Su amistad y afecto significan mucho para mí, cuenta con todo mi respeto y admiración como persona y como investigador, espero estar siempre a la altura de su confianza y me gustaría ratificarle una vez más mi aprecio y lealtad. Me siento profundamente orgullosa de haber realizado este trabajo bajo su dirección. A ambos no sabría cómo agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A la Consellería de Educación y Cultura de la Generalitat Valenciana por concederme la beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo y al Departamento de Biología Funcional y Antropología Física por la ayuda prestada.

A D. Jesús Fuente por realizar desinteresadamente el aburrido y siempre poco gratificante estudio estadístico de los resultados.

Al Dr. Alvaro Peña y a Oscar Andreu por realizar las fotos que ilustran este trabajo.

A la Dra. Encarna Sancho, ella me ha enseñado el significado de las palabras sacrificio y perseverancia, la admiro profundamente por su determinación, ella no sólo ha sido un punto de referencia, sino también una amiga en la que he podido confiar, le debo muchas palabras de aliento y me gustaría transmitirle desde aquí todo el aprecio y afecto que siento por ella.

A mis compañeras de laboratorio María, Cristina y Susana por hacer tan agradable el ambiente en el laboratorio, por todos los ratos compartidos, por estar siempre cerca, por su ayuda y su paciencia.

A Maryland con la que he compartido las horas de comida y ha hecho que sean momentos divertidos en los cuales olvidar un poco los problemas.

A mis amigos que como dice una canción: "les adeudo la ternura, las palabras de aliento y la paciencia de tolerarme las espinas más agudas los arrebatos del humor, la negligencia, las vanidades, los temores y las dudas". A todos les debo mucho, por compartir conmigo buenos y malos momentos por que siempre han estado cerca cuando los he necesitado, por que han confiando en mí sin vacilar, sinceramente gracias y especialmente a: Laura, Aurelio, Eva, Carlos, M^aJosé, José, Toni, Rosa, Nacho, Ana, M^aCarmen y Ramón.

A toda mi familia porque sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo, a mis padres por su paciencia, su apoyo y por todo su cariño, a mi hermano y María, por su cariño y confianza, ellos siempre se han interesado por mi y han estado a mi lado ayudándome y apoyándome cuando los he necesitado. A mis abuelos y a mi tía Emilia agradecerles el tiempo que me dedicaron sin limitaciones cuando era una niña, enseñándome las pequeñas cosas de la vida y cuidándome y mimándome más de lo que merecía. Mis suegros y mis cuñados Javier y Ana, también mis sobrinos Javier y Anita siempre me han demostrado su cariño y me han ayudado en todo cuanto he necesitado.

Y, finalmente, a Migue quien me ha demostrado sobradamente su amor, su paciencia y su cariño han sido fundamentales en mi vida no sólo en la realización de este trabajo sino en muchos aspectos personales. A él le debo casi todo lo que soy, espero tener junto a él una vida plena y feliz.

A Migue y Yaiza

“No existen conocimientos más elevados o más bajos, sino un conocimiento único que emana de la experimentación.”

Leonardo Da Vinci (1452-1519).

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades	2
1.2. Estudio crónico de la toxicidad, alteraciones fisiológicas y comportamiento filtrador	6
1.3. Biología del crustáceo <i>Daphnia magna</i>	9
1.4. Importancia de <i>Daphnia magna</i> en ecotoxicología.....	13
1.5. Problemática de los plaguicidas organoclorados y los herbicidas.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Animales experimentales (<i>Daphnia magna</i>)	21
3.2. Cultivo del alga <i>Nannochloris oculata</i>	23
3.3. Plaguicidas objeto de estudio	26
3.4. Toxicidad aguda de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en <i>D. magna</i>	29
3.5. Estudio de la toxicidad crónica de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en <i>D. magna</i>	31
3.5.1. Cálculo de la concentración óptima de alga.....	31
3.5.2. Toxicidad crónica en <i>D. magna</i>	32
3.6. Efecto de los plaguicidas Tetradifón y Propanil sobre el comportamiento filtrador de <i>D. magna</i>	35
3.7. Efecto del Tetradifón y Propanil en la fisiología (metabolismo energético) de <i>D. magna</i>	37
3.7.1. Determinación de los niveles de glucógeno.....	38
3.7.2. Determinación de la concentración total de lípidos.....	39
3.7.3. Determinación de los niveles de proteínas.....	40
3.8. Determinación del peso seco de <i>D. magna</i>	41
3.9. Cálculo del contenido calórico.....	41
3.10. Análisis estadístico.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Estudio de la toxicidad aguda del Tetradifón y el Propanil en <i>D. magna</i>	43
4.2. Estudio de la toxicidad crónica de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en <i>D. magna</i>	45
4.2.1. Acaricida Tetradifón.....	45
4.2.1.1. Tamaño de la camada	45

4.2.1.2. Número de camadas.....	46
4.2.1.3. Tiempo a la primera puesta.....	46
4.2.1.4. Número de neonatos por hembra	48
4.2.1.5. Longevidad	48
4.2.1.6. Longitud	49
4.2.1.7. Tasa intrínseca de crecimiento natural (r)	49
4.2.1.8. Cálculo de la MATC.....	50
4.2.1.9. Cálculo de la CE ₅₀	50
4.2.2. Herbicida Propanil.....	52
4.2.2.1. Tamaño de la camada	52
4.2.2.2. Número de camadas.....	52
4.2.2.3. Tiempo a la primera puesta.....	52
4.2.2.4. Número de neonatos por hembra	53
4.2.2.5. Longevidad	53
4.2.2.6. Longitud	55
4.2.2.7. Tasa intrínseca de crecimiento natural (r)	55
4.2.2.8. Cálculo de la MATC.....	56
4.2.2.9. Cálculo de la CE ₅₀	56
4.3. Efecto de los plaguicidas Tetradifón y Propanil sobre el comportamiento filtrador de <i>D. magna</i>	58
4.3.1. Acaricida Tetradifón.....	58
4.3.1.1. Tasa de filtración.....	58
4.3.1.2. Tasa de ingestión	58
4.3.2. Herbicida Propanil.....	60
4.3.2.1. Tasa de filtración.....	60
4.3.2.2. Tasa de ingestión	60
4.4. Efectos de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en la fisiología de <i>D. magna</i>	62
4.4.1. Acaricida Tetradifón.....	63
4.4.1.1. Efectos sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).....	63
4.4.1.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.....	63
4.4.1.1.2. Niveles tisulares de lípidos.....	67
4.4.1.1.3. Niveles tisulares de proteínas.....	71
4.4.1.1.4. Contenido calórico	74
4.4.1.1.5. Peso seco	78
4.4.1.2. Efectos sobre el metabolismo energético (expresado por peso).....	81
4.4.1.2.1. Niveles tisulares de glucógeno.....	81
4.4.1.2.2. Niveles tisulares de lípidos.....	84
4.4.1.2.3. Niveles tisulares de proteínas.....	87
4.4.1.2.4. Contenido calórico	91

4.4.2. Herbicida Propanil.....	94
4.4.2.1. Efectos sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).....	94
4.4.2.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.....	94
4.4.2.1.2. Niveles tisulares de lípidos.....	98
4.4.2.1.3. Niveles tisulares de proteínas.....	102
4.4.2.1.4. Contenido calórico.....	106
4.4.2.1.5. Peso seco.....	110
4.4.2.2. Efectos sobre el metabolismo energético (expresado por peso).....	113
4.4.2.2.1. Niveles tisulares de glucógeno.....	113
4.4.2.2.2. Niveles tisulares de lípidos.....	116
4.4.2.2.3. Niveles tisulares de proteínas.....	119
4.4.2.2.4. Contenido calórico.....	123
5. DISCUSIÓN.....	125
5.1. Toxicidad aguda del Propanil en <i>D. magna</i>	126
5.2. Toxicidad crónica de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en <i>D. magna</i>	128
5.3. Efectos del Tetradifón y el Propanil sobre el comportamiento filtrador de <i>D. magna</i>	135
5.4. Efecto del Tetradifón y el Propanil en la fisiología (metabolismo energético) de <i>D. magna</i>	138
6. CONCLUSIONES.....	148
7. BIBLIOGRAFÍA.....	151
8. ANEXO ESTADÍSTICA.....	168
8.1. Estudio de la toxicidad crónica de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en <i>D. magna</i>	169
8.1.1. Acaricida Tetradifón.....	169
8.1.2. Herbicida Propanil.....	172
8.2. Efecto de los plaguicidas Tetradifón y Propanil sobre el comportamiento filtrador de <i>D. magna</i>	175
8.2.1. Acaricida Tetradifón.....	175
8.2.2. Herbicida Propanil.....	176
8.3. Efecto de los plaguicidas Tetradifón y Propanil en la fisiología de <i>D. magna</i>	177
8.3.1. Acaricida Tetradifón.....	177
8.3.1.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).....	177
8.3.1.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).....	187
8.3.2. Herbicida Propanil.....	195
8.3.2.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).....	195
8.3.2.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).....	205

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES.

Actualmente existe una enorme problemática debida a la gran cantidad de sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente. Estas sustancias derivan de los procesos industriales, de la actividad humana diaria y de los actuales sistemas agrarios cada vez más intensivos.

Entre dichas sustancias tóxicas se encuentran los plaguicidas. El uso de estos productos se expandió rápidamente a partir de los años 60. En los 80 se empezó a detectar que dichos compuestos presentaban un efecto nocivo sobre el medio ambiente. El uso racional de los plaguicidas exige el conocimiento de los problemas biológicos relacionados con el control de las plagas, problemas que son muchos y difíciles de solucionar. Los plaguicidas alteran el medio ambiente desequilibrando los sistemas ecológicos. Además, los insectos y algunos otros organismos desarrollan resistencias, lo que hace necesario utilizar mayores dosis o productos de mayor efectividad (Primo Yúfera y Carrasco, 1986).

Los plaguicidas son utilizados para eliminar las plagas que amenazan las cosechas o la salud pública. En la mayoría de las ocasiones llegan a interactuar con organismos que no son los diana; al ser los plaguicidas poco selectivos, provocan que una serie de insectos, mamíferos pequeños, plantas y microorganismos, sean afectados en la misma forma que la plaga, que es el objetivo. El hecho de la presencia de los plaguicidas en el medio ambiente se debe a que es difícil controlar la movilidad de estos compuestos. Los compuestos volátiles pasan al aire, otros son arrastrados por las corrientes de agua junto con partículas de tierra, con lo cual no es raro encontrar restos de plaguicidas, actuando como contaminantes a grandes distancias del lugar en que se aplicaron. Los plaguicidas que no se disgregan por volatilización o en las aguas de escorrentía entran en el suelo o percolan hacia aguas subterráneas.

Algunos autores sostienen que aun cuando el uso del DDT se ha interrumpido los residuos de sus componentes activos permanecen en los organismos del suelo aún por muchas décadas. Se ha demostrado que la persistencia del DDT aumenta apreciablemente si el plaguicida es mezclado con el suelo; el tiempo requerido para que desaparezca el 90% puede ser de 1 a 2 años si queda en la superficie donde ha sido aplicado, pero se extiende de 25 a 40 años cuando se mezcla con el suelo (Wheatley, 1965; Buck y cols., 1982; Cooke y Stringer, 1982).

A pesar del uso de los plaguicidas, se estima que las pérdidas anuales producidas en las cosechas de los países desarrollados oscilan alrededor del 25%, cifra que aumenta

en los países en vías de desarrollo donde se alcanzan pérdidas superiores al 40%. Se reconoce que una de las mejores armas para aumentar los rendimientos consiste en el apropiado empleo de estos compuestos plaguicidas. Su correcta aplicación no estriba sólo en atender al gasto-beneficio obtenido, sino también al impacto que tales productos tienen sobre los ecosistemas y en último termino sobre el hombre (Repetto, 1995).

Debemos tener en cuenta que en muchas ocasiones las aplicaciones se realizan sobre el propio ambiente acuático; por ejemplo, para controlar plagas de mosquitos o cuando el cultivo se realiza en zonas inundadas, como en los arrozales. Los organismos acuáticos que habitan en estos lugares son, sin duda, los que más sometidos se encuentran a los efectos de estos plaguicidas ya que reciben altas concentraciones de estas sustancias. Sin llegar a alcanzar concentraciones letales, la presencia de concentraciones subletales puede originar efectos crónicos en las poblaciones y comunidades acuáticas ocasionando un grave daño a largo plazo que es difícil evaluar. Los efectos crónicos pueden afectar a la supervivencia, la reproducción, el crecimiento, al comportamiento filtrador y a la fisiología de los invertebrados acuáticos (Bodar y cols, 1988).

En general, los plaguicidas comparten la característica fisico-química de la liposolubilidad. Esto les permite ser absorbidos a través de las membranas biológicas, pudiendo pasar a la vía sistémica y acumularse en los depósitos grasos de los animales. Así, un compuesto presente en una concentración que no es tóxica en los niveles más bajos de la cadena trófica, debido a la acumulación progresiva a lo largo de la cadena adquiere, en los niveles más altos, concentraciones tóxicas e incluso letales (Skaare y cols., 2000).

Por ello, hoy en día tiene gran importancia la recuperación de los sistemas acuáticos y su conservación, para esto es necesario determinar los efectos que las sustancias tóxicas producen en los organismos. Dada la dificultad que entraña estudiar directamente un ecosistema a causa de las complicadas relaciones que se dan entre los organismos, se hace necesario la utilización de bioensayos que nos den información sobre la toxicidad de los compuestos que son liberados al medio ambiente y permitan determinar su peligrosidad para la fauna a la que no son destinados.

Debido a toda la problemática implícita en el uso de plaguicidas se hace necesario el estudio de los efectos tóxicos que estas sustancias tienen en los organismos no diana.

Existen numerosas y variadas formas para la medida de la toxicidad provocada por la contaminación de una determinada sustancia; estudios drásticos, como el estudio de la mortalidad, estudios a largo plazo, como la valoración de los efectos subletales de una sustancia; evaluando las alteraciones en el desarrollo, en el crecimiento, en la reproducción, en la fisiología, en la bioquímica del organismo tratado y en el comportamiento, finalmente estudios poblacionales, a nivel de comunidades o incluso de ecosistemas (Graney y Giesy, 1986).

La gran mayoría de estudios toxicológicos llevados a cabo con plaguicidas se han centrado en su efecto sobre pequeños mamíferos y fundamentalmente en peces. Existe una gran literatura al respecto, no obstante algunos trabajos se han hecho en invertebrados superiores (crustáceos decápodos,...etc.). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que estos plaguicidas van a ejercer efectos muy considerables sobre pequeños organismos pertenecientes al zooplancton que desempeñan un papel fundamental en las cadenas tróficas acuáticas, de tal manera que un efecto negativo en la población de estos organismos repercutirá considerablemente en eslabones superiores de la cadena (Lynch y Shapiro, 1981; Lampert y cols., 1986). Dentro del zooplancton, el crustáceo cladóceros *Daphnia magna* constituye una pieza clave en los estudios de la toxicología acuática moderna. Es un organismo muy sensible a la contaminación acuática diversa, pero especialmente a los plaguicidas (Hanazato, 1998; Abe y cols., 2001).

La mayor parte de los estudios de toxicidad en organismos acuáticos se centran en estudios de mortalidad (toxicidad aguda), aunque es de mayor importancia conocer el efecto que concentraciones subletales del contaminante tienen sobre el crecimiento la reproducción y la supervivencia de los organismos expuestos (Jak y Meador, 1997).

Otros estudios de toxicidad son los que reflejan las alteraciones fisiológicas producidas en los organismos ensayados, como consecuencia de la presencia en el medio de concentraciones subletales de tóxicos. Para ello, se han desarrollado estudios centrados en el conocimiento de las alteraciones fisiológicas como son, niveles tisulares de glucógeno, proteínas o lípidos totales. Son determinaciones ampliamente utilizadas en mamíferos y aves, en menor cantidad en peces, pero muy pocos son los estudios llevados a cabo en invertebrados acuáticos (Graney y Giessy, 1986; McKee y Knowles, 1986; Knowles y cols., 1987; Bodar y cols., 1988; Knops y cols., 2001).

Existen muchas razones que apoyan la utilización de este tipo de ensayos en invertebrados. En primer lugar, se sabe que muchos invertebrados acuáticos son más sensibles a los plaguicidas que los peces.

Evaluando el efecto de estos contaminantes en diferentes especies de invertebrados sería posible predecir con mayor garantía qué niveles serán tóxicos en vertebrados. En segundo lugar, los invertebrados son mucho más numerosos que los vertebrados, con lo que podremos pronosticar con mayor exactitud los resultados. Y en último lugar, los invertebrados constituyen componentes muy importantes de las cadenas tróficas. Así pues, una reducción significativa en la población de invertebrados tendría importantes consecuencias ecológicas y económicas.

Existe, además, otro parámetro de utilización reciente en los estudios de toxicidad con invertebrados acuáticos (Ferrando y cols., 1993; Fernández y cols., 1994; Lee y cols., 1997; Barata y Baird, 2000; McWilliam y Baird, 2002), se trata de la tasa de filtración e ingestión de alimento y se refiere a la capacidad con la que un organismo filtra el agua que le rodea e incorpora de esta manera el alimento en ella suspendido. Muchos invertebrados acuáticos pertenecientes al zooplancton, como *Daphnia magna*, son organismos filtradores que se alimentan de partículas tan pequeñas como son las algas del fitoplancton. Cuando el organismo se expone a plaguicidas, éstos afectan al sistema nervioso y por consiguiente al aparato locomotor y filtrador del animal. La consecuencia inmediata es que la tasa de filtración disminuye y, por ello, también la incorporación del alimento; entonces el animal se debilita y esto afecta a su supervivencia y reproducción (Day, 1989).

En la Comunidad Valenciana el uso del acaricida Tetradifón se encuentra muy extendido entre los cultivos de cítricos. Por otro lado, el herbicida Propanil es ampliamente utilizado en los arrozales que rodean al parque natural de La Albufera.

En el presente trabajo se estudian los efectos subletales que los plaguicidas Tetradifón y Propanil tienen sobre el cladóceros *D. magna*. Se han realizado estudios a tres niveles: a nivel poblacional, estudiando la toxicidad crónica, a nivel individual estudiando las alteraciones fisiológicas y, finalmente, a nivel nutricional al evaluar el comportamiento filtrador.

1.2. ESTUDIO CRÓNICO DE LA TOXICIDAD, ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y COMPORTAMIENTO FILTRADOR.

En la última década se ha utilizado, para valorar los efectos tóxicos producidos por plaguicidas, la DL₅₀ (dosis letal cincuenta) y la CL₅₀ (concentración letal cincuenta). Estos ensayos evalúan la mortalidad de los individuos expuestos, son estudios cortos en el tiempo y fáciles de aplicar.

Estos bioensayos nos ayudan a conocer aquellas concentraciones que pueden producir alteraciones letales en los organismos. Pero en ellos no se tiene en cuenta los efectos producidos sobre la reproducción. En condiciones normales, el buen estado de una población depende de la esperanza de vida, el tiempo transcurrido hasta la maduración reproductora y la tasa de reproducción, siendo estos parámetros importantes en los estudios ecotoxicológicos (Walthall y Strack, 1997).

La limitación de los parámetros examinados y el corto tiempo de exposición requerido para obtener una CL₅₀ hacen que sea un dato incompleto para valorar los efectos reales de los contaminantes en las poblaciones naturales. Para remediar esto, muchos autores han recomendado el uso de estudios crónicos para medir los efectos subletales producidos en una población (Bechmann, 1994; Stark y cols., 1997; Sánchez y cols., 1998; Ferrando y cols., 1999).

Además, los estudios crónicos son más completos que los ensayos de toxicidad aguda, ya que en los experimentos crónicos los organismos son expuestos a la sustancia tóxica desde su nacimiento hasta la muerte, si esta sucede, así se pueden estudiar efectos sobre la longevidad, el desarrollo y la fecundidad (Schindler, 1987).

Para *Daphnia magna*, el proceso de filtración e ingestión del alimento influye directamente en su fisiología en términos de crecimiento, metabolismo y reproducción. Ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos alteran su comportamiento filtrador, reduciendo la filtración por los apéndices y, por tanto, los procesos de ingestión y digestión del alimento, debilitándose el animal y siendo más vulnerable a los cambios que se pueden dar en el medio en que vive (Geiger y Buikema, 1981, Ullrich y Millemann, 1983; Gliwicz y Sienawska, 1986; Day y Kaushik, 1987a; Bodar y cols., 1988; Hatch y Burton, 1999; Zhang y Baer, 2000; Orchard y cols., 2002).

Al ser organismos filtradores son consumidores primarios, ocupando un lugar clave en la base de las cadenas tróficas dentro de los ecosistemas acuáticos. Por tanto, la alteración en su comportamiento filtrador inducida por sustancias químicas puede tener

consecuencias en la estructura y función del ecosistema, incluyendo cambios en la transparencia del agua, alteración en las tasas de generación de nutrientes y, en último término, alteraciones en el tamaño poblacional en vertebrados e invertebrados predadores (Taylor y cols., 1998).

Recientemente, Jark y cols., (1996) demostraron que niveles subletales de contaminantes en el ambiente acuático pueden producir eutrofización por la inhibición de la tasa de filtración en organismos del zooplancton. Por tanto, concentraciones subletales de un contaminante pueden tener consecuencias a largo plazo en las comunidades y las poblaciones. Los tóxicos que reducen el tamaño corporal del zooplancton pueden afectar a la producción secundaria, ya que hembras pequeñas producen menos puestas y éstas a su vez contienen menos neonatos. Todo esto aumenta la vulnerabilidad a la depredación e incrementa la mortalidad por el riesgo de intoxicación (Allen y cols., 1995).

Varios investigadores (Day y Kaushik 1987a; Fernández-Casalderrey y cols., 1994; Juckelka y Snell, 1995; Blockwell y cols., 1998; Villarroel y cols., 1999) han sugerido que el comportamiento filtrador del zooplancton es una función fisiológica. El deterioro de las funciones fisiológicas y bioquímicas en un organismo es el primer indicador de los efectos de una perturbación ambiental. Este deterioro se puede conocer mediante los cambios en el comportamiento de los organismos (Calow y Sibly, 1990).

Estos cambios pueden usarse como un indicador rápido y sensible de estrés tóxico, y pueden ayudar a explicar otros observados en la supervivencia, crecimiento y reproducción. Al verse alteradas las tasas de filtración e ingestión del alimento, los individuos no poseen suficiente energía para aumentar su tamaño corporal y crecer, y el comienzo de la reproducción en los dáfidos es función del tamaño corporal y no de su edad (Polohiemo y cols., 1982; Hanazato, 1998).

Por último, el desarrollo de indicadores bioquímicos puede ayudar a entender y predecir los efectos crónicos en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos.

Entender la relación entre los efectos tóxicos y los diferentes niveles de organización biológica es crucial en la investigación en ecotoxicología (Maltby y Calow, 1989). Debido a la dificultad que existe al comparar las diferentes respuestas en los distintos niveles de organización biológica como son: el celular, el individual, y finalmente, el nivel de ecosistema así como los complejos estudios necesarios para

estudiar estas relaciones, la realización de estudios simultáneos de fisiología y parámetros ecológicos aporta una importante información para entender los mecanismos de acción de los contaminantes en los seres vivos (Knops y cols., 2001).

Los indicadores bioquímicos de estrés son de gran interés porque son parámetros sensibles a concentraciones subletales y pueden dar una primera información sobre los futuros efectos adversos producidos por los tóxicos (Graney y Giesy, 1986). Los cambios bioquímicos suceden antes de que las reducciones en el crecimiento y la reproducción sean visibles. Recientemente, se ha dado una gran importancia al desarrollo y uso de los procesos fisiológicos y energéticos (comportamiento filtrador, reproducción, crecimiento y cambios en parámetros energéticos). Estos parámetros son indicadores sensibles en situaciones de estrés tóxico en organismos no diana (Drobne y Hopkin, 1994; Cerón y cols., 1996; Sancho y cols., 1998; Orchard y cols., 2002; Rose y cols., 2002; Khangarot y Rathore, 2003; Tripathi y Singh, 2003).

1.3. BIOLOGÍA DEL CRUSTÁCEO *Daphnia magna*.

Daphnia magna Strauss es una especie que pertenece al Suborden Cladocera, Orden Diplostraca, Familia Daphnidae, Subclase Brachiopoda, Clase Crustacea. Su distribución geográfica es la región Holártica y Etiópica, falta en América del Sur y es muy frecuente en la mitad oriental de la Península Ibérica.

Se encuentran en localidades situadas a baja y media altura sobre el nivel del mar, generalmente sometidas a régimen climático árido. Toleran un amplio rango de condiciones ambientales, prefiriendo aguas de pequeño volumen (charcas, zanjas inundadas,...etc.) de escasa turbidez y expuestas a radiación solar, aunque también pueden habitar en la zona litoral o formar parte del zooplancton de embalses pequeños y mineralizados. En ambientes ricos en vegetación se concentran en las aguas libres formando enjambres (Alonso, 1996).

Daphnia magna es un pequeño crustáceo cuya longitud máxima es de 6 mm (sin contar la espina caudal), su coloración es variable ya que el déficit de oxígeno disuelto y la salinidad, de forma conjunta o aislada, provocan una coloración anaranjada o parda (Alonso, 1996). Están comprimidas lateralmente y su cuerpo está, al menos parcialmente, encerrado dentro de un caparazón bivalvo (Ruppert y Barnes, 1996). El caparazón encierra al tronco, pero no a la cabeza, y suele terminar posteriormente en una espina apical. La cabeza tiene un saliente ventral, algo dirigido hacia atrás. El número de apéndices troncales está reducido a cinco pares, los pereiópodos 2,3,4,5, provocan unas corrientes de agua, pero la filtración la realizan solamente los pereiópodos 3 y 4, el poso es retirado por los apéndices 1 y 2 con ayuda de la corriente de agua que escapa entre dichos apéndices por la diferencia de ritmo que lleva el primero. La bolsa de alimento es compactada por una secreción labral y es recogida por las piezas bucales que la introducen en la cavidad prebucal (Nieto y Mier, 1985).

La punta del tronco, normalmente llamada postabdomen, está girada ventralmente hacia delante y lleva una especie de garras y espinas para limpiar el caparazón.

Nadan por medio de segundas antenas poderosas, el movimiento es en gran parte vertical y normalmente a trompicones, el batido hacia abajo de la antena lanza al individuo hacia arriba, luego se va hundiendo lentamente, utilizando las antenas a modo de paracaídas.

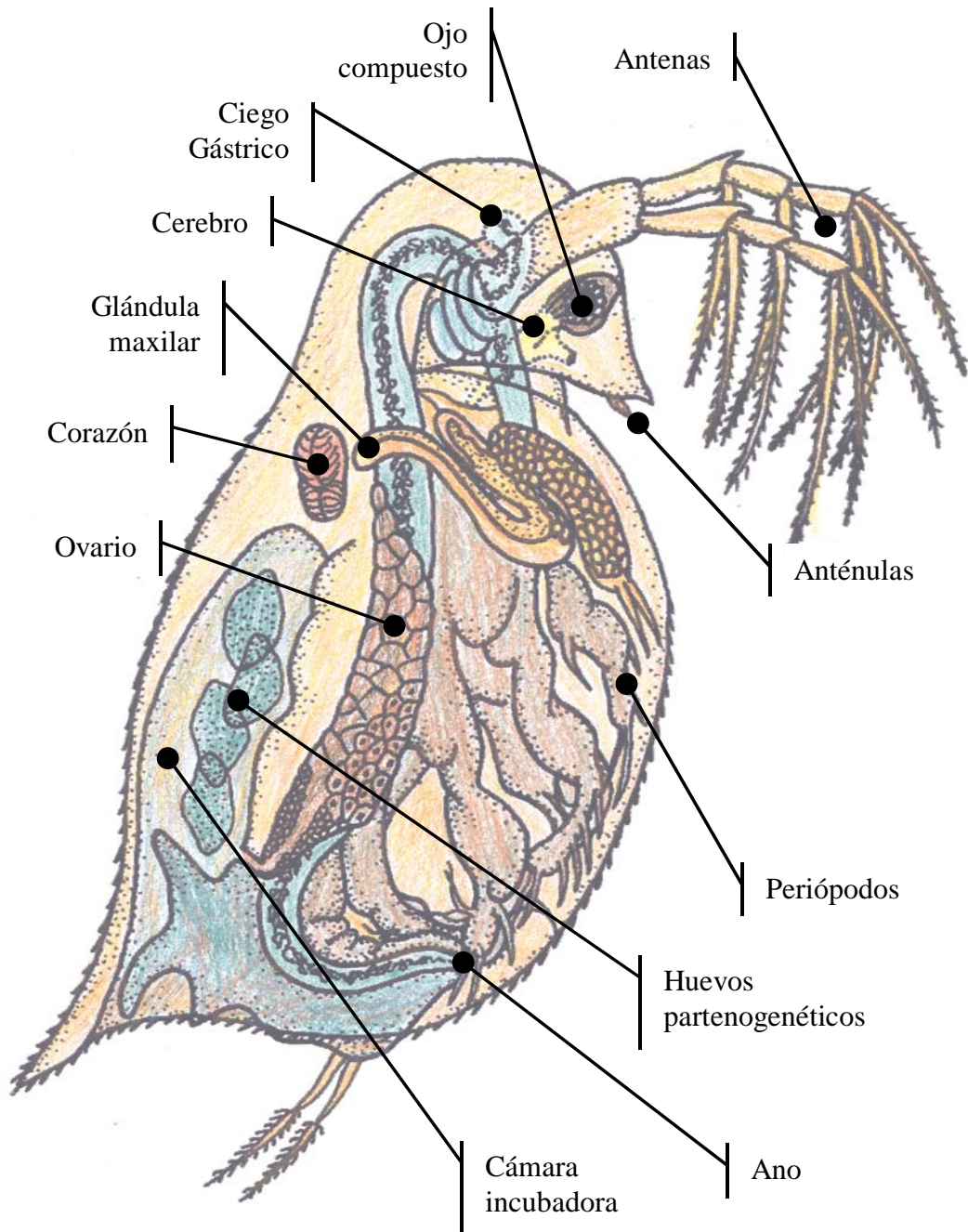


Figura 1. Anatomía de *Daphnia magna*.

Los ojos son compuestos y sésiles, constan de 4 células retinianas por ocelo, poseyendo 22 ommatidios entre los dos ojos, los cuales están fusionados en un único ojo medio; este ojo puede rotar por medio de músculos especiales. El ojo compuesto, en la mayoría de los cladóceros, funciona orientando al animal mientras nada (Ruppert y Barnes, 1996).

La alimentación es suspensívora, filtrando las microalgas presentes en el agua. Producen una corriente de agua del lado anterior al posterior y las partículas alimenticias son recolectadas y transferidas al surco alimentario por medio de sedas especiales situadas en la parte basal de los apéndices.

Los órganos excretores son glándulas antenales. Se sabe que *Daphnia* depende más de la absorción activa para mantener su equilibrio osmótico que de su dieta. Se ponen 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 cutícula de los sacos branquiales y a nivel de la base de los apéndices torácicos se produce la absorción del cloruro (Peters, 1987). Los productos nitrogenados se excretan en forma de amoníaco a través de las glándulas antenales (Peters, 1987; Thorp y Covich, 1991).

Los dáfnidos son hembras partenogenéticas; producen huevos diploides los cuales eclosionan dando hembras partenogenéticas durante muchas generaciones. El desarrollo es directo y cuando los juveniles abandonan la cámara de incubación, situada bajo el caparazón, el exoesqueleto se desprende, se produce la muda y una nueva puesta es expulsada dentro de la cámara incubadora. Ciertos factores como la temperatura del agua o un descenso en la disponibilidad de alimento (generalmente debida a un aumento de la población), inducen la aparición de machos y así se producen huevos fecundados. Las paredes de la cámara incubadora, ahora, se transforman en una cápsula protectora en forma de estribo llamada ehipium o efípia. Este ciclo biológico se representa en la Figura 2.

Estas efípias flotan, se hunden hasta el fondo o se adhieren a objetos y pueden soportar la desecación y la congelación e incluso resistir el paso por el tubo digestivo de peces, aves y mamíferos. Por medio del viento o de animales, estos huevos pueden ser dispersados a través de grandes distancias así pueden pasar el invierno y sobrevivir a las sequías estivales. Cuando reaparecen las condiciones favorables, las efípias eclosionan dando lugar a hembras partenogenéticas que inician de nuevo el ciclo asexual (Ruppert y Barnes, 1996).

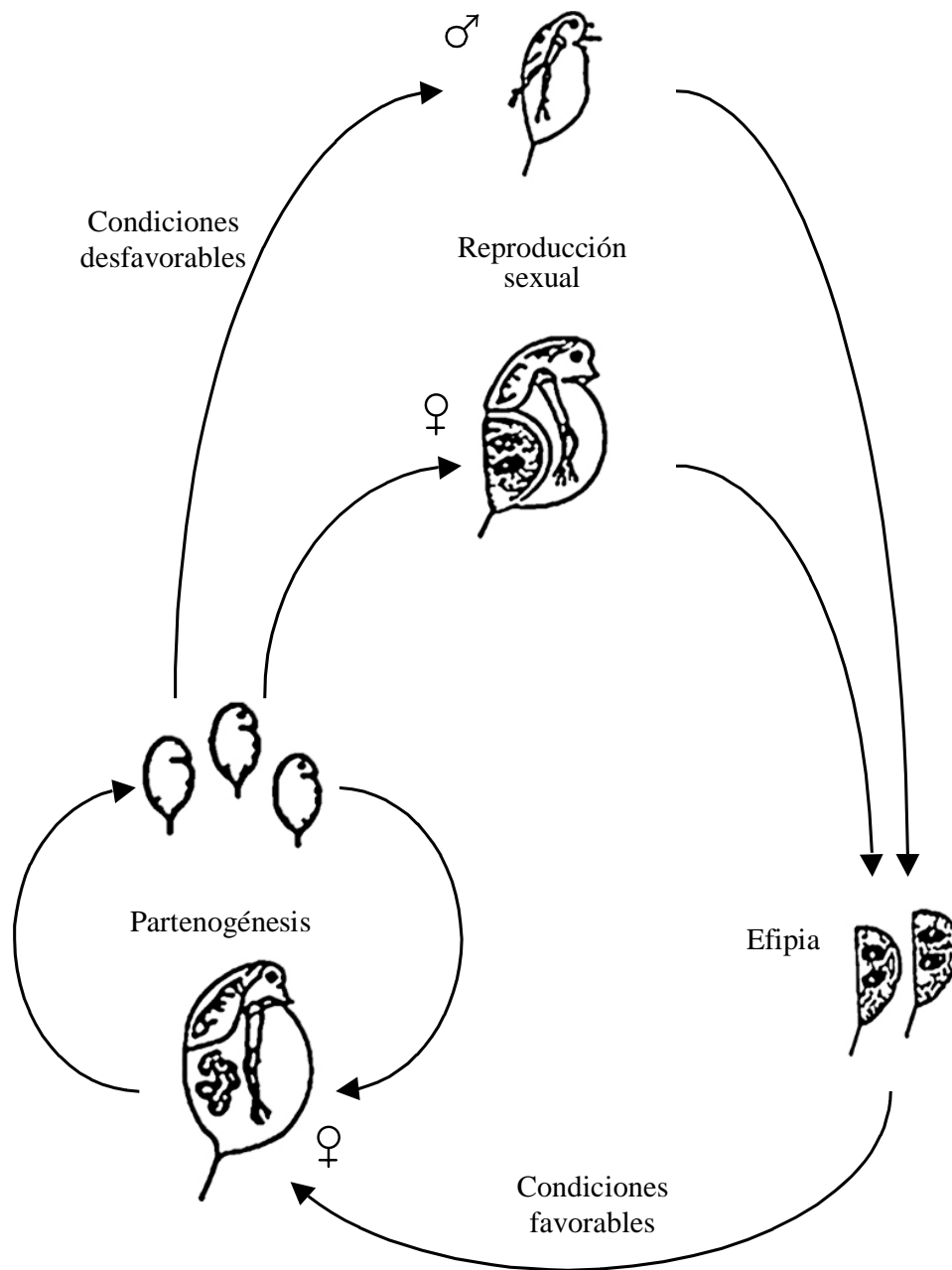


Figura 2. Ciclo biológico de *D. magna*.

1.4. IMPORTANCIA DE *Daphnia magna* EN ECOTOXICOLOGÍA.

Daphnia magna ha sido utilizada desde hace tiempo como una especie standard en ensayos de ecotoxicidad por organizaciones como la CE, OECD e ISO. El hecho de que *Daphnia* sea utilizada como organismo standard se debe a los siguientes factores (Mark y Solbé, 1998):

- Su reproducción es partenogenética, con lo que se pueden obtener muchas generaciones que son clónicas entre sí, evitando así las diferencias genéticas. Esto hace que se dé una respuesta uniforme frente a las condiciones ambientales. Además, su corto ciclo de vida permite la realización de ensayos de toxicidad crónicos en un espacio breve de tiempo.
- Es fácilmente cultivable en condiciones de laboratorio, ya que requiere poco espacio, siendo su mantenimiento más económico que el de otros animales como los peces, los moluscos o macrocrustáceos.
- Representan a la comunidad de zooplancton siendo un elemento importante en las cadenas alimenticias de las aguas dulces. Dentro de zooplancton el crustáceo *Daphnia magna* constituye una pieza clave en los estudios de toxicología acuática moderna, ya que es uno de los principales consumidores de los productores primarios y lo más importante, es el alimento de invertebrados y vertebrados predadores (Hebert, 1978; Larsson y Dodson, 1993).
- Es una especie cosmopolita, por lo que la relevancia de los ensayos está reconocida. Existe gran información sobre su biología y ecología en múltiples estudios (Hutchinson, 1967; Gulati, 1978; Leonhard y Lawrence, 1981).
- Presenta una sensibilidad alta frente a los contaminantes al compararla con otras especies de invertebrados del medio dulceacuícola (Baudo, 1987). Abe y cols., (2001) concluyeron que los dáfidos son el mejor indicador para determinar el peligro potencial en los ambientes acuáticos continentales.

Por todo esto, muchos autores la recomiendan como especie bioindicadora, siendo utilizada para evaluar los riesgos ambientales producidos por vertidos industriales y urbanos, plaguicidas, metales pesados, miméticos de hormonas sexuales,...etc.

1.5. PROBLEMÁTICA DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y LOS HERBICIDAS.

Los plaguicidas organoclorados son compuestos orgánicos de estructura diversa en la que se sustituye uno o varios átomos de hidrogeno por átomos de cloro.

Estos plaguicidas organoclorados se caracterizan por su gran estabilidad y persistencia en el medio ambiente. Son compuestos lipófilos que presentan baja solubilidad en agua, con lo que tienden a acumularse en los tejidos animales que contienen mayor cantidad de lípidos. Además, se unen a detritus y materia orgánica presente en el agua.

La tasa de bioacumulación en los ambientes acuáticos es, generalmente, mucho más alta que en los terrestres. En este proceso tiene un papel fundamental dicha lipofilia, que los hace difíciles de metabolizar y excretar, acumulándose. En los ambientes acuáticos los compuestos con baja solubilidad en el agua y gran liposolubilidad se unen a la materia que contiene lípidos orgánicos. Por tanto, las aguas proporcionan un excelente medio para transportar estos plaguicidas, el fitoplancton y el zooplancton concentran los plaguicidas del agua. La diferencia en la tasa de bioacumulación entre el ambiente acuático y el terrestre se debe a que en el ambiente acuático la incorporación de tóxicos se produce por dos vías: la primera es la incorporación directa desde el medio y la segunda la incorporación mediante las cadenas tróficas (Matsumura, 1985).

Todo esto produce fenómenos de biomagnificación (aumento de la concentración de plaguicida en los animales dependiendo de su posición en la cadena trófica). Las tres rutas más importantes en el transporte de plaguicidas dentro de los sistemas biológicos se representan en la Figura 3.

Como se observa en esta figura, desde el aire los plaguicidas pasan al suelo manteniendo con él un flujo. El suelo nutre de plaguicidas a los ambientes acuáticos siendo éstos los que finalmente mayor concentración presentan. En el ambiente acuático los peces y otros animales acuáticos reciben los restos de plaguicidas desde el medio físico o a través de plantas y fitoplancton que son ingeridos por los invertebrados del zooplancton. Las relaciones predador/presa hacen que finalmente los consumidores terciarios sean los que mayor cantidad de plaguicidas reciben; las aves ictiófagas, los grandes peces e incluso el hombre reciben gran concentración de estas sustancias tóxicas presentes en los tejidos de esos animales.

Esta concentración biológica importante hace que, en zonas muy contaminadas, algunas especies de aves se vean seriamente afectadas por los plaguicidas que almacenan en el organismo a lo largo de su vida y que pueden dañar algunos órganos o interferir en los mecanismos bioquímicos. Por ejemplo, en algunas especies de aves que acumulan altas concentraciones de DDT se producen interferencias en el mecanismo de formación de la cascara del huevo que se rompe fácilmente durante el periodo de incubación (Matsumura, 1985).

Los pájaros de algunas regiones mueren en ocasiones por alimentarse de insectos o granos contaminados por plaguicidas. Las aves son especialmente sensibles a algunos plaguicidas organoclorados y el gran número de insectos que pueden devorar diariamente aumenta el riesgo de intoxicación (Primo Yúfera y Carrasco, 1986).

Por otro lado, los insectos parásitos desarrollan resistencias frente a los plaguicidas, dando lugar a razas resistentes. Los casos más conocidos son la resistencia de la mosca doméstica y el escarabajo de la patata al DDT. En un primer momento el DDT demostró ser un insecticida muy activo, pero al poco tiempo se encontró que eran necesarias dosis mayores para conseguir el mismo efecto.

En muchos casos, además, ocurren resistencias cruzadas; los insectos resistentes a un plaguicida pueden igualmente ser resistentes a otros plaguicidas cuya estructura química o modo de acción sean similares (Ware, 1983).

Es bien conocido que la eliminación de una especie o una reducción importante del número de individuos de la misma, puede desencadenar explosiones demográficas de otra especie o de sus competidores, ya que se pueden eliminar a los enemigos naturales de estas plagas o desaparece el competidor biológico, que los mantenían controlados pudiendo así aumentar la población.

Se ha comentado ya que la reducción del zooplancton filtrador en los ambientes acuáticos, produce eutrofización por el aumento de las poblaciones de fitoplancton, deteriorándose así el medio.

Todo esto ha hecho que, en la actualidad, se utilicen otro tipo de plaguicidas más específicos y con mayor selectividad sobre las plagas a las que son destinados.

Igualmente, se intenta que sean fácilmente degradables y no se bioacumulen en los organismos, aun así muchos de estos compuestos se siguen utilizando.

Los herbicidas son productos químicos que interrumpen la fisiología de la planta durante un periodo de tiempo para matarla o reducir severamente su crecimiento. Desde su implantación en los sistemas de cultivo moderno han llegado a convertirse en la principal herramienta para el control de malas hierbas.

Uno de los problemas de los herbicidas es que, a pesar de ser compuestos indicados para el control de especies vegetales, presentan cierto grado de toxicidad sobre animales e incluso el hombre. La toxicidad de los herbicidas es frecuentemente infravalorada ya que al ser considerablemente menos tóxicos que otros productos, se tiende a considerarlos como inocuos. Sin embargo, la dosis letal media de los herbicidas en su conjunto es muy similar a la de los insecticidas y fungicidas (Ware, 2000).

Otro aspecto importante del uso de herbicidas es su persistencia en el medio ambiente. En algunos casos, un herbicida puede permanecer en el suelo varios ciclos de cultivo, limitando las posibilidades de rotación y pudiendo ocasionar daños de fitotoxicidad en los siguientes cultivos. Por lo tanto, los herbicidas pueden suponer un riesgo para plantas que fueron sembradas después de la aplicación y cuya producción puede ser dirigida a la alimentación animal o incluso al consumo humano (WSSA, 1994). Por ello es importante conocer su persistencia en los suelos de los arrozales cuyas aguas son devueltas a lagos y ríos haciendo que estos tóxicos entren en contacto con las comunidades acuáticas.

La aparición de resistencias también es un inconveniente de los herbicidas; aunque los cambios poblacionales en las especies vegetales son más lentos, la aparición de resistencias es ya un hecho que dificulta considerablemente el manejo de estos compuestos (Ware, 2000).

A pesar de todo ello, es poco conocido el efecto que los herbicidas pueden producir en la comunidades acuáticas. La incidencia de estos compuestos en los productores primarios, como las algas, de la comunidades acuáticas, puede traducirse en alteraciones dentro de las cadenas tróficas (Ma J., 2002).

Los efectos ecológicos producidos por la supresión del zooplancton por acción de los tóxicos puede darse por dos vías, un efecto directo sobre el organismos y una reducción en la cantidad de alimento (Jak y cols., 1998).

La muerte o reducción del fitoplancton produce a su vez una reducción en la producción de oxígeno y en la eliminación de los compuestos nitrogenados; todo esto reduce las poblaciones de zooplancton que en muchas ocasiones son el alimento de otras especies, con lo que finalmente se puede dar la desaparición de especies piscícolas de interés humano (Perschbacher y cols., 1997).

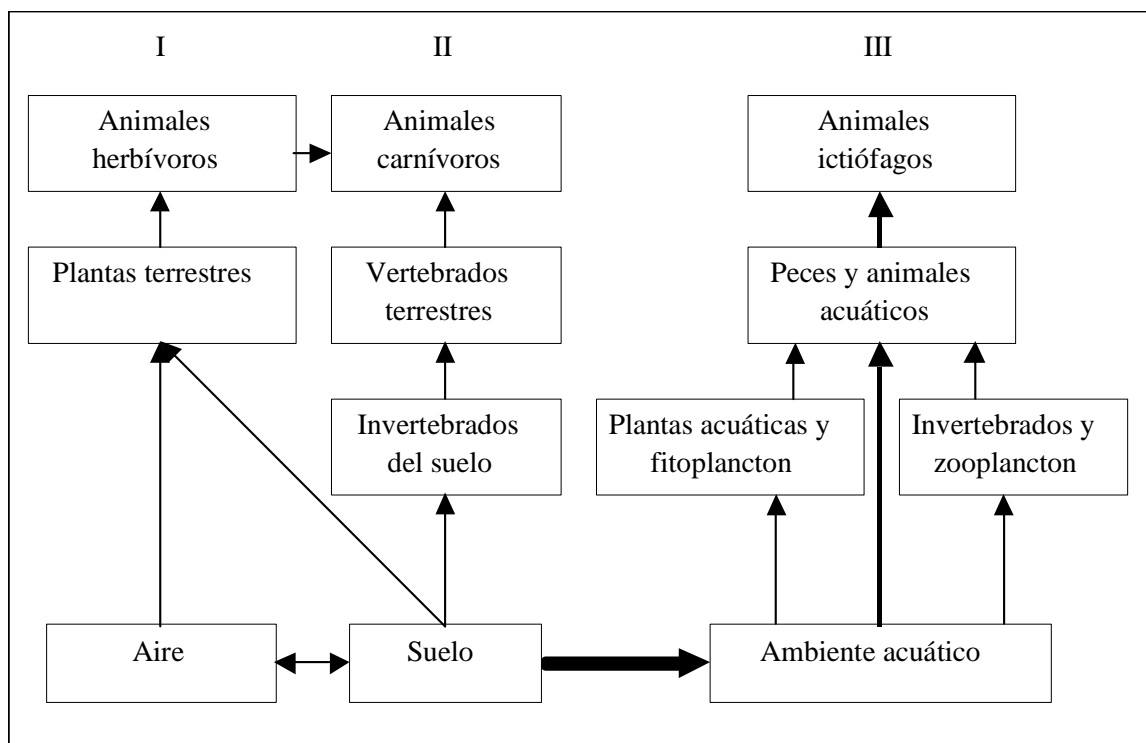


Figura 3. Principales vías de incorporación de plaguicidas.

2. 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 (Tetradifón y Propanil), a través de ensayos de toxicidad aguda.

2. Evaluar el efecto, a largo plazo, producido por los plaguicidas Tetradifón y Propanil en la supervivencia, crecimiento y reproducción de *D. magna*, mediante ensayos crónicos de 21 días de duración.

3. Estudiar el efecto producido por estos plaguicidas en el comportamiento filtrador de *D. magna* utilizando para ello, como índices, las tasas de filtración e ingestión de alimento.

4. Determinar las alteraciones fisiológicas producidas en *D. magna* como consecuencia del efecto de ambos plaguicidas en el metabolismo energético.

5. Valorar la influencia que el tiempo de exposición a los plaguicidas tiene sobre *D. magna* con el fin de evaluar no sólo el impacto del plaguicida en la fisiología del crustáceo, sino también el tiempo que ello tarda en producirse.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES (*Daphnia magna*).

Los organismos que se utilizaron para realizar los ensayos de toxicidad pertenecen a la especie *Daphnia magna* (Straus) y se han obtenido a partir de un cultivo continuo (Figura 4) de esta especie que existe en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universitat de València, mantenido según las normas de la OECD (2000).

Se utilizaron para ello acuarios de 5 litros de capacidad que contenían 3 litros de agua cada uno, con una densidad poblacional aproximada de 50 individuos/l. El agua utilizada fue tomada de la red de suministro general, declorada y aireada, al menos, al 90% de saturación. Sus características físico-químicas fueron las siguientes: pH: 7.9 ± 0.2 , dureza total: 181.8 ± 18.8 mg/l de CaCO_3 ; alcalinidad: 4.1 mmol/l (la determinación de la dureza total y la alcalinidad se realizaron con los kits comerciales correspondientes de la casa Merck).

También se determinó la cantidad de cloro libre presente en el agua, ya que el cloro es tóxico para los dáfnidos y su presencia puede hacer variar los resultados. Teniendo en cuenta las recomendaciones de la OECD en ningún caso el agua utilizada presentó valores superiores a 2 mg/l de carbono orgánico, 1 $\mu\text{g/l}$ de ion amonio o 10 $\mu\text{g/l}$ de cloro residual. Siempre se controlaron las condiciones del cultivo comprobando que no se dieran en los acuarios signos de estrés como son: alta mortalidad, presencia de efípias y machos, baja producción de neonatos y decoloración en los animales.

La temperatura fue de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y el fotoperiodo de 12:12 horas, luz:oscuridad. La temperatura y el fotoperiodo se mantuvieron gracias a una cámara aclimatada que dispone de un temporizador. Es importante que todos estos parámetros estén bien controlados ya que el crecimiento, la maduración sexual y la reproducción son el resultado de la integración de los parámetros nutricionales, físicos y químicos del medio (Buikema y cols., 1980).

El cultivo se renovó dos veces por semana, separándose mediante filtros de diferentes diámetros de poro, los adultos de los neonatos; sólo los adultos se mantuvieron en el cultivo. Los dáfnidos fueron alimentados *ad libitum* con el alga verde unicelular *Nannochloris oculata*. De forma periódica se eliminaron las hembras adultas que iban envejeciendo sustituyéndolas por neonatos procedentes de la tercera camada o superiores, ya que utilizar neonatos de camadas anteriores podría reducir la viabilidad del cultivo, evitando así que la colonia envejezca y conservándola en condiciones adecuadas para su uso.

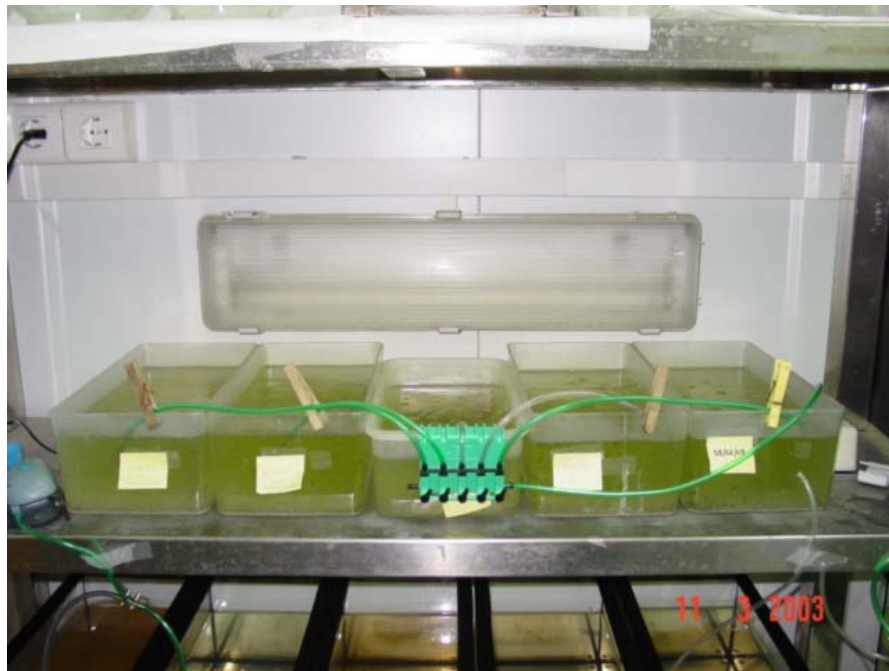


Figura 4. Cultivo de *D. magna* mantenido en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universitat de València.

3.2. CULTIVO DEL ALGA *Nannochloris oculata*.

Nannochloris oculata es un alga clorofícea cuyo tamaño celular oscila entre 1.5-2.0 μm (Yúfera y cols., 1983) lo que permite que pueda ser filtrada e ingerida por *Daphnia magna*.

El género *Nannochloris* posee un único cloroplasto ocupando gran parte de la célula, que tiene una forma más o menos esférica, es inmóvil, desprovista de flagelos y con crecimiento vegetativo por bipartición.

Las características del crecimiento de *Nannochloris sp.* son (Lubian, 1979):

1.-Ausencia de una fase de latencia apreciable, mientras el inóculo utilizado sea lo suficientemente grande y provenga de un cultivo crecido en las mismas condiciones.

2.-Una fase de aceleración con la que comienza habitualmente el crecimiento y que discurre dentro de las primeras 24 horas.

3.- Una fase exponencial, cuya duración oscila entre 3 y 6 días.

4.- Una fase que se prolonga varios días, durante los cuales la población sigue aumentando cada vez más lentamente.

5.-La fase estacionaria.

El medio de cultivo está compuesto por 100 ml de BBM (Bischoff y Bold, 1983), 2 ml de vitaminas y 2 ml de metales esenciales todo por litro de agua (O'Kelly, 1974) que previamente ha sido destilada y filtrada. La composición de las soluciones de BBM, vitaminas y metales aparecen en la Tabla 1.

Este cultivo fue obtenido puro del "Institute of Freshwater Ecology. The Windermere Laboratory", transportado en placa hermética y conservado a 4°C. Obteniendo el inóculo de la placa y trabajando en condiciones estériles se resembró en un medio compuesto por 200 ml de BBM, 4 ml de vitaminas y 4 ml de metales por litro de agua.

Las vitaminas esenciales utilizadas son: vitamina B₁₂, tiamina y biotina. Se añaden al medio, ya que las algas son auxotróficas e incapaces de sintetizar estas vitaminas.

El cultivo se mantuvo en agitación mediante una columna de aire que evita la sedimentación celular. Así mismo se mantuvo una temperatura constante de $22\pm 1^\circ\text{C}$, la energía luminosa la proporcionaron tubos fluorescentes (Figura 5).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para *N. oculata*.

Medio BBM	Na NO ₃ CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl	2500 mg/l 250 mg/l 750 mg/ 750 mg/l 1750 mg/l 250 mg/l
Metales traza	NaFe-EDTA MnCl ₂ ·4H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O NaMoO ₄ ·2H ₂ O	5 g/l 180 mg/l 10 mg/l 22 mg/l 10 mg/l 6.4 mg/l
Vitaminas	Tiamina Biotina B ₁₂	200 mg/l 10 mg/l 10 mg/l

La colonia se renovó semanalmente mediante resiembras en medio fresco almacenado en recipientes de vidrio de 3 litros de capacidad, manteniendo a la población siempre en fase exponencial de crecimiento.

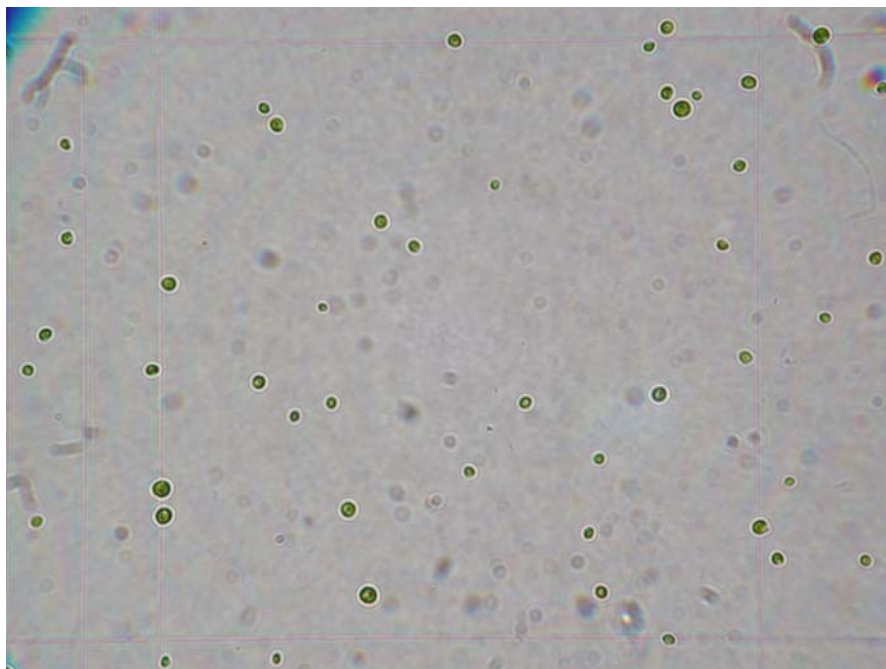


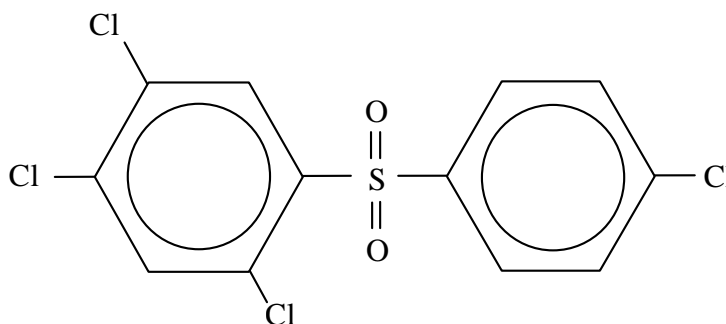
Figura 5. Cultivo de *Nannochloris oculata* mantenido en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universitat de València.

3.3. PLAGUICIDAS OBJETO DE ESTUDIO.

Los plaguicidas objeto de estudio fueron el acaricida Tetradifón y el herbicida Propanil.

El Tetradifón utilizado fue el producto técnico, con una pureza del 97%, suministrado por la empresa SIPCAM INAGRA. El nombre químico es 4 - clorofenil 2, 4, 5 - triclorofenil sulfona ó 2, 4, 4', 5 - tetraclorodifenil sulfona.

Su fórmula estructural es la siguiente:



Se trata de un plaguicida organoclorado, cuyo producto técnico es un sólido cristalino de color amarillento. Se encuentra dentro del grupo de los acaricidas, siendo un plaguicida no sistémico, tóxico para los huevos y para las primeras fases larvarias de los ácaros fitófagos; además da lugar a la esterilidad de los huevos procedentes de ácaros tratados.

Aunque existen algunos insecticidas con actividad acaricida, para la lucha contra los ácaros se han desarrollado productos específicos ya que la aplicación de algunos insecticidas ha producido eclosiones de estos individuos, al destruir sus predadores, habiéndose hecho imprescindible el desarrollo de productos específicos (Primo Yúfera y Carrasco, 1986). Este plaguicida está recomendado para los cítricos, el café, los frutales, la vid y plantas ornamentales, entre otros.

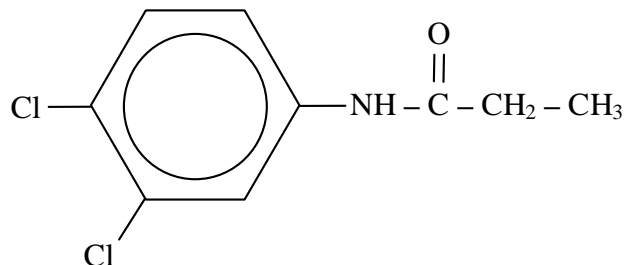
Su solubilidad en agua es de 0.050 mg/l a 20°C y en disolventes, como la acetona, de 82 g/l. El Tetradifón es resistente a las hidrólisis ácidas y alcalinas (Worthing, 1987), pero se degrada muy rápidamente bajo condiciones aeróbicas (Willems y Nimmo, 1981). La toxicidad oral aguda o DL₅₀ para la rata es > 14.700 mg/kg, la toxicidad aguda percutánea para conejos es >10.000 mg/kg.

Las CL_{50} para diferentes organismos acuáticos son: 0.11 mg/l para el crustáceo *Gammarus fasciatus*, 1.2 mg/l para la trucha *Salmo gairdneri* y 0.88 mg/l para el pez *Lepomis macrochirus* (Johnson y Finley, 1980).

Es poco peligroso para las aves aunque si es relativamente peligroso para algunos insectos como las abejas melíferas (Harding, 1979). Este compuesto actúa sobre el sistema nervioso central del animal produciendo un aumento de la excitabilidad de la membrana celular. Al igual que el DDT y sus análogos, el Tetradifón actúa sobre el axón nervioso interfiriendo con el transporte de Na^+ y K^+ forzando la apertura del canal de Na^+ (Desaiah y cols., 1972), esto hace que se altere la permeabilidad de la membrana lipídica de las neuronas produciendo un desajuste en el balance Na^+ , K^+ a lo largo del axón, lo que impide la normal transmisión del impulso nervioso.

El herbicida Propanil utilizado fue el producto técnico con una pureza del 80%, suministrado por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). El nombre químico es 3,4-dicloropropioanilida.

Su formula química es la siguiente:



El Propanil de grado técnico es un sólido marrón con una solubilidad en agua de 225 mg/l y 540 mg/l en etanol, a 25°C. Es estable en emulsiones concentradas pero es hidrolizado en medio ácido o alcalino dando 3,4-dicloroanilina y ácido propiónico (Hayes y Laws, 1990; Meister, 1992). La vida media del herbicida Propanil en aguas continentales como las de un lago es de 60 días aproximadamente, en el agua de un río de 55 días, en agua marina 57 días, 40 días en aguas subterráneas y 44 días en agua destilada (Konstantinou y cols., 2001).

La disminución de la producción unida a la reducción en la calidad de las cosechas originadas por el desarrollo de malas hierbas, han hecho que se impusiera el

uso de los herbicidas como una de las operaciones más necesarias para conseguir cosechas estables de alto rendimiento (Primo Yúfera y Carrasco, 1986).

El Propanil es un herbicida selectivo de aplicación postemergente, se aplica tras la germinación del cultivo, que actúa por contacto al absorberse por las hojas, su utilización se basa en controlar especialmente malezas de gramíneas, hierbas de hoja ancha y cyperáceas que aparecen en los cultivos de arroz y patatas (Montgomery, 1993).

La DL₅₀ para ratas es de 1285-1483 mg/kg. El Propanil es moderadamente tóxico para las aves y puede ser moderadamente o muy tóxico para un rango amplio de organismos acuáticos, por ejemplo la CL₅₀ para la trucha *Salmo gairdneri* a las 96 horas es de 2.3 mg/l, 5.4 mg/l para el pez *Lepomis macrochirus* y 16 mg/l para el crustáceo *Gammarus fasciatus* (Johnson y Finley, 1980).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la fotosíntesis. El Propanil actúa bloqueando la cadena de transporte electrónico en la membrana tilacoidal de los cloroplastos, básicamente se bloquea el flujo electrónico entre las plastoquinonas Q_A y Q_B, esto produce la inhibición de la reacción de Hill en el fotosistema II, por lo que no ocurre la fotólisis del agua ni la liberación de O₂. La acción fitotóxica se debe principalmente al estrés oxidativo provocado por la interrupción del flujo de electrones en la fotosíntesis (Huppertz, 1996).

En animales, la exposición al herbicida Propanil puede producir metahemoglobina, hipoxia tisular y depresión del sistema nervioso central (Eddleston y cols., 2002). Otro efecto importante es la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas como proteinasa, amilasas y dipeptidasas (Ware, 1983), también se observan alteraciones en rutas metabólicas por la inhibición de los enzimas implicados en dichas rutas (Li y cols., 2003).

La elección de estos plaguicidas como contaminantes objeto de estudio se fundamenta en su frecuente uso en los cultivos de la Comunidad Valenciana, especialmente en arroz, cítricos y otros frutales. Además, el uso frecuente de plaguicidas en la práctica agrícola y su posible acceso al medio acuático, puede poner en peligro poblaciones de organismos a los que en principio no iba dirigida su aplicación, como es el caso de los crustáceos cladóceros, alterando de este modo las comunidades biológicas (Wong, 1997). Por tanto, la presencia de plaguicidas en los medios acuáticos puede afectar a la productividad del plancton, a las poblaciones del zooplancton y finalmente a la calidad de las aguas (Perschbacher y cols., 1997).

3.4. TOXICIDAD AGUDA DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN *D. magna*.

El estudio de la toxicidad aguda del plaguicida Tetradifón en *D. magna* fue llevado a cabo por Ferrando y cols. (1996a) que utilizaron las siguientes concentraciones del acaricida: 1, 3, 5, 7, 10 mg/l y calcularon la CE₅₀ a las 24 y 48 horas de exposición (ver capítulo de resultados).

En el presente trabajo, se determinó la CE₅₀ (Concentración Efectiva 50) del herbicida Propanil en el crustáceo *D. magna* siguiendo la normativa de la OECD (2000). Esta concentración se define como aquella que produce la inmovilidad del 50% de la población objeto de estudio.

Para determinar esta concentración se realizaron unos ensayos preliminares a fin de determinar el rango de concentraciones entre las que se encuentra la CE₅₀, para ello se eligió un intervalo entre la concentración más alta de herbicida que no produjo inmovilidad y la concentración más baja que causó el 100% de inmovilidad en el ensayo preliminar, los ensayos definitivos en los que se obtuvo el valor de la CE₅₀ se realizaron para dos tiempos de exposición diferentes 24 y 48 horas.

En estos estudios se utilizaron neonatos de <24 horas de vida los cuales deben pertenecer a la misma camada. Los ensayos se realizaron en botecitos de cristal de 30 ml de capacidad, disponiéndose 10 dafnidos por bote y 25 ml de medio cada uno, para cada una de las concentraciones de herbicida ensayadas y para cada replica, también se ensayó un grupo control en que la mortalidad (inmovilidad) no debió exceder del 10%. Las diferentes concentraciones de herbicida utilizadas se prepararon a partir de un stock, y las diluciones fueron preparadas inmediatamente ante de realizar el ensayo (OECD, 2000).

Las concentraciones de Propanil utilizadas fueron diferentes para las 24 y 48 horas de exposición. Las concentraciones elegidas para las 24 horas fueron: 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/l de Propanil, y para las 48 horas se ensayaron las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 mg/l de Propanil.

Tras introducir los animales en los frascos, se añadió alcohol cetílico al medio (en forma de lentejas), se sabe que rompe la tensión superficial del agua e impide que los neonatos queden retenidos facilitando que se sumerjan completamente en el medio.

El hecho de que los animales queden retenidos por la tensión superficial puede interferir en los resultados, incluso causar la muerte de los individuos. Se ha comprobado que el alcohol cetílico es inocuo para *D. magna* (Cotou, 1993).

Tanto a las 24 como a las 48 horas se registró la movilidad de las dafnias en cada una de las concentraciones ensayadas. Se consideró como criterio la inmovilidad de los dáfnidos tratados tras ser observados durante 15 segundos (OECD, 2000). Con estos datos se realizaron los diferentes cálculos utilizando el método del “moving average” con un programa informático adaptado a PC (Stephan, 1977).

3.5. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN *D. magna*.

3.5.1. Cálculo de la concentración óptima de alga.

Para determinar la concentración óptima de alga (*Nannochloris oculata*) que se debía utilizar en el estudio crónico, se realizó un estudio preliminar utilizando dos concentraciones de alga que debían servir como alimento a *D. magna*, asegurándonos así de que la concentración de alga presente en el medio era la más adecuada para llevar a cabo el ensayo. Esto es importante ya que si existe un exceso de alga en el medio, esta puede adherirse a los apéndices filtradores de los dáfidos impidiéndoles la correcta filtración e ingestión del alimento, por otra parte si el alimento es escaso, el déficit nutricional debilita a los dáfidos.

Las concentraciones seleccionadas para determinar esta concentración óptima de alga fueron 5×10^5 y 5×10^6 cél/ml, por ser las más recomendadas en la bibliografía (Allen y cols., 1995; Taylor y cols., 1998). Para ello, se centrifugó el alga a 3500 r.p.m. en una centrifuga KUBOTA con rotor de brazo libre, durante 10 minutos. Una vez centrifugada se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en agua el precipitado donde se encontraban las células de alga.

Tomando una pequeña cantidad de esta suspensión se realizó una dilución de este concentrado de algas a fin de reducir el número de células y hacer más sencillo su recuento con una cámara cuentaglobulos tipo Bürker. Realizado el recuento, se calculó la concentración de células presente en la suspensión y la cantidad de alga que se debía incorporar al medio para que la concentración en el mismo fuera la deseada.

Para cada concentración de alga se llevaron a cabo tres replicas del estudio en las que se utilizaron neonatos de *D. magna* (< 24h), estos neonatos procedieron del cultivo original que se mantiene en el laboratorio y fueron ubicados individualmente en frascos de vidrio de 60 ml de capacidad. Diariamente se renovó el medio de los dáfidos inoculando la concentración apropiada de alga y se tomó nota de los neonatos nacidos entre las 24 horas que transcurren de un cambio a otro. Después de 15 días, se determinó la tasa intrínseca de crecimiento natural (r), siendo un parámetro que expresa el crecimiento potencial de una población en un ambiente dado, para cada una de las concentraciones de alimento ensayadas.

La concentración de alimento óptima fue aquella que presentó una tasa intrínseca de crecimiento natural mayor. En nuestro caso esa concentración fue la de 5×10^5 cél/ml.

3.5.2. Toxicidad crónica en *D. magna*.

Basándose en los resultados de los ensayos de toxicidad aguda previamente realizados por Ferrando y cols. (1996) en los que como ya se comentó anteriormente se calculó la CE_{50} del acaricida Tetradifón, se eligieron 4 concentraciones subletales de Tetradifón: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l. Del mismo modo con los datos obtenidos del ensayo de toxicidad aguda del Propanil se eligieron también 4 concentraciones subletales que fueron: 0.07, 0.10, 0.21, y 0.55 mg/l.

En ambos casos, una vez pesado el tóxico en una balanza de precisión, se diluyó en acetona el acaricida Tetradifón y en agua el herbicida Propanil, ya que éste no requiere la utilización de disolventes orgánicos para su disolución; después, se preparó una solución stock para cada plaguicida de la que se tomó la cantidad necesaria para obtener las diferentes concentraciones a ensayar. El stock empleado fue de 10 mg por litro de agua, en ambos casos, realizándose las diluciones en matraces aforados de vidrio de 1 litro de capacidad. Además, se utilizó un control exento de plaguicida pero con acetona (22 μ l/l) en el caso del Tetradifón, y un control blanco (sólo agua). A los matraces aforados que contenían las diluciones definitivas se les incorporó la cantidad de alga necesaria para la alimentación de los animales, 5×10^5 cél/ml.

Cada experimento constó de cinco replicas formadas cada una de ellas por tres animales (por lo tanto 15 replicas), dispuestos en frascos individuales de 60 ml de capacidad, rellenándose sólo con 50 ml de la dilución deseada.

Cada individuo fue introducido en uno de los frascos mediante el uso de una pipeta Pasteur de plástico. Durante los primeros días del ensayo se añadió alcohol cetílico al medio (en forma de lentejas), que como se ha comentado rompe la tensión superficial del agua e impide que los neonatos queden retenidos facilitando que se sumerjan completamente en el medio.

Diariamente se renovó el medio permitiendo así mantener la concentración de plaguicida constante. Los animales fueron transferidos a este medio fresco y se contaron los descendientes y los dáfnidos que habían muerto. En todo momento se evitó perturbar a los animales en el proceso de transferencia de un medio a otro.

Para cada uno de los tratamientos (con ambos plaguicidas) se realizó un ensayo crónico de 21 días de duración, al igual que para el control y el control con disolvente en el caso del acaricida Tetradifón.

Durante los 21 días que duraron los ensayos de toxicidad se evaluaron parámetros individuales como: el crecimiento, la supervivencia y la reproducción. También se evaluó la tasa intrínseca de incremento natural (r), por ser un parámetro poblacional muy recomendado como parámetro demográfico en estudios toxicológicos. Van Leeuwen y cols. (1985) comprobaron que existía una correlación del 99% entre el valor obtenido por (r) a los 21 días de vida de *D. magna* y el valor correspondiente al mismo parámetro calculado para todo el ciclo de vida. Por ello, se aceptó que el test de 21 días era apropiado para calcular la tasa intrínseca de crecimiento natural para una población de *D. magna* (Daniels y Allan, 1981; Day y Kaushik, 1987b; Stark y Wennergren, 1995).

El crecimiento se evalúa realizando mediciones del caparazón (cm) del animal desde la parte anterior del rostro hasta la base de la espina caudal (Roche, 1998; Sosak-Swidarska y cols., 1998; Barry, 1999; Muysen y cols., 2002). Esta medición se llevó a cabo incorporando un micrómetro a una lupa binocular, midiéndose sólo aquellos individuos que sobrevivieron los 21 días que duró el ensayo.

La supervivencia de *D. magna* se correspondió con el número medio de días que el animal ha sobrevivido desde el inicio del ensayo, fue evaluada diariamente.

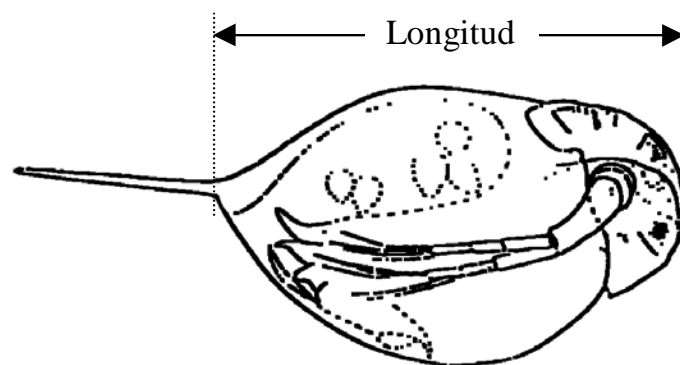


Figura 6. Medida de la longitud de *D. magna*.

Dentro de los parámetros reproductivos se estudiaron:

El tiempo a la primera puesta, o tiempo medio transcurrido desde el inicio del experimento hasta la primera reproducción de los animales.

Tamaño medio de la camada, número medio de neonatos que cada hembra pone en cada camada.

Número de neonatos por hembra, corresponde al número medio de neonatos totales nacidos por cada hembra, durante los 21 días de ensayo.

Número de camadas, es el número medio de camadas producidas por cada hembra durante el ensayo.

La tasa intrínseca de crecimiento natural (r), ha sido calculada utilizando la fórmula de Lotka (1913):

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

Donde x es el intervalo de tiempo observado; l_x es la probabilidad de sobrevivir a la edad x ; m_x el número de neonatos por hembra a la edad x , nacidos durante el intervalo ($x, x+1$); y r la tasa intrínseca de crecimiento natural calculada a los 21 días.

Basándose en los valores obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) se estimó el valor de la concentración máxima aceptable (MATC) como la media geométrica de la mayor concentración de plaguicida que no produjo efectos significativos en la r (NOEC) y la menor concentración de tóxico que produjo efectos significativos en el mismo parámetro (LOEC) (Buhl y cols., 1993; Staples y cols., 2000; Chen y Lin, 2001; Eason y O'Halloran 2002).

Por otra parte, se determinaron los valores de la CE_{50} para aquellos parámetros en los que fue posible; para ello se utilizó la ecuación de una recta de regresión $y=a+bx$, calculada sobre la base de los valores obtenidos para cada uno de los parámetros seleccionados, siendo "x" la concentración de tóxico ensayada e "y" la reducción del 50% del parámetro considerado.

Los parámetros individuales evaluados (reproducción, supervivencia y crecimiento), así como la tasa intrínseca de crecimiento natural (r), se determinaron para cada tratamiento.

3.6. EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL SOBRE EL COMPORTAMIENTO FILTRADOR DE *D. magna*.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo estos experimentos fueron las establecidas por Ferrando y cols. (1993), quienes realizaron una serie de ensayos preliminares con el fin de determinar las más adecuadas en cuanto a densidad de organismos, concentración de alimento (alga), tiempo de exposición al tóxico,...etc. Estos ensayos, al igual que los de toxicidad crónica, se realizaron para cada uno de los tratamientos seleccionados con ambos plaguicidas que fueron: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l para el acaricida Tetradifón y 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l para el herbicida Propanil. Se utilizaron neonatos de menos de 24 horas de vida que procedieron directamente del cultivo que se mantiene en el Laboratorio.

Los experimentos se realizaron en botecitos de vidrio de 60 ml de capacidad, conteniendo 25 ml de medio. Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas, colocando 10 dafnias en cada botecito, que fueron alimentadas con *N. oculata* en una concentración inicial de 5×10^5 células/ml, esta concentración fue determinada al inicio del experimento mediante la utilización de una cámara cuentaglóbulos. Los animales se mantuvieron en oscuridad durante un periodo de 5 horas y a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Transcurrido este periodo de tiempo se determinó la concentración final de alga en el medio, utilizando un microscopio y una cámara cuentaglóbulos. También se incluyó un control sin animales pero con alga, a fin de calcular un factor corrector que correspondería a los cambios que se producen en la concentración de alga a lo largo del tiempo que dura el estudio debido a su crecimiento natural.

Al ser el Propanil un herbicida se considero que durante el tiempo de duración del ensayo podía producirse un efecto considerable sobre el alga *N. oculata* que redujera su viabilidad y por tanto la concentración de alga presente en el medio, con lo que la reducción de esta concentración de alga no fuera debido solamente efecto de la filtración e ingestión por parte de los neonatos de *D. magna* sino también consecuencia del herbicida. Para comprobar si esta situación se producía en nuestros ensayos, se realizó una prueba utilizando el mismo procedimiento que en el ensayo pero sin animales; se preparó la concentración de herbicida más alta utilizada y se dispuso en frascos de 60 ml de capacidad conteniendo solamente 25 ml e incorporando la concentración de alga utilizada en los ensayos 5×10^5 células/ml. Se determinó la concentración del alga al inicio y transcurridas 5 horas.

No se produjeron alteraciones en la concentración de alga, con lo que la reducción de su concentración en los ensayos se debió sólo al filtrado de *D. magna*.

Los parámetros estudiados fueron:

La tasa de filtración (F): volumen de medio filtrado por un individuo y por unidad de tiempo ($\mu\text{l}/\text{ind}/\text{h}$).

La tasa de ingestión (I): número de células consumidas por un individuo por unidad de tiempo ($\text{cél}/\text{ind}/\text{h}$).

Para realizar estos cálculos se utilizaron las siguientes ecuaciones (Gauld, 1951):

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)}{t} - A$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C'_t}{t}$$

$$I = F \times \sqrt{C_0 \times C_t}$$

Donde C_0 y C_t corresponden a la concentración inicial de alga y la concentración de alga una vez transcurridas las cinco horas de ensayo. Las unidades son $\text{cél}/\mu\text{l}$.

“t” es el tiempo de duración del experimento (5 horas).

“n” corresponde al número de individuos y “V” es el volumen de líquido del medio en μl .

“A” es el factor de corrección que se refiere a los cambios que tienen lugar en la concentración inicial de alga C_0 después de transcurrido un tiempo t, en ausencia de animales; la concentración final de alga sería C'_t .

La tasa de ingestión se calcula multiplicando la tasa de filtración por la expresión ($\sqrt{C_0 \times C_t}$), que representa la media geométrica de la concentración de alga.

También se calculó la CE_{50} (concentración de plaguicida que reduce las tasa de filtración e ingestión en un 50%) utilizando las ecuaciones de regresión adecuadas, según se describió en el apartado de toxicidad crónica.

3.7. EFECTO DEL TETRADIFÓN Y PROPANIL EN LA FISIOLOGÍA (METABOLISMO ENERGÉTICO) DE *D. magna*.

El conocimiento de las variaciones en los parámetros bioquímicos es interesante para determinar la correlación entre los cambios bioquímicos y las alteraciones producidas en el crecimiento y reproducción. Es importante establecer una relación cuantitativa o cualitativa entre la presencia de un agente estresante y la respuesta observada; para ello, a fin de valorar los efectos que los plaguicidas tienen sobre el metabolismo de *D. magna*, se determinó el contenido de lípidos totales, proteínas y glucógeno a diferentes tiempos de exposición al plaguicida y para las mismas concentraciones seleccionadas en el estudio crónico que fueron: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l para el acaricida Tetradifón y 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l para el herbicida Propanil.

Se valoraron cada uno de los parámetros a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, a tiempos mayores se observa en los organismos control la aparición de huevos lo que puede interferir en la valoración de los parámetros seleccionados; además, el efecto del plaguicida es ya apreciable en los primeros tiempos de exposición no haciendo necesario aumentar el tiempo de experimentación.

En estos ensayos se realizaron 5 replicas compuestas cada una de ellas por 20 animales, dispuestos en botes de vidrio de 60 ml de capacidad y con 10 animales cada uno. Los animales procedieron del cultivo mantenido en el Laboratorio. Siempre fueron neonatos de <24 horas de vida los que se expusieron inicialmente a los plaguicidas durante los diferentes tiempos seleccionados.

Los dáfidos fueron alimentados con el alga *N. oculata*, incorporando 5×10^5 cél/ml diariamente al renovar el medio de cada uno de los botes. Las diferentes concentraciones de plaguicida se prepararon inmediatamente antes de la renovación del medio. Todas las concentraciones de un mismo tiempo fueron ensayadas a la vez incluyendo el control y el control con acetona, en el caso del plaguicida Tetradifón. Estos ensayos se montaron para cada tiempo de exposición, para cada parámetro valorado y para los dos plaguicidas objeto de estudio.

Transcurrido el tiempo de exposición, los animales fueron recogidos utilizando una pipeta Pasteur de PVC e introducidos en un Ependorf de 1.5 ml de capacidad, se retiró el exceso de agua por completo y se congelaron a -18°C hasta su posterior utilización para la valoración de los diferentes parámetros.

3.7.1. Determinación de los niveles de glucógeno.

Para el seguimiento de los niveles de glucógeno tisular se utilizó el método de Seifter y cols (1950) conocido también como método de la antrona.

Las diferentes muestras, formadas por 20 dáfidos, fueron homogeneizadas en un homogenizador de vidrio de 1 ml de capacidad, con 0.5 ml de KOH (60%) y 1 ml de KOH (30 %) sobre hielo picado, posteriormente fueron incubadas en un baño a 100°C durante 30 minutos.

Tras la digestión producida, las diferentes muestras se enfriaron con agua corriente durante varios minutos, rápidamente se adicionaron 2 ml de etanol (80%) a una temperatura de -20°C, se agitaron y se dejaron reposar durante 24 horas a -24°C para garantizar la precipitación del glucógeno.

Una vez transcurridas las 24 horas, las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante que contenía glucosa libre y se redisolvió el precipitado en un 1 ml de agua destilada. De esta disolución se tomaron 0.25 ml y se mezclaron con 1.75 ml de reactivo de antrona (antrona al 0.05% en ácido sulfúrico al 72%) disponiendo la mezcla en un baño a 100°C durante 15 minutos, durante los cuales el ácido hidroliza el glucógeno en moléculas de glucosa las cuales reaccionan con la antrona dando lugar a un color verde.

Tras enfriar las muestras bajo el grifo se determinó la cantidad de glucógeno midiendo la absorbancia de cada una frente a un blanco de agua destilada y reactivo de antrona a una longitud de onda de 620 nm.

Los datos de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de glucosa, donde x representa la cantidad de glucosa e y la absorbancia. El contenido en glucógeno se expreso en μg de glucógeno por individuo y también como ng de glucógeno por μg de peso seco.

La curva patrón de glucosa se determinó a partir de concentraciones crecientes de glucosa conocidas y, aplicando la metodología general anteriormente descrita, se determinaron las absorbancias de las diferentes muestras y se calculó la correspondiente recta de regresión.

3.7.2. Determinación de la concentración total de lípidos.

Para la extracción de los lípidos se utilizó el método de Bligh y Dyer (1959). Se homogeneizaron las muestras, que contienen 20 animales cada una, en un homogenizador de vidrio de 1 ml de capacidad, con 300 µl de una mezcla de cloroformo y metanol en una proporción de 1:2, sobre hielo picado. Se adicionaron 100 µl de cloroformo, se agitaron las muestras y se añadieron 100 µl de agua destilada, agitando de nuevo. Las proporciones entre la cantidad de mezcla cloroformo–metanol con el cloroformo incorporado después y con el agua destilada utilizada en el último paso debe ser de 3:1:1.

Tras dejar reposar las muestras el tiempo suficiente para que se formaran dos fases, manteniéndolas tapadas para evitar la evaporación, se succionó la fase inferior (donde queda el cloroformo reteniendo a los lípidos); la fase superior se eliminó ya que contiene el agua con el metanol. Esta fase inferior se diluyó con 100 µl de cloroformo tomándose 50 µl para valorar el contenido de lípidos utilizando el Kit 3321 de Merck basado en el método de Zöllner y Kirsch (1962).

Sin desproteinización previa, las alícuotas tomadas de las muestras fueron tratadas con ácido sulfúrico e incubadas en un baño a 100°C durante 10 minutos, tras enfriar las muestras se incorporó el reactivo vainilla produciéndose la reacción de sulfofosfovanilina, donde los lípidos dan una coloración rosácea cuya absorbancia es determinada a 530 nm frente a un standard compuesto por 50 µl de ácido sulfúrico y reactivo vainilla.

La determinación de lípidos totales se obtiene en mg/100ml mediante la fórmula:

$$\text{Lípidos Totales} = \frac{\text{Abs muestra} \times 1000}{\text{Abs standard}}$$

Una vez conocida la concentración de lípidos en mg/100 ml se realizaron los cálculos necesarios para expresar los resultados como µg de lípidos por individuo y ng de lípidos por µg de peso seco.

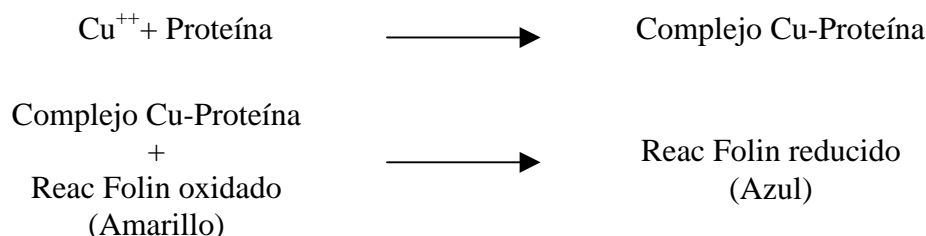
3.7.3. Determinación de los niveles de proteínas.

Para realizar la determinación de proteínas se utilizó el kit 5656 de la casa Sigma basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

Cada una de las muestras formadas por 20 dafnias fue homogeneizada en un homogenizador de vidrio de 1 ml de capacidad, con 200 μ l de tampón fosfato a pH 7.2. De este homogeneizado se tomaron alícuotas de 25 μ l y se mezclaron con 0.5 ml de agua destilada; a estas diluciones se les añadió 0.5 ml de reactivo de Lowry. Transcurridos 20 minutos se adicionaron 0.25 ml del reactivo de Folin, ambos reactivos están presentes en el Kit comercial. Transcurridos otros 30 minutos se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm. Los homogeneizados fueron mantenidos sobre hielo picado en todo momento, las reacciones posteriores tuvieron lugar a temperatura ambiente.

El fundamento del test es el siguiente:

Primero reacciona el cobre alcalino con la proteína, la adición de cobre hace que se formen enlaces coordinados con los cuatro nitrógenos de los enlaces peptídicos. Después se reduce el reactivo de folin por la proteína tratada con cobre, obteniendo un color azul.



Para determinar la concentración de proteínas presente en cada muestra se interpolaron los datos en una curva patrón de seroalbúmina bovina, la cual se obtiene por determinación de la absorbancia de distintas muestras cuya concentración de proteínas es conocida. Finalmente, se multiplicó el resultado por el factor de dilución y se obtuvo la concentración de proteínas presente en cada una de las muestras; esta concentración multiplicada por el volumen de muestra da la cantidad de proteínas por muestra. Estos valores son utilizados para realizar los cálculos que nos permiten expresar los resultados como μ g de proteínas por individuo y ng de proteínas por μ g de peso seco.

3.8. DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE *D. magna*.

Para la determinación de peso seco se realizaron 5 réplicas para cada uno de los tratamientos utilizados (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l para el acaricida Tetradifón y 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l para el herbicida Propanil) y para cada tiempo de exposición con ambos plaguicidas. Ante la imposibilidad de determinar el peso de un sólo individuo, se utilizaron 50 individuos por replica, para los tiempos más bajos de exposición, 0, 24, 48 y 72 horas, para cada una de las concentraciones de los plaguicidas objeto de estudio; para los tiempos 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 1.5 l de capacidad con 300 animales. El medio se cambió diariamente hasta que se cumplía el tiempo de exposición. Este procedimiento se repitió para cada uno de los tiempos de exposición y para cada una de las concentraciones utilizadas tanto para el acaricida Tetradifón como para el herbicida Propanil.

Transcurrido el tiempo de exposición, los individuos fueron dispuestos en un papel de filtro que a su vez se introdujo en placas Petri de cristal (4x1 cm); estas placas fueron introducidas en una estufa a 60°C durante 48 horas (Kobayshi y Nezu, 1986). Transcurrido este tiempo los animales fueron pesados en una balanza de precisión.

3.9. CALCULO DEL CONTENIDO CALÓRICO.

El contenido calórico representa las reservas energéticas fisiológicamente disponibles en el organismo. En este estudio, el contenido calórico fue calculado basándonos solamente en los valores obtenidos para los lípidos, el glucógeno y las proteínas, los valores calóricos utilizados fueron 9.45 cal/mg para los lípidos, 4.1 cal/mg para el glucógeno y 5.65 cal/mg para las proteínas (Mann y Gallager, 1985). Al realizar los cálculos se expresó el contenido calórico como mcal por individuo y mcal por μ g de peso seco. El contenido calórico se calculó de este modo para *D. magna* expuesta a los diferentes tratamientos de Tetradifón y Propanil.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos en todos los estudios realizados fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) para detectar las posibles diferencias significativas ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) entre los posibles parámetros calculados, con respecto al grupo control. El posterior test de Duncan permitió determinar entre qué grupos se encontraban las diferencias significativas ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS+ en un ordenador PC compatible.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL TETRADIFÓN Y EL PROPANIL EN *D. magna*.

Los valores obtenidos por Ferrando y cols. (1996) para la CE_{50} del Tetradifón en *D. magna* fueron de 8.92 mg/l para las 24 horas y 6.92 mg/l para las 48 horas de exposición al acaricida.

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de inmovilidad observados en *D. magna* para cada una de las concentraciones de Propanil ensayadas y los valores obtenidos para la CE_{50} a las 24 y 48 horas de exposición. Con los datos obtenidos se trazaron gráficas en las que se representó el porcentaje de inmovilidad con respecto a la concentración de herbicida utilizada (Figura 7). Las concentraciones ensayadas fueron 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/l para las 24 horas; y 2, 4, 6, 8 y 10 mg/l para las 48 horas de exposición.

Al observar los valores calculados para la CE_{50} podemos decir que el herbicida Propanil provocó una mayor mortalidad de los dáfidos al aumentar el tiempo de exposición ya que se obtuvo un valor menor de la CE_{50} a las 48 horas (5.02 mg/l) respecto al encontrado a las 24 horas de exposición (43.75 mg/l).

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

24 horas		48 horas	
Concentración (mg/l)	% inmovilidad	Concentración (mg/l)	% inmovilidad
20	10	2	0
30	15	4	15
40	25	6	70
50	40	8	95
60	90	10	100
70	100	12	100
$CE_{50} = 43.75 \pm 2.69$ (mg/l)		$CE_{50} = 5.02 \pm 0.32$ (mg/l)	

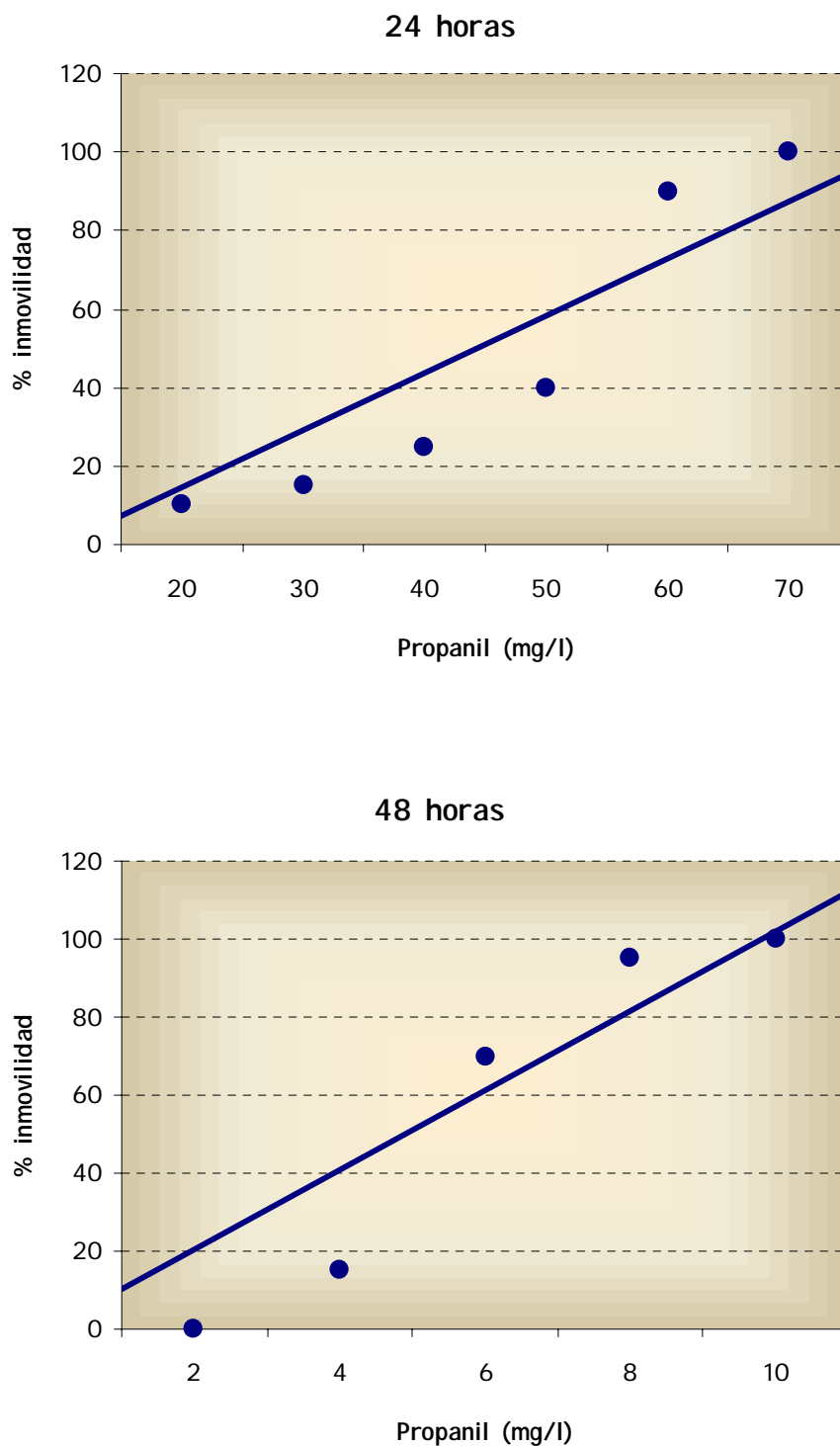


Figura 7. Curvas concentración-inmovilidad de *D. magna* tras 24 horas y 48 horas de exposición a diferentes concentraciones del herbicida Propanil.

4.2. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN *D. magna*.

Este estudio se realizó para los dos plaguicidas seleccionados. Para ello, tal y como se apuntó en el capítulo de Material y Métodos, se tomaron los datos de reproducción y supervivencia durante los 21 días de duración del ensayo; el último día del test se tomaron las medidas correspondientes a la longitud del caparazón de los individuos supervivientes.

Con estos datos se elaboraron las tablas de resultados, donde se reflejó el valor de los diferentes parámetros (número de neonatos por hembra, tamaño de la camada, número de camadas, tiempo a la primera puesta, longitud, longevidad y tasa intrínseca de crecimiento natural (r)) con respecto al tratamiento utilizado.

Las concentraciones subletales de Tetradifón utilizadas fueron 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l, además un control exento de tóxico y un control con disolvente (22 μ l de acetona /l de medio). Para el herbicida Propanil se utilizaron las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l, además de un control exento de tóxico. No fue necesaria la utilización de disolvente por lo que no se realizó un control adicional.

Para ambos plaguicidas se calculó la concentración máxima aceptable (MATC) a partir de los valores de la tasa intrínseca de crecimiento natural (r), obtenidos con la concentración de plaguicida más alta para la cual no se observaron efectos (NOEC) y con la concentración de plaguicida más baja en la que se observó un efecto significativo (LOEC). También se calcularon las CE_{50} (concentración efectiva 50) para los diferentes parámetros estudiados.

4.2.1. ACARICIDA TETRADIFÓN

4.2.1.1. Tamaño de la camada.

Los valores correspondientes al tamaño de la camada (CDA) aparecen reflejados en la Tabla 3. Se observa la existencia de una disminución en el tamaño de la camada, que se acentúa a medida que aumenta la concentración de plaguicida presente en el medio. Se obtuvieron valores decrecientes para este parámetro desde 26.2 neonatos por camada (control) hasta 14.5 neonatos en aquellos organismos expuestos a la mayor concentración (0.44 ppm) de Tetradifón.

El análisis de la varianza (ANOVA) determinó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el control y los grupos tratados (Anexo, Tabla 1).

El posterior test de Duncan mostró las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y los dáfidos expuestos a 0.18, 0.22 y 0.44 ppm de plaguicida. No se encontraron diferencias significativas entre el control y el control con acetona, así como entre la concentración de 0.10 ppm y el control. Los resultados obtenidos con el test de Duncan se muestran en la Figura 1 del Anexo.

4.2.1.2. Número de camadas.

Los valores correspondientes al número de camadas (NCDA) se detallan en la Tabla 3. Se observó la disminución del número de camadas al aumentar la concentración de plaguicida utilizada; no obstante la tendencia no es concluyente ya que los grupos de 0.10 y 0.22 mg/l, presentaron el mismo valor para este parámetro.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los grupos tratados y el control; los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Tabla 2 del Anexo.

El posterior test de Duncan puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos correspondientes a las concentraciones de 0.18 y 0.44 mg/l de Tetradifón. No se observaron diferencias entre el control y el control más acetona (Figura 2 del Anexo).

4.2.1.3. Tiempo a la primera puesta.

Los valores correspondientes al tiempo a la primera puesta (TIPTA) se encuentran, al igual que los anteriores, en la Tabla 3. Desde el valor correspondiente a la concentración de 0.18 hasta la de 0.44 ppm, se observó un aumento gradual en el tiempo que los individuos tardan en realizar su primera puesta. El control y el control con acetona presentaron valores de 7.8 y 7.6 días a la primera puesta, mientras que para los grupos tratados con 0.22 y 0.44 ppm los valores son de 8.8 y 9.0 días respectivamente.

El análisis de la varianza (ANOVA) señaló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los grupos tratados y el control, los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Tabla 3 del Anexo.

Tabla 3. Valores medios y desviaciones típicas de los diferentes parámetros estudiados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón durante 21 días.

Tratamiento	Tamaño de la camada	Número de camadas	Tiempo a la primera puesta	Número de neonatos por hembra	Longevidad	Longitud
Control	26.2±3.2	5.0±0.0	7.8±0.3	131.7±15.0	21.0±0.0	0.48±0.00
C+A	25.9±0.9	4.9±0.1	7.6±0.3	127.8±4.0	21.0±0.0	0.48±0.01
0.10 ppm	25.2±1.3	4.7±0.2	8.1±0.1	118.2±10.4	20.9±0.1	0.46±0.01 [*]
0.18 ppm	22.3±2.5 [*]	4.6±0.2 [*]	8.7±0.2 [*]	102.1±10.7 [*]	20.8±0.1	0.45±0.01 [*]
0.22 ppm	20.0±1.2 [*]	4.7±0.3	8.8±0.3 [*]	97.3±5.6 [*]	20.9±0.1	0.45±0.00 [*]
0.44 ppm	14.5±0.7 [*]	4.5±0.3 [*]	9.9±0.0 [*]	65.9±8.3 [*]	20.9±0.1	0.38±0.00 [*]

(^{*}) Diferencias significativas p< 0.05.

El posterior test de Duncan mostró los grupos que presentaban diferencias significativas con el control, éstos fueron los correspondientes a las concentraciones de 0.18, 0.22 y 0.44 ppm, el control más disolvente y la concentración de 0.10 ppm no mostraron diferencias significativas con el control, los resultados de este test se muestran en la Figura 3 del Anexo.

4.2.1.4. Número de neonatos por hembra.

Los valores correspondientes al número de neonatos por hembra (NH) aparecen reflejados en la Tabla 3. Se puede observar una clara disminución del número de estos. Dicha disminución se acrecentó a medida que aumentaba la concentración de plaguicida en el medio. Así, con la concentración de 0.10 mg/l se obtuvieron 118.2 neonatos por hembra, 102.1 neonatos por hembra se obtuvieron con la concentración de 0.18 mg/l, 97.3 neonatos por hembra se obtuvo para el tratamiento de 0.22 mg/l y finalmente con la concentración de plaguicida más alta, 0.44 mg/l, el valor de neonatos por hembra fue de 65,9 neonatos por hembra.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los individuos tratados y los controles, estas diferencias aparecen a partir de la concentración de 0.18 mg/l (Tabla 4 del Anexo).

El posterior test de Duncan señaló las diferencias significativas ($p < 0.05$) existentes entre el control y los tratamientos de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l. No se encontraron diferencias significativas entre el control y el control más acetona, ni entre la concentración de 0.10 mg/l y el control (Figura 4 del Anexo).

4.2.1.5. Longevidad.

Los valores para la longevidad (LV) se encuentran en la Tabla 3. No se observan diferencias apreciables entre el control y los grupos tratados. Los diferentes tratamientos de Tetradifón no parecieron afectar a la longevidad a lo largo de los 21 días de duración del ensayo.

El análisis estadístico de la varianza ANOVA, efectivamente, no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control ($p > 0.05$) (Tabla 5 del Anexo).

4.2.1.6. Longitud.

Los resultados correspondientes a la longitud (L) aparecen reflejados en la Tabla 3. Se puede observar una disminución en el tamaño del caparazón de los individuos desde la concentración más baja de plaguicida, siendo estos valores de 0.48 cm para el control y el control con acetona y de 0.38 cm para la concentración más alta de 0.44 ppm. Como se puede observar este parámetro se ve afectado con todos los tratamientos.

El análisis de la varianza (ANOVA), mostró diferencias significativas ($p < 0.001$), entre el control y los grupos tratados, estos resultados aparecen en la Tabla 6 del Anexo.

El posterior test de Duncan determinó la existencia de diferencias significativas entre todos los grupos tratados y el grupo control. No se observaron diferencias entre el control y el control con acetona (Figura 5 del Anexo).

4.2.1.7. Tasa intrínseca de crecimiento natural (r).

Los resultados para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) se muestran en la Figura 8. Se observa una disminución en el valor de este parámetro a partir de la concentración de 0.18 mg/l de Tetradifón. Esta disminución fue más acusada en los grupos tratados con 0.22 y 0.44 mg/l. No se observa ningún efecto sobre la concentración de 0.10 mg/l y lo mismo sucede con el control con acetona.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el control y los grupos tratados (Tabla 7 del Anexo).

El posterior test de Duncan mostró que las diferencias se situaban entre el grupo control y los grupos tratados con las concentraciones de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l. No se encontraron diferencias significativas entre el control y el control con acetona ni entre la concentración de 0.10 mg/l y el control (Figura 6 del Anexo).

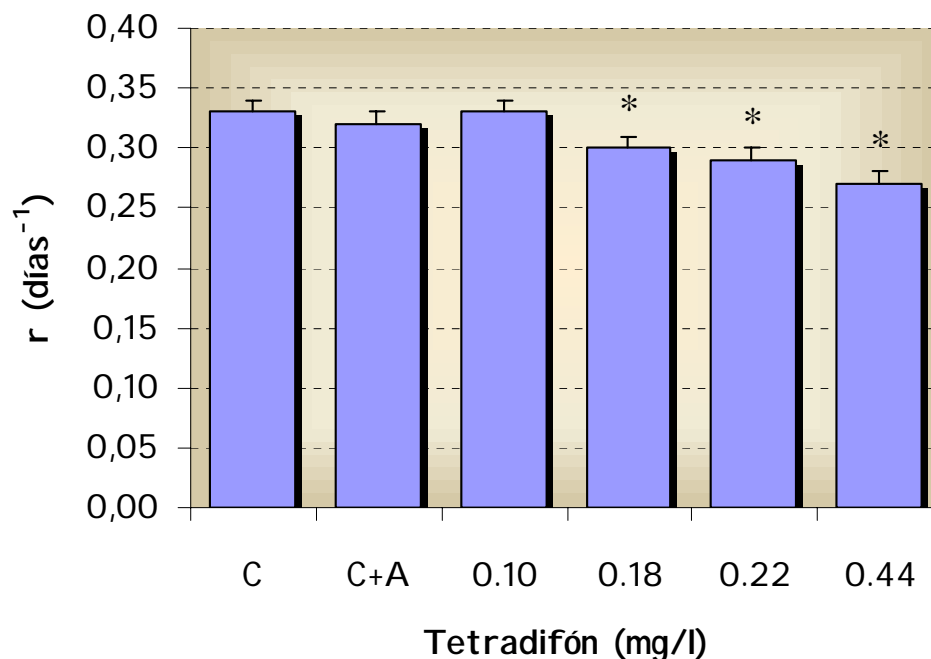


Figura 8. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón. (*) $p < 0.05$.

4.2.1.8. Cálculo de la MATC.

Tomando los valores de la concentración de Tetradifón más alta para la que no se observaron efectos (NOEC) en el parámetro (r) (que en este caso fue la concentración de 0.10 ppm) y la concentración de Tetradifón más baja en la que se observó un efecto significativo (LOEC) (que correspondió con la concentración de 0.18 ppm). Se calculó la concentración máxima de tóxico aceptable (MATC) para el Tetradifón, como la media geométrica entre la NOEC y la LOEC, el valor de la MATC fue de 0.13 mg/l de Tetradifón. Esta sería la concentración de Tetradifón que aún estando presente en el medio no supondría riesgos significativos para una población de *D. magna*.

4.2.1.9. Cálculo de la CE₅₀.

A partir de los resultados obtenidos en *D. magna* por exposición al plaguicida Tetradifón, se intentó encontrar una correlación lineal entre los diferentes parámetros estudiados (y) y la concentración de plaguicida en el medio (x). Sólo se seleccionaron aquellos parámetros que mostraron un coeficiente de correlación (r^2) mayor de 0.80.

Los parámetros que cumplieron la condición antes citada fueron: tamaño de la camada, número de camadas, tiempo a la primera puesta, número de neonatos por hembra, longitud y tasa intrínseca de crecimiento natural (r). Las rectas de regresión y los diferentes valores de la CE_{50} así como los coeficientes de correlación se muestran en la Tabla 4.

Recordar que la CE_{50} para cada parámetro se corresponde con la concentración (mg/l) de Tetradifón que produce un 50% de reducción en el parámetro considerado.

Se puede observar que los parámetros más sensibles en *D. magna* frente a la presencia del plaguicida fueron el número de neonatos por hembra y el tamaño de la camada, ya que presentaron una CE_{50} menor (0.44 y 0.48 mg/l). Ambos manifiestan una correlación muy alta (0.99), lo cual es identificativo de una gran dependencia lineal con la concentración de plaguicida empleada. La longitud y la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) presentaron valores altos de correlación pero no fueron parámetros tan sensibles frente a la contaminación por este plaguicida, ya que poseen CE_{50} más altas que los parámetros anteriores. El número de camadas fue el parámetro menos afectado. De este modo, para una concentración dada de Tetradifón en el medio, el número de neonatos por hembra fue el parámetro más sensible como indicador de la contaminación por este acaricida, seguido de el tamaño de la camada, la longitud y la tasa intrínseca de crecimiento natural (r).

Tabla 4. Ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación (r^2) y CE_{50} (mg/l) para los diferentes parámetros evaluados en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

Parámetro	Recta de regresión	r^2	CE_{50}
Tamaño camada	$Y=27.89 - 30.92x$	0.99	0.48
nº de camadas	$Y=4.88 - 0.98x$	0.86	2.42
Tiempo 1ª puesta	$Y=7.95 - 2.79x$	0.90	1.34
neonatos / hembra	$Y=131.12 - 149.96x$	0.99	0.44
Longitud	$Y=0.49 - 0.25x$	0.97	1.00
r	$Y=0.33 - 0.16x$	0.94	1.03

4.2.2. HERBICIDA PROPANIL.

4.2.2.1. Tamaño de la camada.

Los valores correspondientes para el tamaño de la camada (CDA) aparecen en la Tabla 5. Se puede observar un descenso en el tamaño de la camada desde la concentración de Propanil más baja utilizada. Esta disminución es mayor conforme aumenta la concentración de tóxico presente en el medio. Se encontraron valores entre los 26.2 neonatos del control y los 2.9 neonatos por camada con la concentración de 0.55 mg/l.

El análisis de la varianza puso de manifiesto que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el grupo control y los grupos tratados (Tabla 8 del Anexo). El posterior test de Duncan mostró que todos los grupos tratados presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control, los resultados se muestran en la Figura 7 del Anexo.

4.2.2.2. Número de camadas.

Los valores obtenidos para el número de camadas (NCDA) se muestran en la Tabla 5. Al igual que sucede con el tamaño de la camada, en el número de camadas también se observó una disminución que aumenta al aumentar la concentración de Propanil. Los valores obtenidos oscilaron entre las 5 camadas obtenidas en el grupo control y las 1.7 camadas obtenidas con el tratamiento de 0.55 mg/l.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el grupo control y los diferentes tratamientos. Estos resultados se muestran en la Tabla 9 del Anexo.

El posterior test de Duncan dio a conocer que todos los grupos tratados mostraban diferencias significativas con respecto al grupo control, estos datos se encuentran en la Figura 8 del Anexo.

4.2.2.3. Tiempo a la primera puesta.

En la Tabla 5 aparecen los valores obtenidos para el tiempo a la primera puesta (TIPTA). Se observa un aumento en el número de días transcurridos desde el comienzo del experimento hasta la primera reproducción de los animales tratados.

Los valores obtenidos para que se diera la primera reproducción fueron 7.8 días en el control, 10.1, 10.1 y 10.0 días para las concentraciones de 0.07, 0.10 y 0.21 mg/l respectivamente. Finalmente el valor más alto de 12 días se obtuvo con la concentración más alta utilizada (0.55mg/l).

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se comprobó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos tratados y el grupo control (Tabla 10 del Anexo).

El posterior test de Duncan reveló que todos los grupos presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 9 del Anexo).

4.2.2.4. Número de neonatos por hembra.

Los valores correspondientes al número de neonatos por hembra (NH) también se muestran en la Tabla 5. En este caso, se observó un descenso importante en el número de neonatos por hembra. Esta disminución se acentuó al aumentar la concentración de plaguicida en el medio. Encontramos valores de 131.7 neonatos por hembra para el grupo control, 87.1, 80.1 y 38.5 neonatos por hembra para las concentraciones de 0.07, 0.10 y 0.21 mg/l respectivamente. El descenso más acusado se presentó con la concentración de 0.55 mg/l donde se contabilizaron 14.4 neonatos por hembra.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos tratados y el grupo control. Estos resultados se muestran en la Tabla 11 del Anexo. El posterior test de Duncan mostró que todos los tratamientos presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 10 del Anexo).

4.2.2.5. Longevidad.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para la longevidad. Se observa que sólo con la concentración de Propanil más alta este parámetro se ve afectado, puesto que el número de días que los animales sobrevivieron desde el inicio del ensayo fue de 21 para el control y las concentraciones de 0.07 y 0.10 mg/l; en la concentración de 0.21mg/l se obtuvo un valor de 20.27 días y, finalmente, los animales que menos días sobrevivieron fueron los expuestos a 0.55 mg/l con un valor medio de 12.9 días.

Tabla 5. Valores medios y desviaciones típicas de los diferentes parámetros estudiados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Propanil durante 21 días.

Tratamiento	Tamaño de la camada	Número de camadas	Tiempo a la primera puesta	Número de neonatos por hembra	Longevidad	Longitud
Control	26.2±3.2	5.0±0.0	7.8±0.3	131.7±15.1	21.0±0.0	0.48±0.01
0.07 ppm	22.4±1.4 [*]	3.9±0.2 [*]	10.1±0.3 [*]	87.1±4.3 [*]	21.0±0.0	0.48±0.02
0.10 ppm	20.0±2.0 [*]	4.0±0.0 [*]	10.1±0.2 [*]	80.1±8.3 [*]	21.0±0.0	0.48±0.01
0.21 ppm	10.0±1.9 [*]	3.7±0.5 [*]	10.0±0.2 [*]	38.5±8.5 [*]	20.27±1.2	0.48±0.02
0.55 ppm	2.9±2.0 [*]	1.7±1.3 [*]	12.0±2.4 [*]	14.4±9.0 [*]	12.9±5.9 [*]	0.42±0.01 [*]

(*) Diferencias significativas con el control (p<0.05).

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos tratados y el control (Tabla 12 del Anexo).

Al realizar el posterior test de Duncan se encontró que solamente la concentración de 0.55 mg/l mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 11 del Anexo).

4.2.2.6. Longitud.

Los valores obtenidos para la logitud (L) aparecen reflejados en la Tabla 5. Los resultados obtenidos presentan una gran similitud ya que solamente para el grupo tratado con 0.55 mg/l se obtiene un valor de 0.42 cm, el resto de grupos incluido el control presentaron el mismo valor de 0.48 cm.

Al realizar el análisis de la varianza se confirmó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla 13 del Anexo).

El test de Duncan mostró que solamente los animales tratados con 0.55 mg/l de Propanil presentaban diferencias significativas con el grupo control (Figura 12 del Anexo).

4.2.2.7. Tasa intrínseca de crecimiento natural (r).

En la Figura 9 se muestran los resultados para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r). Se observó una disminución de su valor a medida que aumentó la concentración del herbicida Propanil en el medio, esta disminución es más acusada en las concentraciones de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l donde se obtuvieron valores de 0.26, 0.23 y 0.14 días⁻¹ respectivamente. Por otro lado, el grupo control y el tratamiento de 0.07 mg/l presentaron valores de 0.32 y 0.27 días⁻¹.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se determinó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla 14 del Anexo).

El test de Duncan mostró que los grupos que presentaban diferencias significativas con el grupo control fueron los tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l (Figura 13 del Anexo).

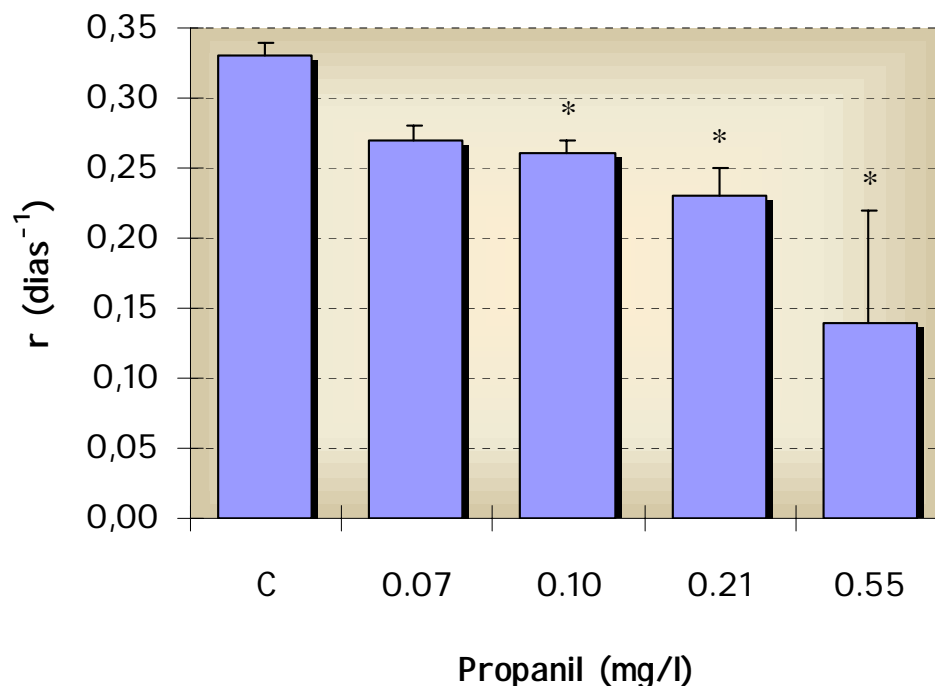


Figura 9. Valores obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Propanil. (*) $p < 0.05$.

4.2.2.8. Cálculo de la MATC.

Para obtener el valor de la máxima concentración de tóxico aceptable (MATC) se realizó, como en el caso del acaricida Tetradifón, la media geométrica entre la concentración de herbicida para la que no se observaron efectos (NOEC) en el parámetro (r), que fue la concentración de 0.07 mg/l y la concentración más baja en la que se observó un efecto significativo (LOEC), que fue la concentración de 0.10 mg/l. Con estos datos la MATC tomó un valor de 0.084 mg/l de Propanil. Como se ha comentado en el caso del Tetradifón, esta sería la concentración de Propanil que aún estando presente en el medio no provocaría efectos significativos en la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) de *D. magna*, por lo tanto no supondría un riesgo para la población.

4.2.2.9. Cálculo de la CE₅₀.

Como en el caso del acaricida Tetradifón, se utilizaron los valores obtenidos para los diferentes parámetros (Tabla 6) con el objeto de encontrar una correlación lineal entre éstos y las diferentes concentraciones de Propanil utilizadas.

En todos los casos “y” representa los valores de los parámetros estudiados y “x” la concentración de herbicida ensayada.

Se seleccionaron aquellos parámetros que presentaron un coeficiente de correlación r^2 mayor de 0.80.

Los parámetros que cumplieron esta premisa fueron: el número de neonatos por hembra, el tamaño de la camada, el número de camadas por hembra y la tasa intrínseca de crecimiento natural (r). Las rectas de regresión y los valores obtenidos para la CE_{50} , al igual que los coeficientes de correlación, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación (r^2) y CE_{50} (mg/l) que describen la relación que existe entre las diferentes concentraciones de Propanil (mg/l) y los valores de los diferentes parámetros estudiados en *D. magna* expuesta a Propanil.

Parámetro	Recta de regresión	r^2	CE_{50}
Número de neonatos por hembra	$Y=105-188x$	0.90	0.21
Tamaño de la camada	$Y=23.9-41.4x$	0.95	0.26
Número de camadas	$Y=4.45-4.87x$	0.98	0.40
Tasa intrínseca (r)	$Y=0.30-0.31x$	0.97	0.45

Los parámetros más sensibles a la presencia de Propanil en el medio fueron: el número de neonatos por hembra y el tamaño de la camada ya que son los que presentaron los valores más bajos de CE_{50} , 0.21 y 0.26 mg/l respectivamente. La correlación que presentan todos los parámetros es muy alta, estando en todos los casos por encima del 0.90 de coeficiente de correlación, esto indica una buena relación lineal entre los diferentes tratamientos y los valores de los diferentes parámetros estudiados. Para el número de camadas y la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) se encuentran valores de CE_{50} más altos, lo que indicó una menor sensibilidad de estos parámetros frente a la presencia del herbicida Propanil en el medio.

Como ocurrió con el acaricida Tetradifón, el número de neonatos por hembra fue el parámetro más sensible como indicador de la contaminación por el herbicida Propanil.

4.3. EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL SOBRE EL COMPORTAMIENTO FILTRADOR DE *D. magna*.

4.3.1. ACARICIDA TETRADIFÓN.

4.3.1.1. Tasa de filtración.

Los resultados correspondientes a este parámetro se muestran en la Figura 10. La tasa de filtración disminuyó en *D. magna* expuesta a concentraciones crecientes de Tetradifón. El valor disminuyó desde 512.6 y 514.3 $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{h}$, en el control y control con acetona, hasta 115.7 $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{h}$ en los dáfidos expuestos a 0.44 mg/l de plaguicida. Los porcentajes de inhibición con respecto al control para las concentraciones 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l fueron respectivamente 41%, 67%, 62% y 77%.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes tratamientos y el grupo control. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 15 del Anexo.

El test de Duncan realizado con posterioridad mostró los grupos que presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control, en este caso todos los tratamientos (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l), excepto el control con acetona, presentaron diferencias significativas con el control. Los resultados obtenidos en este test se muestran en la Figura 14 del Anexo.

4.3.1.2. Tasa de ingestión.

Al igual que para la tasa de filtración, la de ingestión se ve inhibida incluso con las concentraciones de plaguicida más bajas (Fig. 10). La tasa de ingestión disminuyó de un valor, en el grupo control, de 108.4×10^3 cél/ind/h a 62.5×10^3 cél/ind/h con la concentración de 0.10 ppm; a partir de esta concentración continuó el descenso de la misma hasta 50.4×10^3 cél/ind/h con la concentración más alta (0.44 ppm). Para cada una de las concentraciones 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l los porcentajes de inhibición fueron respectivamente de 42%, 50%, 36% y 54%.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos tratados y el control (Tabla 16 del Anexo). El test de Duncan puso de manifiesto que los grupos correspondientes a las concentraciones de 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 ppm presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control; estas diferencias no se presentaron en el control con acetona (Figura 15 del Anexo).

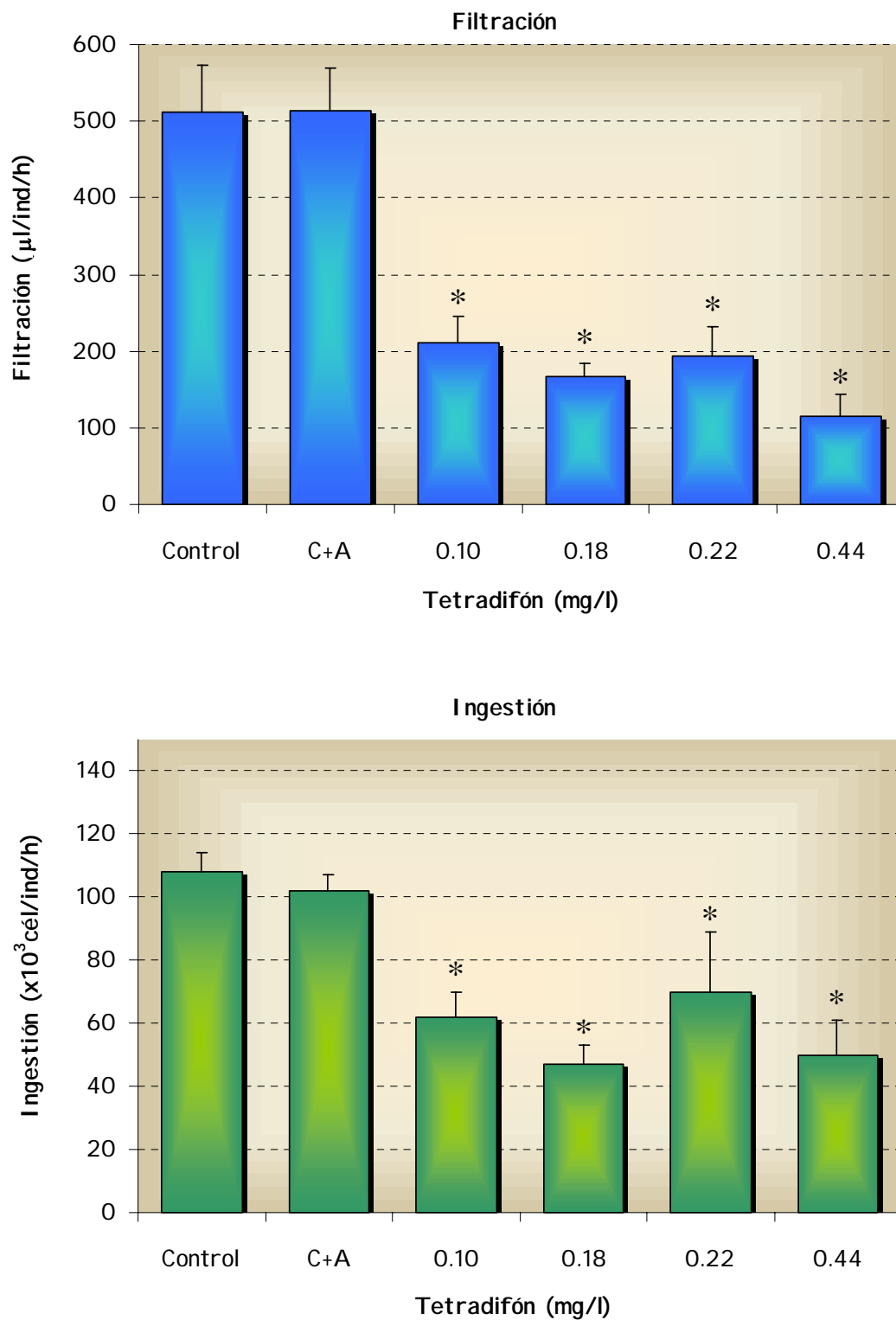


Figura 10. Tasas de filtración e ingestión de *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón durante 5 horas. (*) $p < 0.05$.

4.3.2. HERBICIDA PROPANIL.

4.3.2.1. Tasa de filtración.

Los resultados correspondientes a este parámetro se muestran en la Figura 11. La presencia de herbicida en el medio produce una rápida inhibición de la tasa de filtración que se ve acentuada para las concentraciones de 0.21 y 0.55 mg/l las cuales presentan unos valores de 183 y 180 $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{hr}$, en el control se observa un valor de 323 $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{hr}$. Los porcentajes de inhibición con respecto al control para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l fueron respectivamente: 7%, 35%, 43% y 44%.

El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes tratamientos y el grupo control (Tabla 17 del Anexo).

El posterior test de Duncan mostró los grupos que presentaban estas diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control, estos grupos fueron los tratados con 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l de Propanil (Figura 16 del Anexo).

4.3.2.2. Tasa de ingestión.

Al igual que para la tasa de filtración, la de ingestión disminuyó desde la concentración de 0.10 ppm (Fig. 11). A partir de esta concentración se produjo un descenso mayor, dándose en el resto de concentraciones los siguientes valores: 71×10^3 cél/ind/hr en la concentración de 0.21 y 59×10^3 cél/ind/hr en la concentración más alta (0.55 ppm). Para cada una de las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l los porcentajes de inhibición fueron respectivamente 15%, 39%, 47% y 56%.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes tratamientos y el grupo control (Tabla 18 del Anexo). El posterior test de Duncan indicó que los tratamientos con 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l, presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control (Figura 17 del Anexo).

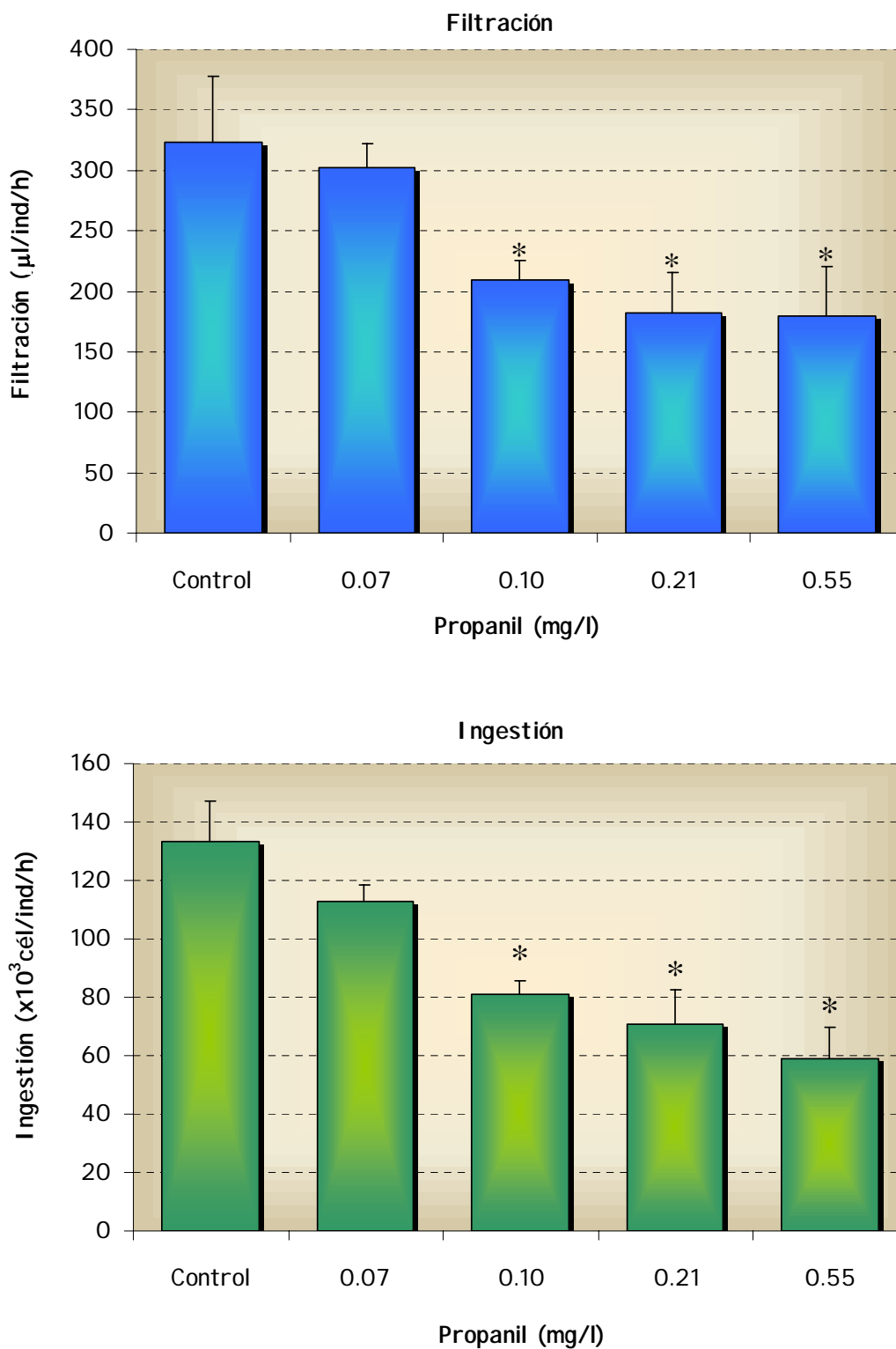


Figura 11. Tasas de filtración e ingestión de *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil durante 5 horas. (*) $p < 0.05$.

4.4. EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN LA FISIOLOGÍA DE *D. magna*.

Para el estudio de las alteraciones fisiológicas que se producen en el crustáceo *D. magna* por la presencia de los plaguicidas Tetradifón y Propanil, se llevo a cabo la determinación y el análisis de la concentración de diferentes biomoléculas cuyo papel en los seres vivos es esencial al formar parte de las reservas energéticas que se ven implicadas en las respuestas al estrés producido por la presencia de un tóxico en el medio.

Para poner de manifiesto los cambios en el metabolismo energético de *D. magna* se determinaron los niveles de las reservas energéticas a diferentes tiempos de exposición al contaminante (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas). Las reservas energéticas a las 0 horas indican los niveles iniciales de las diferentes sustancias valoradas. Este valor va aumentando a lo largo del tiempo ya que los dáfnidos van creciendo durante todo el tiempo que duran los ensayos, por tanto es un dato que nos indica los valores de partida para todos los tratamientos y para todos los tiempos.

A fin de valorar los efectos subletales para cada uno de los plaguicidas objeto de estudio se utilizaron varias concentraciones subletales de cada uno de ellos. Estas concentraciones fueron: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l para el acaricida Tetradifón y 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l para el herbicida Propanil; en ambos casos se ensayó un control, además, para el Tetradifón un control con acetona.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos para cada una de las reservas energéticas estudiadas y el contenido calórico calculado a partir de los valores presentados, para cada concentración, cada tiempo y cada uno de los plaguicidas objeto de estudio. También se muestra el peso seco por individuo obtenido para cada plaguicida durante los diferentes tiempos de experimentación y para los diferentes tratamientos. Conocer este dato permite poder plasmar los resultados de dos formas: el contenido de las reservas energéticas y el contenido calórico por individuo, y el contenido de reservas energéticas y el contenido calórico por peso. Se completan estos resultados mostrando el porcentaje, respecto al control, de cada una de estas reservas energéticas junto con el contenido calórico por individuo y el porcentaje respecto al peso que cada una de estas reservas representa para los diferentes tiempos de exposición y los diferentes tratamientos con ambos plaguicidas.

4.4.1. ACARICIDA TETRADIFÓN.

4.4.1.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).

4.4.1.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Los resultados obtenidos para este parámetro se muestran en la Tabla 7; del mismo modo, en la Figura 12 se representan los porcentajes con respecto al control para cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos de exposición. Se observa que en los organismos control, al aumentar la edad de los individuos, aumentan los niveles tisulares de glucógeno; esta misma tendencia se puede comprobar en los organismos pertenecientes al grupo control con acetona.

Por otra parte, se observó una disminución de los niveles de glucógeno al aumentar la concentración de Tetradiión en el medio. Al aumentar el tiempo de exposición aumentaron las diferencias entre los diferentes tratamientos y el grupo control, por tanto aumentan los efectos producidos por los diferentes tratamientos.

El valor obtenido a las 0 horas fue de 0.17 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$. Este sería el de glucógeno inicial que presentan los individuos y aumenta con el tiempo, siendo éste mayor en el grupo control.

Durante las primeras 24 horas de exposición, los valores oscilaron entre los 0.25 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ (control y control con acetona) y los 0.21 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ para la concentración de 0.44 mg/l. El análisis de la varianza no mostró la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el grupo control (Tabla 19 del Anexo).

Tras 48 horas de exposición al plaguicida se aprecia una disminución de los niveles de glucógeno. Los valores oscilaron entre los 0.37 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ obtenidos en el control y los 0.24 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ que se obtuvieron con la concentración más alta. El análisis de la varianza (ANOVA) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos tratados y el control (Tabla 20 del Anexo). Al realizar el posterior test de Duncan se vió que estas diferencias ($p < 0.05$), las presentaban los grupos tratados con 0.22 y 0.44 mg/l (Figura 18 del Anexo).

Transcurridas 72 horas de exposición, los valores obtenidos para los diferentes tratamientos fueron los siguientes: 0.47 $\mu\text{g/Daphnia}$ para el control, 0.47, 0.36, 0.41, 0.31 y 0.24 $\mu\text{g/Daphnia}$, para el control más acetona, 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente. En este caso, al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) obtuvimos diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto al grupo control (Tabla 21 del Anexo), el test de Duncan mostró que los grupos con diferencias ($p < 0.05$) eran los grupos tratados con 0.10, 0.22 y 0.44 mg/l de Tetradifón (Figura 19 del Anexo).

A las 96 horas de exposición los niveles de glucógeno en los tratamientos de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l presentaron valores de 0.40, 0.34 y 0.29 $\mu\text{g/Daphnia}$ respectivamente, siendo para el grupo control de 0.53 $\mu\text{g/Daphnia}$. La existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes tratamientos y el grupo control vino dada por el análisis de la varianza (ANOVA) cuyos resultados se encuentran en la Tabla 22 del Anexo. El test de Duncan mostró que los grupos tratados con 0.18 mg/l de Tetradifón y superiores mostraban diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (Figura 20 del Anexo).

Por último a las 120 horas, los niveles de glucógeno en los tratamientos más altos presentaron un descenso de más del 50% con respecto al grupo control (0.64 $\mu\text{g/Daphnia}$). El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 23 del Anexo); el test de Duncan indicó que todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con el grupo control (Figura 21 del Anexo).

Para ningún tiempo de exposición el control con acetona mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 7. Contenido en glucógeno tisular ($\mu\text{g}/\text{Daphnia}$) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón a diferentes tiempos.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	0.17 \pm 0.01	-	-	-	-	-
24 horas	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05	0.26 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	0.21 \pm 0.03	0.21 \pm 0.04
48 horas	0.37 \pm 0.07	0.37 \pm 0.02	0.36 \pm 0.06	0.35 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02*	0.24 \pm 0.02*
72 horas	0.47 \pm 0.08	0.47 \pm 0.07	0.36 \pm 0.04*	0.41 \pm 0.11	0.31 \pm 0.03*	0.24 \pm 0.05*
96 horas	0.53 \pm 0.03	0.53 \pm 0.04	0.50 \pm 0.05	0.40 \pm 0.04*	0.34 \pm 0.03*	0.29 \pm 0.06*
120 horas	0.64 \pm 0.06	0.62 \pm 0.07	0.39 \pm 0.14*	0.32 \pm 0.08*	0.28 \pm 0.07*	0.24 \pm 0.10*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

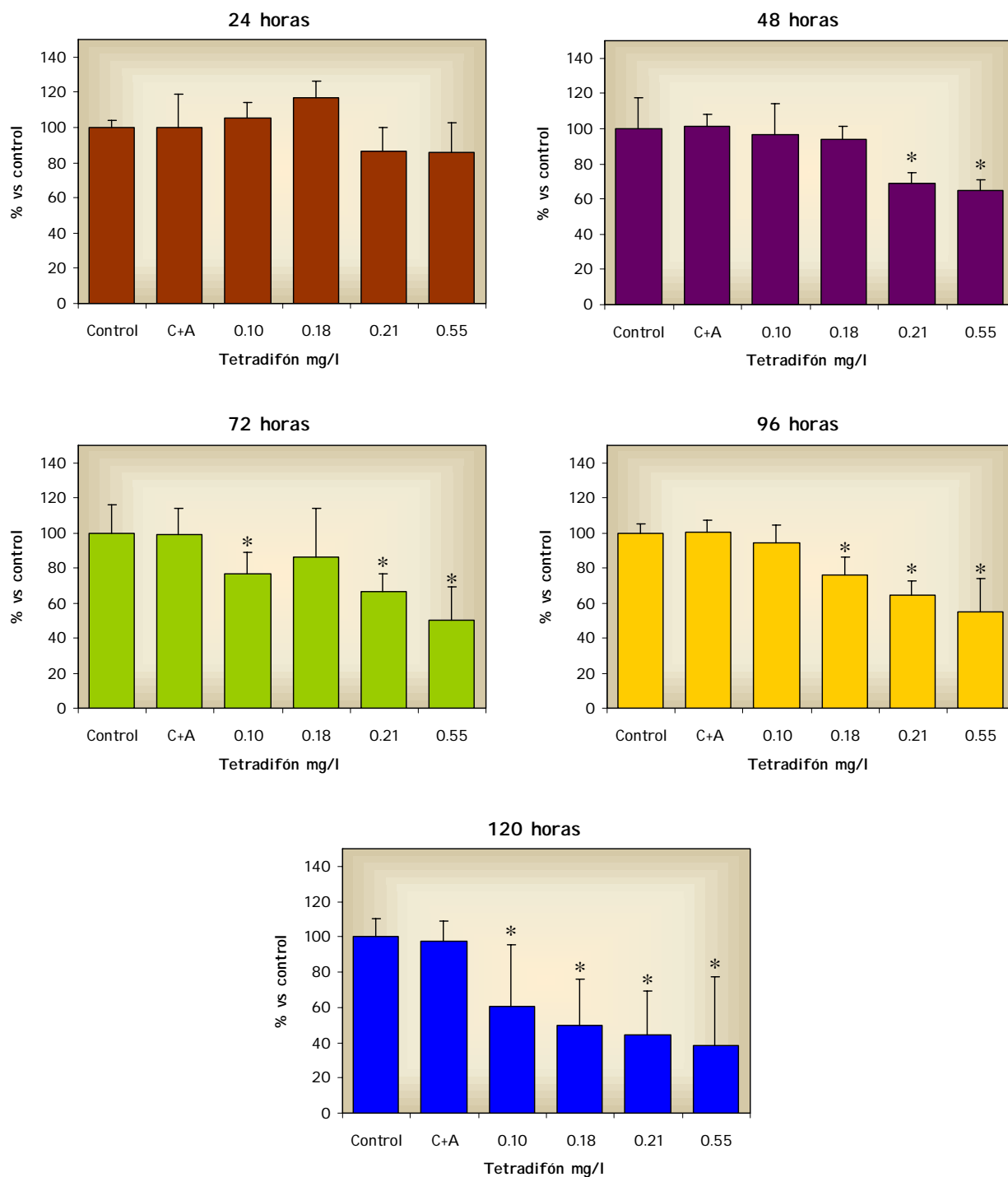


Figura 12. Contenido en glucógeno (porcentajes respecto al control) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón. (*) $p < 0.05$.

4.4.1.1.2. Niveles tisulares de lípidos.

Los resultados obtenidos en el contenido lipídico de *D. magna* se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 13 (porcentajes respecto al control) para los diferentes tratamientos utilizados y tiempos.

Tanto en la tabla como en la figura se puede observar que el efecto del Tetradifón sobre los niveles lipídicos se ve acentuado no sólo al aumentar la concentración del acaricida presente en el medio, sino también al aumentar el tiempo de exposición. Así, tras 120 horas de exposición, la reducción en el contenido lipídico representa más de un 80% con respecto al control.

Desde las primeras 24 horas de exposición, el efecto del plaguicida se hace evidente y el análisis de la varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 24 del Anexo). El test de Duncan situó estas diferencias ($p < 0.05$) entre los grupos tratados con 0.22 y 0.44 mg/l y el grupo control (Figura 22 del Anexo). Los valores que se obtuvieron en este tiempo se encuentran entre los 8.07 $\mu\text{g/Daphnia}$ obtenidos para el grupo control y los 3.13 $\mu\text{g/Daphnia}$ que se obtuvieron con la concentración de 0.44 mg/l.

Todas las concentraciones de Tetradifón utilizadas provocaron un descenso significativo en los niveles de lípidos tisulares tras 48 horas de exposición (Anexo: Tabla 25, Figura 23), que fue más acusado con 0.44 ppm.

A las 72 horas de exposición la disminución del contenido lipídico es menor, encontrando valores de 12.87 $\mu\text{g/Daphnia}$ para el grupo control y de 9.18 $\mu\text{g/Daphnia}$ para la concentración de plaguicida más alta utilizada. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 26 del Anexo). El test de Duncan mostró que las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron con 0.18 mg/l y concentraciones superiores (Figura 24 del Anexo).

El descenso en los niveles de lípidos fue mayor (casi 50%) a las 96 horas de exposición con 0.44 mg/l. La ANOVA (Tabla 27 del Anexo) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$); estas diferencias se encontraron entre los tratamientos de 0.18 mg/l y superiores y el grupo control, tal y como mostró el test de Duncan (Figura 25 del Anexo).

Por último, a las 120 horas, se observan descensos muy acusados en el contenido lipídico en todos los grupos tratados con Tetradifón.

Los valores obtenidos para los diferentes tratamientos (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l) fueron: 15.14, 4.81, 3.04 y 1.87 $\mu\text{g/Daphnia}$ respectivamente, obteniéndose un valor de 18.26 $\mu\text{g/Daphnia}$ para el grupo control.

El análisis de la varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 28 del Anexo). El test de Duncan mostró que todos los grupos presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 26 del Anexo).

En ningún caso el control con acetona presentó diferencias significativas con el grupo control.

Tabla 8. Contenido en lípidos totales ($\mu\text{g/Daphnia}$) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón durante distintos tiempos.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	4.40 \pm 0.68	-	-	-	-	-
24 horas	8.07 \pm 2.82	8.07 \pm 4.60	5.50 \pm 0.82	4.94 \pm 0.68	3.63 \pm 2.29*	3.13 \pm 1.19*
48 horas	8.70 \pm 0.83	8.18 \pm 1.01	6.78 \pm 0.43*	6.57 \pm 0.39*	5.13 \pm 1.48*	3.88 \pm 0.97*
72 horas	12.87 \pm 0.99	11.42 \pm 0.60	11.03 \pm 0.87	9.47 \pm 1.19*	8.74 \pm 1.46*	9.18 \pm 1.26*
96 horas	14.22 \pm 2.96	13.41 \pm 3.70	10.88 \pm 3.08	10.62 \pm 0.91*	9.21 \pm 1.01*	7.94 \pm 1.49*
120 horas	18.36 \pm 0.56	18.50 \pm 0.38	15.14 \pm 5.32*	4.81 \pm 2.23*	3.04 \pm 0.55*	1.87 \pm 0.23*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$

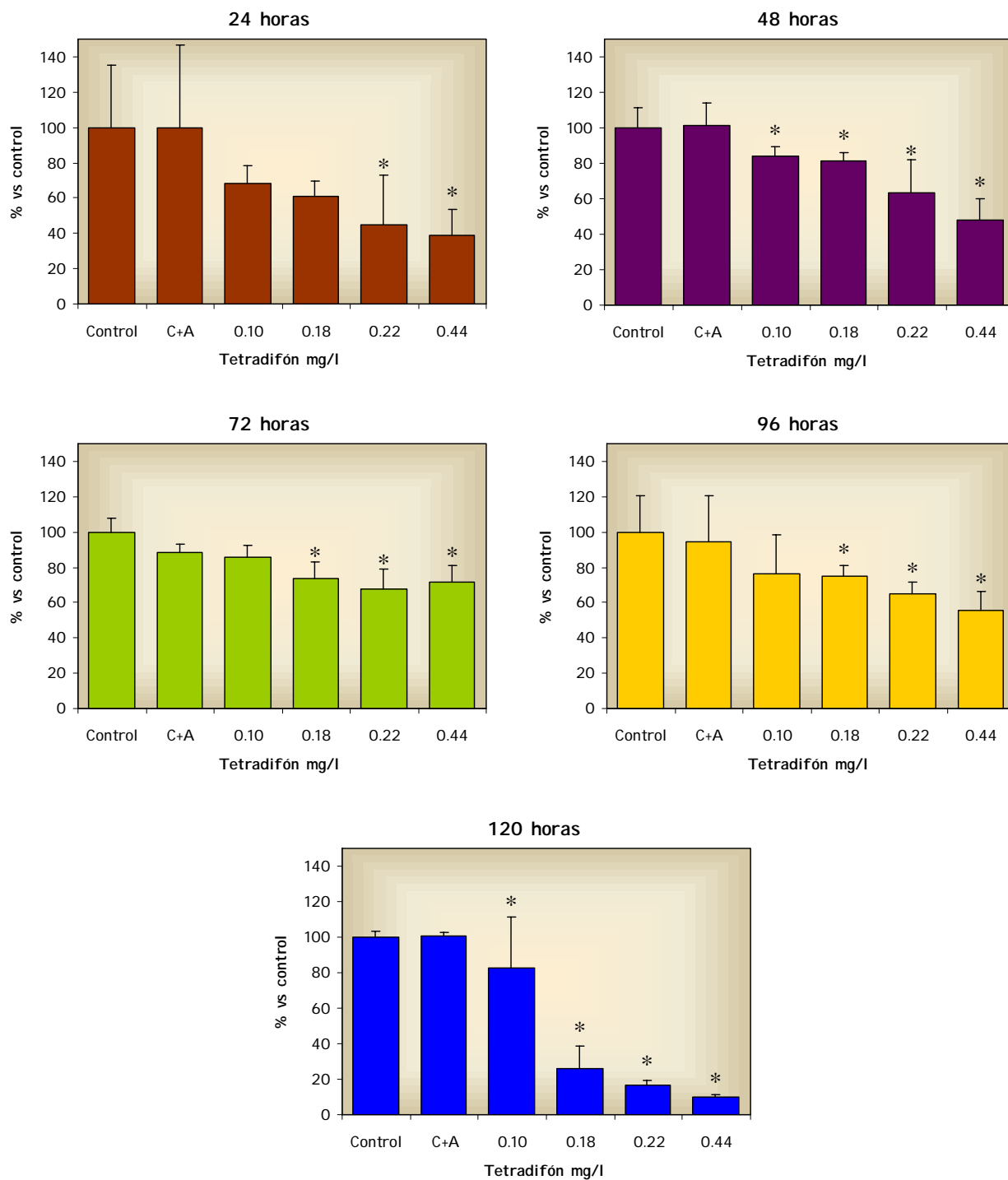


Figura 13. Contenido en lípidos (porcentajes respecto al control) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón. (*) $p < 0.05$.

4.4.1.1.3. Niveles tisulares de proteínas.

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en los niveles de proteínas de *D. magna* tras el tratamiento con Tetradifón. Por otra parte, en la Figura 14 se representan los valores en forma de porcentaje respecto al control para cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos de exposición.

Como ocurría con el contenido en glucógeno y lípidos, el contenido en proteínas disminuye al aumentar la concentración de Tetradifón en el medio, así como al aumentar el tiempo de exposición. En general, el contenido en proteínas aumenta con la edad de los individuos, encontrando a las 120 horas valores más altos que a las 24 horas de exposición.

Durante las primeras 24 horas de exposición se observó un descenso en las proteínas que fue significativo para las concentraciones de Tetradifón más altas utilizadas, así lo confirmó el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 29 del Anexo). El posterior test de Duncan mostró que los grupos que presentaban diferencias significativas con respecto al control eran los tratados con 0.22 y 0.44 mg/l (Figura 27 del Anexo). Los valores obtenidos para estos tratamientos fueron 5.98 y 5.80 µg/Daphnia presentando el control un valor de 7.40 µg/Daphnia.

Resultados similares se encontraron en *D. magna* a las 48 y 72 horas de exposición al plaguicida. El análisis de la varianza (ANOVA) y el posterior test de Duncan, mostraron la existencia de diferencias significativas con las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l (Tablas 30 y 31, Figuras 28 y 29, del Anexo).

Es a partir de las 96 horas cuando se observó que los descensos en el contenido proteico fueron significativos para todos los tratamientos utilizados, como mostraron el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 32 del Anexo) y el posterior test de Duncan ($p < 0.05$) (Figura 30 del Anexo). Los valores obtenidos oscilaron entre 14.91 µg/Daphnia para el control y 9.08 µg/Daphnia para la concentración de 0.44 mg/l.

Por último, a las 120 horas de exposición, también se observaron diferencias significativas entre el control y los dáfidos expuestos al plaguicida, como se puede observar en el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 33 del Anexo) y el posterior test de Duncan (Figura 31 del Anexo). En este caso, los niveles proteicos se redujeron hasta un 30% (0.44 mg/l) respecto al control. En ningún caso el control con acetona mostró diferencias significativas con el grupo control.

Tabla 9. Contenido en proteínas ($\mu\text{g}/\text{Daphnia}$) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón a varios tiempos.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	4.63±0.49	-	-	-	-	-
24 horas	7.40±0.80	7.98±0.61	6.68±0.10	6.65±0.40	5.98±0.73*	5.80±1.12*
48 horas	12.42±1.08	12.45±1.77	11.91±1.11	11.48±2.76	9.04±1.65*	8.88±1.73*
72 horas	14.43±0.75	14.47±0.90	13.45±1.38	13.06±0.59	11.40±0.54*	10.97±1.65*
96 horas	14.91±1.76	15.97±1.63	11.46±0.54*	10.40±1.02*	10.05±0.96*	9.08±0.44*
120 horas	19.12±1.65	19.08±1.11	16.57±1.76*	15.48±1.46*	14.49±1.80*	13.08±0.97*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

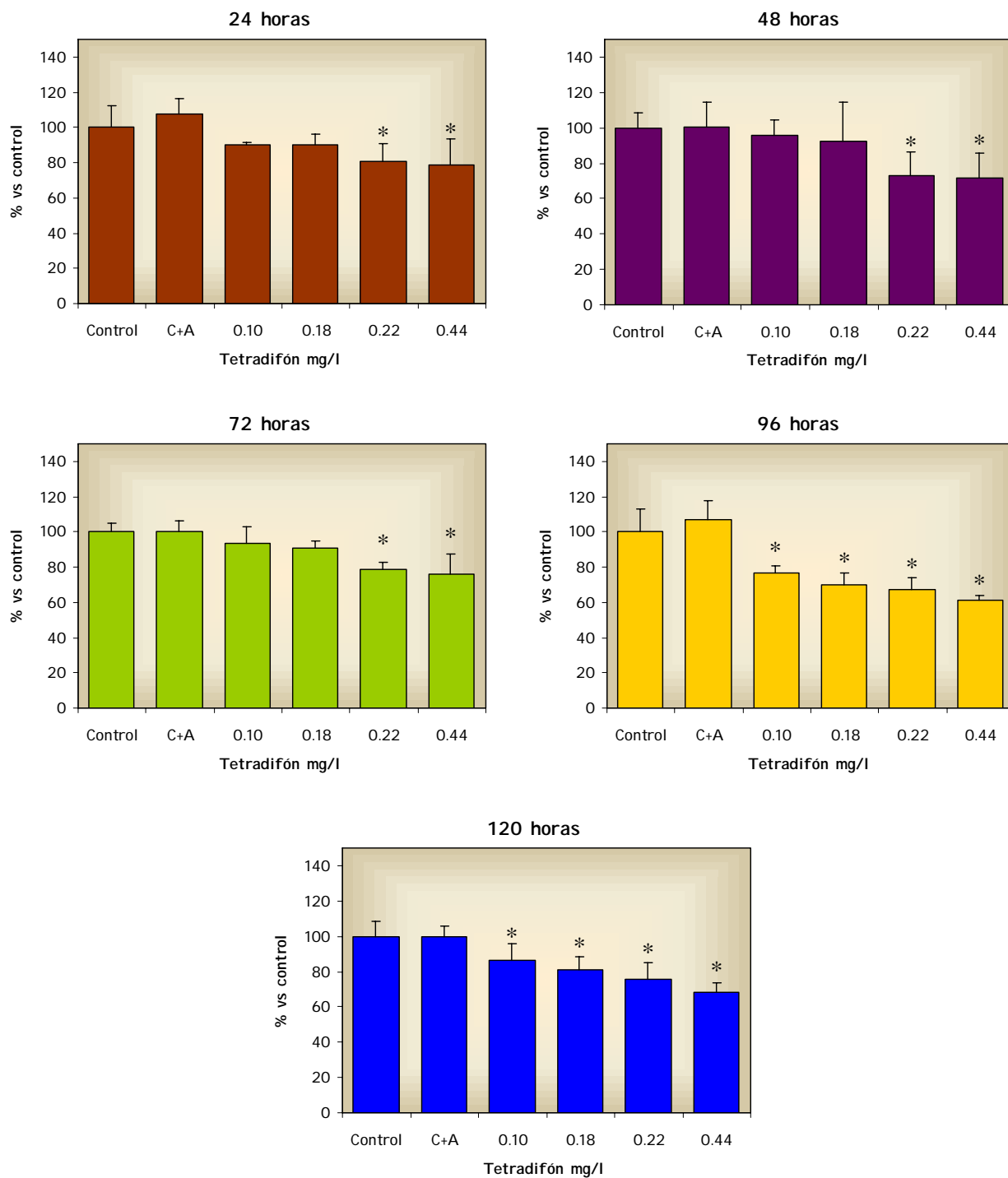


Figura 14. Contenido en proteínas (porcentajes respecto al control) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón. (*) $p < 0.05$.

4.4.1.1.4. Contenido calórico.

Los resultados obtenidos en el contenido calórico en *D. magna* tras exposición al plaguicida Tetradifón se muestran en la Tabla 10. En la Figura 15 podemos ver representados estos mismos datos en porcentaje respecto al control.

Al calcularse el contenido calórico a partir de los valores obtenidos para el glucógeno, los lípidos y las proteínas se observa que el efecto sobre este parámetro es muy intenso encontrando reducciones en el número de calorías de más del 50% en los tiempos más bajos de exposición. El efecto del Tetradifón no sólo aumenta con la concentración de plaguicida presente en el medio sino que lo hace al aumentar el tiempo de exposición. En el control y el control con acetona se aprecia que el contenido calórico aumenta con la edad de los individuos, este comportamiento no es tan evidente en los grupos tratados.

A las 0 horas se encuentra que el contenido calórico fue de 67.24 mcal/Daphnia. A las primeras 24 horas de exposición se aprecia que la reducción en el contenido calórico es significativa para todos los tratamientos, como muestra el análisis de la varianza (ANOVA) que indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 34 del Anexo) y el posterior test de Duncan situó estas diferencias ($p < 0.05$) entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 32 del Anexo). Los valores del contenido calórico se sitúan entre las 131.82 mcal/Daphnia obtenidas para el grupo control y las 58.08 mcal/Daphnia que se obtienen para el grupo tratado con 0.44 mg/l de Tetradifón. Este último valor es incluso menor que el obtenido a las 0 horas.

Tras 48 horas de contacto con el acaricida el contenido calórico presentó unos valores de: 134.42, 120.00, 100.64 y 92.82 mcal/Daphnia para cada uno de los tratamientos: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente, mientras que el valor del control fue de 155.82 mcal/Daphnia. Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 35 del Anexo). El test de Duncan indicó que estas diferencias ($p < 0.05$) las presentaban todos los tratamientos con respecto al grupo control (Figura 33 del Anexo).

A las 72 horas de exposición encontramos que solamente los animales tratados con 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l presentaron diferencias significativas como mostró el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 36 del Anexo); el posterior test de Duncan indicó que eran estos grupos los que presentaban las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (Figura 34 del Anexo). Para este tiempo, los animales tratados

con 0.10 mg/l no presentaron diferencias significativas con el grupo control como ocurre en los tiempos anteriores. El valor alcanzado para los grupos tratados con 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l fue de 171.00, 149.80 y 138.50 mcal/Daphnia respectivamente, el valor para el grupo control fue de 194.78 mcal/Daphnia.

Después de 96 horas de exposición el contenido calórico de los individuos de *D. magna* expuestos a Tetradifón decrece al aumentar la concentración de tóxico, al igual que ocurre en todos los tiempos anteriores. Para este caso, todos los grupos tratados presentaron diferencias significativas respecto del grupo control, como puso de manifiesto el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 37 del Anexo) y el posterior test de Duncan (Figura 35 del Anexo).

Por último, a las 120 horas, se encuentran reducciones importantes en los grupos tratados con mayores concentraciones de Tetradifón siendo éstas del 61 y 65 % para los tratamientos de 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente. Al igual que para las 96 horas todos los grupos tratados presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. El ANOVA ($p < 0.001$) (Tabla 38 del Anexo), y el test de Duncan indicaron que todos los tratamientos presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (Figura 36 del Anexo).

En ningún caso el control con acetona mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 10. Contenido calórico (mcal/Daphnia) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón durante 5 días.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	67.24±6.35	-	-	-	-	-
24 horas	131.82±22.93	141.90±47.69	89.94±7.09*	79.64±7.13*	70.42±22.73*	58.08±7.34*
48 horas	155.82±10.06	153.74±14.18	134.42±6.62*	120.00±20.27*	100.64±13.31*	92.82±18.19*
72 horas	194.78±14.62	188.62±4.85	177.38±11.64	171.00±11.47*	149.80±17.56*	138.50±22.00*
96 horas	223.16±27.27	219.00±36.17	153.66±22.16*	151.68±15.59*	145.56±10.15*	129.64±17.83*
120 horas	283.10±11.00	285.32±9.31	242.66±51.88*	138.68±19.34*	109.66±12.53*	96.38±7.52*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

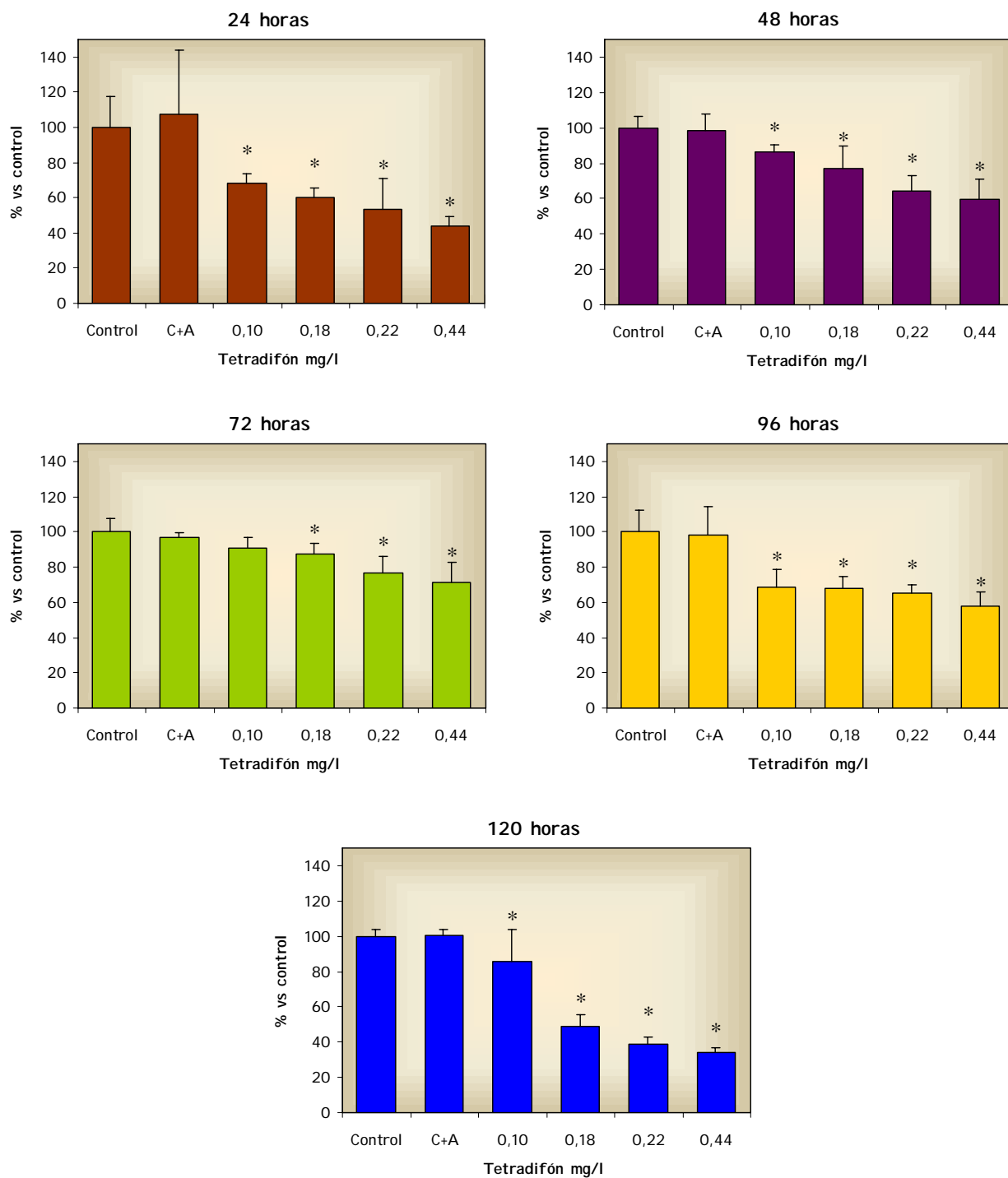


Figura 15. Contenido calórico (porcentajes respecto al control) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón. (*) $p < 0.05$

4.4.1.1.5. Peso seco.

Los valores obtenidos para el peso seco de individuos de *D. magna* expuestos a Tetradifón se muestran en la Tabla 11. Podemos observar que el aumento de la concentración de plaguicida hace que disminuya el peso de los dáfidos. Por otra parte, el peso aumentó con la edad de los animales en todos los casos, y también se observó que al aumentar el tiempo de exposición las diferencias entre los diferentes tratamientos y el grupo control se iban reduciendo.

Los neonatos (a las 0 horas) presentaron un peso de 18.40 μg (este es el peso inicial para todos los individuos utilizados en el ensayo), que aumentará con la edad de los individuos hasta 90.29 μg (a las 120 horas).

A las primeras 24 horas de exposición se puede observar que el peso de los dáfidos se mantuvo similar con todos los tratamientos, por ello el ANOVA no reveló la existencia de diferencias significativas (Tabla 39 del Anexo).

Los dáfidos de 48 horas de vida fueron los más sensibles a la presencia de concentraciones crecientes de Tetradifón en el medio. Se observó una disminución en el peso de los individuos al aumentar la concentración de acaricida. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 34.40, 32.00, 23.20, 23.20, 21.60 y 21.20 μg para el control, el control con acetona, y las concentraciones de: 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se comprobó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 40 del Anexo). El posterior test de Duncan indicó que las diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 37 del Anexo). Este es el único tiempo en el que todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el grupo control.

Encontramos que tras 72 horas de exposición solamente los animales tratados con las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l presentaron disminuciones significativas en su peso con respecto al grupo control. Esto se comprobó al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) ($p < 0.01$) (Tabla 41 del Anexo) y el posterior test de Duncan que situó esta diferencias entre los grupos tratados con 0.22 y 0.44 mg/l y el control (Figura 38 del Anexo).

Similares resultados se encontraron tras 96 horas de exposición, solamente los animales tratados con las concentraciones más altas de Tetradifón presentaron

diferencias significativas con el grupo control. El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 42 del Anexo) y el test de Duncan indicó que las diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre los tratamientos de 0.22 y 0.44 mg/l y el control (Figura 39 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas se halló que sólo los individuos expuestos a la concentración más alta presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.01$) (Tabla 43 del Anexo), y el test de Duncan mostró que las diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre el grupo tratado con 0.44 mg/l y el grupo control (Figura 40 del Anexo).

En todos los casos el control con acetona no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 11. Peso seco (μg /Daphnia) de *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón durante distintos tiempos.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	18.40 \pm 2.61	-	-	-	-	-
24 horas	22.00 \pm 4.00	22.00 \pm 3.16	18.80 \pm 2.28	20.00 \pm 4.24	19.60 \pm 3.85	21.20 \pm 2.28
48 horas	34.40 \pm 3.58	32.00 \pm 3.16	23.20 \pm 4.60*	23.20 \pm 2.28*	21.60 \pm 2.61*	21.20 \pm 3.63*
72 horas	41.60 \pm 5.73	41.20 \pm 4.60	40.00 \pm 3.16	36.80 \pm 3.03	31.60 \pm 5.18*	28.80 \pm 6.10*
96 horas	60.80 \pm 5.93	59.20 \pm 5.22	54.40 \pm 6.69	50.40 \pm 6.69	47.20 \pm 12.13*	36.00 \pm 6.32*
120 horas	90.29 \pm 5.23	87.20 \pm 5.22	84.80 \pm 9.96	83.20 \pm 9.96	82.40 \pm 9.21	73.60 \pm 6.07*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$

4.4.1.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).

4.4.1.2.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Los resultados de glucógeno tisular obtenidos en *D. magna* y expresados en ng/ μ g de peso seco se presentan en la Tabla 12; en la Figura 16 se muestran estos mismos resultados en forma de porcentaje con respecto al peso a los diferentes tiempos de exposición al acaricida.

Se puede observar que el contenido en glucógeno disminuyó al aumentar la concentración de plaguicida en el medio, pero también disminuye al aumentar la edad de los individuos debido a que el peso aumenta a mayor velocidad que los niveles de glucógeno, con lo que la relación entre los niveles de glucógeno y el peso va disminuyendo a medida que aumenta el tamaño corporal.

Al inicio del experimento los valores de glucógeno fueron de 9.46 ng/ μ g, tras 24 horas de exposición a Tetradifón encontramos que aunque se produce un ligero descenso en los niveles de glucógeno al aumentar la cantidad de acaricida en el medio, este no es significativo, tal y como mostró el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 44 del Anexo).

A las 48 horas se observó un descenso en los niveles de glucógeno de *D. magna* obteniéndose valores que oscilaron entre 11.21 para el control y 6.92 ng/ μ g (para la concentración de 0.44 mg/l de Tetradifón). Este descenso fue significativo para las concentraciones de acaricida de 0.18 mg/l y superiores, tal y como indicó el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 45 del Anexo). El posterior test de Duncan mostró que estas diferencias se encontraban entre los tratamientos de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l y el grupo control (Figura 41 del Anexo).

Tras 72 horas se sigue observando el mismo comportamiento, disminuyen los niveles de glucógeno al aumentar la concentración de Tetradifón en el medio. Los valores obtenidos durante este tiempo fueron de 8.70, 9.82, 7.55, 5.70 ng/ μ g para las concentraciones de 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente, en el grupo control el valor obtenido fue 11.36 ng/ μ g. El análisis de la varianza mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 46 del Anexo).

El test de Duncan fue el que nos situó estas diferencias ($p < 0.05$) entre los grupos tratados con 0.10, 0.22 y 0.44 mg/l de Tetradifón con el grupo control (Figura 42 del Anexo).

Similares resultados se obtuvieron cuando los dáfidos se expusieron al plaguicida durante 96 horas. El análisis de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los distintos grupos (Tabla 47 del Anexo). El test de Duncan reveló que los grupos tratados con 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l eran los que presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control (Figura 43 del Anexo).

Por último, a las 120 horas, se observa que los niveles de glucógeno se vieron muy reducidos en comparación con el control, al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los distintos tratamientos (Tabla 48 del Anexo). El test de Duncan situó las diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos de 0.10, 0.18, 0.21 y 0.44 mg/l y el grupo control (Figura 44 del Anexo). Los porcentajes de reducción con respecto al grupo control encontrados para este tiempo fueron de: 39, 50, 55 y 61% para las concentraciones de 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente.

En ningún caso el control con acetona mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 12. Contenido de glucógeno tisular (ng/ μ g) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón durante 5 días.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	9.46 \pm 0.70	-	-	-	-	-
24 horas	11.17 \pm 0.46	11.17 \pm 2.12	11.74 \pm 1.01	13.09 \pm 1.00	9.94 \pm 2.03	9.61 \pm 1.82
48 horas	11.21 \pm 1.38	11.52 \pm 1.01	10.36 \pm 1.89	9.38 \pm 0.98*	7.38 \pm 0.65*	6.92 \pm 0.65*
72 horas	11.36 \pm 1.83	12.57 \pm 1.97	8.70 \pm 1.07*	9.82 \pm 2.67	7.55 \pm 0.77*	5.70 \pm 1.09*
96 horas	8.76 \pm 0.45	8.78 \pm 0.62	8.27 \pm 0.85	7.02 \pm 0.64*	5.18 \pm 0.94*	4.81 \pm 0.91*
120 horas	7.09 \pm 0.71	6.91 \pm 0.78	4.27 \pm 1.52*	3.54 \pm 0.93*	3.13 \pm 0.79*	2.70 \pm 1.05*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.1.2.2. Niveles tisulares de lípidos.

Los resultados obtenidos para los niveles de lípidos expresados por peso de animal se muestran en la Tabla 13; en la Figura 16 se representan estos valores en porcentaje respecto al peso junto con los porcentajes encontrados para el glucógeno y las proteínas.

El contenido lipídico en *D. magna* se vió reducido desde los primeros tiempos de exposición; al aumentar la concentración de Tetradifón en el medio la disminución en el contenido de lípidos fue mayor.

Al comienzo del experimento los niveles lipídicos eran de 239.15 ng/μg de peso. Durante las primeras 24 horas de exposición a Tetradifón el contenido lipídico se fue reduciendo en todos los tratamientos. Al realizar el análisis de la varianza se observó que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 49 del Anexo), estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraron entre los grupos de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l y el grupo control como indicó el test de Duncan (Figura 45 del Anexo). Para dichas concentraciones de plaguicida se obtuvieron valores de 224.60, 203.40 y 112.30 ng/μg respectivamente, mientras que para el control se alcanzó el valor de 320.85 ng/μg de peso.

Tras 48 horas de exposición, los niveles de lípidos descendieron desde 234.77 ng/μg en el control hasta 112.87 ng/μg peso con la concentración más alta de Tetradifón (0.44 mg/l). El test ANOVA indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 50 del Anexo) y el test de Duncan situó estas diferencias entre todos los tratamientos y el grupo control (Figura 46 del Anexo). El valor determinado en la concentración más alta de Tetradifón (0.44 mg/l) representó una reducción del 51% del contenido lipídico con respecto al control.

A las 72 horas se observó el mismo comportamiento que durante todo el ensayo, el descenso en el contenido lipídico fue mayor al aumentar la concentración de Tetradifón disuelto en el medio; así se obtiene para el control un valor de 309.48 ng/μg mientras que los diferentes tratamientos utilizados presentaron valores desde 265.10 ng/μg (0.10 mg/l) hasta 188.03 ng/μg (0.44 mg/l). Para comprobar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre estos valores se realizó el test ANOVA que indicó que si existían diferencias (Tabla 51 del Anexo). El test de Duncan indicó que eran los tratamientos de 0.18 mg/l y superiores los que presentaban estas diferencias ($p < 0.05$) con el control (Figura 47 del Anexo).

Transcurridas 96 horas se encuentra que los valores obtenidos oscilaron entre los 233.81 ng/ μ g obtenidos para el control y los 130.64 ng/ μ g obtenidos para la concentración de acaricida más alta utilizada (0.44 mg/l). El análisis de la varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.005$) entre los diferentes grupos (Tabla 52 del Anexo), y el test de Duncan mostró que estas diferencias se encontraban entre todos los tratamientos (excepto la concentración de 0.10 ppm) y el grupo control (Figura 48 del Anexo).

Finalmente, fue a las 120 horas donde más efecto produjo el Tetradifón sobre el contenido lipídico ya que se encuentran porcentajes de reducción con respecto al control del 17%, 73%, 83% y 89% para las concentraciones de 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente. El análisis de la varianza puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 53 del Anexo). El test de Duncan indicó que estas diferencias se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 49 del Anexo).

En ningún caso el control con acetona mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 13. Contenido de lípidos totales (ng/μg) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de Tetradifón durante distintos tiempos.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	239.15±37.22	-	-	-	-	-
24 horas	320.85±69.13	277.88±59.04	249.81±37.48	224.60±30.96*	203.40±52.45*	112.30±29.66*
48 horas	234.77±26.82	237.78±29.43	197.14±12.36*	191.12±11.41*	148.99±43.03*	112.87±28.15*
72 horas	309.48±23.72	274.45±14.30	265.10±20.89	227.73±28.61*	210.21±35.04*	188.03±65.21*
96 horas	233.81±48.73	220.50±60.93	178.90±50.70	174.74±15.00*	151.44±16.54*	130.64±24.54*
120 horas	203.39±6.23	204.95±4.25	167.68±58.91*	53.31±24.73*	33.64±6.07*	20.70±2.59*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.1.2.3. Niveles tisulares de proteínas.

En la Tabla 14 se muestran los valores obtenidos para el contenido en proteínas de *D. magna* expresado por peso; en la Figura 16 se representan estos valores en forma de porcentaje para todas las concentraciones de Tetradifón y todos los tiempos de exposición, al igual que se hizo para el contenido en glucógeno y lípidos.

Al comienzo del experimento (0 horas) se encuentra un valor inicial de proteínas de 251.67 ng/ μ g que aumentó con el tiempo en los individuos control durante las 24, 48 y 72 horas; sin embargo, en los tiempos más altos de 96 y 120 horas este valor disminuyó al aumentar el peso más rápidamente que el contenido proteico.

Durante las primeras 24 horas de exposición al plaguicida se observó un descenso en el contenido de proteínas que fue mayor al aumentar la concentración de Tetradifón en el medio. Para determinar si las diferencias que existen entre los diferentes tratamientos eran significativas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) el cual indicó la presencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 54 del Anexo). El test de Duncan posterior mostró que todos los tratamientos presentaban diferencias ($p < 0.05$) con el grupo control (Figura 50 del Anexo).

A las 48 horas, se observó que la reducción en los niveles proteicos no era tan evidente, encontrándose valores más próximos entre los diferentes grupos, estos valores oscilaron entre los 377.90 ng/ μ g obtenidos para el control y los 258.15 ng/ μ g obtenidos para la concentración de Tetradifón más alta utilizada (0.44 mg/l). Esta disminución de las diferencias hace que solamente las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l presentaran diferencias significativas con respecto al control tal como muestran el análisis de la varianza (Tabla 55 del Anexo) y el test de Duncan que las situó entre estos grupos y el control (Figura 51 del Anexo).

Tras 72 horas la situación fue similar, las diferencias entre los diferentes valores encontrados oscilaron entre los 347.01 ng/ μ g del control y los 266.81 ng/ μ g para la concentración de 0.44 mg/l, aun así el análisis de la varianza indicó que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 56 del Anexo), fue el test de Duncan posterior el que localizó estas diferencias entre los tratamientos de 0.22 y 0.44 mg/l y el grupo control (Figura 52 del Anexo).

Transcurridas 96 horas la situación cambió encontrándose que los valores obtenidos para los diferentes tratamientos se reducen; el valor para el control fue de

261.79 ng/ μ g de peso, un valor inferior al obtenido en tiempos anteriores, los diferentes tratamientos presentaron valores de: 188.44, 171.05, 165.26, 149.41 ng/ μ g (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente). Las diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los distintos grupos las indicó el análisis de la varianza (Tabla 57 del Anexo), fue el test de Duncan el que mostró que las diferencias se encontraban entre todos los tratamientos y el grupo control (Figura 53 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas, se observa que los valores obtenidos son los más bajos encontrados durante todos los tiempos, esto es debido al gran aumento de peso de los dáfidos. En este tiempo los valores obtenidos van desde los 211.81 ng/ μ g encontrados para el control y los 144.92 ng/ μ g obtenidos para la concentración de 0.44 mg/l. El porcentaje de reducción en las proteínas que presentaron las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l fue de 24 y 31% respectivamente. Las diferencias encontradas entre los diferentes grupos fueron significativas ($p < 0.001$) tal como indicó el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 58 del Anexo), el test de Duncan mostró que todos los tratamientos presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 54 del Anexo).

En ningún caso el control con acetona presentó diferencias significativas con el control.

Tabla 14. Contenido de proteínas (ng/ μ g) para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón a varios tiempos.

Tetradifón							
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm	
0 horas	251.67 \pm 26.78	-	-	-	-	-	
24 horas	364.32 \pm 34.07	362.85 \pm 27.72	296.40 \pm 15.04*	290.28 \pm 13.67*	272.00 \pm 33.20*	262.35 \pm 49.20*	
48 horas	377.90 \pm 34.16	361.99 \pm 51.41	346.11 \pm 32.14	333.86 \pm 80.20	262.84 \pm 48.00*	258.15 \pm 50.15*	
72 horas	347.01 \pm 17.87	347.75 \pm 21.52	323.28 \pm 33.18	314.06 \pm 14.11	274.15 \pm 13.10*	266.81 \pm 44.88*	
96 horas	261.79 \pm 23.68	262.60 \pm 26.74	188.44 \pm 8.93*	171.05 \pm 16.84*	165.26 \pm 15.71*	149.41 \pm 7.28*	
120 horas	211.81 \pm 18.25	211.33 \pm 12.27	183.45 \pm 17.40*	180.67 \pm 14.10*	160.49 \pm 19.95*	144.92 \pm 10.74*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

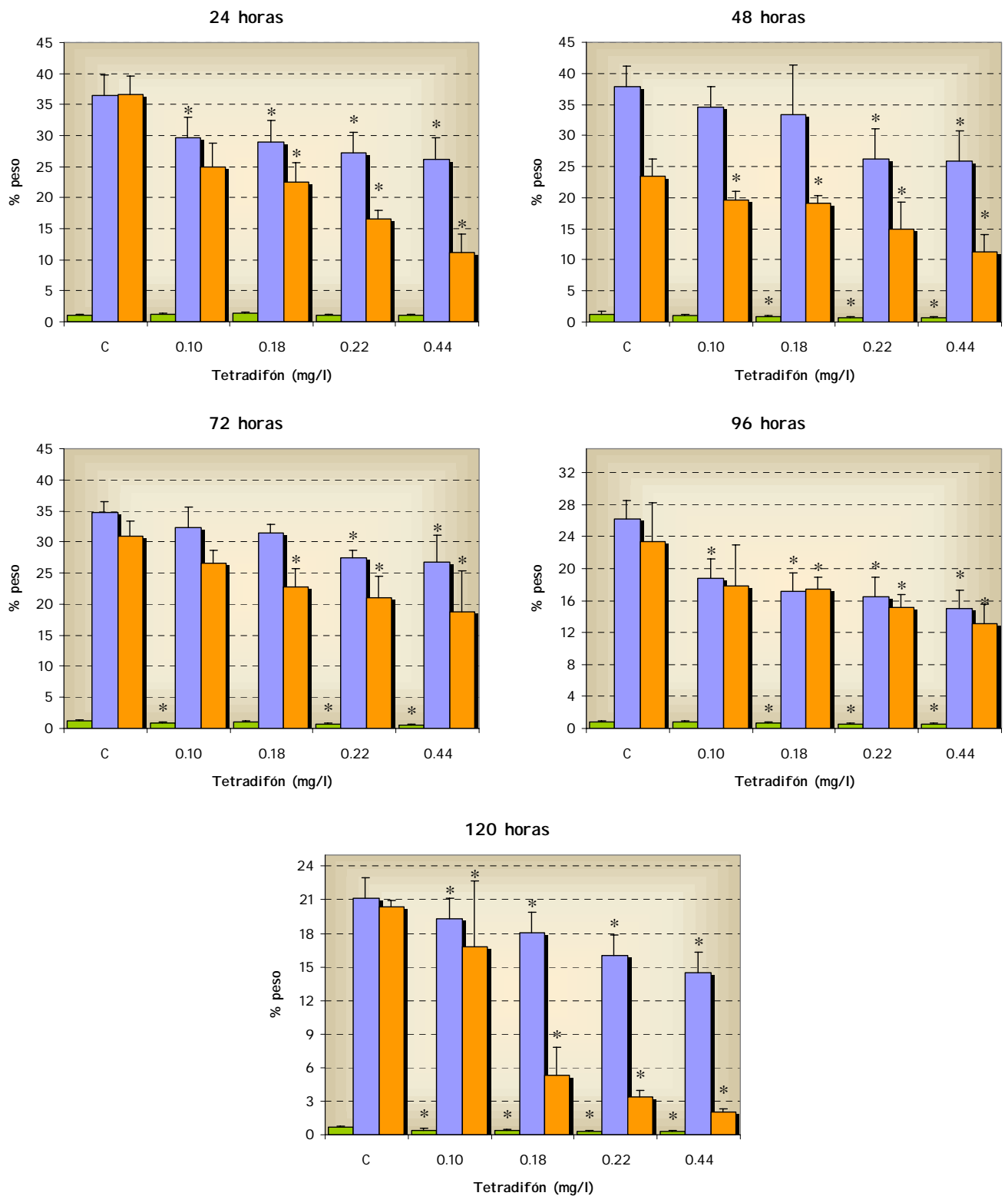


Figura 16. Porcentaje respecto al peso para Glucógeno ■, Proteínas ■, Lípidos ■ en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón. (*) p<0.05.

4.4.1.2.4. Contenido calórico.

Los valores obtenidos para el contenido calórico de *D. magna* expresado por peso se muestran en la Tabla 15. Se observa que el contenido calórico se reduce a medida que aumenta la concentración de Tetradifón en el medio, también se observa que la relación entre el peso y el contenido calórico aumenta al hacerlo la edad de los animales tratados, esto sólo se da durante las primeras 72 horas, ya que al producirse un mayor aumento en el peso de los dáfidos respecto al contenido calórico a partir de las 96 horas, lo que aparece es una disminución de esta relación. A pesar de ello entre las 96 y las 120 horas los individuos tratados presentaron valores inferiores que los valores obtenidos para los grupos control.

El contenido calórico en el momento inicial (0 horas) fue de 3.65 mcal/ μ g. Durante las primeras 24 horas se obtiene en el control un valor mayor al encontrado a las 0 horas (5.99 mcal/ μ g); para los diferentes tratamientos 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l los valores fueron de: 4.09, 3.62, 3.20 y 2.64 mcal/ μ g respectivamente. El estudio estadístico realizado indicó que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 59 del Anexo); estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraron entre todos los grupos tratados y el grupo control tal y como señaló el test de Duncan (Figura 55 del Anexo).

Pasadas 48 horas de exposición, hubo una situación similar, se produjo una reducción en el contenido calórico, que fue significativa ($p < 0.001$) como señaló el análisis de la varianza (Tabla 60 del Anexo), todos los grupos tratados presentaron diferencias ($p < 0.05$) con el control como reveló el test de Duncan (Figura 56 del Anexo).

Tras 72 horas los valores de contenido calórico estuvieron comprendidos entre las 4.93 mcal/ μ g del control y las 3.33 mcal/ μ g en la concentración más alta de 0.44 mg/l. Al realizar el análisis de la varianza se conoció la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los distintos grupos (Tabla 61 del Anexo). El test de Duncan señaló la existencia de diferencias ($p < 0.05$) entre todos los grupos tratados y el control (Figura 57 del Anexo).

A las 96 horas la situación fue similar a las encontradas en los tiempos anteriores. El contenido calórico disminuyó al aumentar la concentración de acaricida presente en el medio, los valores hallados fueron: 3.67, 2.82, 2.60, 2.49 y 2.13 mcal/ μ g para el control, 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l de Tetradifón.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 62 del Anexo). El test de Duncan situó estas diferencias entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 58 del Anexo).

Transcurridas 120 horas los valores obtenidos para todos los grupos fueron menores que en tiempos anteriores, esto, probablemente, es debido al gran aumento de peso que se produce en las últimas horas de exposición.

En este tiempo se encuentra que las reducciones que se producen en el contenido calórico con respecto al control fueron de: 25%, 50%, 58% y 64% para los grupos 0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l respectivamente. La existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos la puso de manifiesto el análisis de la varianza (Tabla 63 del Anexo). El test de Duncan indicó que estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 59 del Anexo).

En ningún caso el control con acetona mostró diferencias significativas con el grupo control.

Tabla 15. Contenido calórico (mcal/ μ g) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del acaricida Tetradifón durante 5 días.

Tetradifón						
Tiempo	Control	C+A	0.10 ppm	0.18 ppm	0.22 ppm	0.44 ppm
0 horas	3.65 \pm 0.39	-	-	-	-	-
24 horas	5.99 \pm 1.04	5.42 \pm 1.95	4.09 \pm 0.32*	3.62 \pm 0.32*	3.20 \pm 1.03*	2.64 \pm 0.33*
48 horas	4.53 \pm 0.29	4.47 \pm 0.41	3.80 \pm 0.15*	3.49 \pm 0.59*	2.93 \pm 0.38*	2.70 \pm 0.53*
72 horas	4.93 \pm 0.26	4.54 \pm 0.12	4.26 \pm 0.28*	3.85 \pm 0.41*	3.34 \pm 0.56*	3.33 \pm 0.53*
96 horas	3.67 \pm 0.45	3.60 \pm 0.59	2.82 \pm 0.48*	2.60 \pm 0.27*	2.49 \pm 0.24*	2.13 \pm 0.29*
120 horas	3.14 \pm 0.12	3.18 \pm 0.06	2.33 \pm 0.74*	1.54 \pm 0.21*	1.32 \pm 0.20*	1.13 \pm 0.07*

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.2. HERBICIDA PROPANIL

4.4.2.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).

4.4.2.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Los datos pertenecientes a este parámetro se encuentran en la Tabla 16, y en la Figura 17 se representan los resultados como porcentaje respecto al control para cada tiempo y para cada concentración de Propanil utilizada.

En general, se puede ver que al aumentar la concentración del herbicida Propanil en el medio disminuye el contenido en glucógeno presente en los organismos. También se observa que al aumentar la edad de los individuos lo hace el contenido en glucógeno presente en los mismos.

Al inicio del experimento, la cantidad de glucógeno determinada en los dáfidos fue de 0.17 $\mu\text{g/Daphnia}$, este valor aumentó en el grupo control con la duración del ensayo hasta alcanzar 0.72 $\mu\text{g/Daphnia}$.

A las 24 horas los valores de glucógeno encontrados oscilaron entre los 0.39 $\mu\text{g/Daphnia}$ (control) y los 0.30 $\mu\text{g/Daphnia}$ en la concentración más alta de 0.55 mg/l. El análisis de la varianza mostró que no existían diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 64 del Anexo).

Tras 48 horas de exposición a Propanil la situación fue similar, los valores obtenidos oscilaron entre 0.49 $\mu\text{g/Daphnia}$ y 0.44 $\mu\text{g/Daphnia}$ para la concentración de 0.55 mg/l. El análisis de la varianza señaló que no existían diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 65 del Anexo).

Transcurridas 72 horas de experimentación la situación no cambió con respecto a lo ya encontrado a las 24 y 48 horas; aunque se ve una disminución en los contenidos de glucógeno estas disminuciones no fueron significativas tal y como mostró el análisis de la varianza (Tabla 66 del Anexo).

La situación encontrada en los tiempos anteriores cambió tras 96 horas de exposición al herbicida pues los descensos en el contenido de glucógeno fueron significativos para las concentraciones de Propanil más altas de 0.21 y 0.55 mg/l.

Los valores obtenidos fueron 0.61, 0.57, 0.54, 0.47 y 0.44 $\mu\text{g/Daphnia}$ para los siguientes tratamientos respectivamente: control, 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l.

El análisis de la varianza (ANOVA) señaló la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos (Tabla 67 del Anexo). El test de Duncan situó estas diferencias entre los grupos tratados con 0.21 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 60 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas, es donde más diferencias se encuentran, ya que los tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Esto fue conocido al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 68 del Anexo), y el posterior test de Duncan puso se manifiesto que las diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre los tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 61 del Anexo). Los porcentajes de reducción encontrados para estos tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l fueron de: 17%, 19% y 28% respectivamente.

Tabla 16. Valores obtenidos para el glucógeno tisular ($\mu\text{g}/\text{Daphnia}$) en *D. magna* expuesta durante 5 días a diversas concentraciones de Propanil.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	0.17 \pm 0.01	-	-	-	-	
24 horas	0.39 \pm 0.10	0.34 \pm 0.04	0.32 \pm 0.07	0.31 \pm 0.05	0.30 \pm 0.08	
48 horas	0.49 \pm 0.11	0.49 \pm 0.08	0.49 \pm 0.07	0.44 \pm 0.04	0.44 \pm 0.05	
72 horas	0.56 \pm 0.10	0.54 \pm 0.10	0.52 \pm 0.07	0.49 \pm 0.07	0.48 \pm 0.10	
96 horas	0.61 \pm 0.09	0.57 \pm 0.08	0.54 \pm 0.10	0.47 \pm 0.04*	0.44 \pm 0.07*	
120 horas	0.72 \pm 0.07	0.67 \pm 0.13	0.60 \pm 0.04*	0.58 \pm 0.07*	0.52 \pm 0.09*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

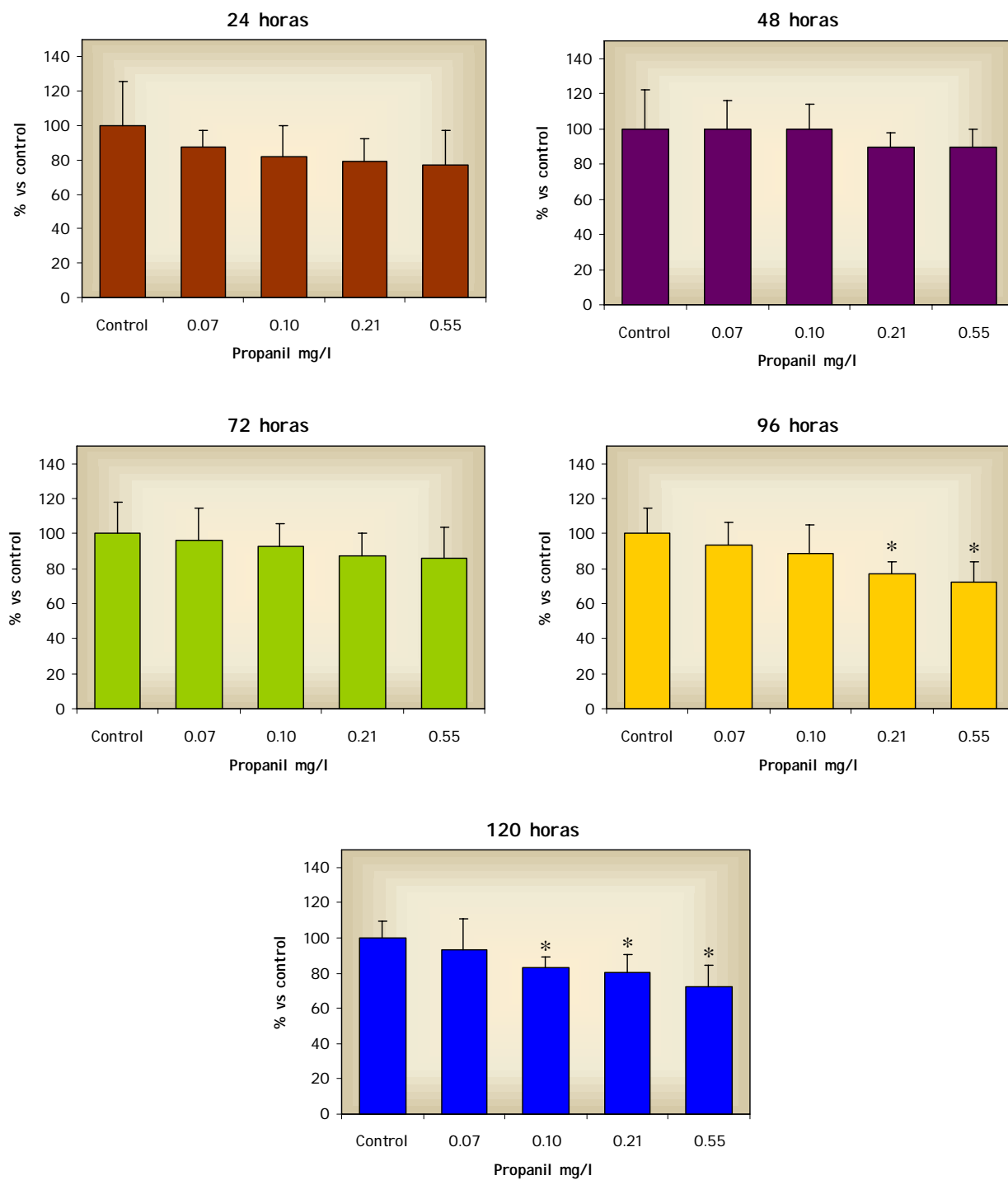


Figura 17. Contenido de glucógeno (porcentajes respecto al control) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil. (*) $p < 0.05$.

4.4.2.1.2. Niveles tisulares de lípidos.

Los resultados obtenidos para este parámetro aparecen en la Tabla 17. Además, en la Figura 18 se representan estos mismos resultados en forma de porcentaje respecto al control para los diferentes tratamientos con Propanil y a los distintos tiempos de exposición.

Se observa que el contenido lipídico de *D. magna* disminuyó al aumentar la concentración de Propanil en el medio; por otra parte, el contenido lipídico aumentó al aumentar la edad de los individuos en todos los casos.

Al inicio del experimento (0 horas) el contenido lipídico de los animales era de 4.40 $\mu\text{g/Daphnia}$ y llegó a ser de 19.28 $\mu\text{g/Daphnia}$ al final del ensayo (120 horas). A las 24 horas se vió reducido al aumentar la concentración de Propanil; así, el control presentó valores de 7.47 $\mu\text{g/Daphnia}$ mientras que con la concentración de 0.55 mg/l se obtuvo un valor de 4.13 $\mu\text{g/Daphnia}$, que es incluso menor que el obtenido al inicio del experimento. El análisis de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 69 del Anexo). El posterior test de Duncan situó las diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos de 0.21 y 0.55 mg/l con el control (Figura 62 del Anexo).

A las 48 horas de exposición al herbicida los valores lipídicos oscilaron entre los 8.26 $\mu\text{g/Daphnia}$ y los 5.40 $\mu\text{g/Daphnia}$ con el tratamiento de 0.55 mg/l. Al realizar el análisis de la varianza se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0.005$) entre los diferentes grupos (Tabla 70 del Anexo). El test de Duncan ubicó las diferencias ($p < 0.05$) entre el tratamiento de 0.55 mg/l y el control (Figura 63 del Anexo).

Es a partir de las 72 horas cuando cambió la situación. La reducción en el contenido lipídico se acentuó; y fue máxima con la concentración de 0.55 mg/l (53% respecto al control). Los valores encontrados para las diferentes concentraciones de Propanil fueron: 7.84, 7.33, 6.89 y 5.04 $\mu\text{g/Daphnia}$ para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente, el control presentó un valor de 10.78 $\mu\text{g/Daphnia}$. El análisis de la varianza mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 71 del Anexo). El test de Duncan situó las diferencias ($p < 0.05$) con todos los tratamientos de Propanil y el grupo control (Figura 64 del Anexo).

Tras 96 horas la situación se repitió; los lípidos se redujeron por la presencia de concentraciones crecientes de Propanil.

Los niveles de lípidos encontrados en este tiempo presentaron una menor reducción que la encontrada a las 72 horas, obteniéndose valores que oscilaron desde 12.16 a 9.47 $\mu\text{g/Daphnia}$ para las concentraciones de 0.07 y 0.55 mg/l, el control presentó un valor de 15.23 $\mu\text{g/Daphnia}$. Al realizar el análisis estadístico se vió la existencia de diferencias significativas tal y como mostró el ANOVA correspondiente ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 72 del Anexo). El posterior test de Duncan situó las diferencias entre todos los tratamientos y el grupo control (Figura 65 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas, se encontró que los porcentajes de reducción que presentaron cada uno de los tratamientos fueron de: 16%, 22%, 27% y 31% para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó la presencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 73 del Anexo). El test de Duncan situó estas diferencias entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 66 del Anexo).

Tabla 17. Valores obtenidos para los lípidos totales ($\mu\text{g/Daphnia}$) en *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de Propanil durante distintos tiempos.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	4.40 \pm 0.68	-	-	-	-	
24 horas	7.47 \pm 1.53	6.56 \pm 0 \pm 0.87	6.86 \pm 0.85	4.37 \pm 1.38*	4.13 \pm 1.40*	
48 horas	8.26 \pm 0.54	7.47 \pm 0.46	7.29 \pm 0.77	7.04 \pm 1.26	5.40 \pm 1.35*	
72 horas	10.78 \pm 1.90	7.84 \pm 0.48*	7.33 \pm 1.23*	6.89 \pm 0.86*	5.04 \pm 0.99*	
96 horas	15.23 \pm 1.13	12.16 \pm 0.91*	11.71 \pm 1.00*	11.25 \pm 0.19*	9.47 \pm 1.28*	
120 horas	19.28 \pm 0.68	16.15 \pm 2.10*	15.10 \pm 1.25*	14.06 \pm 0.91*	13.36 \pm 0.31*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$

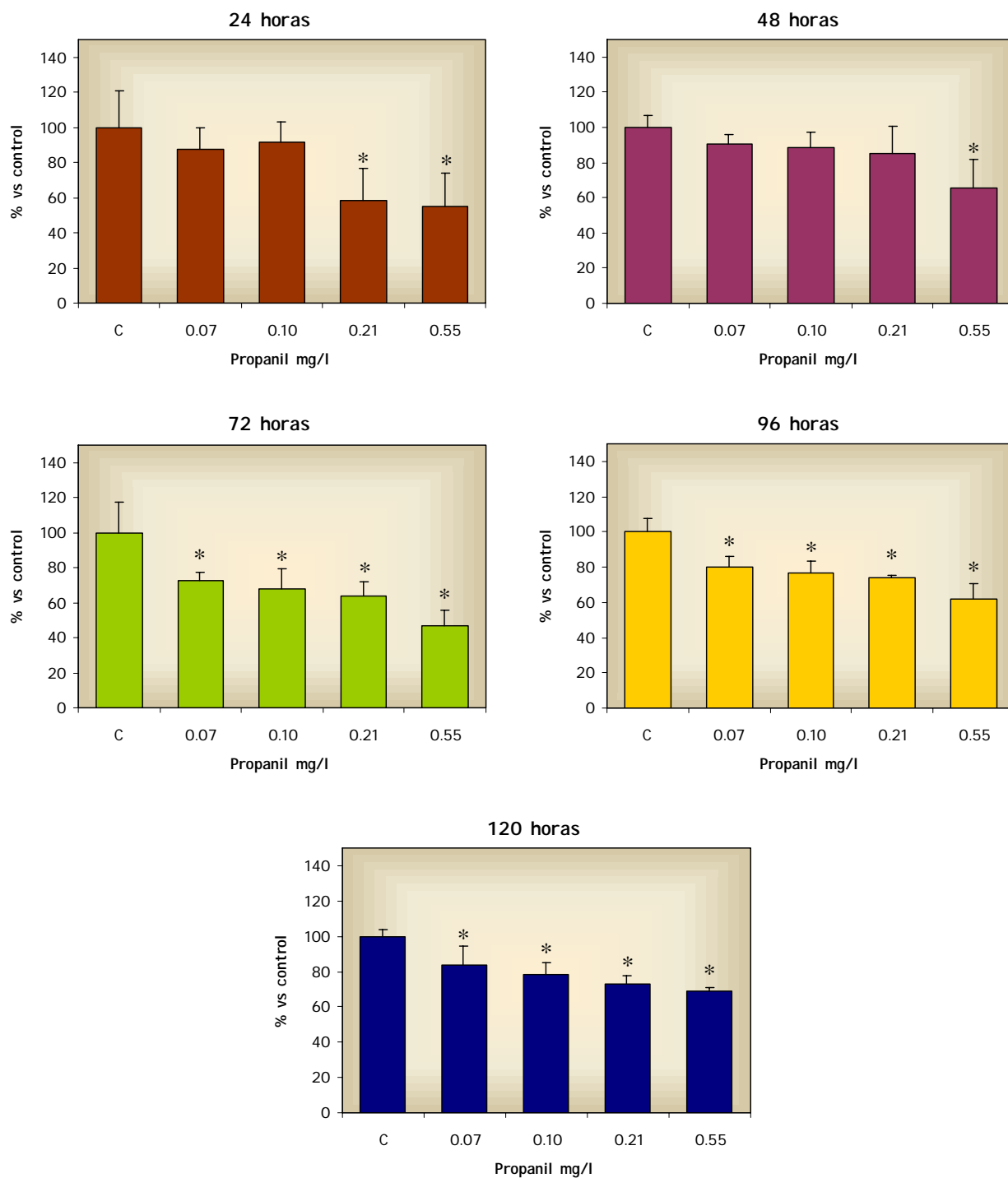


Figura 18. Contenido en lípidos (porcentajes respecto al control) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil durante 5 días. (*) $p < 0.05$.

4.4.2.1.3. Niveles tisulares de proteínas.

Los valores obtenidos para este parámetro en *D. magna* se muestran en la Tabla 18; en la Figura 19 se representan los porcentajes respecto al control para estos valores en todos los tiempos y para todas las concentraciones de Propanil utilizadas.

Los resultados indicaron que durante las primeras horas se dieron reducciones importantes en los niveles de proteínas. Para todos los tiempos de exposición se encontró que el aumento de la concentración de Propanil produjo una reducción en el contenido de proteínas en los dáfidos; a pesar de esta reducción, el contenido en proteínas aumentó con la edad de los individuos; los descensos encontrados durante las primeras horas se fueron reduciendo a medida que aumentó la edad de los animales tratados.

Al comienzo del experimento (0 horas) los niveles de proteínas fueron de 4.30 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ y aumentaron al aumentar la edad de los individuos. Transcurridas 24 horas de exposición a Propanil el valor del contenido proteico disminuyó, los valores obtenidos para los diferentes tratamientos de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l fueron: 3.54, 3.12, 2.08 y 1.69 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ respectivamente, el control presentó un valor de 5.11 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$. Estos valores representaron unos porcentajes de reducción del 31%, 39%, 59% y 67% respectivamente. El análisis de la varianza señaló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 74 del Anexo). El test de Duncan indicó que las diferencias se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 67 del Anexo).

A las 48 horas de exposición a Propanil la situación fue similar aunque las reducciones en los niveles proteicos fueron menores. Los resultados estuvieron comprendidos entre los 11.73 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ encontrados en el control y los 6.48 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ encontrados con la concentración de 0.55 mg/l. El análisis de la varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los distintos grupos (Tabla 75 del Anexo). El posterior test de Duncan situó estas diferencias ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos y el grupo control (Figura 68 del Anexo).

Una vez pasadas las 72 horas se vió que los contenidos proteicos en los grupos tratados presentaron un aumento respecto a los valores obtenidos en los tiempos anteriores, estos fueron: 15.63, 14.10, 13.74 y 12.68 $\mu\text{g}/\text{Daphnia}$ para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente, todos estos valores

presentaron diferencias significativas con respecto al control tal y como mostró el análisis de la varianza (Tabla 76 del Anexo) y el posterior test de Duncan (Figura 69 del Anexo).

Tras 96 horas se observó que los niveles de proteínas iban en aumento respecto del tiempo anterior, encontrándose valores comprendidos entre los 21.85 $\mu\text{g/Daphnia}$ del control y los 15.73 $\mu\text{g/Daphnia}$ de la concentración de 0.55 mg/l. Este es el único tiempo en el que no todos los tratamientos presentan diferencias significativas con el grupo control. Esto se puso de manifiesto al realizar el análisis de la varianza (Tabla 77 del Anexo), y el posterior test de Duncan que descubrió que las diferencias significativas se encontraban entre los grupos tratados con 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 70 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas los valores obtenidos fueron los más altos encontrados para cada uno de los tratamientos. Los porcentajes de reducción fueron del 25 y 26% con las concentraciones de Propanil de 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. El análisis de la varianza mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 78 del Anexo). El test de Duncan indicó que todos los tratamientos presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control (Figura 71 del Anexo).

Tabla 18. Contenido en proteínas ($\mu\text{g}/\text{Daphnia}$) para *D. magna* tratada con concentraciones crecientes del herbicida Propanil a diferentes tiempos.

		Propanil					
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm		
0 horas	4.30 \pm 0.52	-	-	-	-		
24 horas	5.11 \pm 0.99	3.54 \pm 1.26*	3.12 \pm 0.53*	2.08 \pm 0.49*	1.69 \pm 0.42*		
48 horas	11.73 \pm 0.88	9.19 \pm 1.51*	8.64 \pm 2.22*	5.69 \pm 1.01*	6.48 \pm 0.76*		
72 horas	17.39 \pm 0.48	15.63 \pm 0.19*	14.10 \pm 1.28*	13.74 \pm 1.17*	12.68 \pm 1.17*		
96 horas	21.85 \pm 0.29	20.45 \pm 1.46	18.90 \pm 2.66*	18.17 \pm 1.15*	15.73 \pm 2.70*		
120 horas	25.51 \pm 0.92	22.02 \pm 3.15*	19.97 \pm 1.24*	19.33 \pm 0.50*	18.95 \pm 1.75*		

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

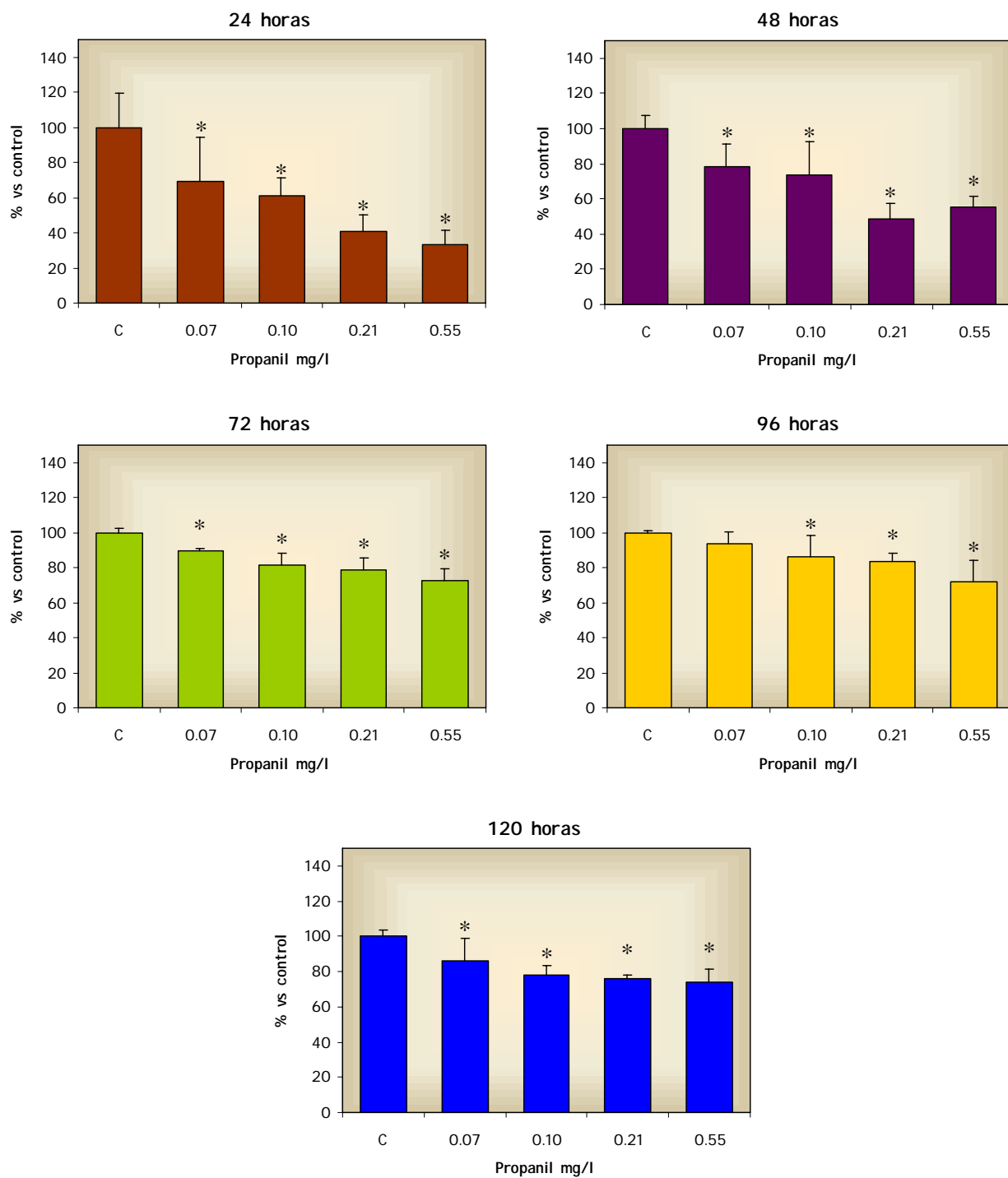


Figura 19. Contenido en proteínas (porcentajes respecto al control) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil. (*) $p < 0.05$.

4.4.2.1.4. Contenido calórico.

Los valores determinados para este parámetro aparecen en la Tabla 19; en la Figura 20 se representan estos valores en forma de porcentaje respecto al control para cada tratamiento y para los diferentes tiempos de exposición a Propanil.

Se puede observar que para todos los tiempos de exposición el aumento de la concentración de Propanil en el medio se tradujo en una reducción en el contenido calórico de los individuos. A pesar de ello, el contenido calórico aumentó con la edad de los organismos siendo el valor mayor para los animales expuestos a 120 horas.

En el inicio del experimento (0 horas) el contenido calórico de *D. magna* fue de 67.24 mcal/Daphnia. Durante las primeras 24 horas se determinó la existencia de diferencias significativas al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 79 del Anexo). El test de Duncan fue el que situó estas diferencias ($p < 0.05$) entre todos los grupos tratados y el control (Figura 72 del Anexo). Los valores obtenidos para los grupos tratados con 0.21 y 0.55 mg/l fueron menores que los encontrados a las 0 horas, el porcentaje de reducción que presentaron estas concentraciones con respecto al control fue de 51 y 55% respectivamente.

Pasadas las 48 horas se encontró que el herbicida Propanil produjo un descenso del contenido calórico en los animales, los valores obtenidos para los diferentes tratamientos oscilaron entre las 144.60 mcal/Daphnia calculadas en el control y las 91.38 mcal/Daphnia obtenidas con la concentración más alta de 0.55 mg/l. La reducción obtenida en este tiempo fue menor que la obtenida a las 24 horas, ya que para la concentración más alta fue del 36%. El análisis de la varianza informó de la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 80 del Anexo), el test de Duncan indicó que estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 73 del Anexo).

Resultados similares se hallaron tras 72 horas de exposición a Propanil. El aumento en la concentración de herbicida produjo un descenso del contenido calórico. Los valores obtenidos para este tiempo fueron: 162.60, 152.10, 145.58 y 122.50 mcal/Daphnia para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l, el control mostró un valor de 201.70 mcal/Daphnia. El análisis de la varianza indicó que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 81 del Anexo). El test de Duncan emplazó estas diferencias entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 74 del Anexo).

Superadas las 96 horas se encontraron los mismos efectos que en los tiempos anteriores, el aumento de herbicida en el medio produjo un descenso en el contenido calórico. Los valores hallados durante este tiempo oscilaron entre las 268.56 mcal/Daphnia del control y las 180.18 mcal/Daphnia de la concentración más alta de 0.55 mg/l. Al realizar el análisis de la varianza se encontró que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 82 del Anexo). El test de Duncan indicó que estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre todos los grupos tratados y el control (Figura 75 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas se halló de nuevo el mismo efecto del Propanil en el contenido calórico de *D. magna*, en este caso la concentración de 0.55 mg/l presentó un porcentaje de reducción del 26%. Los valores obtenidos fueron: 272.68, 266.76, 254.66 y 237.58 mcal/Daphnia para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l de Propanil respectivamente; el valor control fue de 324.32 mcal/Daphnia. Con estos datos al realizar el análisis de la varianza se encontró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos (Tabla 83 del Anexo). El test de Duncan situó estas diferencias entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 76 del Anexo).

Tabla 19. Contenido calórico (mcal/Daphnia) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil durante 120 horas.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	67.24±6.35	-	-	-	-	
24 horas	114.22±33.12	83.54±13.68*	76.92±16.54*	55.88±14.01*	50.90±10.41*	
48 horas	144.60±8.36	123.16±14.24*	120.48±11.29*	111.74±9.30*	91.38±9.00*	
72 horas	201.70±17.40	162.60±1.74*	152.10±14.29*	145.58±11.97*	122.50±16.23*	
96 horas	268.56±12.62	235.02±9.01*	232.14±9.01*	214.82±13.82*	180.18±16.63*	
120 horas	324.32±10.39	272.68±19.92*	266.76±5.07*	254.66±12.27*	237.58±9.54*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

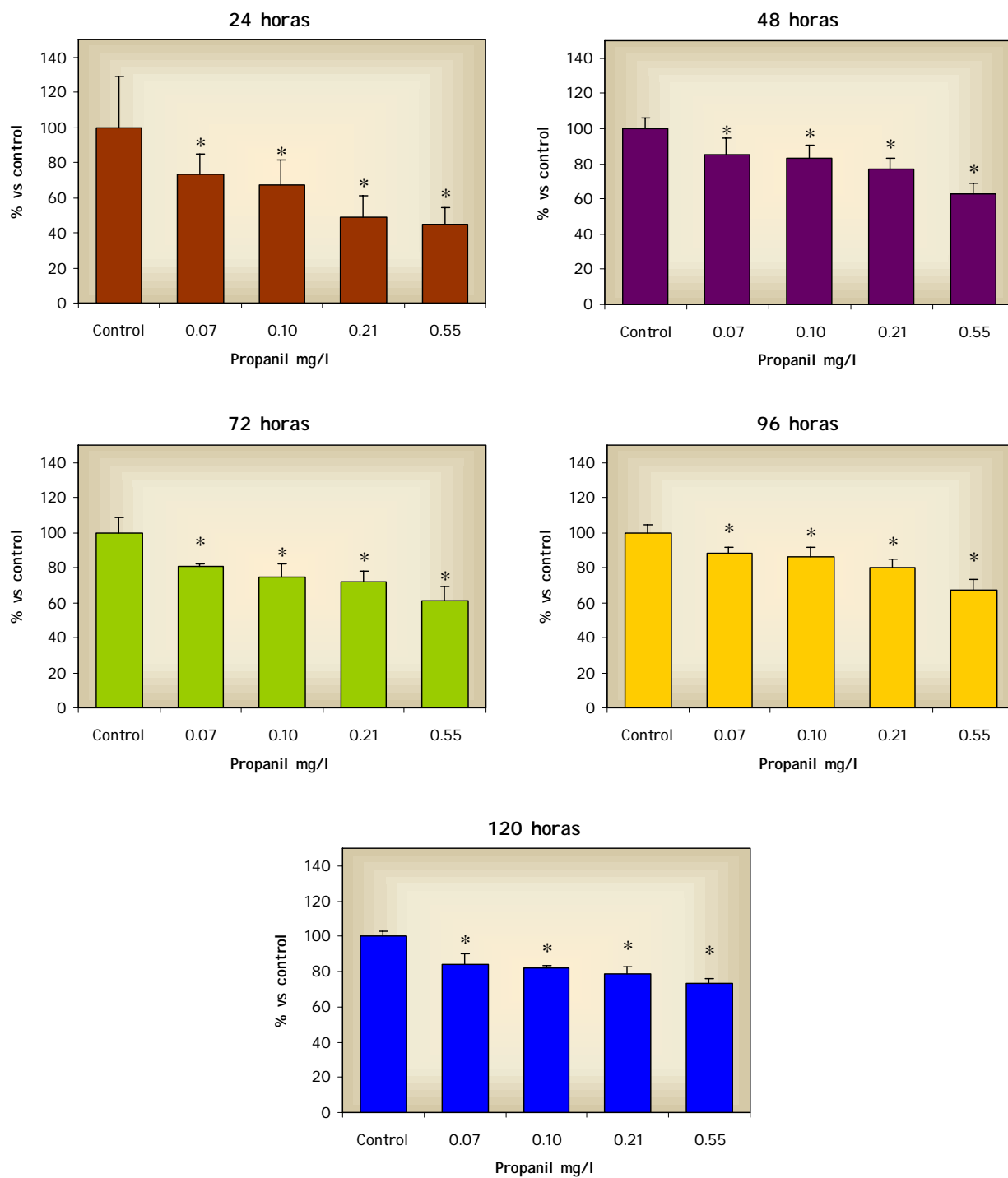


Figura 20. Contenido calórico (porcentajes respecto al control) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil. (*) $p < 0.05$.

4.4.2.1.5. Peso seco.

Los valores determinados para este parámetro aparecen reflejados en la Tabla 20. Al examinar los resultados, se puso de manifiesto que durante las primeras horas de exposición al herbicida la reducción que se produjo en el peso de los dáfidos es muy acusada. Por otra parte, al aumentar la edad de los individuos aumentó el peso de los mismos en todos los tratamientos. Las diferencias que se observaron entre los diferentes tratamientos y el control se fueron reduciendo a medida que aumentó la edad de los individuos.

Al inicio del experimento (0 horas) los animales presentaron un peso de 18.40 $\mu\text{g/Daphnia}$.

Durante las primeras 24 horas el efecto del Propanil sobre el peso fue muy importante ya que se determinó una reducción de casi el 50% para la concentración de herbicida más alta de 0.55 mg/l. Los porcentajes de reducción para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l fueron: 25%, 29%, 31% y 47% respectivamente. Al realizar el análisis de la varianza se observó que las diferencias que se encontraron entre los grupos eran significativas ($p < 0.005$) (Tabla 84 del Anexo) para conocer entre qué grupos existían estas diferencias se realizó el test de Duncan el cual indicó que todos los grupos tratados con herbicida presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo control (Figura 77 del Anexo).

Tras 48 horas, las reducciones en el peso de los individuos fueron menos acusadas, encontrándose valores de 29.60, 28.00, 22.40 y 23.60 $\mu\text{g/Daphnia}$ para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente, el control presentó un valor de 36.40 $\mu\text{g/Daphnia}$. Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) con los datos obtenidos, se vió que existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos grupos (Tabla 85 del Anexo). El test de Duncan reveló que los grupos que presentaban estas diferencias ($p < 0.05$) con el control eran los tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l (Figura 78 del Anexo).

A las 72 horas vemos que las diferencias entre los grupos tratados y el control se reducen todavía más, los resultados oscilaron entre 38.80 y 24.40 μg para el control y 0.55 mg/l respectivamente. El análisis de la varianza indicó que existían diferencias significativas ($p < 0.005$) entre los diferentes grupos (Tabla 86 del Anexo). El test de Duncan determinó que los grupos que presentaban estas diferencias ($p < 0.05$) con el control eran los tratamientos más altos (0.21 y 0.55 mg/l) (Figura 79 del Anexo).

En los últimos tiempos de exposición las diferencias entre los grupos se redujeron tanto que ya no aparecieron diferencias significativas. Así, a las 96 horas los valores obtenidos se sitúan entre los 50.40 $\mu\text{g/Daphnia}$ del control y los 43.20 $\mu\text{g/Daphnia}$ de la concentración de 0.55 mg/l. Al elaborar el análisis de la varianza se vió que no existían diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 87 del Anexo).

Finalmente a las 120 horas, se repite la situación; ningún grupo de los expuestos a Propanil presentó diferencias significativas con el grupo control, los valores obtenidos oscilaron entre los 80.80 $\mu\text{g/Daphnia}$ del control y los 71.20 $\mu\text{g/Daphnia}$ de la concentración de 0.55 mg/l. Con estos datos se estableció el análisis de la varianza el cual señaló que no existían diferencias significativas (Tabla 88 del Anexo).

Tabla 20. Valores obtenidos para el peso seco ($\mu\text{g/Daphnia}$) para *D. magna* tratada con varias concentraciones del herbicida Propanil durante 5 días.

		Propanil					
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm		
0 horas	18.40 \pm 2.61	-	-	-	-	-	
24 horas	22.00 \pm 4.00	16.40 \pm 2.19*	15.60 \pm 2.61*	15.20 \pm 5.22*	11.60 \pm 1.67*		
48 horas	36.40 \pm 3.29	29.60 \pm 7.93	28.00 \pm 4.24*	22.40 \pm 4.78*	23.60 \pm 6.84*		
72 horas	38.80 \pm 1.79	36.80 \pm 4.15	36.40 \pm 4.78	28.00 \pm 8.37*	24.40 \pm 6.07*		
96 horas	50.40 \pm 6.07	42.40 \pm 6.07	46.40 \pm 6.07	45.60 \pm 4.56	43.20 \pm 10.73		
120 horas	80.80 \pm 3.35	78.40 \pm 4.56	73.60 \pm 8.76	74.40 \pm 2.19	71.20 \pm 5.22		

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.2.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).

4.4.2.2.1. Niveles tisulares de glucógeno.

En la Tabla 21 aparecen los resultados obtenidos para este parámetro y en la Figura 21 se representan los porcentajes con respecto al peso para cada uno de los tratamientos y cada tiempo de exposición a Propanil.

Durante los primeros tiempos de exposición se observó que los niveles de glucógeno aumentaron, debido a la gran reducción que el Propanil produce sobre el peso de los individuos en las primeras horas de exposición. Esto hace que la relación entre el contenido en glucógeno y el peso aumente; sin embargo, a las 96 y 120 horas es donde el efecto producido por el Propanil sobre el peso no fue significativo puesto que los valores de glucógeno obtenidos disminuyeron al aumentar la concentración de herbicida en el medio.

Al inicio del experimento (0 horas) el contenido en glucógeno fue de 9.46 ng/ μ g de peso. Durante las primeras 24 horas se observó un aparente aumento en el contenido de glucógeno al aumentar la concentración de herbicida en el medio, debido como ya se ha comentado a la gran reducción que el Propanil produjo sobre el peso de los individuos, a pesar de ello no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control tal y como mostró el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 89 del Anexo).

A las 48 horas se observó que al aumentar la concentración de Propanil en el medio también lo hace la relación entre el contenido de glucógeno y el peso de *D. magna*, los valores obtenidos para las diferentes concentraciones fueron: 13.62, 16.69, 17.36, 19.75 y 18.50 ng/ μ g para el control y las concentraciones de: 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. Este aumento en la relación contenido de glucógeno/peso fue significativo para las concentraciones de Propanil 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l, tal como puso de manifiesto el análisis de la varianza (Tabla 90 del Anexo) y el posterior test de Duncan (Figura 80 del Anexo).

Transcurridas 72 horas, el incremento en la relación entre el contenido en glucógeno y el peso de los dáfidos se redujo al darse, probablemente, un menor efecto del Propanil sobre el peso de los animales.

Los valores obtenidos oscilaron de los 14.42 ng/ μ g del control a los 19.70 ng/ μ g obtenidos en la concentración más alta de herbicida. En este tiempo, únicamente la concentración de 0.55 mg/l presentó diferencias significativas con respecto al control, como lo indicó el análisis de la varianza (Tabla 91 del Anexo) y el posterior test de Duncan (Figura 81 del Anexo).

Pasadas las 96 horas, el efecto de reducción que produce el Propanil sobre el peso es mucho menor y por ello se encuentra que la relación entre el contenido de glucógeno y el peso disminuye, ya que, además, el peso aumenta rápidamente. A partir de aquí, se ve que al aumentar la concentración de Propanil en el medio disminuye el contenido en glucógeno respecto al peso, encontramos valores de: 12.15, 13.54, 11.92, 10.34, 10.25 ng/ μ g para el control y las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. Al realizar el análisis de la varianza se vio que no existían diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 92 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas, los niveles de glucógeno fueron menores que los anteriores, ya que es en este tiempo donde se registra un mayor peso en los individuos utilizados en el ensayo. Así aparecen valores próximos comprendidos entre los 8.95 ng/ μ g del control y los 7.36 ng/ μ g de la concentración de 0.55 mg/l. El análisis de la varianza (ANOVA) no indicó que existieran diferencias significativas entre los grupos (Tabla 93 del Anexo).

Tabla 21. Valores obtenidos para el glucógeno tisular (ng/ μ g) en *D. magna* expuesta durante 5 días a diversas concentraciones de Propanil.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	9.46 \pm 0.70	-	-	-	-	
24 horas	17.71 \pm 4.45	20.96 \pm 2.65	20.39 \pm 4.30	20.61 \pm 3.43	26.26 \pm 6.88	
48 horas	13.62 \pm 2.77	16.69 \pm 2.54	17.36 \pm 2.43*	19.75 \pm 1.77*	18.50 \pm 2.21*	
72 horas	14.42 \pm 2.46	13.12 \pm 2.68	14.18 \pm 1.91	17.66 \pm 2.42	19.70 \pm 3.99*	
96 horas	12.15 \pm 1.72	13.54 \pm 1.91	11.92 \pm 2.42	10.34 \pm 0.82	10.25 \pm 1.73	
120 horas	8.95 \pm 0.83	8.55 \pm 1.68	8.98 \pm 1.68	7.83 \pm 0.90	7.36 \pm 1.24	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.2.2.2. Niveles tisulares de lípidos.

Los resultados obtenidos para este parámetro se muestran en la Tabla 22; en la Figura 21 se representan estos valores en porcentaje respecto al peso junto con los porcentajes respecto al peso obtenidos para el glucógeno y las proteínas.

En el caso de los lípidos el efecto que supone el peso no fue tan importante como ocurrió con los niveles de glucógeno; en este caso, el aumento de la concentración de Propanil en el medio si que produjo un descenso más evidente en el contenido de lípidos, este descenso fue más acentuado en los tiempos de 96 y 120 horas.

Al comienzo del experimento (0 horas) el contenido lipídico fue de 239.15 ng/μg. En las 24 horas siguientes se observó un ligero ascenso en el contenido de lípidos al aumentar la concentración de Propanil en el medio; este ascenso no fue significativo en ninguno de los casos, tal y como mostró el análisis de la varianza (Tabla 94 del Anexo). Los valores encontrados para los diferentes grupos se situaron entre los 339.53 ng/μg del control y los 356.00 ng/μg de la concentración de 0.55 mg/l.

A las 48 horas se produce también se produjo un ligero incremento en los niveles de lípidos al aumentar la concentración de Propanil en el medio, este incremento sólo fue significativo con la concentración de 0.21 mg/l, tal y como indicaron el análisis de la varianza (Tabla 95 del Anexo) y el test de Duncan (Figura 82 del Anexo).

Transcurridas 72 horas se comienza a apreciar un descenso en los niveles de lípidos respecto al aumento de la concentración de herbicida, los valores obtenidos fueron: 227.73, 213.12, 201.45, 245.94 y 206.44 ng/μg para el control y las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se vió que existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos (Tabla 96 del Anexo). El test de Duncan estableció que estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre las concentraciones de 0.07, 0.10 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 83 del Anexo).

Pasadas 96 horas, al igual que en el periodo anterior, hubo un descenso en el contenido de lípidos paralelo al aumento de la concentración de Propanil en el medio. En este caso los valores obtenidos fueron: 302.16, 286.90, 252.31, 246.71 y 219.13 ng/μg para el control y las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente.

El análisis de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los diferentes grupos (Tabla 97 del Anexo).

El test de Duncan reveló que estas diferencias ($p < 0.05$) se encontraban entre los tratamientos de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 84 del Anexo).

Finalmente, a las 120 horas, fue donde se produjo una mayor reducción en el contenido lipídico, siendo esta reducción evidente desde la concentración de Propanil más baja utilizada, los porcentajes de reducción encontrados con respecto al grupo control fueron: 13%, 14%, 20% y 21% para las concentraciones de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. Al realizar el análisis de la varianza se vió que existían diferencias ($p < 0.001$) significativas entre los diferentes grupos (Tabla 98 del Anexo). El test de Duncan indicó que estas diferencias se encontraban entre todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 85 del Anexo).

Tabla 22. Valores obtenidos para los lípidos totales (ng/μg) en *D. magna* expuesta a diversas concentraciones de Propanil durante distintos tiempos.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	239.15±37.22	-	-	-	-	
24 horas	339.53±69.42	399.92±53.34	385.39±83.85	287.66±91.11	356.00±120.81	
48 horas	226.90±14.92	252.35±15.56	260.27±27.65	314.49±56.22*	229.02±57.11	
72 horas	227.73±49.09	213.12±13.14*	201.45±33.92*	245.94±30.76	206.44±40.69*	
96 horas	302.16±22.36	286.90±21.37	252.31±21.59*	246.71±4.20*	219.13±29.61*	
120 horas	238.62±8.40	205.98±26.75*	205.22±16.92*	188.98±12.20*	187.70±4.37*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

4.4.2.2.3. Niveles tisulares de proteínas.

Los resultados obtenidos para este parámetro aparecen en la Tabla 23; en la Figura 21 se representa el porcentaje respecto al peso para los valores obtenidos en todos los tiempos y para todas las concentraciones.

En general, se observa que con los tiempos de exposición más altos hay mayor efecto del herbicida en la relación entre el contenido proteico y el peso; como ocurre con los parámetros anteriores. El peso de los dáfidos se ve muy afectado durante las primeras horas de exposición, así, a pesar de presentar en esos tiempos contenidos más bajos de proteínas, al calcular la relación entre este contenido y el peso se encuentra que hay pocas diferencias con el control o que, incluso, se presenta un aumento en esta relación al compararlo con el control. Sin embargo, en los tiempos más altos se ven mejor los efectos en la relación contenido proteico/peso, ya que el peso presenta entonces valores similares para todos los tratamientos y el contenido en proteínas si que descende por efecto del herbicida. Por ello es a las 120 horas donde al aumentar la concentración de Propanil en el medio se produce una reducción en el contenido de proteínas.

Al inicio del experimento (0 horas) el valor de partida fue de 251.67 ng/μg. En las primeras 24 horas de exposición a Propanil se observó que al aumentar la concentración del herbicida se produjo un descenso en el contenido proteico por peso; este descenso fue más acusado en las concentraciones de 0.21 y 0.55 mg/l, las cuales presentaron porcentajes de reducción con respecto al control del 33% y 37% respectivamente. Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) se vió la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos (Tabla 99 del Anexo). El test de Duncan ubicó estas diferencias entre los tratamientos de 0.21 y 0.55 mg/l y el grupo control (Figura 86 del Anexo).

Durante las 48 horas siguientes se observó que aunque hubo un ligero descenso en el contenido proteico por peso éste no fue significativo para los diferentes tratamientos ya que los valores fueron: 310.48, 260.57, 254.12, 274.48 ng/μg para los tratamientos de 0.07, 0.10, 0.21, 0.55 mg/l respectivamente, el control presentó un valor de 322.20 ng/μg. El análisis de la varianza indicó que no existían diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 100 del Anexo).

Transcurridas 72 horas, se produjo un aumento a medida que aumentó la concentración de herbicida, esto fue debido, seguramente, a la reducción que se produjo sobre el peso de los organismos.

Encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento de 0.55 mg/l y el control como indicaron el análisis de la varianza (Tabla 101 del Anexo) y el test de Duncan (Figura 87 del Anexo). Los valores obtenidos oscilaron entre los 448.12 ng/ μ g obtenidos en el control y los 519.85 ng/ μ g obtenidos en la concentración de 0.55 mg/l.

A las 96 horas, a pesar de observarse una ligera disminución de los niveles al aumentar la concentración de herbicida en el medio, no se obtuvieron diferencias significativas tal como mostró el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 102 del Anexo) y el test de Duncan (Figura 88 del Anexo).

Finalmente, tras 120 horas de exposición, se observó un efecto claro del Propanil sobre el contenido de proteínas (por peso); ya que al aumentar la concentración de Propanil descendió el contenido proteico de forma significativa para las concentraciones de 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l, según puso de manifiesto el análisis de la varianza (Tabla 103 del Anexo) y el test de Duncan (Figura 89 del Anexo). Los valores obtenidos para los diferentes grupos fueron: 315.71, 303.88, 280.66, 259.87, 266.19 ng/ μ g para el control y los tratamientos de 0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l respectivamente. Y los porcentajes de reducción fueron de: 4%, 11%, 18% y 16% respectivamente.

Tabla 23. Contenido en proteínas (ng/ μ g) para *D. magna* tratada con concentraciones crecientes del herbicida Propanil a diferentes tiempos.

Propanil						
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	251.67 \pm 26.78	-	-	-	-	
24 horas	232.19 \pm 44.96	215.92 \pm 76.99	200.04 \pm 33.87	155.61 \pm 38.06*	145.29 \pm 36.25*	
48 horas	322.20 \pm 24.13	310.48 \pm 51.10	260.57 \pm 78.65	254.12 \pm 45.07	274.48 \pm 32.37	
72 horas	448.12 \pm 12.50	424.61 \pm 5 \pm .22	404.97 \pm 36.28	490.83 \pm 41.81	519.85 \pm 48.00*	
96 horas	433.46 \pm 5.79	482.26 \pm 34.51*	437.88 \pm 20.92	398.54 \pm 25.12	364.13 \pm 62.51	
120 horas	315.71 \pm 11.33	303.88 \pm 18.66	280.66 \pm 11.26*	259.87 \pm 6.78*	266.19 \pm 24.63*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

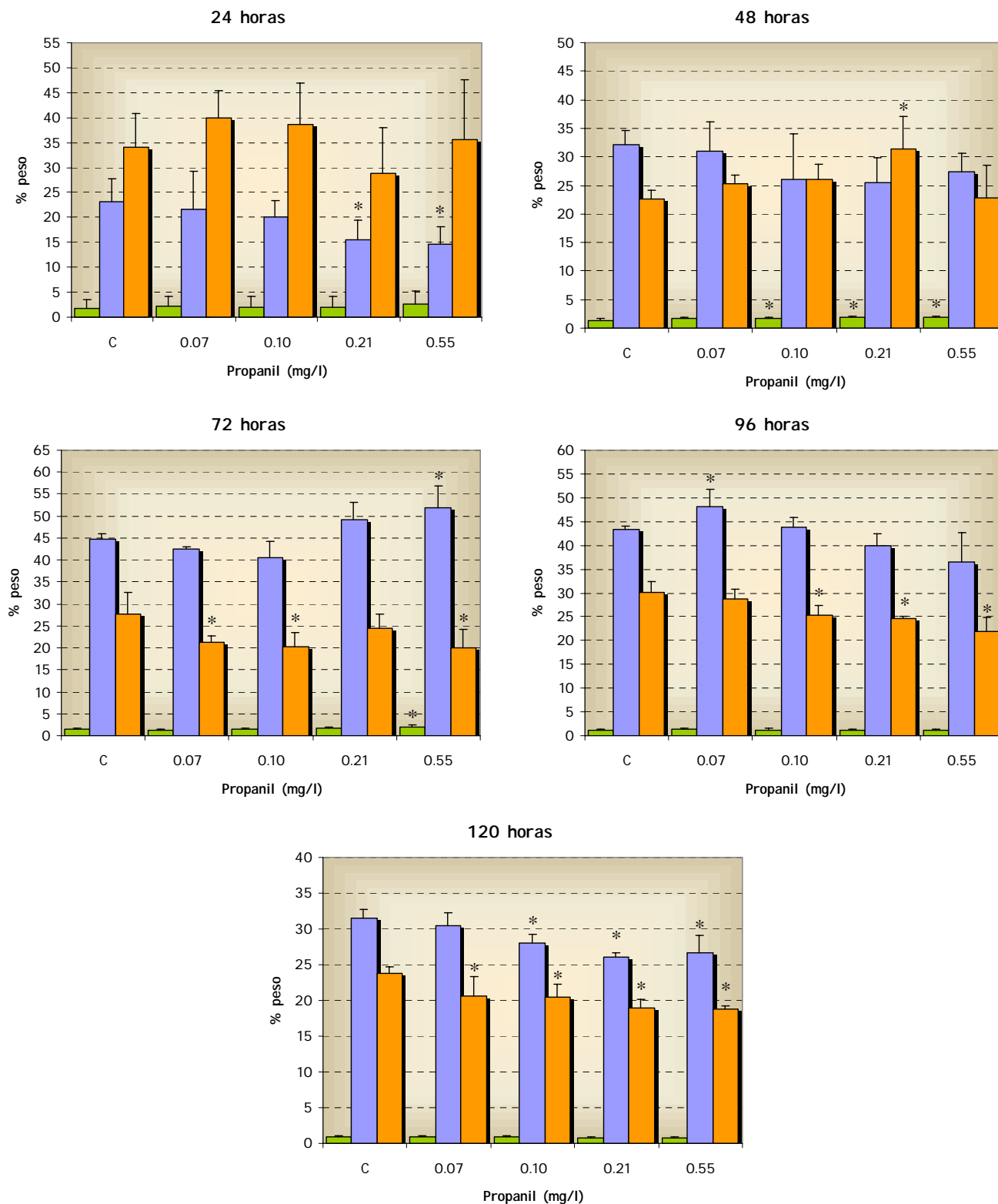


Figura 21. Porcentaje respecto al peso para Glucógeno ■, Proteínas ■, Lípidos ■ en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil. (*) p<0.05.

4.4.2.2.4. Contenido calórico.

En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos en el contenido calórico de *D. magna* por exposición al herbicida Propanil. En líneas generales, se observó que el aumento de la concentración de Propanil en el medio hace que se produzca una disminución del contenido calórico.

Al inicio del experimento (0 horas) el contenido calórico presente en los animales fue de 3.65 mcal/ μ g; este valor aumentó con la edad de los organismos, pero no es lineal ya que depende del peso obtenido en cada tiempo, aunque de forma general, tras 120 horas, encontramos mayor contenido calórico que a 0 horas.

A las 24 horas de exposición a Propanil vemos que los valores obtenidos fueron muy similares entre si y oscilaron entre las 5.19 mcal/ μ g del control y las 4.39 mcal/ μ g de la concentración de 0.55 mg/l, aun siendo valores próximos se vió una aparente disminución en el contenido calórico que no fue significativa en ningún caso tal y como puso de manifiesto el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 104 del Anexo).

Tras 48 horas de exposición, se produjo un ligero aumento en el contenido calórico por peso en los tratamientos de 0.07, 0.10 y 0.21 mg/l ya que presentaron valores de 4.16, 4.30 y 4.74 mcal/ μ g respectivamente, siendo el valor control de 3.97 mcal/ μ g; a pesar de ello, solamente la concentración de 0.21 mg/l presentó un aumento significativo con respecto al control, tal y como indicaron el análisis de la varianza (Tabla 105 del Anexo) y el test de Duncan (Figura 90 del Anexo).

A partir de este momento se observó un ligero descenso del contenido calórico en *D. magna* debido al herbicida que fue más acusado tras 96 y 120 horas de exposición. Los resultados estadísticos se muestran en las Tablas 106-108 del Anexo y en las Figuras 91-93 (Anexo).

Tabla 24. Contenido calórico (mcal/ μ g) en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Propanil durante varios tiempos.

		Propanil				
Tiempo	Control	0.07 ppm	0.10 ppm	0.21 ppm	0.55 ppm	
0 horas	3.65 \pm 0.35	-	-	-	-	
24 horas	5.19 \pm 1.51	5.09 \pm 0.83	4.90 \pm 1.02	3.68 \pm 0.92	4.39 \pm 0.90	
48 horas	3.97 \pm 0.23	4.16 \pm 0.48	4.30 \pm 0.40	4.74 \pm 0.45*	3.92 \pm 0.47	
72 horas	5.20 \pm 0.45	4.42 \pm 0.05*	4.43 \pm 0.44	5.20 \pm 0.43	5.02 \pm 0.67	
96 horas	5.33 \pm 0.25	5.48 \pm 0.20	5.00 \pm 0.32	4.71 \pm 0.30*	4.17 \pm 0.39*	
120 horas	4.01 \pm 0.13	3.62 \pm 0.26*	3.62 \pm 0.07*	3.38 \pm 0.24*	3.34 \pm 0.14*	

(*) Diferencias significativas $p < 0.05$.

5. DISCUSIÓN

5.1. TOXICIDAD AGUDA DEL PROPANIL EN *D. magna*.

Durante los últimos años la especie *Daphnia magna* viene siendo utilizada como bioindicador de aguas contaminadas y los efectos que diferentes agentes ejercen sobre esta especie están siendo ampliamente estudiados.

Vimos en el capítulo de Resultados que la CE₅₀ calculada por Ferrando y cols. (1996) para el acaricida Tetradifón era de 8.92 y 6.92 mg/l a las 24 y 48 horas respectivamente. Por otra parte, en el presente trabajo, hemos calculado la CE₅₀ para *Daphnia magna* del herbicida Propanil, a las 24 horas fue de 43.75 mg/l y a las 48 horas se obtuvo un valor de 5.01 mg/l, este valor fue inferior al encontrado a las 24 horas de exposición, indicando, mayor toxicidad al incrementarse el tiempo de exposición.

Así pues, a las 48 horas de exposición la toxicidad aguda de ambos plaguicidas en *D. magna* es muy similar, a pesar de que hablamos de un acaricida y un herbicida.

No obstante, autores como Rohm y Hass (1991) obtuvieron valores inferiores para la CE₅₀ del Propanil en la misma especie (0.14 mg/l a las 48 horas).

Por otra parte, Moore y cols. (1998) encontraron que la CE₅₀ a las 48 horas del herbicida Propanil en *Ceriodaphnia dubia* (especie similar) era de 1.65 mg/l; este mismo autor determinó la CE₅₀ del Propanil a las 48 horas para otros organismos acuáticos: *Hyalella azteca*, *Xenopus laevis*, y *Chironomus tentans* siendo el valor de la CE₅₀ a las 48 horas para cada una de estas especies de 5.64, 8.13, 8.27 mg/l respectivamente.

Chaiyarach y cols. (1975) determinaron la toxicidad aguda del herbicida Propanil para diferentes especies de organismos acuáticos encontrando que los valores de CE₅₀ a las 48 horas para *Gambusia affinis*, *Palaemonetes kadiakensis* y *Procambarus simulans* eran de: 11.0, 20.0, 33.80 mg/l respectivamente. Se aprecia que los valores obtenidos son bastante superiores a los encontrados por nosotros en *D. magna*.

Call y cols. (1983) determinaron la CE₅₀ del Propanil técnico en condiciones de flujo continuo, para el pez *Pimephales promelas* a las 48 horas, el valor de la CE₅₀ encontrado fue de 10.2 mg/l; estos autores también observaron un aumento de la toxicidad con el tiempo de exposición ya que a las 96 horas el valor de la CE₅₀ disminuyó hasta 8.6 mg/l.

Otro herbicida ampliamente utilizado en los arrozales es el Glifosato. Los valores de la CE₅₀ a las 96 horas para los peces *Salmo gairdneri* e *Ictalurus punctatus* son: 8.3, y 13.0 mg/l para este herbicida respectivamente, mientras que este mismo herbicida en *D. magna* tras 48 horas de exposición fue bastante más tóxico, con un valor de CE₅₀ de 3.0 mg/l (Folmar y cols., 1979).

Similares resultados encontraron Sancho y cols. (2001) al calcular la CE_{50} del herbicida Molinato en *D. magna*, determinando que ésta era de 3.01 mg/l.

Por otro lado Ferrando y cols. (1999) determinaron que la CE_{50} de este mismo herbicida, el Molinato (a las 24 horas) era de 11.37 mg/l para el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

También existen datos de la CE_{50} de la 3,4-dicloroanilina (DCA), una amina aromática que es un metabolito producido en la hidrólisis del herbicida Propanil (Crossland 1990). Por ejemplo Ferrando y cols. (1992) calcularon la CE_{50} de la DCA para *D. magna* obteniendo un valor de 0.20 mg/l a las 24 horas de exposición y de 61.5 mg/l para el rotífero *Brachionus calyciflorus* para el mismo tiempo de exposición.

Kluttgen y cols. (1996) determinaron la CE_{50} de la DCA en los crustáceos *D. magna* y *Ceriodaphnia quadrangulata*; los valores obtenidos fueron 0.81 mg/l y 3.97 mg/l para cada una de las especies respectivamente.

Otros autores han comparado la toxicidad aguda presentada por *D. magna* frente a la toxicidad aguda en ratones, a fin de predecir qué organismo presenta una mayor sensibilidad y así poder ser utilizados como indicadores previos de contaminación en relación con la posible toxicidad de nuevas sustancias en mamíferos superiores e incluso el hombre. Así, Guillermino y cols. (2000) determinaron la CE_{50} en *D. magna* y la DL_{50} en ratones para 54 tóxicos entre ellos los plaguicidas Paraoxon, Parathion, la DCA y el Clorpyrifos, determinando que *D. magna* presentaba una mayor sensibilidad frente a los diferentes tóxicos que la encontrada para los ratones.

Tanto para el herbicida Propanil como para su metabolito principal, la 3,4-dicloroanilina, *D. magna* se muestra como un organismo muy sensible a la presencia del tóxico en el medio, al compararla con otros organismos acuáticos, al igual que ocurre con otros herbicidas ampliamente utilizados en las labores agrícolas.

Los estudios de toxicidad aguda con invertebrados nos sirven para determinar los límites de seguridad de los compuestos, aunque la toxicidad de los plaguicidas en los invertebrados acuáticos varía mucho dependiendo de la especie y del tipo de plaguicida. Los datos indican que *D. magna* es una de las especies más sensibles a la contaminación por plaguicidas

Aunque los estudios de toxicidad aguda son importantes para evaluar el riesgo potencial de los plaguicidas en el medio acuático, son también necesarios otros estudios como los ensayos de toxicidad crónica, o el estudio de las alteraciones en la fisiología y el comportamiento de los organismos expuestos, a fin de evaluar mejor el riesgo que supone el uso de plaguicidas para el medio acuático (Morky y Hoagland, 1990).

5.2. TOXICIDAD CRÓNICA DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN *D. magna*.

Dentro de los parámetros reproductivos estudiados se integran el tamaño de la camada, el número de camadas, el tiempo a la primera puesta y el número de neonatos por hembra; este último suele ser el más utilizado por la mayoría de los autores como índice de toxicidad subletal, aunque algunos autores dentro de sus estudios realizan un seguimiento del resto de los parámetros reproductivos.

Se pudo ver en el apartado de resultados que el aumento de la concentración del acaricida Tetradifón provocó un descenso en el **tamaño de la camada**, éste se vió significativamente reducido ($p < 0.05$) con concentraciones superiores a 0.18 mg/l del acaricida. También el aumento de la concentración de Propanil produjo un efecto similar sobre el tamaño de la camada, el cual se vió reducido significativamente en todas las concentraciones de herbicida utilizadas encontrando un mayor descenso en las concentraciones de 0.21 y 0.55 mg/l.

El **número de camadas** también descendió por el aumento de la concentración de Tetradifón en el medio. No obstante, el Propanil tuvo un efecto más acusado sobre este parámetro ya que encontramos que para todos los tratamientos existían diferencias significativas, siendo estas diferencias mayores para las concentraciones más altas utilizadas (0.21 y 0.55 mg/l).

Similares resultados encontraron Day y Kaushik (1987b) con *Daphnia galeata mendotae* cuando fue expuesta a 0.01 y 0.05 $\mu\text{g/l}$ del plaguicida Fenvalerato. Fernández-Casalderrey y cols. (1993a) también detectaron un descenso significativo en el número medio de camadas y en el tamaño de la camada al exponer a *Daphnia magna* a concentraciones de Endosulfan entre 0.12 y 0.31 mg/l.

Autores como Ferrando y cols. (1995) determinaron que para *D. magna* concentraciones del plaguicida Lindano superiores a 0.16 mg/l reducían parámetros reproductivos como el número medio de neonatos por camada. Y Sánchez y cols. (1998) observaron también que concentraciones superiores a 0.05 ng/l del insecticida Diazinón producían un descenso en el número de neonatos por camada en *Daphnia magna*.

El **tiempo que transcurre desde el inicio del ensayo** hasta que se da la primera reproducción de los dáfnidos se ve aumentado al incrementarse la concentración de Tetradifón presente en el medio. En este estudio, concentraciones de acaricida

superiores a 0.18 mg/l hacen que el número de días transcurridos hasta la primera puesta aumente significativamente, desde 7.8 días a 8.7, 8.8 y 9.0 días para las concentraciones de 0.18, 0.22, y 0.44 mg/l de Tetradifón. En el caso del herbicida Propanil el aumento del tiempo a la primera puesta es significativo desde la concentración más baja utilizada (0.07 mg/l) donde transcurren 10 días desde el inicio del experimento hasta la primera reproducción de los dáfnidos, siendo para la concentración de 0.55 mg/l donde este tiempo se prolonga hasta incluso los 12 días.

Este aumento en el número de días transcurrido hasta la primera puesta fue constatado también por Fernández-Casalderrey y cols. (1993a) al exponer *Daphnia magna* a concentraciones superiores a 0.20 mg/l del plaguicida Endosulfan.

Otros plaguicidas producen efectos similares. Así, Ferrando y cols. (1996b) encontraron que concentraciones del plaguicida organofosforado Fenitrothion superiores a 0.011 µg/l producían un aumento en el tiempo transcurrido hasta la primera reproducción en el cladóceros *Daphnia magna*.

Una vez transcurridos los 21 días de duración del ensayo se contabilizaron todos los neonatos producidos por las hembras de *D. magna*. En los resultados obtenidos para el acaricida Tetradifón se observó que concentraciones superiores a 0.18 mg/l producían un descenso significativo en el **número de neonatos** producidos. Mientras que en el grupo control se obtuvieron 131.7 neonatos por hembra, y para las concentraciones de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l obtuvimos 102.1, 97.3 y 65.5 neonatos por hembra, respectivamente. El aumento de la concentración de plaguicida en el medio produjo un descenso progresivo y acusado en el número de descendientes.

Por su parte, el herbicida Propanil tuvo un importante efecto sobre la reproducción de los dáfnidos ya que encontramos que el número de neonatos por hembra se reduce significativamente con todas las concentraciones de herbicida utilizadas, obteniendo valores que oscilaron entre 87.1 y 14.4 neonatos para las concentraciones de 0.07 y 0.55 mg/l respectivamente, siendo el valor control de 131.7 neonatos por hembra.

En este caso también el aumento de la concentración de Propanil en el medio produjo una disminución progresiva en el número de descendientes, que fue incluso más acusada que para el Tetradifón.

Van Leeuwen y cols. (1985) determinaron que el ditiocarbamato Disulfiram causaba una reducción significativa en la supervivencia y la reproducción de *D. magna* al ser expuesta a concentraciones superiores a 10 µg/l.

Fernández-Casalderrey y cols. (1993a) encontraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en la reproducción de *D. magna* al exponerla a 0.22, 0.25 y 0.31 mg/l de Endosulfan. Esta reducción en el número de descendientes fue encontrada también por otros investigadores como Ferrando y cols. (1996b) al exponer al cladóceros *D. magna* al insecticida Fenitrothion a concentraciones de 0.011 y 0.013 µg/l.

Otros herbicidas como el Molinato también tienen un efecto sobre la reproducción de los organismos acuáticos, así Julli y Krassoi (1995) encontraron que concentraciones de Molinato superiores a 0.29 µg/l producían una reducción significativa en la reproducción del cladóceros *Moina australiensis*.

Nebeker y Schuytema (1998) obtuvieron una reducción significativa tanto en la supervivencia como en la reproducción de *Daphnia pulex* al ser expuesta a concentraciones del herbicida Diuron iguales o superiores a 7.7 mg/l. Estos mismos autores también encontraron una reducción significativa en la reproducción del anfípodo *Hyaella azteca* al ser expuesto a concentraciones de Diuron iguales o superiores a 15.7 mg/l.

Algunos investigadores como Daniels y Allan (1981) e Ingersoll y Winner (1982) han sugerido que la supervivencia en los test de toxicidad crónica es el mejor índice de toxicidad ya que es más sensible y menos variable que los parámetros reproductivos. En el presente trabajo el mejor índice de toxicidad estaría representado por los parámetros reproductivos ya que tanto el tamaño de la camada, el número de camadas y el número de neonatos por hembra se vieron significativamente reducidos frente al grupo control para ambos plaguicidas, no siendo así para la supervivencia.

En nuestros ensayos **la supervivencia** no se vio afectada por el aumento de la concentración de Tetradifón en el medio, incluso la concentración más alta de 0.44 mg/l de Tetradifón no mostró un descenso significativo con respecto al grupo control.

Por el contrario, en el caso del herbicida Propanil, se observó que la concentración más alta utilizada (0.55 mg/l) presentó una reducción significativa con respecto al grupo control, esta reducción fue del 39%.

Similares resultados a los obtenidos en este estudio con el plaguicida Tetradifón fueron encontrados por Day y Kaushik (1987b) cuando trataron a *D. galeata mendotae* con 0.01 y 0.05 µg/l del plaguicida Fenvalerato.

Encontraron que la supervivencia de los dáfnidos expuestos no presentaba diferencias significativas con el control para un tiempo de exposición de 30 a 32 días. Estos investigadores sugirieron que la supervivencia sólo era un buen indicador de la toxicidad cuando los organismos eran expuestos durante todo su ciclo vital.

Buhl y cols. (1993) también observaron que la reproducción en *D. magna* era un índice más sensible a la toxicidad crónica por plaguicidas que la supervivencia. Del mismo modo, Muñoz y cols. (1996) al exponer a *D. magna* a Hexaclorobenceno observaron que la supervivencia tampoco se veía afectada.

Sin embargo, Klüttgen y cols. (1996) encontraron que al exponer a *D. magna* a concentraciones crecientes de 3,4-Dicloroanilina (metabolito del herbicida Propanil), la reproducción de estos organismos se veía fuertemente inhibida, no encontrando un efecto significativo sobre la supervivencia. También Rose y cols. (2002) hallaron que al exponer a *Ceriodaphnia dubia* a concentraciones crecientes de 3,4-Dicloroanilina hasta 15 µg/l, la supervivencia de los organismos no se veía afectada, pero si la reproducción.

Otros investigadores han sugerido que la supervivencia y la reproducción son índices de toxicidad crónica igual de sensibles. Así Ferrando y cols. (1995) encontraron que al incluir en el medio concentraciones subletales de Lindano superiores a 0.25 mg/l se detectaba un descenso significativo tanto en la supervivencia como en la reproducción de *D. magna*.

De igual manera, Sánchez y cols. (1998) obtuvieron un descenso tanto en la supervivencia como en el número de descendientes obtenidos, al exponer *D. magna* a concentraciones crecientes de Diazinón.

Por otro lado, Ferrando y cols. (1996a) demostraron la elevada bioacumulación del plaguicida Tetradifón en *D. magna*, esto puede ser también una posible explicación para el gran efecto que este plaguicida produce en los parámetros reproductivos frente a la supervivencia, ya que la acumulación del plaguicida en los tejidos puede producir desajustes fisiológicos y bioquímicos causando alteraciones en la reproducción pero no llegar a causar la muerte.

Por su parte, Baird y cols. (1991) indicaron que la inhibición en la reproducción en el cladócer *D. magna* por efecto del herbicida Propanil, se debía al efecto letal que tiene su metabolito, la 3,4-dicloroanilina, sobre los huevos en desarrollo dentro de la cámara incubadora. Los estudios de biodegradación del Propanil revelan que la 3,4-Dicloroanilina es el principal metabolito del herbicida Propanil (Garrido y cols., 2001).

La exposición a 3,4 Dicloroanilina y en general a las anilinas sustituidas puede causar un incremento en sangre de metahemoglobina en diferentes especies (McLean y cols., 1969; Crossland, 1990). Crossland (1990) postuló una hipótesis según la cual un descenso en la capacidad de transportar oxígeno, como resultado de un incremento en el contenido de metahemoglobina, se podía reflejar en la inhibición de la reproducción y el crecimiento de organismos acuáticos. En esta misma línea, Baird y cols. (1991) apuntaron que el efecto sobre la reproducción era debido al envenenamiento de los embriones en desarrollo dentro de la cámara incubadora. Si el contenido de oxígeno en la cámara incubadora se ve reducido frente al resto del organismo materno y el tiempo requerido por la hemoglobina para la oxigenación-desoxigenación es mayor en los embriones que en los adultos, el descenso en la hemoglobina debido a la formación de metahemoglobina parece ser crítico para los embriones tempranos y puede ser responsable de los efectos letales de las anilinas sustituidas (Crossland y Hillaby, 1985).

El **tamaño (longitud)** de las hembras de *D. magna* se vio reducido desde la menor concentración de Tetradifón utilizada, obteniéndose valores de 0.46 cm para la concentración de 0.10 mg/l, 0.45 cm para las concentraciones de 0.18 y 0.22 mg/l y 0.38 cm para la mayor concentración de Tetradifón utilizada (0.44 mg/l). Por el contrario, la longitud de los dáfnidos al ser tratados con el herbicida Propanil sólo se vio reducida en la concentración más alta de Propanil utilizada de 0.55 mg/l. Recordaremos que el tamaño de los dáfnidos control fue de 0.48 cm.

El ditiocarbamato Disulfuran también produjo una reducción significativa del tamaño corporal de *D. magna* para concentraciones superiores a 18 µg/l, tal y como encontraron Van Leeuwen y cols. (1985)

Barry (1999) detectó un descenso significativo en el tamaño corporal de *Daphnia longicephala* al ser expuesta a concentraciones crecientes del herbicida Carbaril.

Otros investigadores han encontrado también que el aumento de la concentración de plaguicidas reduce el tamaño de los organismos expuestos. Fernández y cols. (1995b) encontraron que el tamaño del caparazón de *D. magna* se veía significativamente reducido al aumentar la concentración del plaguicida Diazinón en el medio, estos autores detectaron diferencias significativas con respecto al control para concentraciones superiores a 0.15 µg/l. Por otra parte, Ferrando y cols. (1995) también obtuvieron un descenso significativo en el tamaño del caparazón, exponiendo a *D. magna* a concentraciones subletales de Lindano superiores a 0.25 mg/l.

En otros organismos, Nebeker y Schuytema (1998) también encontraron una reducción significativa en el tamaño corporal del invertebrado *Hyaella azteca* al ser expuesta a concentraciones de Diuron iguales o superiores a 22.9 mg/l.

La **tasa intrínseca de crecimiento natural (r)**, en el presente trabajo, se mostró como un parámetro muy sensible a la toxicidad por ambos plaguicidas debido al efecto que estos tuvieron sobre la reproducción. Para poblaciones como las de los dáfidos con generaciones superpuestas, la tasa intrínseca de crecimiento natural estará determinada primeramente por el número de neonatos por camada en las primeras puestas. Las concentraciones de Tetradifón de 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l reducen el número de neonatos en las primeras puestas reduciendo el valor de la tasa intrínseca de crecimiento natural. Lo mismo ocurre con el herbicida Propanil, ya que concentraciones superiores a 0.10 mg/l inhiben la reproducción de los dáfidos al reducir el número de descendientes.

Van Leeuwen y cols. (1985) detectaron un descenso significativo en la tasa intrínseca de crecimiento natural (r), para *D. magna* al ser expuesta a concentraciones crecientes de los ditiocarbamatos Disulfiram y Zineb. Estos autores atribuyeron esta reducción al efecto que ambos tiocarbamatos presentaban sobre la reproducción y la supervivencia de los organismos expuestos.

Rose y cols. (2002) observaron que concentraciones de 3,4- Dicloranilina superiores a 10 µg/l producían una reducción significativa en la tasa intrínseca de crecimiento natural para el cladócer *Ceriodaphnia dubia*, indicando que este descenso fue consecuencia del gran efecto que la 3,4-Dicloroanilina tiene sobre el número de neonatos por hembra.

Por su parte, Stark y cols. (1997) encontraron un descenso en el valor de r al exponer al ácaro *Tetranychus urticae* a concentraciones crecientes del plaguicida organoclorado Dicofol.

Del mismo modo, Walthall y Stark (1997) exponiendo al áfido *Acyrtosiphon pisum* a concentraciones del insecticida Imidacloprid superiores a 0.07 mg/l encontraron la misma reducción en el valor de r atribuyendo, sin embargo, este resultado al descenso en la supervivencia.

Una disminución en el valor de r fue observada por Ferrando y cols. (1999) al exponer al rotífero *Brachionus calyciflorus* a concentraciones del herbicida Thiobencarb superiores a 5 mg/l.

Estos mismos autores exponiendo el mismo organismo al herbicida Molinato, encontraron que concentraciones superiores a 10 mg/l producían un descenso significativo en el valor de r , el descenso se debía en ambos casos a la disminución del tamaño de la camada y a la reducción en el número de descendientes.

Todos estos autores señalaron la importancia de r como índice del efecto producido por los plaguicidas en las poblaciones estudiadas, ya que combina los efectos producidos sobre la reproducción y la supervivencia.

Hemos de señalar que para ningún parámetro de los estudiados, el grupo perteneciente al control con acetona mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

5.3. EFECTOS DEL TETRADIFÓN Y EL PROPANIL SOBRE EL COMPORTAMIENTO FILTRADOR DE *D. magna*.

En el apartado de resultados vimos que, para los plaguicidas estudiados, las tasas de filtración e ingestión del alga *Nannochloris oculata* se veían reducidas al aumentar la concentración de ambos plaguicidas en el medio.

En el caso del acaricida Tetradifón, en la tasa de filtración se observaron porcentajes de inhibición del 41%, 67%, 62% y 77% para las concentraciones ensayadas (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l); estas reducciones presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Lo mismo ocurrió con la tasa de ingestión de alimento, siendo los porcentajes de inhibición para las diferentes concentraciones del 42%, 50%, 36% y 54%, respectivamente.

El herbicida Propanil, por su parte, presentó para cada una de las concentraciones utilizadas (0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l) los siguientes porcentajes de inhibición: 7%, 35%, 43% y 44%. Estas reducciones presentaron diferencias significativas a partir de la concentración de 0.10 mg/l. La tasa de ingestión también se vio inhibida por efecto de concentraciones crecientes del herbicida Propanil; así, los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones fueron: 15%, 39%, 47% y 56% respectivamente. Al igual que para la tasa de filtración estas reducciones fueron significativas a partir de la concentración de 0.10 mg/l.

Durante las 5 horas de duración del ensayo, en el caso del acaricida Tetradifón, las tasas de filtración e ingestión se redujeron en más de un 50% para la concentración de 0.18 mg/l. Sin embargo, el herbicida Propanil tuvo un efecto menor ya que en la tasa de filtración no se superó el 50% de inhibición con la concentración más alta utilizada (0.55 mg/l).

Investigadores como Fernández-Casalderrey y cols. (1992) que observaron un descenso significativo en las tasas de filtración e ingestión del rotífero *Brachionus calyciflorus* al ser expuesto a concentraciones de Endosulfan superiores a 2.5 mg/l y a concentraciones de Diazinón superiores a 14 mg/l. En otro estudio realizado por los mismos autores (Fernández-Casalderrey y cols. 1993b), se observó que al exponer a *D. magna* a concentraciones superiores a 0.062 ng/l de Metilparathion, la tasa de filtración se veía significativamente reducida respecto del grupo control.

Del mismo modo, Fernández-Casalderrey y cols. (1994) expusieron *D. magna* a concentraciones subletales de los plaguicidas Diazinón y Endosulfan, observando que concentraciones de Endosulfan superiores a 0.31 mg/l producían una reducción

significativa en la incorporación del alimento por parte del cladóceros. Esta misma reducción se encontró para una concentración de Diazinón de 0.45 µg/l.

Semlitsch y cols. (1995) también observaron que concentraciones del fungicida TPT (trifeniltin) de 10 y 20 µg/l producían un descenso en la actividad filtradora de los renacuajos de la rana *Rana esculenta*. Y Donkin y cols. (1997) encontraron una reducción en la tasa de filtración del bivalvo *Mytilus edulis* al exponerlo a concentraciones crecientes de Lindano y Endrin.

Continuando en la misma línea, Kluttgen y cols. (1996) demostraron que las tasas de filtración del alimento por parte de *D. magna* se ven inhibidas por el aumento de la concentración de 3,4-DCA en el medio.

Una explicación a esta inhibición en el comportamiento filtrador la apuntó Day (1989) que encontró que el Fenvalerato reducía la tasa de filtración e ingestión de la comida por el zooplancton, y postuló que la constante exposición de estos organismos al plaguicida durante todo su ciclo podía reducir su habilidad para obtener una adecuada nutrición. El organismo respondería a este estrés disminuyendo la producción de descendientes y produciéndose cambios en la supervivencia que podía verse reducida especialmente bajo condiciones naturales donde la predación y la competición son factores agravantes.

Un descenso en la habilidad del organismo para obtener una adecuada nutrición tendría pues efectos en el crecimiento, en la supervivencia y en la capacidad reproductiva, como se observa en el presente estudio.

También Day y Kaushik (1987a), postularon que la filtración y la ingestión del alimento por parte de los animales filtradores, requiere movimientos por parte de los apéndices filtradores y una coordinación del sistema nervioso. Por tanto, los tóxicos que afectan al sistema nervioso y causan una baja coordinación o una parálisis producen una respuesta de reducción de las tasas de filtración e ingestión.

Estos autores encontraron que, además de un efecto sobre el sistema nervioso, niveles subletales de Permethrin y Fenvalerato producían la adhesión de partículas alimenticias en los apéndices filtradores de los dáfnidos haciendo más dificultoso el movimiento de estos apéndices.

Es sabido que la composición bioquímica y los procesos fisiológicos de los invertebrados se ven alterados por la intoxicación con plaguicidas.

El principal efecto de estos compuestos se ejerce sobre el sistema nervioso y el lugar de acción son las sinapsis, interfiriendo en la transmisión del impulso nervioso (Ware, 1983).

Estos procesos han sido demostrados en invertebrados (Leake y Goldman, 1984). Así, un tóxico que afecte al sistema nervioso y cause pérdida de coordinación y/o parálisis podría ocasionar en el organismo afectado una reducción de la Tasa de Filtración o Ingestión del alimento.

El Tetradifón interfiere en el buen funcionamiento del sistema nervioso (Ware, 1983), con lo que dificulta la incorporación del alimento a través de los apéndices. También la exposición al herbicida Propanil puede producir depresión del sistema nervioso central tal y como apuntaron Eddleston y cols. (2002).

La filtración e ingestión del alimento que realizan los organismos filtradores del zooplancton requiere el movimiento de los apéndices y su coordinación con el sistema nervioso. Si el Tetradifón y el Propanil causan una reducción de la tasa de filtración e ingestión de alimento tras sólo 5 horas de exposición, una exposición constante de estos organismos a dichos plaguicidas, a lo largo de su ciclo de vida, reduciría su capacidad para alimentarse.

Si durante todo el ciclo vital se produce una deficiente incorporación del alimento, esto puede repercutir en el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los organismos expuestos. La energía ingerida determina la magnitud de la reproducción de un animal bajo unas condiciones ambientales dadas. Por ello, las tasas de incorporación del alimento son un buen parámetro para predecir la reproducción y un indicador relevante para valorar la toxicidad (Juchelka y Snell, 1995).

En el presente estudio los dáfidos pertenecientes al grupo del control con disolvente (acetona) no mostraron en ningún momento diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.4. EFECTO DEL TETRADIFÓN Y EL PROPANIL EN LA FISIOLOGÍA (METABOLISMO ENERGÉTICO) DE *D. magna*.

La exposición durante diferentes tiempos a concentraciones crecientes de los plaguicidas Tetradifón y Propanil, produjo alteraciones en la fisiología de *D. magna*. Estas alteraciones se manifestaron como una disminución de las reservas de las principales biomoléculas (glúcidos, lípidos y proteínas), y como hemos visto anteriormente también en una reducción del tamaño corporal, la reproducción e incluso la supervivencia.

Calow y Sibly (1990) sugirieron que el estrés tóxico induce cambios metabólicos en los organismos, que se traducen en la reducción de las reservas energéticas, como consecuencia se producen efectos adversos en el crecimiento y la reproducción de los individuos. Las alteraciones en la homeostasis de los organismos lleva a alteraciones patológicas que desencadenan en los organismos mecanismos compensatorios, que requieren mucha energía. Este gasto energético y la limitación de las reservas energéticas en el organismo lleva a una redistribución de los recursos energéticos, reduciendo la cantidad de energía destinada a la reproducción y el crecimiento (Beyers y cols., 1999).

En el apartado de resultados pudimos ver que, con el acaricida Tetradifón, el contenido en glucógeno tisular (por individuo) sufrió una reducción significativa a partir de las 48 horas de exposición, para las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l de plaguicida. Esta reducción aumentó con el tiempo de exposición encontrando que a las 120 horas todas las concentraciones utilizadas presentaron diferencias significativas con el control. Al determinar el contenido en glucógeno (por peso seco) observamos que, de forma similar, las reducciones fueron significativas a partir de 48 horas para las concentraciones más altas (0.22 y 0.44 mg/l) y a las 120 horas de exposición las reducciones fueron significativas para todas las concentraciones ensayadas.

En el caso del herbicida Propanil el contenido en glucógeno tisular (por individuo) se vió significativamente reducido a partir de las 96 horas con las concentraciones de Propanil de 0.21 y 0.55 mg/l. A las 120 horas estas diferencias aumentaron y encontramos que también la concentración de 0.10 mg/l presentó diferencias con respecto al grupo control. Para los primeros tiempos de exposición no se observó ninguna reducción significativa, aunque si se observó que los valores obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de exposición a Propanil, fueron menores que los encontrados en el grupo control.

El contenido en glucógeno (por peso) se vió muy condicionado al gran efecto que el Propanil tuvo sobre el peso de los animales, ya que al verse éste tan reducido la relación contenido en glucógeno/peso aumentó en aquellos tiempos y concentraciones donde el efecto sobre el peso de los organismos fue más acusado, pudiendo darse incluso diferencias significativas con el control.

Encontramos un aumento significativo en la relación glucógeno/peso con las concentraciones de 0.10, 0.18 y 0.21 mg/l a las 48 horas de exposición a Propanil; a las 72 horas las concentraciones que presentaron diferencias significativas con respecto al control sólo fueron las de 0.21 y 0.55 mg/l. A medida que el efecto sobre el peso disminuyó encontramos menos diferencias significativas, así a las 72 horas solamente la concentración de Propanil más alta (0.55 mg/l) presentó estas diferencias. Para 96 y 120 horas de exposición no se obtuvieron diferencias significativas, pero si que se obtuvieron menores valores que los encontrados en el grupo control.

Umminger (1970) señaló que los carbohidratos representan la principal fuente de energía y de precursores metabólicos en los organismos expuestos a estrés toxico.

McKee y Knowles (1986a) encontraron que concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/l del plaguicida Fenvalerato producían un descenso significativo en el contenido en glucógeno de *D. magna* tras 7 días de exposición.

Knowles y cols. (1987) también hallaron un descenso significativo en el contenido en glucógeno al exponer a *D. magna* a 811 µg/l de Di-2-etilhexil ftalato (DEHP), utilizado en la fabricación del PVC, durante 7 días.

Resultados similares se encontraron en otros invertebrados. Así, Graney y Giesy (1986) detectaron una reducción en el contenido en glucógeno (por peso seco) en el anfipodo *Gammarus pseudolimnaeus* expuesto a 0.77 mg/l de Pentaclorofenol (PCF).

Saravana y Geraldine (1997) también encontraron una reducción significativa en los niveles tisulares de glucógeno al exponer al crustáceo *Macrobrachium malcolmsonii* a concentraciones subletales de Endosulfan. Estos autores indicaron que una posible explicación para esta reducción del glucógeno era la secreción de catecolaminas y glucocorticoides, inducida por el estrés toxico, que incrementaría la glucogenólisis.

Del mismo modo Nath (2000) determinó, una alteración en el metabolismo de los carbohidratos al exponer al gusano de seda *Bombyx mori* a un preparado comercial de Fenitrotión y Etión; este autor encontró que el Fenitrotión altera la estructura

mitocondrial y por tanto causa interferencias en las rutas metabólicas implicadas en la obtención de energía.

DeCoen y cols (2001) demostraron que el metabolismo intermediario de *D. magna* es afectado por una exposición breve a concentraciones subletales de plaguicidas, la respuesta básica de este metabolismo parece consistir principalmente en la movilización y utilización de las reservas de carbohidratos.

Del mismo modo, Tripathi y Singh (2002) encontraron reducciones significativas del 59 y 56 % en los niveles de glucógeno en el hepatopancreas y el ovotestis del caracol *Lymnaea acuminata*, tras 96 horas de exposición a Dimetoato. Estos autores también estudiaron el efecto del herbicida Carbaril en el mismo organismo, encontrando una reducción en el contenido en glucógeno del 55 y 54% para el hepatopancreas y el ovotestis. Según estos autores la reducción en el contenido en glucógeno fue debida a la generación de energía necesaria para sofocar la demanda generada por el estrés tóxico.

En cuanto al contenido en lípidos (por individuo) presente en los organismos expuestos a Tetradifón, éste presentó una reducción desde las primeras horas de exposición al acaricida, ya a las 24 horas encontramos que las concentraciones más altas utilizadas (0.22 y 0.44 mg/l) presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, tras 48 y 120 horas de exposición, encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir de la concentración de 0.10 mg/l, mientras que en los tiempos intermedios de 72 y 96 horas estas diferencias se presentaron a partir de la concentración de 0.18 mg/l.

El contenido en lípidos (por peso) presentó un comportamiento similar al anterior, las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron desde las primeras 24 horas, donde los animales tratados con concentraciones de Tetradifón de 0.18 mg/l y superiores presentaron diferencias significativas con respecto al control, al igual que ocurrió a las 72 y 96 horas. Son los tiempos de 48 y 120 horas de exposición los que presentaron diferencias significativas para todos los tratamientos respecto al control.

El herbicida Propanil produjo un efecto similar sobre el contenido en lípidos (por individuo) que el encontrado para el acaricida Tetradifón, en este caso las diferencias significativas aparecen desde los primeros tiempos de exposición, con las concentraciones de 0.21 y 0.55 mg/l. A las 48 horas solamente la concentración más alta de Propanil (0.55 mg/l) presentó diferencias con respecto al control.

Fue a partir de las 72 horas donde se observó el mayor efecto sobre el contenido en lípidos, ya que todos los tratamientos utilizados ocasionaron reducciones respecto al control. Del mismo modo, a las 96 y 120 horas también todos los tratamientos presentaron reducciones significativas en el contenido en glucógeno (por individuo).

El efecto del Propanil sobre el contenido en lípidos (por peso), comenzó a las 72 horas donde las concentraciones de 0.07, 0.10 y 0.55 mg/l presentaron diferencias significativas con el control. A las 96 horas de exposición los tratamientos de 0.10 mg/l y superiores provocaron reducciones significativas respecto al control, es a las 120 horas donde la reducción en el contenido en lípidos fue significativa para todas las concentraciones de Propanil ensayadas (0.07, 0.10, 0.21 y 0.55 mg/l).

Tessier y Goulden (1982) sugirieron que las reservas lipídicas en los cladóceros determinan la sensibilidad del individuo al estrés ambiental, ya los animales que presentan reducciones en sus reservas lipídicas son más sensibles al estrés tóxico y al ayuno prolongado.

McKee y Knowles (1986a) encontraron que concentraciones de Fenvalerato superiores a 0.5 mg/l producían un descenso significativo en el contenido en lípidos de *D. magna*, tras 7 días de exposición.

También, Knowles y cols (1987) observaron una reducción en el contenido lipídico de *D. magna* al ser expuesta a concentraciones de DEHP (Di-2-etilhexil ftalato) superiores a 811 mg/l.

Un descenso en el contenido en lípidos (por peso) en *Gammarus pseudolimnaeus* expuesto a 0.77 mg/l de PCF (Pentaclorofenol) fue determinado por Graney y Giesy (1986).

Bhavan y Geraldiner (2001) encontraron una disminución en las reservas lipídicas del cangrejo *Macrobrachium malcolmsonii* al exponerlo a concentraciones subletales de Endosulfan. Estos autores señalaron la aceleración progresiva en la hidrólisis de los niveles de lípidos de acuerdo con el aumento en la demanda energética por efecto del estrés producido por el Endosulfan. Los lípidos son una fuente alternativa de energía particularmente durante condiciones de estrés (Chang y O'Connor, 1983).

Reducciones del 35% en el contenido lipídico fueron encontradas por Choi y cols. (2001) al exponer larvas del díptero *Chironomus riparius* a 2 µg/l de Fenitrotion. Para el glucógeno también encontraron una reducción significativa del 47 % con respecto al grupo control. Estos autores explicaron el descenso de estos parámetros por el estrés oxidativo causado por el Fenitrotion, ya que los daños ocasionados en la

membrana mitocondrial por efecto de la peroxidación lipídica pueden interferir en la actividad de la cadena de transporte electrónico. Así, el glucógeno sería consumido en los procesos relacionados con el estrés y los lípidos se usarían para producir energía y utilizarla en la detoxificación de los compuestos tóxicos. La utilización de estas reservas durante los primeros estadios de vida tendrán consecuencias en el desarrollo de las larvas hasta su estado adulto. Estos autores concluyeron que tanto el contenido en glucógeno como el contenido en lípidos son parámetros muy sensibles que reflejan el estado fisiológico del animal y pueden ser utilizados para predecir los efectos del estrés tóxico.

Como ocurre con el contenido en glucógeno y lípidos el efecto del Tetradifón en el contenido en proteínas (por individuo) también se vio muy reducido desde los primeros tiempos de exposición, encontrando diferencias significativas para las concentraciones más altas utilizadas de 0.22 y 0.44 mg/l a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Encontramos que todas las concentraciones de acaricida ensayadas presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control tras 96 y 120 horas de exposición.

El contenido proteico (por peso) presentó el mismo comportamiento, tras 24, 96 y 120 horas de exposición todos los tratamientos (0.10, 0.18, 0.22 y 0.44 mg/l) presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Mientras que en los tiempos intermedios de 48 y 72 horas solamente las concentraciones de 0.22 y 0.44 mg/l, presentaron diferencias significativas con el grupo control.

El Propanil tuvo sobre el contenido proteico (por individuo) de *D. magna* un efecto mayor que el encontrado para el Tetradifón, en este caso para todos los tratamientos y todos los tiempos de exposición se encontró una reducción significativa en el contenido en proteínas, obteniendo reducciones que oscilaron entre 13% y el 25% con las concentraciones de 0.07 y 0.55 mg/l. El contenido en proteínas (por peso) presentó diferencias significativas para las concentraciones de 0.10 mg/l y superiores tras 120 horas de exposición. A causa del gran efecto que el Propanil produjo sobre el peso durante los primeros tiempos de exposición, la relación contenido proteínas/peso aumentó no presentando diferencias significativas con el control, aunque si se observó que para algunos tiempos y concentraciones se obtuvieron diferencias al aumentar la relación proteínas/peso.

McKee y Knowles (1986b) encontraron que concentraciones del insecticida Clordecone superiores a 30 µg/l producían reducciones significativas en los niveles de

proteínas de *D. magna* tras 7 días de exposición. Estos autores relacionaron el descenso en el contenido proteico con la reducción que se produjo en el crecimiento de *D. magna*. Estos cambios en el contenido proteico de *D. magna* estaban asociados con los efectos del insecticida sobre el crecimiento y la reproducción tras 21 días de exposición. La reducción en el contenido en proteínas tras 7 días de exposición reveló los efectos que posteriormente se encontraron sobre la reproducción y el crecimiento.

Graney y Giesy (1986) encontraron un descenso significativo en el contenido de proteínas (por peso) en *Gammarus pseudolimnaeus* expuesto a 0.77 mg/l de PCF (Pentaclorofenol). También Knowles y cols. (1987) obtuvieron un descenso en el contenido proteico de *D. magna* al ser expuesta a 811 µl/l de DEHP (Di-2-etilhexil ftalato).

En peces, Sancho y cols. (1998) detectaron un descenso en los niveles de proteínas en los tejidos de la anguila *Anguilla anguilla* expuesta a dos concentraciones del insecticida Fenitrotión (0.02 y 0.04 mg/l). Estos autores indicaron que el descenso encontrado en los niveles de proteínas se debía a la intoxicación por Fenitrotión, ya que en los animales se producen mecanismos fisiológicos de adaptación para compensar el estrés producido por el tóxico. Por otro lado, también indicaron que los animales que se encuentran bajo estrés requieren mayor cantidad de energía y esta demanda podría estimular el catabolismo de las proteínas.

El descenso en lípidos y proteínas bajo condiciones de estrés tóxico puede deberse también a diferentes mecanismos fisiológicos entre lo que se encuentran la formación de lipoproteínas utilizadas para reparar los daños que se producen en células y tejidos, así como también a la utilización por parte de las células como requerimientos energéticos al aumentar la lipólisis (Rambabu y Rao, 1994).

El efecto del Tetradifón sobre el contenido calórico, tanto por individuo como por peso, presentó diferencias significativas para todos los tratamientos y en todos los tiempos. Al calcular el contenido calórico como el conjunto de calorías presentes en los organismos a partir de los datos obtenidos para el glucógeno, los lípidos y las proteínas, cualquier disminución de uno de estos parámetros produjo un descenso en el contenido calórico, en nuestro estudio el Tetradifón produjo una disminución en las reservas energéticas de los organismos, lo que se tradujo en la gran reducción que se observa en el contenido calórico.

En el caso del Propanil, el contenido calórico (por individuo) presentó reducciones significativas para todos los tratamientos utilizados y para todos los tiempos de exposición. Sin embargo, en el contenido calórico (por peso) se observó el mismo efecto que para los anteriores parámetros estudiados, que al disminuir el peso la relación contenido calórico/peso aumentó y sólo se tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo control para los tiempos de exposición más altos, así para las 96 horas, los tratamientos de 0.21 y 0.55 mg/l presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control y en las 120 horas todos los tratamientos presentaron diferencias con el control.

McKee y Knowles (1986a) encontraron una reducción en el contenido calórico de *D. magna* tras exponerla a 0.25 y 0.5 µg/l de Fenvalerato. Igualmente, estos mismos autores detectaron un descenso en el contenido calórico de *D. magna* tras ser expuesta a 811 µg/l de DEHP (Di-2-etilhexil ftalato) tras 7 días.

En cuanto al contenido calórico expresado por peso, éste presentó un descenso significativo para *Gammarus pseudolimnaeus* expuesto a 0.77 mg/l de PCF (Pentaclorofenol) (Graney y Giesy, 1986).

Por último, el peso en *D. magna* sufrió reducciones significativas a partir de las 48 horas de exposición para todos los tratamientos de Tetradifón utilizados, este efecto se vió reducido a medida que aumentó la edad de los individuos, ya que a las 72 y 96 horas solamente los grupos tratados con 0.22 y 0.44 mg/l presentaron diferencias significativas con el control, finalmente a las 120 horas sólo los animales tratados con 0.44 mg/l de Tetradifón presentaron diferencias.

El Propanil, por su parte, tuvo un efecto más acusado durante los primeros tiempos de exposición, a las 24 horas de exposición todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el control, a las 48 horas solamente los tratamientos de 0.10 mg/l y superiores presentaron estas diferencias, y finalmente, a las 72 horas fueron los de 0.21 y 0.55 mg/l los que presentaron diferencias con el control. Esta acusada reducción en el peso durante las primeras horas hizo que la relación entre los diferentes parámetros/peso aumentara con respecto al control, ya que a las 24 horas los animales tratados con 0.55 mg/l presentaron una reducción en su peso superior al 47%.

No hemos encontrado bibliografía acerca del efecto de los plaguicidas en el peso de *D. magna*, pero si de otros contaminantes.

Así, una reducción en el peso de *D. magna* fue encontrada por Bodar y cols. (1988), al ser expuesta a 1 µg/l y 5 µg/l de Cadmio.

Khangarot y Rathone (2003) encontraron un descenso en el peso de *D. magna* para concentraciones de Cobre de 0.032 mg/l y superiores, tras 48 horas de exposición. Estos autores detectaron una reducción del peso mayor al 45% respecto al control para los organismos expuestos a 0.18 mg/l de Cobre durante 48 horas.

En otros organismos acuáticos, Vink y cols. (1995) también encontraron una reducción significativa en el peso del isópodo *Porcellionides pruinosus* expuesto a concentraciones crecientes de Carbofuran y Diazinón.

El efecto de los plaguicidas Tetradifón y Propanil sobre los porcentajes con respecto al peso para cada uno de los parámetros estudiados fue más acusado en el caso de las proteínas y los lípidos observándose que son las proteínas y los lípidos los que proporcionan la mayor cantidad de energía en *D. magna*, siendo los lípidos metabolizados en primer lugar junto con el glucógeno, seguido de las proteínas que serían metabolizadas en último lugar como fuente de energía.

Blazka (1966) encontró que, en general, se metabolizan antes los lípidos y el glucógeno como fuente de energía que las proteínas, ya que estas son utilizadas como fuente de energía de emergencia tras una carencia o falta de nutrientes. Así los animales bajo condiciones de estrés metabolizan en primer lugar las reservas de glucógeno seguidas por las de lípidos y finalmente por las reservas proteícas.

Bodar y cols. (1988) observaron una reducción en el metabolismo de *D. magna* al ser expuesta a concentraciones crecientes de Cadmio, indicando que los animales por efecto del estrés tóxico comenzarían por utilizar el glucógeno como fuente de energía, seguido probablemente de la utilización de lípidos y finalmente de proteínas. Indicaron también que el efecto inhibitor del Cd se daba principalmente en los músculos del aparato filtrador de *D. magna*, con lo que se reduce la cantidad de nutrientes incorporados al organismo. Estos autores indicaron que bajo condiciones de estrés los organismos metabolizan en primer lugar las reservas de glucógeno, seguidas por las de lípidos y finalmente por las reservas proteícas, tal y como se observa en este estudio.

Los lípidos y las proteínas son considerados como un buen indicador del estado nutritivo de *D. magna* (Tessier y Goulden 1982, Guisande y cols. 1991), bajo condiciones de estrés o ayuno prolongado el contenido en lípidos se ve reducido y el

contenido en proteínas por su parte se ve reducido bajo condiciones de ayuno muy severas.

En estas condiciones de ayuno los dáfidos sufren un descenso en su peso, y en el contenido de glucógeno, lípidos y proteínas, tras 3 días de ayuno las reservas energéticas presentes en los animales no son suficientes para mantener el crecimiento y la reproducción (Elendt, 1989). El glucógeno se utiliza como material de reserva para la fabricación de los precursores de la cutícula y como reserva metabólica (Parvathy, 1971). En los crustáceos, las reservas lipídicas son la fuente de energía para la reproducción y la supervivencia durante periodos en los cuales se da una menor incorporación de nutrientes (Tessier y cols., 1983).

Ya se ha comentado que tanto el Tetradifón como el Propanil producen una inhibición en la incorporación del alimento, esto produce una menor incorporación de energía por parte de los organismos expuestos, si a esto se le añade el aumento de la demanda energética con el fin de contrarrestar los efectos tóxicos, entonces los niveles de glucógeno, lípidos y proteínas se verán reducidos desde los primeros tiempos de exposición. Por otro lado estos compuestos se incorporan fácilmente al interior celular a través de la membrana lipídica provocando interferencias en el normal funcionamiento tanto bioquímico como fisiológico de las células (Yasmeen y cols. 1991).

Todo esto se traducirá en una menor reproducción y un menor crecimiento ya que los organismos deben utilizar su energía para mantenerse vivos, tal y como se ha visto en este estudio, donde el efecto de ambos plaguicidas sobre la incorporación del alimento, el metabolismo energético, la reproducción y el crecimiento están estrechamente relacionados y nos aportan una visión en conjunto sobre los efectos adversos que el Tetradifón y el Propanil tiene en la fisiología de *D. magna*.

Hemos comentado que son muchas y diversas las causas por las que los plaguicidas producen alteraciones en el metabolismo energético de los animales, tales como: sistemas fisiológicos compensatorios, peroxidación lipídica, hipoxia, alteraciones enzimáticas en las diferentes rutas metabólicas relacionadas con la obtención de energía...etc.

Para todas estas causas el efecto final es el mismo; la reducción en los niveles de glucógeno, lípidos y proteínas como principales fuentes de energía, con lo que la valoración de estos parámetros nos da una información del estado fisiológico del animal y nos ayuda a valorar los posibles efectos que a largo plazo se pueden encontrar.

Los cambios bioquímicos observados tras 5 días de exposición a los plaguicidas Tetradifón y Propanil están asociados a los efectos que se observan en la reproducción y el crecimiento de *D. magna*, tras 21 días de exposición. Ya que los efectos observados en la reproducción y el crecimiento son precedidos no sólo por cambios en el contenido en glucógeno, lípidos y proteínas, sino también por una inhibición importante en la incorporación del alimento.

La mayoría de los autores destacan la utilización de estos parámetros bioquímicos para predecir los efectos crónicos, ya que son ensayos cortos en el tiempo y muy sensibles a los efectos subletales producidos por los plaguicidas, pues los cambios en los parámetros bioquímicos en muchas ocasiones se producen antes que se observen efectos en la reproducción o el crecimiento de los organismos (Ribeiro y cols., 2001; Khangarot y Rathore, 2003).

Hemos de señalar que para ninguno de los parámetros estudiados el control con acetona mostró diferencias significativas con el grupo control.

6. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de toxicidad aguda pusieron de manifiesto que la mortalidad del crustáceo *D. magna* tras 24 horas de exposición al acaricida Tetradifón fue mayor que la producida por el herbicida Propanil. Sin embargo, tras 48 horas de exposición, la sensibilidad del crustáceo fue similar para ambos plaguicidas.

2. Concentraciones subletales del acaricida Tetradifón no afectaron a la longevidad de *D. magna*; y el herbicida Propanil provocó un descenso de la misma sólo con la mayor concentración utilizada.

3. La reproducción de *D. magna* se vió claramente reducida por ambos plaguicidas, siendo el efecto del Propanil más acusado en todos los parámetros evaluados.

4. Entre los parámetros reproductivos estudiados el número total de descendientes producidos fue el más afectado, especialmente por exposición al herbicida Propanil.

5. La tasa intrínseca de crecimiento natural (r) es un buen indicador del nivel de contaminación producida por ambos plaguicidas en *D. magna*, ya que combina el efecto de estos tóxicos sobre la supervivencia y la reproducción de la población. No obstante, no fue el parámetro más sensible debido al poco efecto de estos plaguicidas en la longevidad de los dáfidos.

6. Los plaguicidas utilizados afectaron al crecimiento de *D. magna* produciendo una reducción significativa de la longitud media del caparazón siendo más acusado el efecto del acaricida Tetradifón.

7. Las Tasas de Filtración e Ingestión de alimento en el crustáceo *D. magna* pueden ser consideradas como un buen índice en la evaluación del efecto de la contaminación por plaguicidas a corto plazo. De los dos plaguicidas estudiados, el acaricida Tetradifón produjo una mayor inhibición en el comportamiento filtrador de *D. magna*.

8. El acaricida Tetradifón y el herbicida Propanil provocaron en el crustáceo *D. magna* un descenso general de los niveles de glucógeno, lípidos y proteínas tisulares, que fue proporcional a la concentración de plaguicida ensayada y más acusado por exposición al acaricida Tetradifón.

9. Los plaguicidas Tetradifón y Propanil produjeron una disminución en las reservas energéticas de los dáfidos, lo que se tradujo en una gran reducción en el contenido calórico, que fue más evidente con el acaricida Tetradifón.

10. El peso en *D. magna* sufrió reducciones significativas cuando los organismos se vieron expuestos a ambos plaguicidas. Sin embargo, el herbicida Propanil afectó sobre todo a los dáfidos con edades inferiores a las 48 horas.

11. El disolvente utilizado en el presente estudio (acetona) no influyó en los parámetros evaluados en *D. magna*.

7. BIBLIOGRAFÍA

-
- ✓ ABE T.A., SAITO H., NIIKURA Y., SHIGEOKA T. Y NAKANO Y. (2001). "Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives." **Chemosphere** **45**: 487-495.
 - ✓ ALLAN J.D. Y 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. Y BAIRD D.J. (1995). "A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*." **Environ. Toxicol. Chem.** **14**(9): 1625-1630.
 - ✓ ALONSO M. (1996). "**Fauna Iberica**" Vol 7 Crustacea Branchiopoda. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Eds Ramos M.A. Madrid. 486p.
 - ✓ BAIRD D.J., BARBER I., SOARES A.M.V.M. Y CALOW P. (1991). "An early life-stage test with *Daphnia magna* Straus: An alternative to the 21-days chronic test?" **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **22**: 1-7.
 - ✓ BARATA C. Y BRAIRD D. (2000). "Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based test with *Daphnia magna* Straus." **Aquat. Toxicol.** **48**: 195-209.
 - ✓ BARRY M.J. (1999). "The effects of a pesticide on inducible phenotypic plasticity in *Daphnia magna*." **Environ. Pollut.** **104**: 217-334.
 - ✓ BAUDO, R. (1987). Ecotoxicological testing with *Daphnia*. En *Daphnia* (Edited by R.H. Peters and R. de Bernardi). **Mem. Ist. Ital. Idrobiol.** **45**: 461-482.
 - ✓ BECHMANN R.K. (1994). "Use of life tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcate* (Baird)." **Environ. Toxicol. Chem.** **13**: 1509-1517.
 - ✓ BEYERS D.W., RICE J. A., CLEMENTS W.H. Y HENRY C.J. (1999). "Estimating physiological cost of chemical exposure: intergrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish." **Can. J. Fish. Aquat.Sci.** **56**: 814-822.
 - ✓ BHAVAN P.S. Y GERALDINE P. (2001). "Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobranchium malcolmsolii* on exposure to endosulfan." **Pestic. Biochem. Physiol.** **70**: 27-41.

-
- ✓ BISCHOFF M.W. Y BOLD M.C. (1983). "Physiological studies IV. Some algae from encheded rock and related algae species." **Univ. Texas Publ.** **6318, 95p.**
 - ✓ BLAZKA P. (1966). "Metabolism of natural and cultured populations of *Daphnia* related to secondary production." **Verh. Intern. Verein. Limnol.** **16: 380-385.**
 - ✓ BLIGH G.M. Y DYER W.J. (1959). "A rapid method of total lipids extraction and purification." **Can. J. Biochem. Physiol.** **37: 911-917.**
 - ✓ BLOCKWELL S.J., TAYLOR E.J., JONES I. Y PASCOE D. (1998). "The influence of freshwater pollutants an interaction with *Asellus aquaticus* (L) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L)." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **34: 41-47.**
 - ✓ BODAR C.W.M., VAN DER SLUIS, VOOGT P.A. Y 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.**
 - ✓ BUCK N.A., ESTESEN B.J. Y WARR G.W. (1982). "DDT moratorium in Arizon: residues in soil and alfalfa after 12 yerars" **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **13: 61-72.**
 - ✓ BUHL KJ, HAMILTON SJ. Y SCHMULBACH JC. (1993). "Chronic toxicity of the bromoxynil formulation buctril[®] to *Daphnia magna* exposed continuously and intermittently." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **25:152-159.**
 - ✓ BUIKEMA A.L., GEIGER J.G. Y LEE D.R. (1980). "*Daphnia* toxicity test." A.L. Buikema Jr, John Cairns Jr. Eds Aquatic invertebrate bioassays, ASTM STP715. **American Society of Testing and Materials.** Philadelphia, Pennsylvania. p 48-69.
 - ✓ CALL D.J., BROOKE L.T., KENT R.J., KNUTH M.L. ANDERSON C. Y MORIARITY C. (1983). "Toxicity, bioconcentration, and metabolism of the herbicide propanil (3,4-dichloroaniline) in freshwater fish." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **12: 175-182.**
 - ✓ CALOW P Y SIBLY M.M. (1990). "A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications." **Funct. Ecol.** **4: 283-288.**
 - ✓ CEE (1992). CEE directive 92/69/EEC, **Official Journal of the EEC L383 A:** Methods for the determination of ecotoxicity. C.2. Acute Toxicity for *Daphnia*.

-
- ✓ CERÓN J.J., SANCHO E., FERRANDO M.D., GUTIERREZ C. Y ANDREU E. (1996). "Metabolic effects of diazinon on the european eel *Anguilla anguilla*." **J. Environ. Sci. Health B(31) 5: 1029-1040.**

 - ✓ CHAIYARACH S., RATANANUN V. Y HARREL R.C. (1975). "Acute toxicity of the insecticides toxaphene and carbaryl and the herbicides propanil and molinate to four species of aquatic organisms." **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 14(3): 281-284.**

 - ✓ CHANG E.S. Y O'CONNOR J.D. (1983). "Metabolism and transport of carbohydrates and lipids." **The Biology of Crustacea**. Vol. 5. Academic press, 263-287.

 - ✓ CHEN J.C. Y LIN C.H. (2001). "Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*." **Aquacult. 192: 55-65.**

 - ✓ CHOI J., ROCHE H. Y CAQUET T. (2001). "Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae." **Comp. Biochem. Physiol. C. 130: 11-17.**

 - ✓ COOKE B.R. Y STRINGER A. (1982). "Distribution and breakdown of DDT in an orchard soil." **Pest. Sci. 13: 545-551.**

 - ✓ COTOU E. (1993). "The controlled production of dormant eggs of *Daphnia pulex* (Leydig) as biological starting material for testing." **PhD Thesis, University of Ghent, Belgium, 284p.**

 - ✓ CROSSLAND N.O. Y HILLABY J.M. (1985). "Fate and effects of 3,4-dichloroaniline in the laboratory and in outdoor ponds. II. Chronic toxicity to *Daphnia sp.* and other invertebrates." **Environ. Toxicol. Chem. 4: 489-499.**

 - ✓ CROSSLAND N.O. (1990). "A review of the fate and toxicity of 3,4-dichloroaniline in aquatic environments." **Chemosphere 21: 1489-1497.**

 - ✓ DANIELS R.E. Y ALLAN J.D. (1981). "Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide." **Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 485-494.**

-
- ✓ DAY K. Y KAUSHIK N.K.(1987a). “Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the algae *Chlamydomonas reinhardtii*.” **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **16: 423-432.**
 - ✓ DAY K. Y KAUSHIK N.K. (1987b). “An assessment of the chronic toxicity of the synthetic pyrethroid, fenvalerate to *Daphnia galeata mendotae*, using life tables.” **Environ. Pollut.** **44: 13-26.**
 - ✓ DAY K.E. (1989). “Acute chronic and sublethal effects of synthetic pyrethroids on freshwater zooplankton.” **Environ. Toxicol. Chem.** **8 (5): 411-416.**
 - ✓ DECOEN W.M., JANSSEN C.R. Y SEGNER H. (2001). “The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane.” **Ecotox. Environ. Saf.** **48: 223-234.**
 - ✓ DESAIAH D., CUTKOMP L.K., KOCH R.B., YAP H.H. (1972). “Tetradifón (Tedion^R): a specific inhibitor of Mg⁺² dependent mitochondrial adenosine triphosphate activity.” **Life Science II.** **11(7):389-395.**
 - ✓ DONKIN P., WIDDOWS J., EVANS S.V., STAFF F.J. Y YAN T. (1997). “Effect of neurotoxic pesticides on the feeding rate of marine mussels (*Mytilus edulis*).” **Pestic. Sci.** **49: 196-209.**
 - ✓ DROBNE D. Y HOPKIN S.P. (1994). “Ecotoxicological laboratory test for assessing the effects of chemicals on terrestrial isopods.” **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53: 390-397.**
 - ✓ EASON C. Y O’HALLORAN K. (2002). “Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment.” **Toxicol.** **181-182: 517-521.**
 - ✓ EDDLESTON M., RAJAPAKSHE M., ROBERTS D. REGINALD K., REZVI SHERIFF M.H.,DISSANAYAKE W. Y BUCKLEY N. (2002). “Severe propanil [N-(3,4-dichlorophenyl) propanamide] pesticide self-poisoning.” **J. Toxicol.-Clin. Toxicol.** **40(7): 847-854.**
 - ✓ ELENDET B.P. (1989). “Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*.” **Arch. Hydrobiol.** **116(4): 415-433.**

-
- ✓ FERNÁNDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D. AND ANDEU-MOLINER E. (1992). "Filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* after exposure to endosulfan and diazinon." **Comp. Biochem. Physiol.** **103C(2): 357-361.**

 - ✓ FERNÁNDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D., Y ANDREU-MOLINER E. (1993a). "Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*." **Comp. Biochem. Physiol.** **106C (2): 437-441.**

 - ✓ FERNANDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D. Y ANDREU-MOLINER E. (1993b). "Effects of the insecticide methylparation on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*." **Sci. Total. Environ (Suppl.): 867-876.**

 - ✓ FERNÁNDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D., Y ANDEU-MOLINER. E. (1994). "Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behaviour of *Daphnia magna*." **Ecotox. Environ. Safety.** **27: 82-89.**

 - ✓ FERNÁNDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D. Y ANDREU-MOLINER E. (1995a). "Chronic toxicity of Methylparathion to *Daphnia magna*: Effects on survival, reproduction and growth." **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **54: 43-49.**

 - ✓ FERNÁNDEZ-CASALDERREY A., FERRANDO M.D., Y ANDREU-MOLINER E. (1995b). "Chronic toxicity of diazinon to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth." **Toxicol. Environ. Chem.** **49: 25-32.**

 - ✓ FERRANDO M.D., ANDREU-MOLINER E. Y FERNÁNDEZ-CASALDERREY A. (1992). "Relative sensitivity of *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* to five pesticides." **J. Environ. Sci. Health B27 (5): 511-522.**

 - ✓ FERRANDO M.D., JANSSEN C.R., ANDREU E. Y PERSOONE G. (1993). "Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. III. The effects of chemicals on the feeding behavior." **Ecotox. Environ. Saf.** **26: 1-9.**

 - ✓ FERRANDO M.D., SANCHO E., Y ANDREU-MOLINER, E. (1995). "Effects of Lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure." **J. Environ. Sci. Health, B.** **30 (6): 815-825.**

 - ✓ FERRANDO M.D., SANCHO E. Y ANDREU E. (1996a). "Accumulation of Tetradifon in an algae (*Nannochloris oculata*) and the cladoceran *Daphnia magna*." **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **57: 139-145.**

-
- ✓ FERRANDO M.D., SANCHO E. AND ANDREU E.(1996b). “Chronic toxicity of Fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*) and the cladoceran (*Daphnia magna*).” **Ecotoxicol. 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 B 34 (4): 569-586.**

 - ✓ FOLMAR L.C., SANDERS H.O. Y JULIN A.M. (1979). “Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates.” **Arch. Environ. Contam. Toxicol 8: 269-278.**

 - ✓ GARRIDO E.M., LIMA J.L.F.C., DELERUE-MATOS C., BORGES F., SILVA A.M.S. Y OLIVEIRA BERTT A.M. (2001). “Electrochemical oxidation of propanil and related N-substituted amides.” **Anal. Chim. Acta 434: 35-41.**

 - ✓ GAULD, T. (1951) “The grazing rate of marine copepods.” **J. Mar. Biol. Ass. 26: 695-706.**

 - ✓ GEIGER J.G. Y BUIKEMA A.L. (1981). “Oxygen consumption and filtering rate in *Daphnia pulex* after exposure to water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, no. 2 fuel oil and coal tar creosotte.” **Bull. Environ.Contam. Toxicol. 27:783-789.**

 - ✓ GENTILE J.M., GENTILE S.M., HAIRSTON N.G. Y SULLIVAN B.K. (1982). “The use of life-table for evaluating the chronic toxicity of pollutants to *Mysidopsis bahia*.” **Hidrobiol. 93: 179-187.**

 - ✓ GLIWICZ M.Z. Y SIENAWSKA A. (1986). “Filtering activity of *Daphnia* in low concentrations of a pesticide.” **Limnol. Oceanogr. 31: 1132-1138.**

 - ✓ GRANNEY R.L. Y GIESY J.P. (1986). “Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* Bousfield (Crustacea, Amphipoda).” **Ecotox. Environ. Saf. 12: 233-251.**

 - ✓ GUARINO A.M., PRITCHARD J.B., ANDERSON J.B. AND D.P. RALL. (1974). “Tissue distribution of [14C]DDT in the lobster after administration via intravascular or oral routes of after exposure from ambient sea water.” **Toxicol. Appl. Pharmacol. 29: 277-288.**

-
- ✓ GUILHERMINO L., DIAMANTINO T., SILVA M.C. Y SOARES A.M.V.M. (2000). "Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?" **Ecotox. Environ. Saf.** **46: 357-362.**
 - ✓ GUISANDE C., TOJA J. Y MAZUELOS N. (1991). "The effects of food on protein content in rotifer and cladoceran species: a field correlational study." **Freshwat. Biol.** **26: 433-438.**
 - ✓ GULATI R.D. (1978). "The ecology of common planktonic Crustacea of the fresh waters in the Netherlands." **Hidrobiol.** **59: 101-112.**
 - ✓ HANAZATO T. (1998). "Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effects of chemicals." **Chemosphere** **36 (8): 1903-1909.**
 - ✓ HARDING W.C. (1979). "Pesticide profiles, part one: insecticides and miticides." Univ. Maryland, **Coop. Ext. Serv. Bull.** **267, 30p.**
 - ✓ HATCH A.C. Y BURTON G.A. (1999). "Phototoxicity of fluoranthene to two freshwater crustaceans, *Hyalella azteca* and *Daphnia magna*: measures of feeding inhibition as a toxicological endpoint." **Hidrobiol.** **400: 243-248.**
 - ✓ HAYES W.J. Y LAWS E.R. (1990). "Handbook of pesticide toxicology." Vol. III, **Classes of pesticides.** Academic Press. New York. 1576p.
 - ✓ HEBERT P.D.N. (1978). "The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae)." **Biol. Rev.** **53:387-426.**
 - ✓ HUPPATZ J.L. (1996). "Quantifying the inhibitor-target site interactions of photosystem II herbicide." **Weed Science.** **44: 743-748.**
 - ✓ HUTCHINSON G.E. (1967). "A treatise on limnology." Vol.II. **Introduction to lake biology and the limnoplankton.** Wiley, 1115p.
 - ✓ INGERSOLL C.G. Y WINNER R.W. (1982). "Effects on *Daphnia pulex* of daily pulse exposure to copper or cadmium." **Environ. Toxicol. Chem.** **1: 321-327.**
 - ✓ ISO. (International Organization for Standardization) (1982). "Water quality determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, crustacea)." **I.S.O. 6341-1982, p.1-10.**

-
- ✓ JAK D.R. Y MEADOR J.P. (1997). "Evaluation of laboratory derived toxic effects concentrations of a mixture of metals by testing freshwater plankton communities in enclosures." **Water Res. 30: 1215-1227.**

 - ✓ JAK R.G., MAAS J.L. Y SCHOLTEN M.C.T.H. (1998). "Ecotoxicology of 3,4-dichloroaniline in enclosed freshwater plankton communities at different nutrient levels." **Ecotoxicol. 7: 49-60.**

 - ✓ JARK R.G., MAAS J.L. Y SCHOLTEN M.C.T. (1996). "Evaluation of laboratory derived toxic effect concentrations of a mixture of metals by testing fresh-water plankton communities in enclosures." **Water. Res. 30: 1215-1227.**

 - ✓ JOHNSON W.W. Y FINLEY M.T. (1980). "Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates." **U.S. Fish and Wildlife service. Resource publication 137.** Washington, D.C.

 - ✓ JUCKELKA C.M. Y SNELL T.W. (1994). "Rapid toxicity assessment using rotifer ingestion rate." **Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26: 549-554.**

 - ✓ JUCKLEKA C.M. Y SNELL T.M. (1995). "Rapid toxicity assessment used ingestion rate of cladocerans and ciliates." **Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28: 508-512.**

 - ✓ JULLI M. Y 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.**

 - ✓ KHANGAROT B.S. Y 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.**

 - ✓ KLUTTGEN B., KUNTZ N. Y RATTE H.T. (1996). "Combined effects of 3,4-dichloroaniline and food concentration on life table data of two related cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangulata*." **Chemosphere 32(10): 2015-2028.**

 - ✓ KNOPS M., ALTENBURGER R. Y SEGNER H. (2001). "Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress" **Aquat. Toxicol. 53: 79-90.**

-
- ✓ KNOWLES C.O., McKEE M.J. Y PALAWSKI D.U. (1987). "Chronic effects of di-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition survival and reproduction of *Daphnia magna*." **Environ. Toxicol. Saf. 6: 201-208.**

 - ✓ KOBAYASHI M., AND NEZU T. (1986). "Variation of hemoglobin content in *Daphnia magna*." **Physiol. Zool. 59(1): 35-42.**

 - ✓ KONSTANTINOOU I.K., ZARKADIS A.K. Y AIBANIST T.A. (2001). "Photodegradation of selected herbicides in various natural waters and soils under environmental conditions." **J. Environ. Qual. 30(1): 121-130.**

 - ✓ LAMPERT W., FLECKNER W., RAI H. Y TAYLOR B.E. (1986). "Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study of the clear water spring phase." **Limnol. Oceanogr. 31: 478-490.**

 - ✓ LARSSON P. Y DODSON S. (1993). "Chemical communication in plankton animals." **Arch. Hydrobiol. 129: 129-155.**

 - ✓ LEAKE L.A. Y GOLDMAN H. (1984). "The influence of cholinergic and anticholinergic drugs on egg deposition by a rotifer" **J. Pharmac. Exp. Ther. 146: 123-128.**

 - ✓ LEE S., NA E., CHO Y., KOOPMAN B. Y BITTON G. (1997). "Short-term toxicity test based on algal uptake by *Ceriodaphnia dubia*." **Water Environ. Res. 69: 1207-1210.**

 - ✓ LEONHARD S.L. Y LAWRENCE S.G. (1981). "*Daphnia magna* (Straus), *Daphnia pulex* (Leydig) Richard." En S.G. Lawrence (Ed.). Manual for the culture of selected freshwater invertebrates. **Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. No. 54: 31-50.**

 - ✓ LI W.M., YIN D.Q., ZHOU Y., HU S.Q. Y WANG L.S. (2003). "3,4-dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*)." **Ecotoxicol. Environ. Saf. 56: 251-255.**

 - ✓ 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., AND RANDALL R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." **J. Biol. Chem. 193: 265-275.**

-
- ✓ LUBIAN L.M. (1979). "Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica marina *Nannochloris sp.*" **Invest. Pesq.** **67**.
 - ✓ LYNCH M. Y SHAPIRO J. (1981). "Predation enrichment and phytoplankton community structure." **Limnol. Oceanogr.** **26: 86-102**.
 - ✓ MA J. (2002). "Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*." **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **68: 275-281**.
 - ✓ MALTBY L. Y CALOW P. (1989). "The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future." **Hydrobiol.** **188/189: 65-76**.
 - ✓ MANN R., Y GALLAGER S.M. (1985). "Physiological and biochemical energetics of larvae of *Tereos navalis* L. and *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalva: Teredinidae)." **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** **85: 211-218**.
 - ✓ MARK U. Y SOLBÉ J. (1998). "Analysis of the ecotoxic aquatic toxicity (eat) database V- the relevance of *Daphnia magna* as a representative test species." **Chemosphere** **36(1): 155-166**.
 - ✓ MATSUMURA F. (1985). "**Toxicology of insecticides**" 2nd edition. Eds Plenum. New York. 598 p.
 - ✓ McKEE J.M. Y KNOWLES C.O. (1986a). "Effects of fenvalerate on biochemical parameters, survival and reproduction of *Daphnia magna*." **Ecotox. Environ. Saf.** **12: 70-84**.
 - ✓ McKEE M.J. Y KNOWLES C.O. (1986b). "Protein, nucleic acid and adenylate levels in *Daphnia magna* during chronic exposure to chlordecone." **Environ. Pollut. (A)** **42: 335-351**.
 - ✓ McLEAN S., STARMER G.A. Y THOMAS J. (1969). "Methaemoglobin formation by aromatic amines." **J. Pharm. Pharmacol.** **21: 441-450**.
 - ✓ McWILLIAM R.A. Y BAIRD D.J. (2002) "Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*." **Environ. Toxicol. Chem.** **21(6): 1198-1205**.
 - ✓ MEISTER R.T. (1992). "**Farm chemicals handbook'92**." Meister publishing company. Willoughby, Ohio. 970p.

-
- ✓ MONTGOMERY J.H. (1993). “**Agrochemical desk reference: Environmental data.**” Lewis Publisher. Michigan. 625 p.

 - ✓ MOORE M.T., PIERCE J.R., MILAM C.D., FARRIS J.L. Y WINCHESTER E.L. (1998). “Responses of non-target aquatic organisms to aqueous propanil exposure.” **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 61: 169-174.**

 - ✓ MORKY L.E. Y HOAGLAND K.D. (1990). “Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticide to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*.” **Environ. Toxicol. Chem. 9: 1045-1051.**

 - ✓ MUÑOZ M.J., RAMOS G. Y TARAZONA J.V. (1996). “Bioaccumulation and toxicity of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*” **Aquat. Toxicol. 35: 211-220.**

 - ✓ MUYSSSEN B.T.A., JANSSEN C.R. Y BOSSUYT B.T.A. (2002). “Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations.” **Aquat. Toxicol. 56:69-79.**

 - ✓ NATH B.S. (2000). “Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori*, exposed to organophosphorus insecticides.” **Pestic. Biochem. Physiol. 68: 127-137.**

 - ✓ NEBEKER A.V. Y SCHUYTEMA G.S. (1998). “Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms and snails.” **Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35: 441-446.**

 - ✓ NIETO J.M. Y MIER M.P. (1985). “**Tratado de entomología.**” Eds Omega S.A. Barcelona. 599 p.

 - ✓ O’KELLY J.C. (1974). “Inorganic nutrients. Algal physiology and biochemistry.” W.D.P. Stewart (Eds), **Botanical monographs 10: 610-635.**

 - ✓ OECD (2000). **OECD Guidelines for testing of chemicals.** Section 2. Guideline 202. *Daphnia sp* Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, France.

 - ✓ ORCHARD S.J., HOLDWAY D. A., BARATA C., Y VAN DAM R.A. (2002). “A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*.” **Ecotox. Environ. Saf. 53: 12-19.**

-
- ✓ PARVATHY K. (1971). "Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*." **Mar. Biol.** **10: 82-86.**
 - ✓ PERSCHBACHER P.W., STONE N., LUDWING G.M. Y GUY C.B. (1997). "Evaluation of effects of common aerially-applied soybean herbicides and propanil on the plankton communities of aquaculture ponds." **Aquacul.** **157: 117-122.**
 - ✓ PETERS RH. (1987) "Metabolism in *Daphnia*." En R.H. Peters y R. de Bernardi, eds "*Daphnia*." **Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia.** **Vol. 45. p. 193-243.**
 - ✓ POLOHIEMO J.E, CRABTREE S.J, Y TAYLOR W.D. (1982). "Growth model of *Daphnia*." **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** **39:598-606.**
 - ✓ PRIMO YÚFERA E. Y CARRASCO M.J. (1986). "**Química agrícola (Plaguicidas y Fitorreguladores)**" Eds Alhambra. Madrid. 639 p.
 - ✓ RAMBABU J.P. Y RAO M.B. (1994). "Effects of organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipids and proteins contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller)." **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53: 142-148.**
 - ✓ REPETTO M. (1995). "**Toxicología avanzada**" M.Repetto. Eds Díaz de Santos, S.A. Madrid, 621p.
 - ✓ RIBEIRO S., SOUSA J.P., NOGUEIRA A.J.A. Y SOARES A.M.V.M. (2001). "Effects of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*." **Ecotox. Environ. Saf.** **49: 131-138.**
 - ✓ ROCHE K.F. (1998). "Prediction of fecundity in chronic toxicity tests on *Daphnia magna*." **Wat. Res.** **32(11): 3146-3156.**
 - ✓ ROHM G., Y HASS M. (1991). **Product: STAM Tech 98% DCA herbicide (key 904399-2).** Rohm and Hass Company, Philadelphia, P.A.
 - ✓ ROSE R.M., WARNE M.St.J. Y LIM R.P. (2002). "Food concentration affects the life history response of *Ceriodaphnia* cf. *dubia* to chemicals with different mechanisms of action." **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **51: 106-114.**

-
- ✓ RUPPERT E.E., Y BARNES R.D. (1996). “**Zoología de los invertebrados.**” 6ª Edición. Eds. Mc Graw-Hill interamericana. S.A. México. 1114p.

 - ✓ SÁNCHEZ M., FERRANDO M.D., SANCHO E. Y ANDREU-MOLINER E. (1998). “Evaluation of a *Daphnia magna* renewal-cycle test method with Diazinon.” **J. Environ. Health B 33(6), 785-797.**

 - ✓ SANCHO E., FERRANDO M.D. Y ANDREU E. (1998). “Effects of sublethal exposure to a pesticide on levels of energetic compounds in *Anguilla anguilla*.” **J. Environ. Sci. Health B(33) 4: 411-424.**

 - ✓ SANCHO E., SÁNCHEZ M., FERRANDO M.D. Y ANDREU-MOLINER E. (2001). “Effects of thiobencarb herbicide to an alga (*Nannochloris oculata*) and the cladoceran (*Daphnia magna*).” **J. Environ. Sci. Health. B36(1): 55-65.**

 - ✓ SARAVANA P. Y GERALDINE P (1997). “Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogen, free sugar, and lipids in the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to sublethal concentrations of endosulfan.” **Pest. Biochem.Physiol. 58: 89-101.**

 - ✓ SCHINDLER DW. (1987) “Detecting ecosystem response to anthropogenic stress.” **Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44:6-25.**

 - ✓ SEIFTER S., DAYTON S., NOVIC B., MUNTWYLER I. (1950). “Estimation of glycogen with the antrone reagent.” **Arch. Biochem. 25: 191-200.**

 - ✓ SEMLITSCH R., FOGLIA M. Y MUELLER A. (1995). "Short-term exposure to thirphenyltin affects the swimming and feeding behavior of tadpoles." **Environ. Toxicol. Chem. 14(8): 1419-1423.**

 - ✓ SKAARE J.U., BERNHOFT A., DEROCHER A., GABRIELSEN G.W., GOKSOYR A., HENRIKSEN E., LARSEN H.J., LIE E. Y WIIG O. (2000). “Organochlorines in top predators at Svalbard occurrence, levels and effects.” **Toxicology Letters 112/113: 103-109.**

 - ✓ SOSAK-SWIDERSKA B., TYRAWKA D. Y DZIDO D. (1998). “*Daphnia magna* ecotoxicity test with parathion.” **Chemosphere 37(14-15): 2989-3000.**

 - ✓ STAPLES C.A., MURPHY S.R., McLAUGHLIN J.E., LEUNG H.W., CASCIERI T.C. Y FARR C.H. (2000). “Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters.” **Chemosphere 40: 29-38.**

-
- ✓ STARK J.D. Y WENNERGREN U. (1995). "Can population effects of pesticides be predicted from demographic toxicological studies?" **J. Econ. Entomol.** **88: 1089-1096.**
 - ✓ STARK JD, TANIGOSHI L, BOUNFOUR M. Y ANTONELLI A. (1997). "Reproductive potential: its influence on the susceptibility of a species to pesticides." **Ecotox. Environ. Safety.** **37: 273-279.**
 - ✓ STEPHAN E.C.(1997). "Aquatic toxicology and harzard evaluation. Methods for calculating an LC₅₀." **Library of Congress Catalog Card number: 77-075532.**
 - ✓ TAYLOR G., BAIRD D.J. Y 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.**
 - ✓ TESSIER A.J. Y GOULDEN C.E. (1982). "Estimating food limitation in cladoceran populations." **Limnol. Oceanogr.** **27: 707-717.**
 - ✓ TESSIER A.J., GOULDEN C.E. Y DURAND M.W. (1983). "Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation." **Limnol. Oceanogr.** **28: 667-676.**
 - ✓ THORP J.H. Y CORVICH A.P. (1991). Cladocera and other Branchiopoda. En: "Ecology and classification of northamerican freshwater invertebrates." Academic Press, Inc. U.S.A. 911p.
 - ✓ TRIPATHI P.K. Y SINGH A. (2002). "Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on protein metabolism of the freshwater snail *Lymnaea acuminata.*" **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **70: 146-152.**
 - ✓ ULLRICH S.O. Y MILLEMANN R.E. (1983). "Survival, respiration and food assimilation of *Daphnia magna* exposed to petroleum-derived and coal-derived oils at three temperatures." **Can. J.Fish.Aquat. Sci.****40:17-26.**
 - ✓ UMMINGER B.L. (1970). "Physiological studies on super cool hill fish *Pundulus heteroclitus* III carbohydrate metabolism and survival at sub zero temperature." **J. Exp. Zool.** **173, 153-159.**
 - ✓ VAN LEEUWEN, C. J., MOBERTS, F., NIEBEEK, G. (1985). "Aquatic toxicology aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna.*" **Aquatic Toxicol.** **8: 165-175.**

-
- ✓ 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.**

 - ✓ VINK K., DEWI L., BEDAUX J., TOMPOT A., HERMANS M. Y VAN STRAALEN 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. Y 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. (1983) "**Pesticides. Theory and Application.**" Eds Freeman. New York. 308 p.

 - ✓ WARE G. W. (2000). "**The pesticide book**" 5th Ed. Thomson Publications, Fresno, California. 415p.

 - ✓ WATERMAN T. (1961). "**Comparative Physiology.**" Vol 1. Academic Press, New York. 681p.

 - ✓ WHEATLEY G.A. (1965). "The assessment and persistence of residues of organochlorines insecticides in soils and their uptake by crops." **Ann. Appl. Biol.** **55: 325-329.**

 - ✓ WILLEMS A.G.M. Y NIMMO W.B. (1981). "**The degradation of ¹⁴C-tetradifon**" In a water/hydro soil system, weesp, Netherlands, Duphar B.V.(Unpublished Proprietary Report n° 56635/41/81).

 - ✓ VINK K., DEWI L., BEDAUX J. Y TOMPOT A. (1995). "The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprophic isopod." **Environ. Toxicol. Chem.** **14(7): 1225-1232.**

 - ✓ WONG C.K. (1997). "Effects of diazinon on some population parameters of *Moina macrocopa* (Cladocera)." **Water. Air. Soil Pollut.** **393: 393-399.**

 - ✓ WONG C.K., STRICKLER J.R. Y ENGELHARDT F.R. (1983). "Feeding behavior of *Daphnia pulex* in crude oil dispersions." **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **31:152-157.**

- ✓ WORTHING C.R. (1987). “**The pesticide manual**” 8th ed. Croydon. British Crop Protection Council. (BCPC Publications). 1081p.
- ✓ WSSA 1994 (Weed Sciences Society of America). “**Herbicide Handbook.**” 7th Ed. Champaign, Illinois. 352p.
- ✓ YASMEEN R., TULASI S.J. Y RAO J.V.R. (1991). “Metabolic changes in the air breathing fish *Anabas scandens* on long term exposure to endosulfan.” **Pestic. Biochem. Physiol.** **40: 200-205.**
- ✓ YÚFERA 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.**
- ✓ ZHANG L. Y BAER K.N. (2000) “The influence of feeding, photoperiod and selected solvents on the reproductive strategies of the water flea, *Daphnia magna*.” **Environ. Pollution** **110: 425-430.**
- ✓ ZÖLLER N., KIRCH K. (1962). “Über die quantitative bestimmung von lipoiden (Mikromethode).” **Z. Ges. Exp. Med.** **135: 535.**

8. ANEXO ESTADÍSTICA

8.1. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN *D. magna*.

8.1.1. Acaricida Tetradifón

Tabla 1. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el tamaño de la camada (CDA) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CDA	5	501.2707	100.2541	23.0125
Error	24	104.5560	4.3565	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
14.52	0.44						
20.48	0.22	*					
22.32	0.18	*					
25.16	0.10	*	*	*			
25.88	C+A	*	*	*			
26.24	Control	*	*	*			

Figura 1. Resultados del test de Duncan para los valores del tamaño de la camada en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el número de camadas (NCDA) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
NCDA	5	0.8227	0.1645	2.8368
Error	24	1.3920	0.0580	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.44	0.18	0.10	0.22	C+A	Control
4.54	0.44						
4.62	0.18						
4.68	0.10						
4.74	0.22						
4.94	C+A	*					
5.00	Control	*	*				

Figura 2. Resultados del test de Duncan para el número medio de camadas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el tiempo a la primera puesta (T1PTA) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
T1PTA	5	0.8227	0.1645	2.8368
Error	24	1.3920	0.0580	($p < 0.001$)

Media	Grupo	C+A	Control	0.10	0.18	0.22	0.44
7.60	C+A						
7.82	Control						
8.06	0.10	*					
8.68	0.18	*	*	*			
8.80	0.22	*	*	*			
9.00	0.44	*	*	*			

Figura 3. Resultados del test de Duncan para los valores del tiempo a la primera puesta en *D. magna* expuesta a Tetradifón.**Tabla 4.** Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el número de neonatos por hembra (NH) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
NH	5	14854.2697	2970.8539	25.2310
Error	24	2825.9040	117.7460	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
65.94	0.44						
97.28	0.22	*					
102.06	0.18	*					
118.20	0.10	*	*	*			
127.80	C+A	*	*	*			
131.66	Control	*	*	*			

Figura 4. Resultados del test de Duncan para el número de neonatos por hembra en *D. magna* expuesta a Tetradifón.**Tabla 5.** Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la longevidad (LV) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
LV	5	0.1440	0.0288	2.4000
Error	24	0.2880	0.0120	($p > 0.05$)

Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la longitud (L) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
L	5	0.0314	0.0063	72.5000
Error	24	0.0021	0.0001	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.18	0.22	0.10	C+A	Control
0.384	0.44						
0.446	0.18	*					
0.446	0.22	*					
0.464	0.10	*	*	*			
0.476	C+A	*	*	*			
0.482	Control	*	*	*	*		

Figura 5. Resultados del test de Duncan para la longitud en *D. magna* expuesta a Tetradifón.**Tabla 7.** Análisis de la varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos en la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M	F
r	5	0.0153	0.0031	39.9043
Error	24	0.0018	0.0001	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	C+A	Control	0.10
0.270	0.44						
0.286	0.22	*					
0.298	0.18	*	*				
0.324	C+A	*	*	*			
0.326	Control	*	*	*			
0.330	0.10	*	*	*			

Figura 6. Resultados del test de Duncan para los valores de la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

8.1.2. Herbicida Propanil

Tabla 8. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para el tamaño de la camada (CDA) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CDA	4	1840.6585	460.1646	76.6035
Error	20	120.1419	6.0071	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
2.924	0.55					
10.020	0.21	*				
20.010	0.10	*	*			
22.400	0.07	*	*			
26.240	Control	*	*	*	*	

Figura 7. Resultados del test de Duncan para los valores del tamaño de la camada en *D. magna* expuesta Propanil.**Tabla 9.** Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de número de camadas (NCDA) obtenidas al exponer a *D. magna* a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
NCDA	4	27.8624	6.9656	12.4832
Error	20	11.1600	0.5580	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
1.76	0.55					
3.60	0.21	*				
3.88	0.10	*				
4.00	0.07	*				
5.00	Control	*	*	*	*	

Figura 8. Resultados del test de Duncan para los valores de número de camadas producida por *D. magna* expuesta a Propanil.**Tabla 10.** Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores obtenidos en el tiempo a la primera puesta (T1PTA) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
T1PTA	4	40.9824	10.2456	8.6695
Error	20	23.6360	1.1818	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
7.90	0.55					
10.00	0.21	*				
10.06	0.10	*				
10.14	0.07	*				
11.94	Control	*	*	*	*	

Figura 9. Resultados del test de Duncan para el tiempo a la primera puesta en *D. magna* expuesta a Propanil.

Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) para el número de neonatos por hembra (NH) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
NH	4	41435.5544	10358.8886	88.7811
Error	20	2333.5800	116.6790	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
14.36	0.55					
38.44	0.21	*				
80.14	0.10	*	*			
87.06	0.07	*	*			
131.66	Control	*	*	*	*	

Figura 10. Resultados del test de Duncan para los valores del numero de neonatos por hembra para *D. magna* expuesta a Propanil.

Tabla 12. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la longevidad (LV) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
T1PTA	4	246.3504	61.5876	6.9688
Error	20	176.7520	8.8376	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
13.00	0.55					
20.26	0.21	*				
21.00	0.10	*				
21.00	0.07	*				
21.00	Control	*				

Figura 11. Resultados del test de Duncan para los valores de longevidad para *D. magna* expuesta a Propanil.

Tabla 13. Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la longitud (L) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
L	4	0.0133	0.0033	14.0678
Error	20	0.0047	0.0002	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
0.422	0.55					
0.478	0.21	*				
0.478	0.10	*				
0.482	0.07	*				
0.480	Control	*				

Figura 12. Resultados del test de Duncan para los valores de longitud para *D. magna* expuesta a Propanil.**Tabla 14.** Análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
r	4	0.0979	0.0245	15.0160
Error	20	0.0326	0.0016	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
0.138	0.55					
0.230	0.21	*				
0.268	0.10	*				
0.274	0.07	*				
0.326	Control	*	*	*		

Figura 13. Resultados del test de Duncan para la tasa intrínseca de crecimiento natural (r) para *D. magna* expuesta a Propanil.

8.2. EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL SOBRE EL COMPORTAMIENTO FILTRADOR DE *D. magna*.

8.2.1. Acaricida Tetradifón

Tabla 15. Análisis de la varianza (ANOVA) para la tasa de filtración (TF) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
TF	5	642908.9472	128581.7894	55.1000
Error	18	42004.9641	2333.6091	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.18	0.22	0.10	Control	C+A
115.7	0.44						
167.5	0.18						
193.1	0.22	*					
211.1	0.10	*					
512.6	Control	*	*	*	*		
514.3	C+A	*	*	*	*		

Figura 14. Resultados del test de Duncan para la tasa de filtración en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

Tabla 16. Análisis de la varianza (ANOVA) para la tasa de ingestión (TI) en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
TI	5	13694.9141	2738.9828	19.2552
Error	18	2560.4344	142.2464	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.18	0.44	0.10	0.22	C+A	Control
47.0	0.18						
50.4	0.44						
62.5	0.10						
69.7	0.22	*	*				
102.3	C+A	*	*	*	*		
108.4	Control	*	*	*	*		

Figura 15. Resultados del test de Duncan para la tasa de ingestión en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

8.2.2. Herbicida Propanil

Tabla 17. Análisis de la varianza (ANOVA) para la tasa de filtración (TF) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
TF	4	93410.6101	23352.6525	13.3601
Error	20	34958.7110	1747.9356	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.21	0.55	0.10	0.07	Control
170.0	0.21					
179.9	0.55					
199.9	0.10					
285.7	0.07	*	*	*		
322.7	Control	*	*	*		

Figura 16. Resultados del test de Duncan para la tasa de filtración en *D. magna* expuesta a Propanil.**Tabla 18.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la tasa de ingestión (TI) en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
TI	4	17928.8864	4482.2216	30.4325
Error	20	2945.6760	147.2838	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
58.8	0.55					
73.3	0.21					
78.3	0.10	*				
108.5	0.07	*	*	*		
133.0	Control	*	*	*	*	

Figura 17. Resultados del test de Duncan para la tasa de ingestión en *D. magna* expuesta a Propanil.

8.3. EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS TETRADIFÓN Y PROPANIL EN LA FISIOLOGÍA DE *D. magna*.

8.3.1. ACARICIDA TETRADIFÓN

8.3.1.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo)

8.3.1.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Tabla 19. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	0.0223	0.0045	4.2897
Error	24	0.0250	0.0010	(p> 0.05)

Tabla 20. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	0.0914	0.0183	10.2153
Error	24	0.0430	0.0018	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
0.238	0.44						
0.254	0.22						
0.346	0.18	*	*				
0.354	0.10	*	*				
0.370	Control	*	*				
0.374	C+A	*	*				

Figura 18. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.

Tabla 21. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	0.2077	0.0415	8.6260
Error	24	0.1156	0.0048	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.10	0.18	C+A	Control
0.238	0.44						
0.314	0.22						
0.362	0.10	*					
0.410	0.18	*	*				
0.468	C+A	*	*	*			
0.470	Control	*	*	*			

Figura 19. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 22. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	0.2649	0.0530	31.3237
Error	24	0.0406	0.0017	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
0.294	0.44						
0.344	0.22						
0.404	0.18	*	*				
0.506	0.10	*	*	*			
0.530	Control	*	*	*			
0.534	C+A	*	*	*			

Figura 20. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 23. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	0.7595	0.1519	18.5822
Error	24	0.1962	0.0082	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
0.242	0.44						
0.282	0.22						
0.320	0.18						
0.384	0.10	*					
0.624	C+A	*	*	*	*		
0.640	Control	*	*	*	*		

Figura 21. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.1.2. Niveles tisulares de lípidos.

Tabla 24. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	113.04	22.6080	3.6725
Error	24	147.7446	6.1560	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
3.128	0.44						
3.630	0.22						
4.940	0.18						
5.496	0.10						
8.068	Control	*	*				
8.068	C+A	*	*				

Figura 22. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Tetradifón.

Tabla 25. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	70.5445	14.1089	15.8181
Error	24	21.4067	0.8919	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
3.882	0.44						
5.126	0.22	*					
6.574	0.18	*	*				
6.782	0.10	*	*				
8.076	Control	*	*	*	*		
8.180	C+A	*	*	*	*		

Figura 23. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.

Tabla 26. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	88.1035	17.6207	8.1533
Error	24	51.8681	2.1612	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
7.820	0.44						
8.746	0.22						
9.474	0.18						
11.028	0.10	*	*				
11.418	C+A	*	*				
12.874	Control	*	*	*			

Figura 24. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 27. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	144.1287	28.8257	4.7973
Error	24	144.2108	6.0088	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
7.946	0.44						
9.208	0.22						
10.624	0.18						
10.878	0.10						
13.406	C+A	*	*				
14.218	Control	*	*	*			

Figura 25. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 28. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	1548.6328	309.7266	54.4988
Error	24	136.3963	5.6832	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
1.870	0.44						
3.036	0.22						
4.812	0.18						
15.142	0.10	*	*	*			
18.364	Control	*	*	*	*		
18.500	C+A	*	*	*	*		

Figura 26. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.1.3. Niveles tisulares de proteínas.

Tabla 29. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	17.2361	3.4472	6.5407
Error	24	12.6491	0.5270	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
5.7980	0.44						
5.9840	0.22						
6.6540	0.18						
6.6820	0.10						
7.4000	Control	*	*				
7.9820	C+A	*	*	*	*		

Figura 27. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 24h a Tetradifón.

Tabla 30. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	67.4466	13.4893	4.2991
Error	24	75.3054	3.1377	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
8.882	0.44						
9.046	0.22						
11.482	0.18	*	*				
11.904	0.10	*	*				
12.424	Control	*	*				
12.454	C+A	*	*				

Figura 28. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 48h a Tetradifón.

Tabla 31. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	55.3155	11.0631	6.5407
Error	24	26.4943	1.1039	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
10.968	0.44						
11.404	0.22						
13.064	0.18	*	*				
13.450	0.10	*	*				
14.428	Control	*	*				
14.466	C+A	*	*				

Figura 29. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 32. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	196.8393	39.3679	26.3580
Error	24	35.8460	1.4936	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
9.086	0.44						
10.048	0.22						
10.398	0.18						
11.458	0.10	*					
14.912	Control	*	*	*	*		
15.966	C+A	*	*	*	*		

Figura 30. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 33. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	150.4508	30.0902	13.5353
Error	24	53.3540	2.2231	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
13.084	0.44						
14.488	0.22						
15.476	0.18	*					
16.566	0.10	*	*				
19.082	C+A	*	*	*	*		
19.124	Control	*	*	*	*		

Figura 31. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.1.4. Contenido calórico.

Tabla 34. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	289.1789	57.8358	9.9957
Error	24	138.8663	5.7861	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
5.808	0.44						
7.042	0.22						
7.964	0.18						
8.994	0.10						
13.182	Control	*	*	*	*		
14.190	C+A	*	*	*	*		

Figura 32. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Tetradifón.**Tabla 35.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	175.4917	35.0983	16.6469
Error	24	50.6016	2.1084	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
9.282	0.44						
10.064	0.22						
11.996	0.18	*	*				
13.442	0.10	*	*				
15.374	C+A	*	*	*	*		
15.582	Control	*	*	*	*		

Figura 33. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.**Tabla 36.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	120.8214	24.1643	11.1795
Error	24	51.8758	2.1615	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
13.850	0.44						
14.980	0.22						
17.096	0.18	*	*				
17.738	0.10	*	*				
18.862	C+A	*	*				
19.478	Control	*	*	*			

Figura 34. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 37. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	402.7316	80.5463	15.0685
Error	24	128.2884	5.3453	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
12.964	0.44						
14.556	0.22						
15.168	0.18						
15.366	0.10						
21.900	C+A	*	*	*	*		
22.316	Control	*	*	*	*		

Figura 35. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 38. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	1916.8972	383.3794	65.9685
Error	24	139.4773	5.8116	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
9.638	0.44						
10.966	0.22						
13.868	0.18	*					
24.266	0.10	*	*	*			
28.310	Control	*	*	*	*		
28.532	C+A	*	*	*	*		

Figura 36. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.1.5. Peso seco.

Tabla 39. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	5	44.4000	8.8800	0.7699
Error	24	276.8000	11.5333	($p > 0.05$)

Tabla 40. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	5	823.0667	164.6133	14.2728
Error	24	276.8000	11.5333	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.10	0.18	C+A	Control
21.200	0.44						
21.600	0.22						
23.200	0.10						
23.200	0.18						
32.000	C+A	*	*	*	*		
34.400	Control	*	*	*	*		

Figura 37. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.**Tabla 41.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	5	717.8667	143.5733	6.2787
Error	24	548.8000	22.8667	($p < 0.01$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
28.800	0.44						
31.600	0.22						
36.800	0.18	*					
40.000	0.10	*	*				
41.200	C+A	*	*				
41.600	Control	*	*				

Figura 38. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 42. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	5	2069.8667	413.9733	7.3226
Error	24	1356.8000	56.5333	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
36.000	0.44						
47.200	0.22	*					
50.400	0.18	*					
54.400	0.10	*					
59.200	C+A	*	*				
60.800	Control	*	*				

Figura 39. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.**Tabla 43.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	5	797.7667	159.5533	2.5638
Error	24	1493.6000	62.2333	($p < 0.01$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
73.600	0.44						
82.400	0.22						
83.200	0.18						
84.800	0.10	*					
87.200	C+A	*					
90.200	Control	*					

Figura 40. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).

8.3.1.2.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Tabla 44. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	39.6800	7.9360	3.3541
Error	24	56.7857	2.3661	(p> 0.05)

Tabla 45. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	94.6106	18.9221	12.9161
Error	24	35.1602	1.4650	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
6.922	0.44						
7.378	0.22						
9.380	0.18	*	*				
10.360	0.10	*	*				
11.212	Control	*	*	*			
11.524	C+A	*	*	*			

Figura 41. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.

Tabla 46. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	157.8247	31.5649	10.9189
Error	24	69.3807	2.8909	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.10	0.18	Control	C+A
5.702	0.44						
7.550	0.22						
8.696	0.10	*					
9.820	0.18	*					
11.360	Control	*	*	*			
12.568	C+A	*	*	*	*		

Figura 42. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 47. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	79.3129	15.8626	27.7998
Error	24	13.6944	0.5706	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
4.810	0.44						
5.182	0.22						
7.018	0.18	*	*				
8.276	0.10	*	*	*			
8.754	Control	*	*	*			
8.780	C+A	*	*	*			

Figura 43. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.**Tabla 48.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno (CG) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	5	92.7248	18.5450	18.4195
Error	24	24.1635	1.0068	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
2.702	0.44						
3.132	0.22						
3.540	0.18						
4.270	0.10	*					
6.912	C+A	*	*	*	*		
7.092	Control	*	*	*	*		

Figura 44. Resultados del test de Duncan para el contenido de glucógeno en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.2.2. Niveles tisulares de lípidos.

Tabla 49. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	127577.4269	25515.4854	8.9974
Error	24	68061.1865	2835.8828	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
112.298	0.44						
203.400	0.22	*					
224.598	0.18	*					
249.808	0.10	*					
277.866	C+A	*					
320.854	Control	*	*	*			

Figura 45. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Tetradifón.**Tabla 50.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	59601.4165	11920.2833	15.8506
Error	24	18048.9686	752.0404	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
112.866	0.44						
148.986	0.22	*					
191.122	0.18	*	*				
197.142	0.10	*	*				
234.766	Control	*	*	*	*		
237.774	C+A	*	*	*	*		

Figura 46. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.**Tabla 51.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	50899.0812	10179.8162	8.1423
Error	24	30005.8505	1250.2438	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
188.024	0.44						
210.214	0.22						
227.732	0.18						
265.106	0.10	*	*				
274.450	C+A	*	*				
309.482	Control	*	*	*			

Figura 47. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 52. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	39006.1407	7801.2281	4.7965
Error	24	39034.7948	1626.4498	($p < 0.005$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
130.634	0.44						
151.436	0.22						
174.738	0.18						
178.896	0.10						
220.502	C+A	*	*				
233.812	Control	*	*	*			

Figura 48. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 53. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	5	189952.2293	37990.4459	54.5077
Error	24	16727.3624	696.9734	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
20.700	0.44						
33.638	0.22						
53.308	0.18						
167.680	0.10	*	*	*			
203.394	Control	*	*	*	*		
204.946	C+A	*	*	*	*		

Figura 49. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.2.3. Niveles tisulares de proteínas.

Tabla 54. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	49221.9503	9844.3901	10.7940
Error	24	21888.5244	912.0219	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
262.354	0.44						
271.996	0.22						
290.280	0.18						
296.396	0.10						
362.846	Control	*	*	*	*		
362.846	C+A	*	*	*	*		

Figura 50. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Tetradifón.**Tabla 55.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	65055.4235	13011.0847	4.8503
Error	24	64380.6649	2682.5277	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
258.148	0.44						
262.836	0.22						
333.858	0.18	*	*				
346.112	0.10	*	*				
361.990	C+A	*	*				
377.906	Control	*	*				

Figura 51. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.**Tabla 56.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	30547.4907	6109.4981	8.5870
Error	24	17075.5112	711.4796	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
266.812	0.44						
274.146	0.22						
314.054	0.18	*	*				
323.280	0.10	*	*				
347.004	Control	*	*				
347.750	C+A	*	*				

Figura 52. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradifón.

Tabla 57. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	62366.2680	12473.2536	38.5995
Error	24	7755.4951	323.1456	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
149.414	0.44						
165.264	0.22						
171.048	0.18						
188.442	0.10	*					
261.790	Control	*	*	*	*		
262.596	C+A	*	*	*	*		

Figura 53. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradifón.

Tabla 58. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas (CP) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	5	17951.0006	3590.2001	13.6805
Error	24	6298.3830	262.4326	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
144.918	0.44						
160.488	0.22						
180.676	0.18	*					
183.468	0.10	*	*				
211.328	C+A	*	*	*	*		
211.803	Control	*	*	*	*		

Figura 54. Resultados del test de Duncan para el contenido de proteínas en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradifón.

8.3.1.2.4. Contenido calórico.

Tabla 59. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	42.3180	8.4636	8.1031
Error	24	25.0677	1.0445	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
2.642	0.44						
3.202	0.22						
3.622	0.18						
4.086	0.10						
5.424	C+A	*	*	*	*		
5.990	Control	*	*	*	*		

Figura 55. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Tetradifón.**Tabla 60.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	14.6203	2.9241	16.6876
Error	24	4.2054	0.1752	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
2.696	0.44						
2.926	0.22						
3.486	0.18	*	*				
3.802	0.10	*	*				
4.470	C+A	*	*	*	*		
4.526	Control	*	*	*	*		

Figura 56. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Tetradifón.**Tabla 61.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Tetradifón.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	10.5886	2.1177	13.6468
Error	24	3.7243	0.1552	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
3.330	0.44						
3.340	0.22						
3.852	0.18						
4.264	0.10	*	*				
4.536	C+A	*	*	*			
4.930	Control	*	*	*	*		

Figura 57. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Tetradiión.

Tabla 62. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Tetradiión.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	9.7186	1.9437	11.6486
Error	24	4.0047	0.1669	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	C+A	Control
2.132	0.44						
2.486	0.22						
2.602	0.18						
2.822	0.10	*					
3.602	C+A	*	*	*	*		
3.672	Control	*	*	*	*		

Figura 58. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Tetradiión.

Tabla 63. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Tetradiión.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	5	20.7730	4.1546	37.9514
Error	24	2.6273	0.1095	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.44	0.22	0.18	0.10	Control	C+A
1.126	0.44						
1.324	0.22						
1.536	0.18						
2.334	0.10	*	*	*			
3.136	Control	*	*	*	*		
3.176	C+A	*	*	*	*		

Figura 59. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Tetradiión.

8.3.2. HERBICIDA PROPANIL

8.3.2.1. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por individuo).

8.3.2.1.1. Niveles tisulares de glucógeno.

Tabla 64. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	0.0244	0.0061	1.1870
Error	20	0.1029	0.0051	($p > 0.05$)

Tabla 65. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	0.0155	0.0039	0.7649
Error	20	0.1016	0.0051	($p > 0.05$)

Tabla 66. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	0.0198	0.0050	0.6707
Error	20	0.1476	0.0074	($p > 0.05$)

Tabla 67. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	0.0955	0.0239	3.9026
Error	20	0.1224	0.0061	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
0.444	0.55					
0.472	0.21					
0.544	0.10					
0.572	0.07	*				
0.610	Control	*	*			

Figura 60. Resultados del test de Duncan para el contenido en glucógeno (CG) en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.

Tabla 68. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	0.1202	0.0301	4.2107
Error	20	0.1428	0.0071	(p< 0.05)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
0.524	0.55					
0.582	0.21					
0.598	0.10					
0.670	0.07	*				
0.722	Control	*	*	*		

Figura 61. Resultados del test de Duncan para el contenido en glucógeno (CG) en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.1.2. Niveles tisulares de lípidos.

Tabla 69. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	46.3404	11.5851	7.5174
Error	20	30.8221	1.5411	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
4.132	0.55					
4.374	0.21					
6.560	0.10	*	*			
6.860	0.07	*	*			
7.468	Control	*	*			

Figura 62. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Propanil.

Tabla 70. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	21.8827	5.4707	6.0638
Error	20	18.0436	0.9022	($p < 0.005$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
5.406	0.55					
7.044	0.21	*				
7.284	0.10	*				
7.466	0.07	*				
8.256	Control	*				

Figura 63. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.

Tabla 71. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	86.4205	21.6051	15.1773
Error	20	28.4703	1.4235	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
5.038	0.55					
6.888	0.21	*				
7.334	0.10	*				
7.842	0.07	*				
10.776	Control	*	*	*	*	

Figura 64. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 72. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	87.6145	21.9036	22.9755
Error	20	19.0669	0.9533	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
9.464	0.55					
11.248	0.21	*				
11.706	0.10	*				
12.164	0.07	*				
15.228	Control	*	*	*	*	

Figura 65. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.

Tabla 73. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	107.3539	26.8385	18.3317
Error	20	29.2809	1.4640	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
13.364	0.55					
14.062	0.21					
15.106	0.10	*				
16.152	0.07	*	*			
19.282	Control	*	*	*	*	

Figura 66. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.1.3. Niveles tisulares de proteínas.

Tabla 74. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	36.3896	9.0974	13.9065
Error	20	13.0837	0.6542	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
1.688	0.55					
2.076	0.21					
3.120	0.10	*				
3.542	0.07	*	*			
5.110	Control	*	*	*	*	

Figura 67. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Propanil.**Tabla 75.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	113.8417	28.4604	14.8645
Error	20	38.2933	1.9147	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.21	0.55	0.10	0.07	Control
5.692	0.21					
6.476	0.55					
8.642	0.10	*	*			
9.192	0.07	*	*			
11.726	Control	*	*	*	*	

Figura 68. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.**Tabla 76.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	67.0579	16.7645	18.0266
Error	20	18.5997	0.9300	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
12.686	0.55					
13.742	0.21					
14.104	0.10	*				
15.626	0.07	*	*	*		
17.388	Control	*	*	*	*	

Figura 69. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 77. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	107.5914	26.8979	7.4752
Error	20	71.9654	3.5983	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
15.732	0.55					
18.172	0.21					
18.902	0.10	*				
20.430	0.07	*				
21.846	Control	*	*	*		

Figura 70. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.

Tabla 78. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	146.3245	36.5811	10.7171
Error	20	68.2666	3.4133	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
18.952	0.55					
19.336	0.21					
19.978	0.10					
22.022	0.07	*	*			
25.510	Control	*	*	*	*	

Figura 71. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.1.4. Contenido calórico.

Tabla 79. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	127.9395	31.9849	8.5196
Error	20	75.0858	3.7543	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
5.090	0.55					
5.588	0.21					
7.692	0.10					
8.394	0.07	*	*			
11.422	Control	*	*	*	*	

Figura 72. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Propanil.**Tabla 80.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	74.3889	18.5972	16.3846
Error	20	22.7008	1.1350	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
9.138	0.55					
11.174	0.21	*				
12.048	0.10	*				
12.316	0.07	*				
14.460	Control	*	*	*	*	

Figura 73. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.**Tabla 81.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	168.7036	42.1759	23.0033
Error	20	36.6695	1.8335	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
12.250	0.55					
14.558	0.21	*				
15.210	0.10	*				
16.260	0.07	*				
20.170	Control	*	*	*	*	

Figura 74. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 82. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	207.3150	51.8287	27.8717
Error	20	37.1909	1.8595	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
18.018	0.55					
21.482	0.21	*				
23.214	0.10	*				
23.502	0.07	*	*			
26.846	Control	*	*	*	*	

Figura 75. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.

Tabla 83. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	212.3757	53.0939	34.4543
Error	20	30.8199	1.5410	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
23.758	0.55					
25.466	0.21	*				
26.676	0.10	*				
27.268	0.07	*	*			
32.432	Control	*	*	*	*	

Figura 76. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.1.5. Peso seco.

Tabla 84. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	4	280.9600	70.2400	6.0972
Error	20	230.4000	11.5200	($p < 0.005$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
11.600	0.55					
15.200	0.21					
15.600	0.10					
16.400	0.07					
22.000	Control	*	*	*	*	

Figura 77. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Propanil.**Tabla 85.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	4	619.2000	154.8000	4.8015
Error	20	644.8000	32.2400	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
22.400	0.55					
23.600	0.21					
28.000	0.10					
29.600	0.07					
36.400	Control	*	*	*		

Figura 78. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.**Tabla 86.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	4	792.6400	198.1600	6.6053
Error	20	600.000	30.0000	($p < 0.005$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
24.400	0.55					
28.000	0.21					
36.400	0.10	*	*			
36.800	0.07	*	*			
38.800	Control	*	*			

Figura 79. Resultados del test de Duncan para el peso seco en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 87. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	4	198.4000	49.6000	1.0065
Error	20	985.6000	49.2800	($p > 0.05$)

Tabla 88. Análisis de la varianza (ANOVA) para el peso seco (PS) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
PS	4	298.2400	74.5600	2.6477
Error	20	563.2000	28.1600	($p > 0.05$)

8.3.2.2. Efecto sobre el metabolismo energético (expresado por peso).

8.3.2.2.1. Niveles de glucógeno.

Tabla 89. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	194.1719	48.5430	2.3256
Error	20	417.4749	20.8737	($p > 0.05$)

Tabla 90. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	106.2233	26.5558	4.7321
Error	20	112.2359	5.6118	($p < 0.05$)

Media	Grupo	Control	0.07	0.10	0.21	0.55
13.624	Control					
16.694	0.07					
17.358	0.10	*				
18.498	0.21	*				
19.748	0.55	*				

Figura 80. Resultados del test de Duncan para el contenido en glucógeno en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.

Tabla 91. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	150.6668	37.6667	4.8465
Error	20	155.4385	7.7719	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.07	0.10	Control	0.21	0.55
13.120	0.07					
14.260	0.10					
14.416	Control					
17.664	0.21	*				
19.698	0.55	*	*	*		

Figura 81. Resultados del test de Duncan para el contenido en glucógeno en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 92. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	37.9077	9.4769	2.9386
Error	20	64.5006	3.2250	($p > 0.05$)

Tabla 93. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en glucógeno (CG) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CG	4	10.1408	2.5352	1.4608
Error	20			($p > 0.05$)

8.3.2.2.2. Niveles tisulares de lípidos.

Tabla 94. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	38539.5716	9634.8929	1.2242
Error	20	157401.9112	7870.0956	($p > 0.05$)

Tabla 95. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	25126.1861	6281.5465	4.1052
Error	20	30602.8107	1530.1405	($p < 0.05$)

Media	Grupo	Control	0.55	0.07	0.10	0.21
226.900	Control					
229.020	0.55					
252.352	0.07					
260.264	0.10					
314.488	0.21	*	*	*	*	

Figura 82. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.**Tabla 96.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	20908.9725	5337.2431	4.1251
Error	20	25343.6790	1267.1839	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.10	0.55	0.07	0.21	Control
201.444	0.10					
206.442	0.55					
213.118	0.07					
245.940	0.21					
277.728	Control	*	*	*		

Figura 83. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 97. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	21981.1393	5495.2848	11.8560
Error	20	9270.0747	463.5037	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
219.132	0.55					
246.710	0.21					
252.314	0.10	*				
286.900	0.07	*	*	*		
302.156	Control	*	*	*		

Figura 84. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.**Tabla 98.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en lípidos (CL) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CL	4	8434.6059	2108.6515	8.5046
Error	20	4958.8234	247.9412	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
187.700	0.55					
188.984	0.21					
205.222	0.10					
205.974	0.07					
238.624	Control	*	*	*	*	

Figura 85. Resultados del test de Duncan para el contenido en lípidos en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.2.3. Niveles tisulares de proteínas.

Tabla 99. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	28669.7069	7167.4267	3.0222
Error	20	47431.6349	2371.5817	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	0.07	Control
145.294	0.55					
155.608	0.21					
200.042	0.10					
215.920	0.07	*				
232.190	Control	*	*			

Figura 86. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 24 horas a Propanil.**Tabla 100.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	18457.2662	4614.3166	1.8518
Error	20	49835.1227	2491.7561	($p > 0.05$)

Tabla 101. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	44639.1553	11159.7888	10.0509
Error	20	22206.5535	1110.3277	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.10	0.07	Control	0.21	0.55
404.968	0.10					
424.606	0.07					
448.122	Control					
490.830	0.21	*	*			
519.850	0.55	*	*	*		

Figura 87. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 102. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	39531.9683	9882.9921	7.9692
Error	20	24802.9413	1240.1471	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.55	0.21	Control	0.10	0.07
364.132	0.55					
398.536	0.21					
433.456	Control	*				
437.882	0.10	*				
482.262	0.07	*	*	*		

Figura 88. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.**Tabla 103.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en proteínas (CP) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CP	4	11515.4647	2878.8662	11.4622
Error	20	5023.2343	251.1617	(p< 0.001)

Media	Grupo	0.21	0.55	0.10	0.07	Control
259.870	0.21					
266.192	0.55					
280.662	0.10					
303.878	0.07	*	*	*		
315.708	Control	*	*	*		

Figura 89. Resultados del test de Duncan para el contenido en proteínas en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.

8.3.2.2.4. Contenido calórico.

Tabla 104. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 24 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	7.8639	1.9660	1.7364
Error	20	22.6437	1.1322	($p > 0.05$)

Tabla 105. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 48 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	2.1767	0.5442	3.1299
Error	20	3.4774	0.1739	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.55	Control	0.07	0.10	0.21
3.924	0.55					
3.970	Control					
4.160	0.07					
4.304	0.10					
4.744	0.21	*	*	*		

Figura 90. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 48 horas a Propanil.**Tabla 106.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 72 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	3.1533	0.7883	3.8517
Error	20	4.0934	0.2047	($p < 0.05$)

Media	Grupo	0.07	0.10	0.55	0.21	Control
4.420	0.07					
4.432	0.10					
5.020	0.55					
5.198	0.21	*	*			
5.198	Control	*	*			

Figura 91. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 72 horas a Propanil.

Tabla 107. Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 96 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	5.4096	1.3524	15.1522
Error	20	1.7851	0.0893	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.10	Control	0.07
4.172	0.55					
4.712	0.21	*				
5.002	0.10	*				
5.326	Control	*	*			
5.476	0.07	*	*	*		

Figura 92. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 96 horas a Propanil.**Tabla 108.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico (CC) a las 120 horas en *D. magna* expuesta a Propanil.

	G.L.	S.C.	C.M.	F
CC	4	1.4495	0.3624	11.0157
Error	20	0.6579	0.0329	($p < 0.001$)

Media	Grupo	0.55	0.21	0.07	0.10	Control
3.340	0.55					
3.376	0.21					
3.620	0.07	*	*			
3.622	0.10	*				
4.014	Control	*	*	*	*	

Figura 93. Resultados del test de Duncan para el contenido calórico en *D. magna* expuesta durante 120 horas a Propanil.