

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**Universidad de El Salvador**  
*Hacia la libertad por la cultura*

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION LETAL 50 (CL50) DE DOS  
PLAGUICIDAS SINTETICOS UTILIZANDO *Eisenia foetida* S. (LOMBRIZ DE  
TIERRA ROJA CALIFORNIANA) EN EL CULTIVO DE *Cucumis sativus* L.  
(PEPINO) EN EL DISTRITO DE RIEGO DEL VALLE DE ZAPOTITAN, LA  
LIBERTAD.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
LUIS DAVID ALONZO HERNANDEZ  
SILVIA JANETH CHICAS QUINTANILLA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL DE 2013  
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

## **COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADORA GENERAL**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORA DE ÁREA DE QUÍMICA AGRÍCOLA**

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

### **ASESORA DE ÁREA DE GESTIÓN AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

### **DOCENTES DIRECTORES**

MAE. Maria Elisa Vivar de Figueroa

MSc. Dagoberto Pérez

MSc. José Miguel Sermeño Chicas

Lic. Oscar Raúl Avilés

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS:** por darme la paciencia, entendimiento y perseverancia para terminar satisfactoriamente con el proceso de trabajo de graduación.

**AL DEPARTAMENTO DE QUIMICA AGRICOLA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS:** por permitirnos desarrollar la investigación en las instalaciones para la realización y culminación de este trabajo de graduación.

**A LAS LICENCIADAS:** : Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez y MSc. Ena Edith Herrera Salazar por su apoyo y orientación para mejorar el trabajo de graduación.

**A LOS INGENIEROS:** Dagoberto Pérez y Miguel Sermeño por su orientación en mi investigación

**A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:** MAE. María Elisa de Figueroa y Lic. Oscar Raúl Avilés por darnos los lineamientos y apoyo para la elaboración de nuestro trabajo de graduación.

**-Luis David Alonzo**

## **DEDICATORIA**

**A MI AMADO DIOS Y SALVADOR JESUCRISTO:** por permitirme finalizar mis estudios con éxito, por estar en todos los momentos más difíciles, y por ser mi amigo fiel guiándome en esta etapa de mi vida y colocar en mi camino a las personas indicadas. Gracias por todas tus bendiciones que he recibido a lo largo de mi vida. TE AMO

**A MI MADRE:** Dina de Alonzo Hernández, por su apoyo incondicional, amor confianza, consejos y sacrificio, por enseñarme que siempre existen momentos difíciles en la vida, pero siempre hay que luchar hasta lograr la meta propuesta, a tener fé y confianza en Dios que si el está con nosotros todo es posible. Gracias por ser responsable y un gran ejemplo en mi vida. TE AMO, por ser la mejor mamá de este mundo.

**A MI PADRE:** Rafael Alonzo Peraza por su apoyo incondicional, por su paciencia, tolerancia, amor y sacrificio. Gracias por ser responsable, un ejemplo de perseverancia, por enseñarme que siempre hay que ponerse metas en la vida y lograrlas, siempre con la ayuda de Dios y gracias por enseñarme que todos los días hay que ser humildes. TE AMO eres el mejor papá que Dios me ha regalado.

**A MIS HERMANOS (Dina y Alberto)** por hacerme pasar momentos divertidos y olvidarme del estrés, son de las mejores personas en mi vida. LOS AMO.

**-Luis David Alonzo**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis Docentes directores:** MAE. Maria Elisa Vivar de Figueroa y Licdo. Oscar Avilés por su tiempo, conocimiento, orientación y apoyo para la culminación de este trabajo.

**A todo el personal** del Laboratorio de análisis e Investigación del Departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

**A las Licenciadas:** Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez y MSc. Ena Edith Herrera Salazar por todo su apoyo para la finalización de este trabajo de graduación.

**A los Ingenieros:** Ing. Dagoberto Pérez, Ing. Miguel Sermeño por su orientación en mi investigación

**A mi Facultad** y a todos aquellos que con su ayuda permitieron poder culminar mis estudios.

**-Janeth Quintanilla**

## DEDICATORIAS

A **DIOS** por estar a mi lado siempre y poner en mi camino sus bendiciones.

A mi **MADRE** por todo su apoyo, paciencia y amor.

A el **ANGEL** que ahora cuida a sus niñas, mi padre.

A mi **HIJA** Monica Gisselle por estar a mi lado siempre aun en noches de desvelo con sus travesuras pero regalándome una sonrisa sincera de corazón, **TE AMO** linda.

A **MIS AMIGOS** Norma, Francisco y Sabrina por darme todo su apoyo en momentos de flaqueza cuando ya no sentía fuerzas. **Los Quiero Mucho.**

Y a todas las personas que estuvieron a mi lado apoyándome durante todos mis estudios.

**-Janeth Quintanilla**

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 Prueba de toxicidad	26
3.2 Principio de la prueba de toxicidad	27
3.3 Concentración Letal 50 (CL50)	28
3.3.1 Ensayo de toxicidad	28
3.4 Generalidades de <i>Eisenia foetida</i> S.(lombriz de tierra roja californiana)	30
3.4.1 Taxonomía de la lombriz	30
3.4.2 Anatomía de la lombriz de tierra roja californiana	33
3.4.3 Ciclo reproductivo de la lombriz de tierra roja californiana	35
3.4.4 Lombriz de tierra rojocaliforniana utilizada como Bioindicador	36
3.5 Plaguicidas	37
3.5.1 Los plaguicidas, métodos favoritos de la agricultura Industrializada	38
3.5.2 Clasificación de los plaguicidas	40
3.5.3 Tipos de formulaciones	47

3.5.4	Métodos de aplicación	49
3.5.5	Clasificación de los grados de persistencia de los plaguicidas en el suelo	
3.6	Producción de pepino	49
3.6.1	Requerimiento del cultivo	50
3.6.2	Historia agraria del valle de Zapotitán	51
3.6.3	Manejo del suelo	51
3.6.4	Protección del cultivos	52
3.7	Producción de un cultivo saludable	52
3.8	Plagas importantes	53
3.8.1	Control para la mosca blanca	55
3.9	Análisis físico y químico del suelo	57
3.9.1	pH	57
3.9.2	Materia Orgánica	58
3.9.3	Humedad	60
Capítulo IV		
4.0	Diseño Metodológico	63
4.1	Tipo de Estudio	63
4.2	Investigación bibliográfica	63
4.3	Investigación de campo	64
4.3.1	Características de la zona de estudio	
4.3.2	Universo y muestra	64
4.3.3	Método e instrumento de recopilación de datos	65
4.4	Metodología Experimental y prueba previas a la metodología	65
4.4.1	Condiciones de la prueba	65
4.4.2	Recolección de tierra	65
4.4.3	Procedencia del caolín y recolección de la arena	66
4.4.4	Preparación del sustrato artificial	67

4.4.5 Prueba de retención de agua	67
4.4.6 Prueba de supervivencia de las lombrices	67
4.4.7 Lombrices de prueba	68
4.4.8 Plaguicidas en estudio	68
4.4.9 Aplicación de los plaguicidas de prueba de acuerdo a su presentación	69
4.4.10 Condiciones del control	70
4.4.11 Codificación de las concentraciones de los plaguicidas	71
4.5 validez de la prueba	72
	72
Capitulo V	
5.0 Resultados	76
5.1 Condiciones y pruebas previas para obtención de Resultados	77
5.1.1 Descripción de los productos químicos sintéticos utilizados	77
5.1.2 Endosulfan (Thiodan EC 35)	77
5.1.3 Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	78
5.1.4 Preparación de la solución del plaguicida en estudio	78
5.1.5 Características del sustrato artificial	78
5.1.6 Prueba de supervivencia	79
5.1.7 Prueba de retención de agua	79
5.1.8 Adaptación de las lombrices de prueba al sustrato artificial	80
5.1.9 Organismos de prueba	80
5.1.10 Dimensiones del frasco de prueba	80
5.2 Resultados de las determinaciones fisicoquímica	81
5.2.1 Control	81
5.3 Determinaciones fisicoquímicas del plaguicida Endosulfan	83

(Thiodan EC 35)	
5.3.1 Determinación del contenido de humedad	83
5.3.2 Determinación de pH	84
5.3.3 Determinación de Materia Orgánica	85
5.3.4 Temperatura	86
5.3.5 Concentración Letal 50 (CL50) de Endosulfan (Thiodan EC 35)	87
5.3.6 Comparación de la Concentración Letal 50 (CL50) del ensayo con la concentración declarada en la hoja de seguridad	88
5.4 Determinación fisicoquímicas del plaguicida de Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	89
5.4.1 Determinación del contenido de Humedad	89
5.4.2 Determinación de pH	90
5.4.3 Determinación de Materia Orgánica	91
5.4.4 Temperatura	92
5.4.5 Concentración Letal 50 (CL50) de Thiacloprid + Beta- cyflutrina (Monarca EC 11.25)	93
5.4.6 Comparación de la Concentración Letal 50 (CL50) del ensayo con la concentración declarada en la hoja	94
5.5 Comparación entre la toxicidad de Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	94
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	96
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	99
Bibliografía	101

Anexos

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Mapa de las zonas de cultivos en el Distrito de Riego del valle de Zapotitán
2. Cálculo del tamaño del muestra a considerar para los agricultores a entrevistar en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán
3. Encuesta y Resultados de las entrevistas realizadas a los agricultores de ***Cucumis sativus*** L. (pepino) en el Distrito de Riego del valle de Zapotitán, La Libertad.
4. Ejemplos de cálculos para la determinación de humedad y concentración de plaguicida
5. Hojas de Seguridad de Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 )
6. Equipo, materiales y reactivos para los análisis de Humedad, pH, Temperatura y Materia Orgánica
7. Esquemas de Procedimientos de análisis fisicoquímico de Materia orgánica, Humedad ,pH y procedimiento de para calcular el porcentaje de retención de agua.
8. Cuadros de los resultados individuales y cuadros de los resultados Promedios de Humedad pH y Temperatura para Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 )
9. Tratamiento estadístico de números de mortalidad a valores probit
10. Cálculos de Concentración Letal 50 (CL50) para plaguicidas Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 ).
11. Fotos de adaptación y desarrollo de la prueba de toxicidad de la OECD

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Mortalidad del control de prueba	82
2. Datos de mortalidad y valores probit del plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)	87
3. Concentración Letal 50 (CL50) rotulada de Endosulfan (Thiodan EC 35)	88
4. Datos de mortalidad y valores probit del plaguicida de Thiacloprid + Beta- cyflutrina (Monarca EC 11.25)	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. Adultas de <i>Eisenia foetida</i> S.	32
2. Huevos de <i>Eisenia foetida</i> S.	32
3. Características Externas de la lombriz de tierra roja californiana	35
4. Ciclo reproductivo de la lombriz de tierra roja californiana	36
5. Ninfa de mosca blanca	56
6. Adulto de mosca blanca	56
7. Los túneles de tierra en el suelo realizados por las lombrices	59
8. Ubicación del Cantón Agua Caliente en el Departamento de La Libertad	66
9. Esquema del muestreo donde se tomo tierra a utilizar para el sustrato artificial	66
10. Entrevista a un agricultores de <i>Cucumis sativus</i> L. (pepino) en Valle de Zapotitán	66
11. Prueba de supervivencia	79
12. Prueba de Retención de agua	80
13. Humedad promedio inicial y final de la prueba de toxicidad de la concentraciones del plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35 )	83
14. pH promedio inicial y final de las concentraciones del plaguicida Endosulfan(Thiodan EC 35)	84
15. Promedio de Materia Orgánica inicial y final de las concentraciones del Plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)	85
16. Promedio de temperatura inicial y final de las	86

concentraciones del plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)	
17. Grafico log concentración vrs valor probit para el plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)	87
18. Humedad inicial y final promedio de las concentraciones con plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	89
19. pH inicial y final de La concentraciones del plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	90
20. Promedio de Materia Orgánica inicial y final de las concentraciones del plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	91
21. Promedio de temperatura inicial y final de las concentraciones con laguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)	92
22. Gráfico log concentración Vrs valor probit plaguicida Monarca EC 11.25	93

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág N°
1. Taxonomía de la lombriz de tierra roja californiana	31
2. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad	44
3. Listado de insectos que atacan el cultivo del pepino con su control químico	54
4. Codificación de los plaguicidas en la prueba de toxicidad de la OECD	71
5. Descripción de Endosulfan (Thiondan 35 EC)	77
6. Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 )	78
7. Características fisicoquímicas iniciales del sustrato artificial	79

## **ABREVIATURAS**

**%H:** porcentaje de Humedad

**%MO:** porcentaje de Materia Orgánica

**°C:** grados Celsius

**CL50:** Concentración Letal 50

**EC:** Concentrado Emulsificable

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

**g:** gramo

**kg:** Kilogramo

**L:** Litro

**m:** metro

**mg:** miligramos

**mcg:** microgramos

**MIP:** Manejo Integrado de Plagas

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**OECD:** Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico

**OMS:** Organización Mundial para la Salud

**ppm:** mcg/mL ó mg/L

## Resumen

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la Concentración Letal 50 (CL50) utilizando *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana) para la evaluación de dos plaguicidas químicos sintéticos utilizados para el cultivo de *Cucumis sativus* L. (pepino) en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, La Libertad. por medio una encuesta, obteniendo Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) como los plaguicidas más utilizados, evaluándolos a cuatro diferentes concentraciones: una menor concentración que la recomendada por el fabricante, la recomendada por el fabricante, doble y triple, llevando un control por quintuplicado. Tanto las concentraciones como el blanco se evaluaron en un sustrato artificial compuesto por arena caolín y tierra (libre de plaguicidas), como lo establece la prueba de toxicidad en suelos, especificada por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) aplicándola a las condiciones ambientales y experimentales del país; se realizaron durante las cuatro semanas de prueba las determinaciones fisicoquímicas de Humedad, pH y Materia Orgánica. La humedad se mantuvo dentro de los valores permitidos por que no excedió el 10% de pérdida de agua verificada semanalmente por diferencia de peso. El pH aumentó de 6.2 hasta 6.9 como valor promedio del estudio debido a la actividad biológica de la lombriz al descomponer el estiércol con que se les alimentó. El valor promedio de Materia Orgánica para el control aumentó 0.64% con respecto a los que se encontraban en presencia del

plaguicida, manteniendo la temperatura de  $23 \pm 2$  °C, demostrando que la presencia de estos productos disminuye la actividad biológica de ***Eisenia foetida*** S. (lombriz de tierra roja californiana); observando que la concentración recomendada por el fabricante y superiores producen el 100% de mortalidad. Según los resultados del estudio realizado bajo las condiciones descritas, se determinó por el programa estadístico para bioensayos (Probit) que para los plaguicida sintético Endosulfan (Thiodan EC 35), la Concentración Letal 50 (CL50) es de 92.18 ppm y para hiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 EC), la Concentración Letal 50 (CL50) es de 36.25 ppm en un volumen de 622 cm<sup>3</sup> de sustrato artificial para ambos plaguicidas, por lo que se recomienda realizar la prueba de toxicidad de la OECD evaluando diferentes tipos de contaminantes del suelo, como metales pesados y sustancias de origen químico potencialmente peligrosos para el medio ambiente.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

En El Salvador durante los últimos años *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana) ha tomado un papel importante debido al rol que desempeña en la recuperación de suelos en zonas rurales. Representando aproximadamente un 80% de la biomasa del suelo <sup>(51)</sup>, sus hábitos alimenticios y excavaciones contribuyen a la aireación de suelo, dando una mayor filtración del agua y estructuración, favoreciendo la generación de una importante capa de humus en la superficie del suelo, siendo la lombriz de tierra roja californiana un bioindicador de la fertilidad de éste<sup>(35)</sup>. Son organismos de prueba debido a su continuo contacto con el suelo, la ingestión de las partículas del suelo, y la facilidad de adaptación al laboratorio<sup>(45)</sup>.

Actualmente en el país se utiliza una gran cantidad de plaguicidas sintéticos para controlar y prevenir plagas que disminuyen la productividad de los cultivos <sup>(19)</sup>, el uso indiscriminado elimina agentes beneficiosos que se encuentran en su hábitat natural como *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana); debido a la importancia que éstos organismos tienen para la vida y salud del suelo es necesario evaluar el daño que les provoca el uso de agroquímicos. Se ha comprobado que la lombriz de tierra roja californiana es un excelente bioindicador de problemas de contaminación del suelo por lo que en otros países está siendo utilizada para determinar la Concentración Letal 50 (CL50) en plaguicidas químicos sintético.

Debido que el país no cuenta con una metodología que permita determinar la Concentración Letal 50 (CL50) de plaguicidas, se busca mediante la Prueba de Toxicidad en suelos especificada por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) aplicada bajo condiciones experimentales y ambientales de El Salvador, para poder determinar la Concentración Letal 50 de

plaguicidas, que causan una disminución en la biomasa y fertilidad de los suelos.

Por lo que en el presente trabajo se realizó una encuesta para determinar los dos plaguicidas de mayor uso en los cultivos de *Cucumis sativus* L. (pepino) en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, La Libertad, los cuales fueron Endosulfan (Thiodan EC 35) y hiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) los que se evaluaron a cuatro diferentes concentraciones, en un sustrato artificial compuesto por caolín (20%), arena (70%) y tierra (10%), con un 60% de humedad. Posteriormente se realizó la prueba de supervivencia para determinar si las lombrices en estudio se adaptan al alimento a utilizar durante la prueba. Se colocaron las lombrices en recipientes plásticos transparentes, donde permanecieron por un período de cuatro semanas protegidas de la luz, registrando Materia Orgánica (MO), pH, Humedad y Temperatura, durante el tiempo de prueba se hizo un conteo de las lombrices adultas vivas, al final de las cuatro semanas se registraron los huevos y lombrices jóvenes. Para ambas concentraciones se llevó por quintuplicado el control para los dos plaguicidas, los datos obtenidos se analizaron mediante un programa estadístico para bioensayos (Probit), obteniendo como resultado para Endosulfan (Thiodan EC 35) que la Concentración Letal 50 (CL50) es de 92.18 ppm y para hiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25), la Concentración Letal 50 (CL50) es de 36.25 ppm en 622 cm<sup>3</sup> de sustrato artificial para ambos plaguicidas; esta investigación se desarrolló en los meses de Marzo a Octubre de 2012, en la Facultad de Ciencias Agronómicas y la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 Objetivos

### 2.1 Objetivo general:

Determinar la Concentración Letal 50 (CL50) de dos plaguicidas sintéticos Utilizando *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana) en el cultivo de *Cucumis sativus* L. (pepino) en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, La Libertad.

### 2.2 Objetivos específicos:

2.2.1. Identificar los dos plaguicidas químicos sintético más utilizados por Los productores de *Cucumis sativus* L. (pepino) en el Valle de Zapotitán mediante una encuesta.

2.2.2. Aplicar la Prueba de toxicidad en suelos, utilizando *Eisenia foetida* S., propuesto por OECD bajo condiciones experimentales y ambientales de El Salvador.

2.2.3. Conocer la Concentración Letal 50 (CL50) para *Eisenia foetida* S. de los dos plaguicidas más usados por los productores de *Cucumis sativus* L. (pepino) del Valle de Zapotitán.

2.2.4. Comparar la CL50 de los dos plaguicidas con las Concentraciones ensayadas.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 PRUEBA DE TOXICIDAD

La llegada de la «Revolución Verde» produjo un incremento mundial en el uso de plaguicidas para sostener cultivos intensivos. La actividad agrícola continua tiende a desmejorar la calidad del suelo y la aplicación repetida de plaguicidas puede traer efectos de deterioro para el ecosistema y la salud humana<sup>(39)</sup>.

Las lombrices de tierra se hallan entre los invertebrados más abundantes del suelo, representando un 92% de la biomasa de los mismos, una de las especies es la lombriz de tierra roja californiana que sirve como bioindicador de la fertilidad del suelo, esto ha llevado a ser utilizada en diferentes ensayos que permitan determinar el impacto del uso de los plaguicidas de manera indiscriminada en diversos cultivos<sup>(39)</sup>.

En 1984, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) publicó un artículo (Directrices para Pruebas Químicas en lombrices de tierra) un método de ensayo denominado *Prueba de Toxicidad* utilizada para evaluar los efectos de las sustancias químicas en el suelo usando la lombriz de tierra roja californiana, por contacto sobre papel de filtro<sup>(34)</sup>.

En el Manual de Invertebrados del Suelo publicado en 1998, se describe la *prueba de toxicidad* utilizando ***Eisenia foetida*** S, haciendo referencia a la metodología recomendada por la OCDE.

En abril de 2004, la OCDE publicó nuevamente el método *prueba de toxicidad* especificando las especies para determinación entre las cuales se utiliza la lombriz de tierra roja californiana en sustrato de suelo artificial (Directrices para Pruebas Químicas, Reproducción en lombrices de Prueba: ***Eisenia foetida/Eisenia Andrei***)<sup>(34)</sup>.

Ribas, Bartolomé, en su publicación denominada "Datos sobre la Evaluación para la salud, industria alimentaria e impacto ambiental", hace referencia al ensayo de toxicidad el cual se realiza sobre un indicador biológico del medio ambiente terrestre, *Eisenia foetida* S., determinando los efectos de toxicidad aguda (mortalidad) originados por muestras contaminadas o productos químicos de diversa índole. Se evalúa la toxicidad de los productos en el suelo a través de dos tipos de ensayos:<sup>(37)</sup>

- a) Ensayo de toxicidad por contacto sobre papel de filtro: (Método OCDE 1984. Prueba N° 207). La prueba consiste en exponer las lombrices de tierra en un papel de filtro húmedo a la disolución de la muestra, a diferentes concentraciones con el fin de determinar a las 48 horas la CL50.
- b) Ensayo de toxicidad en suelo artificial: el ensayo en suelo artificial permite investigar a corto plazo los efectos causados por las muestras a estudiar por absorción oral o cutánea de las mismas al exponer la *Eisenia foetida* S., a un suelo de composición definida, se evalúa la mortalidad al séptimo y catorceavo día después de la aplicación del compuesto, sustancia o mezcla y se determina la CL50.

El suelo artificial descrito por OECD, está compuesto por las siguientes proporciones: Tierra (10%), Caolín (20%) y arena (70%). Un 50% de la arena debe tener un diámetro entre 0.05 mm a 0.002 mm<sup>(34)</sup>.

### **3.2 Principio de la Prueba de toxicidad** <sup>(34)</sup>

La lombriz de tierra roja californiana es expuesta a plaguicidas en diversas concentraciones durante el ensayo, aplicados sobre el sustrato artificial. El método de aplicación es específico para el propósito de la prueba. En la prueba se seleccionan concentraciones de plaguicidas que abarcan las probabilidades

de causar efectos tanto sub-letales y letales a través de un período de ocho semanas. Efectos de mortalidad y el crecimiento de la lombriz de tierra roja californiana en su etapa adulta se determinan después de cuatro semanas de exposición. Los adultos se retiran de la tierra y se evalúan los efectos sobre la reproducción después de cuatro semanas contando el número de crías presentes en el suelo. El rendimiento reproductivo de las lombrices expuestas a la sustancia de ensayo se compara con la del control con el fin de determinar la CL50 y se utiliza un modelo de regresión para estimar la Concentración Letal 50.

### **3.3 Concentración Letal 50 (CL50)**

#### **Definición** <sup>(19)</sup>

La Concentración Letal 50, es la cantidad requerida de una sustancia para causar la muerte de 50% de una población expuesta durante un tiempo determinado y observada por un período dado después de la exposición, se refiere a la concentración por exposición inhalatoria en el contexto de tóxicos en el aire (puede referirse también a la concentración en agua).

En pocas palabras CL50 es la Concentración Letal media, es decir que la concentración de la sustancia de ensayo que mata 50 por ciento de los animales de ensayo dentro del período de prueba.

#### **3.3.1 Ensayos de toxicidad** <sup>(14)</sup>

Hay dos fuentes primarias de información para conocer los efectos sobre la salud de la exposición a químicos. La fuente más utilizada consiste en los estudios de toxicidad en animales de laboratorio. Se pueden desarrollar diferentes tipos de estudios, por ejemplo, los ensayos de toxicidad aguda (a

corto plazo) que aportan dos índices de toxicidad ampliamente utilizados: DL50 (Dosis Letal 50) y CL50 (Concentración Letal 50).

La Dosis Letal 50 (DL50) se refiere a la cantidad de sustancia que mata al 50% de los animales de laboratorio cuando se les administra una única dosis. La DL50 se expresa como la masa de sustancia administrada por unidad de masa del individuo, tales como gramos de sustancia por Kg de masa del cuerpo.

La CL50 como se definió anteriormente, es la cantidad requerida de un químico que mata al 50% de los animales de laboratorio en un tiempo determinado. En general, cuanto menor sea el valor, más tóxico será el químico. Lo contrario también es cierto, cuanto mayor sea el valor, menor será la toxicidad. Es también importante notar que el valor de la CL50 puede ser diferente para un químico determinado dependiendo de la ruta de exposición (dérmica, oral, o respiratoria).

Se obtienen datos de toxicidad que aportan una información muy general la cual permiten comparar la toxicidad letal de diferentes químicos, pero que no aporta datos adecuados sobre carcinogenicidad, teratogenicidad o toxicidad para la reproducción.

En la actualidad, muchos organismos nacionales e internacionales están intentando modificar o reemplazar los ensayos DL50 y CL50 por métodos más simples, tales como procedimientos de dosis-fija, en los cuáles menos animales estarían implicados. Estos procedimientos requieren un número menor de animales, y los analistas pueden evaluar la toxicidad química sin que los animales mueran como resultado del ensayo.

Las pruebas de toxicidad, utilizando la lombriz de tierra roja californiana ***Eisenia foefida*** S, son una herramienta ampliamente útil para evaluar la toxicidad cuando estos están contaminados. Las lombrices de tierra roja californiana son organismos ideales de prueba, debido a su continuo contacto con el suelo, la

ingestión de las partículas del suelo, y la facilidad de adaptación al laboratorio. Las pruebas de toxicidad con las lombrices de tierra roja californiana son relativamente simples y barata de realizar y los resultados de la prueba se puede utilizar no sólo para determinar el suelo toxicidad, pero puede utilizarse también para determinar la absorción de los contaminantes del suelo por las lombrices de tierra y la posibilidad de movimiento de los contaminantes en la cadena alimentaria<sup>(45)</sup>.

### **3.4 Generalidades de *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana)**

La lombriz de tierra roja californiana es un organismo biológicamente simple, su peso total lo constituye el agua en un 80 a 90%<sup>(3)</sup>, el resto está formado por una serie de fibras musculares y órganos. Según Donahue, 1997 reporta, más de 7,000 especies identificadas<sup>(16)</sup>.

#### **Generalidades sobre *Eisenia foetida* S.** <sup>(26)</sup>

- Trabaja de 1 a 3 pies de profundidad de los suelos
- No emigra
- Existen en suelos con todo los grados de acidez (pH)
- Produce una cápsula cada semana
- Casi todas las cápsulas son fértiles
- De cada capsula nacen de 2 a 20 lombrices
- Deposita su estiércol de manera pareja, sobre y dentro del primer pie de profundidad

#### **3.4.1 Taxonomía de la lombriz**

La principal característica de estos invertebrados es la segmentación del cuerpo; los segmentos, que pueden ser muy numerosos, contienen órganos digestivos y reproductivos que pueden estar repetidos en cada anillo. Tienen el

cuerpo alargado con los dos extremos bien diferenciados, presentando en el anterior una cabeza bien definida, que tiene la boca<sup>(35)</sup>.

**Tabla N° 1:** Taxonomía de la lombriz de tierra roja californiana <sup>(35)</sup>.

Reino:	Animal
Sub reino:	Metazoos
Tipo:	Anélida
Phylum:	Protostomía
Clase:	Anélida
Orden:	Oligochaeta
Género:	<i>Eisenea</i>
Especie:	<i>foetida</i>

La vida media de las lombrices comunes es de aproximadamente cuatro años, durante los meses de frío sufre un aletargamiento y sólo inicia sus actividades en los meses templados. La lombriz ***Eisenia foetida*** S. vive un promedio de 16 años, se acopla cada siete días, alcanza su madurez sexual a los 90 días y su talla adulta (ver figura N°2) al cabo de 9 meses es de 8 a 10 cm, tiene cinco corazones, 6 riñones y 182 elementos excretores. El clitelio juega un rol importante durante la crianza de las lombrices de tierra y su función es de producir el huevo (ver figura N°1) y cuando cesa esa función el clitelio se extingue. El color del clitelio es diferente al resto del cuerpo. El género ***Eisenia foetida*** S. tiene un rango de adaptación a sustratos con un pH de 6 a 8, temperaturas de 20 a 28°C y una humedad de 40 a 80%<sup>(47)</sup>.



**Figura N° 1:** adultas de *Eisenia foetida* S. <sup>(35)</sup>



**Figura N°2:** huevos de *Eisenia foetida* S. <sup>(35)</sup>

La lombriz de tierra roja californiana presenta variaciones de colores debido a los pigmentos protoporfirina y éster metílico<sup>(20)</sup>. Dicha pigmentación la protege contra la radiación de la luz ultravioleta; tiene forma cilíndrica, con secciones cuadrangulares, variando en cuanto a tamaño de 5 a 30 cm de largo y oscila entre 5 a 25 mm de diámetro, de acuerdo a las especies, variando el número de segmentos de 80 a 175 anillos<sup>(35)</sup>.

Las lombrices prefieren sitios húmedos, no toleran la sequía ni las heladas, de aquí que los suelos arenosos secos y los de poco espesor sobre roca no son un medio favorable para ellos. Necesitan un suelo razonablemente aireado, por lo que los arcillosos pesados con mal avenamiento son también desfavorables. Así, bajo una cierta condición de manejo del suelo, son más numerosos en suelos francos que en los arenosos de grava y arcillosos<sup>(40)</sup>.

El rango de pH <sup>(16)</sup> al que mejor se adaptan varía entre 5.0 y 8.4, la disponibilidad de la Materia Orgánica afecta fuertemente a la población de lombrices<sup>(8)</sup>.

La importancia de las lombrices de tierra se están posicionado como una especie de indicador clave<sup>(27)</sup>. El interés en ecotoxicología lombriz de tierra se

remonta a la introducción de las pruebas de toxicidad y la normalización Internacional de la prueba para lombrices de tierra, toxicidad aguda (OECD 1984), donde la prueba fue diseñada para ser incluida en el marco de evaluación del riesgo para los productos químicos de nueva matriculación y los plaguicidas<sup>(46)</sup>.

### 3.4.2 Anatomía de la lombriz de tierra roja californiana <sup>(6)</sup>

Para mayor comprensión del estudio, a continuación se describen algunas de las partes más importante de la anatomía de la *Esenia foetida* S. (ver figura N°3).

**Cutícula:** lámina quitinosa muy delgada, finamente estriada, cruzada por fibras.

**Epidermis:** epitelio simple con células glandulares que están encargadas de producir mucus y sustancias cerosas.

**Peritoneo:** es lo que limita al celoma (cavidad de la lombriz de tierra roja californiana)

**Celoma:** espacio que contiene líquido y envuelve al canal alimenticio. Este fluido lo expulsa ante el peligro.

**Tubo digestivo:** ocupa casi toda la parte central de la cavidad de la lombriz de tierra roja californiana. Este canal corre desde la boca al ano. Detrás de la boca encontramos la cavidad bucal y dentro de ella las células del paladar (prostomio).

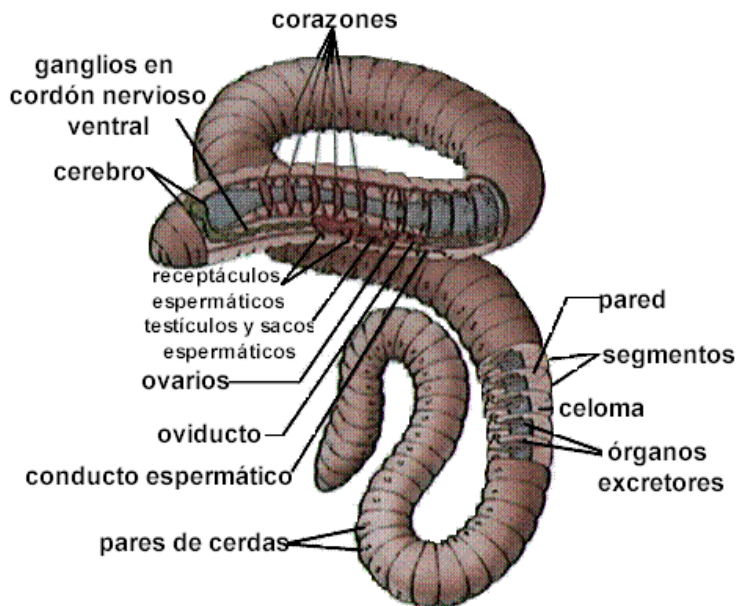
**Sistema circulatorio:** la sangre absorbe oxígeno y alimentos del intestino, elimina residuos solubles en los riñones y libera gas carbónico por la piel.

**Sistema respiratorio:** es muy primitivo, no existen pulmones verdaderos, pero el oxígeno pasa por la pared del cuerpo, de donde es retirado por la sangre.

**Sistema excretor:** la excreción se realiza por órganos especiales, los nefridios, hay dos para cada anillo.

**Visión:** en la epidermis hay un gran número de células fotosensibles ubicadas especialmente en el prostomio. Son los órganos primitivos de visión de las lombrices. Las lombrices huyen de la luz, no detectan la luz roja y los rayos ultravioletas les provocan la muerte.

**Segmentos:** aunque la lombriz de tierra roja californiana ha desarrollado los siguientes sistemas: nervioso, circulatorio, digestivo, excretor, reproductor y muscular, el aspecto más destacable es la segmentación de su cuerpo que se extiende también hacia el interior. En la figura N°3 se muestran las partes antes mencionadas

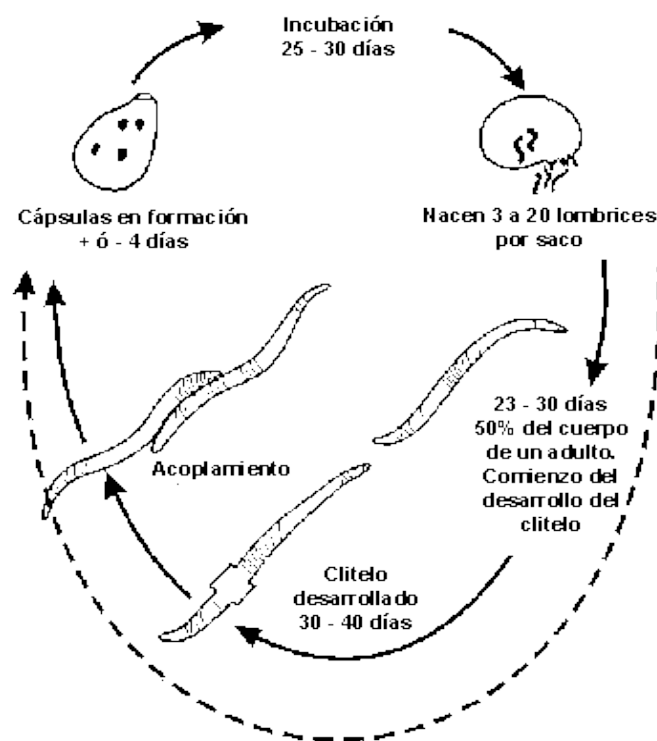


**Figura N° 3:** Características Externas de la lombriz de tierra roja californiana <sup>(50)</sup>

### 3.4.3 Ciclo reproductivo de la lombriz de tierra roja californiana

Desde el nacimiento la lombriz de tierra roja californiana, esta puede ingerir el alimento por sus propios medios mientras esté lo suficientemente húmedo. Las lombrices poseen ambos aparatos genitales femenino y masculino, intercambian espermatozoides, bastan unos 25 a 30 días de incubación y de 60 a 70 días de maduración para estar en condiciones de acoplarse <sup>(13)</sup> (ver figura N°4)

Algunas especies representan partenogénesis uniparental, con autofecundación, que puede ser facultativa u obligada. La mayoría tiene reproducción biparental. La reproducción de la lombriz de tierra roja californiana tiene lugar durante todo el año, cuando las condiciones son apropiadas los jóvenes alcanzan su madurez sexual a los tres meses; tiempo que coincide con la formación del clitelo. Cada lombriz de tierra roja californiana <sup>(31)</sup> adulta puede depositar un huevo que eclosiona al cabo de 3 semanas, y de éste emergen entre 2 y 20 estados juveniles, están listas para reproducirse, a los 3 meses <sup>(13)</sup>.



**Figura N° 4:** Ciclo reproductivo de la lombriz de tierra roja californiana<sup>(35)</sup>.

#### 3.4.4 Lombriz de tierra roja californiana utilizada como bioindicador <sup>(6)</sup>

Son los animales más comunes en los suelos y cumplen con las siguientes funciones:

- Mejoramiento de la aireación, infiltración y distribución del agua.
- Mezcla de las fracciones orgánicas con los minerales.
- Producción de un compuesto que mejora la estructura edáfica y la formación de compuestos húmicos.

En la actualidad se le está prestando mucha atención a su crianza y utilización en el desarrollo de métodos debido a la importancia que tiene en la descomposición de los residuos orgánicos; usándose además como carnada en la pesca, alimento para especies domésticas, producción de humus, reciclaje de estiércol animal, transformación ecológica de materiales biodegradables, y

bioindicador de la fertilidad de un suelo, permitiendo la recuperación de suelos con baja fertilidad, esto debido a su corto ciclo reproductivo (4 veces por año), su elevada frecuencia de apareamiento (cada 1-10 días), mayor longevidad (15-16 años)<sup>(35)</sup>.

### **3.5 Plaguicidas**

Según la FAO, los plaguicidas son definidos, como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte<sup>(33)</sup>.

En lugares donde se practica el monocultivo intensivo, los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra las plagas. Por desgracia, los beneficios aportados por la química han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas, como consecuencia de la perturbación de las relaciones depredador-presa y la pérdida de biodiversidad. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias en la salud humana<sup>(33)</sup>.

Si bien el uso de productos químicos en la agricultura se reduce a un número limitado de compuestos, este crea una de las pocas actividades donde se descargan deliberadamente en el medio ambiente productos químicos para acabar con algunas formas de vida<sup>(50)</sup>.

Los plaguicidas tienen la capacidad de producir cuatro tipos de intoxicaciones en los organismos: <sup>(31)</sup>

- Sobre agudas (en minutos u horas de evolución)
- Agudas (en días)
- Subagudas (de semanas)
- Crónicas (de meses o años)

El efecto tóxico que pueda causar la formulación de un plaguicida depende básicamente de tres factores: <sup>(35)</sup>

1. El grado de toxicidad de los diferentes componentes de la formulación y sus posibles interacciones.
2. El grado y tipo de exposición a la formulación (tiempo, dosis y área de exposición).
3. El grado de susceptibilidad de los organismos, durante el tiempo en que están en contacto con estas sustancias, sus productos de degradación o ambos.

### **3.5.1 Los plaguicidas, método favorito de la agricultura industrializada** <sup>(22)</sup>

El desarrollo de esta agricultura por medio de la llamada “revolución verde”, implicó un cambio en la modalidad de producción que favoreció la implantación de monocultivos permanentes o una serie de cultivos rotativos específicos, en algunos casos la reducción de la biodiversidad y la dependencia ascendente de fertilizantes y plaguicidas sintéticos. Ante este panorama, algunos de los métodos previamente utilizados se tornaron inoperantes o fueron desechados

sin mayores consideraciones, esta nueva situación proporcionó desequilibrios en el agrosistema, que fomentaron la aparición de frecuentes plagas agrícolas y el deterioro de la vida en el suelo. El predominio y favoritismo de los plaguicidas como agentes para el combate de plagas se explica básicamente por dos factores:<sup>(22)</sup>

- a) Su efecto inmediato para reducir las poblaciones en forma espectacular y en el momento oportuno.
- b) La generalización y la difusión de la falsa creencia de que no puede haber producción agropecuaria sin la utilización de estas sustancias.

En nuestro medio, además de utilizar los plaguicidas por sus propiedades intrínsecas, muchos agricultores los emplean por una o varias de las siguientes razones:<sup>(22)</sup>

- a) Pretender asegurar la cosecha.
- b) Seguir los consejos de los agentes de extensión agrícola
- c) Acoger las recomendaciones de los distribuidores de esas sustancias, interesados mayormente en vender sus productos y acrecentar sus ganancias.

Estos factores en gran medida son responsables de que se apliquen más cantidad de plaguicida de la recomendada por los proveedores. Con frecuencia, los agricultores tienden a aplicar los plaguicidas en forma calendarizada, por ejemplo cada semana sin considerar cuán seria o amenazante es la abundancia de la plaga en cada momento. Influyen en tales decisiones factores como la carencia de conocimientos en lo relativo a la aplicación de los principios de la agricultura orgánica y las presiones del mercado, en este sentido las recomendaciones actuales para combatir problemas de plagas muestran una marcada preponderancia de los plaguicidas sintéticos sobre los métodos culturales y biológicos, incluso en el Manejo Integrado de Plagas.

El uso de plaguicidas se ha convertido en una práctica común debido al crecimiento de la población, crisis alimentaria y la consiguiente necesidad para el aumento de la producción agrícola<sup>(19)</sup> todavía hay poca información acerca de los efectos de estos compuestos químicos en invertebrados que ocupan los niveles de alta sensibilidad en la cadena trófica. Entre los estudios realizados con invertebrados terrestres que se analizó la posible alteraciones en la biomasa, reproducción, comportamiento, supervivencia y tisular y celular lesiones como resultado de la exposición a determinados productos agroquímicos y asociado con el uso de bioindicadores y biomarcadores<sup>(18)</sup>

### **3.5.2 Clasificación de los plaguicidas**

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, En 1987, La OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones<sup>(36)</sup>.

#### **a) Grado de toxicidad aguda del plaguicida**

Definido como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto<sup>(36)</sup>.

#### **b) La estructura química de los plaguicidas<sup>(31)</sup>**

Con base a su estructura química, los plaguicidas se agrupan en familias o grandes grupos, los cuales, a su vez, pueden llegar a subdividirse, aquí se mencionan únicamente los nombres de los grandes grupos a los cuales pertenecen la mayoría de los plaguicidas utilizados actualmente en el país.

- i. **Bipiridilos:** son compuestos catiónicos de amonio cuaternario de la piridina, muy solubles en agua. Los más conocidos son el paraquat y el diquat. Cabe mencionar que existen preocupaciones con respecto a los posibles riesgos ambientales a mediano y largo plazo que estos residuos pueden causar como consecuencia de su capacidad de acumulación y persistencia en el suelo.
- ii. **Carbamatos:** son derivados del ácido carbámico, se emplea como insecticidas (carbaril, metomil, propoxur), fungicidas (thiram), herbicidas (Tiobercarb) o nematicidas (aldicarb carbofurán, oxamil).
- iii. **Clorados:** son productos orgánicos sintéticos que contienen cloro en su molécula. La mayoría son insecticidas, entre las características más sobresalientes se encuentran al ser muy persistentes en el ambiente y su tendencia a acumularse en los tejidos grasos del organismo. Aún quedan algunos productos que se comercializan libremente en nuestro país, tales como los insecticidas de clorano, endosulfán y mirex.
- iv. **Clorofenoxiacéticos:** son derivados del ácido fenoxiacético. Los productos más conocidos en nuestro medio son el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el MCPA (ácido 2-metil-4-cloro- fenoxi acético). Estos productos tiene una fuerte actividad herbicida y selectiva contra malezas de hoja ancha por lo que tienen gran aplicación en cultivos de gramíneas. Actúan por contacto y translocación, si no se aplican adecuadamente, los vapores de

estos pueden alcanzar terrenos colindantes y causar daños severos sobre cultivos de dicotiledóneas.

- v. **Fosforados:** son derivados orgánicos del ácido fosfórico, la mayoría son insecticidas y nematicidas. Son degradados en el ambiente rápidamente y poseen un poder de toxicidad relativamente alto en la mayoría de los casos. Por lo general, son bastante volátiles en comparación con otros grupos de plaguicidas. Suelen ser, mayormente, solubles en grasas y solventes orgánicos. Su mecanismo de acción está relacionado con la transmisión de impulsos nervioso.
  
- vi. **Piretroides:** son compuestos de acción insecticida relacionados estructuralmente con aquellos extraídos de las flores *Pyrethrum*. Las preparaciones comerciales son más estables, efectivas y solubles que los compuestos de origen natural. Entre los compuestos más conocidos se encuentran la aletrina, la permetrina, la cipermetrina y la detametrina. Su uso excesivo e indiscriminado ha provocado la aparición de tolerancia en algunos insectos.
  
- vii. **Triazinas:** son productos de acción herbicida. Los productos más conocidos y aplicados en nuestro medio son la atrazina, la simazina y la ametrina. La acción de esta sustancia está relacionada con su comportamiento en el suelo, el lavado y la descomposición del producto, el contenido de Materia Orgánica del suelo influye decisivamente sobre estos fenómenos porque favorecen la adsorción y el desarrollo de microorganismo que aceleran la descomposición del producto. Por ello es que en

suelos ricos en Materia Orgánica se recomienda la utilización de la dosis altas en las etiqueta.

**viii. Naturales:** los más utilizados son de origen botánico y se les ha empleado en el combate de plagas insectiles. Entre los más conocidos se encuentran la piretrina (***Chrysanthemum cinerariifolium***), limonenos (cáscaras de ***Citus spp.***), entre otras; por lo general, son sustancia fácilmente degradables bajo condiciones ambientales y por lo tanto, poco resistentes.

Otros plaguicidas naturales de gran importancia son los antibióticos producidos por microorganismo vivientes. La mayoría solo inhiben bacterias, pero hay algunos que actúan contra hongos.

**ix. Otros:** en este grupo se incluyen feromonas, esterilizantes químicos, atrayentes, repelente y hormonas juveniles para el combate de insectos principalmente.

**c) Peligrosidad o grado de toxicidad los plaguicidas<sup>(31)</sup>**

Este criterio de clasificación se utiliza para enfatizar el grado de peligrosidad de los plaguicidas a corto plazo. La Organización Mundial para la Salud (OMS) ha recomendado una clasificación (ver tabla N°2), sujeta a actualizaciones periódicas, que considera:

- La dosis letal media aguda (CL50) de los plaguicidas formulados.
- Las formas oral y dérmica de contacto con el plaguicida
- Las formulaciones sólidas y líquidas.

**Tabla N° 2:** Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad <sup>(23)</sup>

ROJO Clase 1 <sup>a</sup> muy toxico	La banda de color rojo indica que el plaguicida es <b>extremadamente peligroso</b> .
ROJO Clase 1b Tóxico	La banda de color rojo 1b indica que el plaguicida es <b>altamente peligroso</b>
AMARILLO Clase II Dañino	La banda de color amarillo indica que el plaguicida es <b>moderadamente peligroso</b> .
AZUL Clase III Cuidado	La banda de color azul indica que el plaguicida es <b>ligeramente peligroso</b> y se debe tener cuidado.
VERDE Clase IV Precaución	La banda de color verde indica que con este tipo de plaguicida, se debe tener <b>precaución</b> , siempre hay que usar protección al aplicarlo.

**d) Actividad o área de interés en que se utilizan**<sup>(19)</sup>

Esto referido para el uso en agricultura, salud pública, área doméstica o áreas de uso público.

**e) El modo de acción de los plaguicidas**<sup>(19)</sup>

En el caso de los insecticidas, nematocidas y acaricida estos pueden ser: de contacto, de ingestión, penetrantes, sistémicos. En caso de los herbicidas: quemantes o de contacto, sistémicos y en el caso de los fungicidas, estos se clasifican como: protectores o terapéuticos de superficie; erradicarte terapéuticos curativos, tópicos o de acción local; sistémicos.

**f) Especificidad**<sup>(19)</sup>

Es la característica de los plaguicidas para combatir un número variado de plagas.

De acuerdo con este criterio, los plaguicidas se puede clasificar en:

- Plaguicida de acción específica

- Plaguicidas de acción múltiple

**g) La superficie cubierta**<sub>(19)</sub>

Esto de acuerdo al tipo de aplicación su es total o dirigida (localizada).

**h) El lugar de aplicación**<sub>(19)</sub>

Referido a las partes tratadas ya sea foliar, suelo, raíz, fruto, cosecha, o las semillas; o las condiciones del lugar donde se aplican: al aire libre, bajo invernadero o en lugares confinados

**i) La época de aplicación**<sub>(19)</sub>

Los plaguicidas también pueden clasificarse de acuerdo con la época de aplicación con respecto a variables específicas de desarrollo del cultivo. Tomando como referencia la siembra o emergencias de cultivo.

- Pre-siembra
- Pre-emergencia
- Pre-floración
- Floración y Post-floración

**j) El mecanismo específico de acción**<sub>(19)</sub>

En el caso de los fungicidas: inhibidores del proceso de producción de energía, inhibidores de la síntesis de lípidos, destructores de las estructuras celulares, inhibidores de las síntesis de las proteínas, etc. En el caso de insecticidas acaricidas y nematocidas: con efecto en el sistema nervioso, inhibidores del metabolismo energético y reguladores del crecimiento.

En el caso de los herbicidas: inhibidores de la germinación, de la fotosíntesis.

**k) Su origen o naturaleza<sup>(19)</sup>**

- Sintéticos: cuando son obtenidos por medio de una síntesis química artificial.
- Naturales: cuando son sintetizados por organismos biológico.
- Biológicos: referidos a organismos vivos que ejercen un efecto de control poblacional sobre las plagas que se desean combatir.

**l) El grupo de cultivos específicos a los que está destinado su uso<sup>(19)</sup>**

De acuerdo a esto puede ser para uso ornamental, hortícolas, forestales, cítricos, frutales, cereales.

**m) El nombre con que se les denomina<sup>(19)</sup>**

Nombre comercial: nombre con el cual el fabricante identifica un producto determinado para su comercialización, antes de salir al mercado, el nombre comercial debe ser inscrito y aprobado por el Registro de Marcas, la primera letra de los nombres comerciales se escriben con mayúscula para diferenciarlos del nombre genérico.

Nombre genérico: nombre común de plaguicida aprobado por algún organismo oficial de normalización internacional. Estos se escriben con letras minúsculas para diferenciarlos de los nombres comerciales.

Nombre químico: se refiere al nombre químico de la molécula de un producto.

**3.5.3 Tipos de formulaciones<sup>(19)</sup>**

A continuación se describen las características más sobresalientes de diversos tipos de formulaciones de acuerdo a su manera de aplicación:

Aplicaciones líquidas o aspersiones: con 80% de la oferta mundial de plaguicidas, las aspersiones constituyen el método de aplicación más frecuente

Cápsulas en suspensión: consiste en una suspensión de microcápsulas que contiene el material técnico en una fase acuosa e ingredientes adicionales de la formulación, se presenta en forma cremosa y lista para ser mezclada con agua para su aplicación.

Concentrados Emulsificables (EC): se tratan de disoluciones de principios activos insolubles en agua, sólidos o líquidos, en disolventes orgánicos, agregando los emulgentes adecuados, tales disoluciones pueden mezclarse con agua, convirtiéndose entonces en una emulsión blanquecina y lechosa. Es fundamental que la emulsión por aplicar se mantenga estable, sin embargo, en caso de que se separen los componentes, la homogeneidad de la emulsión se restablece agitándola y bombeándola.

Concentrados solubles en agua: consiste en concentrados de principios activos o sus sales, disueltas en agua o en disolventes miscibles con agua. Esto significa que los principios activos deben tener suficiente solubilidad en agua, facultad que solo la poseen pocas sustancias en la actualidad.

Emulsiones de aceites en agua: son formulaciones fluidas heterogéneas que consisten en una disolución del principio activo en un líquido orgánico (aceite) dispersado como glóbulos finos en una fase acuosa. Entre estas se distinguen dos tipos de emulsiones: las microemulsiones y las macroemulsiones, Las primeras son disoluciones transparentes, en tanto que las segundas presentan un aspecto turbio y lechoso.

Emulsiones de agua en aceite: son formulaciones fluidas heterogéneas que consisten en una disolución del plaguicida en agua dispersa como glóbulos finos en una fase líquida orgánica continua.

Granulados dispersables en agua (GR): consiste en una mezcla homogénea de los materiales técnicos, los materiales inertes y los ingredientes adicionales de la formulación. Tiene forma granular que se aplican después de su desintegración y dispersión en agua. El producto es seco y libre de grumos. Este tipo de formulación está sustituyendo a las formulaciones de polvos mojables.

Pastillas de liberación controlada: son bloques sólidos preparados para la liberación controlada del principio activo en agua.

Polvos mojables o polvo humectante (WP): consisten en una mezcla homogénea de los productos técnicos con las sustancias auxiliares apropiadas. Se presentan en forma de polvo fino y se aplican como una suspensión después de que ha ocurrido su dispersión en el agua. El polvo es capaz de mojarse y mantenerse en suspensión en agua durante un tiempo más o menos largo. El producto formulado comercial es seco y libre de grumos.

Polvos solubles en agua (SP): son polvos para aplicarse como una solución verdadera del principio activo, después de su dilución en agua. Son relativamente pocos los preparados existentes en este tipo de formulaciones. (2,4; sales de sodio, potasio o aminas del herbicida MCPA)

Productos para aplicaciones a ultra bajo volumen (UBV o "ULV"): se refieren a formulaciones líquidas que se encuentran listas para aplicarse con equipo de UBV (< 5 litros/hectárea) por lo general se utiliza aceite como vehículo y disolvente. En vista de que las gotas aplicadas con esta técnica son muy pequeñas, el disolvente ideal debe poseer: buena capacidad solvente, así como volatilidad, viscosidad y fitotoxicidad bajas.

Suspensiones concentradas (SC): consisten en una suspensión de partículas final del material técnico en una fase acuosa e ingredientes adicionales de la

formulación, se presentan en forma cremosa y lista para ser mezclada con agua para su aplicación.

#### **3.5.4 Método de aplicación** <sup>(19)</sup>

El método de aplicación de plaguicidas en la agricultura en nuestro medio el más utilizado es la *bomba de espalda manual* este es un pulverizador compuesto por un tanque diseñado para mantenerse en forma vertical sobre el suelo y que, al ser cargado por el aplicador este se acomode a su espalda.

#### **3.5.5 Clasificación de los grados de persistencia de los plaguicidas en el Suelo** <sup>(19)</sup>

La persistencia de un plaguicida en el suelo se refiere a la capacidad de resistencia a los procesos de degradación a lo largo del tiempo, está definida de manera diferente de acuerdo con el tiempo requerido para degradarse un porcentaje predeterminado de la concentración inicial. Por lo general, se hace referencia a la vida media del plaguicida.

### **3.6 Producción de pepino** <sup>(48)</sup>

El cultivo de pepino es de gran importancia económica pues tiene una gran demanda en el mercado local e internacional ya sea fresco como procesado. La producción para el mercado local se centra en pequeños productores que aprovechan la época de este cultivo para cubrir el mercado.

#### **3.6.1 Requerimientos del cultivo** <sup>(48)</sup>

El agricultor: este es el factor principal. La actitud de este hacia el cultivo es importante. Debe estar dispuesto a darle todas las condiciones favorables que se puedan controlar (preparación de suelos, riego, nutrición, control de plagas, enfermedades, malezas, post-cosecha y transporte).

Suelo: el pepino se puede cultivar en cualquier suelo, pero responde mejor en suelos arcillo-arenosos a francos bien drenados. Si el suelo no es el ideal, hay que proveer las condiciones adecuadas para prevenir el exceso de agua (encharcamiento) que en cualquier cultivo es un gran problema. La planta de pepino no tolera la salinidad por lo cual el pH debe estar entre 5.5 y 6.8.

Temperatura: la temperatura ideal para el cultivo del pepino es entre los 20°C - 30°C.

Altitud: desde 400 hasta 1,200 metros sobre el nivel del mar.

Precipitación: no tolera excesos de agua por lo que se produce en zonas con una precipitación entre los 500 y 1200 mm/año.

Humedad relativa: esta es una planta con elevados requerimientos de humedad, siendo la humedad relativa óptima durante el día de 60 a 70% y durante la noche de 70 a 90%. Sin embargo, los excesos de humedad durante el día pueden reducir la producción, al disminuir la transpiración y por ende la fotosíntesis. Con humedad ambiental más alta del 90% la atmósfera está saturada de vapor de agua lo que es conducido para desarrollar enfermedades fungosas.

Además, un cultivo mojado por la mañana empieza a trabajar más tarde, ya que la primera energía disponible deberá cederla a las hojas para poder evaporar el agua de su superficie.

Luminosidad: este cultivo crece, florece y fructifica con normalidad hasta en días cortos (con menos de 12 horas de luz), aunque a mayor cantidad de radiación solar, mayor es la producción.

Viento: este es un factor determinante en la producción de pepino. El viento de varias horas de duración y con velocidades arriba de 30 kilómetros por hora

(km/h) acelera la pérdida del agua de la planta, bajan la humedad relativa del aire y aumenta las exigencias hídricas de esta. Reduciendo esto fecundación de los estilos florales. En resumen, el viento disminuye el crecimiento, reduce la producción, acelera la senilidad de la planta, y daña hojas, flores y frutos. Por este motivo debe cultivarse en lugares resguardados o poner barreras rompevientos.

Fechas de siembra y distribución geográfica: puede sembrarse en casi todo el país todo el año, tanto en época seca (si se cuenta con riego) como lluviosa, para mantener la oferta del mercado local.

### **3.6.2 Historia agraria del Valle de Zapotitán** <sup>(48)</sup>

El que ahora se conoce como Distrito de Riego de Zapotitán siempre ha sido una zona pantanosa, como lo testifica por ejemplo, la presencia de numerosos aluviales lacustres. Por eso, ha representado, durante mucho tiempo, un espacio secundario o “complementario” para las economías que lo rodean, hasta que su avenamiento reciente permitiera su puesta permanente en cultivos, lo que convirtió esta zona en un espacio estratégico para el país.

### **3.6.3 Manejo del suelo** <sup>(48)</sup>

Es indispensable hacer el muestreo de suelos una vez al año. El suelo debe prepararse por lo menos 45 días antes del trasplante. Esto ayuda a evitar atrasos al momento de sembrar y poder hacer control de malezas pre-siembra oportunamente.

### **3.6.4 Protección de cultivos** <sup>(48)</sup>

Las plagas y enfermedades pueden arruinar todo el trabajo que se ha llevado a cabo para producir un cultivo rentable y de alto rendimiento. Los planes para

proteger el cultivo deben comenzar mucho antes de la siembra y las estrategias utilizadas no deben depender exclusivamente del uso de plaguicidas. El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es no sólo recomendado pero más que ello es la única forma de trabajar un cultivo para que sea saludable, de alta calidad como es esperado por los consumidores y a la vez rentable. El MIP depende de:

- Producción de un cultivo saludable
- Prevención
- Salubridad
- Muestreo y monitoreo
- Intervenciones de control integradas
- Mantenimiento de bitácoras

### **3.7 Producción de un cultivo saludable<sup>(48)</sup>**

Mientras más saludable esté la planta, menos probabilidades habrán de que una plaga o enfermedad le haga daño. Las plantas tienen su propio sistema natural de defensa que trabaja mejor cuando la planta tiene un buen sistema radicular, un buen programa de nutrición/manejo del agua y no está bajo estrés por otros motivos como por ejemplo inundaciones o malezas.

#### **3.7.1 Prevención**

La prevención comienza con la selección del terreno y el cultivo. Es importante saber y tomar en cuenta qué tipo de problemas ha tenido el terreno anteriormente, ya sean nematodos, grillos, cogolleros, o quizás enfermedades del suelo. También hay que saber cuándo fue la última vez que se sembró un cultivo de la familia del melón en ese lugar ya que hay muchas plagas y

enfermedades a las que les va particularmente bien con ciertas familias de plantas. Si hubo un cultivo de cucurbitáceas sembrado en el campo, hay una gran posibilidad de que haya plagas o enfermedades específicas de cucúrbitas todavía en el campo o en las malezas que se encuentran en los alrededores. El tipo de semillas que se planifica sembrar y su resistencia o tolerancia a estas enfermedades y plagas para prevenir plagas y enfermedades futuras.

### **3.8 Plagas Importantes** <sup>(48)</sup>

Las plagas más importantes en el cultivo de pepino son (ver tabla N°3):

- Plagas de suelo (Gusano de suelo, nemátodos y Síntilos)
- Trips
- Minadores
- Mosca Blanca
- Pulgones
- Lepidópteros

#### **Plagas de suelo**

##### **Gusanos de suelo:**

Como en todos los cultivos las plagas de suelo que afectan son gallina ciega, gusano alambre, sínfilo, gusano cuerudo y nemátodos. Para determinar la presencia de estas plagas en el suelo se debe hacer un muestreo de campo.

Los productos que existen en el mercado para controlar este tipo de plagas son buenos pero hay que aplicarlos correctamente.

**Tabla N° 3:** Listado de insectos que atacan al cultivo de pepino con su control químico<sup>(48)</sup>.

Nombre Común	Nombre Científico	Daño que Ocasiona	Control Químico
<b>Gallina ciega, Gusano alambre, Sinfilido y Nemátodo</b>	<b><i>Phylophaga sp</i></b> <b><i>Aeolus sp</i></b> y otras especies, <b><i>Scutigerella y</i></b> Nematodos varias	Se alimentan del bulbo, raíces y pelos absorbentes	Bazan ( <b><i>Beauveri bassiana</i></b> ), Brigadier 30TS(Bifentrin), Furadan 48 SC(Carbofuran)
<b>Trips</b>	<b><i>Thrips tabaci</i></b>	Se alimenta del follaje y están por las axilas por lo general	Actara 25 WG (Thiamethoxam), Arrivo 20 EC (Cypermethrina, Danitol 2.4 EC(Fentropathrina), Monarca EC 11.25 (Beta Cyflutrin +Thiacloprid), Ppegasus 50 SC(Diafentiuoron)
<b>Mirador</b>	<b><i>Liriomyza sp</i></b>	Daño en el follaje	Danitol 2.4 EC(Fentropathrina) Newmectin 1.8 EC (Abamectin) Sunfire 24SC (Cyromanzine) Trigard (Cyromazine)
<b>Mosca Blanca</b>	<b><i>Aphis gossypii</i></b>	Transmisión de virus	Actara 25 WG (Thiamethoxam) Monarca EC 11.25 (Beta Cyflutrin +Thiacloprid), Chess 5 WG (Pymetrozine) Rescate 20 SP(Acetamiprid), Thiodan EC 35 (Endosulfan)
<b>Afido</b>	<b><i>Myzus persicae</i></b>	Transmisión de virus	Monarca EC 11.25 (Beta Cyflutrin +Thiacloprid), Rescate 20 SP(Acetamiprid) Actara 25 WG (Thiamethoxam), Thiodan EC 35 (Endosulfan), Danitol 2.4 EC(Fentropathrina), Confiador 70 WG
<b>Crisomelidos ó diabrotica</b>	<b><i>Diabrotica balteata</i></b>	Daño mecánico al follaje, raíces, flores. Transmisión de enfermedad	Baytroid 2.5 EC(Ciflurtina) Curacron 500 EC (Porfenofos) Danitol 10 EC(Deltametrina) Diazol 60EC (Diazinon) Monarca EC11.25 (Beta Cyflutrin +Thiacloprid)Vidate 24 SL (Oxamilo)
<b>Lepidopteros</b>	Varias Especies	Daño al follaje, fruta	Cascade 10 DC (Flufenoxuron) Danitol 10 EC(Deltametrina) Dipel 604 WG ( <b><i>Bacillus Thuringiensis</i></b> ) Intrepid 24 EC (metoxifenozide) Tracer 48 SC (spinosad)

### **Mosca Blanca:**

Dos de los géneros que afectan el cultivo son *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*. Los adultos colonizan las partes jóvenes de la planta (ver figura N°5), realizando las posturas en el envés de la hoja, de donde emergen las primeras ninfas que son móviles (ver figura N°6). Tras fijarse en la planta pasan por tres estados ninfales y uno de pupa. Los daños directos como amarilleamiento y debilitamiento de la planta son ocasionados por ninfas y adultos al alimentarse absorbiendo la sabia de las hojas. Los daños indirectos se deben a la formación de fumagina sobre la melaza que producen al alimentarse, manchando y dañando los frutos, así como dificultando el normal desarrollo de las plantas. Otro daño indirecto y más importante es la transmisión de virus (geminivirus). Las especies del género *Trialeurodes* son trasmisoras del virus (geminivirus) del amarilleamiento de las cucurbitáceas (CYMV). Las especies del género *Bemisia* son trasmisoras de la mayor cantidad de virus en cultivos hortícolas y en la actualidad actúa como trasmisora del virus del rizado amarillo del tomate, el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico de la calabacita (SqMV).

#### **3.8.1 Control para mosca blanca**

El mejor control es el de hacer las prácticas básicas a tiempo, siembra de barreras vivas, limpieza de los bordes de los lotes, colocar trampas amarillas para muestreo, el muestreo de las plantas y aplicar el agroquímico correcto para su control. Las aplicaciones se deben dirigir al envés de la hoja que es donde ellos se alimentan y se debe hacer calibración con lámpara fluorescente para asegurar que el producto se está poniendo donde está la plaga. Al final del cultivo es imperativo eliminar totalmente los rastrojos y hacer rotación con cultivos como sorgo, maíz o cebolla.



**Figura N° 5:** Ninfa de mosca blanca<sup>(43)</sup>



**Figura N° 6:** Adulto de mosca blanca<sup>(43)</sup>

### **Lepidópteros**<sup>(48)</sup>

Gusanos cogolleros: ***Spodoptera spp*** y ***Heliothis spp.***

Gusanos barrenadores: ***Diaphania spp.*** A los gusanos ***Spodoptera spp*** y los ***Heliothis spp.***, se les conoce como gusanos cogolleros o gusanos soldados. Son capaces de dañar todo tipo de cultivo, especialmente a las dicotiledóneas. En el pepino el daño empieza desde que nace, pues son migratorios y pueden llegar de otros cultivos, o de malezas como bleo (***Amaranthus spp***) y la verdolaga (***Portulaca spp.***). Generalmente los productores le llaman gusano nochero pues se protege debajo de la tierra, terrones y hojas secas durante el día y sale a comer por la noche. Los daños son generales en plantas recién germinadas y en una noche pueden cortar completamente la planta. En cultivos ya establecidos son capaces de defoliar, perforar frutos y guías.

## **3.9 Análisis físicos y químicos del suelo**

### **3.9.1 pH**<sup>(3)</sup>

Existen diversos parámetros considerados clave para determinar la calidad del suelo, aquellos de naturaleza física y físico-química (estabilidad de agregados,

pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono) como del tipo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas). El componente microbiológico puede servir como indicador del estado general del suelo, pues una buena actividad microbiana en suelo es reflejo de condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos (bacterias, hongos, algas, actinomicetos) que actúan sobre sustratos orgánicos y cultivos asociados; y constituye un marcador biológico potencialmente útil para evaluar las perturbaciones que puedan presentarse. Es muy importante en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas y su fertilidad, pues interviene tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos, como en la formación de la estructura de los suelos.

El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos (incluidos microorganismos y plantas). La lectura de pH se refiere a la concentración de iones hidrógeno activos ( $H^+$ ) que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquidos. La concentración de iones hidrógeno es fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. El grado de acidez o alcalinidad de un suelo es determinado por medio de un electrodo de vidrio en un contenido de humedad específico o relación de suelo-agua, y expresado en términos de la escala de pH. El valor de pH es el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno, que se expresa por números positivos del 0 al 14. Tres son las condiciones posibles del pH en el suelo: la acidez, la neutralidad y la alcalinidad.

### **Fundamento**

El método potenciométrico o electroquímico para medir pH de un suelo es el más utilizado. Con este método se mide el potencial de un electrodo sensitivo a

los iones  $H^+$  (electrodo de vidrio) presentes en una solución problema; se usa como referencia un electrodo cuya solución problema no se modifica cuando cambia la concentración de los iones por medir, que es generalmente un electrodo de calomelano o de Ag/AgCl. El electrodo, a través de sus paredes, desarrolla un potencial eléctrico. En la práctica se utilizan soluciones amortiguadoras, de pH conocido, para calibrar el instrumento y luego comparar, ya sea el potencial eléctrico o el pH directamente de la solución por evaluar.

### 3.9.2 Materia Orgánica <sup>(3)</sup>

La Materia Orgánica (MO) del suelo contiene cerca del 5% del nitrógeno total, pero también contiene otros elementos esenciales para las plantas, tales como fósforo, magnesio, calcio, azufre y micronutrientes <sup>(20)</sup>.

La MO representa del 95 al 99% del total del peso seco de los seres vivos, pero su presencia en los suelos suele ser escasa y son contadas las excepciones en las que supera el 2% <sup>(28)</sup>.

El nivel deseable de Materia Orgánica <sup>(21)</sup> en los suelos arcillosos medios es del 2%, pudiendo descender a 1.65% en suelos pesados y llegar a un 2.5% en los arenosos.

Los autores denominan indistintamente Materia Orgánica <sup>(28)</sup> o humus <sup>(21)</sup> a la parte orgánica que cumple con un papel esencial en el suelo. No existe una definición de humus con la que todos los especialistas estén de acuerdo; pero, en general, el término “humus” designa a las sustancias orgánicas variadas, de color pardo y negruzco, que resultan de la descomposición de materias orgánicas de origen exclusivamente vegetal”. Contiene aproximadamente un 5% de nitrógeno, por lo que su valor en el suelo se puede calcular multiplicando por 20 su contenido de nitrógeno total <sup>(21)</sup>.

La función de la Materia Orgánica en el suelo es contribuir al crecimiento de las plantas a través de sus efectos sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Este último tiene una función nutricional en la que sirve como una fuente de N, P y S para el crecimiento de las plantas, en la que afecta profundamente la actividad de la microflora y la micro fauna, y una función física en lo que promueve una buena estructura, con lo cual mejora las labores de labranza, aireación y la retención de humedad<sup>(2)</sup>.

Las lombrices de tierra promueven la actividad de los microorganismos mediante la fragmentación de la Materia Orgánica y el aumento del área accesible a los hongos y las bacterias. Además, estimulan el crecimiento extensivo de las raíces en el subsuelo debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno en los túneles (hasta cuatro veces más que el nitrógeno total en la capa superior del suelo) y a la fácil penetración de las raíces por los canales existentes. Los túneles formados por las lombrices de tierra crean en el suelo macroporos y canales que permiten la infiltración del agua y la circulación del aire (ver figura N°7).



**Figura N° 7:** Los túneles de tierra en el suelo realizados por las lombrices <sup>(31)</sup>

### **Fundamento de la determinación de Materia Orgánica** <sup>(17)</sup>

La Materia Orgánica del suelo se consigue mediante la calcinación en un horno de mufla y midiendo la pérdida de peso. Los grupos  $-OH$  de los minerales arcillosos, así como los oxohidróxidos de hierro y aluminio, y el hidróxido de

aluminio, se deshidroxilan formando agua y, por consiguiente, experimentando una pérdida de peso, el carbonato de calcio pierde dióxido de carbono cuando se calienta 550°C para formar CaO, por consiguiente, se selecciona una temperatura tan baja como sea posible, que todavía se conseguirá la oxidación de la Materia Orgánica.

### **3.9.3 Humedad<sup>(3)</sup>**

La humedad del suelo es uno de los factores más importantes para la presencia de lombrices de tierra en el suelo. Al conservar la cobertura del suelo se reduce la evaporación y aumenta la MO en el suelo, lo cual a su vez permite conservar más agua. Las condiciones de vida óptimas se encuentran cuando la humedad del suelo está entre 40 y 80%.

La fracción activa o de fácil descomposición de la Materia Orgánica del suelo es el principal suministro de alimentos para varios organismos vivos del suelo. La fracción activa es fuertemente influenciada por las condiciones climáticas, el estado de humedad del suelo, la etapa de desarrollo de la vegetación, la adición de residuos orgánicos y las prácticas culturales como la labranza. Entre el 35 y 55 por ciento de la parte no viviente de la Materia Orgánica es el humus. Es un importante amortiguador que reduce las fluctuaciones de la acidez del suelo y de la disponibilidad de nutrientes. Comparadas con las moléculas orgánicas simples, las sustancias húmicas son voluminosas, son de alto peso molecular y son muy complejas. Las características de la parte bien descompuesta de la Materia Orgánica, o sea el humus, son muy diferentes a las de las moléculas orgánicas simples. Si bien existen muchos conocimientos acerca de su composición química general, el valor relativo de varios tipos de materiales húmicos para el crecimiento de las plantas no está aun claramente establecido.

**Fundamento**

La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda, y después de haberse secado en la estufa hasta obtener un peso constante.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Tipo de Estudio:

El presente trabajo se clasifica como: bibliográfico, experimental y de campo.

- Bibliográfico: porque está fundamentado y desarrollado, tomando como referencia los documentos de investigación científica relacionados con la problemática, el análisis bibliográfico para el desarrollo de la temática y el diseño metodológico.
- Experimental: debido a que se aplicó la prueba de toxicidad que propone la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) a las condiciones experimentales y ambientales de El Salvador.
- De Campo: porqué se realizó una encuesta en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, La Libertad para poder determinar los dos plaguicidas sintéticos que los productores más utilizan en el cultivo de ***Cucumis sativus*** L. (pepino).

### 4.2 Investigación Bibliográfica:

Se llevó a cabo la búsqueda y revisión de información en libros y trabajos de investigación con temas relacionados al estudio de la utilización de ***Eisenia foetida*** S. (lombriz de tierra roja californiana) y la importancia de la determinación de la Concentración Letal 50 (CL50); para ello se visitaron las bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.

- Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de El Salvador.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Enrique Álvarez Córdova)
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).

### 4.3 Investigación de Campo

#### 4.3.1 Caracterización de la zona de estudio <sup>(9)</sup>

El Valle de Zapotitá, La Libertad, está ubicada en el kilómetro 30 de la carretera de San Salvador a Santa Ana, comprende 3900 hectáreas, de las cuales 3800 son agrícolas; es una depresión con pendientes inferiores a 3%, pertenece a la cuenca hidrográfica del Río Sucio; esta zona presenta a la vez una cierta unidad geomorfológica y ecológica (el sitio de la antigua laguna de Zapotitán y sus alrededores), y constituye un campo geográficamente definido de acción del estado a través del “Proyecto de Desarrollo Agrícola del Valle de Zapotitán” y de la ley de creación de distrito con una producción agrícola muy importante. (ver anexo N°1).

#### 4.3.2 Universo y Muestra

- Universo: Todos los plaguicidas usados para combatir, controlar y erradicar las plagas en el cultivo de ***Cucumis sativus*** L. (pepino).
- Especie en estudio: ***Eisenia foetida*** S. (lombriz de tierra roja californiana).
- Muestra: la cantidad de 500 individuos y los dos plaguicidas sintéticos más utilizados en el cultivo de ***Cucumis sativus*** L. (pepino).

### **4.3.3 Método e instrumentos de recopilación de datos**

Se realizó una encuesta en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán para conocer cuáles son los plaguicidas más utilizados en el cultivo de *Cucumis sativus* S (pepino) de los cuales solo se seleccionaron dos para la prueba de toxicidad (ver anexo N°3).

## **4.4 Metodología Experimental y Pruebas previas a la metodología <sup>(34)</sup>**

### **4.4.1 Condiciones de prueba**

La investigación experimental se realizó en el Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia ambos de la Universidad de El Salvador, con una temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  la cual se debe verificar dos veces por semanas. Dentro de las características del diseño del contenedor de prueba que contenía las 10 lombrices de tierra roja californiana, se debía asegurar el intercambio gaseoso con el ambiente; los frascos de prueba se protegieron de la luz directa del sol.

Las pérdidas de agua de agua del sustrato artificial no debe exceder el 10% durante la prueba pérdida y se verificará semanalmente por la diferencia de peso en la biomasa del contenedor, la pérdida se repondrá usando agua destilada.

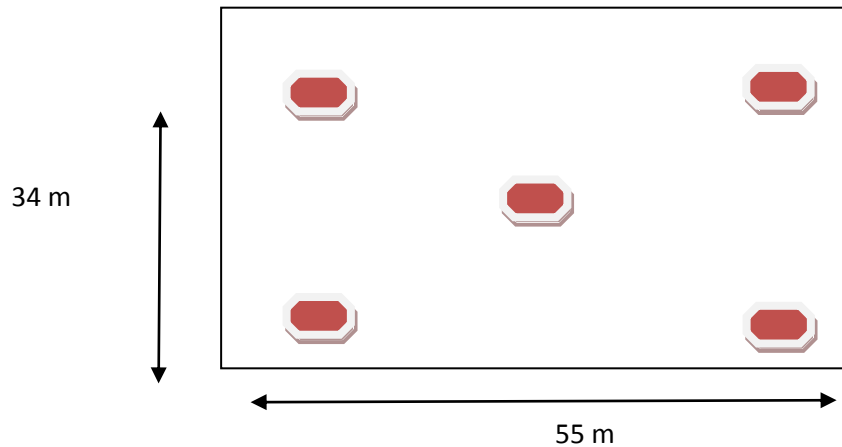
### **4.4.2 Recolección de tierra**

Para la preparación del sustrato se utilizó tierra recolectada en el cantón Agua Caliente, La Libertad (ver figura N°8), en una parcela incluso en sus alrededores donde no se ha cultivado ni agregado plaguicida por más de diez años. Se limpió la zona de restos de plantas y piedras tomando los primero 5 cm y 20 cm de la superficie, posteriormente se tamizó para eliminar piedras y

residuos de hojas, se realizó la toma de la muestra en cinco puntos del terreno que tenía un equivalente a media manzana (ver figuraN°9).



**Figura N°8:** Ubicación del Cantón Agua Caliente en el Departamento de La Libertad



**Figura N°9:** Esquema del muestreo donde se tomo la tierra utilizada para el sustrato artificial.

#### 4.4.3 Procedencia del caolín y recolección de la arena

El caolín se adquirió comercialmente en Droguería QUIRSA ubicada en Santa Tecla. La arena utilizada para la preparación del sustrato artificial se recolectó

en la playa Punta Roca, La Libertad, para esto se limpió la zona de restos de plantas y se tomó los primeros 5 a 20 cm, se lavó con suficiente agua destilada, para eliminar toda la humedad se secó en una estufa a 105°C por 24 horas.

#### **4.4.4 Preparación de sustrato artificial**

Para elaborar el sustrato artificial se mezcló homogéneamente los siguientes materiales:

- 10% Tierra fina sin restos de plantas
- 20% Arcilla caolín
- 70% Arena fina

Pesar la cantidad de sustrato artificial por contenedor correspondiente a 500 g en peso seco y se agregó 1% carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), pulverizado grado analítico para llevar pH (Cloruro de Calcio,  $\text{CaCl}_2$  0.01M) a  $6.0 \pm 0.5$ .

Posteriormente se determinó el porcentaje de Materia Orgánica a este sustrato artificial seco como un parámetro inicial.

#### **4.4.5 Prueba de retención de agua**

Pesar 100 g de sustrato artificial y colocar en un recipiente que permitiera medir el nivel de saturación de agua, luego se fue adicionando el agua poco a poco con una probeta, midiendo el volumen gastado cuando cae la primera gota. Determinando de esta manera la cantidad de agua necesaria para saturar el sustrato artificial, tomando como un 100% de saturación el volumen gastado y calculando el 60% de retención de agua (ver anexo N°4).

#### **4.4.6 Prueba de supervivencia de las lombrices**

Pesar en un frasco plástico transparente (de las mismas características del contenedor a utilizar para la determinación de la Concentración Letal 50, 113.5

g de estiércol de bovino humedecido con 60 mL de agua destilada, colocar 25 *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana) y tomar nota inicial de su comportamiento (si estas quedan en la superficie, se alejan ó se introducen en el estiércol), luego de 24 horas contar el número de lombrices vivas.

El estiércol utilizar debe de recolectarse de manera anticipada y debe secarse la sombra durante 10 días con un volteo de dos veces diarias y luego moler finamente y humedecer al momento de alimentar las lombrices durante la prueba experimental. (El estiércol debe de mantenerse en un lugar seco, evitando la humedad).

#### **4.4.7 Lombrices de prueba**

Para la investigación utilizar *Eisenia foetida* S. (lombrices de tierra roja californiana), con las siguientes características: de por lo menos dos meses de edad y no mayores de un año, con clitelo y una población relativamente homogénea desde el punto de vista de la edad, tamaño y masa. Dentro de la prueba, las lombrices no deben diferir más de 100 mg de peso.

Acondicionar las lombrices de tierra roja californiana seleccionadas 5 días antes de la prueba de toxicidad en un kilogramo de sustrato de suelo artificial humedecido al 60%, incluyendo cantidades apropiadas de alimento.

#### **4.4.8 Plaguicidas en estudio**

Para los plaguicidas en estudio se tomaron las siguientes consideraciones:

En el caso de las concentraciones a utilizar:

- Concentración menor a la recomendada por el fabricante: esta concentración se consideró de acuerdo a la cantidad rotulada de principio activo en la etiqueta del plaguicida; se realizó con el fin de

evaluar la actividad biológica de las lombrices a una concentración menor.

- Concentración utilizada por los productores: se tomó la concentración recomendada por el fabricante siendo la misma utilizada por el productor.
- Concentración doble: se tomó el doble de la dosis recomendada por el fabricante.
- Concentración triple: se tomó el triple de la dosis recomendada por el fabricante.
- Presentación del plaguicida EC (sección 3.5.3).

#### **4.4.9 Aplicación de los plaguicidas de prueba de acuerdo a su Presentación**

Mezclar la sustancia de prueba en el sustrato de suelo antes de introducir las lombrices de tierra, utilizando los métodos descritos a continuación dependiendo de la presentación de los plaguicidas, en nuestro caso fue utilizado el método (i) para Concentrados Emulsificables ( Ver anexo N° 4).

- (i) Sustancias solubles en agua (Concentrado Emulsificable):  
inmediatamente antes de comenzar la prueba, disolver la cantidad de sustancia de prueba en el agua requerida para las réplicas de una concentración ó la porción necesaria para humedecer el sustrato de suelo y mezclar completamente la sustancia de prueba antes de introducirla en un contenedor de prueba.
- (ii) Sustancias insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos:  
Disolver la cantidad de sustancia de prueba requerida para obtener la concentración deseada en un solvente volátil (como acetona o hexano). Agregarlo a una pequeña parte de arena de cuarzo o

sustrato de suelo seco, mezclar completamente y evaporar el disolvente colocando el recipiente bajo una campana de extracción por una hora. Luego adicionar el restante del sustrato de suelo y el agua, mezclar completamente.

- (iii) Sustancias insolubles en agua o solventes orgánicos: Para una sustancia insoluble en un solvente volátil, preparar una mezcla de 10 g de tierra fina, arena ó 10 g de sustrato de suelo seco y la cantidad de sustancia de prueba requerida para obtener la concentración deseada. Colocar la mezcla, el resto del sustrato de suelo y el agua en un vaso de precipitados y mezclar completamente antes de introducirlo en el contenedor de prueba.

#### **4.4.10 Condiciones del control**

Para la prueba de toxicidad se llevó un control por quintuplicado para ambos plaguicidas exponiéndose a las mismas condiciones ambientales y experimentales. Con una humedad del 60%, pH de  $6.0 \pm 0.5$  y temperatura  $23 \pm 2$  °C como parámetro fisicoquímico inicial utilizando un sustrato artificial con las mismas proporciones de tierra, caolín y arena con la diferencia que a este no se le aplicará plaguicida.

#### **4.4.11 Codificación de las concentraciones de los plaguicidas**

Con los plaguicidas en estudio se realizaron cinco repeticiones para cada concentración, codificándolo de la siguiente manera: concentración de prueba de los plaguicidas en estudio "C", plaguicida en estudio Endosulfan (Thiodan EC 35) "THI", thiacloprid + Beta-Cyflutrina (Monarca EC 11.25 EC) "MON" y repetición "R".

**Tabla N°4:** Codificación de los plaguicidas en la prueba de toxicidad de la OECD

Concentraciones	Endosulfan	Thiacloprid + Beta-Cyflutrina
<b>Cmenor</b>	C <sub>1/4</sub> THIR1	C <sub>1/3</sub> MONR1
	C <sub>1/4</sub> THIR2	C <sub>1/3</sub> MONR2
	C <sub>1/4</sub> THIR3	C <sub>1/3</sub> MONR3
	C <sub>1/4</sub> THIR4	C <sub>1/3</sub> MONR4
	C <sub>1/4</sub> THIR5	C <sub>1/3</sub> MONR5
<b>C1</b>	C1THIR1	C1MONR1
	C1THIR2	C1MONR2
	C1THIR3	C1MONR3
	C1THIR4	C1MONR4
	C1THIR5	C1MONR5
<b>C2</b>	C2THIR1	C2MONR1
	C2THIR2	C2MONR2
	C2THIR3	C2MONR3
	C2THIR4	C2MONR4
	C2THIR5	C2MONR5
<b>C3</b>	C3THIR1	C3MONR1
	C3THIR2	C3MONR2
	C3THIR3	C3MONR3
	C3THIR4	C3MONR4
	C3THIR5	C3MONR5
<b>Control</b>	CONTROL1	
	CONTROL2	
	CONTROL3	
	CONTROL4	
	CONTROL5	

#### 4.5 Validez de la prueba.

Los resultados se consideran válidos si:<sup>(34)</sup>

- I. El porcentaje de mortalidad de los adultos observados en el control es menor al 10% a las condiciones de prueba.
- II. Se logra la reproducción mínima de 30 lombrices de tierra roja californiana jóvenes por contenedor control.
- III. El coeficiente de variación no excede el 50% en el control.

#### **Procedimiento:**

1. Preparar la cantidad de plaguicida a utilizar en la prueba de toxicidad especificada por Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), de acuerdo a las características de solubilidad del plaguicida.
2. Pesar 500.0 g de sustrato artificial seco en una balanza semianalítica.
3. Medir el plaguicida preparado dependiendo de la concentración a evaluar y mezclar con el agua necesaria para humedecer el sustrato al 60%.
4. Aplicar el plaguicida disuelto en la cantidad de agua necesaria para humedecer el 60% (realizar en bandejas limpias para facilitar la incorporación del plaguicida).
5. Colocar el sustrato humedecido en los frascos de prueba llevando por quintuplicado la prueba y dejar 30 minutos en cámara de extracción de gases.

6. Medir los parámetros fisicoquímicos iniciales (Temperatura, Humedad, pH y Materia Orgánica) del sustrato de prueba (ver anexo N°6 y N°7).
7. Seleccionar 10 lombrices de tierra roja californiana adultas y lavar con agua destilada, retirar el exceso de agua con papel toalla, pesar y agregar a los frascos que contendrán el sustrato con el plaguicida.
8. Pesar los frascos plásticos que contienen el sustrato con las lombrices de tierra roja californiana (biomasa).
9. A las 24 horas alimentar las lombrices con 5 g de estiércol de bovino (0.5 g por cada lombriz de tierra roja californiana) y humedecer el estiércol con agua destilada (aproximadamente con 5 ó 6 mL por recipiente) extendiéndolo de manera homogénea en toda la superficie del sustrato artificial. A partir de entonces alimentar una vez por semana durante el período de prueba y si las lombrices aún no han consumido todo el alimento, disminuir la ración con el fin de evitar el crecimiento de hongos.
10. Cada semana pesar y revisar el estado de las lombrices (sacando del contenedor las lombrices de tierra roja californiana vivas) el estado de las lombrices durante el período de prueba. Agregar agua destilada si hay pérdida de peso mayor al 10% (biomasa).
11. Tomar la temperatura de los frascos dos veces por semana a la misma hora.
12. A las cuatro semanas sacar de los frascos las lombrices adultas vivas y pesarlas, transferir el sustrato que contiene las lombrices a bandejas limpias para facilitar la búsqueda de las lombrices de tierra roja

californiana adultas, lavar antes de pesar con agua destilada y el exceso de agua eliminarlo con papel de toalla. Todas las lombrices que no se encuentran en ese momento van a ser registradas como muertas, contar las descendencias (huevos y crías jóvenes) que se encuentran en el sustrato.

13. Medir los parámetros fisicoquímicos finales (Temperatura, Humedad, pH y Materia Orgánica) del sustrato de prueba (ver anexo N°6 y N°7).
14. Determinar Concentración Letal 50 (CL50) mediante tratamiento estadístico probit.
15. Devolver el sustrato a los contenedores (excepto las lombrices adultas), la prueba se mantendrá durante cuatro semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales, que la alimentación se llevará a cabo sólo una vez al inicio de esta nueva fase de la prueba.
16. Transcurridas las cuatro semanas adicionandoles verificar la reproducción por la presencia de crías jóvenes y huevos siguiendo el procedimiento en N°12.

## **V .RESULTADOS**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 5.0. Resultados

El Distrito de Riego del Valle de Zapotitán está formado por 15 productores de pepino, se determinó estadísticamente la toma de muestra, obteniendo como resultado 6 productores (ver anexo N°2), cabe mencionar que se entrevistó a 8 por su disposición a colaborar con la recopilación de datos, aumentando la precisión de los datos obtenidos (ver anexo N°3).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los dos plaguicidas sintéticos más utilizados son: Endosulfan (Thiodan EC 35) y thiacloprid + Beta-Cyflutrina (Monarca EC 11.25), ambos Concentrados Emulsificables de clase II banda amarilla (moderadamente peligrosos según la OMS).

De acuerdo a las encuestas realizadas a los agricultores, la concentración utilizada de plaguicidas en el cultivo del pepino, es la recomendada por el fabricante en la etiqueta del producto, pero en ocasiones llegan a utilizar el doble y hasta el triple dependiendo del problema fitosanitario, por tal razón se consideraron en estudio las siguientes concentraciones: 1/4 de la dosis recomendada para el plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35) y 1/3 de la concentración recomendada para el thiacloprid + Beta-Cyflutrina (Monarca EC 11.25) como las más bajas y para ambos plaguicidas se utilizaron la dosis recomendada por el fabricante que equivale a la utilizada por el agricultor, y las concentraciones doble y triple de la concentración recomendada.



**Figura N° 10:** Entrevista a un agricultor de *Cucumis sativus* L. (pepino) en el Valle de Zapotitán

la que los agricultores del Distrito de Riego del Valle de Zapotitán cosechan el *Cucumis sativus* L (pepino). Este ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas con las condiciones de luz necesaria en la prueba y utilizando frascos plásticos transparentes que permitían el intercambio gaseoso.

## 5.1 Condiciones y pruebas previas para obtención de resultados

### 5.1.1 Descripción de los productos químicos sintéticos utilizados

#### 5.1.2 Endosulfan (Thiodan EC 35)

Es un plaguicida sintético, utilizado como insecticida con propiedades acaricidas el cual es moderadamente peligroso. En la tabla N°5 se presenta una breve descripción de este plaguicida (ver hoja de seguridad anexo N°5).

**Tabla N° 5:** Descripción de Endosulfan (Thiodan EC 35)

Principio activo	Endosulfan (Thiodan EC 35)
Nombre químico	6,7,8,9,10,10-hexachloro 1,5,5a,6,9,9a-hexahydro
Densidad	1,07 g/cm <sup>3</sup> a 20°C
Concentración	35 g/mL
Presentación	Concentrado Emulsificable
Toxicidad	Moderada
Concentración recomendada	25 mL /bomba
Solubilidad	Soluble en agua
CAS	115-29-7

### 5.1.3 Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Es un plaguicida sintético, que se utiliza como un insecticida con propiedades acaricidas y moderadamente tóxico. En la tabla N°6 se presenta una breve descripción de este plaguicida (ver hoja de seguridad anexo N°5).

**Tabla N° 6:** Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Principio activo	Thiacloprid + Beta-cyflutrina
<b>Nombre químico</b>	(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2- ylidencyanamide (S)-a-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1R)-cis-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate/(S) (1R)-trans- and (R) (1S)-trans- isómeros, en la relación 1:2: cyano (4-fluoro-3-phenoxyphenyl) methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (IUPAC)
<b>Concentración</b>	11.25 g/mL
<b>Presentación</b>	Concentrado Emulsificable
<b>Toxicidad</b>	Moderada
<b>Concentración recomendada</b>	25 mL/bomba
<b>Solubilidad</b>	Soluble en agua
<b>CAS</b>	[111988-49-9] + [68359-37-5]

### 5.1.4 Preparación de la solución del plaguicida en estudio

Los plaguicidas seleccionados están diseñados para formar emulsiones con agua, por lo que estos fueron agregados a la cantidad de agua requerida para humedecer el sustrato de suelo y mezclar completamente con esto, antes de introducir al contenedor para la prueba(Ejemplo de cálculo, ver anexo N°4).

### 5.1.5 Características del sustrato artificial

El sustrato artificial utilizado necesito de un pre-tratamiento con carbonato de calcio para aumentar en más de una unidad el pH requerido en la prueba, en la

tabla N°7 se muestra las características del sustrato al inicio de la prueba de toxicidad.

**Tabla N° 7:** Características fisicoquímicas iniciales del sustrato artificial

Determinación	Valor medio
<b>pH</b>	6.2
<b>Materia orgánica</b>	0.32%
<b>Humedad</b>	60%
<b>Temperatura</b>	23 °C

#### 5.1.6 Prueba de supervivencia

Como se muestra en la figura N°11, en la prueba de supervivencia no se registraron muertes de las 25 lombrices, observando una completa asimilación de los 113.5 g de estiércol, secado, molido y humedecido con 70 mL de agua destilada.



**Figura N°11:** Prueba de supervivencia

#### 5.1.7 Prueba de retención de agua

Luego de la prueba de retención de agua realizada, se obtuvo que el sustrato artificial requería 120 mL de agua para poder humedecerse al 60% como se observa en la figura N°12 (para cálculos ver anexo N°4).



**Figura N°12:** Prueba de Retención de agua

#### **5.1.8 Adaptación de las lombrices de prueba al sustrato artificial**

La adaptación se realizó cinco días antes del montaje de la prueba de toxicidad con un kilogramo de sustrato artificial humedecido al 60% con agua destilada y luego se introdujeron las 500 lombrices de prueba que fueron utilizadas en el transcurso del ensayo.

#### **5.1.9 Organismos de prueba**

Las *Eisenia foetida* S (lombriz de tierra roja californiana) fueron lombrices adultas de más de dos meses de edad con un tamaño de seis a siete centímetros de largo con clitelio teniendo una masa de  $300 \pm 100$  mg de peso aproximadamente

#### **5.1.10 Dimensiones del frasco de prueba**

Se obtuvieron las dimensiones del frasco para poder determinar el espacio en volumen que ocupaba los 500.0 g de sustrato artificial dentro de este se obtuvo matemáticamente utilizando la fórmula de un cilindro:

$$V = \pi r^2 h$$

Donde:

V: volumen	r: Radio
h: Altura	$\pi$ : pi

Luego de hacer las mediciones del frasco se tiene que la altura es de 5.5 cm, con un radio de 12 cm. Al calcular el volumen se tiene que el sustrato artificial ocupa un volumen de 622 cm<sup>3</sup> dentro del frasco (ver anexo N°11, figuraN°24).

## **5.2 Resultados de las determinaciones fisicoquímicas**

Se determinó el contenido de Materia Orgánica por el método indirecto (cenizas), también se registró el pH y la temperatura. Los análisis se realizaron durante el inicio y final de las cuatro semanas de la prueba de toxicidad (anexo N°8). Los valores presentados en las gráficas en la discusión de resultados son los promedios de las réplicas realizadas en el ensayo mediante la prueba de toxicidad.

### **5.2.1 Control**

Durante la prueba de toxicidad de la OECD se llevaron de manera simultánea cinco controles los cuales se expusieron a las mismas condiciones de temperatura y luz del sustrato artificial que el frasco donde se tenían los plaguicidas en estudio.

**Cuadro N°1:** Mortalidad del control de prueba

Control	Mortalidad%	Crías jóvenes
<b>CONTROL1</b>	0	25
<b>CONTROL2</b>	0	26
<b>CONTROL3</b>	0	28
<b>CONTROL4</b>	0	26
<b>CONTROL5</b>	1	20
$\bar{X}$	2	25

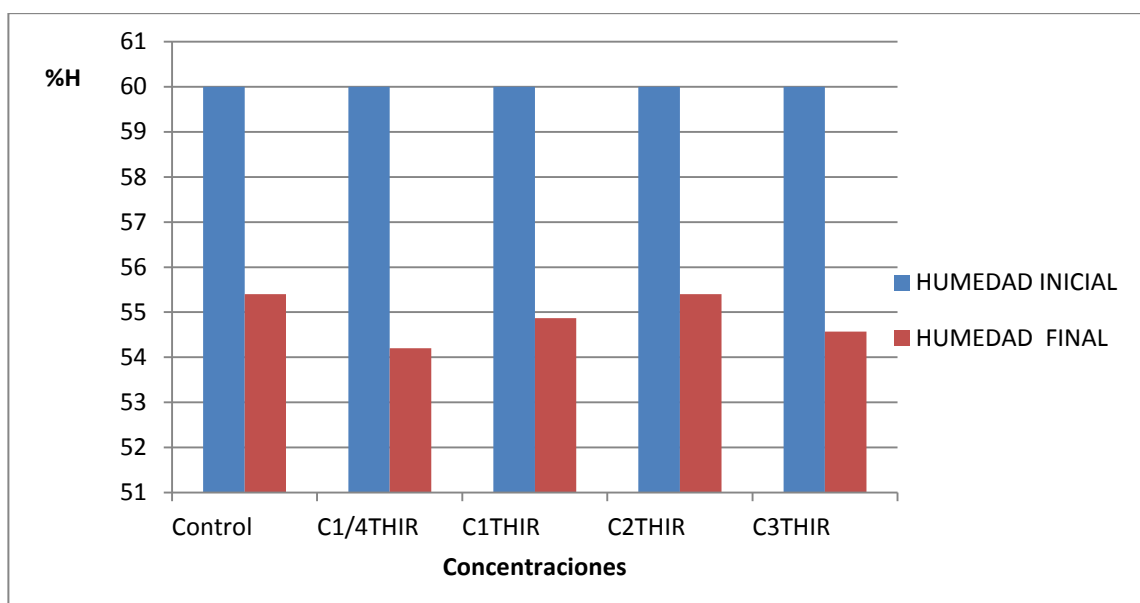
Como se muestra en el cuadro N°1 solo en el **CONTROL5** se produjo la muerte de una lombriz lo que equivale al 2% de mortalidad de la *Eisenia foetida* S (lombriz de tierra roja californiana) el cual fue determinado por el conteo de las lombrices al final de las cuatro semanas obteniendo un coeficiente de variación de 4.56, con un promedio de 25 lombrices juveniles, en los que el pH alcanzado fue de 6.9 (pH óptimo para la reproducción es 7-8).

Todos los individuos del grupo Control presentaron clítelos bien desarrollados al final del estudio permitiendo su reproducción.

Luego de las cuatro semanas de la prueba de toxicidad de la OECD se sacaron las lombrices adultas y se dejaron por cuatro semanas más, las crías jóvenes y huevos, obteniendo un promedio de veinticinco lombrices jóvenes para los cinco frascos control. La prueba de toxicidad propuesta por OECD especifica que la validez de la prueba se logra si la reproducción mínima es de 30 lombrices y establece que de ser menor la cantidad de lombrices como nuestros resultados debe especificarse las posibles causas de esto para poder dar la validez de la prueba, entre las posibles causas: variación del pH, temperatura y el sustrato debido a su alto porcentaje de arena

### 5.3 Determinaciones fisicoquímicas del plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)

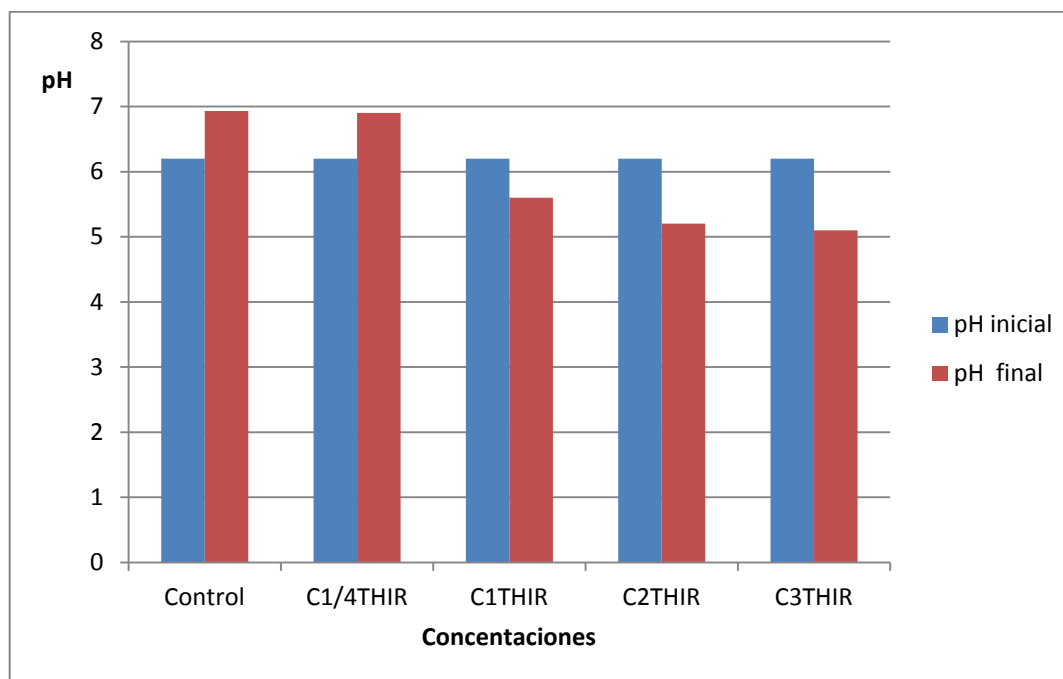
#### 5.3.1 Determinación de Contenido de humedad



**Figura N°13:** Humedad promedio inicial y final de las concentraciones de plaguicida Endosulfan (Thiodan final EC35)

En la figura N° 13 se ilustra que la humedad disminuyó entre 4 y 6% (ver anexo N° 8) a su valor inicial que fue de 60% para todas las concentraciones en estudio, no excediendo el 10% límite de pérdida de humedad, debido a que el sistema de prueba permitía el intercambio gaseoso que se produce al descomponerse la Materia Orgánica, dando lugar a que el agua se evapore de manera natural por sus propiedades físicas; siendo la pérdida de humedad muy lenta ya que el caolín del sustrato artificial permite retener humedad en el sistema de prueba.

### 5.3.2 Determinación de pH

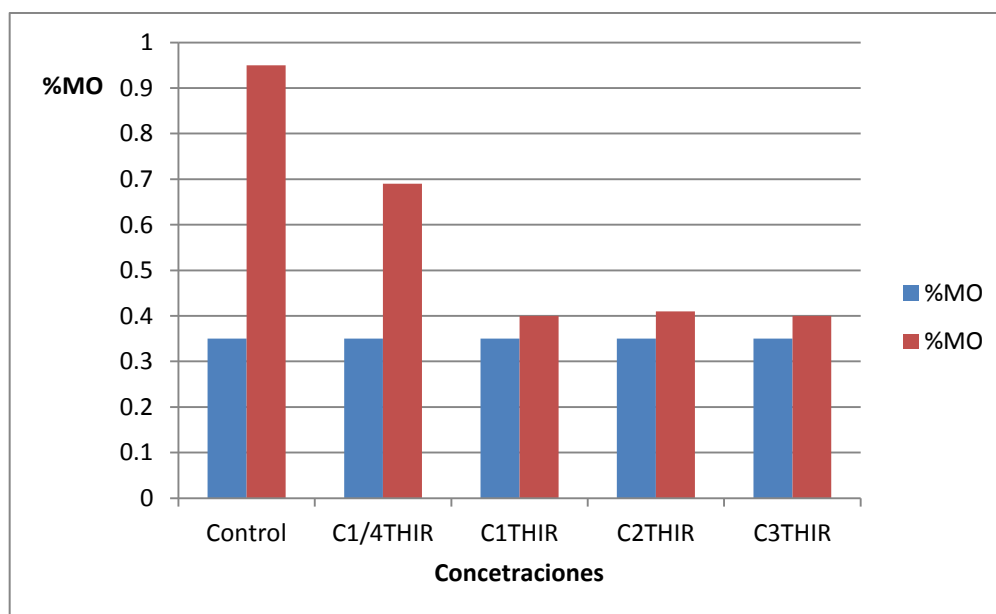


**Figura N°14:** pH promedio inicial y final de las concentraciones con el plaguicida Endosulfan(Thiodan EC35)

La figura N°14 ilustra un pH inicial de 6.2. Para el frasco control y para la C<sub>1/4</sub>THIR un promedio final de 6.87, este aumento está relacionado con la cantidad de Materia Orgánica y la producción de Vermibono producida por las lombrices<sup>(4)</sup>.

Respecto a las concentraciones C1THIR, C2THIR, C3THIR, se observó una disminución del pH luego de una semana de observación en la cual se produjo un 100% de mortalidad de las lombrices (ver anexo N°8), esta disminución influenciado por la descomposición de las lombrices y la acción del plaguicida<sup>(4)</sup>. El promedio final de las cuatro semanas de prueba para estas concentraciones fue de 6.1.

### 5.3.3 Determinación de Materia Orgánica

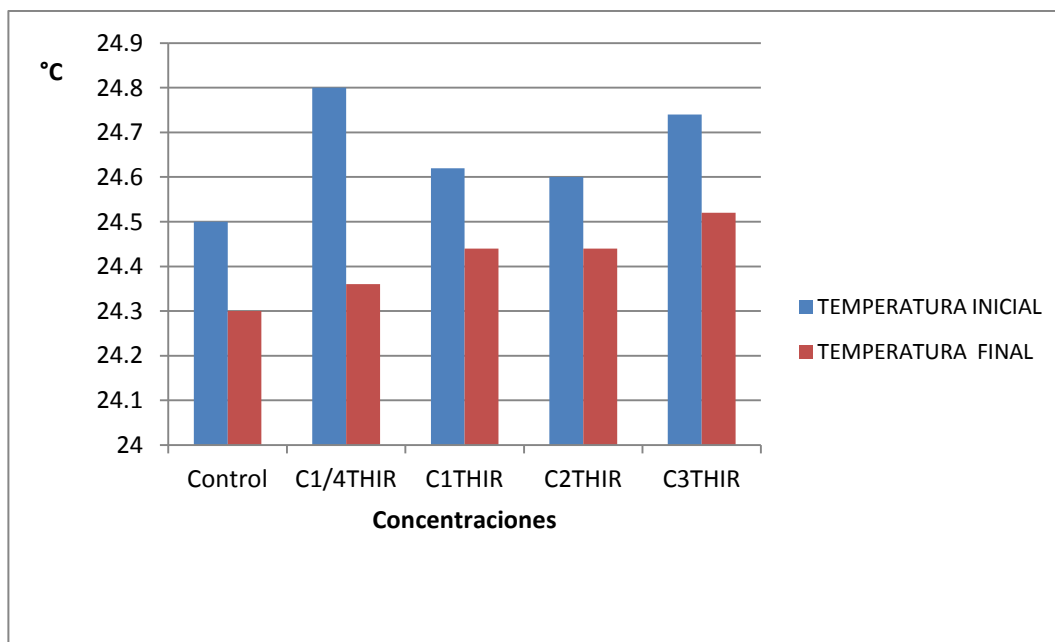


**Figura N°15** : Promedio de Materia Orgánica inicial y final de las concentraciones con el plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)

La figura N°15 ilustra el aumento de Materia Orgánica para las concentraciones C1THIR, C2THIR, C3THIR, aumento debido al 100% de mortalidad de las lombrices, convirtiéndose estas en parte del sustrato artificial.

Para el control y la concentración C<sub>1/4</sub>THIR se produjo un aumento de Materia Orgánica de 0.65% y 0.34% respectivamente, como promedio durante las cuatro semanas de la Prueba de toxicidad, debido a que no se produjo el 100% de mortalidad (ver cuadro N°2), este aumento se debe a la actividad biológica que realizan lombrices al alimentarse <sup>(4)</sup>

### 5.3.4 Temperatura



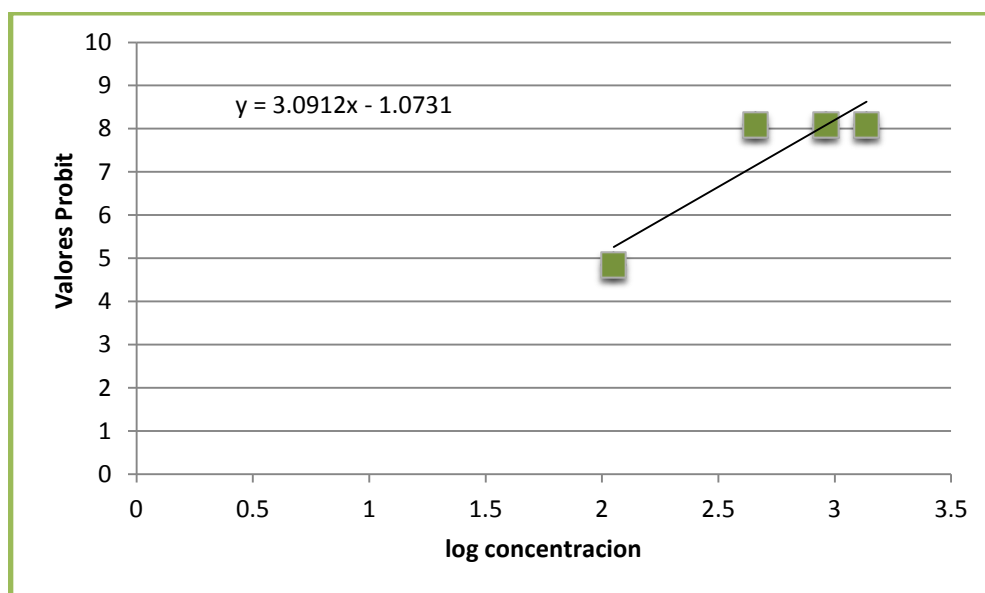
**Figura N°16:** Promedio de temperatura inicial y final de las concentraciones con plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)

En la figura N°16 se ilustra el comportamiento de la temperatura en los frascos para todas las concentraciones. Cabe destacar que los valores obtenidos se encuentran entre  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , siendo la temperatura optima establecida en la prueba de toxicidad. Permitiendo mantener para todas concentraciones un temperatura en la cual *Eisenia foetida* (lombriz de tierra roja californiana) pudiera desarrollarse, ya que la temperatura optima es de  $20 - 28^{\circ}\text{C}$  para la reproducción de ellas;

### 5.3.5. Concentración Letal (CL50) de Endosulfan (Thiodan EC 35)

**Cuadro N° 2:** Datos de mortalidad y valores probit del plaguicida endofulfan (Thiodan EC 35) (ver anexo N°10)

Replicas	Concentración (mg/L)	log concentración	Mortalidad%	Valor probit
<b>C1/4THIR</b>	114.375	2.05	44	4.85
<b>C1THIR</b>	457.91	2.66	100	8.09
<b>C2THIR</b>	915.83	2.9618	100	8.09
<b>C3THIR</b>	1373.73	3.137	100	8.09



**Figura N°17:** Gráfico log concentración vrs valor probit para el plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35)

En la figura N°17 se ilustra la Concentración Letal 50 (CL50) para el plaguicida químico sintético Endosulfan (Thiodan EC 35), la mortalidad producida para  $\frac{1}{4}$  de la concentración recomendada por el fabricante fue de 44%, para las concentraciones recomendada por el fabricante, doble y triple concentración fue de un 100% de mortalidad como se muestra en la cuadro N°2, ya que en las tablas probit (ver anexo N°9) no hay un valor para el 100% de mortalidad se

tomó el valor más cercano al 100%. Obteniendo una Concentración Letal 50 (CL50) de 92.18 ppm (ver cálculo anexo N°10) en 622 cm<sup>3</sup> de sustrato artificial que es el volumen de suelo artificial al cual se aplicó el plaguicida.

De acuerdo a los resultados del control, la muerte que se produjo en los frascos de prueba para las diferentes concentraciones se debió a la acción de los plaguicidas.

### 5.3.6 Comparación de la Concentración Letal 50 (CL50) del ensayo con la concentración declarada en hoja de seguridad

**Cuadro N° 3:** Concentración Letal 50 (CL50) rotulada de Endosulfan (Thiodan EC 35) (ver anexo N°5)

Bioindicador	Dosis	Tiempo de exposición	Comentario
<b><i>Oncorhynchus mykiss</i></b> ( <i>Trucha arco iris</i> )	2,1 µg/L	96 horas	Realizando el ensayo con un producto formulado de características similares.
<b><i>Daphnia magna</i></b> ( <i>Daphnia</i> )	0.004 mg/L	48 horas	Realizando el ensayo con un producto formulado de características similares.
<b><i>Scenedesmus subspicatus</i></b> ( <i>algas</i> )	0.56 mg/L	72 horas	El valor indicado corresponde a principio activo de endosulfan (Thiodan EC 35)

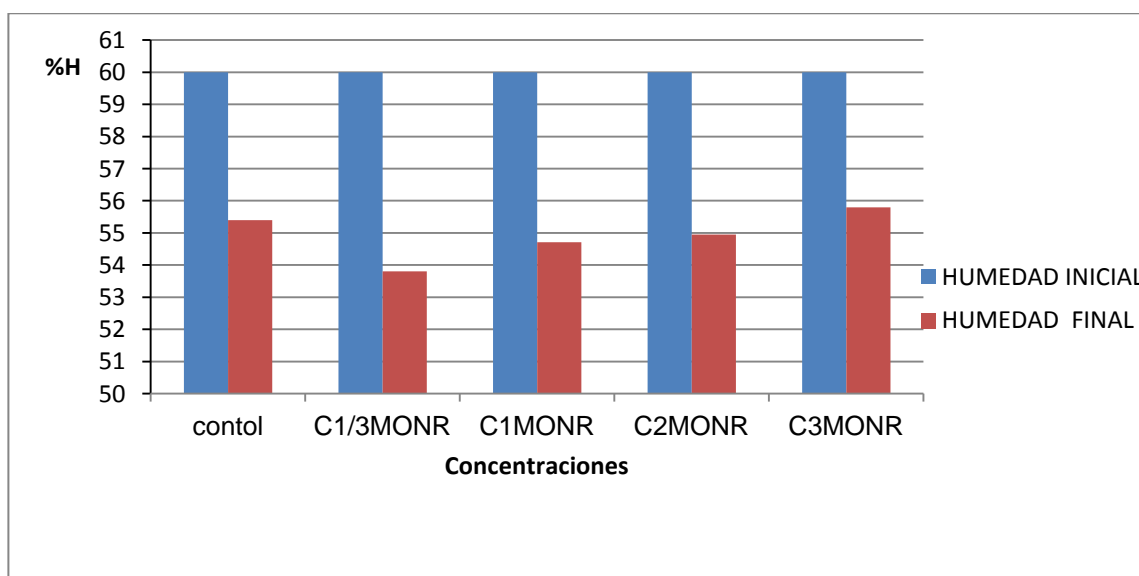
Como se observa en el cuadro N°3, el único organismo que reporta CL50 es ***Scenedesmus subspicatus*** (algas), utilizando Endosulfan pero tenemos que tomar en cuenta que este valor no está sujeto a comparación porque la contaminación de plaguicidas en algas es de manera indirecta y en nuestro estudio es de manera directa, estos dos organismos son de diferente especie y

presenta no solo diferente anatomía si no también diferente fisiología, adsorción, metabolización y eliminación.

De acuerdo a los valores de Concentración Letal 50 reportados en la etiqueta del producto no puede compararse con el obtenido en el estudio, debido a que tampoco se menciona el método y condiciones experimentales a las cuales se determinó este valor.

#### 5.4 Determinaciones fisicoquímicas del plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

##### 5.4.1 Determinación de contenido de humedad

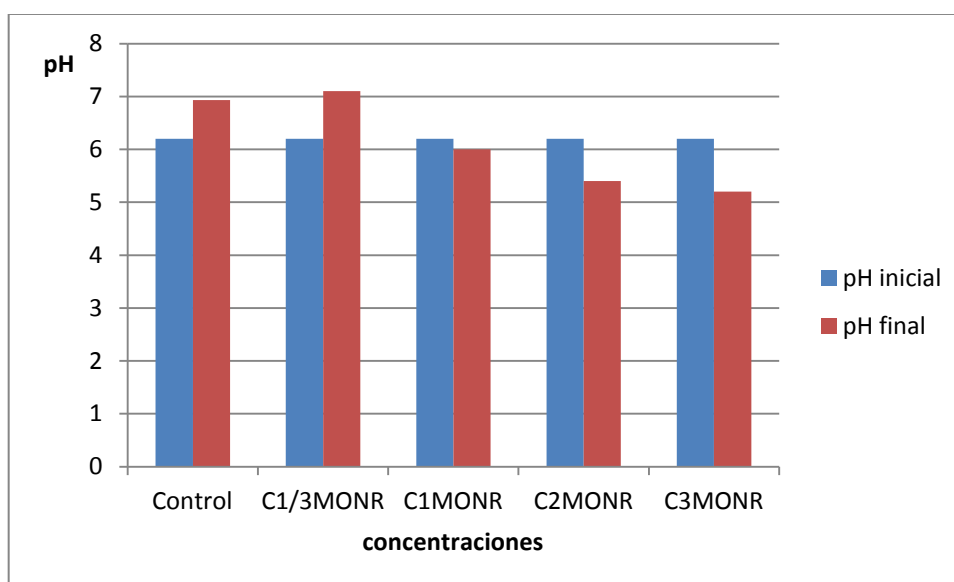


**Figura N°18:** Humedad inicial y final promedio de las concentraciones con el plaguicida Thiacloprid +Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

En la figura N° 18 se ilustra que a lo largo de la prueba de toxicidad la humedad disminuyó entre 4 y 6% de la humedad inicial (60%) para todas las concentraciones en estudio, no excediendo el límite de 10% de pérdida de

humedad debido a que el sistema de prueba permitía el intercambio gaseoso que se produce al descomponerse la Materia Orgánica, dando lugar a que el agua se evapore de manera natural por sus propiedades físicas; siendo la pérdida de humedad muy lenta ya que el caolín presente en el sustrato artificial permite retener humedad en el sistema de prueba.

#### 5.4.2 Determinación de pH



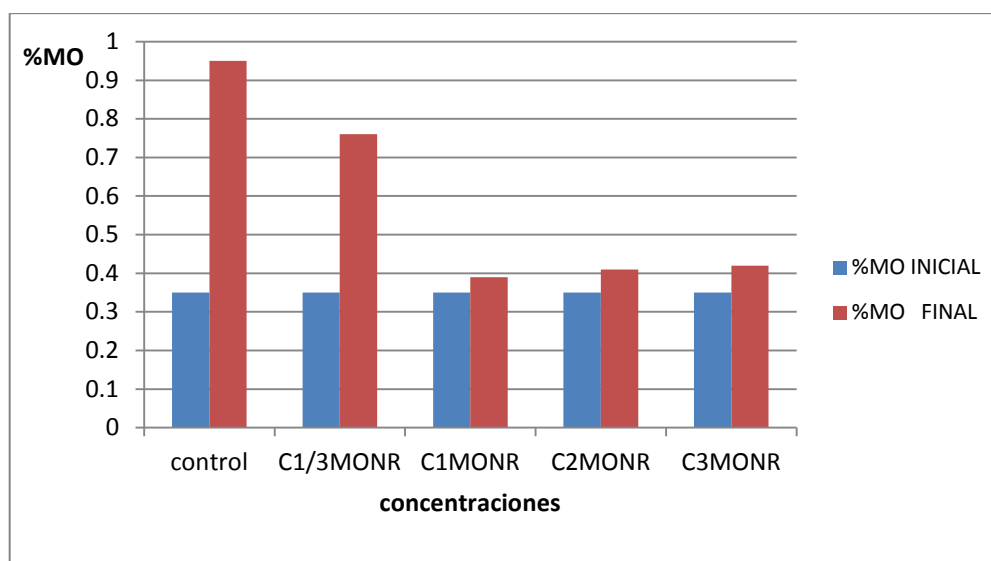
**Figura N° 19:** pH inicial y final promedio de las concentraciones con el plaguicida Thiocloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Como lo muestra la figura N°19 para la concentración más baja evaluada C<sub>1/3</sub>MONR y el Control se observó un aumento del pH ya que las lombrices de prueba sobrevivieron por un período de cuatro semanas, siendo el aumento el resultado de la producción de vermiabono y lixiviado <sup>(4)</sup>; estos productos de las lombrices tienden a modificar el pH a un medio básico.

Para las concentraciones C1MONR, C2MONR, C3MONR en las cuales las lombrices de tierra roja californiana solo sobrevivieron por un período de una

semana, se produce una disminución de pH por la descomposición de las lombrices muertas y la naturaleza del plaguicida.

#### 5.4.3 Determinación de Materia Orgánica

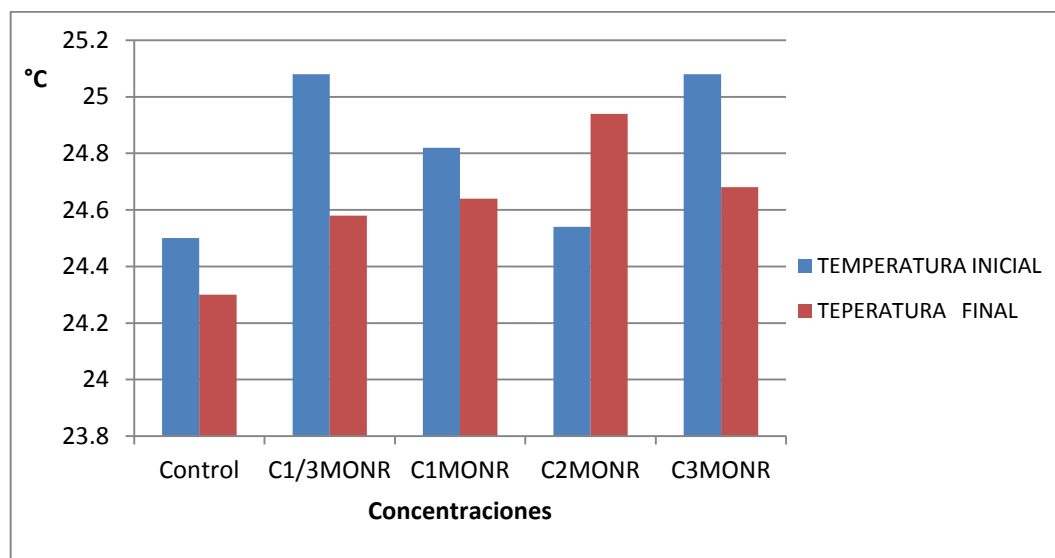


**Figura N°20:** Promedio de Materia Orgánica inicial y promedio de las concentraciones con el plaguicida Thiacloprid + Beta-cyfluthrin (Monarca EC 11.25)

En la figura N°20 se ilustra el resultado para las concentraciones C1MONR, C2MONR y C3MONR observándose un pequeño aumento en porcentaje de Materia Orgánica <sup>(47)</sup> debido al 100% de mortalidad de las lombrices en estudio, produciéndose una descomposición de estas e incorporándose a la cantidad de Materia Orgánica presente en el sistema.

Al comparar el control y C<sub>1/3</sub>MONR con el resto de las concentraciones se observa un mayor aumento de Materia Orgánica, demostrando que las lombrices al estar en presencia de plaguicida sintético disminuye la producción de vermiabono.

#### 5.4.4 Temperatura



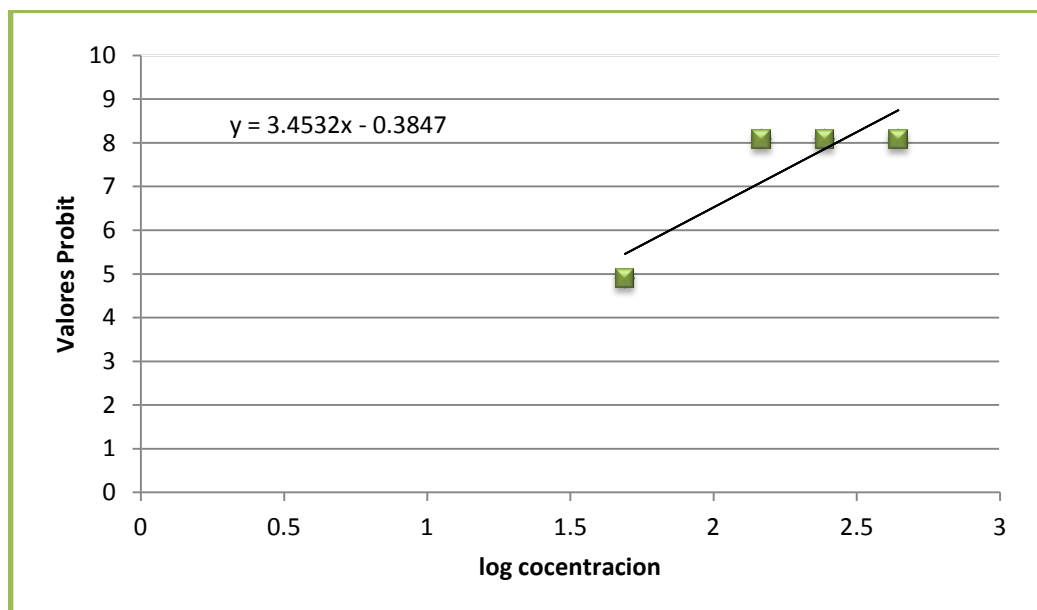
**Figura N°21:** Promedio de temperatura inicial y final de las concentraciones con el plaguicida Thiachloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Como se observa en la figura N°21 el comportamiento de la temperatura se encuentra entre  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , manteniendo para todas las concentraciones la temperatura en la cual *Eisenia foetida* S (lombriz de tierra roja californiana) puede desarrollarse, siendo la temperatura optima para la reproducción de  $20 - 28^{\circ}\text{C}$  (47) de las lombriz de tierra roja californiana; por lo que la temperatura se mantuvo en un rango optima.

#### 5.4.5 Concentración Letal (CL50) Thiachloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

**Cuadro N° 4:** Datos de mortalidad y valores probit del plaguicida Thiachloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Réplicas	Concentración (mg/L)	log concentración	Mortalidad %	Valor probit
<b>C<sub>1/3</sub>MONR</b>	49.16	1.691	46	4.9
<b>C1MONR</b>	147.5	2.168	100	8.09
<b>C2MONR</b>	295	2.389	100	8.09
<b>C3MONR</b>	442.5	2.645	100	8.09



**Figura N°22:** Gráfico log concentración Vrs valor probit plaguicida Thiachloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25)

Como se muestra en la figura N°22 la mortalidad producida por el plaguicida sintético Thiachloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) es de 46% para la concentración  $C_{1/3}$  MONR de 46%. Para las concentraciones: la recomendada por el fabricante doble y triple se produjo un 100% de mortalidad de las lombrices (ver cuadro N°4) y considerando que las tablas probit (ver anexo N°9) no tienen un valor para el 100% de mortalidad se tomó el valor más cercano al 100% que es de 8.09.

La ecuación obtenida para la determinación de la CL50 en plaguicida Thiachloprid +Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) es  $y = 3.4532x - 0.3847$  y la CL50 de 36.25 ppm (ver cálculo anexo N°10) en  $622\text{cm}^3$  de sustrato artificial que es el volumen de suelo artificial al cual se aplicó el plaguicida.

#### **5.4.6 Comparación de Concentración Letal 50 (CL50) del ensayo con la Rotulada**

De acuerdo a la hoja de seguridad (ver anexo N°5) del plaguicida sintético Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) no se reporta la Concentración Letal 50 (CL50) con ningún tipo de organismo bioindicador por lo que no se tiene un valor de comparación con la CL50 encontrada en el ensayo.

Es de gran importancia resaltar que los valores de CL50 obtenidos para ambos plaguicidas en estudio, reflejan un envenenamiento del suelo que al compararlo con una exposición prolongada y repetida provocaría un efecto adverso en la capacidad de la biota del suelo en contribuir a la salud del suelo e incluso podría provocar no solo la muerte de las lombrices sino disminuir la capacidad del suelo para aportar los nutrientes necesarios a los cultivos.

#### **5.5 Comparación entre la toxicidad de Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 EC).**

De acuerdo a los resultados obtenidos para el plaguicida Endosulfan (Thiodan EC 35) la concentración letal 50 fue de 92.18ppm y para el plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 EC) fue 36.25ppm por ello el plaguicida más tóxico es el Monarca EC 11.25 ya que a menor cantidad de principio activo causó el 100 de mortalidad.

**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos en la encuesta efectuada a productores de *Cucumis sativus* L (pepino) en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, los plaguicidas sintéticos más utilizados son Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) ambos con presentación comercial de Concentrados Emulsificables.
2. De acuerdo de a los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad la Concentración Letal 50 (CL50) para el plaguicida químico sintético Endosulfan (Thiodan EC 35), fue de 92.18 ppm y para el plaguicida químico sintético Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25 EC), la Concentración Letal 50 (CL50) fue de 36.25 ppm en un volumen 622 cm<sup>3</sup> de sustrato artificial.
3. Al comparar el porcentaje de Materia Orgánica del control con las concentraciones ensayadas se observa una disminución de la producción de Materia Orgánica, indicando que la presencia de plaguicidas sintéticos afecta la actividad biológica de las lombrices.
4. La concentración recomendada por el fabricante de Endosulfan (Thiodan EC 35) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) produjo el 100% de mortalidad en *Eisenia foetida* S (lombriz de tierra roja californiana) bajo la condiciones del sistema de Prueba para la determinación de la CL50.
5. Los porcentajes de Materia Orgánica en los sustratos se incrementó por la actividad biológica de *Eisenia foetida* S (lombriz de tierra roja

californiana) ó por la mortalidad de ella al convertirse en parte la biomasa del suelo.

6. El plaguicida sintético más tóxico para *Eisenia foetida* (lombriz de tierra roja californiana) es el Thiocloprid + Beta-cyflutrina (Monarca EC 11.25) ya que se necesitó una menor cantidad de principio activo para producir el 100% de mortalidad en la prueba de toxicidad bajo las condiciones del estudio.

**CAPÍTULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Evaluar concentraciones menores a la recomendada por el fabricante utilizando *Eisenia foetida* S. (lombriz de tierra roja californiana) para ambos plaguicidas en la prueba de toxicidad de la Organización para la Cooperación y Desarrollo (OECD) para ambos plaguicidas.
2. En estudios posteriores utilizar suelos que contenga un alto porcentaje de Materia Orgánica y que se encuentre libre de plaguicidas, aplicando diferentes concentraciones plaguicidas sintéticos para poder determinar la Concentración Letal 50 (CL50) en un suelo natural.
3. En estudios posteriores cuantificar la cantidad de plaguicida que es absorbido por las lombrices de tierra roja californiana al inicio, durante y al final de la prueba, para poder determinar la concentración que causa la mortalidad individual de las lombrices en un determinado tiempo.
4. Evaluar la cantidad de nutrientes del lixiviado y vermiabono, producido por la actividad biológica de la lombriz de tierra roja californiana a diferentes concentraciones de plaguicidas sintéticos, para determinar el efecto que tienen la lombriz de tierra en el aporte de nutrientes a los suelos agrícolas y su afectación con los grados de contaminación.
5. Utilizar la metodología propuesta por la Organización para la Cooperación y Desarrollo (OECD) en la evaluación de diferentes tipos de contaminación del suelo, como metales pesados y sustancia de origen químico potencialmente peligroso para el Medio Ambiente.

6. Realizar pruebas con otros plaguicidas químicos sintéticos en cultivos altamente explotados en El Salvador y poder determinar el afecto que causa en el medio ambiente en los suelos agrícolas del país.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alas R, Alvarenga H. Evaluación de Sustratos de Origen Animal y Vegetal en la Producción de Humus y Carne de Lombriz (*Eisenia foetida* S.). Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Fitotecnia. 2002.
2. Andrews W. H. Official Methods of Analysis of AOAC International. Volumen I. Agricultural Chemical, Contaminants, Drugs. AOAC International. Ed Horwitz W. 17 th Edition. 2000.
3. Ávila G, Gaete H, Morales M, Neaman A. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* .2007 (42): pág.435-441.
4. Bates R, Beauchamp E, Haq A, Ketcheson J.W.; Análisis Físico Químicos, John Wiley and Sons, Inc. New York al .1983.
5. Bello-Amez S, La Materia Orgánica, Importancia y Experiencias de su uso en la agricultura. IDESIA. Chile. 2006. Volumen 24, No. 1: pág. 49-61.
6. Brechelt. Manejo Ecológico del Suelo. Fundación de Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América latina (RAP-AL). Primera edición: agosto 2004[acceso 15 julio de 2012]. Disponible en:  
[http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Manejo\\_Ecologico\\_del\\_Suelo.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Manejo_Ecologico_del_Suelo.pdf).
7. Brenes L. Producción Orgánica: algunas limitaciones que enfrentan los pequeños productores. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 2003.

8. Buckman H, Montaner S. Naturaleza y propiedad de los suelos. 1966. Barcelona. pág. 590.
9. Cooperación Técnica Francesa, Departamento de economía, UCA. Estudio de un sistema agrario: Distrito de Riego y Avenamiento de Zapotitán [28 de abril de 2012] Disponible en:[http://www.uca.edu.sv/revistarealidad /archivo/4ea09f17158c5estuodiodeunsistema.pdf](http://www.uca.edu.sv/revistarealidad/archivo/4ea09f17158c5estuodiodeunsistema.pdf).
10. Crespo V, C. Mecánica de suelos y cimentaciones. Quinta edición. Limusa, 2004. Pág. 22-25. Disponible en: [http://books.google.com.sv /books ?id=Db2SQbBHVPQC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=Db2SQbBHVPQC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
11. Cussu S. Fernando R.; Toxicidad Ambiental y Ecotoxicológica Escuela Militar de Ingeniería (EMI). 2001. Disponible en: <http://www.slideshare.net/Fernandoraul/manual-de-procedimientos-3336028>.
12. Díaz B, Bulas Rossini D, Pica Granados Y. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. Capítulo 5. Disponible en: [http://web.idrc.ca/es/ev-84468-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://web.idrc.ca/es/ev-84468-201-1-DO_TOPIC.html).
13. Díaz E. Guía de Lombricultura. ADEX. 2002. [30 de abril del 2012] ,Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/88761.pdf>.
14. Dirección General de Materiales, Residuos y Actividades Riesgosas del Instituto Nacional de Ecología. Introducción a la Gestión de Sustancias Químicas. 2011[consultado 2 de agosto del 2012]. Disponible en:<http://www.ine.gob.mx/index.php>.  
Disponible en: [http:// www.scielo.org.mx](http://www.scielo.org.mx).

15. Domínguez J, Velando A, Ferreiro A. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia Andrei*. Bouche '(1972) (Oligoquetos, Lombrices) diferentes especies biológicas). Rev. EL SEVIER; 2004;(49); p. 81-87.
16. Donahue, R, Miller, R. Shicakluna, J. Soils: an Introduction to soils and plant growth. 4 edición. Prentice Hall, N.J. 1997. p. 626.
17. Faithfull Nigel T. Métodos de análisis químicos agrícolas, ACRIBIA, S.A, pág 85-86.
18. Fontanetti C. S., Nogarol L. R, de Souza R. B, Perez D. G., Maziviero G. T. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. 2011 .São Paulo State University (UNESP)[consultado 8 de agosto de 2012]Brazil p.146-147. Disponible: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/19395.pdf>
19. García J. E. Introducción a los Plaguicidas. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2007. Capítulo 1-7.
20. Graetz H, Suelos y Fertilización. Traducido por: F. Luna Orozco. Trillas. México. 1997.
21. Gros A, Domínguez A, Abonos guía práctica de la fertilización. 8va. edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1992.
22. Homer Ch. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Trillas. 1973.
23. Inoue N, Isshiki M, Díaz L, Terezón J. Proyecto CENTA-JINCA. "Manejo Correcto y Seguro de Plaguicidas". Proyecto Fortalecimiento del Desarrollo

- y. Transferencia de Tecnología Agrícola en la república de El Salvador. MAG-CENTA y Agencia de cooperación internacional de Japón.
24. Manual Práctico Ilustrado. Hogares Campesinos Juveniles. Abono Orgánico y Lombricultura. Granja integral autosuficiente. Biblioteca de Campo. 1996.
25. Med Enciclopedia virtual. Estudios de Toxicología.(consultada mayo 2012) Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox02.htm>.
26. Meléndez G. A, Ángel Campos C. A, Morales Canjura M. O. Uso de Sustratos Alimenticios en el Desarrollo Reproductivo y Cantidad Proteica de la Lombriz de Tierra (*Eisenia foetida*). Universidad de El Salvador Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de zootecnia. 1997.
27. Nahmani J, Hodson M.E, Black S, A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Environmental Pollution. 2007.
28. Navarro J, Moral H, Gómez. Residuos orgánicos y agricultura. Universidad de Alicante. Servicio de Publicaciones. Alicante. España, 1995.
29. Nieto C. Medición del Coeficiente de Presión de Tierras en Reposo “KO”, Por Medio del Consolidómetro de Rowe Modificado. Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia. 2007. Disponible: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/955/95500806.pdf>.
30. Nuñez J. Fundamentos de edafología. 2da edición. Editorial UNED, 1995 San José. 1995. pág.184.

31. Organización de las Naciones Unidas (ONU) . Dosis Letal 50(DL50). 2007.  
Disponible en: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/Spanish/03-parte3-sp.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/Spanish/03-parte3-sp.pdf).
32. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos.1997 [ 2 de agosto de 2012] Disponible: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/W2598S00.htm>.
33. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Curso de Autoinstrucción en Evaluación de Riesgo. Anexo 4(Publicado enero 2005) Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial/index.html>.
34. Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Guía para la prueba de toxicidad, fertilidad y reproducción en suelos de lombrices ***Eisenia foetida*** prueba / ***Eisenia andrei***, 2004.
35. Pineda J. A. Lombricultura. Instituto Hondureño del Café (Tegucigalpa). 1a. edición. Gerencia Técnica. Dirección de Generación de Tecnología. 2006. Disponible en: [http://www.pasolac.org.ni/files/publicacion/1175041790\\_IHC\\_AFE.pdf](http://www.pasolac.org.ni/files/publicacion/1175041790_IHC_AFE.pdf).
36. Ramírez J. A, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Rev Arch Prev Riesgos Labor. 2001,4(2) p.67-75 [consultado 3 de agosto del 2012] Disponible: <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>

37. Ribas O. B. Biocidas: Datos sobre su evaluación para la salud Industria alimentaria e impacto ambiental. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2010 [acceso 09 de agosto de 2012]. Disponible en: <http://www.nalesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1109/1126>.
38. Rodríguez A.R. Producción y Calidad de Abono Orgánico por Medio de la Lombriz Roja Californiana (*Eisenia foetida*) y su Capacidad Reproductiva. IHCAFE. Disponible en: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/936/Producci%C3%B3n%20y%20Calidad%20de%20Abono.pdf>.
39. Rodríguez R, Maitre M. I. Efectos Subletales de la Lambda-Cialotrina sobre *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta, Umbricidae). INTEC (Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química); Universidad Nacional del Litoral, CONICET, Santa Fe, Argentina. Publicado Septiembre 2010. Disponible: <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v28n1/v28n1a05.pdf>.
40. Russel E.J.; Russel E. W. Las Condiciones del Suelo y el Desarrollo de las plantas. 3° edición Trand G. Gonzales. Editorial Agilar, Madrid. 1964. pág. 771.
41. Sanderson P. Ecotoxicological Testing of Lead Contaminated Soil.using a Multispecies Soil System. Division of Information Technology, Engineering and the Environment,University of South Australia. 2008. [consultado 9 de agosto de 2012] p. 7-9. Disponible en: <http://www.crccare.com/education/downloads/Peter-Sanderson-Final-Thesis.pdf>.
42. Satchell J. E. Lumbrícid. En Biología del Suelo. Editado por Alan Burges y Frank Raw. Edición Omega, Barcelona. 1971. pág. 307-378.

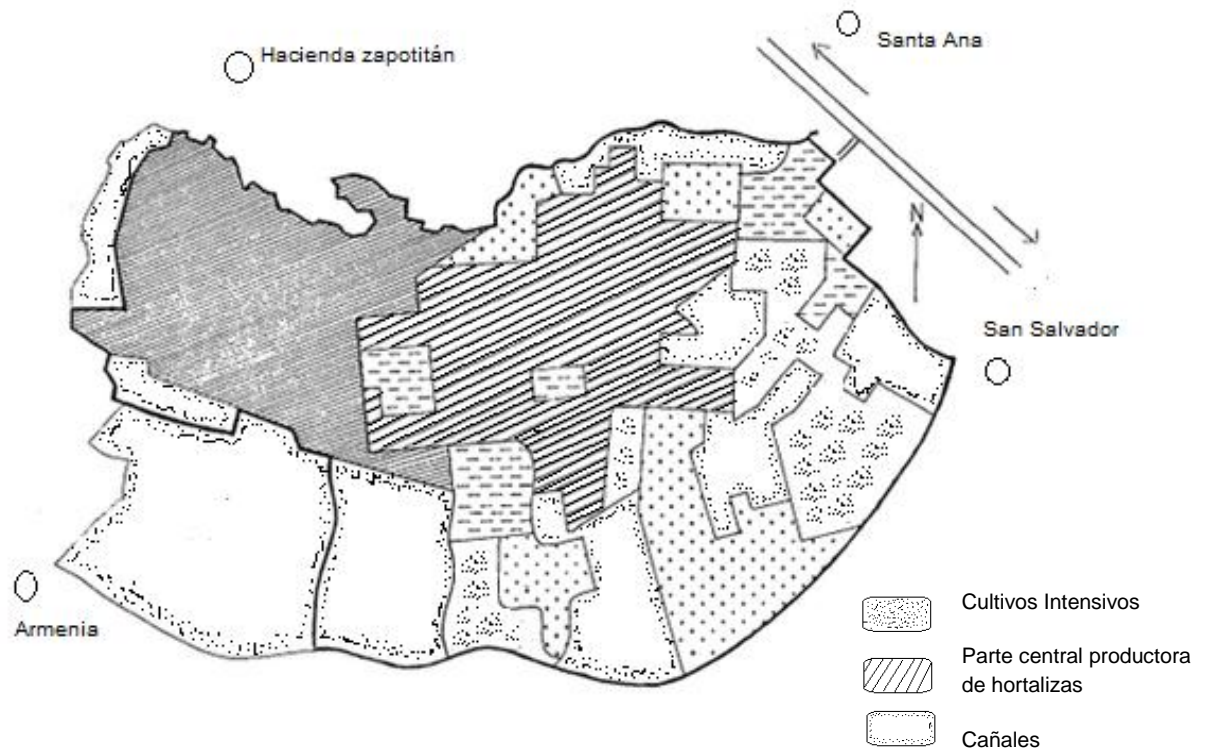
43. Silva A. G. Que es y como se calcula la DL 50 en insecticidas Universidad de Concepción; 2004 [acceso 09 de agosto del 2012] Disponible en : <http://es.scribd.com/doc/64648821/DL50>.
44. Sindy M. B. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de cinco especies del Género *Micrurus* en estado de cautiverio en NiloCundinamarca (Colombia). Universidad de la Amazonia. Facultad de Ciencias Básicas. Programa de Biología con Énfasis en Biorecursos. Florencia-Caquetá. 2007. Disponible en: [http://www.probiol.com/imagenes/dosisletal media accidente ofidico.pdf](http://www.probiol.com/imagenes/dosisletal%20media%20accidente%20ofidico.pdf).
45. Specht W.L. Rapid Bioassessment Methods for Accessing the Toxicity of Terrestrial Waste Sites at the Savannah River Site Using the Earth Worm, *Eisenia Foetida*. Clemson University(SC) USA.1995.[consultado 7 de agosto de 2012] Diponible:[http://www.osti.gov/bridge/product\\_biblio.jsp?osti\\_id=226008](http://www.osti.gov/bridge/product_biblio.jsp?osti_id=226008).
46. Spurgeon D, Weeks J, Van Gestel, C.A.M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology: the 7th international symposium on earthworm ecology, Cardiff, Wales, 2002.
47. Tineo B, Alex L. Programa de Manejo Integral de Recursos Naturales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Publicaciones del proyecto RENARM/Manejo de Cuencas. Crianza y Manejo de Lombrices de Tierra con fines Agrícolas. catie Turrialba. 1994. Disponible en:

<http://books.google.com.sv/books?id=occOAQAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

48. USAID-RED. Proyecto de Diversificación económica Rural. Manual de Producción de Pepino. 2007 Programa de Diversificación Económica Rural USAID-RED. Disponible en: [http://www.fintrac.com/docs/RED/RED\\_Manual\\_Produccion\\_08\\_Pepino\\_04.12.pdf](http://www.fintrac.com/docs/RED/RED_Manual_Produccion_08_Pepino_04.12.pdf).
49. Vásquez G. Lombrices. Revista Comunica en Línea. Magníficas Aliadas. Por Periodista. Año 5. Abril 25, 2008. Disponible en: <http://www.uca.edu.sv/virtual/comunica/archivo/abril252008/notas/nota21.htm>.
50. Ville C, Walker W, Smith F. Zoología, Tercera edición. Traducido por F. Colchero A. Nueva editorial Interamericana, México. 1970. pág. 83.
51. Wang Y, Cang T, Zhao X, Ruixian Ch, Wu Ch, Wan Q. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia foetida*, EL SEVIER. 2011. [acceso 20 de abril del 2012], Ecotoxicology and Environmental Safety Disponible en: [http://www.farmlandbirds.net/sites/default/files/Wang%20et%20al%202012\\_toxicity%20of%20neonics%20to%20earthworms\\_%20Ecotox%20%20Env%20%20Saf%20%20AIP\\_0.pdf](http://www.farmlandbirds.net/sites/default/files/Wang%20et%20al%202012_toxicity%20of%20neonics%20to%20earthworms_%20Ecotox%20%20Env%20%20Saf%20%20AIP_0.pdf).

## **ANEXOS**

## Anexo N° 1



**Figura N° 23:** Mapa de las zonas de cultivos en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán<sub>(10)</sub>

## ANEXO N° 2

Cálculo del tamaño de la muestra a considerar para los agricultores a entrevistar en el Distrito de Riego del valle de Zapotitán, La Libertad

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q}$$

Donde:

$N$  = es el total de la población;

$Z^2_{\alpha}$  = es 1,962 si la seguridad deseada es del 95 %;

$p$  = es la proporción esperada (en este caso 95 % ó 0.95);

$q = 1 - p$  (en este caso  $1 - 0.95 = 0.05$ );

$d$  = es la precisión (en este caso se desea un 15 %).

$$n = \frac{15 * 1.96^2 * 0.95 * 0.05}{0.15^2(15 - 1) + 1.96^2 * 0.95 * 0.05} = 5.50 \cong 6$$

### **ANEXO N° 3**

**Encuesta y Resultados de las entrevistas realizadas a los agricultores del cultivo de *Cucumis sativus L.* (pepino) en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, La Libertad.**



5. ¿Por qué toma la decisión de aplicar plaguicidas?

- a) Preventivamente                      b) Presencia de plaga

6. ¿Considera que previene y combate las plagas el o los plaguicidas usados?

Si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_

7. ¿Quién aplica los plaguicidas en el cultivo?

- a) Dueño de la parcela  
b) Empleado  
c) Familiar

8. ¿Usted o la persona que aplica los plaguicidas se ha intoxicado alguna vez?

Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

9. ¿Ha recibido capacitaciones sobre el uso y manejo seguro de los plaguicidas?

Si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_

10. ¿Qué medidas de prevención toma en cuenta cuando aplica los plaguicidas?

- a) Ropa adecuada                      b) Guantes  
c) Mascarilla                              d) no ingiere alimentos

11. ¿Posee algún lugar especial para el manejo de los plaguicidas?

Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

12. ¿Quién le recomienda los productos a utilizar?

- a) Los técnicos de CENTA o alguna ONG    b) Los vendedores  
c) Otro

Quién: \_\_\_\_\_

RESULTADOS DE LA ENCUESTA REALIZADA A LOS AGRICULTORES DE *Cucumis sativus* L. (PEPINO) EN EL DISTRITO DE RIEGO DEL VALLE DE ZAPOTITAN LA LIBERTAD

1. ¿Cuales cultivos establece en esta parcela durante esta época del año?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Maíz	-	-
Arroz	-	-
Pepino	8	100
Chile verde	-	-
Total	8	100

2. ¿Qué tipo de plaguicidas utiliza para manejar los problemas de plagas y enfermedades?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Productos químicos sintéticos	8	100
Productos orgánicos	-	-
Productos biológicos	-	-
Total	8	100

b) ¿Cual o cual los plaguicidas que más usan?

Nombre del producto	Dosis usada	Presentación (sólido, líquido, suspensión) expresada por los agricultores encuestados*
Monarca 11.25 EC	1-2 copa por bomba	Líquido
Thiodan 35 EC	1-2 copa por bomba	Líquido
Rescate	1-2 sobres por bomba	Polvo
Escuecho	1-2 sobres por bomba	Polvo
SunFire	1-copa por bomba	Líquido
Winner	1-2 copa por bomba	Líquido
Exal	1-2 copa por bomba	Líquido
Diamante	1-2 copa por bomba	Líquido
Rienda	1-3 copa por bomba	Líquido
Vidal	1-2 copa por bomba	Líquido
Ridumil Gold	1-2 sobres por bomba	Polvo
Ridumil Bravo	1-2 copa por bomba	Líquido
Aliette	1-2 sobres por bomba	Polvo
Pegasus	1-2 copa por bomba	Líquido
Espinto	1-2 copa por bomba	Líquido

4. ¿Por qué utilizan más este o estos plaguicidas?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Costos	-	-
Controla mejor las plagas	5	62.5
Accesible	-	-
Por ser más conocido	-	-
El menos peligroso	-	-
Esl más potente	3	37.5
Total	8	100

5. ¿Por qué toma la decisión de aplicar plaguicidas?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Preventivamente	8	100
Presencia de plaga	-	-
Total	8	100

6. ¿Considera que previene y combate las plagas el o los plaguicidas usados?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Si	8	100
No	-	-
Total	8	100

7. ¿Quién aplica los plaguicidas en el cultivo?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Dueño de la parcela	2	25
Empleado	3	37.5
Familiar	3	37.5
Total	8	100

8. ¿Usted o la persona que aplica los plaguicidas se ha intoxicado alguna vez?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Si	-	-
No	8	100
Total	8	100

9. ¿Ha recibido capacitaciones sobre el uso y manejo seguro de los plaguicidas?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Si	8	100
No	-	-
Total	100	100

10. ¿Qué medidas de prevención toma en cuenta cuando aplica los plaguicidas?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Ropa adecuada	8	100
Guantes	-	-
Mascarilla	-	-
no ingiere alimentos	8	100
Total	8	100

11. ¿Posee algún lugar especial para el manejo de los plaguicidas?

<i>Alternativa</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Si</i>	<i>8</i>	<i>100</i>
<i>No</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
Total	8	100

12. ¿Quién le recomienda los productos a utilizar?

Alternativa	Frecuencia absoluta	Porcentaje
Los técnicos de CENTA o alguna ONG	2	25
Los vendedores	4	50
Otro	2	25
Total	8	100

## Anexo N° 4

### Ejemplo de cálculos de humedad y concentración de plaguicida

#### Cálculos para la determinación del 60% de humedad en el sustrato utilizado

20 mL de agua → 100% de humedad  
X mL de agua → 60% de humedad  
X=12 mL de agua

12 mL de agua → 50 g de sustrato artificial  
X mL de agua → 500 g de sustrato artificial  
X= 120 mL de agua

#### Cálculos para la determinación de la cantidad de plaguicida utilizada para cada concentración.

Volumen recomendado por el fabricante = 25 mL/bomba

Capacidad de la bomba = 19 Litros =1900 mL

mL de agua necesarios para el 60% de humedad para 500 g = 120 mL

25 mL de plaguicida → 19000 mL de agua

X mL de plaguicida → 120 mL de agua

X = 0.15 mL de plaguicida

#### Cálculo para la Concentración recomendada por el fabricante del plaguicida Thiodan 35 EC

35 g p.a → 100 mL de plaguicida

X g p.a → 0.15 mL de plaguicida

X g = 0.0552 de p.a

$$\text{Concentración} = \frac{0.0552 \text{ g}}{120 \text{ mL}} = 0.4579 \text{ mg/mL}$$

**ANEXO N° 5**

**Hojas de Seguridad de Endosulfan (Thiodan 35 EC) y Thiacloprid + Beta-  
cyflutrina (Monarca 11.25 EC)**

<b>HOJA DE SEGURIDAD DE THIODAN 35 EC</b>	
<b>1. COMPOSICIÓN / INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES THIODAN 35 EC</b>	
<b>Naturaleza química</b>	Concentrado emulsionable (EC)
<b>Componentes peligrosos</b>	Endosulfan 350 g/l
<b>3. IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS</b>	
<b>Advertencia de riesgo para el hombre y para el medio ambiente</b>	Inflamable. Tóxico en contacto con la piel. Tóxico por ingestión. Irrita la piel. Riesgo de lesiones oculares graves. Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.
<b>4. PRIMEROS AUXILIOS</b>	
<b>Inhalación</b>	En caso de accidente por inhalación, alejar a la víctima de la zona contaminada y mantener en reposo. Llame inmediatamente al médico.
<b>Contacto con la piel</b>	Quítese inmediatamente la ropa contaminada. Lávese inmediatamente con jabón y agua abundante. Llame inmediatamente al médico.
<b>Contacto con los ojos</b>	En caso de contacto con los ojos, lávenlos inmediata y abundantemente con agua y acuda a un médico.
<b>Ingestión</b>	En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase. Inducir vómito si el paciente está totalmente consciente, han pasado menos de 2 horas desde la ingestión y no se puede obtener ayuda médica fácilmente. (el vómito no debe llegar al tracto respiratorio) Enjuagar la boca cuidadosamente y a fondo con agua.
<b>Notas para el médico</b> <b>Síntomas</b>	Local:, irritación grave, Sistémico:, mareos, dolor de cabeza, ataxia, náusea, vómitos, dolor abdominal, inconsciencia, convulsiones
<b>Riesgos</b>	Puede haber efectos neurológicos retrasados, incluyendo edema cerebral. En caso de ingestión o vómitos, peligro de aspiración pulmonar. NO confundir con compuestos

<p><b>Tratamiento</b></p>	<p>organofosforados</p> <p>Auxilios elementales, descontaminación y tratamiento sintomático. Se deberá aplicar intubación endotraqueal y hacer un lavado gástrico, seguidos de administración de carbón animal y después de una solución acuosa de sulfato de magnesio o de sodio al 30%.</p> <p>Controlar: sistemas respiratorio, cardíaco, riñón, hígado y sistema nervioso central. Control de electrocardiograma. Control de electroencefalograma. Eliminación por diuresis alcalina forzada. Tratamiento de las convulsiones con fenobarbital y, según caso, con diazepam por vía intravenosa; gluconato cálcico 10% por vía intravenosa. Contraindicados: derivados de adrenalina, derivados de morfina, atropina, obidoxima</p>
<p><b>5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS</b></p>	
<p><b>Medios de extinción adecuados</b></p> <p><b>Peligros específicos para la lucha contra el fuego</b></p> <p><b>Equipo de protección especial para los bomberos</b></p> <p><b>Información adicional</b></p>	<p>Espuma Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) Polvo seco Agua pulverizada</p> <p>En caso de incendio puede(n) desprenderse: Monóxido de carbono (CO) Óxidos de azufre Acido clorhídrico (HCl)</p> <p>En caso de fuego, protéjase con un equipo respiratorio autónomo. Llevar ropa de protección total.</p> <p>El agua de extinción debe recogerse por separado, no debe penetrar en el alcantarillado. Si no se puede retirar el producto de la zona de incendio, refrigerar con agua los envases y reducir el calor para evitar que aumente la presión en los envases.</p>
<p><b>6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL</b></p>	
<p><b>Precauciones personales</b></p> <p><b>Precauciones para la protección del medio ambiente</b></p>	<p>Utilícese equipo de protección individual. Evacuar el personal a zonas seguras.</p> <p>Utilícese equipo de protección individual. Evacuar el personal a zonas seguras.</p>

<p><b>Métodos de limpieza</b></p> <p><b>Consejos adicionales</b></p>	<p>Recoger con material absorbente (p. ej. arena, tierra de infusorios, absorbente universal). Llevar a eliminar en recipientes provistos de cierre seguro.</p> <p>Indicaciones relativas a manipulación segura. Indicaciones relativas al equipo de protección individual. Indicaciones relativas a eliminación de residuos. Verificar también la existencia de procedimientos internos en el centro de trabajo.</p>
<p><b>7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO</b></p>	
<p><b>Manipulación</b></p> <p><b>Consejos para una manipulación segura</b></p> <p><b>Indicaciones para la protección contra incendio y explosión</b></p> <p><b>Indicaciones para la protección contra incendio y explosión</b></p> <p><b>Almacenamiento</b></p> <p><b>Exigencias técnicas para almacenes y recipientes</b></p> <p><b>Indicaciones para el almacenamiento conjunto</b></p> <p><b>Estabilidad en almacén</b></p> <p><b>Tiempo de almacenamiento</b> <b>Temperatura de almacenamiento</b> <b>Otros datos</b></p> <p><b>Materiales adecuados</b></p> <p><b>Material no adecuado</b></p>	<p>Asegúrese una ventilación apropiada.</p> <p>El producto es inflamable. Manténgase separado del calor y de las fuentes de ignición.</p> <p>El producto no es sensible a impacto y/o fricción y por lo tanto, no provoca explosiones</p> <p>Cerrar los recipientes herméticamente y mantenerlos en lugar seco, fresco y bien ventilado. Mantener alejado de la luz directa del sol. Proteger de las heladas.</p> <p>Manténgase separado de alimentos, bebidas y piensos.</p> <p>24 Meses</p> <p>25 °C Almacenar a temperatura entre 0 y 30 °C , máx. 50 °C.</p> <p>Vidrio Botellas de polietileno con revestimiento interior de poliamida (coex) Acero pintado al horno Polietileno, goma</p>

<b>8. CONTROLES DE LA EXPOSICIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL</b>	
<b>Protección personal</b> <b>Protección respiratoria</b>  <b>Protección de las manos</b>  <b>Protección de la piel y del Cuerpo</b>  <b>Medidas de higiene</b>  <b>Medidas de protección</b>	Durante corte tiempo puede utilizarse equipo respiratorio con filtro combinado A-P3.  Guantes desechables de PVC. Caucho nitrilo.  Ropa ligera de protección, de PVC.  No comer o beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos y la cara antes de los descansos y después del trabajo.  Evitar contacto con piel y ojos
<b>9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS</b>	
<b>Aspecto</b> Estado físico Líquido Color De pardo claro a pardo oscuro Olor Aromático  <b>Datos de Seguridad</b> Punto de inflamación 48 °C Temperatura de autoignición Densidad Solubilidad Hidrosolubilidad Viscosidad, cinemática Tensión superficial Sensibilidad al impacto Explosividad	Líquido De pardo claro a pardo oscuro Aromático  <b>Datos de Seguridad</b> 48 °C copa cerrada 435 °C a 1.000 hPa <sub>92/69</sub> /EWG, A.15 aprox. 1,07 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C Soluble en hidrocarburos aromáticos Emulsionable 2,01 mm <sup>2</sup> /s a 40 °C 28,9 mN/m a 40 °C No sensible al impacto No explosivo
<b>10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD</b>	
Productos de descomposición peligrosos Reacciones peligrosas	Óxidos de azufre compuestos de cloro Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas
<b>11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA</b>	
Toxicidad oral aguda Toxicidad oral aguda Toxicidad dérmica aguda  Irritación de la piel Irritante (conejo)	DL50 (rata) 40 mg/kg DL50 (conejo) 34 mg/kg DL50 (rata) 266 mg/kg Se realizó el ensayo con un producto formulado de características similares. Se realizó el ensayo con un producto formulado de características Similares

Irritación de los ojos	Riesgo de lesiones oculares graves. (conejo)Se realizó el ensayo con un producto formulado de características similares.
Sensibilización	No sensibilizante (conejo de indias)OCDE Línea Directriz de Prueba 406, Prueba de Buehler. Se realizó el ensayo con un producto formulado de características similares.
<b>12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA</b>	
<b>Efectos ecotoxicológicos</b> Toxicidad para peces	CL50 (Trucha arco iris (Oncorhynchus Mykiss)) 2,1 µg/l Tiempo de exposición: 96 h Se realizó el ensayo con un producto formulado de características similares.
Toxicidad para <i>Dafnia magna</i>	CE50 ( <i>Dafnia magna</i> ) 0,004 mg/l Tiempo de exposición: 48 h Se realizó el ensayo con un producto formulado de características similares.
Toxicidad para las algas	(Scenedesmus Subspicatus) > 0,56 mg/l Tiempo de exposición: 72 h El valor indicado corresponde a la materia activa técnica endosulfan
<b>13. CONSIDERACIONES SOBRE LA ELIMINACIÓN</b>	
<b>Producto</b>	No eliminar el desecho en el alcantarillado. Debe incinerarse en una planta incineradora adecuada que esté en posesión de un permiso otorgado por las autoridades competentes.
<b>Envases contaminados</b>	Enjuagar los recipientes vacíos con agua y usar esta agua de limpieza para preparar el caldo de pulverización. Perforar el envase para evitar su reutilización. Los envases vacíos deben ser reciclados o eliminados como residuo. Envases/embalajes que no pueden ser limpiados deben ser eliminados de la misma forma que el producto contenido.
<b>14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE</b>	
<b>ADR/RID/ADNR</b> N° ONU Etiquetas Grupo embalaje	<b>2995</b> 6.1 (3) II 63

<p>N° de peligro Descripción de los productos</p> <p><b>IMDG</b> N° ONU Clase Grupo embalaje EmS Contaminante marino Descripción de los productos</p> <p><b>IATA</b> N° ONU Clase Grupo embalaje Descripción de los productos</p>	<p>UN 2995 PLAGUICIDA ÓRGANOCOLORADO LÍQUIDO TÓXICO, INFLAMABLE (Endosulfan, disolvente nafta (Petróleo) fracción aromática ligera en solución)</p> <p><b>2995</b> 6.1 II F-E , S-D Contaminante del mar PLAGUICIDA LIQUIDO, TOXICO , A BASE DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS, INFLAMABLE (Endosulfan, disolvente nafta (Petróleo) fracción aromática ligera en solución) ORGANOCHLORINE PESTICIDE, LIQUID, TOXIC, FLAMMABLE (Endosulfan, solvent naphtha (Petroleum) light aromatic solution)</p> <p><b>2995</b> 6.1 II PLAGUICIDA ORGANICO CLORADO, LIQUIDO, TOXICO, INFLAMABLE (Endosulfan, disolvente nafta (Petróleo) fracción aromática ligera en solución) ORGANOCHLORINE PESTICIDE, LIQUID, TOXIC, FLAMMABLE (Endosulfan, solvent naphtha (Petroleum) light aromatic solution)</p>
<p><b>15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA</b></p>	
<p>Clasificación y etiquetado según Directivas CE sobre preparados peligrosos 1999/45/CE, y sus Clasificación:</p> <p>Requiere etiqueta Componentes determinantes del peligro para el etiquetado:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosulfan</li> <li>• Nafta Disolvente (petróleo), fracción aromática ligera</li> </ul> <p>Símbolo(s) T Tóxico N Peligroso para el medio ambiente</p> <p>Frase(s) - R</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• R10 Inflamable.</li> <li>• R24/25 Tóxico en contacto con la piel y por ingestión.</li> </ul>	

- R38 Irrita la piel.
- R41 Riesgo de lesiones oculares graves.
- R50/53 Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- R65 Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.

Frase(s) - S

- S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
- S36/37/39 Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).
- S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente.

Etiquetado adicional

- A fin de evitar riesgos para las personas y el medio ambiente, siga las instrucciones de uso.

Etiquetado adicional

- Restringido a usos profesionales.

Información adicional

- Clasificación OMS: Ib (Altamente peligroso)

Medidas preventivas de medicina laboral

- Deben tenerse en cuenta las limitaciones vigentes para el empleo de jóvenes en determinadas tareas: 94/33/EC

## 16. OTRA INFORMACIÓN

### Información adicional

Texto de las frases R mencionadas en la Sección 2:

- R10 Inflamable.
- R21 Nocivo en contacto con la piel.
- R24/25 Tóxico en contacto con la piel y por ingestión.
- R34 Provoca quemaduras.
- R36 Irrita los ojos.
- R37 Irrita las vías respiratorias.
- R37/38 Irrita las vías respiratorias y la piel.
- R41 Riesgo de lesiones oculares graves.
- R50/53 Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- R51/53 Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- R52/53 Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- R65 Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.
- R66 La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.
- R67 La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo.

**HOJA DE SEGURIDAD MONARCA 11.25 EC**

**Sección 1: Composición/Ingredientes**

<b>Tipo de producto :</b>	Insecticida, Aceite, emulsión en agua (EC)
<b>Ingrediente activo :</b>	Thiacloprid + Beta-cyflutrina
<b>Nombre químico :</b>	(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidene cyanamide (S)-a-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1R)-cis-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate/(S) (1R)-trans- and (R) (1S)-trans- isómeros, en la relación 1:2: cyano (4-fluoro-3-phenoxyphenyl) methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (IUPAC)
<b>Concentración :</b>	9,9% p/p + 11.24% p/p
<b>Fórmula química :</b>	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> CIN <sub>4</sub> S + C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>
<b>Nº CAS :</b>	[111988-49-9] + [68359-37-5]
<b>Nº UN :</b>	2810

**Sección 2: Identificación de los riesgos**

<b>Marca en etiqueta Clasificación de riesgos del producto químico:</b>	Nocivo Moderadamente Peligroso. Categoría II.
<b>a) Peligros para la salud de las personas</b>	Puede provocar leve irritación de las mucosas.
<b>- Efectos de una sobre-exposición aguda (por una vez)</b>	El contacto prolongado puede causar sensibilización e irritación cutánea.
<b>Inhalación :</b>	El contacto prolongado puede causar irritación a los ojos. Si se ingiere puede producir náuseas, dolor abdominal, dificultad para respirar, congestión pulmonar, temblores, espasmos musculares.
<b>Contacto con la piel :</b>	
<b>Contacto con los ojos:</b>	Leve irritación de la piel y mucosas, gastritis.
<b>Ingestión :</b>	No conocidas.
<b>- Efectos de una sobre-exposición crónica (largo plazo) :</b>	Producto tóxico por ingestión. Puede provocar efecto de sensibilización al contacto con la piel
<b>- Condiciones médicas que se verán agravadas con la exposición al producto</b>	

<b>Sección 3: Medidas de primeros auxilios</b>	
<p><b>En caso de contacto accidental con el producto, proceder de acuerdo con:</b></p> <p>.</p> <p><b>Inhalación:</b></p> <p><b>Contacto con la piel :</b></p> <p><b>Contacto con los ojos :</b></p> <p><b>Ingestión :</b></p> <p><b>Nota para el médico tratante :</b></p> <p><b>Síntomas :</b></p>	<p>En caso de accidente o malestar, obtener atención médica inmediatamente (si es posible mostrar la etiqueta del producto). Mantener al afectado bajo control médico</p> <p>Trasladar al afectado al aire fresco. Si es requerido, dar respiración artificial. Mantener al paciente abrigado.</p> <p>Sacar inmediatamente la ropa contaminada y los zapatos. Lavar la zona afectada de la piel inmediatamente con abundante agua y jabón neutro.</p> <p>Lavar inmediatamente con abundante agua durante al menos 15 minutos. En caso de inflamación persistente, llamar a un oftalmólogo.</p> <p>No provocar vómitos y buscar ayuda médica.</p> <p>No tiene antídoto específico. Aplicar tratamiento sintomático. Dilución y lavado gástrico con suero salino. De ser necesario, estimular la respiración y actividad cardíaca.</p> <p>Náuseas, dolor abdominal, dificultad para respirar, congestión pulmonar, temblores, espasmos musculares.</p>
<b>Sección 4: Medidas para lucha contra el fuego</b>	
<p><b>Agentes de extinción :</b></p> <p><b>Riesgos específicos :</b></p> <p><b>Procedimientos especiales para combatir el fuego :</b></p> <p><b>Equipos de protección personal para el combate del fuego :</b></p>	<p>Chorro de agua pulverizada, espuma, dióxido de carbono, polvos secos o arena.</p> <p>No combustible. Peligro de emisión de gases tóxicos en caso de fuego.</p> <p>Contener la dispersión del medio de extinción. Evite contaminación ambiental. No respirar vapores o neblina.</p> <p>Utilizar equipo de respiración de presión positiva. Usar filtro para vapores químicos orgánicos. Llevar ropa de protección cuando se combate el fuego.</p>

<b>Sección 5: Medidas para controlar derrames o fugas</b>	
<b>Medidas de emergencia :</b> .	Señalizar la zona afectada y prohibir el acceso de personas ajenas, niños y animales en el lugar de derrame
<b>Equipo de protección personal :</b>	Utilizar equipo de protección.
<b>Precauciones para evitar daños al medio ambiente :</b>	No contaminar cursos o fuentes de agua ni la red de alcantarillado
<b>Métodos de limpieza :</b>	Recuperar el producto con material absorbente como tierra o aserrín húmedo. Barrer el material recopilado introducirlo en un recipiente, el que se almacena debidamente marcado y bien cerrado para disponerlo de acuerdo con la legislación vigente.
<b>Sección 6: Manipulación y almacenamiento</b>	
<b>Recomendaciones técnicas:</b>	Seguir las normas de seguridad apropiadas para productos fitosanitarios.
<b>Precauciones :</b>	Mantener fuera del alcance de los niños. Almacenar alejado de alimentos, bebidas.  Utilizar equipo de protección adecuado. No comer, beber ni fumar durante su manipulación o aplicación.
<b>Medidas específicas para manipulación segura :</b>	Manipulación sólo por personas adultas y adiestradas en el manejo de productos fitosanitarios.
<b>Condiciones de almacenamiento :</b>	Almacenar en su envase original bien cerrado, en lugar seguro, fresco, seco y bien ventilado. Mantener idealmente a temperaturas < 35°C.
<b>Embalajes recomendados y no adecuados :</b>	Material recomendado: material rígido con protección contra la humedad: Coex.
<b>Sección 7: Control de exposición/protección especial</b>	
<b>Medidas para reducir una eventual exposición</b>	Ninguna en especial.
<b>Parámetros de control específicos :</b>	No presenta.
<b>Equipo de protección personal</b>	
<b>Protección respiratoria :</b>	Utilizar máscara con filtro para vapores orgánicos.
<b>Protección de las manos :</b>	Utilizar guantes.
<b>Protección de la vista :</b>	Utilizar gafas protectoras.

<b>Otros equipos de protección :</b>	Utilizar ropa de protección adecuada.
<b>Medidas de higiene específicas:</b>	Lavar las zonas del cuerpo expuestas al producto, siempre después de su manipulación o aplicación. Lavarse antes de beber, comer, fumar o ir al baño.
<b>Precauciones especiales :</b>	No específicas.

#### Sección 8: Propiedades físicas y químicas

<b>Estado físico :</b>	Líquido, suspensión
<b>Apariencia, color y olor</b>	Líquido blanco a ligeramente café.
<b>pH :</b>	4.8 (1% v/v)
<b>Punto de inflamación (flash point) :</b>	No exhibe con temperaturas > 100°C.
<b>Temperatura de autoignición :</b>	435°C.
<b>Propiedades explosivas :</b>	No explosivo.
<b>Peligro de fuego o explosión :</b>	No.
<b>Presión de vapor a 20°C :</b>	No disponible.
<b>Densidad de vapor : No disponible.</b>	No disponible.
<b>Densidad :</b>	1.018 g/mL a 20°C.
<b>Solubilidad en agua y otros solventes :</b>	Miscible en agua

#### Sección 9: Estabilidad y reactividad

<b>Estabilidad :</b>	Estable bajo condiciones normales de uso.
<b>Condiciones que deben evitarse:</b>	Humedad en el almacenamiento. Temperaturas < -10°C y > 40°C. Materiales que deben evitarse Incompatibilidad : Incompatible con productos de reacción alcalina u oxidantes.
<b>Productos peligrosos de la descomposición :</b>	No existen reacciones peligrosas conocidas bajo condiciones normales de uso.
<b>Productos peligrosos de la combustión :</b>	Peligro de emisión de gases tóxicos en caso de incendio: HCl, CO, SO <sub>2</sub> y NO <sub>x</sub> .
<b>Polimerización peligrosa :</b>	No presenta.

#### Sección 10: Información toxicológica

<b>Toxicidad aguda :</b>	LD50 oral rata: > 500 < 1.000 mg/kg LD50 dermal rata: > 4.000 mg/kg
<b>Toxicidad crónica o de largo plazo :</b>	No mutagénico; no teratogénico.
<b>Efectos locales o sistémicos :</b>	No irritante para los ojos (conejo).
<b>Sensibilización alérgica :</b>	No irritante a la piel (conejo). Puede provocar sensibilización (cerdo de Guinea).

<b>Sección 11: Información ecológica</b>	
<p><b>Inestabilidad:</b></p> <p><b>Persistencia/degradabilidad :</b></p> <p><b>Bioacumulación :</b></p> <p><b>Comportamiento/impacto sobre el medio ambiente :</b></p> <p><b>Ecotoxicidad :</b></p>	<p>Estable bajo condiciones normales.</p> <p>Thiacloprid se degrada rápidamente en el suelo bajo condiciones aeróbicas. Beta-ciflutrina se metaboliza rápidamente en el suelo bajo condiciones aeróbicas, con vida media de 58 días</p> <p>Thiacloprid no se bioacumula en peces. Beta-ciflutrina se bioacumula en peces, declinando con vida media de 3.7 días en la fase de depuración.</p> <p>No presenta riesgos si se siguen las medidas de seguridad y recomendaciones de uso.</p> <p>Basado en los ingredientes activos; tóxico a peces y organismos acuáticos.</p>
<b>Sección 12: Consideraciones sobre disposición final</b>	
<p><b>Método de eliminación del producto:</b></p> <p><b>Eliminación de embalajes y envases contaminados :</b></p>	<p>Incineración en instalaciones autorizadas. Disponer de acuerdo con las leyes locales vigentes. No contaminar cursos o fuentes de agua con el producto o sus restos.</p> <p>El envase debe estar completamente vacío para su eliminación. Incinerar en instalaciones autorizadas. Disponer de acuerdo con la normativa vigente</p>

**ANEXO N° 6**

**Equipo, materiales y reactivos para los análisis de Humedad, pH,  
Temperatura y Materia Orgánica**

## 1. Determinación de Materia Orgánica <sup>(2)</sup>

Determinación de cenizas

### Materiales y equipo

#### Materiales

- Crisoles de porcelana
- Pinzas para crisol
- Bandeja metálica
- Micro espátula.

#### Equipo

- Balanza analítica
- Estufa de vacío
- Mufla

#### Procedimiento:

- Tarar crisoles a peso constante calentando a 105°C por 5 horas enfriar en desecador y pesar.
- Pesar 1.00 g de muestra (sustrato artificial) previamente secada a 105°C
- Calcinar 550°C por 5 horas en la mufla.
- Enfriar en desecador y pesar.

Cálculos:

Fórmula:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol vacío}}{W} \times 100$$

En donde :

W = Peso de la muestra en gramos

Formula de materia orgánica

$$\% \text{ de Materia Orgánica (MO)} = 100 - \% \text{ de Cenizas}$$

## 2. Determinación de Porcentaje de Humedad <sup>(22)</sup>

### Materiales y equipo

#### Materiales

- Cajas metálicas
- Pinzas para crisol
- Bandeja metálica de aluminio
- Micro espátula

#### Equipo

- Balanza analítica
- Estufa de vacío

#### Procedimiento:

- Tarar la caja de aluminio a peso constante calentando a 105°C por 1 hora enfriar y pesar.
- Pesar 5.00 g de muestra y colocar en estufa a 105°C por 24 horas
- Enfriar en desecador por 1 hora y pesar

$$\%H = \frac{(\text{peso de caja de Al + muestra húmeda}) - (\text{peso de caja de Al + muestra seca})}{(\text{peso de caja + muestra húmeda})} \times 100$$

En donde:

%H= Porcentaje de humedad.

## 3. Determinación de pH <sup>(2)</sup>

### Reactivos

Solución Buffer de pH= 4, 7y 10

Agua destilada fría libre de CO<sub>2</sub>

### Materiales y equipo

#### Materiales

- Beaker 100 mL
- Agitadores
- Probeta de 100 mL

#### Equipo

- Balanza Semianalitica
- pHmetro

-Bandeja metálica

-Micro espátula

**Procedimiento:**

- Pesar 3.0 g de muestra en beaker de 100 mL.
- Adicionar 50 mL de Agua.
- Agitar ocasionalmente.
- Dejar reposar por 30 minutos.
- Calibrar el pH - metro (utilizando el siguiente orden con los buffer (4, 7 y 10).
- Introducir el electrodo en la solución de la muestra.
- Esperar que aparezca en la pantalla la lectura directa.

**4. Determinación de temperatura** <sup>(2)</sup>

**Equipo**

-Termómetro (0-200°C)

**Procedimiento:**

- Colocar el termómetro en 5 puntos estratégicos en forma de cruz dentro del sustrato artificial (En la extremos y centro),
- Dejar reposar por 5 minutos y tomar la lectura.

## **ANEXO N° 7**

**Esquemas de Procedimientos de análisis fisicoquímico de Materia Orgánica, Humedad, pH y procedimiento para calcular el porcentaje de retención de agua**

## 1. Procedimiento de porcentaje de humedad

Tarar a 105°C una caja de aluminio por 2 horas (identificarla)



Enfriar en desecador por 30 min



Pesar la caja de aluminio



Colocar la caja en estufa al vacío previamente calentada a 105°C por 24 hora y ajustar la presión



Homogenizar muestra y pesar 5.0 g en caja de aluminio previamente tarada



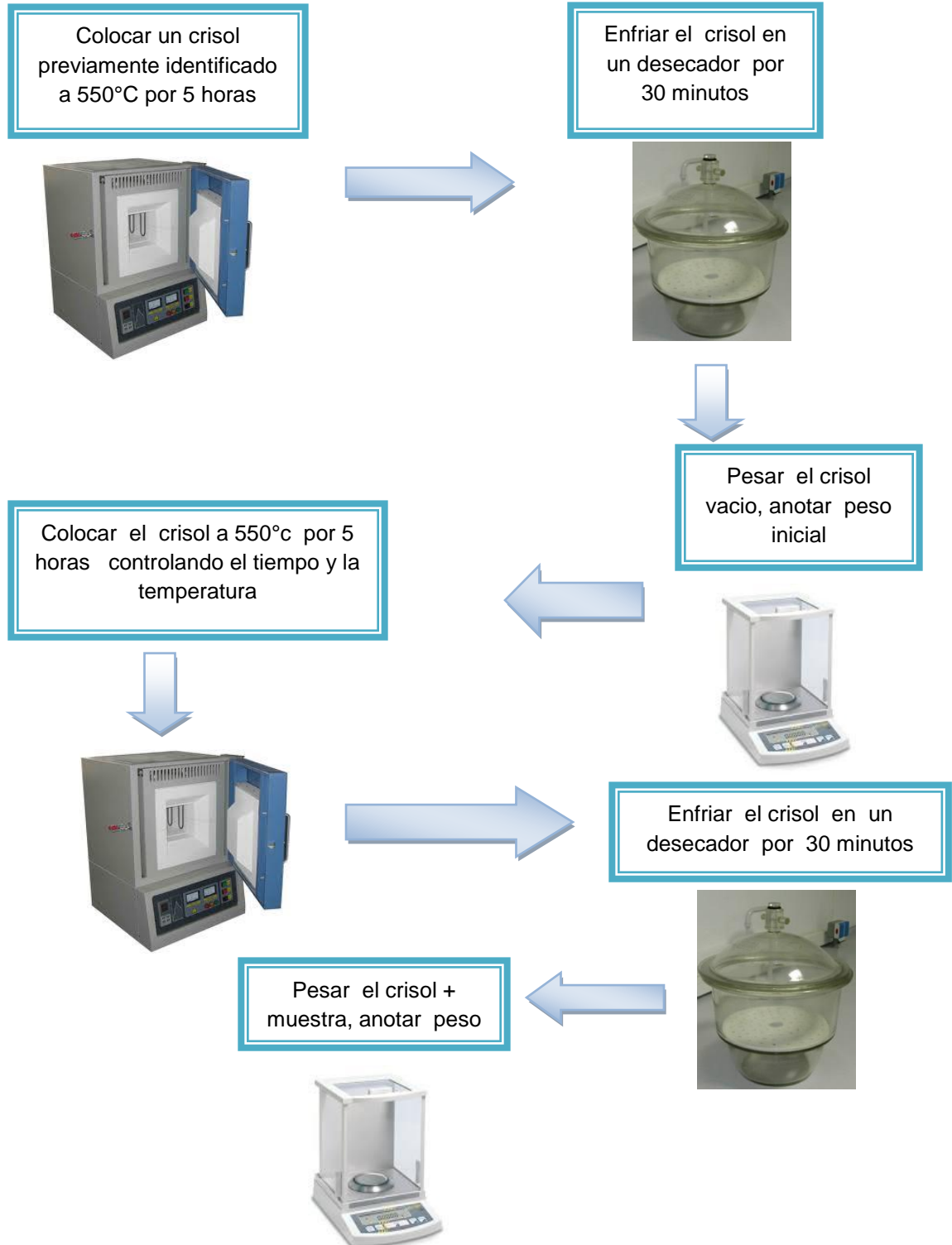
Enfriar por 1 hora



Pesar la caja más la muestra seca. Anotar el peso



## 2. Procedimiento de Materia Orgánica (Cenizas)



### 3. Procedimiento de determinación de pH

Pesar 3 g de sustrato en un beaker de 100 mL



Disolver en 50 mL de agua destilada



#### 4. Procedimiento para determinar el porcentaje de humedad



Pesar 100.0 g de sustrato artificial seco



Armar el equipo y colocar el sustrato en el tubo para la prueba



Agregar agua con una probeta hasta que comience el primer goteo



Medir el volumen gastado cuando el sustrato forma la primera gota de agua excedente



## **ANEXO N° 8**

**Cuadros de los resultados individuales y cuadros de los resultados  
Promedios de Humedad, pH y Temperatura para Endosulfan (Thiodan 35  
EC) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca 11.25 EC)**

**CUADRO DE DATOS INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE HUMEDAD, pH y TEMPERATURA PARA EL CONTROL Y LOS PLAGUICIDAS DE PRUEBA**

**Cuadro N° 5:** Resultados de los porcentajes individuales de Humedad, Materia Orgánica, pH y temperatura para los controles Orgánica, pH y Temperatura de los frascos control.

Réplicas	INICIAL				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
Control1	60	0.35	24	6.2	52	0.92	24	6.69
	60	0.35	24	6.2	56	0.93		7.12
	60	0.35	24	6.2	54	0.89		6.88
control2	60	0.35	24	6.2	54	0.92	25	7.14
	60	0.35	24	6.2	57	0.92		7.21
	60	0.35	24	6.2	54	0.96		7.13
control3	60	0.35	24	6.2	55	0.91	24	6.97
	60	0.35	24	6.2	56	0.97		6.79
	60	0.35	24	6.2	57	0.96		7.08
control4	60	0.35	24	6.2	52	0.96	24	6.81
	60	0.35	24	6.2	55	0.97		6.96
	60	0.35	24	6.2	52	0.95		6.76
control5	60	0.35	24	6.2	56	0.94	24	6.81
	60	0.35	24	6.2	53	1.26		6.87
	60	0.35	24	6.2	53	0.98		6.89

**Cuadro N° 6:** Resultados de los porcentajes individuales de los parámetros fisicoquímicos ¼ de la concertación recomendada del plaguicida Thiodan 35 EC de la primera semana y cuarta semana.

Réplicas	INICIAL				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1/4THIR1	60	0.35	24	6.2	54	0.73	24.3	6.89
	60	0.35	24	6.2	56	0.65		6.93
	60	0.35	24	6.2	55	0.66		6.91
C1/4THIR2	60	0.35	24	6.2	55	0.69	25.2	6.98
	60	0.35	24	6.2	54	0.68		7.02
	60	0.35	24	6.2	56	0.73		7.1
C1/4THIR3	60	0.35	24	6.2	55	0.72	24.3	6.85
	60	0.35	24	6.2	52	0.69		6.76
	60	0.35	24	6.2	53	0.66		6.89
C1/4THIR4	60	0.35	24	6.2	55	0.71	24.5	7.15
	60	0.35	24	6.2	56	0.67		7.08
	60	0.35	24	6.2	54	0.67		7.09
C1/4THIR5	60	0.35	24	6.2	52	0.66	24.2	7.32
	60	0.35	24	6.2	53	0.69		7.35
	60	0.35	24	6.2	55	0.68		7.23

**Cuadro N° 7:** Resultados de los porcentajes individuales de los parámetros fisicoquímicos de la primera semana del plaguicida Endosulfan (Thiodan 35 EC)

Réplicas	INICIAL				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1THIR1	60	0.35	24	6.2	55	0.4	24.5	5.7
	60	0.35	24	6.2	58	0.42		5.73
	60	0.35	24	6.2	56	0.38		5.68
C1THIR2	60	0.35	24	6.2	55	0.44	24.3	5.62
	60	0.35	24	6.2	56	0.42		5.60
	60	0.35	24	6.2	54	0.39		5.61
C1THIR3	60	0.35	24	6.2	52	0.44	24.3	5.71
	60	0.35	24	6.2	53	0.42		5.72
	60	0.35	24	6.2	54	0.41		5.69
C1THIR4	60	0.35	24	6.2	54	0.39	25.6	5.52
	60	0.35	24	6.2	57	0.42		5.51
	60	0.35	24	6.2	56	0.40		5.50
C1THIR5	60	0.35	24	6.2	54	0.42	23.5	6.71
	60	0.35	24	6.2	55	0.42		6.89
	60	0.35	24	6.2	53	0.41		6.69
C2THIR1	60	0.35	24	6.2	55	0.42	24.2	5.23
	60	0.35	24	6.2	54	0.41		5.20
	60	0.35	24	6.2	56	0.43		5.21
C2THIR2	60	0.35	24	6.2	55	0.41	23.4	5.27
	60	0.35	24	6.2	56	0.41		5.26
	60	0.35	24	6.2	57	0.44		5.25
C2THIR3	60	0.35	24	6.2	52	0.41	25.5	5.25
	60	0.35	24	6.2	54	0.42		5.23
	60	0.35	24	6.2	52	0.43		5.26
C2THIR4	60	0.35	24	6.2	54	0.41	25.4	5.25
	60	0.35	24	6.2	55	0.38		5.22
	60	0.35	24	6.2	54	0.43		5.23
C2THIR5	60	0.35	24	6.2	56	0.42	24.6	5.31
	60	0.35	24	6.2	57	0.39		5.33
	60	0.35	24	6.2	58	0.44		5.30
C3THIR1	60	0.35	24	6.2	51	0.41	24.8	5.13
	60	0.35	24	6.2	52	0.40		5.15
	60	0.35	24	6.2	53	0.42		5.10
C3THIR2	60	0.35	24	6.2	55	0.41	25.6	5.16
	60	0.35	24	6.2	52	0.40		5.23
	60	0.35	24	6.2	56	0.40		5.25
C3THIR3	60	0.35	24	6.2	55	0.41	24.4	5.26
	60	0.35	24	6.2	56	0.41		5.21
	60	0.35	24	6.2	57	0.42		5.25
C3THIR4	60	0.35	24	6.2	53	0.39	25.2	5.03
	60	0.35	24	6.2	54	0.41		5.1
	60	0.35	24	6.2	56	0.40		5.06
C3THIR5	60	0.35	24	6.2	55	0.41	23.6	5.02
	60	0.35	24	6.2	56	0.39		5.13
	60	0.35	24	6.2	56	0.43		5.08

**Cuadro N° 8:** Resultados de los porcentajes individuales de los parámetros fisicoquímicos para 1/3 de la concentración recomendada de réplicas para el plaguicida Monarca 11.25 EC de la primera semana y cuarta semana

Replicas	INICIAL				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1/3MONR1	60	0.35	24	6.2	52	0.78	24	7.09
	60	0.35	24	6.2	55	0.77		7.13
	60	0.35	24	6.2	53	0.75		7.11
C1/3MONR2	60	0.35	24	6.2	55	0.73	24.1	7.07
	60	0.35	24	6.2	56	0.76		7.04
	60	0.35	24	6.2	54	0.81		7.06
C1/3MONR3	60	0.35	24	6.2	52	0.77	24.4	7.08
	60	0.35	24	6.2	53	0.76		7.11
	60	0.35	24	6.2	55	0.72		7.09
C1/3MONR4	60	0.35	24	6.2	55	0.76	25.2	1.14
	60	0.35	24	6.2	54	0.76		7.10
	60	0.35	24	6.2	56	0.74		7.15
C1/3MONR5	60	0.35	24	6.2	53	0.73	24.3	7.06
	60	0.35	24	6.2	52	0.77		7.09
	60	0.35	24	6.2	55	0.75		7.11

**Cuadro N° 9:** Resultados de los porcentajes individuales de los parámetros fisicoquímicos de la primera semana del plaguicida Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca 11.25 EC)

Réplicas	INICIAL				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1MONR1	60	0.35	24	6.2	55	0.38	24.9	5.98
	60	0.35	24	6.2	54	0.41		5.93
	60	0.35	24	6.2	52	0.39		5.95
C1MONR2	60	0.35	24	6.2	53	0.39	24.5	6.2
	60	0.35	24	6.2	55	0.42		6.31
	60	0.35	24	6.2	54	0.41		6.20
C1MONR3	60	0.35	24	6.2	55	0.37	24.3	5.93
	60	0.35	24	6.2	53	0.39		6.10
	60	0.35	24	6.2	51	0.41		5.93
C1MONR4	60	0.35	24	6.2	55	0.40	25.5	5.94
	60	0.35	24	6.2	56	0.39		5.96
	60	0.35	24	6.2	54	0.37		5.91
C1MONR5	60	0.35	24	6.2	57	0.38	24.3	5.41
	60	0.35	24	6.2	54	0.39		5.61
	60	0.35	24	6.2	57	0.43		5.45
C2MONR1	60	0.35	24	6.2	54	0.39	24.5	5.43
	60	0.35	24	6.2	54	0.44		5.65
	60	0.35	24	6.2	53	0.40		5.46
C2MONR2	60	0.35	24	6.2	55	0.38	24.6	5.31
	60	0.35	24	6.2	55	0.39		5.52
	60	0.35	24	6.2	56	0.42		5.56
C2MONR3	60	0.35	24	6.2	53	0.39	24.8	5.36
	60	0.35	24	6.2	51	0.42		5.52
	60	0.35	24	6.2	55	0.42		5.59
C2MONR4	60	0.35	24	6.2	55	0.40	25.5	5.29
	60	0.35	24	6.2	52	0.42		5.59
	60	0.35	24	6.2	56	0.43		5.68
C2MONR5	60	0.35	24	6.2	58	0.38	25.3	5.35
	60	0.35	24	6.2	57	0.40		5.52
	60	0.35	24	6.2	58	0.42		5.59
C3MONR1	60	0.35	24	6.2	54	0.37	24.7	5.29
	60	0.35	24	6.2	57	0.39		5.13
	60	0.35	24	6.2	56	0.42		5.22
C3MONR2	60	0.35	24	6.2	58	0.45	24.3	2.3
	60	0.35	24	6.2	57	0.43		5.21
	60	0.35	24	6.2	56	0.41		5.26
C3MONR3	60	0.35	24	6.2	54	0.43	24.8	5.19
	60	0.35	24	6.2	53	0.42		5.23
	60	0.35	24	6.2	55	0.41		5.31
C3MONR4	60	0.35	24	6.2	57	0.40	25.1	5.08
	60	0.35	24	6.2	57	0.40		5.11
	60	0.35	24	6.2	58	0.43		5.21
C3MONR5	60	0.35	24	6.2	53	0.44	24.5	5.12
	60	0.35	24	6.2	53	0.43		5.12
	60	0.35	24	6.2	54	0.40		5.11

**CUADRO DE DATOS PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE HUMEDAD, MATERIA ORGANICA, pH y TEMPERATURA PARA LOS PLAGUICIDAS DE PRUEBA**

**Cuadro N° 10:** Resultados de los porcentajes promedios de Humedad, Materia Orgánica y Temperatura de los frascos control.

Réplica	INICIO				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
<b>Control1</b>	60	0.35	24.5	6.2	54	0.91	24	6.89
<b>Control2</b>	60	0.35	25.0	6.2	55	0.93	25	7.16
<b>Control3</b>	60	0.35	24.0	6.2	56	0.94	24	6.94
<b>Control4</b>	60	0.35	24.0	6.2	53	0.96	24	6.84
<b>Control5</b>	60	0.35	25.0	6.2	54	1.07	24	6.86
<b><math>\bar{X}</math></b>	60	0.35	24.6	6.2	54.4	0.96	24.2	6.93

**Cuadro N° 11:** Resultados de los porcentajes promedios de los parámetros fisicoquímicos  $\frac{1}{4}$  de la concentración recomendada para el plaguicida Thiodan 35 EC de la semana uno a la cuatro

Réplica	INICIO				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
<b>C<sub>1/4</sub> THIR1</b>	60	0.35	25	6.2	55	0.68	24.3	6.91
<b>C<sub>1/4</sub> THIR2</b>	60	0.35	24.5	6.2	55	0.70	25.2	7.03
<b>C<sub>1/4</sub> THIR3</b>	60	0.35	25	6.2	53	0.71	24.6	6.8
<b>C<sub>1/4</sub> THIR4</b>	60	0.35	25	6.2	55	0.68	24.5	7.12
<b>C<sub>1/4</sub> THIR5</b>	60	0.35	24.5	6.2	53	0.67	24.2	6.73
<b><math>\bar{X}</math></b>	60	0.35	24.8	6.2	53.8	0.68	24.5	6.91

**Cuadro N° 12:** Resultados de los porcentajes promedios de Humedad, Materia Orgánica y Temperatura para la concentración recomendada, doble y triple de las réplicas del Thiodan 35 EC de la primera semana

Réplica	INICIO				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1THIR1	60	0.35	25.5	6.2	55.95	0.409	24.5	5.71
C1THIR2	60	0.35	24.2	6.2	55.45	0.41	24.3	5.61
C1THIR3	60	0.35	23.5	6.2	53.60	0.421	24.3	5.7
C1THIR4	60	0.35	25.4	6.2	55.53	0.407	25.6	5.51
C1THIR5	60	0.35	24.5	6.2	53.85	0.412	23.5	5.69
$\bar{X}$	60	0.35	24.6	6.2	54.82	0.411	24.44	5.64
C2THIR1	60	0.35	23.3	6.2	55.34	0.421	24.2	5.21
C2THIR2	60	0.35	24.5	6.2	56.49	0.415	23.4	5.26
C2THIR3	60	0.35	25.3	6.2	53.39	0.423	25.5	5.24
C2THIR4	60	0.35	24.4	6.2	54.23	0.419	25.4	5.21
C2THIR5	60	0.35	25.5	6.2	57.59	0.423	24.6	5.31
$\bar{X}$	60	0.35	24.6	6.2	55.40	0.420	24.6	5.24
C3THIR1	60	0.35	25.5	6.2	52.04	0.412	23.8	5.12
C3THIR2	60	0.35	24.3	6.2	54.34	0.405	25.6	5.21
C3THIR3	60	0.35	24.9	6.2	56.32	0.419	24.4	5.25
C3THIR4	60	0.35	24.5	6.2	54.56	0.408	25.2	5.06
C3THIR5	60	0.35	24.5	6.2	55.59	0.411	23.6	5.07
$\bar{X}$	60	0.35	27.7	6.2	54.57	4.11	24.52	5.14

**Cuadro N° 13:** Resultados de los porcentajes promedios de los parámetros físicoquímicos para un 1/3 de la concentración recomendada del plaguicida Monarca 11.25 EC de la semana uno a la cuatro

Réplica	INICIO				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C <sub>1/3</sub> MONR1	60	0.35	25.3	6.2	53	0.76	24.0	7.11
C <sub>1/3</sub> MONR1	60	0.35	24.9	6.2	54	0.75	24.1	7.05
C <sub>1/3</sub> MONR1	60	0.35	25.4	6.2	53	0.77	24.4	7.09
C <sub>1/3</sub> MONR1	60	0.35	25.3	6.2	55	0.74	25.2	7.12
C <sub>1/3</sub> MONR1	60	0.35	24.5	6.2	53	0.75	24.3	7.08
$\bar{X}$	60	0.35	25.28	6.2	53.6	0.75	24.4	7.09

**Cuadro N° 14:** Resultados de los porcentajes promedios de los parámetros fisicoquímicos para la concentración recomendada, doble y triple de las réplicas del plaguicida Monarca 11.25 EC de la primera semana

Réplica	INICIO				FINAL			
	%H	%MO	T°C	pH	%H	%MO	T°C	pH
C1MONR1	60	0.35	25.1	6.2	53.53	0.40	24.4	5.96
C1MONR2	60	0.35	24.3	6.2	54.36	0.41	24.5	6.23
C1MONR3	60	0.35	25.4	6.2	53.39	0.39	24.3	5.98
C1MONR4	60	0.35	24.8	6.2	55.56	0.38	25.5	5.97
C1MONR5	60	0.35	24.5	6.2	56.73	0.40	24.5	6.51
$\bar{X}$	60	0.35	24.8	6.2	54.7	0.39	24.6	6.13
C2MONR1	60	0.35	24.4	6.2	53.54	0.41	24.5	5.51
C2MONR2	60	0.35	25.3	6.2	55.49	0.40	24.6	5.48
C2MONR3	60	0.35	24.5	6.2	53.35	0.41	24.8	5.49
C2MONR4	60	0.35	24.7	6.2	54.43	0.42	25.5	5.52
C2MONR5	60	0.35	24.8	6.2	57.94	0.40	25.3	5.49
$\bar{X}$	60	0.35	24.7	6.2	54.95	0.408	24.9	5.49
C3MONR1	60	0.35	25.2	6.2	55.5	0.41	24.7	5.21
C3MONR2	60	0.35	24.5	6.2	57.23	0.43	24.3	5.23
C3MONR3	60	0.35	25.6	6.2	54.87	0.42	24.8	5.24
C3MONR4	60	0.35	25.7	6.2	57.76	0.41	25.1	5.14
C3MONR5	60	0.35	24.4	6.2	53.69	0.42	24.5	5.16
$\bar{X}$	60	0.35	25.4	6.2	55.81	0.41	24.7	5.19

**Cuadro N° 15:** Peso inicial y final de las 10 lombrices de prueba del control.

Réplica	Peso inicial (g)	Peso final (g)
CONTROL1	2.522	3.931
CONTROL2	2.621	4.059
CONTROL3	2.752	4.210
CONTROL4	2.826	4.163
CONTROL5	2.651	4.235

**Cuadro N° 16:** Peso inicial y final de las 10 lombrices de prueba para el plaguicida Thiodan 35 EC

<b>Preplica</b>	<b>Peso inicial (g) de 10 lombrices vivas</b>	<b>Peso final (g) lombrices vivas</b>
C1/4 THIR1	2.758	3.358
C1/4 THIR2	2.862	3.462
C1/4 THIR3	2.935	3.685
C1/4 THIR4	2.687	3.137
C1/4 THIR4	2.965	3.565
C1THIR1	2.514	0.0
C1THIR2	2.465	0.0
C1THIR3	2.504	0.0
C1THIR4	2.716	0.0
C1THIR5	2.326	0.0
C2THIR1	2.841	0.0
C2THIR2	2.253	0.0
C2THIR3	2.373	0.0
C2THIR4	2.543	0.0
C2THIR5	2.497	0.0
C3THIR1	2.292	0.0
C3THIR1	2.698	0.0
C3THIR1	2.487	0.0
C3THIR1	2.450	0.0
C3THIR1	2.495	0.0

**Cuadro N° 17:** Peso inicial y final de las 10 lombrices de prueba para el plaguicida Monarca 11.25 EC

<b>Réplica</b>	<b>Peso inicial (g) de 10 lombrices vivas</b>	<b>Peso final (g) de lombrices vivas</b>
<b>C1/3MONR1</b>	2.651	3.251
<b>C1/3MONR2</b>	2.374	2.824
<b>C1/3MONR3</b>	2.689	3.439
<b>C1/3MONR4</b>	2.584	3.334
<b>C1/3MONR5</b>	2.638	3.238
<b>C1MONR1</b>	2.553	0.0
<b>C1MONR2</b>	2.454	0.0
<b>C1MONR3</b>	2.608	0.0
<b>C1MONR4</b>	2.465	0.0
<b>C1MONR5</b>	2.564	0.0
<b>C2MONR1</b>	2.887	0.0
<b>C2MONR2</b>	2.391	0.0
<b>C2MONR3</b>	2.309	0.0
<b>C2MONR4</b>	2.571	0.0
<b>C2MONR5</b>	2.502	0.0
<b>C3MONR1</b>	2.698	0.0
<b>C3MONR2</b>	2.665	0.0
<b>C3MONR3</b>	2.524	0.0
<b>C3MONR1</b>	2.658	0.0
<b>C3MONR1</b>	2.751	0.0

## ANEXO N° 9

**Tabla N° 8:** Tratamiento estadístico de números de mortalidad a valores probit.

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3,72	10	4,16	20	4,48	30	4,75	40	5,00	50	5,25	60	5,52	70	5,84	80	6,28	90	7,33	99,0
2,67	1	3,77	11	4,19	21	4,50	31	4,77	41	5,03	51	5,28	61	5,55	71	5,88	81	6,34	91	7,37	99,1
2,95	2	3,82	12	4,23	22	4,53	32	4,80	42	5,05	52	5,31	62	5,58	72	5,92	82	6,41	92	7,41	99,2
3,12	3	3,87	13	4,26	23	4,56	33	4,82	43	5,08	53	5,33	63	5,61	73	5,95	83	6,48	93	7,46	99,3
3,25	4	3,92	14	4,29	24	4,59	34	4,85	44	5,10	54	5,36	64	5,64	74	5,99	84	6,55	94	7,51	99,4
3,36	5	3,96	15	4,33	25	4,61	35	4,87	45	5,13	55	5,39	65	5,67	75	6,04	85	6,64	95	7,58	99,5
3,45	6	4,01	16	4,36	26	4,64	36	4,90	46	5,15	56	5,41	66	5,71	76	6,08	86	6,75	96	7,65	99,6
3,52	7	4,05	17	4,39	27	4,67	37	4,92	47	5,18	57	5,44	67	5,74	77	6,13	87	6,88	97	7,75	99,7
3,59	8	4,08	18	4,42	28	4,69	38	4,95	48	5,20	58	5,47	68	5,77	78	6,18	88	7,05	98	7,88	99,8
3,66	9	4,12	19	4,45	29	4,72	39	4,97	49	5,23	59	5,50	69	5,81	79	6,23	89	7,33	99	8,09	99,9

## **Anexo N° 10**

**Cálculos de Concentración Letal 50 (CL50) para plaguicidas  
Endosulfan (Thiodan 35 EC) y Thiacloprid + Beta-cyflutrina (Monarca  
11.25 EC)**

## 1. Cálculo de la Concentración Letal 50 para el plaguicida Thiodan 35 EC

**Paso 1:** tratamiento estadístico de las dosis a logaritmo y del porcentaje de mortalidad a valores probit según tablas de transformación

**Tabla N° 9:** Datos transformados de concentración y porcentaje de mortalidad.

Replicas	Concentración (mg/L)	log concentración	% Mortalidad	Valor probit
C1/4THIR	114.375	2.05	46	4.85
C1THIR	457.91	2.66	100	8.09
C2THIR	915.83	2.9618	100	8.09
C3THIR	1373.73	3.137	100	8.09

**Paso 2:** se hace una regresión lineal ( $Y = a + bx$ ) entre el logaritmo de la Dosis (X) y los valores probit (Y) donde (a) es el valor de la variable dependiente y (b) es la pendiente.

**Paso 3:** se estima como calculado el valor para un 50% de mortalidad en unidades probit 50% corresponde a 5.

$$y = a + bx$$

$$5 = 3.091 - 1.073X$$

$$X = \frac{5 + 1.073}{3.091}$$

$$X = 1.96$$

**Paso 4:** se aplica antilogaritmo

$$X = 1.96 / \text{antilog}$$

$$X = 92.18$$

**Paso 5:** en consecuencia

$$CL_{50} = 92.18 \text{ mg/L (en } 622 \text{ cm}^3 \text{ de sustrato)}$$

## 2.Cálculo de la Concentración Letal 50 de plaguicida Monarca 11.25 EC

**Paso 1:** tratamiento estadístico de las dosis a logaritmo y del porcentaje de mortalidad a valores probit según tablas de transformación

**Tabla N° 10:**Datos transformados de concentración y porcentaje de mortalidad.

Réplicas	Concentración (mg/L)	log concentración	% Mortalidad	Valor probit
C1/3MONR	49.16	1.691	5.4	4.9
C1MONR	147.5	2.168	100	8.09
C2MONR	245	2.389	100	8.09
C3MONR	442.5	2.645	100	8.09

**Paso 2:** se hace una regresión lineal ( $Y = a + bx$ ) entre el logaritmo de la Dosis (X) y los valores probit (Y) donde (a) es el valor de la variable dependiente y (b) es la pendiente

**Paso 3:** se estima como calculado el valor para un 50% de mortalidad en unidades probit 50% corresponde a 5.

$$y = a + bx$$

$$5 = 3.453 - 0.384X$$

$$X = \frac{5 + 0.384}{3.453}$$

$$X = 1.55$$

**Paso 4:** se aplica antilogaritmo

$$X = 1.55/\text{antilog}$$

$$X = 36.25 \text{ mg/L}$$

**Paso 5:** en consecuencia CL<sub>50</sub> = 36.25 mg/L (en 622 cm<sup>3</sup> de sustrato)

**Anexo N° 11**

**Fotos de adaptación y desarrollo de la prueba de toxicidad de la  
OECD**



**Figura N° 24:** Frasco plástico transparente en el cual se realizó la prueba



**Figura N° 25:** Recolección de arena en la playa Punta Roca La Libertad



**Figura N° 26:** Recolección de tierra utilizada para el sustrato artificial en el Cantón Agua Caliente del Departamento de La Libertad.

## **ANEXO N°12**

**Prueba de toxicidad de la Organización para la Cooperación y  
Desarrollo Económico (OCDE)**

## OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

### Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei* )

#### INTRODUCTION

1. This Test Guideline is designed to be used for assessing the effects of chemicals in soil on the reproductive output (and other sub-lethal end points) of the earthworm species *Eisenia fetida* (Savigny 1826) or *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). The test has been ring-tested (3). A guideline for the earthworm acute toxicity test has been published by OECD (4). A number of other international and national guidelines for earthworm acute and chronic tests have been published (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* are considered to be a one of representatives of soil fauna and earthworms in particular. Background information on the ecology of earthworms and their use in ecotoxicological testing is available (7)(9)(10)(11)(12).

#### PRINCIPLE OF THE TEST

3. Adult worms are exposed to a range of concentrations of the test substance either mixed into the soil or, in case of pesticides, applied into or onto the soil using procedures consistent with the use pattern of the substance. The method of application is specific to the purpose of the test. The range of test concentrations is selected to encompass those likely to cause both sub-lethal and lethal effects over a

period of eight weeks. Mortality and growth effects on the adult worms are determined after 4 weeks of exposure. The adults are then removed from the soil and effects on reproduction assessed after a further 4 weeks by counting the number of offspring present in the soil. The reproductive output of the worms exposed to the test substance is compared to that of the control(s) in order to determine the (i) no observed effect concentration (NOEC) and/or (ii)  $EC_x$  (e.g.  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) by using a regression model to estimate the concentration that would cause a x % reduction in reproductive output. The test concentrations should bracket the  $EC_x$  (e.g.  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ) so that the  $EC_x$  then comes from interpolation rather than extrapolation (see Annex 1 for definitions).

#### INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE

4. The following information relating to the test substance should be available to assist in the design of appropriate test procedures:

- water solubility;
- $\log K_{ow}$ ;
- vapour pressure;
- and information on fate and behaviour in the environment, where possible (e.g. rate of photolysis and rate of hydrolysis where relevant to application patterns).

5. This Guideline is applicable to all substances irrespective of their water solubility. The method is not applicable to volatile substances, defined here as substances for which Henry's constant or the

air/water partition coefficient is greater than one, or to substances with vapour pressures exceeding 0.0133 Pa at 25 °C.

6. No allowance is made in this Guideline for possible degradation of the test substance over the period of the test. Consequently it cannot be assumed that exposure concentrations will be maintained at initial values throughout the test. Chemical analysis of the test substance at the start and the end of the test is recommended in that case.

#### REFERENCE SUBSTANCE

7. The NOEC and/or the EC<sub>x</sub> of a reference substance must be determined to provide assurance that the laboratory test conditions are adequate and to verify that the response of the test organisms does not change statistically over time. It is advisable to test a reference substance at least once a year or, when testing is carried out at a lower frequency, in parallel to the determination of the toxicity of a test substance. Carbendazim or benomyl are suitable reference substances that have been shown to affect reproduction (3). Significant effects should be observed between (a) 1 and 5 mg active ingredient (a.i.)/kg dry mass or (b) 250-500 g/ha or 25-50 mg/m<sup>2</sup>. If a positive toxic standard is included in the test series, one concentration is used and the number of replicates should be the same as that in the controls

#### VALIDITY OF THE TEST

8. The following criteria should be satisfied in the controls for a test result to be considered valid:
- each replicate (containing 10 adults) to have produced  $\geq 30$  juveniles by the end of the test;
  - the coefficient of variation of reproduction to be  $\leq 30$  %;
  - adult mortality over the initial 4 weeks of the test to be  $\leq 10$  %.

Where a test fails to meet the above validity criteria the test should be terminated unless a justification for proceeding with the test can be provided. The justification should be included in the report.

#### DESCRIPTION OF THE TEST

##### Equipment

9. Test containers made of glass or other chemically inert material of about one to two litres capacity should be used. The containers should have a cross-sectional area of approximately 200 cm<sup>2</sup> so that a moist substrate depth of about 5-6 cm is achieved when 500 to 600 g dry mass of substrate is added. The design of the container cover should permit gaseous exchange between the substrate and the atmosphere and access to light (e.g. by means of a perforated transparent cover) whilst preventing the worms from escaping. If the amount of test substrate used is substantially more than 500 to 600 g per test container the number of worms should be increased proportionately.

10. Normal laboratory equipment is required, specifically the following:
- drying cabinet;
  - stereomicroscope;
  - pH-meter and photometer;
  - suitable accurate balances;

- adequate equipment for temperature control;
- adequate equipment for humidity control (not essential if exposure vessels have lids);
- incubator or small room with air-conditioner;
- tweezers, hooks or loops;
- water bath.

#### Preparation of the artificial soil

11. An artificial soil is used in this test (5)(7) with the following composition (based on dry weights, dried to a constant weight at 105 C):

- 10 per cent sphagnum peat (as close to pH 5.5 to 6.0 as possible, no visible plant remains, finely ground, dried to measured moisture content);
- 20 per cent kaolin clay (kaolinite content preferably above 30 per cent);
- 0.3 to 1.0% calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ , pulverized, analysis grade) to obtain an initial pH of  $6.0 \pm 0.5$ .
- 70% air-dried quartz sand (depending on the amount of  $\text{CaCO}_3$  needed), predominantly fine sand with more than 50% of the particles between 50 and 200 microns.

Note 1: The amount of  $\text{CaCO}_3$  required will depend on the components of the soil substrate including food, and should be determined by measurements of soil sub-samples immediately before the test. pH is measured in a mixed sample in a 1 M solution of potassium chloride (KCl) or a 0.01 M solution of calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) (13).

Note 2: The organic carbon content of the artificial soil may be reduced, for example by lowering the peat content to 4-5% and increasing the sand content accordingly. By such a reduction in organic carbon content, the possibilities of adsorption of test chemical to the soil (organic carbon) may be decreased and the availability of the test chemical to the worms may increase. It has been demonstrated that *Eisenia fetida* can comply with the validity criteria on reproduction when tested in field soils with lower organic carbon content (e.g. 2.7%) (14), and there is experience that this can also be achieved in artificial soil with 5% peat. Therefore, it is not necessary before using such a soil in a definitive test to demonstrate the suitability of the artificial soil for allowing the test to comply with the validity criteria unless the peat content is lowered more than specified above.

Note 3: When using natural soil in additional (e.g. higher Tier) testing the suitability of the soil and achieving the test validity criteria should also be demonstrated.

12. The dry constituents of the soil are mixed thoroughly (e.g. in a large-scale laboratory mixer) in a well ventilated area. Before starting the test, the dry artificial soil is moistened by adding enough de-ionised water to obtain approximately half of the final water content, that being 40% to 60% of the maximum water holding capacity (corresponding to  $50 \pm 10\%$  moisture dry mass). This will produce a substrate that has no standing or free water when it is compressed in the hand. The maximum water holding capacity (WHC) of the artificial soil is determined in accordance with procedures described in Annex 2 or ISO 11274 (15).

13. If the test substance is applied on the soil surface or mixed into soil without water, the final amount of water can be mixed into the artificial soil during preparation of the soil. If the test substance is mixed into the soil together with some water, the additional water can be added together with the test substance (see paragraph 19).

14. Soil moisture content is determined at the beginning and at the end of the test in accordance with ISO 11465 (16) and soil pH in accordance with Annex 3 or ISO 10390 (13). These determinations should be carried out in a sample of control soil and a sample of each test concentration soil. The soil pH should not be adjusted when acidic or basic substances are tested. The moisture content should be monitored throughout the test by weighing the containers periodically (see paragraph 26 and 30).

#### Selection and preparation of test animals

15. The species used in the test is *Eisenia fetida* or *Eisenia andrei* (1)(2). Adult worms between two months and one year old and with a clitellum are required to start the test. The worms should be selected from a synchronised culture with a relatively homogeneous age structure (Annex 4). Individuals in a test group should not differ in age by more than 4 weeks.

16. The selected worms should be acclimatised for at least one day with the type of artificial soil substrate to be used for the test. During this period the worms should be fed on the same food to be used in the test (see paragraphs 31 to 33).

17. Groups of 10 worms should be weighed individually randomly assigning the groups to the test containers at the start of the test. The worms are washed prior to weighing (with deionised water) and the excess water removed by placing the worms briefly on filter paper. The wet mass of individual worms should be between 250 and 600 mg.

#### Preparation of test concentrations

18. Two methods of application of the test substance can be used: mixing the test substance into the soil (see paragraphs 19-21) or application to the soil surface (see paragraphs 22-24). The selection of the appropriate method depends on the purpose of the test. In general, mixing of the test substance into the soil is recommended. However application procedures that are consistent with normal agricultural practice may be required (e.g. spraying of liquid formulation or use of special pesticide formulations such as granules or seed dressings). Solvents used to aid treatment of the soil with the test substance should be selected on the basis of their low toxicity to earthworm and appropriate solvent control must be included in the test design (see paragraph 27).

#### Mixing the test substance into the soil

##### **Test substance soluble in water**

19. A solution of the test substance in de-ionised water is prepared immediately before starting the test in a quantity sufficient for all replicates of one concentration. A co-solvent may be required to facilitate for the preparation of the test solution. It is convenient to prepare an amount of solution necessary to reach the final moisture content (40 to 60% of maximum water holding capacity). The solution is mixed thoroughly with the soil substrate before introducing it into a test container.

##### **Test substance insoluble in water**

20. The test substance is dissolved in a small volume of a suitable organic solvent (e.g. acetone) and then sprayed onto, or mixed into, a small quantity of fine quartz sand. The solvent is then removed by evaporation in a fume hood for at least a few minutes. The treated sand is then mixed thoroughly with the pre-moistened artificial soil. De-ionised water is then added (an amount required) to achieve a final moisture content of 40 to 60 % of the maximum water holding capacity is then added and mixed in. The

soil is then ready for placing in test containers vessels. Care should be taken that some solvents may be toxic to earthworms.

#### **Test substance insoluble in water and organic solvents**

21. A mixture comprised of 10 g of finely ground industrial quartz sand with a quantity of the test substance necessary to achieve the test concentration in the soil is prepared. The mixture is then mixed thoroughly with the pre-moistened artificial soil. De-ionised water is then added to an amount required to achieve a final moisture content of 40 to 60% of the maximum water holding capacity is then added and mixed in. The soil is then ready for placing to the test containers.

#### **Application of the test substance to the soil surface**

22. The soil is treated after the worms are added. The test containers are first filled with the moistened soil substrate and the weighed worms are placed on the surface. Healthy worms normally burrow immediately into substrate and consequently any remaining on the surface after 15 minutes are defined as damaged and must be replaced. If worms are replaced, the new ones and those substituted should be weighed so that total live weight of the exposure group of worms and the total weight of the container with worms at the start is known.

23. The test substance is applied. It should not be added to the soil within half an hour of introducing the worms (or if worms are present on the soil surface) so as to avoid any direct exposure to the test substance by skin contact. When the test substance is a pesticide it may be appropriate to apply it to the soil surface by spraying. The test substance should be applied to the surface of the soil as evenly as possible using a suitable laboratory-scale spraying device to simulate spray application in the field. Before application the cover of the test container should be removed and replaced by a liner which protects the side walls of the container from spray. The liner can be made from a test container with the base removed. The application should take place at a temperature within  $20 \pm 2$  °C of variation and for aqueous solutions, emulsions or dispersions at a water application rate of between 600 and 800  $\mu\text{l}/\text{m}^2$ . The rate should be verified using an appropriate calibration technique. Special formulations like granules or seed dressings should be applied in a manner consistent with agricultural use.

24. Test containers should be left uncovered for a period of one hour to allow any volatile solvent associated with the application of the test substance to evaporate. Care should be taken that no worm will escape from the test vessels within this time.

### **PROCEDURE**

#### **Test groups and controls**

25. A loading of 10 earthworms in 500 - 600 g dry mass of artificial soil (i.e. 50-60 g of soil per worm) is recommended. If larger quantities of soil are used, as might be the case if testing pesticides with special modes of application such as seed dressings, the loading of 50-60 g of soil per worm should be maintained by increasing the number of worms. Ten worms are prepared for each control and treatment container. The worms are washed with water and wiped and then placed on absorbent paper for a short period to allow excess water to drain.

26. To avoid systematic errors in distributing the worms to the test containers the homogeneity of the test population should be determined by individually weighing 20 worms sampled randomly from the population from which the test worms are to be taken. Having ensured homogeneity, batches of worms are

then be selected, weighed and assigned to test containers using a randomisation procedure. After the addition of the test worms, the weight of each test container should be measured to ensure that there is an initial weight that can be used as the basis for monitoring soil moisture content throughout the test as described in paragraph 30. The test containers are then covered as described in paragraph 9 and placed in the test chamber.

27. Appropriate controls are prepared for each of the methods of test substance application described in paragraphs 18 to 24. The relevant procedures described are followed for preparing the controls except that the test substance is not added. Thus, where appropriate, organic solvents, quartz sand or other vehicles are applied to the controls in concentrations/amounts consistent with those used in the treatments. Where a solvent or other vehicle is used to add the test substance an additional control without the vehicle or test substance should also be prepared and tested to ensure that the vehicle has no bearing on the result.

#### Test conditions

28. The test temperature is  $20 \pm 2$  °C. The test is carried out under controlled light-dark cycles (preferably 16 hours light and 8 hours dark) with illumination of 400 to 800 lux in the area of the test containers.

29. The test containers are not aerated during the test but the design of the test vessel covers should provide opportunity for gaseous exchange whilst limiting evaporation of moisture (see paragraph 9).

30. The water content of the soil substrate in the test containers is maintained throughout the test by re-weighing the test containers (minus their covers) periodically. Losses are replenished as necessary with de-ionised water. The water content should not vary by more than 10 % from that at the start of the test.

#### Feeding

31. Any food of a quality shown to be suitable for at least maintaining worm weight during the test is considered acceptable. Experience has shown that oatmeal, cow or horse manure is a suitable food. Checks should be made to ensure that cows or horses from which manure is obtained are not subject to medication or treatment with substances, such as growth promoters, nematicides or similar veterinary products that could adversely affect the worms during the test. Self-collected cow manure is recommended, since experience has shown that commercially available cow manure used as garden fertiliser may have adverse effects on the worms. The manure should be air-dried, finely ground and pasteurised before use.

32. Each fresh batch of food should be fed to a non-test worm culture before use in a test to ensure that it is of suitable quality. Growth and cocoon production should not be reduced compared to worms kept in a substrate that does not contain the new batch of food (conditions as described in OECD 207(4)).

33. Food is first provided one day after adding the worms and applying the test substance to the soil. Approximately 5 g of food is spread on the soil surface of each container and moistened with de-ionised water (about 5 ml to 6 ml per container). Thereafter food is provided once a week during the 4-week test period. If food remains uneaten the ration should be reduced so as to avoid fungal growth or moulding. The adults are removed from the soil on day 28 of the test. A further 5 g of food is then administered to each test container. No further feeding takes place during the remaining 4 weeks of the test.

#### Selection of test concentrations

34. Prior knowledge of the toxicity of the test substance should help in selecting appropriate test concentrations, for example from an acute test (4) and/or from range-finding studies. When necessary, a

range-finding test is conducted with, for example, five test concentrations of 0.1, 1.0, 10, 100, and 1000 mg/kg (dry mass of soil). One replicate for each treatment and control is sufficient. The duration of the range-finding test is two weeks and the mortality is assessed at the end of the test.

### Experimental design

35. Since a single summary statistic cannot be prescribed for the test, this Guideline makes provision for the determination of the NOEC and the EC<sub>x</sub>. A NOEC is likely to be required by regulatory authorities for the foreseeable future. More widespread use of the EC<sub>x</sub>, resulting from statistical and ecological considerations, may be adopted in the near future. Therefore, three designs are proposed, based on recommendations arising from a ring test of an enchytraeid reproduction test method (17):

36. In setting the range of concentrations, the following should be borne in mind:

- For determination of the NOEC, at least five/twelve concentrations in a geometric series should be tested. Four replicates for each test concentration plus eight controls are recommended. The concentrations should be spaced by a factor not exceeding 2.0.
- For determination of the EC<sub>x</sub> (e.g. EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>), an adequate number of concentrations to cause at least four statistically significantly different mean responses at these concentrations is recommended. At least two replicates for each test concentration and six control replicates are recommended. The spacing factor may vary, i.e. less than or equal to 1.8 in the expected effect range and above 1.8 at the higher and lower concentrations.
- A combined approach allows for determination of both the NOEC and EC<sub>x</sub>. Eight treatment concentrations in a geometric series should be used. Four replicates for each treatment plus eight controls are recommended. The concentrations should be spaced by a factor not exceeding 1.8.

### Test duration and measurements

37. On Day 28 the living adult worms are observed and counted. Any unusual behaviour (e.g. inability to dig into the soil; lying motionless) and in morphology (e.g. open wounds) are also recorded. All adult worms are then removed from the test vessels and counted and weighed. Transfer of the soil containing the worms to a clean tray prior to the assessment may facilitate searching for the adults. The worms extracted from the soil should be washed prior to weighing (with de-ionised water) and the excess water removed by placing the worms briefly on filter paper. Any worms not found at this time are to be recorded as dead, since it is to be assumed that such worms have died and decomposed prior to the assessment.

38. If the soil has been removed from the containers it is then returned (minus the adult worms but containing any cocoons that have been produced). The soil is then incubated for four additional weeks under the same test conditions except that feeding only takes place once at the start of this phase of the test (see paragraph 33).

39. At the end of the second 4-week period, the number of juveniles hatched from the cocoons in the test soil and cocoon numbers are determined using procedures described in Annex 5. All signs of harm or damage to the worm should also be recorded throughout the test period.

### Limit test

40. If no effects are observed at the highest concentration in the range-finding test (i.e. 1000 mg/kg), the reproduction test would be performed as a limit test, using a test concentration of 1000 mg/kg. A limit test will provide the opportunity to demonstrate that the NOEC for reproduction is greater than the limit concentration whilst minimising the number of worms used in the test. Eight replicates should be used for both the treated soil and the control.

## DATA AND REPORTING

### Treatment of results

41. Although an overview is given in Annex 6, no definitive statistical guidance for analysing test results is given in this guideline.

42. One endpoint is mortality. Changes in behaviour (e.g. inability to dig into the soil; lying motionless against the glass wall of the test vessel) and morphology (e.g. open wounds) of the adult worms should however also be recorded along with the presence of any juveniles. Probit analysis (18) or logistic regression should normally be applied to determine the  $LC_{50}$ . However, in cases where this method of analysis is unsuitable (e.g., if less than three concentrations with partial kills are available), alternative methods can be used. These methods could include moving averages (19), the trimmed Spearman-Kärber method (20) or simple interpolation (e.g., geometrical mean of  $LC_0$  and  $LC_{100}$ , as computed by the square root of  $LC_0$  multiplied by  $LC_{100}$ ).

43. The other endpoint is fecundity (e.g. number of juveniles produced). However, as in the range-finding test, all other harmful signs should be recorded in the final report. The statistical analysis requires the arithmetic mean  $\bar{X}$  and the standard deviation per treatment and per control for reproduction to be calculated.

44. If an analysis of variance has been performed, the standard deviation,  $s$ , and the degrees of freedom (df) may be replaced by the pooled variance estimate obtained from the ANOVA and by its degrees of freedom, respectively – provided variance does not depend on the concentration. In this case, use the single variances of control and treatments. Those values are usually calculated by commercial statistical software using the per-vessel results as replicates. If pooling data for the negative and solvent controls appears reasonable rather than testing against one of those, they should be tested to see that they are not significantly different (for the appropriate test, consider paragraph 47 and Annex 6).

45. Further statistical testing and inference depends on whether the replicate values are normally distributed and are homogeneous with regard to their variance.

### NOEC Estimation

46. The application of powerful tests should be preferred. One should use information for example from previous experience with ring-testing or other historic data on whether data are approximately normally distributed. Variance homogeneity (homoscedasticity) is more critical. Experience tells that the variance often increases with increasing mean. In these cases, a data transformation could lead to homoscedasticity. However, such a transform should be based on experience with historic data rather than on data under investigation. With homogeneous data, multiple t-tests such as Williams' test ( $\alpha = 0.05$ , one-sided) (21)(22) or certain cases Dunnett's test (23)(24) should be performed. It should be noted that, in the case of unequal replication, the table t-values must be corrected as suggested by Dunnett and

Williams. Sometimes, because of large variation, the responses do not increase/decrease regularly. In this case of strong deviation from monotonicity the Dunnett's test is more appropriate. If there are deviations from homoscedasticity, it may be reasonable to investigate possible effects on variances more closely to decide whether the t-tests can be applied without losing much power (25). Alternatively, a multiple U-test, for example the Bonferroni-U-test according to Holm (26), or when these data exhibit heteroscedasticity but are otherwise consistent with a underlying monotone dose-response, an other non-parametric test (e.g. Jonckheere-Terpstra (27)(28) or Shirley (29) (30)) can be applied and would generally be preferred to unequal-variance t-tests. (see also the scheme in Annex 6).

47. If a limit test has been performed and the prerequisites of parametric test procedures (normality, homogeneity) are fulfilled, the pair-wise Student-t-test can be used or otherwise the Mann-Whitney-U-test procedure (31).

#### EC<sub>x</sub> Estimation

48. To compute any EC<sub>x</sub> value, the per-treatment means are used for regression analysis (linear or non-linear), after an appropriate dose-response function has been obtained. For the growth of worms as a continuous response, EC<sub>x</sub>-values can be estimated by using suitable regression analysis (32). Among suitable functions for quantal data (mortality/survival and number of offspring produced) are the normal sigmoid, logistic or Weibull functions, containing two to four parameters, some of which can also model hormetic responses. If a dose-response function was fitted by linear regression analysis a significant r<sup>2</sup> (coefficient of determination) and/or slope should be found with the regression analysis before estimating the EC<sub>x</sub> by inserting a value corresponding to x% of the control mean into the equation found by regression analysis. 95%-confidence limits are calculated according to Fieller (cited in Finney (18)) or other modern appropriate methods.

49. Alternatively, the response is modelled as a percent or proportion of model parameter which is interpreted as the control mean response. In these cases, the normal (logistic, Weibull) sigmoid curve can often be easily fitted to the results using the probit regression procedure (18). In these cases the weighting function has to be adjusted for metric responses as given by Christensen (33). However, if hormesis has been observed, probit analysis should be replaced by a four-parameter logistic or Weibull function, fitted by a non-linear regression procedure (34). If a suitable dose-response function cannot be fitted to the data, one may use alternative methods to estimate the EC<sub>x</sub>, and its confidence limits, such as Moving Averages after Thompson (19) and the Trimmed Spearman-Kärber procedure (20).

#### Test report

50. The test report must include the following information:

##### Test substance:

- a definitive description of the test substance, batch, lot and CAS-number, purity;
- properties of the test substance (e.g. log K<sub>ow</sub>, water solubility, vapour pressure, Henry's constant (H) and information on fate and behaviour).

##### Test organisms:

- test animals used: species, scientific name, source of organisms and breeding conditions;
- age, size (mass) range of test organisms.

##### Test conditions

- preparation details for the test soil;
- the maximum water holding capacity of the soil;
- a description of the technique used to apply the test substance to the soil;
- details of auxiliary substances used for administering the test substance;
- calibration details for spraying equipment if appropriate;
- description of the experimental design and procedure;
- size of test containers and volume of test soil;
- test conditions: light intensity, duration of light-dark cycles, temperature;
- a description of the feeding regime, the type and amount of food used in the test, feeding dates;
- pH and water content of the soil at the start and end of the test.

Test results:

- adult mortality (%) in each test container at the end of the first 4 weeks of the test;
- the total mass of adults at the beginning of the test in each test container;
- changes in body weight of live adults (% of initial weight) in each test container after the first four weeks of the test;
- the number of juveniles produced in each test container at the end of the test;
- a description of obvious or pathological symptoms or distinct changes in behaviour;
- the results obtained with the reference test substance;
- the LC<sub>50</sub>, the NOEC and/or EC<sub>x</sub> (e.g. EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>) for reproduction if some of them are applicable with confidence intervals, and a graph of the fitted model used for its calculation all information and observations helpful for the interpretation of the results;
- a plot of the dose-response-relationship;
- the results applicable to each test container;

Deviations from procedures described in this guideline and any unusual occurrences during the test.

Deviations from procedures described in this guideline and any unusual occurrences during the test.

### LITERATURE

- (1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm - III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 - 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, p. 50-82.
- (4) OECD Guideline for testing chemicals 207. Earthworm acute toxicity test. Adopted: 4 April 1984.
- (5) ISO (International Organization for Standardization ) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneva.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3<sup>rd</sup> Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneva.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneva.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3<sup>rd</sup> ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. - Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

- (21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2<sup>nd</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

ANNEX 1DEFINITIONS

The following definitions are applicable to this Guideline:

EC<sub>x</sub> (Effect concentration for x% effect) is the concentration that causes an x% of an effect on test organisms within a given exposure period when compared with a control. For example, an EC<sub>50</sub> is a concentration estimated to cause an effect on a test end point in 50% of an exposed population over a defined exposure period. In this test the effect concentrations are expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of the test substance per unit area of the soil.

LC<sub>0</sub> (No lethal concentration) is the concentration of a test substance that does not kill any of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC<sub>0</sub> is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil.

LC<sub>50</sub> (Median lethal concentration) is the concentration of a test substance that kills 50% of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC<sub>50</sub> is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of test substance per unit area of soil.

LC<sub>100</sub> (Totally lethal concentration) is the concentration of a test substance kills 100% of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC<sub>100</sub> is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) is the lowest test substance concentration that has a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) In this test the LOEC is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of test substance per unit area of soil. All test concentrations above the LOEC should normally show an effect that is statistically different from the control. Any deviations from the above must be justified in the test report.

NOEC (No Observed Effect Concentration) is the highest test substance concentration immediately below the LOEC at which no effect is observed. In this test, the concentration corresponding to the NOEC, has no statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) within a given exposure period when compared with the control.

Reproduction rate: Mean number of juvenile worms produced per a number of adults over the test period.

ANNEX 2DETERMINATION OF THE MAXIMUM WATER HOLDING CAPACITY OF THE SOIL

The following method for determining the maximum water holding capacity of the soil has been found to be appropriate. It is described in Annex C of the ISO DIS 11268-2 (1).

Collect a defined quantity (e.g. 5 g) of the test soil substrate using a suitable sampling device (auger tube etc.). Cover the bottom of the tube with a piece of filter paper fill with water and then place it on a rack in a water bath. The tube should be gradually submerged until the water level is above to the top of the soil. It should then be left in the water for about three hours. Since not all water absorbed by the soil capillaries can be retained, the soil sample should be allowed to drain for a period of two hours by placing the tube onto a bed of very wet finely ground quartz sand contained within a covered vessel (to prevent drying). The sample should then be weighed, dried to constant mass at 105 °C . The water holding capacity (WHC) can then be calculated as follows:

$$\text{WHC (in \% of dry mass)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Where:

S = water-saturated substrate + mass of tube + mass of filter paper

T = tare (mass of tube + mass of filter paper)

D = dry mass of substrate

**References:**

- (1) ISO (International Organization for Standardisation ) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

ANNEX 3DETERMINATION OF SOIL pH

The following method for determining the pH of a soil is based on the description given in ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (1).

A defined quantity of soil is dried at room temperature for at least 12 h. A suspension of the soil (containing at least 5 grams of soil) is then made up in five times its volume of either a 1 M solution of analytical grade potassium chloride (KCl) or a 0.01 M solution of analytical grade calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>). The suspension is then shaken thoroughly for five minutes and then left to settle for at least 2 hours but not for longer than 24 hours. The pH of the liquid phase is then measured using a pH-meter that has been calibrated before each measurement using an appropriate series of buffer solutions (e.g. pH 4.0 and 7.0).

**References:**

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.

ANNEX 4CULTURING OF *EISENIA FETIDA* /*EISENIA ANDREI*

Breeding should preferably be carried out in a climatic chamber at  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . At this temperature and with the provision of sufficient food, the worms become mature after about 2 to 3 months.

Both species can be cultured in a wide range of animal wastes. The recommended breeding medium is a 50:50 mixture of horse or cattle manure and peat. Checks should be made to ensure that cows or horses from which manure is obtained are not subject to medication or treatment with substances, such as growth promoters, nematicides or similar veterinary products that could adversely affect the worms during the test. Self-collected manure obtained from an "organic" source is recommended, since experience has shown that commercially available manure used as garden fertiliser may have adverse effects on the worms. The medium should have a pH value of approximately 6 to 7 (adjusted with calcium carbonate), a low ionic conductivity (less than 6 mg or 0.5 % salt concentration) and should not be contaminated excessively with ammonia or animal urine. The substrate should be moist but not too wet. Breeding boxes of 10 to 50-litre capacity are suitable.

To obtain worms of standard age and size (mass), it is best to start the culture with cocoons. Once the culture has been established it is maintained by placing adult worms in a breeding box with fresh substrate for 14 days to 28 days to allow further cocoons to be produced. The adults are then removed and the juveniles produced from the cocoons used as the basis for the next culture. The worms are fed continuously with animal waste and transferred into fresh substrate from time to time. Experience has shown that air-dried finely ground cow or horse manure or oatmeal is a suitable food. It should be ensured that cows or horses from which manure is obtained are not subject to medication treatment with substances, such as growth promoters, that could adversely affect the worms during long term culture. The worms hatched from the cocoons are used for testing when they are between 2 and 12 months old and considered to be adults.

Worms can be considered to be healthy if they move through the substrate, do not try to leave the substrate and reproduce continuously. Substrate exhaustion is indicated by worms moving very slowly and having a yellow posterior end. In this case the provision of fresh substrate and/or a reduction in stocking density is recommended.

ANNEX 5TECHNIQUES FOR COUNTING JUVENILE WORMS HATCHED FROM COCOONS

Hand sorting of worms from the soil substrate is very time-consuming. Two alternative methods are therefore recommended:

(a) The test containers are placed in a water bath initially at a temperature of 40°C but rising to 60°C. After a period of about 20 minutes the juvenile worms should appear at the soil surface from which they can be easily removed and counted.

(b) The test soil may be washed through a sieve using the method developed by van Gestel et al. (1) providing the peat and the manure or oatmeal added to the soil were ground to a fine powder. Two 0.5 mm mesh size sieves (diameter 30 cm) are placed on top of each other. The contents of a test container are washed through the sieves with a powerful stream of tap water, leaving the young worms and cocoons mainly on the upper sieve. It is important to note that the whole surface of the upper sieve should be kept wet during this operation so that the juvenile worms float on a film of water, thereby preventing them from creeping through the sieve pores. Best results are obtained when a showerhead is used.

Once all the soil substrate has been washed through the sieve, juveniles and cocoons can be rinsed from the upper sieve into a bowl. The contents of the bowl are then left to stand allowing empty cocoons to float on the water surface and full cocoons and young worms to sink to the bottom. The standing water can then be poured off and the young worms and cocoons transferred to a petri dish containing a little water. The worms can be removed for counting using a needle or a pair of tweezers.

Experience has shown that method (a) is better suited to extraction of juvenile worms that might be washed through even a 0.5 mm sieve.

The efficiency of the method used to remove the worms (and cocoons if appropriate) from the soil substrate should always be determined. If juveniles are collected using the hand sorting technique it is advisable to carry out the operation twice on all samples.

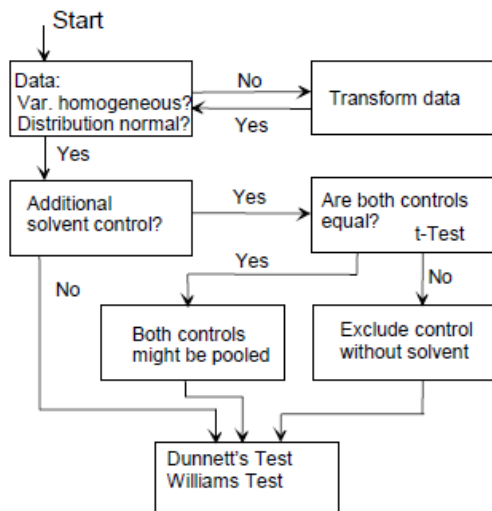
**References:**

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

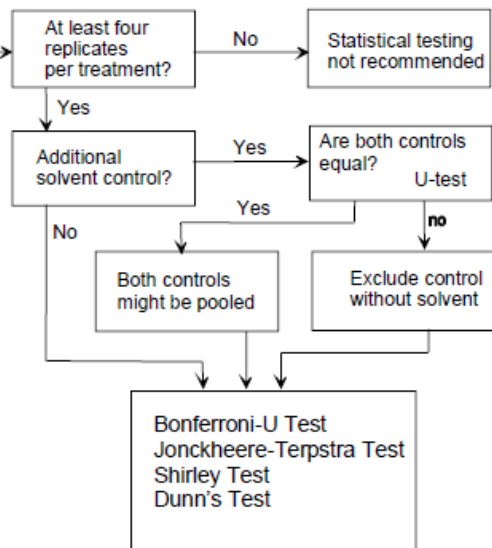
ANNEX 6

OVERVIEW OF THE STATISTICAL ASSESSMENT OF DATA (NOEC DETERMINATION)

**Parametric Tests**



**Non-parametric Tests**



}