



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA
“PUCE-SI”**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
“ECAA”**

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y MORTALIDAD DE CARBOFURÁN Y
CARBENDAZIM EMPLEANDO COMO BIOINDICADOR *Eisenia andrei*.”**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO EN INGENIERA EN CIENCIAS
AMBIENTALES Y ECO-DESARROLLO**

Línea de Investigación 2. Ambiente y Biodiversidad
Sublínea 2.2 Evaluación de Impactos Ambientales

AUTOR/A: MAURA LIZBETH MORENO JURADO

ASESOR/A: MCs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, DICIEMBRE – 2017

CERTIFICACIÓN

Ibarra, 18 de Diciembre del 2017

MCs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE
ASESOR DE TESIS

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCE-SI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f)


MCs. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 1002658399

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f)


MCs. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR DEL PROYECTO DE GRADO

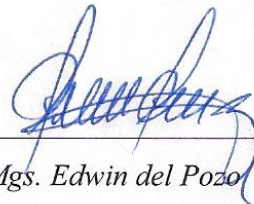
C.C: 1002658399

(f)


Mgs. Maritza Mier

C.C: 1002878286

(f)

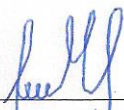

Mgs. Edwin del Pozo

C.C: 1001756566

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Maura Lizbeth Moreno Jurado, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 18 de Diciembre del 2017

(f) 

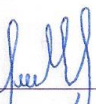
Maura Lizbeth Moreno Jurado

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 100402426-9

AUTORÍA

Yo, Maura Lizbeth Moreno Jurado, portador de la cédula de ciudadanía N° 100402426-9, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f) 
Maura Lizbeth Moreno Jurado

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 100402426-9


DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo Maura Lizbeth Moreno Jurado, con cedula de ciudadanía 100402426-9, autora del trabajo de grado intitulado: "Evaluación de la toxicidad y mortalidad de Carburan y Carbendazim empleando como bioindicador *Eisenia andrei*", previo a la obtención del título profesional de Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede-Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 18 de Diciembre del 2017

(f) 
Maura Lizbeth Moreno Jurado
C.C. 100402426-9

DEDICATORIA

*Este trabajo de grado le dedico a Dios dador de fuente de vida,
por darme esperanza, fe para seguir luchando por cada una de mis metas y objetivos,*

Con el más puro e infinito amor a los mejores padres:

Fernando Moreno y Alba Jurado a mi hermano Jairo,

A mis tías queridas: Martha Moreno, Matilde y Azucena Jurado

Mis ángeles que me cuidan desde el cielo:

Rosaura y José Miguel Jurado

Que me han apoyado y son el motivo de lucha, amor sincero,

*Agradecerles por su apoyo incondicional por esa fuerza que me han dado para no decaer, por mi
formación ética, moral y profesional para seguir adelante en cada*

Paso que doy a lo largo de esta etapa.

Lizbeth Moreno Jurado.

AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra

Por ser el lugar de mi formación académica,

En especial a la escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales por permitir que mis conocimientos se fortalezcan, a mis maestros por su carisma y la dedicación brindada en su labor educativa.

Un agradecimiento muy especial al MsC. Santiago Mafla por su paciencia, por ser guía y asesor de mi trabajo de grado.

Decirles gracias a mis amigos, primas que colaboraron en esta fase de superación estudiantil, profesional y sobre todo por enseñarme que nunca hay que rendirse Dios bendiga a cada uno de Uds. Por su apoyo.

Lizbeth Moreno Jurado.

ÍNDICE

CARÁTULA	I
CERTIFICACIÓN.....	II
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	III
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	IV
AUTORÍA.....	V
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	VI
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
ÍNDICE	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	14
ÍNDICE DE ANEXOS	17
RESUMEN.....	18
ABSTRACT	19
CAPITULO I.....	20
1. INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 Objetivos	22
1.1.1 Objetivo General	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
1.2 Hipótesis.....	23
CAPÍTULO II.....	24
2. ESTADO DEL ARTE.....	24
2.1 Suelo.....	24

2.2 Componentes del suelo.....	24
2.2.1 Componentes orgánicos.	25
2.2.2 Componentes inorgánicos.	25
2.3 Materia Orgánica en el suelo.....	26
2.4 Microorganismo y Macroorganismos benéficos para el suelo.	27
Fuente: (Jaramillo, 2013)	28
2.5 Ventajas de la lombriz de tierra en los suelos.	29
2.6 Degradación de Suelo.....	30
2.7 Uso de agroquímicos en la Agricultura.	31
2.8 Contaminación de Suelos por el uso de Agroquímicos.....	31
2.9 Persistencia de los plaguicidas en los suelos.....	32
2.10 Afectación de los Plaguicidas a la lombrices de tierra.	32
2.11 Aspectos biológicos de <i>Eisenia andrei</i> (Lombriz roja californiana).....	33
2.12 Anatomía sistemática de las lombrices.	34
2.12.1 Pared del cuerpo.	34
2.12.2 Sistema digestivo.....	35
2.12.3 Sistema excretor.	36
2.12.4 Sistema nervioso.	37
2.12.5 Sistema neurosensorial.	38
2.12.6 Sistema reproductivo.....	38
2.13 Lombrices de Tierra utilizadas como Bioindicadores de Calidad de Suelos.	39
2.14 Estudios eco toxicológicos con Lombriz roja Californiana (<i>Eisenia andrei</i>) como bioindicador.....	40
2.15 Bioensayos eco toxicológicos.	41
2.15.1 Bioensayos con lombriz de tierra (<i>Eisenia fetida/andrei</i>) en suelos.....	42
2.15.2 Procesos experimentales para la medición de toxicidad utilizando lombrices de tierra... ..	42
2.16 Plaguicidas a usar en la presente Investigación.	45
2.16.1 Carbofurán.....	45
2.17 Propiedades físico-químicas del Carbofurán.....	45
2.19 Aplicaciones	46

2.20	Utilización en cultivos.....	47
2.21	Precauciones.....	48
2.22	Residualidad de Carbofuran.	48
2.23	Efectos adverso sobre la salud y el ambiente.....	49
2.23.1	Efectos potenciales en la salud.....	49
2.23.2	Efectos crónicos y carcinogénicos.	50
2.24	Efectos ambientales.....	50
2.25	Carbendazim.....	51
2.25.1	Propiedades físico-químicas del Carbendazim.	51
2.27	Utilización en cultivos.....	53
2.28	Precauciones.....	53
2.29	Residualidad de Carbendazim.	54
2.30	Efectos adversos sobre la salud.....	54
2.31	Efectos ambientales.....	54
2.32	Técnica de Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) para la evaluación mutagénica de <i>Eisenia andrei</i> por el uso de Carbofuran y Carbendazim.....	55
2.32.1	Aplicación y etapas.	55
2.32.2	Etapas de la técnica RFLP.....	55
2.32.3	Aplicaciones de la técnica RFLP.	56
2.33	Ventajas y desventajas.	56
2.33.1	Ventajas.....	56
2.33.2	Desventajas.....	57

CAPÍTULO III58

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1	Generalidades.....	58
3.2.1	Método inductivo.	58
3.2.2	Método deductivo.....	59
3.2.3	Método experimental.....	59
3.2.4	Método estadístico.....	59
3.3	Manejo y análisis de datos.	60
3.3.1	Variable independiente.....	60

3.3.2	Variable dependiente.....	60
3.3.3	Variabes de control.	60
3.4	Metodología	61
3.4.1	Ubicación del área de estudio.....	61
3.4.2	Experimentación en Laboratorio.....	61
3.4.3	Carbofurán y Carbendazim.	61
3.4.4	Organismos de prueba.	62
3.4.5	Condiciones del Suelo artificial.	63
3.4.6	Técnicas de medición.	64
3.4.7	Medición de pH.....	64
3.4.8	Medición de la Conductividad Electrica ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)	65
3.4.9	Determinación de Humedad.....	66
3.5	Índices Eco toxicológicos.....	68
3.5.1	Determinación de la Dosis letal (DL50%).	68
3.6	Implementación del bioensayo.....	69
3.7	Condiciones de control del bioensayo.....	69
3.8	Técnica RFLP usada para observar daños mutagénicos en <i>Eisenia andrei</i>	70
3.9	Materiales y Equipos.	72
3.9.1	Materiales.	72
3.9.2	Equipos.....	73
3.9.3	Balanza analítica.	73
3.9.4	PureLink® Genomic DNA Mini Kit.....	73
3.9.5	Vórtex.....	74
3.9.6	Microcentrifuga.....	75
3.9.7	Enzima de restricción EcoR1.	75
3.9.8	Bloque de calentador seco.....	76
3.9.9	Cámara de electroforesis	77
CAPITULO IV		78
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
4.1	Análisis eco toxicológico en función de la mortalidad de <i>Eisenia andrei</i>	78
4.1.1	PRIMERA FASE.	78

4.1.1.1 Dosis letal media (DL50%) para Carbofurán a las 72 horas de exposición.....	79
4.1.1.2 Dosis letal media (DL50%) para Carbendazim a las 72 horas de exposición.....	80
4.1.1.3 Dosis letal media (DL50%) para la mezcla (Carbofurán mas Carbendazim) a las 72 horas de exposición.	80
4.1.2 SEGUNDA FASE.	81
4.1.3 Evaluación de los tratamientos en los individuos de <i>Eisenia andrei</i> expuestos a Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.	82
4.2 Evaluación de las variables de control durante el bioensayo.	85
4.2.1 Humedad del suelo al inicio y al final del bioensayo.....	85
4.2.2 Medición de pH al inicio y al final del bioensayo.....	87
4.2.3 Conductividad eléctrica al inicio y al final.....	90
4.2.4 Temperatura al inicio y al final del bioensayo.	92
4.3 Resultados de Sensibilidad en <i>Eisenia andrei</i>	94
4.4 Análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)..	96
4.5 Evaluación del Riesgo Ambiental y su toxicidad que presentan Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.....	100
4.6 Socialización.	102
CAPITULO V.....	107
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	107
5.1 Conclusiones.	107
5.2 Recomendaciones.....	108
6. GLOSARIO	109
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA.	111
8. ANEXOS.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación del suelo según los componentes	24
Tabla 2 Tipos de Materiales Orgánicos presentes en el suelo.....	27
Tabla 3 Clasificación de todos los organismos presentes en el suelo.	28
Tabla 4 Diferencias entre especies de lombriz.....	34
Tabla 5 Propiedades físico-químicas del Carbofurán.	46
Tabla 6 Síntomas del contacto con Carbofurán.	50
Tabla 7 Propiedades físico-químicas del Carbendazim	52
Tabla 8 Ubicación del Laboratorio de la PUCESI.	61
Tabla 9 Propiedades químicas del suelo artificial.....	64
Tabla 10 Protocolo para usar enzimas de restricción – EcoRI.....	71
Tabla 11 Materiales y reactivos utilizados en el laboratorio.....	72
Tabla 12. Dosis Letal Media (DL50%) para Carbofurán.....	79
Tabla 13. Dosis Letal Media (DL50%) para Carbendazim.....	80
Tabla 14. Dosis Letal (DL50%) para la mezcla de Carbofuran mas Carbendazim.	81
Tabla 21 Humedad promedio del suelo al inicio y al final del bioensayo.	85
Tabla 22 pH promedio al inicio y al final del bioensayo.	88
Tabla 23 Conductividad eléctrica promedio al inicio y al final del bioensayo.	90
Tabla 24 Temperatura al inicio y al final del bioensayo.	93
Tabla 25 Evaluación de riego ambiental (ERA) en especie Eisenia andrei.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Proceso de degradación del suelo. Fuente: (Martinez, 2011)	30
Figura 2 Pared del cuerpo. Fuente: (Arrázola, 2016)	35
Figura 3 Sistema digestivo. Fuente: (Arrázola, 2016)	36
Figura 4 Ubicación de los nefridios. Fuente: (Diaz, 2002)	37
Figura 5 Sistema nervioso. Fuente: (Arrázola, 2016)	38
Figura 6 Ciclo de vida de la lombriz. Fuente: (Martinez, 2011)	39
Figura 7 Estructura química del Carbofurán. Fuente: (Governor, 2012)	45
Figura 8 NFPA 704 del Carbofurán. Fuente: (Nufarm, 2011)	48
Figura 9 Estructura química del Carbendazim. Fuente: (Governor, 2012)	51
Figura 10 Diseño completamente al azar (DCA). Fuente:(Autor)	60
Figura 11 Carbofurán y Carbendazim Fuente: (Autor)	61
Figura 12 Recolección de organismos de prueba. Fuente: (Autor)	62
Figura 13 Identificación del clitelo. Fuente: (Autor)	62
Figura 14 Suelo artificial. Fuente: (Autor)	63
Figura 15 Potenciómetro. Fuente: (Autor)	65
Figura 16 Conductímetro. Fuente: (Autor)	66
Figura 17 Balanza analítica. Fuente: (Autor)	73
Figura 18 PureLink® Genomic DNA Mini Kit. Fuente: (Autor)	74
Figura 19 Vórtex. Fuente: (Autor)	74
Figura 20 Microcentrifuga. Fuente: (Autor)	75
Figura 21 Anza™ EcoR1. Fuente: (Autor)	76
Figura 22 Bloque de calor seco. Fuente: (Autor)	77
Figura 23 Cámara de electroforesis. Fuente: (Autor)	77
Figura 24 Dosis subletales por tratamiento.	78
Figura 25 Bioensayo en experimentación a los 14 días.	82
Figura 26 Prueba Tukey al 5%, para el peso de <i>Eisenia andrei</i> en la evaluación de dos plaguicidas más la mezcla.	84
Figura 27 Humedad promedio del suelo aplicado Carbofurán. Fuente: (Autor)	86
Figura 28 Humedad promedio del suelo aplicado Carbedazim. Fuente: (Autor)	86

Figura 29 Humedad promedio del suelo aplicado la mezcla. Fuente: (Autor)	87
Figura 30. pH del suelo aplicado Carbofurán. Fuente: (Autor)	88
Figura 31. pH del suelo aplicado Carbedazim. Fuente: (Autor)	89
Figura 32. pH del suelo aplicado Carbedazim y Carbofurán. Fuente: (Autor)	89
Figura 33 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carburan. Fuente: (Autor)	91
Figura 34 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carbedazim. Fuente: (Autor)	91
Figura 35 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carbofurán y Carbedazim. Fuente: (Autor).....	92
Figura 36 Temperatura ambiente. Fuente: (Autor)	94
Figura 37 Sensibilidad en Eisenia andrei durante el bioensayo de mortandad con sus respectivos tratamientos. Fuente: (Autor)	95
Figura 38 Quemaduras presentadas por Eisenia andrei en exposición a la mezcla de Carbofurán mas Carbendazim. Fuente: (Autor)	96
Figura 39 Gel de agarosa utilizado en la técnica RFLP. Fuente: (Autor)	96
Figura 40 Similitud y rango de toxicidad a la aplicación de dosis de Carbofurán, Carbendazim y su mezcla. Fuente:(Autor)	98
Figura 41 Similitud y rango de toxicidad a la aplicación de dosis de Carbofurán, Carbendazim y su mezcla. Fuente:(Autor)	99
Figura 42 Socialización de la investigación en el salón de Calidad Ambiental del Gobierno Provincial de Imbabura. Fuente: (Autor)	103
Figura 43. Medición de impacto de la investigación. Fuente: (Autor)	104
Figura 44. Medición de impacto de la investigación con perspectivas para estudios complementarios posteriores. Fuente: (Autor).....	105
Figura 45. Medición de impacto de la investigación que genera actualmente o a un futuro un beneficio para alguna organización, comunidad o institución.	105
Figura 46. Medición de impacto de la investigación en cuanto al cumplimiento de objetivos plateados.....	106

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Normativa de la OECD para bioensayos en lombrices de tierra. Fuente: (Autor)	115
Anexo 2. Encuesta realizada a productores de tomate de mesa en la Comunidad de Chiriyacu, Cantón Urcuquí. Fuente: (Autor)	116
Anexo 3. Cultivares de tomate de mesa en Invernadero. Fuente: (Autor)	117
Anexo 4. Plaguicidas sintéticos usados en la agricultura local Fuente: (Autor)	118
Anexo 5. Sustrato artificial utilizado en el bioensayo. Fuente: (Autor)	119
Anexo 6. Recolección de Organismos de prueba en campo Eisenia andrei. Fuente: (Autor)	120
Anexo 7. Preparación de soluciones madre. Fuente: (Autor)	121
Anexo 8. Implementación del Bioensayo-Laboratorio de Biotecnología Fuente: (Autor)	122
Anexo 9. Control del bioensayo. Fuente: (Autor)	123
Anexo 10. Presencia de quemaduras en Eisenia andrei.	124
Anexo 11. Extracción de ADN. Fuente: (Autor)	125
Anexo 12. Diseño ANOVA en el programa GraphPad Prism 5. Fuente: (Autor)	126
Anexo 13. Invitaciones-Socialización. Fuente: (Autor)	127
Anexo 14 Nómina de asistencia a la socialización. Fuente: (Autor)	128
Anexo 15. Encuesta Realizada en el proceso de Socialización.	129

RESUMEN

Los plaguicidas son considerados xenobioticos (Tecuapetla, 2014), es decir, causan alto daño al medio ambiente. Esta investigación determina la mortalidad de *Eisenia andrei* producida por el Carbofurán y Carbendazim mediante un ensayo eco toxicológico para la identificación de daño en células eucariotas, para luego identificar el posible daño genotóxico de dichos componentes sobre la lombriz de tierra mediante la técnica de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y finalmente se determina el riesgo ambiental de Carbofurán, Carbendazim y su mezcla mediante el criterio de relación entre la toxicidad y la exposición (TER), para observar si el daño es agudo o crónico para *Eisenia andrei*. Para ello se realizó un bioensayo según la norma 207 de la OECD, utilizando el software Primer 7 que utiliza las formas de la técnica RFLP. Los resultados demostraron que los individuos expuestos al Carbofurán en el tratamiento T2 obtuvieron un peso promedio final de 0,2285 g y en cuanto a respuestas en estímulos mecánicos, presentaron falta de movilidad en un nivel alto que equivale al 60%, pigmentación en el cuerpo y quemaduras de un 60% y un 20% de cambio moderado; los individuos sujetos a Carbedazim en el tratamiento T3 alcanzaron un peso promedio final de 0,3042 g, mientras que en cuanto a respuesta de estímulos mecánicos el 50% de los individuos no presento cambio; es decir su nivel de respuesta fue bajo, finalmente los sujetos expuestos a la mezcla, en el tratamiento T4 logran un peso promedio final de 0,2261 g, y de igual manera un 60% de cambio alto en respuesta de estímulos mecánicos para falta de movilidad, y en cuanto a la presencia de pigmentación en el cuerpo y quemaduras resulto un cambio moderado que equivale al 50 y 40 %. En cuanto a la evaluación de riesgo ambiental, los resultados arrojaron los siguientes valores: para Carbofurán 49,74 que al ser un valor mayor que 10 implica un riesgo ambiental por su alto nivel crítico; para Carbedazim 6,38 que indica bajo riesgo pero al ser considerado mutagénico su utilización de ser controlada y en la mezcla el valor obtenido fue de 28,06 que continúa siendo un valor superior a 10 por lo tanto en denominación TER nos dice que es tóxico y presentan un riesgo crítico, por ende, debe ser prohibida su aplicación.

Palabras clave: nematicida, toxicidad, mortalidad, Carbedazim, Carbofurán.

ABSTRACT

Pesticides are considered xenobiotics (Tecuapetla, 2014), that is, they cause high damage to the environment. This investigation determines the mortality of *Eisenia andrei* produced by Carbofuran and Carbendazim by means of an ecotoxicological test for the identification of damage in eukaryotic cells, and then to identify the possible genotoxic damage of these components on the earthworm by the technique of length of the restriction fragments (RFLP) and finally the environmental risk of Carbofuran, Carbendazim and its mixture by the criterion of relationship between toxicity and exposure (TER), to determine whether the damage is acute or chronic for *Eisenia andrei*. For this, a bioassay was performed according to OECD standard 207, using the software Primer 7 that uses the forms of the RFLP technique. The results showed that the individuals exposed to Carbofuran in the T2 treatment obtained a final average weight of 0.2285 gr and in terms of responses in stimuli mechanisms, presented lack of mobility at a high level that is equivalent to 60%, pigmentation in the body and burns of 60% and 20% of moderate change; the individuals subject to Carbedazim in treatment T3 reached a final average weight of 0.3042 gr, while in response to mechanical stimuli 50% of the individuals did not present change; that is to say their level of response was low, finally the subjects exposed to the mixture, in the treatment T4 they achieve a final average weight of 0.2261 gr, and in the same way a 60% of high change in response of mechanical stimuli for lack of mobility, and in terms of the presence of pigmentation in the body and burns resulted a moderate change that is equivalent to 50 and 40%. Regarding the environmental risk assessment, the results showed the following values: for Carbofuran 49.74 which, being a value greater than 10, implies an environmental risk because of its high critical level; for Carbedazim 6.38 indicating under irrigation but being considered mutagenic its use of being controlled and in the mixture the obtained value was of 28.06 that continues being a value superior to 10 therefore in denomination TER tells us that it is toxic and present a critical risk, therefore, its application should be prohibited.

Key words: nematicide, toxicity, mortality, Carbedazim, Carbofuran.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias usadas de manera intensiva para controlar plagas agrícolas; de acuerdo con el boletín divulgativo N° 402 del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el Ecuador se siembran alrededor de 2'595.075 ha, de las cuales el 50% es decir el 1'191.131 ha. son tratadas con agroquímicos sintéticos, lo que indica que existen un alto porcentaje de productores que manipulan este tipo de sustancias. También existen cifras de la campaña agrícola realizada por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, donde revela que alrededor del 53% de intoxicaciones en humanos reportadas en el país son ocasionadas por el uso inadecuado de estos xenobióticos. Los insecticidas, fungicidas, nematocidas, acaricidas y herbicidas representan más del 27% de total de plaguicidas sintéticos importados por año y están considerados como altamente peligrosos debido a su toxicidad ya que generan problemas de salud para seres humanos, además de ser perjudiciales para el ambiente por su alta persistencia en suelo, cuerpos de agua y trazas en alimentos donde se han aplicado este tipo de tipo de agroquímicos (Valarezo & Muñoz, 2011).

Estudios realizados sobre el uso de algunas de estas moléculas químicas realizados en Colombia, han ocasionado el rechazo de productos de consumo para exportación, debido a los altos contenidos de trazas encontrados en estos, puesto que ciertos organismos internacionales han replanteando el uso de moléculas como el clorotalonil, carbendazim, carbofurán y mancozeb por los altos riesgos de carcinogenicidad, aunque en América Latina su uso todavía es elevado (Universidad Nacional de Colombia , 2015).

Entre los plaguicidas más comunes usados en nuestro país a pesar de la prohibición según la RESOLUCION DAJ-20133FA-0201.0136 de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro; del Decreto Ejecutivo N° 1449 y el Artículo 7.1, literal b, numeral 1, del Estatuto Orgánico de Gestión Organizacional por procesos de AGROCALIDAD (AGROCALIDAD, 2013). En donde se encuentra el Carbofurán, que se lo puede encontrar en lugares donde se suministra todo tipo de agroquímicos de manera ilegal, es decir contrabando. Otro de los

plaguicidas utilizado en nuestro país es el Carbendazim, un fungicida sistémico que actúa como alterador de hormonas, es decir altera el crecimiento normal en la fase de gestación en animales y seres humanos, estudios realizados por Mantovani (1998); García Gutiérrez & Rodríguez Mesa (2012), comprobaron que varios animales expuestos a Carbendazim en el vientre materno presentaban deformidades graves como falta de ojos o hidrocefalia y daños de fetotoxicidad.

El Carbofurán también disminuye la biomasa de poblaciones de lombrices de tierra en un 17% y el Carbendazim causa cambio en el número de cromosomas en células somáticas y gérmenes de células. Completar análisis con bioensayos de toxicidad es de suma importancia con el fin de poder determinar los efectos negativos sobre los individuos de *Eisenia andrei*, los resultados pueden otorgar datos sobre cómo perturban los plaguicidas a estas poblaciones de macroinvertebrados y los ecosistemas en general (Maiguashca, 2002).

(Salomón Campos & Sánchez Meza, 2013). Nos dice que el uso excesivo de plaguicidas como Carbofurán y Carbendazim genera impactos a organismos vivos entre ellos el ser humano y ecosistemas. Actualmente dichas actividades están reguladas únicamente con análisis físico-químicos, sin embargo, estos no son capaces de medir los efectos biológicos y el daño que se ocasiona en realidad.

Gómez, (2014), menciona que los ensayos de eco toxicidad o también llamados bioensayos; sirven para reconocer, evaluar efectos de un sinnúmero de contaminantes sobre los ecosistemas, para ello se usa un tejido vivo como indicador de los efectos letales o subletales; también sirven como metodologías biológicas, analíticas para prescripciones ambientales y de riesgos producidos por sustancias tóxicas. De esta manera este tipo de pruebas estandarizadas contribuyen de forma efectiva y eficiente, en el establecimiento de efectos tóxicos agudos y crónicos en organismos vivos, dándose una correlación del nivel de concentración-efecto ayudando a complementar análisis físicoquímicos.

Así también, se han aplicado bioensayos a lombrices de tierra, en sus especies *Eisenia fétida* e *E. andrei*, porque estos dos organismos vivos son mayormente adaptables a toxicidades altas presentes en suelos altamente contaminados ya sea por metales pesados, hidrocarburos y

plaguicidas (Romero P. R., 2008). Por otro lado estos bioensayos son aplicados con pruebas previamente estandarizadas en laboratorio para lombriz de tierra, por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD), según la norma 207, así surge el primer procedimiento de evaluación con bioensayos utilizando *Eisenia andrei* que es una lombriz vermicompostera capaz de adaptarse fácilmente y transformar residuos orgánicos de manera natural, además también tiene un grado alto de rapidez para consumir sustrato, digerirlo y asimilarlo de la materia orgánica existente. En la actualidad estos tipos de bioensayos se lo realiza en los países desarrollados para conocer los niveles hipotéticos y reales en ambientes terrestres dado por grados de afectación altos de contaminación ambiental (Gómez, 2014).

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE Sede Ibarra, mediante una metodología experimentalmente estandarizada que cumple con todos los parámetros de estas pruebas toxicológicas, y cuyo primordial objetivo fue la evaluación toxicológica y tasa de mortalidad de *Eisenia andrei* ocasionada por diferentes concentraciones de un nematicida cuyo principio activo fue Carbofurán y un fungicida con Carbedazim respectivamente.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Evaluar la toxicidad y mortalidad ocasionada por Carbofurán y Carbendazim sobre el bioindicador *Eisenia andrei*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar la mortalidad que produce Carbofurán y Carbendazim, sobre *Eisenia andrei* mediante un ensayo eco toxicológico para la identificación de daño en células eucariotas.

- Identificar el posible daño genotóxico de los componentes de Carbofurán y Carbendazim sobre *Eisenia andrei* mediante la técnica de RFLP, para observar las posibles mutaciones que causen los compuestos.
- Determinar el riesgo ambiental de Carbofurán y Carbendazim y su mezcla mediante el criterio de relación entre la toxicidad y la exposición (TER), para observar si el daño es agudo o crónico para *Eisenia andrei*.
- Socializar los resultados de la investigación en la localidad de Chiriyacu, Cantón Urcuquí, Provincia Imbabura.

1.2 Hipótesis

- **Ho:** Existirá riesgo ambiental del uso combinado de Carbofurán y Carbendazim en lombrices adultas (*E. andrei*).
- **H1:** No existe riesgo ambiental del uso combinado de Carbofurán y Carbendazim en lombrices adultas (*E. andrei*).

CAPÍTULO II

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Suelo.

El suelo es el medio en donde se desarrolla la vegetación y multitud de otros organismos, sin embargo, actualmente es atacado por los seres humanos ocasionando fenómenos como la erosión o desertificación, es decir, no se toma en cuenta que este manto supone un sustento físico y biológico para una gran cantidad de seres vivos (Moreno, 2013).

Arrazola, (2016). Nos dice que el suelo es considerado como la unidad central de procesamiento ya que posee múltiples funciones. Otorga una fuente de materia prima como en yacimientos de minerales o hidrocarburos económicamente importantes; provee de alimentos y fibras al debido a que es el lugar donde se desarrollan los cultivos y crecen especies forestales; e incluso juega un rol importante al modificar y mitigar los efectos del cambio climático.

2.2 Componentes del suelo.

Para su mejor comprensión y estudio, el suelo puede ser analizado a partir de diferentes puntos de vista, la manera más óptima de detallar esta capa es mediante la organización según los elementos que lo integran, es decir, los componentes orgánicos e inorgánicos (Romero S. H., 2014), tal y como muestra la siguiente tabla:

Tabla 1 Clasificación del suelo según los componentes

Componentes Orgánicos	Componentes Inorgánicos
• Vegetales.	• Roca Madre.
• Hongos y microorganismos.	• Minerales silicatos.
• Animales.	• Minerales arcillosos

Fuente: (Romero S. H., 2014)

2.2.1 Componentes orgánicos.

También llamados humus o mantillo, su origen proviene de los restos descompuestos de vegetales y animales o por la putrefacción ocasionada por microorganismos ricos en ácidos húmicos que ayudan a la formación de sales (Martinez, 2011). Dentro de los componentes orgánicos del suelo se tiene:

- **Vegetales:** La vegetación tras morir y oxidarse lentamente formará humus, sin embargo, mientras las plantas aún están con vida, actúan como sostén de los suelos y contribuyen con la degradación de la roca madre (Martinez, 2011).
- **Hongos y microorganismos:** Encargados de descomponer la materia vegetal. En climas húmedos las bacterias se desarrollan lentamente formando un cúmulo de humus, mientras que, en zonas tropicales, la acción de las bacterias es intensa restringiendo la formación de humus y formando ácidos orgánicos (Martinez, 2011).
- **Animales:** Tienen una acción mecánica y escasa considerando su número y distribución por área, su labor se reduce a remover la tierra, modificar la composición química del suelo, entre otros (Martinez, 2011).

2.2.2 Componentes inorgánicos.

Son los minerales que varían de acuerdo a las condiciones del medio ambiente y roca madre, son abundantes, diferentes y provienen de la meteorización de rocas (Moreno, 2013). Los más fundamentales son:

- **Roca madre:** Roca disgregada que forma el suelo, puede derivar de la formación in situ o mediante la transportación de elementos debido a factores externos (Moreno, 2013).

- **Minerales silicatos:** Minerales abundantes que corresponden al 95% de la corteza terrestre, bajo en nutrientes y formados a partir de silicio y oxígeno que se coordinan en estructuras (Moreno, 2013).
- **Minerales arcillosos:** Minerales de tamaño reducido que tienen la propiedad de cargar negativamente la superficie. Poseen una alta capacidad de absorción de cationes generando propiedades químicas y físicas en los suelos, además son ricos en nutrientes, aunque mal aireados e impermeables (Moreno, 2013).

2.3 Materia Orgánica en el suelo.

La materia orgánica presente en el suelo es de origen vegetal y animal, principalmente el origen son los residuos vegetales ya que éstos son una fuente de aporte de energía, alimento para los organismos vivos presentes en el mismo, aquí también la materia prima juega un papel muy importante ya que esta da formación a los coloides orgánicos es decir al humus que se aglomera en el superficie del suelo (Jaramillo, 2013).

La velocidad de la materia orgánica también está conformada por tres factores esenciales que interaccionan en un ciclo biológico de forma natural entre ellas está la composición de todos los organismos vivos del suelo, el medio físico es decir el oxígeno, humedad y la temperatura, finalmente también está la calidad de materia orgánica, aquí es donde los individuos y la interrelaciones entre los mismos establecen una red alimentaria beneficiosa para el suelo (Tomita, 2013).

2.3.1 Tipos de Materia Orgánica.

Según Jaramillo, (2013). Los tipos de materiales orgánicos que se puede apreciar en el suelo, se congregan según el nivel de transformación como se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 2 Tipos de Materiales Orgánicos presentes en el suelo.

Materia orgánica fresca (MF) Órganos	Materia orgánica no húmica (MNH) Compuestos químicos simples	Materia orgánica húmica (MH) Coloides orgánicos
Hojas	Celulosa (15-60%)	Ácido fulvico
Tallo	Hemicelulosa (10-30%)	Ácido himatomelanico
Raíces	Lignina (5-30%)	Acido húmico
Flores	Azucares, aminoácidos y ácidos alifáticos (5-30%)	Humina
Frutos	Grasas, aceites, resinas, ceras y otros pigmentos (1-8%) Proteínas (1-15%)	-

Fuente: (Jaramillo, 2013)

Entre estos compuestos los húmicos, que son totalmente particulares y van de 50 y 85% del total de la materia orgánica presente en el suelo, pero en cuanto se les considera para resultados prácticos la materia orgánica fresca y la materia orgánica no húmica se representan como un solo conjunto de materiales orgánicos (Jaramillo, 2013).

2.4 Microorganismo y Macroorganismos benéficos para el suelo.

Los macro organismos y microorganismos presentes en el suelo, son de vital importancia para la salud del mismo, además sus interacciones crean una estructura alimenticia; la energía que estos necesitan para todos los niveles alimenticios son generadas por los productores primarios es decir las plantas, líquenes, musgos, bacterias fotosintéticas y algas que utilizan la luz solar para procesos de transformación de dióxido de carbono (CO₂) proveniente de la atmosfera en carbohidratos, en su mayoría todos los organismos están de manera dependiente de todos los productores primarios para recibir energía y nutrientes a estos los llamamos consumidores es decir que dependen de un nivel a otro (Tomita, 2013).

Los microorganismos presentes en el suelo como las bacterias y los grandes invertebrados como las lombrices de tierra ayudan al suelo a descomponer y degradar los residuos de todos los cultivos a través de su ingestión y previamente con la composición de los minerales madre, en dicho proceso además se almacena energía y nutrientes de todas las plantas (Campos, 2013).

Tabla 3 Clasificación de todos los organismos presentes en el suelo.

Microorganismos	Microflora	<5 μm	Bacterias
	Microfauna	<100 μm	Hongos
Macroorganismos	Mesoorganismos	100 μm –	Protozoarios
	Macroorganismos	2mm	Nematodos
		2 – 20 mm	Lombrices
			Milpiés
			Barredor de madera
		Caracoles y babosas	
Plantas	Algas	10 μm	
	Raíces	>10 μm	

Fuente: (Jaramillo, 2013)

Estos son todos los organismos presentes en el suelo, y cada uno de estos cumple una función específica, en todos y cada uno de los procesos de reciclaje de nutrientes en el suelo. En el presente trabajo se enfoca y se hace énfasis a las lombrices de tierra que son los macro organismos, que causan el inicio de la actividad de los microorganismos a través de la fragmentación de toda la materia orgánica, como los hongos y bacterias, también incitan al crecimiento de todas la raíces en la franja del subsuelo que es complementario para la reserva de nitrógeno en las galerías que la lombrices realizan, y esto hace que este proceso sea hasta cuatro veces superior al nitrógeno existente en la parte inferior de los suelos. (Jaramillo, 2013).

2.4.1 Importancia de los Mesoorganismos y Macroorganismos en el suelo.

Son importante en el aprovechamiento de materia orgánica benéfica para el suelo, aunque hay que tener ciertos cuidados puesto que estos se pueden convertir en plagas para las diferentes plantas o cultivos. La Lombriz lleva consigo diferentes acciones a lo largo del tiempo ya que optimizan entornos, al aumentar los nutrientes esenciales para plantas y a su vez mejorar la biomasa además aumenta cuantiosamente los niveles de P^{5+} , K^+ y C^{4+} ; las hormigas que aportan al suelo mejorando la disponibilidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; las termitas ayudan a aumentar el Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , P^{5+} y C^{4+} ; otros organismos como los ciempiés, escorpiones, arañas, colémbolos y coleópteros son en su mayoría predadores ya que equilibran las poblaciones de muchos otros organismos, creando galerías y agujeros en el suelo para mejorar la aireación, permeabilidad, algunos de estos recogen materiales finos para crearse sitios donde anidar y a su vez que van afinan la textura de los suelos (Campos, 2013).

2.5 Ventajas de la lombriz de tierra en los suelos.

De acuerdo con Ríos, (2010). La lombriz de tierra posee ventajas beneficiosas en cuanto a una buena calidad del suelo, entre ellas se mencionan:

- Ayudan al incremento de nutrientes (N^{3-} , P^{5+} , y K^+), en cuanto a su disponibilidad.
- Aumentan los niveles de degradación de la materia orgánica ayudando a agregar litter y reactivar los procesos de mineralización y humificación, además también mejora la agregación.
- Eliminan del suelo a organismos que presente un peligro o estén enfermos y sean perjudiciales para la salud del mismo.
- Aumentan considerablemente la cantidad de microorganismos beneficios para la calidad de los suelos.

2.6 Degradación de Suelo.

La degradación del suelo altera las propiedades y disminuye la capacidad actual y potencial del mismo para producir bienes o servicios. Es decir, el suelo es un bien que al ser destruido puede afectar tanto social como ambientalmente a los seres vivos. El proceso de degradación mostrado en la Figura es el principal problema que ocasiona devastación del suelo (Martínez, 2011).

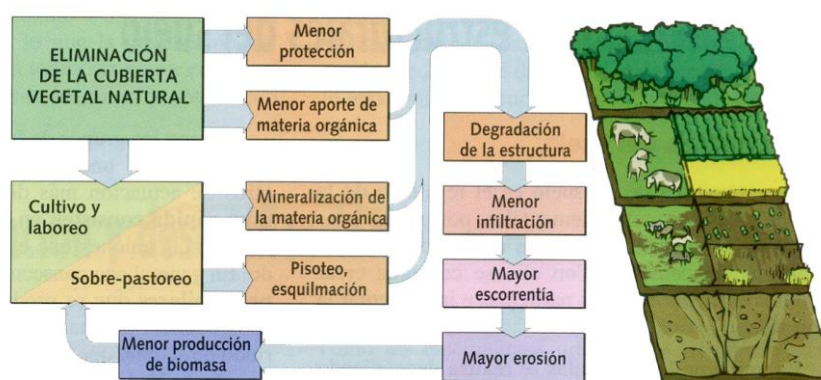


Figura 1 Proceso de degradación del suelo.

Fuente: (Martínez, 2011)

Martínez, (2011). Indica que la destrucción de esta capa superficial causa problemas a nivel socio-ambiental difíciles de superar como los citados a continuación:

- Disminución del rendimiento de cultivos.
- Aumento de los costos de la agricultura.
- Contaminación de embalses, ríos y sistemas de drenajes naturales o artificiales.
- Pérdida de recursos naturales.
- Explotación de aguas subterráneas.
- Deterioro de la calidad de vida.
- Desertificación.

2.7 Uso de agroquímicos en la Agricultura.

Jaramillo, (2013). Menciona que el uso de estos compuestos en la agricultura es de gran variedad, en la practicas agrícolas se usa un sin número de plaguicidas y pesticidas entre ellos está herbicidas, fungicidas, nematicidas y acaricidas, pero cabe recalcar que uso de los mismos genera perturbaciones a la biota del suelo. A continuación se puede acotar algunas de las generalidades:

- Ciertas aplicaciones de herbicidas en dosificaciones estandarizadas no poseen efectos agresivos en la respiración del suelo, pero por el contrario si estas se aumentan el resultado es altamente peligroso para la vida biológica de los suelo.
- Para los tratamientos en donde se hace uso de fungicidas se visualiza aumento de las dosis de amonio, sin embargo si se usa insecticidas el flujo de amonio se vuelve una causa de amonificación para el mismo.
- En cuanto a la persistencia en el suelo los fungicidas pueden durar unos cuantos meses en el suelo, pero a su vez también son potenciales inhibidores de nitrificación.
- Algunos de los insecticidas, nematicidas y fungicidas derivados de carbamatos, benzimidazoles tiene incidencia sobre poblaciones de microorganismos benéficos.
- Muchos de los principios activos de fungicidas afectan a la fijación biológica de nitrógeno.

2.8 Contaminación de Suelos por el uso de Agroquímicos.

La contaminación de suelos viene dada principalmente por el uso excesivo de plaguicidas tanto en su aplicación directa en distintos cultivos agrícolas, así como también por el mal manejo final de los residuos, es decir un lavado incorrecto de los tanques de almacenamiento, fugas de los depósitos contenedores y derramamientos por accidente; la mezcla de todos estos factores conlleva a que los plaguicidas se dispersen en el ambiente y se conviertan en contaminantes para animales, plantas, suelo, agua, aire y así se vea

afectado su equilibrio, convirtiéndose en un peligro para la salud de estos dos sistemas (biótico y abiótico). Así mismo una vez que los plaguicidas se incrustan en las cadenas alimenticias éstos se van agregando simultáneamente hasta llegar a una concentración letal a organismos que componen la cadena o a su vez a elevaciones mayores de toda la sucesión trófica (Del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014).

2.9 Persistencia de los plaguicidas en los suelos.

La persistencia de estos compuestos varía dependiendo del tipo de suelo y de la biodisponibilidad como: la naturaleza del plaguicida, el clima, es decir el tiempo de permanencia que este tenga en la actividad biológica de los suelos, sin embargo, en varios análisis se demuestra que los plaguicidas más persistentes son los organoclorados que van de 1 a 10 años de persistencia en el suelo, seguidos por los carbamatos que van de 3 a 18 meses, a estos le siguen los ácidos alifáticos y las triazinas ya que son de amplio espectro. Estas sustancias químicas se retienen dejando un residuo en la parte superior de los terrenos, por lo tanto el efecto se refleja en las próximas siembras, por ello se recomienda realizar un tratamiento antes del cultivo, ya que si los suelos no son tratados cada año los niveles de residuos van aumentando hasta resultar extremadamente tóxicos para plantas y la biota del suelo originando que éste no tenga buena calidad (Sánchez & Sánchez, 2010).

2.10 Afectación de los Plaguicidas a la lombrices de tierra.

Las lombrices de tierra en todas sus especies ya sea *Lombricus terrestris*, *Eisenia fétida* ó *Eisenia andrei* se ven afectadas por los altos niveles de plaguicidas presentes en los suelos; a estas especies de macroinvertebrados les afecta la toxicidad de los químicos por ser altamente sensibles. Algunos de los plaguicidas más tóxicos para estos individuos son los carbamatos, benzimidazoles y triazinas ya que son extremadamente tóxicos y presentan persistencia en suelos; por otro lado, están los herbicidas que poseen baja toxicidad, aunque estas sustancias actúan por los grados de dosificación, y finalmente está el grupo de los organoclorados que poseen algunos efectos de toxicidad sobre lombrices

de tierra debido a los principios activos que éstos contienen además de ser unos de los plaguicidas extremadamente tóxicos para la micro fauna del suelo (Rios, 2010).

2.11 Aspectos biológicos de *Eisenia andrei*.

Las especie de lombriz *E. andrei* en su etapa adulta llega a medir 5 a 9 cm como se menciona por (Cerdas, 2015). Muestra a lo largo de su cuerpo un número de 80 a 100 segmentos en total, que en su etapa adulta se puede mirar claramente un engrosamiento, en la zona anterior del espécimen, llamado clitelo, que posee un número determinado de segmentos que van de forma continua; además también presenta una parte glandular que no es notoria porque ésta se desarrolla cuando *Eisenia* alcanza su etapa de madurez sexual, es decir solo en sus períodos de reproducción. Una de las principales funciones que está ligada con la reproducción para la formación de los cocones ya que estos contienen los huevos fecundados (Piola, 2011).

Domínguez, (2010). Menciona que *E. andrei* es un tipo de lombriz conocida también como lombriz roja común cuya forma y color son uniformes, es utilizada a nivel mundial para el reciclaje de residuos orgánicos mediante vermicompostaje. El uso de la misma se debe a que es ubicua con una distribución cosmopolita, tiene ciclos de vida medios, rangos amplios de tolerancia a la temperatura y humedad, y un manejo relativamente sencillo, por lo que es la especie más utilizada en estudios de Eco toxicidad en suelos.

De acuerdo a la literatura, se estima que hay unas 8500 especies de lombrices, entre las cuales la más conocida es la lombriz de tierra o *Lumbricus terrestris*; sin embargo, para el manejo de desechos orgánicos se usan especies con alta voracidad y resistencia tales como la *Eisenia foetida/Eisenia andrei* (Cerdas, 2015). Es fácil confundir estos tipos de especies ya que son muy afines y están estrechamente relacionadas, incluso a nivel morfológico y según parámetros biológicos presentan similitudes. Para entender de mejor manera a cada una de las especies mencionadas, se representa en la Tabla 4 datos importantes de las mismas.

Tabla 4 Diferencias entre especies de lombriz

Características	<i>Eisenia foetida</i>	<i>Eisenia andrei</i>	<i>Lombricus terrestris</i>
Color	Rojo pardo	Rojo fresa	Café oscuro
Tamaño (cm)	7-8	5-9	9-30
Peso (g)	0,30-0,50	0,30-0,50	0,50-1
Reproducción	Alta	Alta	Baja
Capsulas, capullos	1 cada 7 días	1 cada 5 días	Hasta 12 por año
N° de lombrices/capsula	De 6 a 8	De 6 a 11	De 1 a 2
Ciclo de vida	De 90 a 100 días	De 80 a 90 días	180 días
Adaptabilidad	De 0 a 3000msnm	De 0 a 3000msnm	Zonas tropicales
Voracidad	Alta	Alta	Baja

Fuente: (Cerdas, 2015)

2.12 Anatomía sistemática de las lombrices.

Las lombrices de tierra son organismos segmentados, cilíndricos que carecen de ojos. Presentan filamentos semejantes a pelos de diferentes tamaños llamados sedas o quetas, y pese a su aparente simplicidad, son estructuras vivas complejas que se adaptan a la vida terrestre o acuática. El tamaño de las lombrices es muy variable, su longitud depende de la especie al igual que el color de su cuerpo. En resumen, se puede decir que estos animales pertenecen a los anélidos (cuerpo anillado) y oligoquetos (anillos con pocas quetas) en los que se distingue con facilidad una cabeza, un tronco y una región terminal que lleva al ano (Soriano, 2015). Sistemáticamente se puede apreciar las siguientes partes en una lombriz:

2.12.1 Pared del cuerpo.

Consta de un tegumento que cubre toda la epidermis, tiene células secretoras de moco y sedas o quetas, su musculatura es bien desarrollada y en general está compuesta por una capa

externa con fibras circulares y otra interna con fibras longitudinales. La forma del cuerpo es circular cilíndrica y permeable de secado rápido, esta habilidad juega un papel muy importante en el intercambio gaseoso (Pineda, 2006).

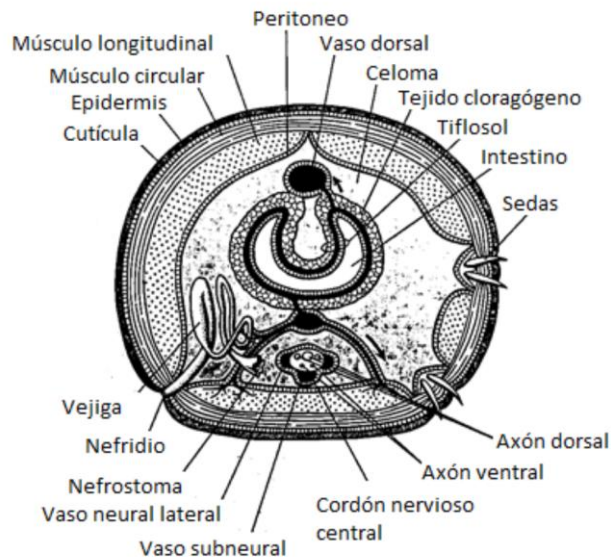


Figura 2 Pared del cuerpo.
Fuente: (Arrázola, 2016)

2.12.2 Sistema digestivo.

Las lombrices se alimentan por succión ya que carecen de dientes o mandíbula, su principal alimento proviene de microorganismos o materia orgánica en descomposición presente en los suelos. El sistema digestivo de una lombriz es recto y simple, inicia con la boca que se conecta a estructuras como la faringe, el buche, la molleja hasta llegar al intestino el cual termina en el ano. La cantidad de desechos que excreta esta criatura es el 40% de lo que come (Soriano, 2015).

El aparato digestivo es tubular y muy completo, el trayecto del alimento inicia con la boca, continua por la faringe la cual segrega mucus que sirven para humedecer el alimento; le sigue el buche que tiene como función el almacenamiento temporal; después, la comida es triturada al pasar por la molleja y llevada hacia el intestino que realiza la digestión y absorción, finalmente los alimentos que no pueden ser digeridos son excretados por el ano. La lombriz tiene dos estómagos,

uno interior de pared delgada y uno posterior de pared gruesa que logran cumplir con las funciones alimenticias necesarias (Diaz, 2002).

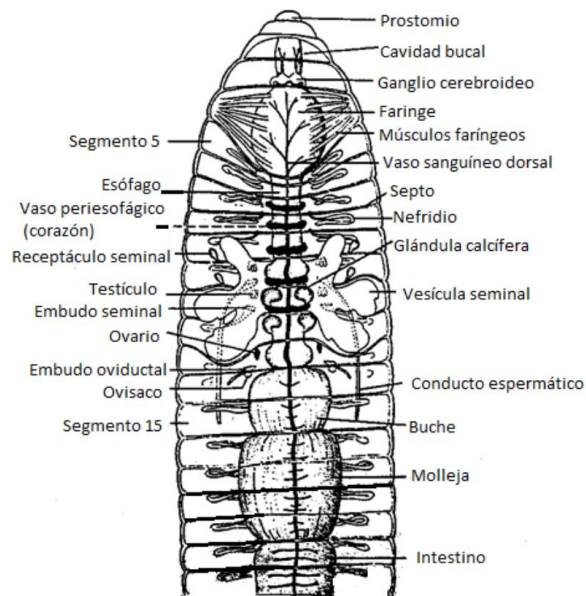


Figura 3 Sistema digestivo.
Fuente: (Arrázola, 2016)

2.12.3 Sistema excretor.

La eliminación de desechos líquidos es realizado a través de una red de estructuras llamadas nefridios, estos se encuentran de dos en dos en casi todos los segmentos del cuerpo; son parecidos a un cuerno de vaca, la extremidad más abierta se encuentra sumergida en el celoma y se abre al exterior en poros uriníferos (Pineda, 2006) . Los nefridios tienen tres funciones principales:

- **Filtración:** Depende si el nefridio es abierto o cerrado, en el primer caso ésta se da en el nefrostoma, y en el otro a través de las paredes (Pineda, 2006).
- **Reabsorción:** Se da para las sustancias útiles como la glucosa y los aminoácidos (Pineda, 2006).

- **Transformación química:** La orina está compuesta por restos proteínicos, úrea y amoníaco. Los niveles de úrea dependen de la dieta y condiciones del animal (Pineda, 2006).

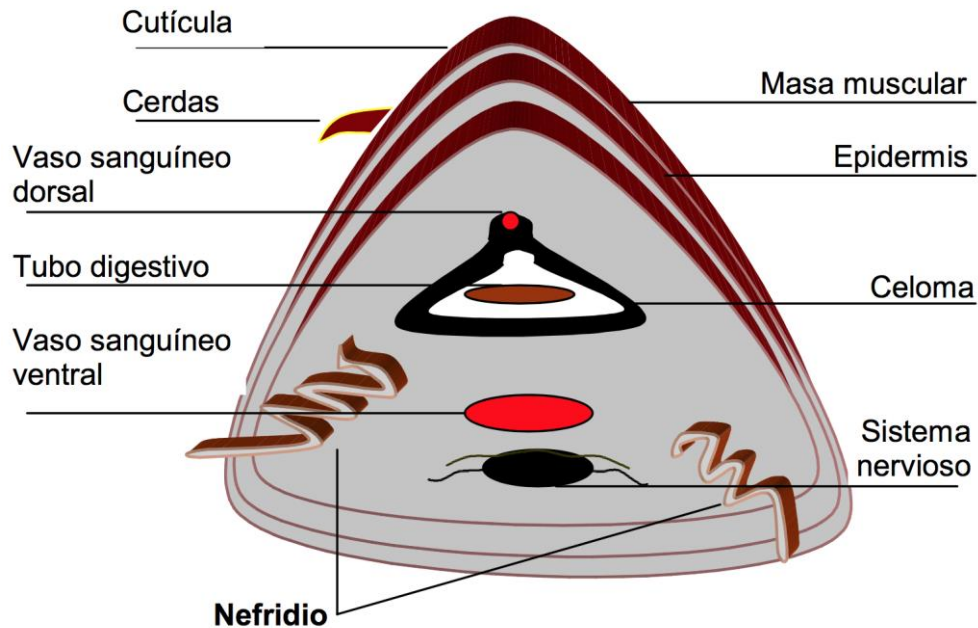


Figura 4 Ubicación de los nefridios.
Fuente: (Díaz, 2002)

2.12.4 Sistema nervioso.

Es de tipo ganglionar, es decir, posee dos ganglios cerebrales dorsales unidos por la comisura transversal. De estos parten dos tiras laterales dirigidas hacia atrás y hacia abajo donde se conecta a otros ganglios formando una especie de escalera. Este sistema es el centro de control motor y de reflejos vitales (Díaz, 2002).

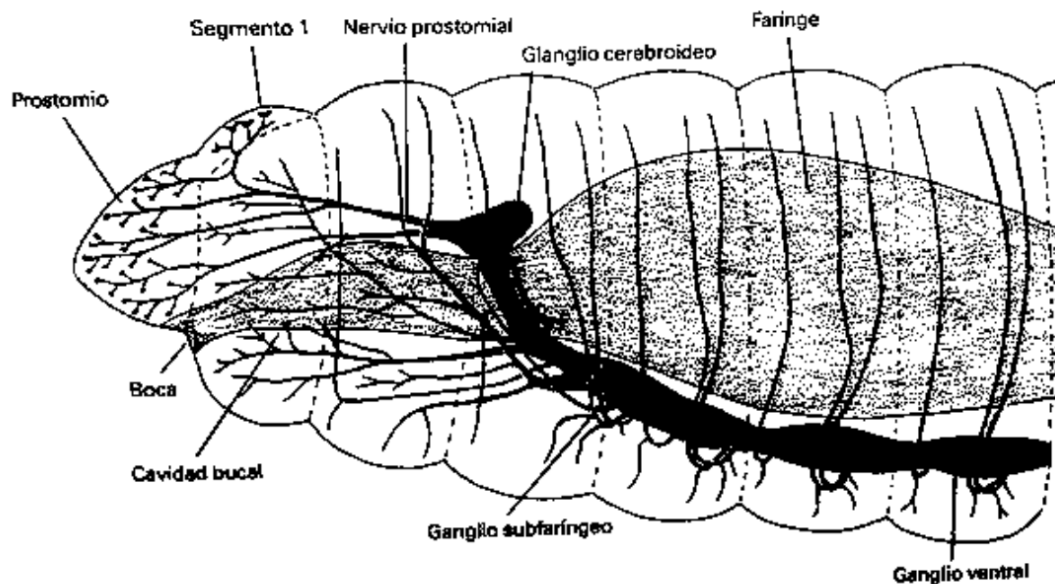


Figura 5 Sistema nervioso.
Fuente: (Arrázola, 2016)

2.12.5 Sistema neurosensorial.

La lombriz carece de ojos, posee una piel con células fotosensibles lo que significa que es sensitiva a la luz y no puede estar expuesta mucho tiempo a ella porque muere, esto es importante para su comportamiento ya que en el día las lombrices se esconden y realizan trabajo de minado, mientras que en la noche salen a la superficie. Posee células neurosensoriales que perciben las vibraciones y una alta reacción a la temperatura, además, presentan una quimio recepción desarrollada que les permite detectar y capturar el alimento, proveer información sobre el ambiente y facilitar el proceso de reproducción (Pineda, 2006).

2.12.6 Sistema reproductivo.

Las lombrices son hermafroditas, es decir, están dotadas de órganos sexuales masculinos y femeninos, pero son incapaces de auto fecundarse y se reproducen recíprocamente por fecundación cruzada. El sistema reproductor masculino está formado por dos pares de testículos, los espermatozoides producidos son almacenados en reservorios y luego son expulsados a los poros masculinos; el sistema reproductivo femenino está formado por dos pares de ovarios, su

finalidad es la de producir óvulos que son recogidos por los embudos ovulares y expulsados a través de poros femeninos (Soriano, 2015).

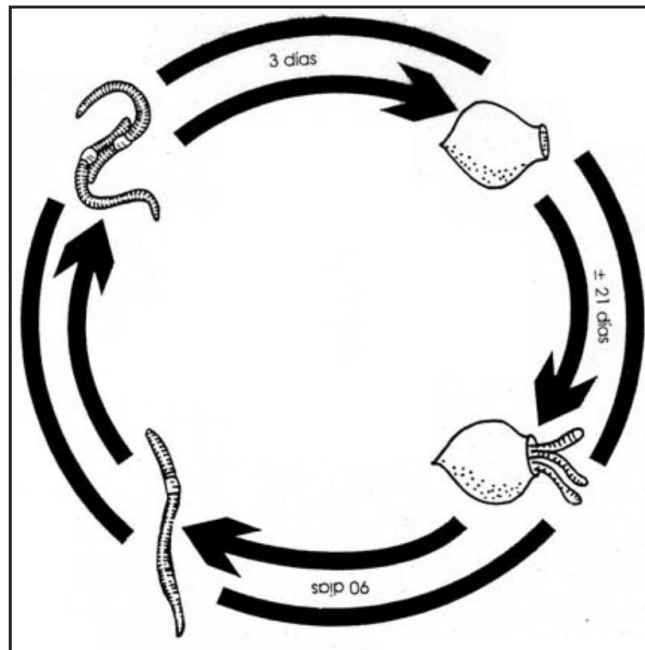


Figura 6 Ciclo de vida de la lombriz.
Fuente: (Martinez, 2011)

Martínez, (2011). Menciona que debido a que las lombrices no son capaces de auto fecundarse, se ven obligadas a intercambiar esperma para poder fecundar los óvulos, éstas a su vez liberan unas estructuras pequeñas en forma de peras conocidas como cápsulas, capullos o cocones con huevecillos fecundados en su interior; éstos tardan en madurar y eclosionan siempre y cuando tengan las condiciones adecuadas.

2.13 Lombrices de Tierra utilizadas como Bioindicadores de Calidad de Suelos.

Las lombrices de tierra *Eisenia foétida* y *Eisenia andrei* son utilizadas en pruebas de toxicidad y a su vez como bioindicadores de la calidad, vida y salud de los suelos, ya que son altamente sensibles porque pueden ofrecer innumerables estudios de perturbaciones ambientales producidas por agroquímicos, metales pesados, antibióticos, productos de uso veterinario (De Andréa, 2010).

Por otro lado también las lombrices de tierra vermicomposteras se utilizan para medir el estado edáfico del suelo a través de ensayos y pruebas de toxicidad letal o subletal, estos oligoquetos son ampliamente utilizados por su singular particularidad debido a que poseen una movilidad extremadamente moderna, sus ciclos de vida son largos, y en ambientes completamente adecuados no mueren a menos que exista una perturbación extrema en su entorno, los patrones potencialmente de bioindicadores han logrado destacar su comportamiento al observar como las lombrices seleccionan su propio hábitat de acuerdo a sus composiciones físicas, químicas y también biológicas, para así poder darnos respuestas globales, porque muchos de los estudios físicos químicos solo nos muestran una realidad instantánea de perturbaciones ambientales y no respuestas mediante pruebas biológicas que indiquen como se afecta la salud de los suelos por medio de las prácticas agrícolas intensivas (Momo & Falco, 2003).

2.14 Estudios eco toxicológicos con Lombriz roja (*Eisenia andrei*) como bioindicador.

Las especies más utilizadas en diferentes estudios ha sido *Eisenia andrei* y *Eisenia foetida* como se detalla a continuación:

Una investigación realizada por Gómez, (2014), para la evaluación de toxicidad en suelos utilizando *Eisenia foetida* a través de un bioensayo, estableció una metodología utilizando el protocolo experimental de la OECD para evaluar tres zonas industriales en Colombia en donde se observó la mortandad en puntos finales con el fin de realizar un análisis sobre el potencial bioindicador en la calidad de los suelos.

En estudios realizados por Corona y Cram, (2010), sobre el daño genotóxico por la acumulación de plaguicidas en lombriz de tierra (*Eisenia andrei*), como una estrategia para la caracterización toxicológica en suelos altamente contaminados, donde de igual forma se trabajó con un bioensayo estandarizando y utilizando de la misma manera el protocolo impartido por la OECD para pruebas eco toxicologías con lombrices de tierra composteras y dando como resultado

positivo en cuanto a daños en el ADN con lombrices sometidas a diferentes concentraciones de plaguicidas como Cartap, Carbofurán, Benomyl.

De la misma manera un estudio elaborado por Piola, (2011), en Argentina mostró que las lombrices de tierra son altamente evaluativas como bioindicadores de calidad en suelos en pruebas de laboratorio y campo, en donde *Eisenia andrei* fue expuesta a diferentes plaguicidas como: Cartap, Carbendazim, Glifosato y Clorpirifos en sustrato artificial y mostraron además ser altamente sensibles a diferentes concentraciones y teniendo un alto valor relevante para determinar contaminaciones a largo plazo ya que estos individuos se comportan de acuerdo al medio.

Según las investigaciones de Tecuapetla, (2014), elaboradas en la Universidad Autónoma del estado de México, en donde evaluaron el potencial bioindicador de *Eisenia andrei* y el riesgo eco toxicológico producido por la cantidad residual de varios plaguicidas, dando como resultado un nivel de toxicidad y afectación sobre esta especie, por ende se concluye que el abuso de estos agroquímicos en concentraciones altas afectan de manera singular a organismos no blanco ya que muchos de estos individuos presentaron alteraciones en su cuerpo como cambio de color, enrollamientos y quemaduras que produjeron su mortandad.

2.15 Bioensayos eco toxicológicos.

Los bioensayos o ensayos biológicos son un conjunto de pruebas en las que se utilizan organismos vivos para detectar la presencia o efectos de una o más sustancias tóxicas, así como, para determinar el límite de tolerancia de dichas sustancias con respecto a organismos. Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico que permiten comprobar los efectos físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales controladas (Bravo, 2012).

Con un bioensayo se establece la magnitud de una sustancia o de un material a partir de respuestas producidas por organismos biológicos, entre los elementos más usados para este tipo de pruebas se encuentran las drogas, hormonas, agentes cancerígenos, agentes toxicológicos u otros, que según la dosis administrada otorgan resultados diferentes (Barros, 2014).

Gómez, (2014), menciona a los bioensayos de eco toxicidad o ensayos toxicológicos que poseen el objetivo de estipular las dosis que se dan para un toxico y que estos generan efectos dañinos alarmantes en un organismo no blanco o cualquier otro que se someta a dicha evaluación; estos efectos a su vez incluyen varias etapas como el cambio de vida, modificación en el control de crecimiento y alteraciones reproductivas en todos los individuos, de acuerdo a la información que estos bioensayos arrojen se puede subordinar en ensayos de toxicidad aguda, ensayos de toxicidad crónica es decir subletales y letales. Los iniciales se dan de acuerdo a la muestra de individuos de una especie en específico a una sucesión de dosis crecientes de un contaminante en particular en condiciones de laboratorio durante un periodo corto de tiempo, con la finalidad de evaluar la mortalidad que es una consecuencia y el rango toxico que es la dosis letal media (DL50%) mientras que los crónicos estudian el resultado en los organismos después de un tiempo prolongado; aquí se toma en cuenta como resultado el desarrollo y la reproducción, encontrado los rangos óptimos más bajos de toxicidad y por ende lo más altos que son los más significativos.

2.15.1 Bioensayos con lombriz de tierra (*Eisenia fetida/andrei*) en suelos.

Por su singularidad las lombrices de tierra vermicomposteras son eventualmente una de las más utilizadas como organismos no blancos para pruebas de toxicidad en sistemas terrestres, debido a su fácil manejo y adaptabilidad (Gómez, 2014).

El mismo autor indica que los bioensayos con lombriz de tierra en sus dos especies más utilizadas, posee un proceso experimental que puede ser efectuado con una orientación predictiva para anticipar impactos ambientales severos. Sin embargo, según el objetivo que se quiera realizar en la implantación de bioensayos con estas especies cambia, ya que el método esta universalmente estandarizado por la norma 207 de la OECD.

2.15.2 Procesos experimentales para la medición de toxicidad utilizando lombrices de tierra.

Gómez, (2014), menciona que para la experimentación con *Eisenia andrei/foétida* sometida a varios químicos bien sea plaguicidas, antibióticos, hidrocarburos, metales pesados en suelos, existen varios modelos que se detallan continuación:

- Ensayos de Inmersión: Estos se realizan cuando se las introduce a las lombrices por un período de tiempo, estableciendo previamente las soluciones que contengan las dosis letales o subletales de los químicos (Gómez, 2014).
- Ensayos de acuerdo a la aplicación tópica: Se emplea los químicos solo en la capa superficial del cuerpo de la lombriz utilizando pinceles o aplicadores y se visualizan las tasas de mortandad de acuerdo al post tratamiento en un período de tiempo conforme vayan reaccionado los organismos (Gómez, 2014).
- Ensayos de inyección: Se utiliza varias soluciones de químicos de prueba que son inyectados en la cavidad celómica de las lombrices para ser depositadas en el suelo de prueba, una vez realizado este proceso, se analiza las controles de mortalidad de acuerdo al post tratamiento (Gómez, 2014).
- Ensayos de alimento retenido: Se somete a la lombrices inyectando en el esófago de cada una de ellas los químicos de prueba mediante la preparación previa en agar nutritivo y posteriormente a los individuos se les coloca en papel filtro humedecido, luego de esto se hace la evaluación de mortandad (Gómez, 2014).
- Ensayos de alimento facultativo: A las lombrices se les coloca alimento previamente contaminado para proceder seguidamente a evaluar las tasas de mortalidad y observar sus reacciones (Gómez, 2014).
- Ensayos utilizando Artisol: Se prepara grupos de lombrices en una matriz de sílice previamente humedecida, luego se emplean químicos de prueba que son suspendidas con esferas de vidrio durante un período de exposición (14 días) para evaluar las controles de mortalidad (Gómez, 2014).

- Ensayos de embudo: Se colocan embudos rellenos de suelo y se coloca a las lombrices y después de un período de tiempo; cuando los organismos hayan realizado su aclimatación al medio se suministra dosis de químicos al área del suelo para determinar los mecanismos que éstas toman y la mortalidad que presentan (Gómez, 2014).
- Ensayos de contacto con papel filtro: Se someten a las lombrices a contacto con papel filtro sometido a varias concentraciones de contaminante para después colocar en frascos de vidrio y hallar su dosis letal o subletal, antes de estar ser sometida a muestra de suelo en una duración de 48 a 72 horas aproximadamente (Gómez, 2014).
- Ensayos con suelo artificial: Se dispone una fórmula estandarizada de suelo artificial y seguidamente se mezcla con la dosis de contaminante de prueba para luego proceder a adicionar las lombrices a cada dosificación, al cabo de esto se determina la mortalidad en el día 7 y el período final de prueba a los 14 días, debido a que los químicos de acuerdo a su comportamiento en el suelo se pueden volatilizar (Gómez, 2014).
- Ensayos con suelo natural: Se introducen diferentes dosificaciones de contaminantes químicos de prueba en suelos que estén limpios, es decir, en estado natural al 100% debido a que si las muestras poseen una cantidad residual de xenobióticos, estos podrían influir en su comportamiento y dañarían la prueba, de la misma manera se realiza los análisis al día 7 y el período final a los 14 días (Gómez, 2014).

Bravo, (2012), nos dice también que todo estos tipos de experimentación en bioensayos de toxicidad aguda o crónica con lombriz de tierra roja californiana se debe mantener en escenarios adecuados a los medios naturales de estas especies y haber sido aclimatadas anteriormente. Al terminar el bioensayo se debe también medir y rastrear los efectos negativos biológicos como la mortalidad, el comportamiento, coloración, si hubo o no reproducción y pérdida o ganancia de peso por individuo que los contaminantes provocaron en las diferentes concentraciones que estas especies fueron sometidas, para proceder finalmente a realizar un análisis cuantitativo de todos los datos obtenidos.

2.16 Plaguicidas a usar en la presente Investigación.

2.16.1 Carbofurán.

Carbamato sistémico con actividad insecticida, nematocida y acaricida de uso agrícola e industrial. Actúa por contacto sobre nematodos e insectos de suelo y por ingestión sobre insectos chupadores y masticadores en los que interfiere directamente a la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. (Agromed, 2014).

2.17 Propiedades físico-químicas del Carbofurán.

El Carbofurán posee un amplio espectro, fue manufacturado y comercializado por la corporación norteamericana FMC en la década de los 60 bajo el nombre de Furadan 4F. La fórmula química de este compuesto es $C_{12}H_{15}NO_3$, nombre químico: 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil-carbamato, nombre común: Carbofurán (ANSI, ISO), su peso molecular es de 221.26 g, se encuentra dentro de la clasificación de Carbamatos y su estructura química es la siguiente (Governor, 2012):

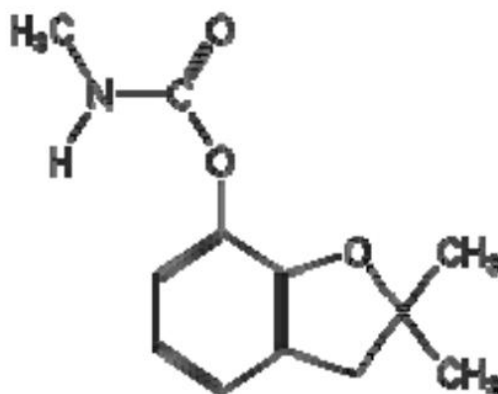


Figura 7 Estructura química del Carbofurán.
Fuente: (Governor, 2012)

Esta sustancia es soluble en agua, acetona, acetonitrilo, benceno, dimetilformamida y ciclohexanona, pero poco soluble en xileno y éter de petróleo. Nos es corrosivo y se descompone

al calentarse produciendo gases tóxicos incluyendo a los óxidos de nitrógeno (Nufarm, 2011). Las propiedades físico-químicas de este compuesto están expuesta a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5 Propiedades físico-químicas del Carbofurán.

Aspecto físico	Líquido blanco
Olor	Fenol leve
pH	3,3
Densidad relativa	1,075 g/ml
Tremp. De descomposición	130 °C
Punto de fusión	N.A. 153-154 °C
Punto de inflamación	90,6°C
Flamabilidad	Ligeramente combustible
Límites de inflamación	LFL Y UFL
Presión de vapor	0,031 mPas
Solubilidad en agua	351 mg/l

Fuente: (Nufarm, 2011)

2.18 Clasificación Toxicológica.

Según la OMS se clasifica a esta sustancia como del tipo 1B, lo que significa “altamente peligroso”. Si bien no aparenta ser mutagénico, estudios toxicológicos en ratas han revelado que, a diferentes dosis se tiene diferente porcentaje de inhibición de la enzima colinesterasa. La inhibición de la enzima es la raíz de los impactos en la salud humana y en la vida salvaje (Santucho, 2012).

2.19 Aplicaciones

Se aplica en dosis dada por el fabricante en suelo a través de riego por goteo o utilizando la técnica drench, en los cultivos en invernadero y a campo a abierto realizando un ligero surco alrededor

de la planta formando un círculo de 10 cm de radio aproximadamente en el caso de ser suelo directo, semillas o en plantaciones mayores se detallan a continuación (Nufarm, 2011).

- **Para aplicación al suelo:**
 - Granulado, ingrediente activo de: 30, 50 y 100 (I.A. /Kg o L).
 - Solución concentrada acuosa, ingrediente activo de: 350 (I.A. /Kg o L).
 - Suspensión acuosa, ingrediente activo de: 360, 399 y 500 (I.A. /Kg o L).

- **Para tratamiento de semillas para siembra:**
 - Suspensión acuosa, ingrediente activo de: 300 y 315 (I.A. /Kg o L).

- **Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas:**
 - Polvo técnico, ingrediente activo de: 750, 850, 950, 980 (I.A. /Kg o L).
 - Sólido técnico, ingrediente activo de: 950, 970 y 980 (I.A. /Kg o L).

2.20 Utilización en cultivos.

Su eficacia se reduce en condiciones secas, puede utilizarse en todos los tipos de suelos minerales y orgánicos evitando aquellos húmedos o encharcados; cabe recalcar que la eficiencia del tratamiento puede disminuir cuando la biodegradación es rápida. No se recomienda aplicar en un mismo lugar más de 1 vez en 2 años con el fin de reducir el riesgo de estimular la biodegradación, Carbofurán se aplica en cultivos como (Agromed, 2014):

- En zanahorias, su uso está limitado solo se aplica a las cultivadas en suelos minerales.
- En cebollas sólo se debe usar en aquellas que se van a recolectar como bulbos maduros.
- En fresas debe ser aplicado después de la última cosecha del año.
- En arroz se debe aplicar antes de inundar o 3 semanas después de inundar.
- En papas no se debe aplicar con suelos muy húmedos.
- Caña de azúcar, sorgo, café, cereales, tomate de mesa, pimiento debe ser aplicado al principio de la siembra.

2.21 Precauciones.

Si bien los fabricantes afirman que la seguridad de este producto está dada por su uso apropiado, estudios afirman que las mismas se basan en la suposición de que la vida salvaje no está presente en las áreas donde se desarrolla la agricultura (Santucho, 2012). La peligrosidad del Carbofurán se puede expresar mejor mediante el rombo NFPA 704.

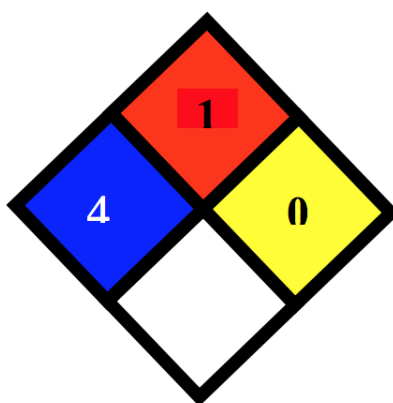


Figura 8 NFPA 704 del Carbofurán.
Fuente: (Nufarm, 2011)

- **Salud (Azul) 4:** Una exposición corta puede causar la muerte o lesiones residuales importantes, aunque se proporcione un rápido tratamiento médico.
- **Inflamabilidad (Rojo) 1:** Debe ser precalentada para que ocurra incendios.
- **Riesgo de explosión (Amarillo) 0:** Normalmente estable, incluso bajo condiciones de incendio.

2.22 Residualidad de Carbofuran.

Su persistencia residual es de 30 a 40 días, su vida media en el suelo es de 30 a 117 días, es decir, posee alta movilidad es móvil en suelo y agua, característica importante ya que por su alta toxicidad puede afectar a peces e invertebrados acuáticos (Agromed, 2014).

2.23 Efectos adverso sobre la salud y el ambiente.

El Carbofurán es un ingrediente activo inhibidor de la colinesterasa, su presencia en hogares es peligrosa por lo que debe estar fuera del alcance de los niños, cabe mencionar que este compuesto puede ser fatal si es inhalado, ingerido o absorbido a través de la piel. Sus efectos atacan directamente a la salud, es un elemento con efectos crónicos, carcinogénicos y sobre todo efectos ambientales (Nufarm, 2011).

2.23.1 Efectos potenciales en la salud.

Tiene la capacidad de ingresar al organismo por medio de inhalación, ingestión y contacto con ojos y piel. El producto puede ser altamente tóxico si se absorbe a través de la membrana mucosa de los ojos, también genera calambres, debilidad, sudor y es fatal en caso de tener contacto con la piel. La ingestión e inhalación producen síntomas de intoxicación severa o en muchos casos genera la muerte (Nufarm, 2011). Otros síntomas de este compuesto se aprecian en la siguiente tabla.

Tabla 6 Síntomas del contacto con Carbofurán.

Sintomatología		
En receptores muscarínicos	En receptores nicotínicos	En receptores del SNC
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bronco-constricción y secreciones bronquiales ▪ Aumento de la salivación y el lagrimeo, ▪ Problemas gastrointestinales: peristaltismo, náuseas, vómitos, diarreas ▪ Braqui-cardias que pueden progresar hasta el bloqueo cardíaco ▪ Constricción de pupilas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ debilidad muscular ▪ tic involuntarios, gesticulaciones y calambres ▪ vaso constricción. ▪ Depresión respiratoria 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ tensión, insomnio, ▪ inestabilidad emocional ▪ neurosis y confusión, ▪ convulsiones ▪ depresión de los centros respiratorio y circulatorio, pudiendo llegar a coma y muerte.

Fuente: (Santucho, 2012)

2.23.2 Efectos crónicos y carcinogénicos.

Santucho, (2012), menciona que en estudios de laboratorio con animales expuestos a altas dosis de Carbofurán mostraron disminución de peso, sin embargo, esta sustancia posee riesgo de cáncer en humanos. La toxicidad de este elemento es muy alta tal y como se describe a continuación:

- **Genotoxicidad:** Los efectos a nivel mutagénico son débiles o nulos en animales y bacterias (Santucho, 2012).
- **Toxicidad sistémica:** Causa inhibición reversible de la colinesterasa en humanos y animales afectando la función del sistema nervioso (Santucho, 2012).

2.24 Efectos ambientales.

Muy tóxico y con grandes efectos en organismos acuáticos, causa efectos adversos a largo plazo en el ambiente acuático sobre todo en peces e invertebrados. También hay la presencia de efectos en abejas (Nufarm, 2011).

2.25 Carbendazim.

Bencimidazol sistémico que actúa de forma rápida, posee una actividad fungicida preventivo y curativo sobre enfermedades producidas por hongos endoparásitos y ectoparásitos. Esta sustancia es absorbida por las raíces y tejidos verdes, luego interfiere en la biosíntesis de ADN durante la mitosis y el mecanismo de transmisión del mensaje genético del ADN al RNA, es decir, permite la germinación de las esporas, pero detiene el desarrollo del tubo germinativo induciendo irregularidades en la división celular dando lugar a células anormales que provocan la muerte del hongo (Nufarm, 2017).

2.25.1 Propiedades físico-químicas del Carbendazim.

El Carbendazim es un fungicida de acción sistémica, preventiva y curativa de uso agrícola que entra en la clasificación de los benzimidazoles, Su fórmula química es $C_9H_9N_3O$ con un peso molecular de 191,19(g) de nombre químico: Metilbenzimidazol-2-il carbamato de nombre común: Carbendazim (EPA, ISO), Carbendazima (ES) (CASAFE, 2009). Su estructura química es la siguiente:

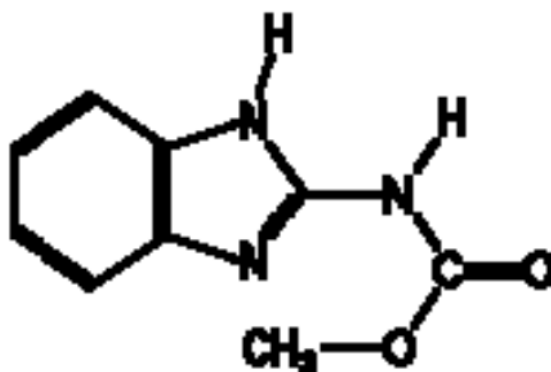


Figura 9 Estructura química del Carbendazim.
Fuente: (Governor, 2012)

Esta sustancia es soluble en agua, etanol, dimetilformamida, cloroformo y acetona; poco soluble en hexano y ligeramente soluble en benceno y diclorometano. El Carbendazim se

descompone lentamente al contacto con bases o a una temperatura de 300 °C (Machado, 2012). Las propiedades físico-químicas de este compuesto están expuesta a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 7 Propiedades físico-químicas del Carbendazim

Aspecto físico	Líquido viscoso
Color	Gris tenue
Olor	Ligero musgoso
pH	6,0 – 7,5
Densidad relativa	1,18 g/ml
Temperatura De descomposición	218 °C
Punto de inflamación	No inflamable
Explosividad	No explosivo
Corrosividad	No corrosivo
Solubilidad en agua	Completa a 20°C
Persistencia a la espuma	Máximo 25 ml después de 1 minuto

Fuente: (Antalien, 2014)

2.26 Aplicaciones en cultivos.

Controla enfermedades en viñedos, frutales, tropicales y subtropicales. También es indicado para el control de enfermedades en tratamientos post-cosechas su aplicación se detalla a continuación (Nufarm, 2017).

- **Para aplicación al follaje:**
 - Dispersión, ingrediente activo de: 511(I.A./Kg o L).
 - Floable, ingrediente activo de: 500 (I.A. /Kg o L).
 - Polvo humectable, ingrediente activo de: 500 (I.A. /Kg o L).
 - Suspensión acuosa, ingrediente activo de: 375 (I.A. /Kg o L).
 - Microgranulado disperso, ingrediente activo de: 500 (I.A. /Kg o L).

- **Para aplicación en drench al cuello de la planta:**
 - Suspensión acuosa, ingrediente activo de: 600 (I.A. /Kg o L).
- **Para uso en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas:**
 - Polvo técnico, ingrediente activo de: 900, 950, 980 (I.A. /Kg o L).
 - Sólido técnico, ingrediente activo de: 980, 990 (I.A. /Kg o L).

2.27 Utilización en cultivos.

Para su correcta utilización se debe mezclar el Carbendazim en mínimo 200 L de agua/ha. y aplicar por medio de inmersión, pulverización o aspersión. No es recomendable aplicar en caso de lluvias o heladas. Si el cultivo está húmedo, con efectos de sequía u otras circunstancias adversas se debe evitar utilizar esta sustancia (Gutiérrez, 2015). Es necesario seguir las siguientes recomendaciones al momento de aplicar este producto en cultivos:

- En apio iniciar los tratamientos con los primeros síntomas.
- La aplicación en durazneros debe ser después del fruto formado.
- En melón y pepino realizar el tratamiento cada 28 días luego de manifestarse los primeros síntomas de enfermedad.
- Realizar inmersión o aspersión de esta sustancia inmediatamente luego de la cosecha de manzanas, peras y cítricos.
- Evite la dispersión del polvo.
- Si se realiza mezclas con insecticidas o acaricidas es aconsejable agregarlos al caldo de Carbendazim inmediatamente antes de su aplicación.

2.28 Precauciones.

Como medidas precautorias generales en caso de tener contacto directo con el Carbendazim, es necesario evitar la inhalación, contacto con los ojos, piel y contaminación con

los alimentos. Durante la preparación de esta sustancia se debe utilizar protector facial, ropa protectora, anteojos, botas y guantes de goma, además, obviar comer, beber o fumar durante la aplicación de tratamientos (Gutiérrez, 2015).

2.29 Residualidad de Carbendazim.

Su vida media en suelos es de 6 a 12 meses, es considerado un elemento de persistencia media y puede ser mezclado con insecticidas, nematicidas, fungicidas para distintos cultivos a excepción de aquellos de fuerte reacción alcalina (Nufarm, 2017).

2.30 Efectos adversos sobre la salud.

La sustancia puede ser absorbida dentro del cuerpo mediante inhalación por aerosol o contacto directo con la piel. Luego de utilizar este fungicida es primordial lavarse las manos prolijamente con agua y jabón conjuntamente con todas las partes del cuerpo expuestas al contacto con el producto. También es importante lavar la ropa usada durante el tratamiento con el fin de evitar los siguientes síntomas (Antalien, 2014):

- Irritación de la piel.
- Irritación de los ojos.
- Tóxico en caso ingestión, presencia de nerviosismo.
- Cefalea, cansancio, agresividad, sudoración, taquicardia, confusión mental, temblores.

2.31 Efectos ambientales.

Sustancia tóxica para organismos acuáticos por lo cual se debe aplicar a un margen seguro de 40 metros fuera del agua ya que tiene la capacidad de producir efectos negativos a largo plazo en el medio ambiente acuático. Virtualmente tóxico para abejas, no tóxico para aves y muy tóxico para peces (Gutiérrez, 2015).

2.32 Técnica de Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) para la evaluación mutagénica de *Eisenia andrei* por el uso de Carbofuran y Carbendazim.

El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción también conocido como RFLP, es una técnica inventada en 1984 por el científico Alec Jeffreys mientras investigaba enfermedades hereditarias. Se utiliza en el análisis de modelos únicos en el ADN para lo cual se requiere de enzimas de restricción y sondas, Las enzimas de restricción son endonucleasas aisladas de bacterias que reconocen secuencias específicas y cortan el ADN en esas secuencias concretas (Cheriyedath, 2017).

La técnica RFLP permite detectar polimorfismo definidos como diferencias genéticas heredadas entre individuos, los pequeños cambios en la secuencia del ADN pueden modificar los patrones de corte de las endonucleasas de restricción, de la misma forma, la utilización de distintas combinaciones de enzimas de restricción o sondas, permiten explorar distintas zonas del genoma en busca de polimorfismo (Pérez, 2015).

2.32.1 Aplicación y etapas.

La técnica RFLP fue el primer marcador de ADN desarrollado, y se ha usado para varias aplicaciones genéticas desde su invención. Al aplicar este tipo de estudio se logra explotar las diferencias entre las series de ADN y reconocer las variaciones intraspecies e interspecies (Torres, 2012). Esta técnica consta de varias etapas y aplicaciones la cuales son citadas a continuación.

2.32.2 Etapas de la técnica RFLP.

- Extracción de ADN
- Digestión completa de ADN con enzimas de restricción, la digestión debe ser completa para que los resultados sean repetibles.
- Separación y desnaturalización de fragmentos de restricción.
- Transferencia de los fragmentos de ADN a una membrana nitrocelulosa o nylon.

- Preparación de una sonda.
- Hibridación de los fragmentos de restricción con la sonda.
- Visualización de los fragmentos hibridados por autor radiografía.

2.32.3 Aplicaciones de la técnica RFLP.

- Para determinar el estatus de enfermedades genéticas.
- Para determinar o confirmar la fuente de una muestra de ADN.
- Para determinar los tipos de recombinaciones que muestran la distancia genética entre los lugares geométricos.
- Para determinar un portador de mutación o enfermedad.

2.33 Ventajas y desventajas.

Esta técnica a pesar de tener muchas ventajas como por ejemplo ser replicable, tiene varias desventajas por el hecho de no permitir automatización y tener altos costos en tiempo y dinero, lo que ha llevado en muchos casos a la sustitución del RFLP por nuevos marcadores más sencillos y eficaces (Pérez, 2015).

2.33.1 Ventajas.

- Es altamente reproducible, permite repetir el experimento utilizando la misma combinación de enzimas y sondas.
- Al ser una técnica reproducible, se logra obtener los mismos resultados incluso en laboratorios diferentes.
- Proporciona marcadores codominantes.

2.33.2 Desventajas.

- Para detectar diferencias entre cultivares o poblaciones, es necesario disponer de numerosas sondas.
- Su proceso es largo y laborioso.
- Se necesita de grandes cantidades de ADN.
- A gran escala, el coste es elevado.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generalidades.

La presente investigación se realizó con el objetivo de poder demostrar la toxicidad de Carbofurán y Carbedazim en la lombriz de tierra o lombriz roja común (*Eisenia andrei*), en el laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE Sede Ibarra. Los resultados obtenidos de la siguiente investigación serán discutidos y las bases de los experimentos servirán para futuras investigaciones.

3.2 Métodos.

Al realizar el proyecto se da importancia a la información de libros, artículos científicos, revistas y linkografía de fuentes verificadas, las mismas que permiten direccionar correctamente el tema, los objetivos y el marco teórico que funcionan como preámbulo de la investigación experimental (Maya, 2014).

Los métodos utilizados ayudan con la correcta organización del trabajo de grado, por lo tanto, para el éxito de la experimentación realizada en el siguiente informe se cuenta con el método inductivo, deductivo, analítico, estadístico y experimental. Con la ayuda de todos estos se garantiza una recopilación de información adecuada y necesaria para comprender de mejor manera el proyecto elaborado (Maya, 2014).

3.2.1 Método inductivo.

Este método fue utilizado para la recopilación acerca de datos sobre suelos, bioensayos, información interna sobre la especie de lombriz *E. andrei*, toxicidad de plaguicidas y fungicidas como el Cabofurán o Carbedazim y sobre todo para fundamentos relevante de la técnica RFLP. Las investigaciones realizadas sobre estos temas sirven para direccionar correctamente la experimentación.

3.2.2 Método deductivo.

El método deductivo se utilizó en la observación de los fenómenos ocasionados por el Carbofurán y Carbedazim sobre la *E. andrei*, también sirvió como medio generador de hipótesis y para verificar y comprobar los resultados obtenidos al final de la experimentación.

3.2.3 Método experimental.

El tipo de experimento utilizado es un bioensayo de laboratorio con una duración intermedia de entre 14 a 90 días, las aplicaciones de las sustancias son de carácter estático ya que el Carbofurán y Carbedazim solo fueron aplicados una vez en todo el bioensayo, además, los efectos del experimento son agudos porque las concentraciones de la sustancia fueron letales para la especie en particular. Cabe recalcar, que al final del ensayo se obtuvieron resultados cuantitativos y porcentuales útiles en la elaboración de los resultados y conclusiones.

3.2.4 Método estadístico.

Se usó un diseño completamente al azar (DCA) que constó de cuatro tratamientos y tres repeticiones con un total de doce unidades experimentales, en donde el testigo (T1), fue con suelo totalmente estéril sin contaminantes, el segundo tratamiento (T2), que contenía el ingrediente activo de Carbofurán, un tercer tratamiento (T3) que posee el segundo ingrediente activo Carbendazim y finalmente un cuarto tratamiento (T4), en donde contenía la mezcla de los dos ingredientes activos mencionados anteriormente. Para el análisis de resultados finales se usó el programa SYSTAT 7.0 y prueba de significancia Tukey al 5%.

- Tratamientos: 4
- Repeticiones: 3
- Total de unidades experimentales: 12

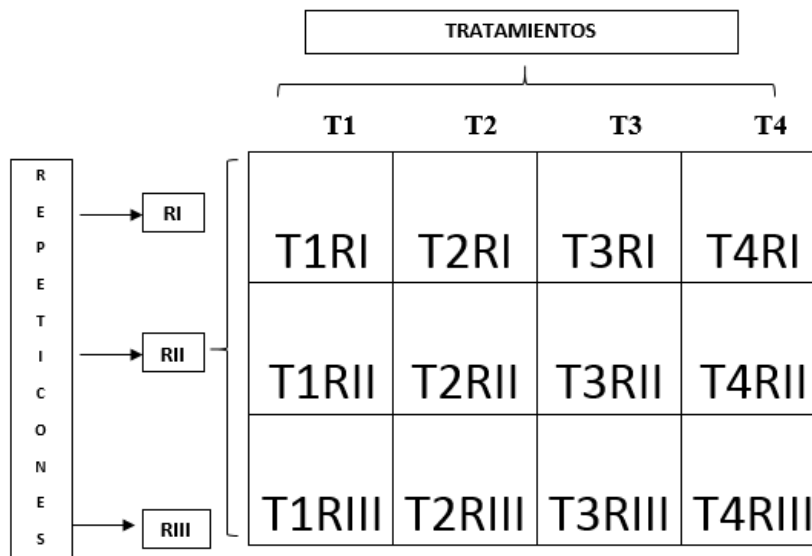


Figura 10 Diseño completamente al azar (DCA).
Fuente:(Autor)

3.3 Manejo y análisis de datos.

3.3.1 Variable independiente.

- Testigo (T1).
- Concentración de Carbofurán (T2).
- Concentración de Carbendazim (T3).
- Concentración de la mezcla (T4).

3.3.2 Variable dependiente.

- Porcentaje de mortalidad de *Eisenia andrei*.
- Sensibilidad

3.3.3 Variables de control.

- pH
- Temperatura
- Humedad
- Conductividad eléctrica

3.4 Metodología

3.4.1 Ubicación del área de estudio.

El área de investigación fue el laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, ubicada a 2,7 Km del centro de la Ciudad de Ibarra.

Tabla 8 Ubicación del Laboratorio de la PUCESI.

Provincia	Imbabura	Longitud	0°21'01'N
Cantón	Ibarra	Latitud	78°06'24'W
Parroquia	El Sagrario	Altitud	2221 msnm
Ciudadela	La Victoria	Temperatura	20 °C

Fuente: (Ponce, 2016)

3.4.2 Experimentación en Laboratorio.

Para el proceso de experimentación se obtuvo los Plaguicidas.

3.4.3 Carbofurán y Carbendazim.

Para la obtención del Carbofurán y Carbendazim se compró los dos ingredientes activos en concentrado emulsionante.



Figura 11 Carbofurán y Carbendazim
Fuente: (Autor)

3.4.4 Organismos de prueba.

Se realizaron salidas de campo a la localidad de la Esperanza ubicada en el cantón Ibarra, Provincia de Imbabura en donde se obtuvieron los individuos de *Eisenia andrei*, previamente se identificó todos a los sujetos que tenían clitelo, es decir, en etapa adulta. Se logró recolectar alrededor de 150 individuos que se mantendrán en un recipiente con alimento, posterior a la prueba del bioensayo en el laboratorio.



Figura 12 Recolección de organismos de prueba.
Fuente: (Autor)

En la Figura 12, se puede apreciar la manera en la que se obtuvieron los individuos de prueba, estos son extraídos de su habitat natural con mucho cuidado con el fin de que la experimentación no se vea afectada.



Figura 13 Identificación del clitelo.
Fuente: (Autor)

3.4.5 Condiciones del Suelo artificial.

El suelo totalmente estéril utilizado fue Turba de Sphagnum, este es un sustrato de base turba para la germinación y el crecimiento de plántulas en bandejas, sin embargo, en dicho ensayo este suelo fue utilizado para albergar a los sujetos de prueba.



Figura 14 Suelo artificial.
Fuente: (Autor)

El sustrato artificial contiene materiales tales como tierra fina sin restos de plantas, turba de musgo, Carbonato de Calcio (CaCO_3) pulverizado los cuales estaban previamente homogenizados, entre otros. El pH del sustrato es de 6,5 con una conductividad eléctrica de 11 mmhos. cm^{-1} además, posee una humedad aproximada del 80 %. Se obtuvo 2400 gr de suelo totalmente estéril con las siguientes características:

Tabla 9 Propiedades químicas del suelo artificial

	(mg/l)	
N-NO₃	Nitrógeno	40-100
P-PO₄	Fosforo	5-15
K⁺	Potasio	35-75
Ca²⁺	Calcio	25-75
Mg²⁺	Magnesio	20-40
Fe²⁺	Hierro	0.7-2
Zn²⁺	Zinc	<0.2
Cu³⁺	Cobre	<0.3
Mn²⁺	Manganeso	<0.6
B³⁺	Boro	<0.6

Fuente: (EDIFARM, 2016)

3.4.6 Técnicas de medición.

Las siguientes técnicas fueron aplicadas en el control de toda la fase de experimentación del bioensayo.

3.4.7 Medición de pH

Parámetro evaluado todos los días durante el bioensayo, con el fin de que tengan las condiciones óptimas para que puedan vivir los sujetos de prueba, las características de este dispositivo son: Horiba Scientific, F-71G de rango 0 a 14 pH. El procedimiento es análogo a APHA, 4500 – H + B.



Figura 15 Potenciómetro.
Fuente: (Autor)

Para la determinación de pH se utilizó el método del Potenciómetro en donde, se pesó 1g de muestra de suelo y se colocó en un vaso de precipitación de 25 ml seguidamente se agregó 10 ml de agua destilada previamente agitado para dejar reposar durante 10 minutos ajustando el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras.

3.4.8 Medición de la Conductividad Eléctrica ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Parámetro evaluado todos los días en el bioensayo. Equipo utilizado Conductímetro cuyas características son: Sper Scientific, TDS – Salinity Meter 850038 de rango 0 a 199,9 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$. El procedimiento es análogo a APHA, 2510.

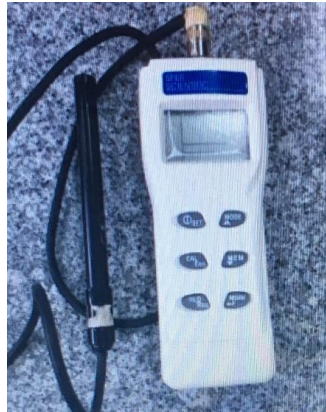


Figura 16 Conductímetro.
Fuente: (Autor)

Para la determinación de la conductividad eléctrica, se utilizó el método del conductímetro en donde para las muestras de suelo fue necesario realizar una preparación de la pasta de saturación y se procedió a pesar 40g de suelo seco para colocarlos en un recipiente de plástico y rápidamente se debe agregar agua destilada con una bureta, luego se mezcla con la espátula hasta su saturación y seguidamente se deja reposar la pasta durante 1 hora, se coloca papel filtro sobre el embudo previamente humedecido con agua destilada para dejar drenar el exceso y poder medir el resultado final de conductividad eléctrica.

3.4.9 Determinación de Humedad.

Para la determinación de humedad de las muestras fue necesario realizar el cálculo inicial con el fin de poder adicionar el agua de hidratación necesaria. Se tomó una muestra de 25 gr. de suelo, seguidamente se colocó en una cápsula de porcelana previamente preparada a un peso constante, luego se procede a secar a 103-105°C en la mufla durante 24 horas, después se coloca en un desecador para enfriar y una vez enfriado se procede a pesar. La diferencia en pesos nos da el peso seco final de la muestra de suelo. La determinación de la humedad del suelo se utilizó la siguiente ecuación (Romero P. R., 2008):

$$HS = \left[\frac{(A - B)}{C - (A - B)} \right] * 100$$

En donde:

HS: humedad de la muestra en %.

A: peso inicial de la muestra + capsula de porcelana (gr.)

B: peso seco final de la muestra + capsula de porcelana (gr.)

C: peso de la muestra tomada inicial (gr.)

En el proyecto se obtuvo los siguientes datos:

$$A= 80,452 \text{ gr. } B=78,192 \text{ gr. } C=25,0880 \text{ gr.}$$

$$HS = \left[\frac{(80,452-78,192)}{25,0880-(80,452-78,192)} \right] * 100$$

$$HS = 9,90\%$$

Para que las muestras se puedan hidratar en un 35 al 45 % se tomó como referencia la ecuación expresada a continuación, correspondiente al peso y el volumen que usamos en el diseño en cada una de las muestras que se utilizó en la prueba del bioensayo (Romero P. R., 2008).

$$HS = T - HS$$

De donde:

HA: hidratación necesaria (%)

T: humedad que se requiere obtener (%)

HS: humedad del suelo (%)

$$T = 60\%$$

$$HS = 9,90\%$$

$$HA = 60\% - 9,90\%$$

HA = 50,1% que fue la hidratación necesaria en porcentaje para cada una de las muestras de suelo.

Para adicionar la cantidad de agua en cada una de las muestras en ml se tomó de igual manera la siguiente ecuación (Romero P. R., 2008):

$$V = \left[\frac{W * HA}{100} \right] * 100$$

De donde:

V: cantidad de agua a adicionar (ml)

W: peso de la muestra (gr)

HA: hidratación necesaria (%)

F: factor de conversión (ml. cm⁻¹)

Remplazando en la ecuación con los datos obtenidos:

$$HA = 35,1\%$$

$$W = 200 \text{ gr}$$

$$V = \left[\frac{200\text{gr} * 50,1\%}{100} \right] * \left(\frac{1\text{ml}}{1\text{gr}} \right)$$

V=100,2ml de agua fue necesario para hidratar cada una de las muestras de suelo que se tenía en el proyecto.

3.5 Índices Eco toxicológicos

3.5.1 Determinación de la Dosis letal (DL50%).

Para las sustancias estudiadas se tomó en cuenta las diferentes concentraciones, estas son alta, media y baja, se analizó la cantidad rotulada de principio activo en la etiqueta de cada uno de los plaguicidas dadas por el fabricante, esto se realizó con el fin de evaluar la actividad biológica de las lombrices para cada una de las concentraciones.

En la aplicación se realizó una solución madre de Carbofurán que contenía 5,06 ml de soluto y a un aforo de 150 ml que se realizó con agua destilada, (Arrázola, 2016), nos dice que para este tipo de plaguicidas se debe establecer tres concentraciones (C1:2.025, C2:1.012, C3:0.506 ppm) obteniendo una concentración alta, seguido de una media y una baja para su aplicación. De la misma manera, se realizó la siguiente solución madre para el Carbendazim en

donde se colocaron 10,05 ml de soluto y a un aforo de 150 ml que se realizó con agua destilada y se procedió a establecer tres concentraciones (C1:2.890, C2:1.4045, C3:0,7022 ppm).

En la aplicación de la mezcla de los plaguicidas (Arrázola, 2016), menciona que para formulaciones en mezclas se debe realizar una solución madre de los dos ingredientes activos de Carbofurán y Carbendazim que contenga 15,11 ml de soluto de las dos formulaciones, donde la concentración máxima es dos veces mayor que la concentración individual de cada una de las concentraciones anteriores y las concentraciones menores son la mitad de la anterior, para ello se usó el método Probit, allí se establecieron tres concentraciones (C1:4.915, C2:2.4575, C3:1.2287 ppm).

3.6 Implementación del bioensayo.

Se implementó un total de 12 frascos con sustrato estéril a una temperatura ambiente de 23° C aproximadamente. El diseño del contenedor utilizado es rectangular cuyas dimensiones son: 20 cm de largo, 10 cm de ancho y 3,5 cm en la altura con un volumen de 700 cm³ equivalente a 200g de sustrato por frasco. Posteriormente se aplicó la concentración establecida a cada uno de los recipientes previamente rotulados se realizó la mezcla del sustrato artificial, dependiendo de la presentación de los dos plaguicidas para dicho proyecto, se utilizó el método para concentrados emulsificantes (CE) solubles en agua. Seguidamente se colocaron 10 lombrices por cada recipiente, previamente protegidas de la luz. Estas concentraciones solo fueron necesarias aplicar al principio de prueba del bioensayo debido a su alto contenido de principio activo contenido en cada uno de los compuestos.

3.7 Condiciones de control del bioensayo.

El control se lo realizó diariamente en cuanto a condiciones de humedad y pH, en donde la humedad se mantenía por día al 70% y el pH oscilaba entre 6 y 6.5 significativamente, en caso de que cada uno de los tratamientos necesite humedad para asegurar la supervivencia de los individuos, se adicionaba cierta cantidad de agua destilada a cada uno de los tratamientos.

Para la validación del bioensayo se realizó un control al día séptimo de mortalidad en cada uno de los tratamientos en donde se evaluó las condiciones de los individuos, es decir, los estímulos mecánicos a los que respondían cada uno de los individuos de *E. andrei*, posteriormente se volvieron a depositar los sujetos de prueba hasta el día 14 para la evaluación final. El día 14 se procedió a medir el pH, temperatura, humedad, y la conductividad eléctrica de cada uno de los frascos y realizar su evaluación final en donde se contó a los individuos que lograron sobrevivir de los 10 sujetos de prueba que contenían los frascos, para proceder a realizar la extracción de ADN y poder observar la mutagénesis.

3.8 Técnica RFLP usada para observar daños mutagénicos en *Eisenia andrei*.

Se realizó la extracción de ADN de los individuos que sobrevivieron a cada tratamiento y en las diferentes concentraciones a las que fueron sometidos, mediante la técnica RFLP se observó los polimorfismos es decir los posibles daños genéticos que sufrieron las lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) que sobrevivieron durante esta prueba con los dos tipos de plaguicidas y su mezcla. Para ello se utilizó el protocolo para preparar el lisado de tejidos, la cual consta de una serie de pasos hasta obtener la extracción total del ADN.

Se lavó cada individuo con agua destilada luego se colocó la cantidad de lisado en un tubo estéril de micro centrifuga, después se añadió 180 μL PureLink® Genomic tampón de digestión y 20 μL de proteinasa K (Vortear durante un minuto), y luego se procedió a incubar a 55°C con agitación en vórtex durante 30 min. Después se eliminó cualquier material en forma de partículas y se centrifugo el lisado a la máxima velocidad durante 3 min a temperatura ambiente para luego transferir el sobrenadante a un nuevo estéril de micro centrifuga, aquí se añadieron 20 μL de RNasa A al lisado, se mezcló bien por breve agitación en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. Seguidamente se añadieron 200 μL PureLink® Genomic de lisis/ tampón de unión y se mezcló bien por vórtex luego de esto se añadió 200 μL 96-100% de etanol al lisado. Se mezcló bien por agitación en Vórtex durante 5min hasta obtener una mezcla homogénea en donde se procedió a la unión del ADN y se agregaron 640 μL del lisado previamente preparado para después proceder a centrifugar a 10.000 revoluciones por 1 min luego se quitó el tubo de recolección y se colocó en un tubo nuevo con filtro. Una vez obtenido dicho tubo se realizó el lavado del ADN en

donde se añadieron 500 μ L del tampón de lavado a la columna con filtro y se procedió a centrifugar a 10.000 rpm (1 minuto) después de esto se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en un nuevo tubo y se agregó 500 μ L del tampón de lavado 2 a la columna en un tubo con filtro inmediatamente se centrifuga a la velocidad máxima durante 3 minutos y se desechó el tubo de recolección.

Por último, se efectuó la elución y almacenamiento del ADN. Aquí se colocó la columna con filtro en un tubo de micro centrifuga estéril de 1.5 ml y se añadieron 100 μ L de Elution buffer en donde se incubó a temperatura ambiente entre 1 minuto en la micro centrifuga la columna a máxima velocidad rápidamente de esto se pasó la solución inmediatamente al filtro en donde se centrifugó a velocidad máxima durante 1,5 minutos y a continuación se retiró la columna de filtro, se tapó el tubo de la micro centrifuga el cual contenía el ADN purificado y para finalizar se refrigeró en la nevera a -35 °C.

Al día siguiente, se procedió a cortar los fragmentos de ADN de cada una de las muestras con la enzima de restricción EcoRI, con el kit Anza™ EcoRI seguido del protocolo correspondiente para realizar el debido proceso aquí se preparó una mezcla de reacción mediante la adición de reactivos en el orden que indica la Tabla 10 del protocolo.

Tabla 10 Protocolo para usar enzimas de restricción – EcoRI

Reactivos	Reacción enzimática
Agua libre de nucleasa	Se requiere para completar el volumen de la reacción final.
Anza™ 10X Red Buffer	2 μ L
DNA	0,2 – 1 μ g
Anza™ Enzima de restricción 1	1 μ L
Anza™ Enzima de restricción 2	-
Anza™ Enzima de restricción 3	-
Volumen final de la reacción	20 μ L

Fuente: (Fisher, 2016)

Se incubaron todas las muestras en el bloque de calor seco a 37 °C por 15 minutos y después de haber realizado todo el proceso antes mencionado se realizó el gel de agarosa compuesto por 2,5 gr. de agarosa en 100 ml de TAE 1X, se agitó bien la muestra para luego colocar 5 µL de Diamond nucleotic DYE caliente, se agitó y se introdujo al microondas por 15 segundos.

Seguidamente se procedió a colocar en la bandeja el gel con la peinilla correspondiente, en 30 a 40 min aproximadamente el gel logro solidificarse a temperatura ambiente y en cada uno de los pocillos se colocarón 5µL por muestra, se colocó en la cámara de electroforesis durante 4-5 horas a 90V calibrados simultáneamente en el voltímetro que está conectado a un ánodo rojo y un cátodo negro hasta que los marcadores de colorante hayan migrado a una distancia propia donde se pudieron visualizar las bandas. Para la visualización de las bandas de ADN se procedió a colocar en un transiluminador UV.

3.9 Materiales y Equipos.

3.9.1 Materiales.

En la Tabla 11, se detallan los materiales y reactivos utilizados en la investigación.

Tabla 11 Materiales y reactivos utilizados en el laboratorio

Materiales	Reactivos
Botellas ámbar	Agarosa 2,5%
Pipetas, Bureta	TAE 10X
Probeta	10X buffer
Vaso de precipitación	Enzima Eco R1
Balón de aforo	10X red buffer
Mortero	Genomic digestión buffer
Micro pipetas	Proteinasa K
Papel aluminio	Rnase A
Papel filtro	Genomic lysis
Frascos de plástico	Genomic Wash buffer

Fuente: (Autor)

3.9.2 Equipos.

3.9.3 Balanza analítica.

Para la experimentación fue necesaria una balanza de gran precisión para lo cual se utilizó la balanza de marca ADAM® Nimbus NBL Series, la misma que puede medir desde 0.001 hasta 200 g.

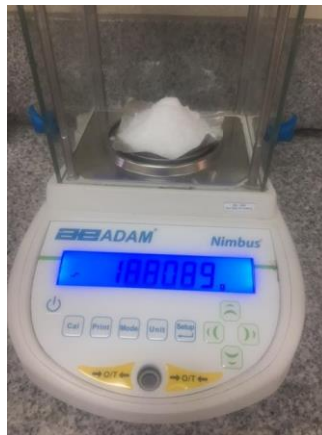


Figura 17 Balanza analítica.
Fuente: (Autor)

3.9.4 PureLink® Genomic DNA Mini Kit.

PureLink® Genomic DNA Kit se utilizó para la extracción de ADN, los códigos de presentación en la que viene este kit son los siguientes: K1820-01, K1820-02, K1821-04. Con los elementos que contiene esta caja se logró facilitar la experimentación de dicho ensayo.



Figura 18 PureLink® Genomic DNA Mini Kit.
Fuente: (Autor)

3.9.5 Vórtex.

El vórtex es fundamental para la extracción de ADN, dependiendo del compuesto los segundos del mismo difieren, la máquina utilizada para la experimentación es el VORTEX MIXER, Labnet International, Inc. Cuyas especificaciones están detalladas a continuación:

- Rango de velocidad: 3400rpm (60Hz), 2800rpm (50Hz).
- Modo de funcionamiento: toque o continuo
- Rango de funcionamiento ambiental: +4°C a 65 °C.
- Peso: 2.2 kg
- Eléctrico: 120V



Figura 19 Vórtex.
Fuente: (Autor)

3.9.6 Microcentrifuga

Permite dejar el compuesto útil en la base mientras que el sobrenadante puede ser desechado, la marca usada es la Prism™ Micricentrifuge, Labnet International, Inc. Que tiene las siguientes especificaciones:

- Motor: Sin escobillas
- Mantenimiento: No es necesario
- Rotor: 24x 1,5/2,0 ml para micromuestras
- Velocidad: 15000 rpm/ 21200 xg.



Figura 20 Microcentrifuga.
Fuente: (Autor)

3.9.7 Enzima de restricción EcoR1.

Las enzimas de restricción sirven para cortar los fragmentos de ADN de los sujetos de prueba, y permite visualizar las mutaciones y daños genotóxicos. Las marcas utilizadas son:

- Invitrogen by Fisher Scientific
- Anza™ EcoR1 (20U/μL).



Figura 21 Anza™ EcoRI.
Fuente: (Autor)

3.9.8 Bloque de calentador seco

Permite calibrar temperaturas variadas dependiendo de la utilización que se necesite, la marca utilizada es ACCUBLOCK™ Digital Dry Bath Labnet Internatinal, Inc. que contiene las siguientes características:

- Rango de temperatura ambiente: +5° a 150°C.
- Temperatura resolución: 0,1°C
- Uniformidad de temperatura $\pm 0,3^\circ\text{C}$
- Temporizador: 1-999 mino continuo
- Cámara de bloque: aluminio moldeado
- Capacidad de bloqueo: Un bloque estándar
- Eléctrico: 120V



Figura 22 Bloque de calor seco.
Fuente: (Autor)

3.9.9 Cámara de electroforesis

La función de este dispositivo es de separar las biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de geles de agarosa, las características principales de este elemento son:

- C.B.S. Scientific WMGE-600
- Voltios: 250 VDC
- Límites máximos de operación: 250 VDC/15W/60mA/55°C.
- Número de serie: 011501



Figura 23 Cámara de electroforesis.
Fuente: (Autor)

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis eco toxicológico en función de la mortalidad de *Eisenia andrei*.

El bioensayo de eco toxicidad se realizó en dos fases: la primera, para determinar el límite máximo de tolerancia a las 72 horas de exposición tomando como referencia la concentración patrón de Carbofurán, Carbedazim y su mezcla; en la segunda fase, tomando como referencia la concentración patrón, se evaluó la mortalidad de los individuos a los 14 días de exposición como se muestra las dosis en la Figura 24, para cada uno de los tratamientos en donde las dosis alta, media y baja se determinaron a partir de las soluciones madre siguiendo el protocolo (Arrázola, 2016).

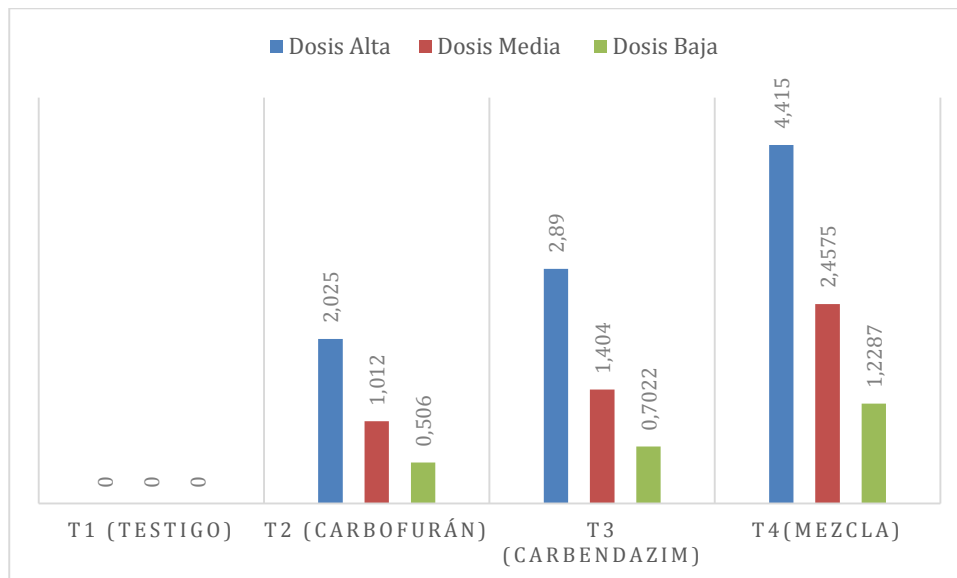


Figura 24 Dosis subletales por tratamiento.

Fuente: (Autor)

4.1.1 PRIMERA FASE.

Los resultados obtenidos indican que la exposición a las dosis subletales de Carbofuran y Carbendazim y su mezcla, presentan una marcada diferencia a su respuesta, es decir que una dosis de Carbofuran y Carbendazim produce efectos subletales tempranos que es debido a una

aclimatación fisiológica o una resistencia genética que presenta *Eisenia andrei*, debido al estrés oxidativo, la absorción y el metabolismos frente a estos tóxicos (Alonzo & Chicas, 2013).

Corona y Cram, (2010), mencionan que si los organismos de *Eisenia andrei/fetida* o *Lombricus terrestris*, son adaptados a suelos altamente contaminados por plaguicidas pueden tener consecuencias, ya que una población adaptada puede permanecer en áreas contaminadas a pesar de la contaminación que exista estas pueden desencadenar alteraciones en su comportamiento genético en los individuos más resistentes y la muerte en aquellos más débiles a pesar de poseer las mismas condiciones de vida.

4.1.1.1 Dosis letal media (DL_{50%}) para Carbofurán a las 72 horas de exposición.

En la Tabla 12, se muestra las dosis suministradas cada 24 horas hasta alcanzar la dosis letal media para los individuos, este ensayo control tuvo una duración de 72 horas. El proceso antes descrito se repitió con los demás tratamientos, aunque los resultados obtenidos fueron diferentes y están expresados a continuación:


Tabla 12. Dosis Letal Media (DL_{50%}) para Carbofurán.

CARBOFURÁN					
DIAS	FECHA	CONCENTRACIONES (ppm)			
		D	M	D	M
Primer día(24h)	12 de Julio	Testigo	0	0,5	2
Segundo día(42h)	13 de Julio	Testigo	0	1,004	3
Tercer día(72h)	14 de Julio	Testigo	0	2,0258	5

Fuente: (Autor)

D: Dosis

M: Mortalidad

DL50% 

Al tercer día (72 horas) de exposición a los individuos se llegó a la Dosis letal (DL_{50%}) en la concentración 2,0258 (ppm) teniendo una mortalidad de 5 individuos, en donde nos dio el patrón al cual murieron la mitad de los individuos en la prueba de 14 días, Cabe mencionar que según el convenio de Rotterdam llevado a cabo en la Unión Europea, para lombrices de tierra con el

plaguicida Carbofurán la dosis letal media DL_{50%} es de 2,987 ppm de ingrediente activo, mientras que en Canadá, para la lombriz de tierra *Eisenia andrei* ensayada con Carbofurán su dosis letal es de 2,983 ppm de ingrediente activo en suelo (ONU, 2017).

4.1.1.2 Dosis letal media (DL_{50%}) para Carbendazim a las 72 horas de exposición.

En la Tabla 13 se observan las dosis suministradas cada 24 horas hasta poder llegar a la dosis letal del 50% de los individuos. Al tercer día (72horas) de exposición a los individuos se llegó a la Dosis letal (DL_{50%}) en la concentración 2,8901 ppm teniendo una mortalidad de 5 individuos, en donde nos dio el patrón al cual murieron la mitad de los individuos.

Tabla 13. Dosis Letal Media (DL_{50%}) para Carbendazim.

CARBENDAZIM					
DIAS	FECHA	CONCENTRACIONES (ppm)			
		D	M	D	M
Primer día(24h)	12 de Julio	Testigo	0	0,7504	1
Segundo día(42h)	13 de Julio	Testigo	0	1,5008	3
Tercer día(72h)	14 de Julio	Testigo	0	2,8901	5

Fuente: (Autor)

D: Dosis

M: Mortalidad

DL50%

4.1.1.3 Dosis letal media (DL_{50%}) para la mezcla (Carbofurán más Carbendazim) a las 72 horas de exposición.

En la Tabla 14 se analizan las dosis suministradas a la mezcla entre estos dos compuestos antes mencionados cada 24 horas hasta poder llegar a la dosis letal del 50% de los individuos, este ensayo control tuvo una duración de 72 horas cabe mencionar que a esta dosis se le administro el doble de las dosis anteriores debido a que esta fue una mezcla de los principios activos que contenían cada uno de los agroquímicos.

Tabla 14. Dosis Letal (DL_{50%}) para la mezcla de Carbofuran más Carbendazim.

MEZCLA (CF + CB)					
DIAS	FECHA	D	CONCENTRACIONES (ppm)		
			M	D	M
Primer día(24h)	12 de Julio	Testigo	0	0,8065	2
Segundo día(42h)	13 de Julio	Testigo	0	2,5672	3
Tercer día(72h)	14 de Julio	Testigo	0	4,9150	6

Fuente: (Autor)

D: Dosis

M: Mortalidad

DL50%

Al tercer día (72 horas) de exposición a esta mezcla de estos dos agroquímicos a los individuos se llegó a la Dosis letal media (DL_{50%}) en la concentración 4,9150 ppm teniendo una mortalidad de 6 individuos, en donde nos dio el patrón al cual murieron la mitad de los individuos.

4.1.2 SEGUNDA FASE.

Una vez finalizada la primera fase en donde se determinó las dosis subletales para Carbofurán, Carbendazim y la mezcla a los 14 días se procedió a la evaluación final de los individuos en cada uno de los tratamientos. De los 150 individuos de *Eisenia andrei*, previamente clitelados y distribuidos 10 individuos en cada uno de los recipientes utilizados en el bioensayo, se realizó la evaluación de los cuatros tratamientos, es decir, T1 representa el testigo, T2 es el primer plaguicida (Carbofurán), T3 es el segundo plaguicida (Carbedazim), y finalmente T4 es la mezcla de los dos plaguicidas, como se muestra en la Figura 25.



Figura 25 Bioensayo en experimentación a los 14 días.

Fuente: (Autor)

4.1.3 Evaluación de los tratamientos en los individuos de *Eisenia andrei* expuestos a Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.

4.1.3.1 Análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis.

En el T1 los datos obtenidos de peso final e inicial no varían, por ende su peso se mantiene estable en un promedio de 0,3502g, el número de individuos es igual al inicial, ya que para la obtención de estos resultados en este tratamiento se aplicó suelo generalmente estéril y se adecuó las condiciones de vida similares a las de campo, cabe mencionar que este sustrato se añadió sin contaminantes para lograr mantener a los individuos durante toda la fase de experimentación.

Los datos no presentaron una distribución paramétrica normal por lo que se procedió a realizar transformaciones logarítmicas, en la cual tampoco se presentó una distribución normal, por lo que se utilizó una prueba no paramétrica a una escala ordinal de Kruskal-Wallis.

Se realizó una evaluación estadística no paramétrica, para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos donde, se efectuó con un valor de $P=0.01879^{**}$, siendo este un valor menor a $P<0.05$, lo que indica que existe una diferencia significativa entre los tratamientos dando como resultado en cuanto a la evaluación de diferencia en pesos al Testigo, seguido de plaguicida Carbendazim, luego esta Carbofuran y por último la mezcla que fue la más agresiva en cuanto a pérdida de peso de los individuos.

En cuanto a la mortalidad en la evaluación estadística no paramétrica de Kruskal Wallis con datos de normalidad, género como resultado el 50% de tasa de mortalidad en los individuos de *Eisenia andrei* la mezcla entre los dos plaguicidas, lo que indica que estas aplicaciones son mucho más agresivas en conjunto que actuando solas de acuerdo a las dosis subletales aplicadas, seguido de Carbofurán que mostraron una mortalidad relativamente agresiva de igual manera del 50% de los individuos y a continuación siendo el menos agresivo Carbendazim con el 30% de los organismos, debido a que este plaguicida es de bajo espectro y no se notó un control negativo como los dos tratamientos anteriores, que decrece la biomasa de lombrices en el suelo significativamente.

Una vez realizada la prueba de significancia de Tukey al 5%, tal como se muestra en la Figura 26, existen 3 rangos bien definidos, a-b-c, para la evaluación de los tratamientos en cuanto a pesos finales obtenidos se obtuvo en primer lugar al rango a, que es la mezcla de Carbofurán y Carbendazim con un peso final de 2,013g de lombriz, lo que indica que hubo un control negativo y afectación en los individuos, presentando los organismos quemaduras (Anexo 10), en el segundo rango b se obtuvo un peso final de 7,012 g de lombriz, que menciona que el tratamiento con Carbofurán también resultó agresivo en cuanto a la evaluación de los pesos, ya que hubo una disminución significativa, mientras que en el rango b en el tratamiento de Carbendazim se obtuvo un peso final de 7,33 g de lombriz lo que indica que el tratamiento no fue tan agresivo debido a que este fungicida es de bajo espectro y no hubo una variación drástica, en el rango a, que fue el testigo los organismos no presentaron diferencia en sus pesos finales, es decir se mantuvieron sus pesos hasta el final de la prueba a los 14 días con un peso inicial de 11,00g de lombriz y finalizando con un peso final de 11,03g de lombriz, esto es debido a que los organismos se encontraban en condiciones normales, por lo tanto indica que una buena salud en el suelo es sinónimo de adaptación de todos los macro y micro organismos que existen en el suelo, y que esta se ve afectada en su toxicidad e influenciada debido a presencia de xenobioticos en los mismos.

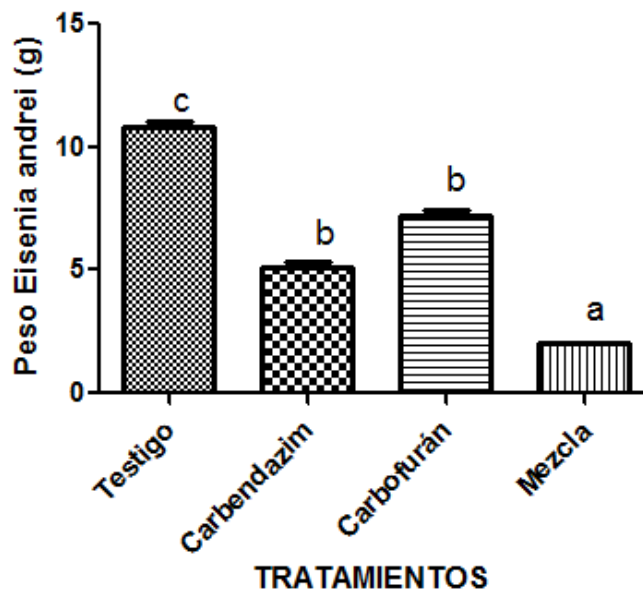


Figura 26 Prueba Tukey al 5%, para el peso de *Eisenia andrei* en la evaluación de dos plaguicidas más la mezcla.

Fuente: (Autor)

De acuerdo al libro “Lombricultura” de Claudia Martínez Cerdas (2015), en condiciones ambientales normales las lombrices vermicomposteras *Eisenia andrei/fetida* rodean un tamaño promedio que varía entre los 7 y 8 cm en su etapa adulta y un peso promedio de 0,30 a 0,50g or cada individuo.

Según Gimenez, (2004), menciona al Carbedazim como un producto no agresivo en cuanto a dosis letales y subletales en microorganismos benéficos para la salud de los suelos pero cabe mencionar que en pruebas testeadas en laboratorio tiene efectos negativos en cambios genéticos mas no en pérdida de peso o desequilibrios fisiológicos en los individuos en cuanto a pruebas de toxicidad ensayadas con anélidos.

Bedmar, (2011), menciona en su estudio realizado para la evaluación de pesos, tamaños, respuestas a estímulos mecánicos y tasas de mortalidad con las dosis letales (DL50% y DL100%) con las especies *Eisenia andrei/fetida*, *Podisus nigrispinus*, utilizando los plaguicidas Cartap,

Benomyl, Metomyl, Carbofurán, Carbendazim, y en una mezcla combinada entre sí como modo de aplicación en el medio agrícola, existió una tasa decreciente en los pesos y por ende una pérdida excesiva de la biomasa de los mismos.

4.2 Evaluación de las variables de control durante el bioensayo.

4.2.1 Humedad del suelo al inicio y al final del bioensayo.

La humedad es una variable importante debido a la sensibilidad de los sujetos de prueba, al utilizar lombrices de tierra en el bioensayo se debe mantener este parámetro elevado con el fin de garantizar la supervivencia de todos los individuos. En la Tabla 15, se logra analizar la humedad inicial y final del suelo durante la aplicación de las sustancias estudiadas.

Tabla 15 Humedad promedio del suelo al inicio y al final del bioensayo.

Concentraciones	Carbofurán		Carbedazim		Carbofurán y Carbedazim	
	Humedad Inicial	Humedad final	Humedad Inicial	Humedad final	Humedad Inicial	Humedad final
Testigo	60%	58%	60%	58%	60%	60%
C1 Alta	60%	55,2%	60%	55%	60%	57%
C2 Media	60%	55,3%	60%	56%	60%	59,3%
C3 Baja	60%	56%	60%	55%	60%	56,6%

Fuente: (Autor)

En las Figuras 27, 28 y 29, mostradas a continuación se aprecia la desvalorización de la humedad tomando en cuenta la humedad inicial y la final con mayor claridad, este parámetro disminuyó muy poco ya que el sustrato artificial fue hidratado constantemente evitando la deshidratación del mismo, la disminución en el porcentaje de humedad es normal y se encuentra dentro de las cifras previstas, además, cabe recalcar que la aplicación de las sustancias en los diferentes tratamientos no afectó a esta variable de ninguna manera.

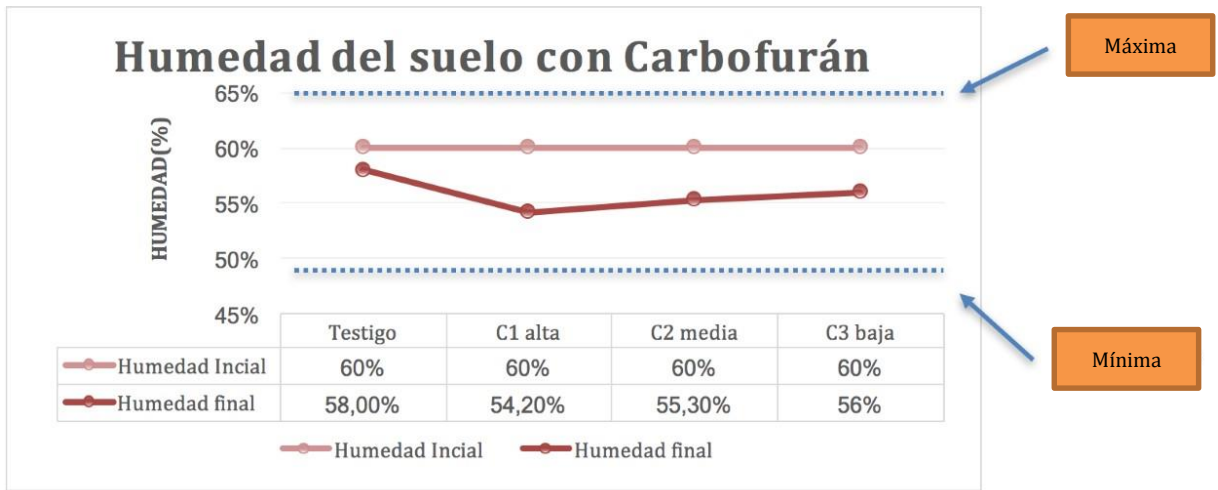


Figura 27 Humedad promedio del suelo aplicado Carbofurán.
Fuente: (Autor)

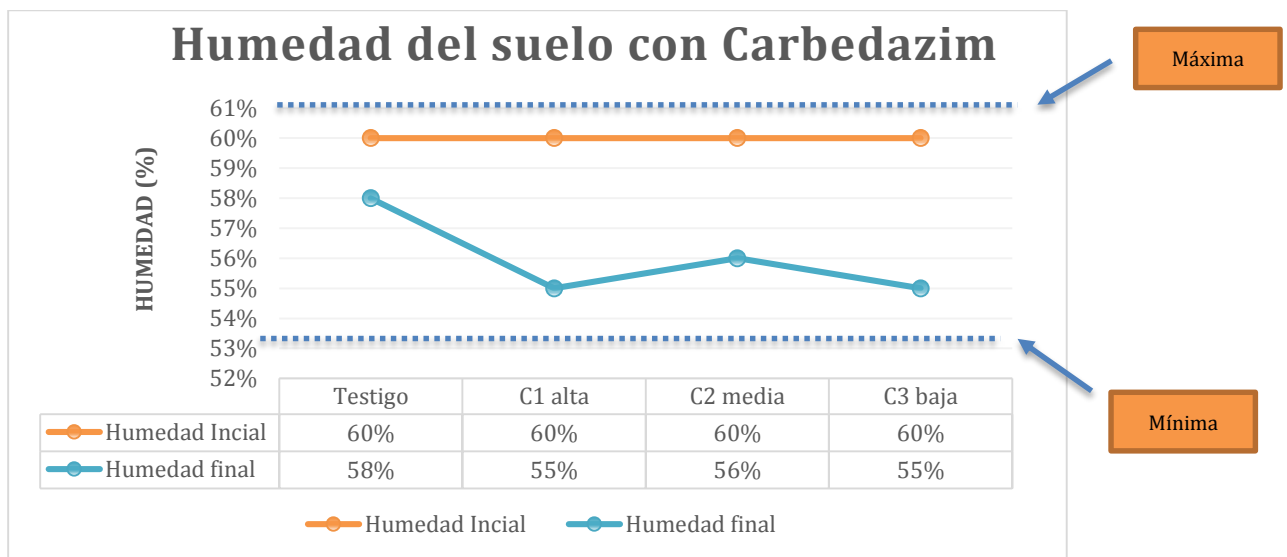


Figura 28 Humedad promedio del suelo aplicado Carbedazim.
Fuente: (Autor)

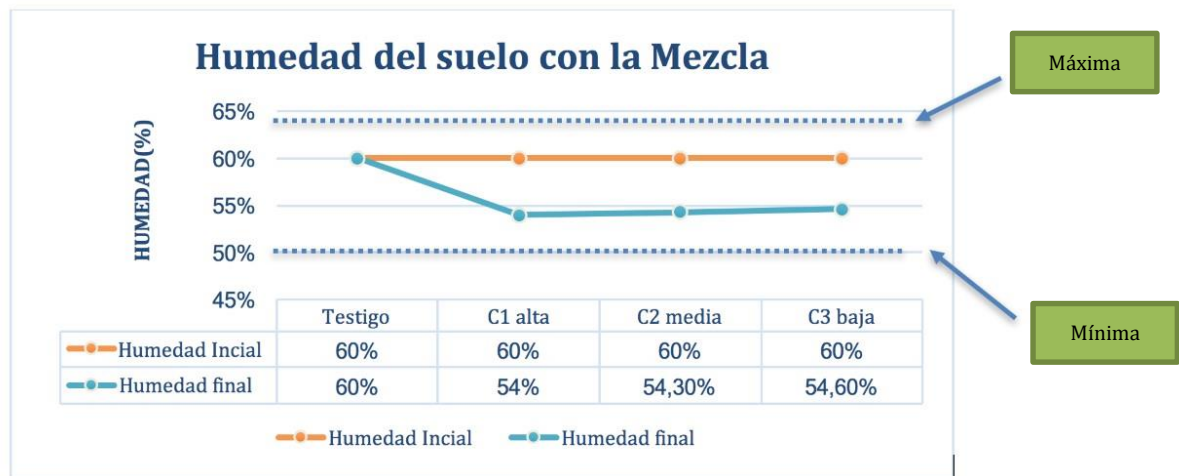


Figura 29 Humedad promedio del suelo aplicado la mezcla.
Fuente: (Autor)

Según Acosta y Solís, (2013), mencionan que una humedad óptima para las poblaciones de lombrices van del 55 al 80 % debido a que estos individuos se desarrollan en ambientes húmedos, pero por encima de dicho rango se considera una humedad excesiva en condiciones anerobicas debido a que estos individuos respiran a través de su piel fría y húmeda, en caso de encontrarse con niveles de sequias estos mueren por asfixia, o por contacto de su piel a medios que presenten una alta cantidad de xenobióticos ya que son altamente sensibles.

4.2.2 Medición de pH al inicio y al final del bioensayo.

El pH debe estar dentro de los parámetros que se observan en la Tabla 16, los valores entre 6,5 y 7 representan un pH neutro y con poca acidez, estos índices deben permanecer dentro de estos rangos numéricos ya que son fundamentales para determinar la cantidad de nutrientes y la sobrevivencia de todas las lombrices de tierra en el bioensayo.

Tabla 16 pH promedio al inicio y al final del bioensayo.

Concentración	Carbofurán		Carbedazim		Carbofurán y Carbedazim	
	pH Inicial	pH Final	pH Inicial	pH Final	pH Inicial	pH Final
Testigo	6,5	7	6,5	6,7	6,5	6,9
C1 alta	6,5	5,9	6,5	6,9	6,5	5,4
C2 media	6,7	6,9	6,7	6,3	6,7	5,2
C3 baja	7	5,3	7	5,3	7	5,0

Fuente: (Autor)

En la Figura 30, se puede apreciar la comparación entre pH inicial y final de los individuos de prueba. El testigo, el mismo que no fue sometido a ningún tipo de sustancia no presentó un cambio en el pH, sin embargo, en los otros tratamientos estos valores disminuyeron por la combinación del alimento más la descomposición del Carbofurán, Carbedazim y la Mezcla.

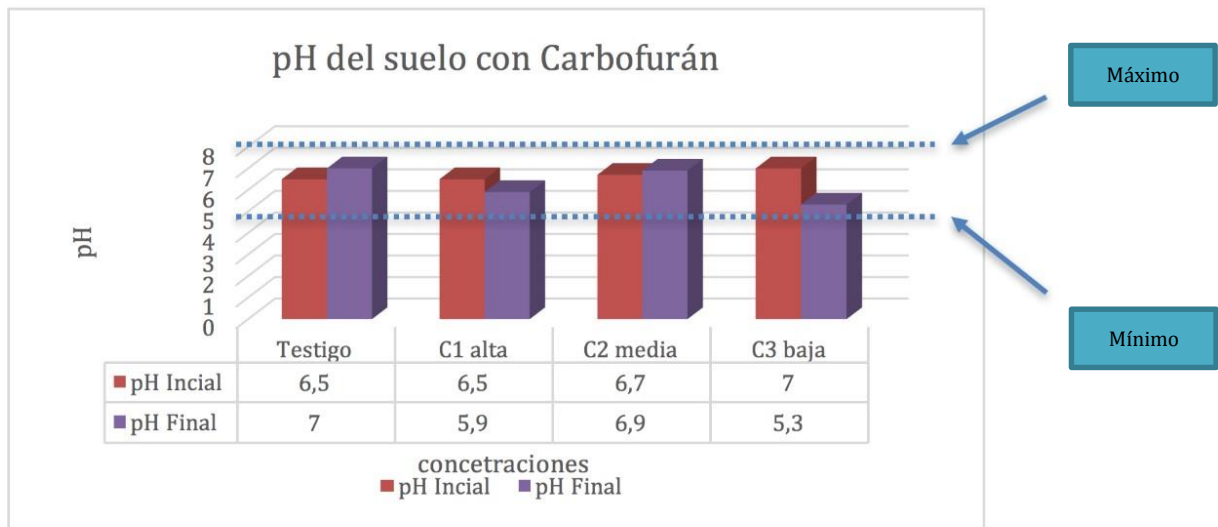


Figura 30. pH del suelo aplicado Carbofurán.

Fuente: (Autor)

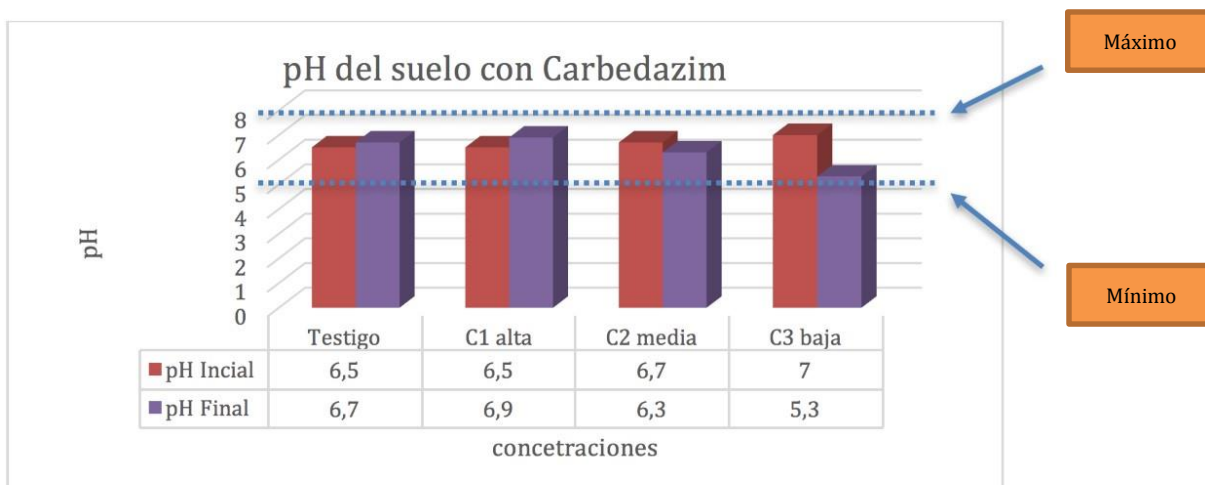


Figura 31. pH del suelo aplicado Carbedazim.
Fuente: (Autor)

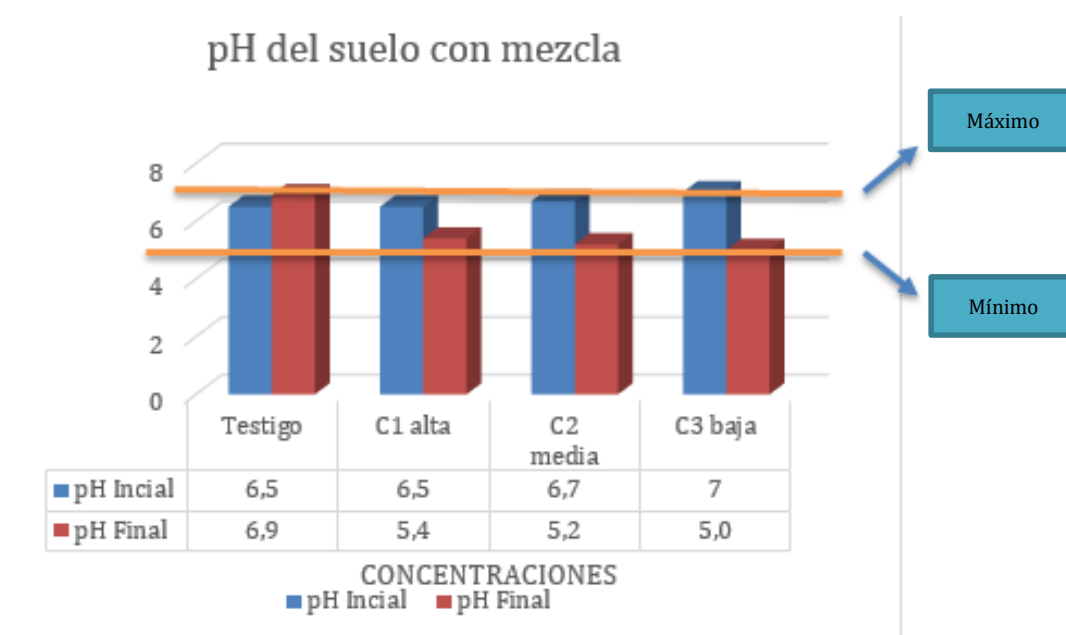


Figura 32. pH del suelo aplicado Carbedazim y Carbofurán.
Fuente: (Autor)

En la Figura 31 y 32, para la concentración baja evaluada con Carbendazim y la mezcla realizada entre Carbofurán y Carbendazim se observó un disminución de pH, debido a la

formación de lixiviado que genere la mezcla de esta sustancia con el suelo de prueba haciéndolo ligeramente ácido.

Alonso y Chicas, (2013), mencionan que un pH óptimo para la supervivencia de lombrices de tierra en suelos o en pruebas de laboratorio va entre 6.5 y 7.5, esto se debe tomar en cuenta que si estos organismos viven en suelos o medios con altas niveles de metales pesados, plaguicidas, fármacos etc. El pH se ve ligeramente modificado a un medio básico debido a la producción de lixiviado que estas sustancias generan.

4.2.3 Conductividad eléctrica al inicio y al final.

Este parámetro indica la concentración de sales presentes en la solución del sustrato y la capacidad de un material para conducir la corriente eléctrica. La conductividad eléctrica es primordial para las lombrices de tierra debido a que constituyen una mayor cantidad de sales. En la Tabla 17, se exponen los valores obtenidos luego de medir los recipientes contenedores de cada tratamiento.

Tabla 17 Conductividad eléctrica promedio al inicio y al final del bioensayo.

Concentración	Carbofurán		Carbedazim		Carbofurán y Carbedazim	
	(CE) inicial	(CE) final	(CE) inicial	(CE) final	(CE) inicial	(CE) final
Testigo	5,5	6	5,5	5,5	5,8	6
C1 alta	5,5	5,9	5,5	5,8	5,5	6,3
C2 media	5,5	5,5	5,5	6,0	6,5	5,5
C3 baja	5,5	5,4	5,5	5	5,3	5,9

Fuente: (Autor)

Luego de observar la Tabla 17, se representa a continuación gráficamente los datos finales en las Figuras 33, 34 y 35 que se encuentran a continuación, en los mismos se observa un aumento en la conductividad eléctrica producto de las sustancias agregadas al sustrato, estos compuestos solubles tienen una liberación lenta afectando indirectamente a los organismos expuestos a los tratamientos, además su composición es concentrada y supera los límites de absorción

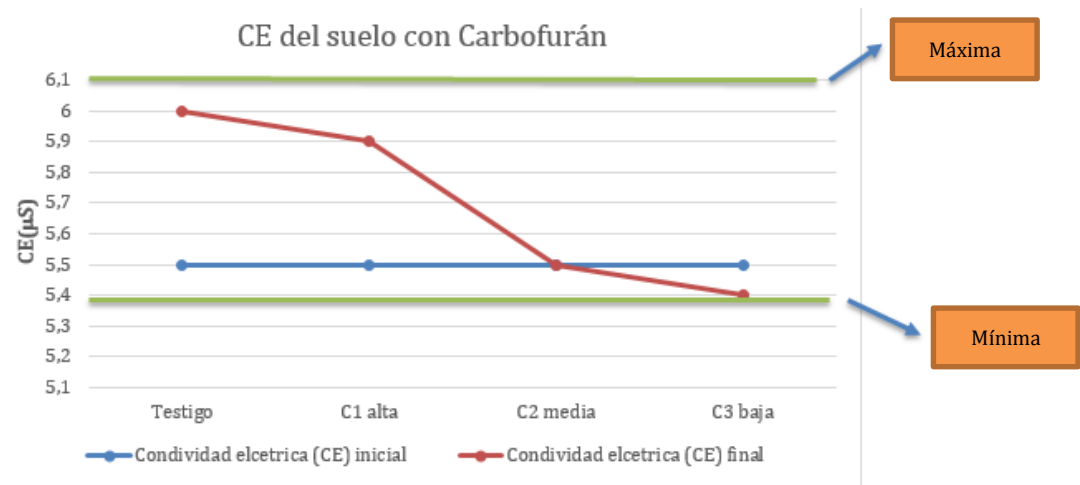


Figura 33 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carburan.
Fuente: (Autor)

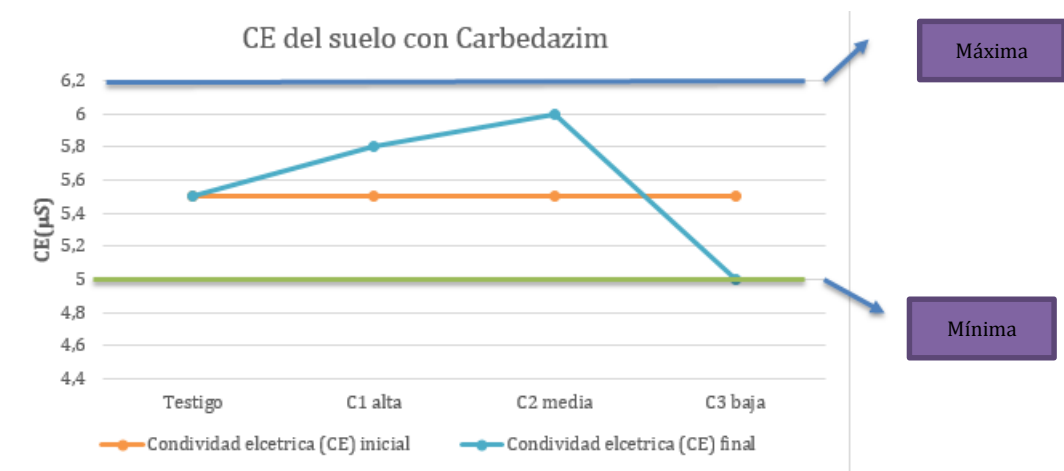


Figura 34 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carbedazim.
Fuente: (Autor)

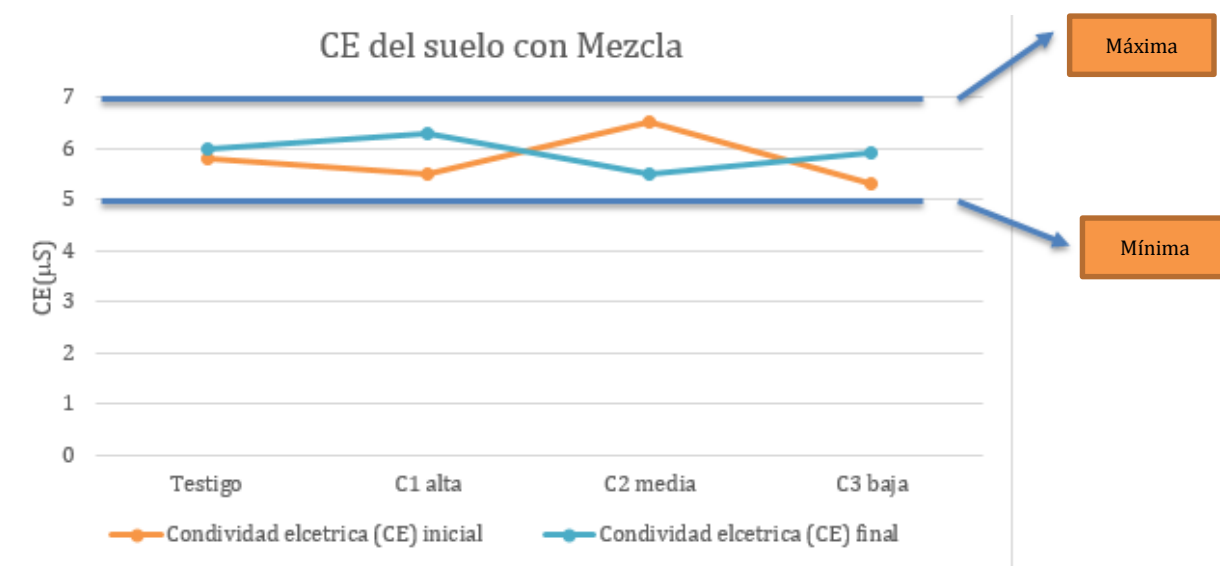


Figura 35 Conductividad Eléctrica promedio del suelo con Carbofurán y Carbedazim.
Fuente: (Autor)

Fernández y Rojas, (2010), dicen que la conductividad eléctrica en un suelo óptimo para microorganismos y microorganismos benéficos para el suelo debe estar entre 4 y 5 μS para que estos organismos tengan una relación, es decir, el suelo pueda conducir la corriente eléctrica al mismo tiempo que se va aprovechando las propiedades de las sales solubles de los nutrientes del suelo.

4.2.4 Temperatura al inicio y al final del bioensayo.

Los individuos de *Eisenia andrei* sometidos al bioensayo deben tener las condiciones normales de su hábitat natural, por lo cual, los recipientes donde se colocaron a los organismos estaban llenos de agujeros, con el fin de permitir el ingreso de oxígeno y además un contacto adecuado con la temperatura ambiente tal como se muestra en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18 Temperatura al inicio y al final del bioensayo.

Concentrac ión	Carbofurán		Carbedazim		Carbofurán y Carbedazim	
	Temperatura inicial	Temperatura final	Temperat ura inicial	Temperat ura final	Temperatu ra inicial	Temperat ura final
Testigo	23	24,6	23	24,6	23	23
C1 alta	23	24,6	23	24,6	23	25,2
C2 media	23	24,6	23	24,6	23	25,3
C3 baja	23	24,6	23	24,6	23	25,6

Fuente: (Autor)

La temperatura es una condición de control del lugar en donde se colocaron los recipientes contenedores de lombrices de tierra con sus respectivos tratamientos, las mediciones realizadas muestran un aumento de temperatura normal que no afecta de ninguna manera en el bioensayo. Los tratamientos aplicados no influyen con la temperatura del ambiente, tampoco con los resultados de las lombrices por lo que se mantienen hasta el final las temperaturas óptimas en todo el proceso.

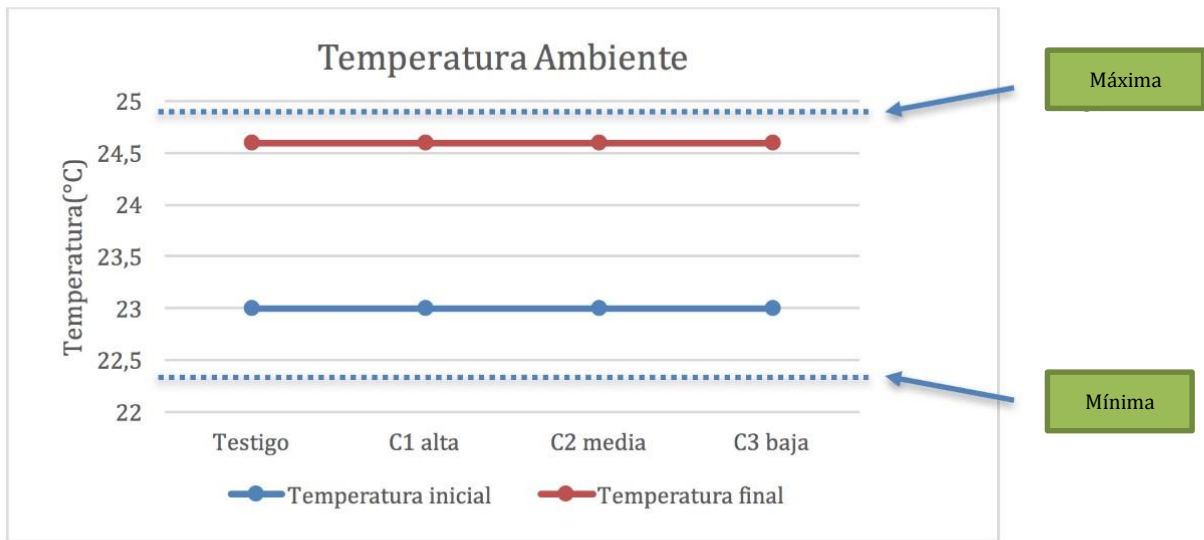


Figura 36 Temperatura ambiente.
Fuente: (Autor)

La temperatura óptima para la supervivencia de las lombrices de tierra roja californiana en condiciones de experimentación en laboratorio debe estar entre 20 a 28°C que es una temperatura ambiente adecuada y permite que estas puedan tener su hábitat natural, ya que a altas y bajas temperaturas estos organismos disminuyen su actividad y entran en un periodo de latencia, es decir disminuyen la actividad reproductiva y de descomponer materia orgánica en suelos y pueden llegar incluso a disminuir la biomasa de estas poblaciones (Alonzo & Chicas, 2013).

4.3 Resultados de Sensibilidad en *Eisenia andrei*.

Los resultados obtenidos en cuanto a su sensibilidad revelan a continuación que cuando los individuos de *Eisenia andrei*, se exponen a niveles tóxicos agudos sin ser previamente adaptados a concentraciones menores de estos agroquímicos provocan una muerte relativamente brusca debido a que en su entorno natural no están adaptados a recibir cantidades de compuestos químicos como presentan Carbofurán, Carbendazin y su mezcla.

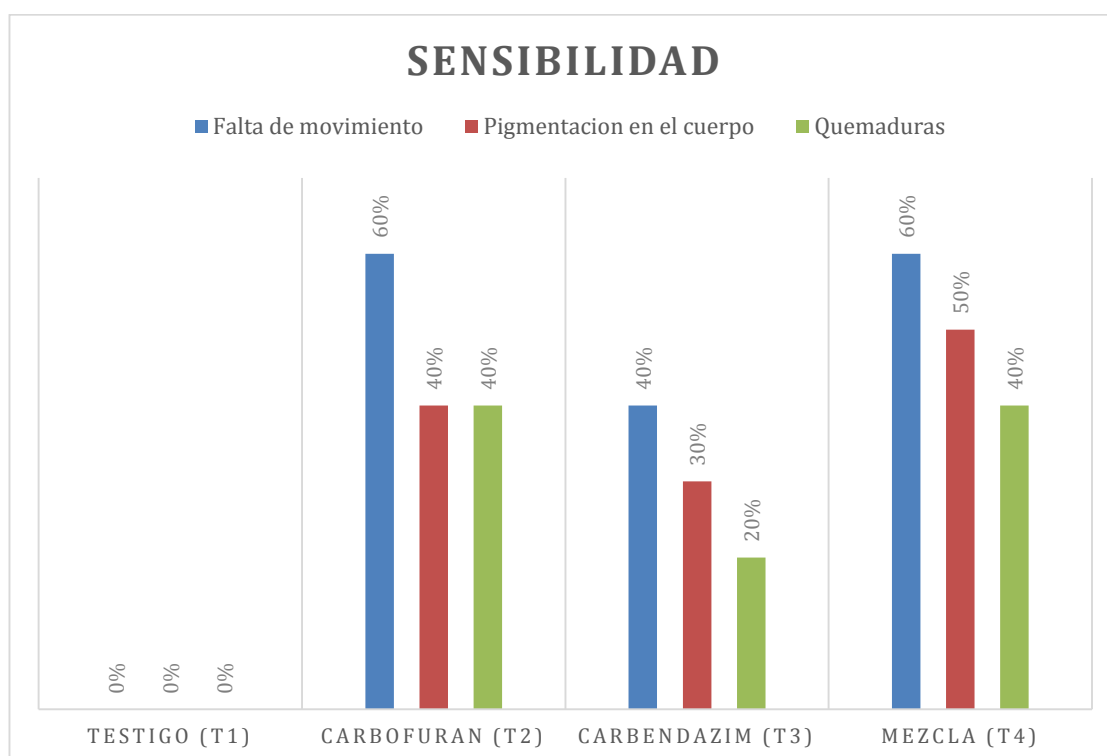


Figura 37 Sensibilidad en *Eisenia andrei* durante el bioensayo de mortandad con sus respectivos tratamientos.

Fuente: (Autor)

En la Figura 37, mostrada con anterioridad los cambios más evidentes que presentaron fueron para falta de movilidad, pigmentación en su cuerpo y quemadura para el agroquímico Carbofurán y para la mezcla de estos agroquímicos, que corresponden al tratamiento T2 y T4, cabe mencionar que estos síntomas pudieron ser evidentes debido al estrés al cual estaban sometidos, lo que quiere decir que los individuos de *Eisenia andrei* son altamente sensibles a cambios en medios altamente contaminados. Según Iannacone José Alberto (2011) las dosis letales de estos químicos en aplicación comúnmente registradas producen cambios bioquímicos, fisiológicos y en el comportamiento de los individuos, es decir que en general se acepta la degradación ambiental de los ecosistemas por plaguicidas de uso cotidiano como el Carbofurano y Carbendazim, Cartap, Metomyl, que es un factor crítico de declinación de especies en peligro, no solo macroorganismos sino también aves.



Figura 38 Quemaduras presentadas por *Eisenia andrei* en exposición a la mezcla de Carbofurán mas Carbendazim.
Fuente: (Autor)

4.4 Análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

Los resultados obtenidos en la técnica de RFLP que fueron sometidas las muestras de cada de uno de los compuestos, después de haber realizado la extracción de ADN de los individuos de *E. Andrei* que sobrevivieron a cada uno de los tratamientos y de haber cortado los fragmentos de ADN con la enzima de restricción Eco RI gracias a la actividad de las enzimas endonucleasas de restricción para la identificación genotóxica es decir si en cada una de las muestras a que fueron sometidos los individuos existe la presencia de mutaciones o aberraciones en el material genético que ocasionaron Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.

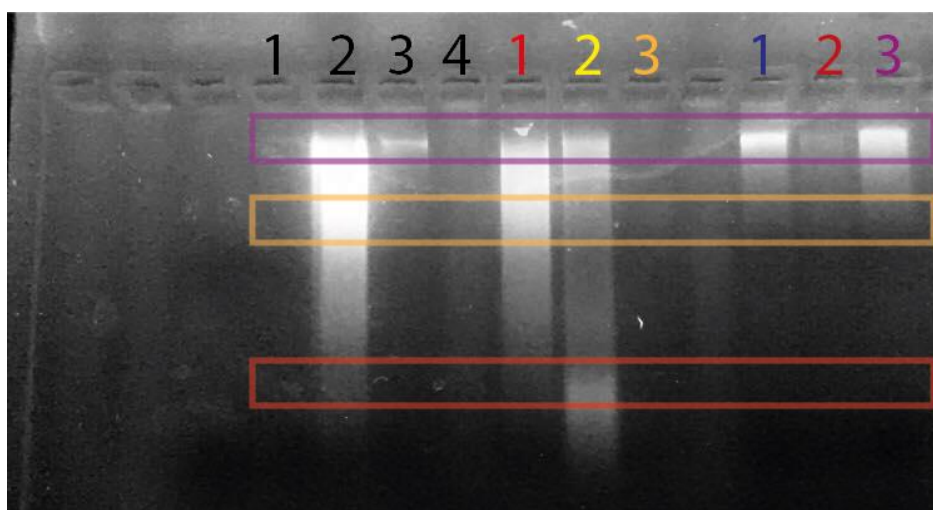


Figura 39 Gel de agarosa utilizado en la técnica RFLP.
Fuente: (Autor)

Los resultados en gel de agarosa a una concentración del 2,5% y sometido a electroforesis a 90V y 45 min muestran que el nivel de daño genotóxico inducido por las concentraciones de cada uno de los tratamientos en ADN de *Eisenia andrei* dependió evidentemente de las mismas de modo que la dosis alta y media de Carbofurán (2025; 1012 ppm) provocó mayor daño en el ADN que la dosis baja del mismo agroquímico en la ilustración se puede evidenciar la presencia de las bandas.

De la misma manera, para Carbendazim se puede evidenciar la presencia de bandas en la aplicación de dosis alta y media en donde la aplicación fue (2890, 14045 ppm) y de la misma manera se puede evidenciar claramente la presencia de las bandas, los que nos indica también que para estas dosis aplicadas también hubo un daño permanente en el ADN de los individuos. Para la mezcla entre estos agroquímicos que mencionamos también podemos evidenciar en la ilustración claramente la presencia de bandas para la dosis alta y baja (4915, 12287 ppm) por lo que también, así como se detalla para los dos compuestos existió un daño del ADN por lo que se puede interpretar que hubo aberraciones y por lo tanto un daño genotóxico en estos individuos al ser sometidos a estas dosis de la mezcla de los dos agroquímicos.

Un estudio realizado por Romera, (2016), presenta un análisis de riesgos que supone para la salud, el ambiente y su toxicidad el uso de algunos de los productos químicos que se emplea de forma convencional en la agricultura a nivel local y mundial en el ámbito de daños genéticos se presenta mutaciones, teratogeneidad y cancerogenicidad para los siguientes fungicidas como Benomyl que presenta mutación genética y teratogeneidad dando como positivo de un test experimental para valoraciones de mutaciones genéticas y teratogeneidad, así también se presenta para Cartap, Carbendazim, Mancozeb, y en cuanto a estudios realizados también con insecticidas, nematocidas y acaricidas Carbaryl, Carbofuran, Cartap, Malathion, Methamidophos, Methomyl, Parathion se presentó positivo en un solo test experimental para valoración de mutaciones genéticas en un test de rotura de ADN sobre efectos cromosómicos, en cuanto a teratogeneidad el resultado también positivo de un test experimental y finalmente se presentó Carcinogenicidad positivo de más de un test experimental es decir fueron modelos experimentales diversos lo que indica que este tipo de fitofármacos presentan riesgos elevados y su control debe

ser estrictamente riguroso en cuanto a presencia de muchos problemas que presenta a la salud, el ambiente y a su toxicidad elevada testada en organismos no blanco.

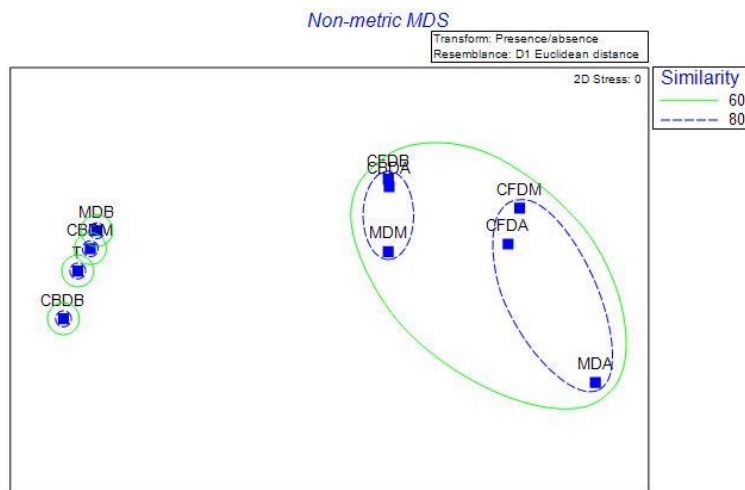


Figura 40 Similitud y rango de toxicidad a la aplicación de dosis de Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.

Fuente:(Autor)

Según Iannacone José Alberto (2011), la toxicidad del Carbofurán y el Carbedazim es altamente dependiente de la duración, frecuencia, intensidad de exposición, formulación y sustentabilidad del organismo evaluado. Estas rutas de exposición toxicológica para lombrices de tierra dependiendo de la especie son diferentes debido a los procesos metabólicos y bioquímicos.

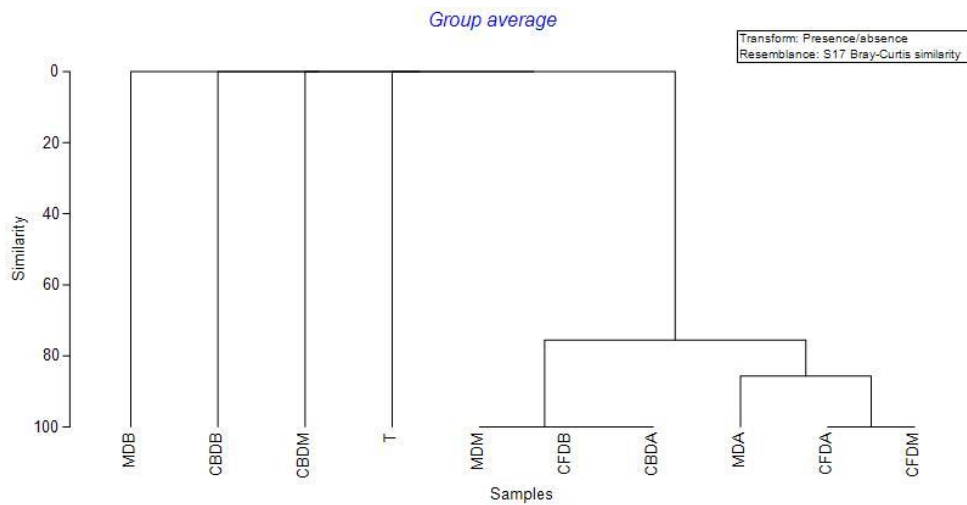


Figura 41 Similitud y rango de toxicidad a la aplicación de dosis de Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.

Fuente:(Autor)

En la Figura 41, mostrada anteriormente se puede observar que para el testigo es decir el organismo control (T), y para la aplicación de Carbendazim en dosis media (CBDM), Carbendazim en dosis baja (CBDB), y la mezcla en dosis baja (MDB), son independientes de su toxicidad y su aplicación mientras que para Carbofurán en dosis alta (CFDA), media (CFDM) y baja (CFDB), Carbendazim en dosis alta (CBDA), la mezcla en dosis alta (MDA) y media (MDM) prestaron un 80% de similitud lo que quiere decir que su aplicación y su toxicidad al aplicar estas dosis dependen el uno del otro y que por lo tanto estas dosis son altamente tóxicas para los individuos si se aplican solo o en mezcla.

Según estudios realizados por el Dr. Peter Kille de la Universidad de Cardiff (2008), quien ha dirigido un grupo de investigación, explica que estos estudios de aplicación de plaguicidas como cartap, metomil, carbendazim, benomyl, carfosulfan, parathion, clorpirifos en concentraciones distintas de contaminantes ayudan a comprender como durante millones de años la lombriz ha desarrollado mecanismo adaptativos para adecuarse a la contaminación de los suelos a través de respuestas genéticamente programadas y que estas ofrecen también, pistas importantes para saber cómo los seres humanos reaccionarán o se adaptarán a la exposición de sustancias químicas, ya que compartimos vías genéticas comunes con las lombrices de tierra.

4.5 Evaluación del Riesgo Ambiental y su toxicidad que presentan Carbofurán, Carbendazim y su mezcla.

La Evaluación de Riesgo Ambiental “ERA” es un objetivo para la obtención de resultados, sin embargo, otros autores la definen como una metodología que ayuda a establecer preferencias en una forma objetiva y científica. La ERA es utilizada además en diferentes ámbitos tales como, políticas evaluativas, utilización adecuada de tierras, manejo de recursos, seguridad de productos y sobre todo planeamientos financieros (Arrázola, 2016).

Ambientalmente la ERA es una herramienta de uso reciente y es apreciada una herramienta muy útil porque arroja resultados objetivos y racionales para la toma de decisiones y prioridades en cuanto a la política ambiental. Para los datos que se obtuvo en el bioensayo y adaptando esta herramienta del ERA utilizamos la siguiente ecuación (De la Torre, 2014).

$$TER = \frac{CL50\%}{PEC}$$

TER: Evaluación del riesgo ambiental (Exposición y efecto)

PEC: Concentración ambiental prevista teórica (por sus siglas en ingles).

Tabla 19 Evaluación de riesgo ambiental (ERA) en especie *Eisenia andrei*.

Especie	Tratamiento	Efecto	Exposición	Resultados	Nivel crítico	Riesgo
<i>E. andrei</i>	Carbofurán	DL ₅₀	0,44	48,74	>10	Si
<i>E. andrei</i>	Carbendazim	DL ₅₀	0,44	6,38	>10	No
<i>E. andrei</i>	Mezcla(Carbofurán y Carbendazim)	DL ₅₀	0,44	28,06	>10	Si

Fuente: (Autor)

Para Carbofurán como se muestra en la Tabla 19 en evaluación de riesgo dio como resultado 49,74 que es un valor superior a 10, según Arrazola (2016), el valor TER en condiciones de laboratorio para lombrices de tierra explica que si el valor de TER es mayor a 10 no se debe dar una autorización para el uso de agroquímicos, como valor expuesto anteriormente es superior a 10 se concluye que este nematocida debe estar prohibido en cualquier tipo de aplicación ya que su uso es altamente tóxico.

En cuanto a Carbendazim se obtuvo un resultado de 6,38 que es un valor inferior a 10 por lo que su autorización de este fungicida es aceptable, sin embargo, según María del Pilar Romera (2014) en su artículo “Agricultura Ecológica” el Carbendazim es mutagénico e inhibidor de enzimas, también, afecta a humanos por lo tanto, su utilización debería ser controlada.

Y finalmente en la mezcla de Carbofurán más Carbendazim se consiguió el resultado de 28,06 que continúa siendo un valor superior a 10 por lo tanto en denominación TER nos dice que es tóxico y presenta un riesgo, por ende, debe ser prohibida su aplicación. El resultado obtenido posiblemente proviene de la diferencia de densidades, el compuesto más denso es Carbendazim con una densidad de $1,8 \text{ g.ml}^{-1}$, por lo tanto, fue el compuesto predominante logrando que los índices de TER no sean tan elevados como los resultados obtenidos en Carbofurán.

Según el convenio de Róterdam (2017), el riesgo agudo para lombrices de tierra y otros macroorganismos del suelo en valores TER aplicados en la Unión Europea para carbofurano el valor nominal es superior a 10, lo que indica un riesgo elevado a largo plazo para las lombrices de tierra. En estudio de laboratorio con la formulación Furadan 5G, para estos individuos se obtuvieron valores de 50,65 lo que indica que el plaguicida puede entrañar un riesgo elevado para estos macroorganismos. En Canadá, en una evaluación TER, a nivel de cribado la preocupación para las lombrices de tierra superó las tasas de aplicación con 52,8 de este ingrediente activo (ONU, 2017).

4.6 Socialización.

La socialización se realizó el día 30 de octubre del 2017 en el salón de Calidad Ambiental del Gobierno Provincial de Imbabura, cabe recalcar que en la presentación de los resultados estuvo presente el Abg. Pablo Jurado, Prefecto de la Provincia y su equipo técnico encargado del control ambiental, de esta manera, la investigación tiene relevancia científica y puede ser aplicada en el campo laboral. Se invitó también a los docentes de la carrera de Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, con la finalidad de exponer el trabajo de Investigación: “Evaluación de la toxicidad y mortalidad de Carbofurán y Carbendazim sobre *Eisenia andrei*.”

Durante la exposición se comentó el problema ambiental que presenta el uso de estos plaguicidas sintéticos al suelo, el daño a los macroorganismos como la lombriz de tierra y los problemas que presentan a la salud humana. De igual forma se trató la metodología empleada en esta investigación, tratamientos y análisis que se lograron realizar en toda la fase de experimentación. Se expusieron los resultados preliminares obtenidos en la investigación para así poder tener en cuenta el riesgo que presenta el uso y el abuso de estos plaguicidas sintéticos.

En la Figura 42, se muestra el proceso de socialización en el salón de calidad Ambiental del Gobierno Provincial de Imbabura.



Figura 42 Socialización de la investigación en el salón de Calidad Ambiental del Gobierno Provincial de Imbabura.

Fuente: (Autor)

En las conclusiones y recomendaciones se finaliza con un foro de preguntas por parte de los técnicos de Control y Calidad Ambiental. Las encuestas aplicadas a los presentes arrojaron los siguientes resultados: el 95% establece que la sala donde se desarrolló el evento brindó las comodidades necesarias; el 90% manifiesta que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado, el 95% considera que el expositor mostró dominio en el tema; el 95% expresa que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado. En la Figura 43, se muestra la

medición de impacto de la investigación obtenida de las encuestas en donde el 95% dice que el tema posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad.

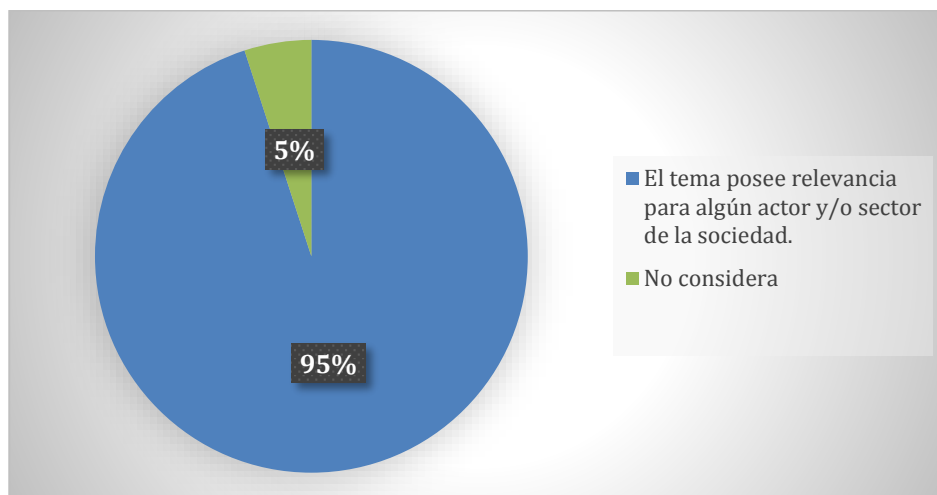


Figura 43. Medición de impacto de la investigación.
Fuente: (Autor)

En la Figura 44, se muestra la medición de impacto de la investigación en donde el 95% de los encuestados manifiestan que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores, debido a que en el mercado no solo existen estos plaguicidas usados en la investigación sino una variedad de productos sintéticos usados en la agricultura.

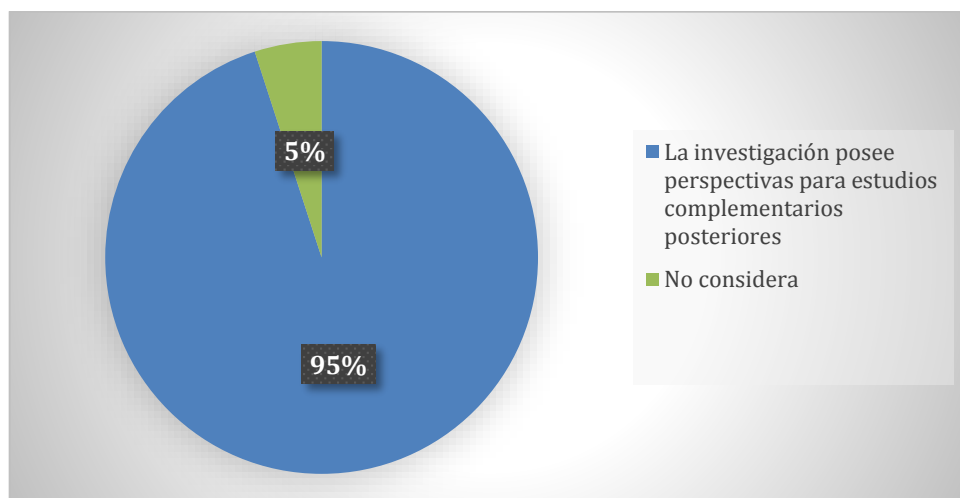


Figura 44. Medición de impacto de la investigación con perspectivas para estudios complementarios posteriores.

Fuente: (Autor)

En la Figura 45, se observa de igual manera para la medición de impacto de la investigación el 95% cree que el tema investigado genera actualmente o a un futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución.

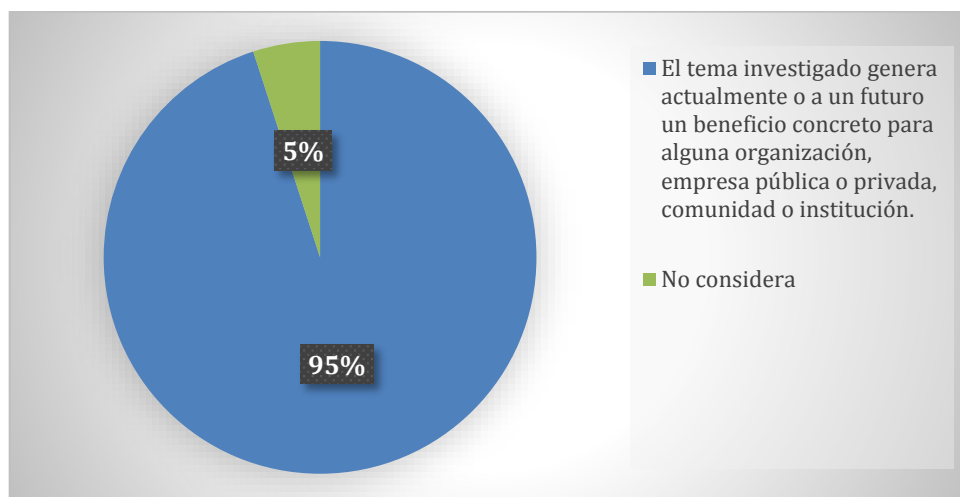


Figura 45. Medición de impacto de la investigación que genera actualmente o a un futuro un beneficio para alguna organización, comunidad o institución.

Fuente: (Autor)

En la Figura 46, se muestra la medición de impacto de la investigación en donde el 100% de los encuestados consideran que los objetivos planteados expuestos en la misma se cumplieron con éxito uno a uno.

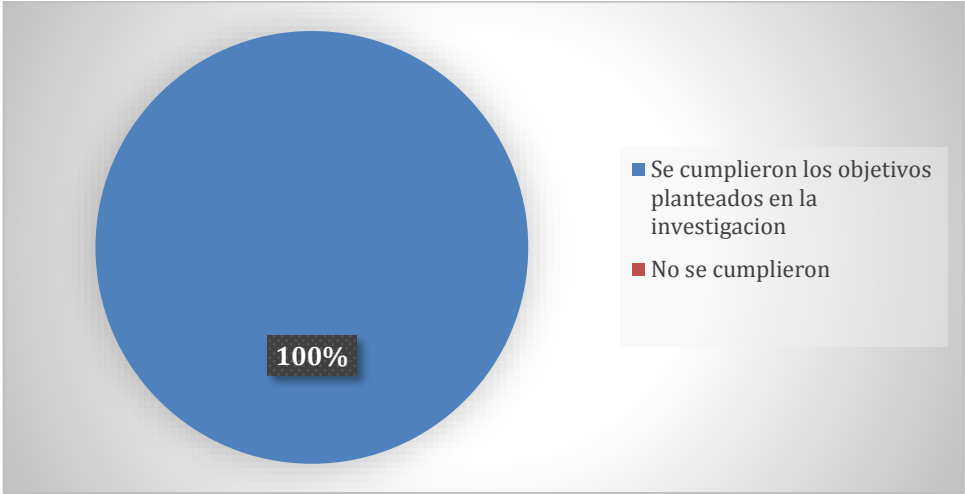


Figura 46. Medición de impacto de la investigación en cuanto al cumplimiento de objetivos planteados.
Fuente: (Autor)

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusiones.

- La dosis letal media para Carbofurán es de 2025 ppm, para Carbedazim es de 2890 ppm y para la mezcla entre los dos compuestos es de 4915 ppm, las mismas, que son indicadores de toxicidad aguda para este tipo de sustancias y generan una mortalidad del 50% de los organismos de prueba.
- Antes de realizar el ensayo, los individuos pertenecientes a T1 tienen peso promedio de 0,3214g a los 14 días de terminado el bioensayo, mientras que los individuos expuestos al Carbofurán en el T2 obtuvieron un peso promedio final de 0,2285 g; y finalmente los individuos sujetos a Carbedazim en el tratamiento T3 alcanzaron un peso promedio final de 0,3042 g, y por último los individuos expuestos a la mezcla T4 logran un peso promedio final de 0,2261 g. El cambio de pesos es mayor en la mezcla y Carbofurán y esto se debe a la persistencia de estas sustancias sobre el suelo.
- Para el tratamiento T1 o testigo en cuanto a sensibilidad neta no presentó cambios en el 100% de los individuos; en el tratamiento T2 con Carbofurán se evidenció un cambio alto en cuanto a falta de movimiento, pigmentación en el cuerpo y quemaduras de un 60% y un 20% para cambio moderado; en el tratamiento T3 con la presencia de Carbedazim se dio un cambio moderado del 30% y 50% no presentó cambio; mientras que con la mezcla o tratamiento T4 se visualizó un 60% de cambio alto en cuanto a falta de movimiento, pigmentación en el cuerpo y quemaduras, y un 20 % de cambio moderado.
- Una vez que se extrajo el ADN y se realizó el análisis de polimorfismo aplicando la técnica RFLP, se cortó con la enzima de restricción Eco RI y se obtuvo para Carbofurán la presencia de 3 bandas en sus diferentes dosis aplicadas, para Carbedazim 4 bandas y en la mezcla 2 bandas, es decir, los individuos expuestos a los plaguicidas presentaron un daño genotóxico que indica mutaciones en cuanto a su ADN, además, es un bioindicador de carcinogénesis.

- Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de riesgo ambiental arrojaron los siguientes valores: para Carbofurán 49,74 que al ser un valor mayor que 10 implica un riesgo ambiental por su alto nivel crítico; para Carbedazim 6,38 que indica bajo riesgo pero al ser considerado mutagénico su utilización debe ser controlada y en la mezcla el valor obtenido fue de 28,06 que continúa siendo un valor superior a 10 por lo tanto en denominación TER nos dice que es tóxico y representa un riesgo, por ende, debe ser prohibida su aplicación.

5.2 Recomendaciones

- Según el artículo 1 de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro, se cancela los registros de los productos que contengan Carbofurán y sus mezclas, es decir, está prohibida su comercialización en el Ecuador, cabe recalcar que estas sustancias son comercializadas con normalidad en forma de contrabando, es por esto, que se recomienda evitar la utilización continua de Carbofurán, ya que no solo afecta al suelo, también genera grandes daños a sistemas hídricos y las especies alrededor de ellos.
- Se recomienda realizar más pruebas de laboratorio y de campo acerca de plaguicidas de todo tipo y sus efectos en el ambiente, ya que todos generan riesgos de flora y fauna e indirecta y directamente para el ser humano.
- Se recomienda realizar bioensayos con suelos completamente limpios, ya que aquellos que poseen contaminantes influyen en la obtención de resultados debido a la presencia de variedad de metales pesados, plaguicidas u otros.

6. GLOSARIO

ADN: Acido desoxirribonucleico, es una proteína compleja que se encuentra en el núcleo de las células y conforma el material genético de todos los seres vivos.

Agarosa: polisacárido conformado por galactosas alfa y beta se son extraídas de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, es de gran poder gelificante.

Biomasa: es toda materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los residuos orgánicos, susceptibles que se pueden aprovechar energéticamente de alto potencial.

Bioensayo: es un proceso para determinar la potencia de una sustancia o de un material a partir de las respuestas producidas en organismos biológicos.

Carbendazim: fungicida sistémico de efecto preventivo de bajo espectro controla enfermedades producidas por hongos es de la familia de los bencimidazoles.

Carbofurán: es un insecticida, nematocida y acaricida que actúa por ingestión, contacto o ingestión es de la familia de los carbamatos, su persistencia en el suelo de media a alta.

Colinterasa: también denominada acetilcolinterasa, es una enzima que se encuentra en la sangre y sinapsis nerviosa.

Electroforesis: técnica que sirve para la separación de moléculas según la movilidad que estas adquieran en un campo eléctrico, esta disociación se puede dar sobre una superficie hidratada de un soporte sólido.

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

Fungicida: se emplean para prevenir enfermedades provenientes por hongos y mohos perjudiciales para las plantas, pero estos pueden contener sustancias altamente toxicas.

Genotóxico: son indicadores del proceso de carcinogénesis que presenta daños en material genético.

Hermafrodita: son aquellos organismos con la presencia de órganos sexuales femeninos y masculinos en un mismo ser vivo.

Nematicida: aquel agroquímico que se usa para matar nematodos que son parásitos en las plantas, algunos de ellos pueden ser tóxicos de amplio espectro.

Neurotransmisor: es aquella sustancia química cuya función principal es la transmisión de información de una neurona a otra atravesando el espacio llamado como parasimpático que separa dos neuronas sucesivas.

PEC: Concentración ambiental prevista (por sus siglas en ingles).

pH: Potencial de hidrogeno que indica el grado de acidez o basicidad de una solución.

RFLP: Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

TER: Evaluación de riesgo ambiental por exposición y efecto (por sus siglas en ingles)

Toxicidad: capacidad de una sustancia química capaz de producir efectos perjudiciales sobre un organismo o ser vivo al ponerlo en contacto con él.

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Acosta, M., & Solís, O. (2013). Precomposteo en la dinamica poblacional de *Eisenia foetida*. Costa Rica.
- AGROCALIDAD. (2013). RESOLUCIÓN DAJ-20133FA-0201.0136. Quito.
- Agromed. (2014). Insumos Inteligentes. Obtenido de Terralia: terralia.com/agroquímicos_de_mexico
- Alberto, I. J. (2011). Evaluación del riesgo ambiental del Carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Perú: Universidad Ricardo Palma.
- Alonzo, L., & Chicas, S. (2013). Determinacion de la Concentracion Letal 50 (CL50%) de dos plaguicidas sinteticos utilizando *Eisenia foetida*. San Salvador .
- Antalien. (2014). Carbendazim, hoja de seguridad. República Dominicana: Antalien, Agro Químicos.
- Arrázola, E. (2016). Evaluación de riesgo ambiental. Lima.
- Barros, J. (2014). Universitat de Barcelona. Obtenido de GroupsInovacio: ub.edu/start/GroupsInovacio
- Bedmar, F. (2011). Plagucidas agricolas empleados en mezclas para dosis letales de macroinvertebrados. Buenos Aires.
- Bravo, L. O. (2012). Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental. Mexico: SEP.
- Campos, S. (2013). Evaluacion de la toxicidad de metales en suelos del Valle de Toluca empleando como indicador *Eisenia andrei*. Toluca.
- CASAFE. (2009). Carbendazim. Argentina: CASAFE.
- Cerdas, C. M. (2015). Lombricultura. Mexico: SAGARPA.
- Cheriyedath, S. (2017). RFLP. Inglaterra: News Medical.
- Corona, D., & Cram, S. (2010). Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisneia andrei*. Distrito Federal México.
- De Andréa, M. M. (2010). El uso de lombrices de tierra como bioindocadores de contaminacion de suelos. Sao Paulo: Instituto Biológico.
- De la Torre, A. (2014). Toxicologia ambiental y Seguridad Quimica. España: Sanidad Ambiental. CISA.

- Del Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los Plaguicidas sobre el Ambiente y la Salud. La Habana : INHEM.
- Diaz, E. (2002). Guía de Lombricultura. España: ADEX.
- Domínguez, J. (2010). Eisenia Fetida y Eisenia Andrei. España: Universidad de Vigo.
- EDIFARM. (2016). PRO-MIX "PGX". Ecuador: Vadevecum.
- Fernández, L., & Rojas, N. (2010). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México, D.F.: SEMARNAT.
- Fisher, T. (2016). Invitrogen. Estados Unidos: Thermo Fisher Scientific.
- García Gutiérrez, C., & Rodríguez Mesa, G. (2012). Problemática y Riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa (Vol. 8). Mexico.
- Gimenez, R. (2004). Efectos toxicos de los plaguicidas benomyl y clorpirifos sobre la lombriz de tierra (*Eisennia fetida*),. Buenos Aires.
- Gómez, A. d. (2014). Evaluación de la Toxicidad en suelos mediante un Bionesojo con la lombriz de tierra *Eisenia fetida*. Bogotá.
- Governor, C. (2012). Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. New Jersey: New Jersey Departament.
- Gutiérrez, R. (2015). Fungicida Carbendazim . Argentina: Formulagro.
- Jaramillo, D. (2013). Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellin: Universidad Nacional de Colombia.
- Jiménez, P., & Hernández, S. (2015). AGROTECNOLOGIA.
- Luters, A., & Salazar, J. C. (2011). Area de Cartografía de Suelos y Evaluacion de Tierras. Argentina.
- Machado, S. (2012). Carbendazim y el medio ambiente. Brazil: Universidad de Sao Paulo.
- Manguashca, F. (2002). Tesis de grado previo a la obtencion de Ingeniero Agronomo. Efecto de ocho insecticidas de baja toxicidad para mamiferos en el control de adultos de gusano blanco de la papa. Quito, Ecuador.
- Martinez, J. (2011). La Biosfera. Mexico: Bio-Geo.
- Maya, E. (2014). Técnicas y métodos de investigación. Mexico: Universidad Autónoma de Mexico.
- Momo, F., & Falco, L. (2003). Las Lombrices de Tierra como Indicadoras de la Calidad de los Suelos. Luján: Laboratorio de Ecología de Argentina.

- Moreno, P. P. (2013). El suelo: La Edafosfera. Mexico: IES Ceuti.
- Nufarm. (2011). Carbofuran Agrogen 330 SC. Colombia: CISPROQUIM.
- Nufarm. (2017). Carbendazim 50. Colombia: CISPROQUIM.
- ONU. (2017). Documento de orientación para la adopción de decisiones Carbofurano. Canadá: PNUMA.
- Pérez, A. M. (2015). Marcadores Basados en Restricción e Hibridación. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Pineda, J. (2006). Lombricultura. Honduras: Litografía Lopez. R.L.
- Piola, L. (2011). Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina. Buenos Aires.
- Ponce, J. (2016). Evaluación de la tasa de mortalidad y sensibilidad de la especie "GUPPY" (*Poecilia reticulata*) en función de la concentración de metales pesados. Ibarra.
- Rios, Y. (2010). Importancia de las lombrices en la agricultura. Venezuela.
- Romera, M. d. (2016). Agricultura ecológica como solución a los problemas planteados por la Agricultura Convencional. España: InfoAgro.
- Romero, P. R. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Mexico: SMARNAT.
- Romero, S. H. (2014). Templates. Ecuador. Obtenido de Educarme.es: Servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamics/suelos_1.pdf
- Ruiz, R. (2014). Bioensayos. Mexico.
- Salomón Campos, V., & Sánchez Meza, J. (19 de Abril de 2013). Evaluación de la toxicidad de plaguicidas en el Valle de Toluca empleado como indicador *Eisenia andrei*. Toluca: RI. Obtenido de Universidad Autónoma del Estado de México.
- Sánchez, M., & Sánchez, C. (2010). Los Plaguicidas, Adsorción y Evolución en el Suelo. Salamanca: CSIC.
- Santucho, N. M. (2012). La controversia del Carbofurano. Argentina: Chemistry and Industry.
- Soriano, M. S. (2015). Morfología de la lombriz. Chile: Sciences University of Wales UK.
- Tecuapetla, M. (2014). Ecotoxicidad producida por agroquímicos empleados en el cultivo de *Gerbera jamesonii* en invernadero, en villa guerrero, Estado de México. Toluca.
- Tomita, K. (2013). Conservación de los Recursos Naturales para una Agricultura Sostenible. Asunción.

- Torres, E. (2012). Caraterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. España: Universidad Politécnica de Madrid.
- Universidad Nacional de Colombia . (29 de Abril de 2015). Plaguicidas. letales para humanos. Bogotá: Unimedios. Obtenido de agenciadenoticias.unal.edu.co.
- Valarezo, O., & Muñoz, X. (2011). Insecticidas de Uso Agrícola en el Ecuador. Portoviejo-Manabi: Estacion Experimental Portoviejo.
- Villacres Espinosa, N. F. (2014). Maestria en Agroecologia y Ambiente. El uso de plaguicidas quimicos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), su relación con el ambiente y la salud. Ambato, Ecuador .

8. ANEXOS.

NORMA OECD 207

Test de toxicidad aguda sobre lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)

Las lombrices de tierra, junto con otros organismos del suelo macrodescomponedores, están entre los organismos más importantes del suelo. Esto se debe a su capacidad para biotransformar la materia orgánica, reciclando nutrientes y contribuyendo a la formación de suelo. Esta importante función se puede ver afectada por la presencia de elementos químicos tóxicos en el suelo.

Una aproximación en la evaluación de los efectos de los agentes tóxicos en suelos se realiza mediante bioensayos de toxicidad. Para ello se han desarrollado metodologías estandarizadas (OCDE 2007) que permiten determinar los efectos agudos y crónicos en lombrices de tierra. Estos ensayos evalúan la contaminación del suelo, a través de indicadores como mortalidad, reproducción u otra respuesta subletal en los organismos seleccionados.

Anexo 1. Normativa de la OECD para bioensayos en lombrices de tierra.
Fuente: (Autor)

**ENCUESTA DIRIGIDA A LOS PRODUCTORES DE TOMATE
DE MESA A LA LOCALIDAD DE CHIRIYACU CANTON
URCUQUI PROVINCIA DE IMBABURA**

1.- ¿Dónde adquiere Ud. La semilla para su cultivar?

Compró

2.- ¿Qué tipo de plaguicida Ud. Usa para su cultivar?

Beacta, Fitorax, Furadan, Nobac, Robol, Amtracol,
Benomyl, Bosetil - Alveitito, Mancozeb, Acrebat

3.- Con qué frecuencia Ud. usa los plaguicidas mencionados?

2 veces a la semana

4.- ¿Qué tipo de plaga le ataca más a su cultivar?

Nematodos, Mosca blanca, Mirador, Phytoftora

5.- Ud. Realiza mezclas entre sus plaguicidas

Si ()

No ()

6.- ¿Cree Ud. Como agricultor que es mejor usar plaguicidas orgánicos?

Si ()

No ()

¿Por qué? _____

7.-¿Conoce Ud. Que el exceso de plaguicidas produce un alto porcentaje de personas con cáncer?

Si ()

No ()

No sabe ()

8.- Ha sufrido Ud. Alguna contaminación por derramamiento o por daño del recipiente durante el transporte.

Si ()

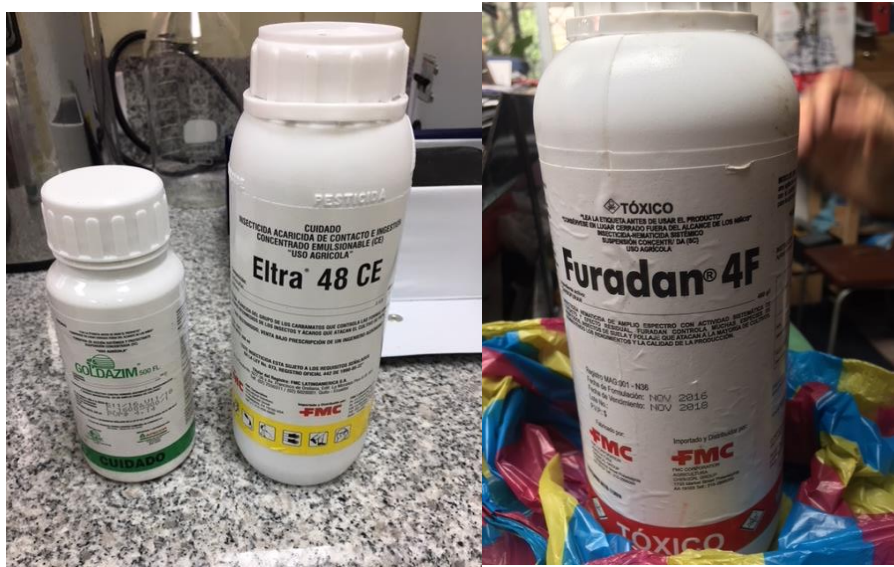
No ()

Anexo 2. Encuesta realizada a productores de tomate de mesa en la Comunidad de Chiriyacu, Cantón Urcuquí.

Fuente: (Autor)



Anexo 3. Cultivares de tomate de mesa en Invernadero.
Fuente: (Autor)



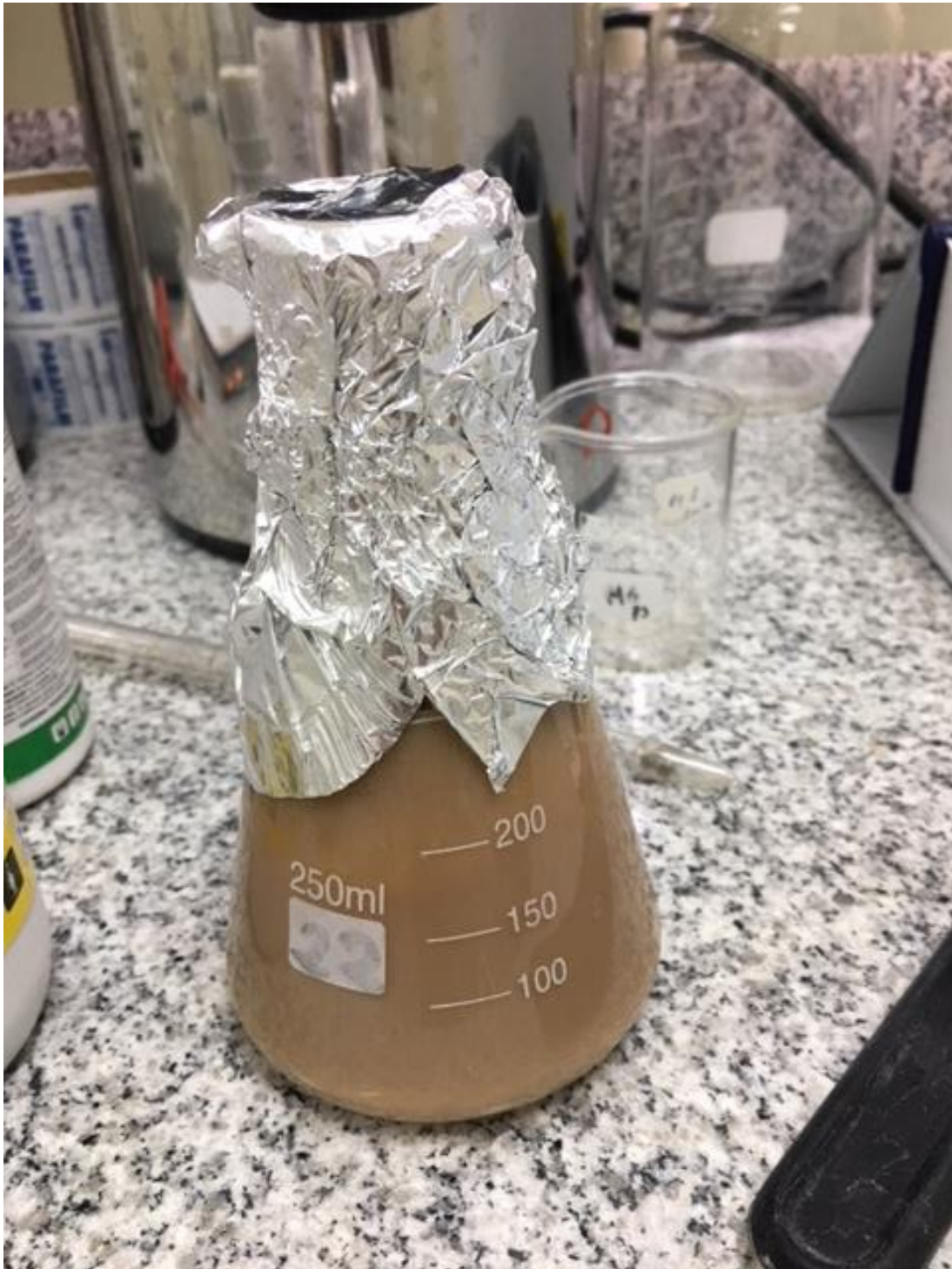
Anexo 4. Plaguicidas sintéticos usados en la agricultura local
Fuente: (Autor)



Anexo 5. Sustrato artificial utilizado en el bioensayo.
Fuente: (Autor)



Anexo 6. Recolección de Organismos de prueba en campo *Eisenia andrei*.
Fuente: (Autor)



Anexo 7. Preparación de soluciones madre.
Fuente: (Autor)



Anexo 8. Implementación del Bioensayo-Laboratorio de Biotecnología
Fuente: (Autor)

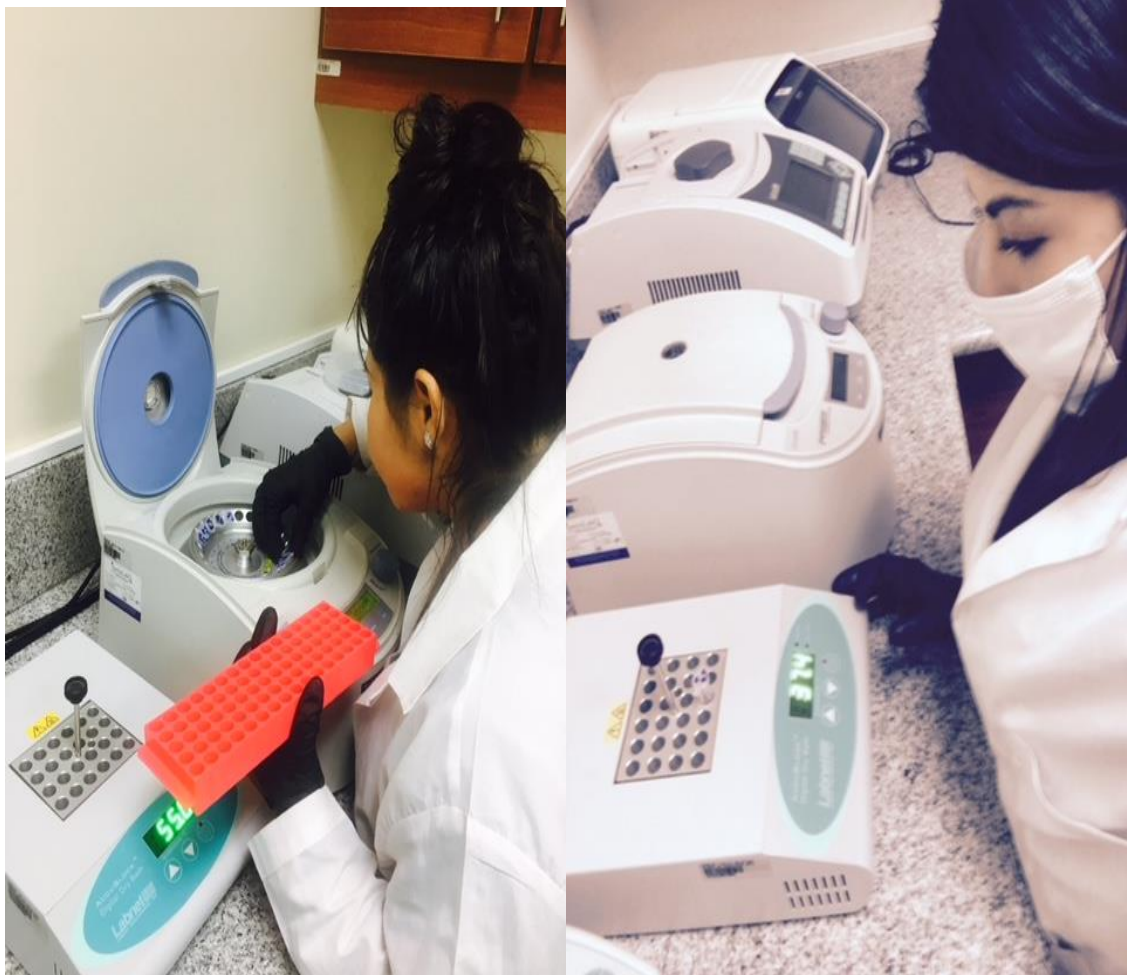


Anexo 9. Control del bioensayo.
Fuente: (Autor)



Anexo 10. Presencia de quemaduras en *Eisenia andrei*.

Fuente: (Autor)



Anexo 11. Extracción de ADN.
Fuente: (Autor)

1way ANOVA Tabular results				
1	Table Analyzed	Data 1		
2				
3	Repeated Measures ANOVA			
4	P value	0.0484		
5	P value summary	*		
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
7	Number of groups	3		
8	F	7.087		
9	R squared	0.7799		
10				
11	Was the pairing significantly effective?			
12	R squared	0.6201		
13	F	14.83		
14	P value	0.0141		
15	P value summary	*		
16	Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes		
17				
18	ANOVA Table	SS	df	MS
19	Treatment (between columns)	4.521	2	2.261
20	Individual (between rows)	9.462	2	4.731
21	Residual (random)	1.276	4	0.3190
22	Total	15.26	8	
23				
24	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
				Summary
				95% CI of diff

Anexo 12. Diseño ANOVA en el programa GraphPad Prism 5.
Fuente: (Autor)



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial invitación a la socialización del trabajo de investigación:

“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y MORTALIDAD DE CARBOFURÁN Y CARBENDAZIM SOBRE *Eisenia andrei*.”

Cuya autora es la Srta. Maura Lizbeth Moreno Jurado, de la carrera de Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo.

Fecha: Lunes 30 de Octubre del 2017

Lugar: Sala de reuniones del departamento de Calidad Ambiental del GPI

Hora: 9:30 a.m.

RESUMEN

Los estudios realizados parten de un bioensayo según la norma 207 de la OECD, esta investigación comienza desde la determinación de la mortalidad de lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) producida por el Carbofurán y Carbendazim mediante un ensayo eco toxicológico para la identificación de daño en células eucariotas, luego, se procede a identificar el posible daño genotóxico de dichos componentes sobre la lombriz de tierra mediante la técnica de RFLP para identificar las posibles mutaciones que causan los compuestos, finalmente, se determina el riesgo ambiental de Carbofurán, Carbendazim y su

Anexo 13. Invitaciones-Socialización.
Fuente: (Autor)



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: Maura Lizbeth Moreno Jurado
CARRERA: Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo
FECHA: 30 de Octubre del 2017

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
LUPE HEVIA	100204428-5	PREFECTURA DE MANABÍ	
DAVID JACO	9400496115	G.P.I	
JORGE ARTURO GASTRO	1103051236	GPI	
ANDREA ZLOTTA	1003175120	GPI	
Alexis Guerra	1002935003	GPI	
Paola Alarcón	1102873378	GPI	
DORA ANTONIO S.P.	0401268711	G.P.I.	
Patricio Urquiza	1002388682	G.P.I	
Antonio Rodríguez	100134906-5	Prefectura	
KAREN TACAN	1002256905	GPI	
Diana Naranjo	171861591-8	G.P.I.	
Christian Fuentes	1002254140	E.P.I.	
Daisy Pozo	1003185045	GPI	
Gabo Ortega	1102809819	G.P.I	
Agustín Rueda	1002079109	GPI	
MARIBEL LIMA	100403284-1	GPI	

Anexo 14 Nómina de asistencia a la socialización.
Fuente: (Autor)



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajo investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	30-10-2017		
EXPOSITOR	Elizabeth Moreno		
LUGAR	DENTRO PUCESI	FUERA PUCESI	

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					X
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					X
5. ¿Considera usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?			X		
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?				X	
8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?				X	
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?					X
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD.					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					Precedo de Imbabura

Anexo 15. Encuesta Realizada en el proceso de Socialización.
Fuente: (Autor)