

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

- Ensayo de inhibición del crecimiento de Algas de agua dulce y Cianobacterias OECD 201

INFORME DE RESULTADOS

INFORME Nº 1

(Análisis de toxicidad según las normas de ecotoxicidad para organismos acuáticos **OECD 201** y OCDE 202; y sobre los organismos terrestres OECD 207 y OECD 208. Ensayos realizados con la muestra):

-Muestra 1: Ecofire Rack Batteries (extraída de las pruebas realizadas en el sistema de extinción de incendios Ecofire Rack Batteries)

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

ATT: Ignacio Ruiz Ezquerro

ECOTOXILAB SL

Dr. Técnico: Gerardo Mengs

26-Junio-2025

1. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO EN ALGAS DE AGUA DULCE Y CIANOBACTERIAS (Norma OCDE 201)

1.1- MUESTRA DE ENSAYO

Identificación:

- Muestra 1: Ecofire Rack Batteries

Características de la muestra: extraída in situ de las pruebas realizadas en el sistema de extinción de incendios Ecofire Rack Batteries.

- Acondicionamiento previo de la muestra: Se ajustó el pH de la muestra con NaOH (pH= 4.35 inicial; pH= 6.54 final).

1.2-OBJETIVO DEL ESTUDIO

Establecer el riesgo de Toxicidad relacionada con la muestra denominada como *ECOFIRE Rack Batteries* sobre cultivos de algas verdes de agua dulce *Desmodesmus subspicatus*, a través del Test de Inhibición de Crecimiento Celular incluido en la Guía OCDE nº 201.

1.3- ESPECIE EMPLEADA EN EL ENSAYO

Se ha procedido a estudiar el grado de toxicidad que exhibe el producto extraído in situ del ensayo *ECOFIRE Rack Batteries*, siguiendo la directriz 201 OCDE para ensayo de productos químicos sobre el crecimiento de microalgas de agua dulce. La cepa *Desmodesmus subspicatus* (BEA 0141/1; Banco Español de Algas, Gran Canaria, España) fue la seleccionada para la realización de los ensayos de exposición al producto.

1.4- DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Dadas las características del producto a testar, se han aplicado las recomendaciones dictadas en Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Chemicals de la OECD (2018) para el testado de productos que presentan coloración, de tal forma que:

1. Punto 7.6.1. El valor de CFU ha sido establecido de acuerdo al criterio de proporcionalidad de la absorción respecto al producto a testar.

2. Punto 7.6.1.a. La intensidad de luz aplicada ha sido de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por encima del máximo de 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ recomendado en OECD TG 201.

3. Punto 7.6.1.b. El recorrido de luz en la muestra ha sido acortado, adecuando frascos Erlenmeyer de capacidad para 50 mL, y reduciendo el volumen de solución a 10 mL. en vez de los 50 ml recomendados en OECD TG 201.

4. Punto 7.6.1.c. Se comprobó que la agitación a 150 r.p.m. resultaba suficiente para garantizar una alta frecuencia de exposición de las algas a la irradiación seleccionada.

Se empleó una concentración inicial de 5×10^3 cel mL⁻¹ que fue expuesta al producto sobre medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium), con un volumen inicial de 10 mL en frascos Erlenmeyer de 50 mL de capacidad. El cultivo se mantuvo en movimiento continuo (150 r.p.m.), condiciones constantes de luz ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a una temperatura constante de 21 ± 1 °C. El pH inicial del medio fue de 7.1, y su control durante el tiempo de exposición evidenció que no existieron desviaciones superiores de 0.5 en ninguno de los frascos Erlenmeyer. La medición de biomasa se practicó mediante valoración *in vivo* de fluorescencia de clorofila, a través de un fluorímetro lector de placas (Tecan Genios, Tecan Group Ltd., Switzerland) provisto de filtro de excitación de 485 nm y filtro de emisión de 670 nm.

1.5- RESULTADOS

Los ensayos preliminares para establecer el rango de concentraciones determinaron la **inexistencia de efectos tóxicos a concentraciones de 100 mg L⁻¹**, por lo que se procedió a la realización de un “*Limit Test*” tal y como describe la directriz 201 OCDE. Para ello, un ensayo control negativo y 6 réplicas tratadas con una concentración de 100 mg L⁻¹ fueron sometidas al test de inhibición de crecimiento.

El análisis estadístico general fue realizado a través de hoja de cálculo Excel. El análisis de varianza ANOVA fue obtenido a través del paquete informático GraphPad Prism v8(GraphPad Software Inc., USA).

Los valores CFU obtenidos tras las mediciones de fluorescencia de clorofila, tanto en ensayo control como en las 6 muestras tratadas se resumen en el anexo 1. Las correspondientes tasas de crecimiento celular (μ) durante el tiempo de ensayo para el test control y los 6 tratados se presentan en el anexo 2. El correspondiente rendimiento tanto del ensayo control como de las 6 réplicas, así como la estimación de las distintas varianzas y su homogeneidad se incluyen en el anexo 3.

Los resultados obtenidos mediante el “*Limit Test*”, exponiendo los cultivos a una concentración de 100 mg L⁻¹ de la muestra recogida en el ensayo “*ECOFIRE Rack Batteries*” indican que dicha concentración no presenta efectos adversos significativos en el crecimiento celular de la cepa *Desmodesmus subspicatus*. El análisis de varianza aplicado a las muestras tratadas indica un alto grado de homogeneidad ($p=0,697$) entre ellas, y ningún porcentaje de inhibición respecto al control superó el 10%.

Por tanto, NO PROCEDE continuar con la búsqueda de variables de respuesta tipo EC₁₀ o EC₅₀.

Dr Técnico

GERARDO MENGES
GONZALEZ -
50820624P

Firmado digitalmente por
GERARDO MENGES GONZALEZ
- 50820624P
Fecha: 2025.06.26 08:49:29
+02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González

ANEXO 1

Valores CFU obtenidos en ensayo control y en las 6 réplicas tratadas (S1-S6) mediante conteo a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas de exposición. Cada valor representa la media de 6 mediciones.

TIEMPO 0 h.

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V4.50

Date: 9/6/25
Time: 11:48

Measurement mode: Fluorescence Top
Excitation wavelength: 485 nm
Emission wavelength: 670 nm
Gain (Manual): 100
Number of flashes: 3
Lag time: 0 μ s
Integration time: 40 μ s

GRE96fb.pd

Plate definition file: f

Shake duration (Orbital Normal): 3 s

Rawdata												
Temperature: 30 °C												
<>	1	BBM	control	001-1	001-2	001-3	001-4	001-5	001-6	shading	11	12
A	68	122	2401	3389	3389	3389	3389	3389	3389	64	63	63
B	67	124	2216	3360	3360	3360	3360	3360	3360	65	62	63
C	68	125	2147	3376	3376	3376	3376	3376	3376	60	60	65
D	65	126	2141	3274	3274	3274	3274	3274	3274	63	60	65
E	68	64	58	164	166	168	165	162	161	1157	58	67
F	62	62	56	165	168	165	164	161	164	1120	60	67
G	66	63	56	161	161	162	162	162	162	1083	59	62
H	66	60	58	172	173	168	167	167	168	1165	62	66

TIEMPO 24 h.

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V4.50

Date: 10/6/25
Time: 10:46

Measurement mode: Fluorescence Top
Excitation wavelength: 485 nm
Emission wavelength: 670 nm
Gain (Manual): 100
Number of flashes: 3
Lag time: 0 μ s
Integration time: 40 μ s

GRE96fb.pd

Plate definition file: f

Shake duration (Orbital Normal): 3 s

Rawdata												
Temperature: 30 °C												
<>	1	BBM	control	001-1	001-2	001-3	001-4	001-5	001-6	shading	11	12
A	69	134	13026	13206	13338	13201	13200	13290	13141	65	65	67
B	71	131	12799	13363	13288	13211	13202	13229	13128	68	62	71
C	71	131	12787	13245	13146	13209	13283	13081	13087	65	62	68
D	67	127	12742	13317	13240	13330	13245	13190	13147	62	63	72
E	77	65	64	165	157	165	160	157	158	951	65	71
F	67	63	62	168	160	163	161	159	163	901	64	71
G	69	68	58	158	158	158	164	156	158	960	62	68
H	70	64	65	163	167	164	165	167	160	956	67	68

TIEMPO 48 h.

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V4.50

Date: 11/6/25
Time: 10:17

Measurement mode: Fluorescence Top
Excitation wavelength: 485 nm
Emission wavelength: 670 nm
Gain (Manual): 100
Number of flashes: 3
Lag time: 0 μ s
Integration time: 40 μ s

GRE96fb.pd

Plate definition file: f

Shake duration (Orbital Normal): 3 s

Rawdata												
Temperature: 29,6 °C												
<>	1	BBM	control	001-1	001-2	001-3	001-4	001-5	001-6	shading	11	12
A	70	129	33236	33671	33831	33799	33756	33838	33625	65	63	67
B	68	126	33103	33654	33897	33762	33689	33779	33583	69	64	69
C	69	123	32974	33615	33841	33716	33829	33702	33510	66	61	69
D	66	144	32955	33589	33889	33705	33754	33780	33580	63	63	70
E	77	64	62	79	81	68	67	77	68	978	63	72
F	67	64	58	80	79	68	68	77	70	869	63	68
G	71	65	64	78	80	66	70	76	68	900	64	69
H	67	64	65	82	84	67	71	80	69	968	66	68

TIEMPO 72 h.

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V4.50
 Date: 12/6/25
 Time: 11:37

Measurement mode: Fluorescence Top
 Excitation wavelength: 485 nm
 Emission wavelength: 670 nm
 Gain (Manual): 100
 Number of flashes: 3
 Lag time: 0 µs
 Integration time: 40 µs
 Plate definition file: GRE96fb.pd
 Shake duration (Orbital Normal): f
 3 s

Rawdata Temperature: 26,7 °C

	1	BBM	control	001-1	001-2	001-3	001-4	001-5	001-6	shading	11	12
A	72	136	49533	52216	50664	49325	48806	49821	49853	67	71	76
B	71	133	49519	52108	50650	49305	48938	49990	50094	76	70	74
C	74	136	49434	51934	50439	49177	48876	49844	50139	68	64	75
D	71	137	49445	52265	50652	49224	48787	49808	49778	64	67	78
E	75	64	61	79	97	92	73	82	74	2571	69	73
F	68	66	63	78	80	91	79	84	74	2508	67	70
G	71	71	69	78	81	88	78	82	74	2469	71	76
H	70	67	66	82	84	89	78	86	79	2578	67	72

ANEXO 2

Ratio de crecimiento celular exhibido por el ensayo control y los 6 tratados en intervalos de 24 horas hasta el tiempo final de 72 horas de exposición, y en todo el intervalo de exposición. Los valores representan el incremento logarítmico de biomasa, obtenidos a partir de la ecuación:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{day}^{-1})$$

donde:

- μ_{i-j} es la tasa media de crecimiento celular específico en el intervalo de tiempo i-j;
- X_i es la biomasa a tiempo i;
- X_j es la biomasa a tiempo j.

Intervalo de tiempo	Tasa de crecimiento (μ)						
	Control	S1	S2	S3	S4	S5	S6
0h vs 24h	1,75	1,72	1,72	1,71	1,71	1,71	1,70
24h vs 48h	0,95	0,97	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99
48h vs 72h	0,40	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40	0,41
0h vs 72h	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03

Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento celular (% I_t) respecto al control:

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
% I_t	0,00	- 0,14	- 0,08	- 0,02	- 0,17	0,11

ANEXO 3

Porcentaje de inhibición de la tasa de rendimiento (% I_t) respecto al control.

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
% I_y		- 1,31	- 1,76	- 1 06	- 1,25	- 0,77	- 0,98

Y análisis de homogeneidad de varianza entre los 6 resultados obtenidos para los ensayos tratados.

Ordinary one-way ANOVA						
1	Table Analyzed	homogeneidad de varianza 001_2025				
2	Data sets analyzed	A-F				
3						
4	ANOVA summary					
5	F	0.6039				
6	P value	0.6973				
7	P value summary	ns				
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
9	R square	0.09145				
10						
11	Brown-Forsythe test					
12	F (DFn, DFd)					
13	P value					
14	P value summary					
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?					
16						
17	Bartlett's test					
18	Bartlett's statistic (corrected)	7.842				
19	P value	0.1651				
20	P value summary	ns				
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
22						
23	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
24	Treatment (between columns)	3.482	5	0.6963	F (5, 30) = 0.6039	P=0.6973
25	Residual (within columns)	34.59	30	1.153		
26	Total	38.07	35			
27						
28	Data summary					
29	Number of treatments (columns)	6				
30	Number of values (total)	36				

1.6- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

El producto de la muestra recogida en el ensayo “**ECOFIRE Rack Batteries**” queda fuera del criterio de clasificación de Toxicidad Aguda Acuática del *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, el cual establece su mas baja categoría (*Category Acute 3 for algae*) entre 10 y 100 mg L⁻¹. Igual criterio es aplicado a partir del Reglamento (CE) n° 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2208, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, comúnmente conocido como *Regulación CLP*.

Ensayo basado en la norma OECD 201. Durante la realización del ensayo no se produjeron incidencias técnicas reseñables.