

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

- Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra OECD 207

INFORME DE RESULTADOS

INFORME Nº 3

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 in situ de las pruebas realizadas en el sistema de extinción de incendios Ecofire Rack Batteries)

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

ATT: Ignacio Ruiz Ezquerra

ECOTOXILAB SL

Dr. Técnico: Gerardo Mengs

24-Junio-2025

C/ Juan XXIII, 10 (Tielmes)
28550 Madrid
Tel 918746973
Info@ecotoxilab.com
www.ecotoxilab.com

4. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA EN LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia foetida* sp.)-OCDE 207

4.1- MUESTRA DE ENSAYO

Identificación de la muestra: Ecofire Rack Batteries (MUESTRA 1)

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

4.2 – ESPECIE DE ENSAYO

Especie de ensayo: *Eisenia foetida* (Michaelson). Adultos de mas de 2 meses de edad con clitelo y peso 300-600 mg.

Condiciones de cría: 20 ± 5°C, humedad: 40-60%, sustrato: estiércol de diferentes especies ganaderas, musgo y sustrato universal para plantas.

4.3- CONDICIONES DEL ENSAYO

- Según Norma OCDE 207- Duración del ensayo: 14 días. Parámetros: temperatura: 20°C, humedad: 40-60%, pH 6.0 ± 0,5, 600 lux de forma continuada. Para cada concentración de estudio se han realizado 4 réplicas con 10 lombrices cada una.

- Ensayo realizado en recipientes de 1060 ml con un contenido de 1 kg de sustrato. Sustrato artificial utilizado como patrón en el test: arena fina (contenido superior al 50% de partículas entre 50 y 200 micras) 70%, musgo de sphagnum 10%, caolín 20%, CaCO₃ (pH = 6.0 ± 0.5).

- Los ensayos se han realizado mezclando uniformemente la muestra con el sustrato patrón en cada una de las concentraciones ensayadas. Se ha adicionado agua hasta alcanzar un % de humedad de 40 -60%.

- En los controles negativos y positivos (cloracetamida 15 mg/kg), se ha realizado igual número de réplicas que las réplicas del ensayo.

- Las diferentes concentraciones de la muestra ensayadas han sido las siguientes:

2.91 g/kg, 6.4 g/kg, 14 g/kg, 31 g/kg, 68 g/kg y 150 g/kg. (*factor* = 2.2)

- Las diferentes concentraciones ensayadas se han determinado mediante un estudio previo de mortalidad, con el fin de obtener mayor precisión para el cálculo de CL(E) 50.

- Indicadores:

- *Mortalidad (%)*
- *Disminución de peso vivo (PV) (%)*

4.4- RESULTADOS

Los ensayos se han realizado en las condiciones indicadas, procediéndose a los 7 días a la valoración preliminar de la mortalidad. A los 14 días se recolectaron las lombrices, cuantificando la mortalidad y el peso vivo de los supervivientes. Posteriormente se ha procedido al análisis de los datos.

Concentración-g/kg	% Mortalidad	% Variación de PV
Control+	100 ± 0 SD	-
Control -	0 ± 0 SD	10.62 ± 5.35 SD
2.91 g/kg	0 ± 0 SD	10.71 ± 2.55 SD
6.4 g/kg	2.5 ± 5 SD	-11.55 ± 5.86 SD
14 g/kg	30 ± 8.16 SD (*)	-13.96 ± 3.79 SD
31 g/kg	77.5 ± 9.57 SD (*)	-19.47 ± 3.69 SD(**)
68 g/kg	100 ± 0 SD (*)	-
150 g/kg	100 ± 0 SD (*)	-

(*) La mortalidad se considera significativa cuando el valor es superior al 5% respecto de la mortalidad en el control negativo.

(**) La disminución del peso vivo se considera significativa cuando el valor es superior al 30% respecto de la variación del peso vivo en el control negativo.

4.4.1- Supervivencia (%)

Se evalúa la influencia que ejercen diferentes concentraciones de la muestra de ensayo, mezclado en 6 diferentes concentraciones crecientes con el sustrato patrón. A continuación se muestran los porcentajes de supervivencia obtenidos en cada réplica:

ENSAYO	[MUESTRA 1] g/kg	Réplica 1 (%)	Réplica 2 (%)	Réplica 3(%)	Réplica 4(%)
Control +	0	0	0	0	0
Control -	0	100	100	100	100
C1	2.91	100	100	100	100
C2	6.4	100	90	100	100
C3	14	70	60	80	70
C4	31	10	30	30	20
C5	68	0	0	0	0
C6	150	0	0	0	0

% de lombrices supervivientes en cada réplica de cada concentración ensayada

Indicadores:

IC₅₀ = 19.33 g/kg¹

NOEC = 6.40 g/kg

LOEC = 14.00 g/kg

(IC₅₀, EC₅₀; concentración que produce la mortalidad del 50% en de las lombrices de tierra)

(NOEC; la mayor concentración ensayada en la que no se ha observado efecto)

(LOEC; la menor concentración ensayada en la que se ha observado efecto)

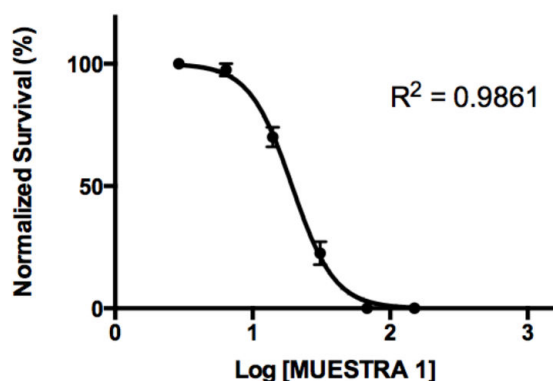
Valoración ecotoxicológica del suelo

Referencia: OCDE 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra).

¹Valor superior a 10 mg/g (10 g/kg) (RD 9/2005 de 14 de Enero). Valoración ecotoxicológica en suelos contaminados.

Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. ANEXO III-Criterios para la consideración de un suelo como contaminado. 2. En aquellos casos en que se considere prioritaria la protección de los ecosistemas: -a) Que la concentración letal o efectiva media, CL(E)50, para organismos del suelo obtenida en los ensayos de toxicidad ..., OCDE 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra) ..., es inferior a 10 mg de suelo contaminado/g de suelo.

Calculo de IC₅₀: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante transformación logarítmica $X = \text{Log}(X)$ y normalización de los datos:



log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope

Best-fit values

LogIC50 1,286
HillSlope -2,8
IC50 19,33

Std. Error

LogIC50 0,01523
HillSlope 0,2231

95% Confidence Intervals

LogIC50 1,255 to 1,318
HillSlope -3,262 to -2,337
IC50 17,98 to 20,79

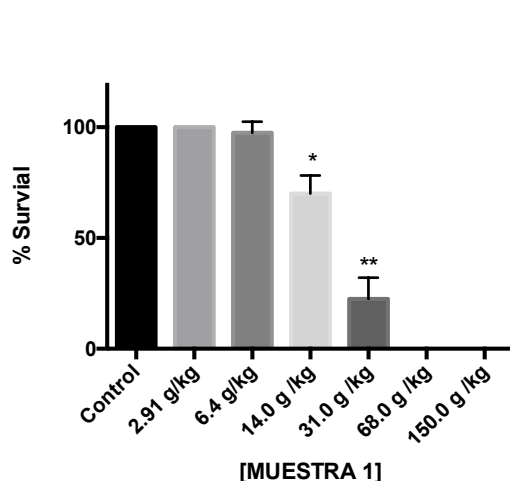
Goodness of Fit

Degrees of Freedom 22
R square 0,9861
Absolute Sum of Squares 611,7
Sy.x 5,273

Number of points

Analyzed 24

Calculo de LOEC y NOEC: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante "Repeated measures one-way ANOVA" y test de comparación múltiple de Bonferroni.



Repeated measures one-way ANOVA data

Table Analyzed

12,5

Repeated measures ANOVA summary

Assume sphericity? No
F 340,8
P value < 0,0001
P value summary ****
Statistically significant (P < 0.05)? Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon 0,2998
R square 0,9913

Was the matching effective?

F 1,108
P value 0,3718
P value summary ns
Is there significant matching (P < 0.05)? No
R square 0,0016

ANOVA table

	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	52736	6	8789	F (1,799, 5,396) = 340,8	P < 0,0001
Individual (between rows)	85,71	3	28,57	F (3, 18) = 1,108	P = 0,3718
Residual (random)	464,3	18	25,79		
Total	53286	27			

Data summary

Number of treatments (columns) 7
Number of subjects (rows) 4

Number of families 1
Number of comparisons per family 6
Alpha 0,05

Bonferroni's multiple comparisons test Mean Diff, 95% CI of diff, Significant? Summary

Control vs. 2.91 g/kg	2,5	-13,08 to 18,08	No	ns
Control vs. 6.4 g/kg	30	4,560 to 55,44	Yes	*
Control vs. 14.0 g /kg	77,5	47,67 to 107,3	Yes	**
Control vs. 31.0 g /kg				
Control vs. 68.0 g /kg				
Control vs. 150.0 g /kg				

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.91 g/kg								
Control vs. 6.4 g/kg	100	97,5	2,5	2,5	4	4	1	3
Control vs. 14.0 g /kg	100	70	30	4,082	4	4	7,348	3
Control vs. 31.0 g /kg	100	22,5	77,5	4,787	4	4	16,19	3
Control vs. 68.0 g /kg								
Control vs. 150.0 g /kg								

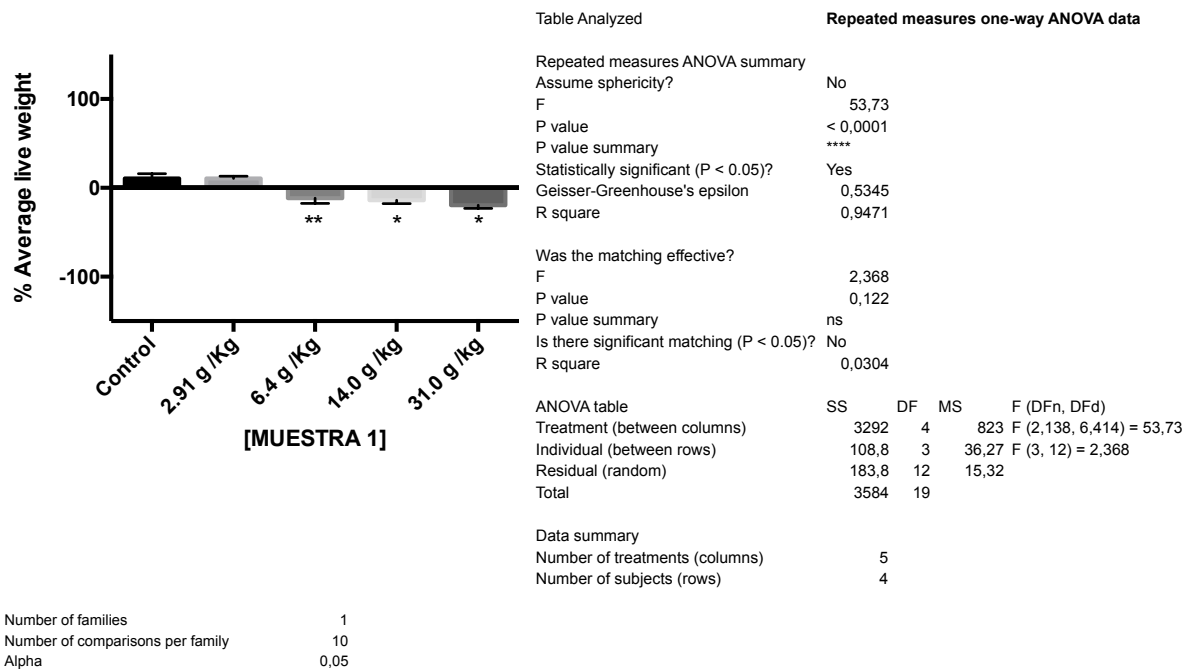
4.4.2-Variación del peso vivo(g)

Se evalúa el efecto de la muestra de ensayo en la variación del peso vivo de las lombrices supervivientes a los 14 días. A continuación se muestran los porcentajes de esta variación en las diferentes concentraciones ensayadas:

ENSAYO	[MUESTRA1] g/kg	Réplica 1 (%)	Réplica 2 (%)	Réplica 3(%)	Réplica 4(%)
Control +	0	0	0	0	0
Control -	0	4,498269896	17,55319149	10,52631579	9,913793103
C1	2.91	7,425742574	10	12,29050279	13,1147541
C2	6.40	-16,26984127	-4,694835681	-8,658008658	-16,57754011
C3	14.00	-10,76233184	-11,7370892	-14,1025641	-19,2513369
C4	31.00	-17,45283019	-19,921875	-16,04938272	-24,46351931
C5	68.00				
C6	150.00				

% de variación del peso vivo de las lombrices supervivientes en cada réplica de cada concentración ensayada

Variación del peso vivo: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante "Repeated measures one-way ANOVA" y test de comparación múltiple de Sidak.



Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.91 g /Kg	-0,0825	-19,03 to 18,87	No	ns
Control vs. 6.4 g /Kg	22,17	10,58 to 33,77	Yes	**
Control vs. 14.0 g /kg	24,59	0,2460 to 48,92	Yes	*
Control vs. 31.0 g /kg	30,09	3,832 to 56,35	Yes	*
2.91 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	22,26	-0,7607 to 45,27	No	ns
2.91 g /Kg vs. 14.0 g /kg	24,67	1,998 to 47,34	Yes	*
2.91 g /Kg vs. 31.0 g /kg	30,18	10,35 to 50,00	Yes	*
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	2,413	-18,23 to 23,05	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	7,92	-13,33 to 29,17	No	ns
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	5,508	-4,340 to 15,35	No	ns

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.91 g /Kg	10,62	10,71	-0,0825	2,563	4	4	0,0322	3
Control vs. 6.4 g /Kg	10,62	-11,55	22,17	1,568	4	4	14,14	3
Control vs. 14.0 g /kg	10,62	-13,96	24,59	3,292	4	4	7,469	3
Control vs. 31.0 g /kg	10,62	-19,47	30,09	3,552	4	4	8,473	3
2.91 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	10,71	-11,55	22,26	3,113	4	4	7,15	3
2.91 g /Kg vs. 14.0 g /kg	10,71	-13,96	24,67	3,066	4	4	8,046	3
2.91 g /Kg vs. 31.0 g /kg	10,71	-19,47	30,18	2,681	4	4	11,25	3
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	-11,55	-13,96	2,413	2,791	4	4	0,8643	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	-11,55	-19,47	7,92	2,874	4	4	2,755	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	-13,96	-19,47	5,508	1,332	4	4	4,135	3

4.5- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

- La mortalidad de las lombrices de tierra en los ensayos **control negativo** fue del 0% (inferior al 5%) y la pérdida de peso vivo a los 14 días, no superó el 30% del peso inicial registrado. Este ensayo se realizó con el sustrato patrón (OCDE 207) como único sustrato de crecimiento.

- La mortalidad de las lombrices de tierra en los ensayos **control positivo** fue del 100% en todos los ensayos. Este ensayo se realizó con el sustrato patrón (OCDE 207) como único sustrato de crecimiento, al que se le añadió cloracetamida (15mg/Kg).

- La humedad se ha mantenido entre los valores 40-60% al comienzo y al final del ensayo en todas las réplicas ensayadas, así como en los controles. El pH inicial fue de $6.0 \pm 0,5$ en todas las réplicas y controles.

- Las 6 concentraciones ensayadas se han estimado mediante un ensayo previo para coincidir con la mortalidad real (para un mejor ajuste de los datos), constituyendo una serie geométrica de factor (2.2). Se han realizado cuatro réplicas de cada concentración.

- La mortalidad del 50% de las lombrices (IC_{50}) se ha producido a una concentración de 19.33 g/kg. Se ha realizado un análisis estadístico con una curva dosis-respuesta, mediante transformación logarítmica y normalización de datos. La bondad del ajuste es buena ($R^2 = 0.9861$) por lo que podemos concluir que existen diferencias significativas en las concentraciones crecientes ensayadas.

- El cálculo de NOEC y LOEC se ha estimado realizando el análisis de varianzas (Repeated measures ANOVA one-way) y test de Bonferroni de comparación múltiple. Podemos confirmar que la comparación entre las distintas concentraciones es estadísticamente significativa en la concentración de 14 g/kg y siguientes.

- En el comienzo de los análisis, cuando fueron depositadas las lombrices de tierra en la superficie del sustrato, procedieron a su enterramiento en los primeros cuatro minutos, de forma similar en todas las concentraciones ensayadas. A los 30 minutos se observó intento de huida en todas las réplicas de las diferentes concentraciones de 68 g/kg y superiores. Se observó ubicación periférica en los recipientes en todas las réplicas de las concentraciones de 68 g/kg y superiores, coincidiendo con las concentraciones en las que la mortalidad ha sido del 100 %.

- A los 7 días, se observó mortalidad en todas las réplicas de las concentraciones de 31 g/kg y superiores, así como alteraciones físicas y de comportamiento en las lombrices supervivientes de estas concentraciones.

- El peso vivo de las lombrices se mantuvo de forma uniforme en los ensayos control y en los de la concentración de 2.91 g/kg. A partir de esta concentración comenzó a ser negativa, siendo más acusado en la concentración de 31 g/kg. En el análisis de los datos podemos comprobar que la diferencia de peso de las lombrices en la concentración de 6.4 g/kg y siguientes, es estadísticamente significativa.

La muestra obtenida del ensayo realizado con el producto comercial denominado **ECOFIRE FIGHTING**, en el ensayo **ECOFIRE RACK BATTERIES** queda fuera del criterio y estándares para la declaración de suelos contaminados, conforme se establece en el RD 9/2005 de 14 de Enero, de Valoración ecotoxicológica en suelos contaminados. En su ANEXO III-Criterios para la consideración de un suelo como contaminado se establece que: *“En aquellos casos en que se considere prioritaria la protección de los ecosistemas, la concentración letal o efectiva media, $CL(E)_{50}$, para organismos del suelo obtenida en los ensayos de toxicidad OCDE 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra), debe ser inferior a 10 mg/g de suelo (10g/kg)”*; siendo en nuestro caso superior, al ser de 19.33 g/kg.

Dr Técnico

GERARDO MENGES
GONZALEZ -
50820624P
Firmado digitalmente por
GERARDO MENGES GONZALEZ -
50820624P
Fecha: 2025.06.24 21:52:24
+02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González