

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 2: Ecofire Parking Control (extraída de las pruebas realizadas en el sistema de extinción de incendios Ecofire Parking Control)

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 2: Ecofire Parking Control

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

- Acondicionamiento previo de la muestra: Se ajustó el pH de la muestra con NaOH (pH= 4.38 inicial; pH= 6.50 final).

1.2-OBJETIVO DEL ESTUDIO

Establecer el riesgo de Toxicidad relacionada con la muestra denominada como *ECOFIRE Parking Control*, 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 Parking Control*, 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 Parking Control*” 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 ($p=0,284$) 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

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Mengs 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: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50												
Date:	9/6/25											
Time:	12:13											
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.pdf											
Shake duration (Orbital Normal):	3 s											
Rawdata	Temperature: 30 °C											
<>	1	BBM	control	002-1	002-2	002-3	002-4	002-5	002-6	shading	11	12
A	64	122	68	68	68	68	68	68	68	61	60	60
B	64	124	67	67	67	67	67	67	67	62	59	60
C	65	125	68	68	68	68	68	68	68	57	57	62
D	62	126	65	65	65	65	65	65	65	60	57	62
E	65	61	55	3286	3311	3359	3298	3236	3215	1157	55	64
F	59	59	53	3295	3368	3308	3279	3229	3276	1120	57	64
G	63	60	54	3212	3211	3222	3230	3236	3235	1083	56	59
H	63	57	56	3440	3468	3396	3348	3343	3359	1165	59	63

TIEMPO 24 h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50												
Date:	10/6/25											
Time:	11:26											
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.pdf											
Shake duration (Orbital Normal):	3 s											
Rawdata	Temperature: 30 °C											
<>	1	BBM	control	002-1	002-2	002-3	002-4	002-5	002-6	shading	11	12
A	69	134	13026	71	74	71	71	73	70	65	65	67
B	71	131	12799	75	73	71	71	72	70	68	62	71
C	71	131	12787	72	70	71	73	68	69	65	62	68
D	67	127	12742	74	72	74	72	71	70	62	63	72
E	77	65	64	13295	13143	13305	13192	13132	13151	1151	65	71
F	67	63	62	13356	13190	13258	13221	13175	13262	1101	64	71
G	69	68	58	13152	13151	13154	13277	13122	13156	1160	62	68
H	70	64	65	13265	13338	13280	13291	13349	13209	1156	67	68

TIEMPO 48 h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50												
Date:	11/6/25											
Time:	11:41											
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.pdf											
Shake duration (Orbital Normal):	3 s											
Rawdata	Temperature: 29,6 °C											
<>	1	BBM	control	002-1	002-2	002-3	002-4	002-5	002-6	shading	11	12
A	74	118	33236	72	75	74	74	75	71	69	67	70
B	71	115	33103	72	76	74	72	74	70	73	67	72
C	73	112	32974	71	75	73	75	73	69	69	64	73
D	70	131	32955	70	76	73	74	74	70	67	66	74
E	81	67	66	33944	34065	33398	33341	33829	33412	978	66	76
F	71	67	61	33997	33956	33419	33381	33834	33496	869	66	72
G	75	68	68	33885	33984	33291	33492	33812	33415	900	68	72
H	71	67	68	34114	34188	33358	33565	34002	33440	968	69	71

TIEMPO 72 h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50													
Date:				12/6/25									
Time:				12:06									
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.pdf									
Shake duration (Orbital Normal):				3 s									
Rawdata						Temperature: 26.7 °C							
⇐	1	BBM	control	002-1	002-2	002-3	002-4	002-5	002-6	shading	11	12	
A	78	124	49533	78	72	74	62	80	80	72	77	82	
B	76	121	49519	76	72	73	65	83	85	83	75	80	
C	80	123	49434	74	68	71	64	80	86	74	69	81	
D	77	124	49445	78	72	72	62	79	79	69	72	84	
E	81	69	66	49146	49864	49691	48924	51729	51185	2571	74	79	
F	73	71	68	49127	50017	49638	49162	51869	51205	2508	72	76	
G	77	77	74	49104	50042	49517	49124	51767	51195	2469	76	83	
H	76	72	71	49271	50177	49560	49102	52013	51512	2578	72	77	

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:

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

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	1,70	1,71	1,72	1,73	1,73
24h vs 48h	0,95	1,00	1,01	0,99	0,99	1,01	0,99
48h vs 72h	0,40	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,41
0h vs 72h	1,03	1,04	1,04	1,03	1,04	1,05	1,04

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

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
% I_t		0,00	0,06	0,12	- 0,23	- 0,99	0,79

ANEXO 3

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

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
% I_t		- 0,36	- 1,60	- 0,24	- 0,19	- 1,24	- 1,09

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 002_2025				
2	Data sets analyzed	A-F				
3						
4	ANOVA summary					
5	F	1.315				
6	P value	0.2841				
7	P value summary	ns				
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
9	R square	0.1798				
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)	19.00				
19	P value	0.0019				
20	P value summary	**				
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
22						
23	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
24	Treatment (between columns)	10.78	5	2.155	F (5, 30) = 1.315	P=0.2841
25	Residual (within columns)	49.15	30	1.638		
26	Total	59.93	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 Parking Control**” 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) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, 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.