

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

- **Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas terrestres OECD 208**

INFORME DE RESULTADOS

INFORME Nº 4

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 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

3. ENSAYO DE EMERGENCIA Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS EN PLANTAS TERRESTRES (*Pisum Sativum* sp.) OECD 208

3.1- MUESTRA DE ENSAYO

Identificación de la muestra: Ecofire Parking Control (MUESTRA 2)

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

3.1 – ESPECIE VEGETAL DE ENSAYO

Detalles de la especie de ensayo: Guisante Ervilha Lincoln (variedad de mata baja) (*Pisum sativum*)

Clase: Dicotiledóneas / Magnoliopsida Orden: Fabales / Fabales Familia: Fabáceas / Fabaceae
Género: Pisum / Pisum

Proveedor: Batlle®

Referencia: 020101G250

Lote: 002/LI130

Validez hasta: Diciembre/2026

Test de germinación: 87,5 % (12 mayo 2025)

Condiciones de almacenamiento: 20 ± 5°C, oscuridad, HR: 60-70%

3.2-CONDICIONES DEL ENSAYO

- Según Norma OCDE 208- en invernadero climatizado, 22 ± 2°C, humedad relativa 70 ± 20%, fotoperiodo 16 horas, duración del ensayo 18 días. Para cada concentración de estudio se han realizado 4 réplicas con 8 semillas cada una.

- Ensayo realizado en macetas de 16 cm² con un contenido de 800 g de sustrato. Sustrato patrón: sustrato universal (peso seco): composición: turba rubia de sphagnum, sustrato vegetal, fibra de coco, corteza de pino, perlita y nutrientes (140-250 mg/l (N), 100-160 mg/l (P₂O₅), 30-150 mg/l (K₂O), 120-200 mg/l (MgO). pH 6-6.5, CE 1 mS/cm. Proveedor: Fertiberia®.

- Los ensayos se han realizado mezclando uniformemente el sustrato de muestra con el sustrato patrón en cada una de las concentraciones ensayadas. Se ha adicionado agua hasta alcanzar un % de humedad de 70 ± 20%.

- En los controles negativos y positivos (ac. Bórico 2400 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:

2.9 g /kg, 6.4 g /kg, 14 g /kg, 31 g /kg, 68 g /kg y 150 g /kg (factor = 2.2)

- Indicadores:

- % de inhibición de la germinación (% de semillas no germinadas)
- Biomasa (peso fresco de la plántula)
- Longitud de la plántula (parte aérea)
- Longitud de la raíz

3.3.

RESULTADOS

Los ensayos se han realizado en las condiciones indicadas, procediéndose a los 18 días a la recolección de las plantas y obtención de datos para su posterior análisis. A continuación se indican los promedios y su desviación estándar.

Concentración- g/kg	% semillas No germinadas	Biomasa (g) (peso fresco %)	Plántula H (mm)	Raíz R (mm)
Control+	100	-	-	-
Control -	6,125 ± 7,22 SD	0,97 ± 0,05 SD (100,00%)	H 94,10 ± 05,66 SD	R 90,17 ± 05,72 SD
2.9 g /kg	6,25 ± 7,22 SD	0,95 ± 0,05 SD (98,15%)	H 91,93 ± 04,95 SD	R 88,97 ± 05,70 SD
6.4 g /kg	9,37 ± 11,97 SD	0,96 ± 0,05 SD (98,97%)	H 93,03 ± 05,29 SD	R 90,25 ± 05,51 SD
14 g /kg	21,87 ± 16,25 SD	0,94 ± 0,05 SD (96,86%)	H 91,60 ± 04,68 SD	R 87,68 ± 08,33 SD
31 g /kg	43,75 ± 16,14 SD	0,93 ± 0,04 SD (95,40%)	H 88,33 ± 04,61 SD	R 83,28 ± 07,54 SD
68 g /kg	75,00 ± 10,21 SD	0,80 ± 0,07 SD (82,10%)	H 76,00 ± 06,91 SD	R 70,12 ± 07,77 SD
150 g /kg	100	-	-	-

3.3.1-Inhibición de la germinación (%)

Se evalúa la influencia que ejercen diferentes concentraciones de la muestra de ensayo en la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas. La muestra de ensayo es mezclada con el sustrato patrón de manera uniforme, en 6 diferentes concentraciones crecientes. A continuación se muestran los porcentajes de germinación 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	87,5	87,5	100	100
C1	2.9	100	87,5	100	87,5
C2	6.4	75	100	87,5	100
C3	14.0	75	75	87,5	75
C4	31.0	75	50	37,5	62,5
C5	68.0	25	12,5	37,5	25
C6	150.0	0	0	0	0

% de semillas germinadas en cada réplica de cada concentración ensayada

Indicadores:

IC₅₀ = 37.28 g/kg¹

NOEC = 31.00 g/kg

LOEC = 68.00 g/kg

(IC₅₀, EC₅₀; concentración que produce la reducción del 50% en la germinación de las semillas)

(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)

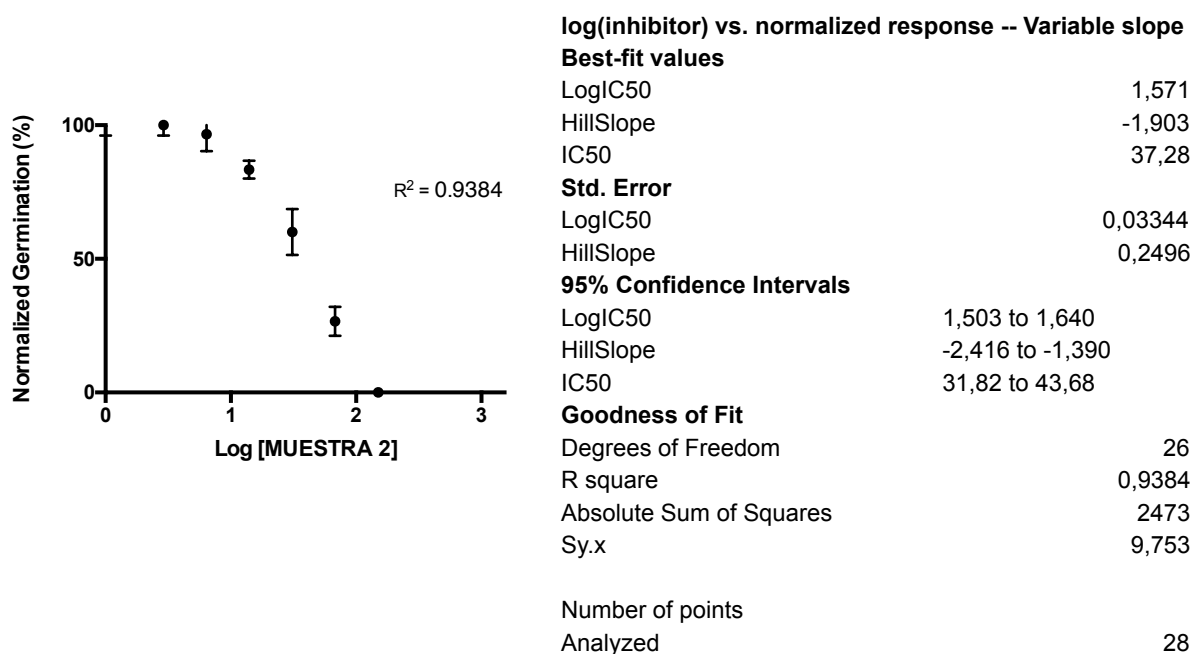
Valoración ecotoxicológica del suelo

Referencia: OCDE 208 (Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas).

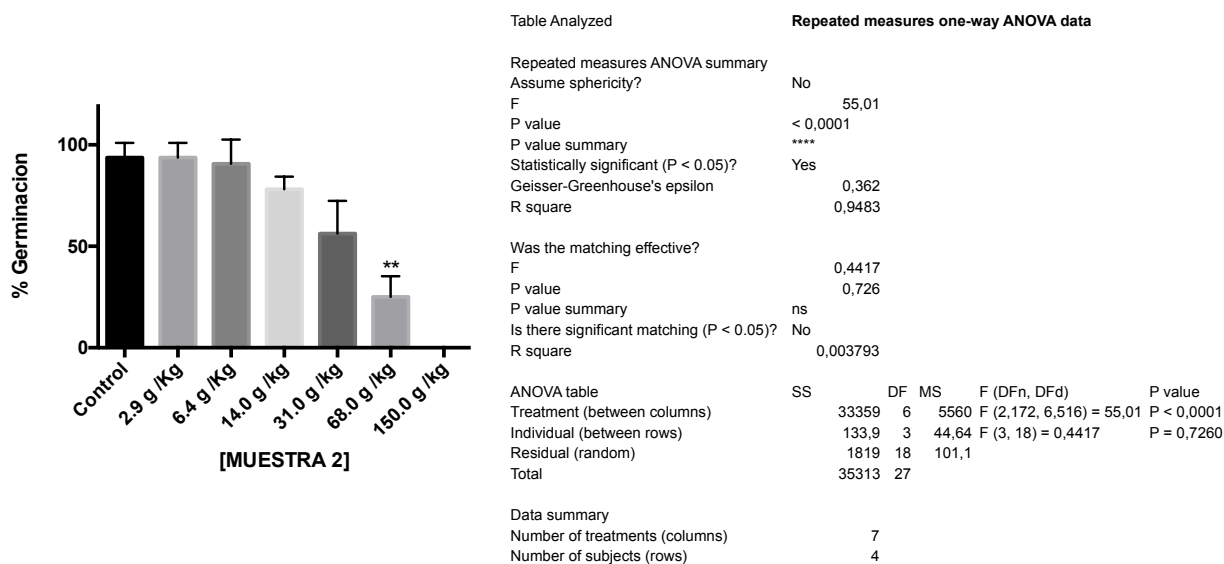
¹**Valor superior a 10 mg/g (10 g/kg)** (RD 9/2005 de 14 de Enero). *Valoración ecotoxicológica en suelos contaminados.*

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 208 (Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas terrestres) ..., 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:



Cálculo de NOEC y LOEC: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante “Repeated measures one-way ANOVA” y test de comparación múltiple de Sidak:



Number of families 1
 Number of comparisons per family 21
 Alpha 0,05

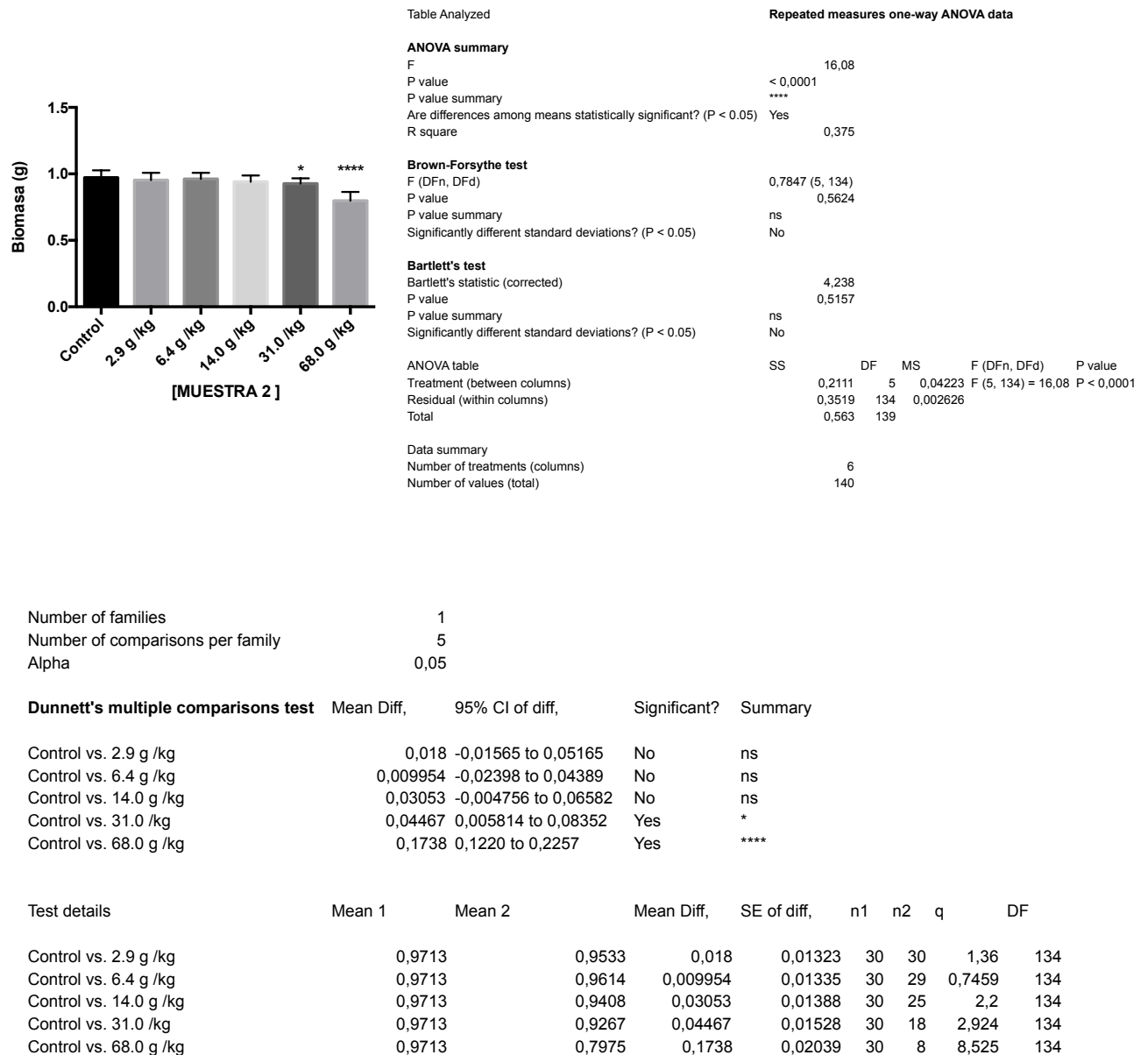
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /Kg	0	-48,71 to 48,71	No	ns
Control vs. 6.4 g /Kg	3,125	-53,99 to 60,24	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	15,63	-14,20 to 45,45	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	37,5	-59,91 to 134,9	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	68,75	34,31 to 103,2	Yes	**
Control vs. 150.0 g /kg	93,75	59,31 to 128,2	Yes	**
2.9 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	3,125	-86,35 to 92,60	No	ns
2.9 g /Kg vs. 14.0 g /kg	15,63	-14,20 to 45,45	No	ns
2.9 g /Kg vs. 31.0 g /kg	37,5	-46,86 to 121,9	No	ns
2.9 g /Kg vs. 68.0 g /kg	68,75	34,31 to 103,2	Yes	**
2.9 g /Kg vs. 150.0 g /kg	93,75	59,31 to 128,2	Yes	**
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	12,5	-56,38 to 81,38	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	34,38	-78,55 to 147,3	No	ns
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	65,63	-23,85 to 155,1	No	ns
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	90,63	33,51 to 147,7	Yes	*
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	21,88	-80,00 to 123,8	No	ns
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	53,13	23,30 to 82,95	Yes	**
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	78,13	48,30 to 108,0	Yes	**
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	31,25	-72,07 to 134,6	No	ns
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	56,25	-20,76 to 133,3	No	ns
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	25	-23,71 to 73,71	No	ns

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.9 g /Kg	93,75	93,75	0	5,103	4	4	0	3
Control vs. 6.4 g /Kg	93,75	90,63	3,125	5,984	4	4	0,5222	3
Control vs. 14.0 g /kg	93,75	78,13	15,63	3,125	4	4	5	3
Control vs. 31.0 g /kg	93,75	56,25	37,5	10,21	4	4	3,674	3
Control vs. 68.0 g /kg	93,75	25	68,75	3,608	4	4	19,05	3
Control vs. 150.0 g /kg	93,75	0	93,75	3,608	4	4	25,98	3
2.9 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	93,75	90,63	3,125	9,375	4	4	0,3333	3
2.9 g /Kg vs. 14.0 g /kg	93,75	78,13	15,63	3,125	4	4	5	3
2.9 g /Kg vs. 31.0 g /kg	93,75	56,25	37,5	8,839	4	4	4,243	3
2.9 g /Kg vs. 68.0 g /kg	93,75	25	68,75	3,608	4	4	19,05	3
2.9 g /Kg vs. 150.0 g /kg	93,75	0	93,75	3,608	4	4	25,98	3
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	90,63	78,13	12,5	7,217	4	4	1,732	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	90,63	56,25	34,38	11,83	4	4	2,905	3
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	90,63	25	65,63	9,375	4	4	7	3
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	90,63	0	90,63	5,984	4	4	15,14	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	78,13	56,25	21,88	10,67	4	4	2,049	3
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	78,13	25	53,13	3,125	4	4	17	3
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	78,13	0	78,13	3,125	4	4	25	3
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	56,25	25	31,25	10,83	4	4	2,887	3
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	56,25	0	56,25	8,069	4	4	6,971	3
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	25	0	25	5,103	4	4	4,899	3

3.3.2-Variación de la Biomasa-peso fresco (g)

Se evalúa el efecto de la muestra de ensayo en el desarrollo de la plántula mediante la cuantificación del peso fresco de la biomasa formada a los 18 días desde la siembra:

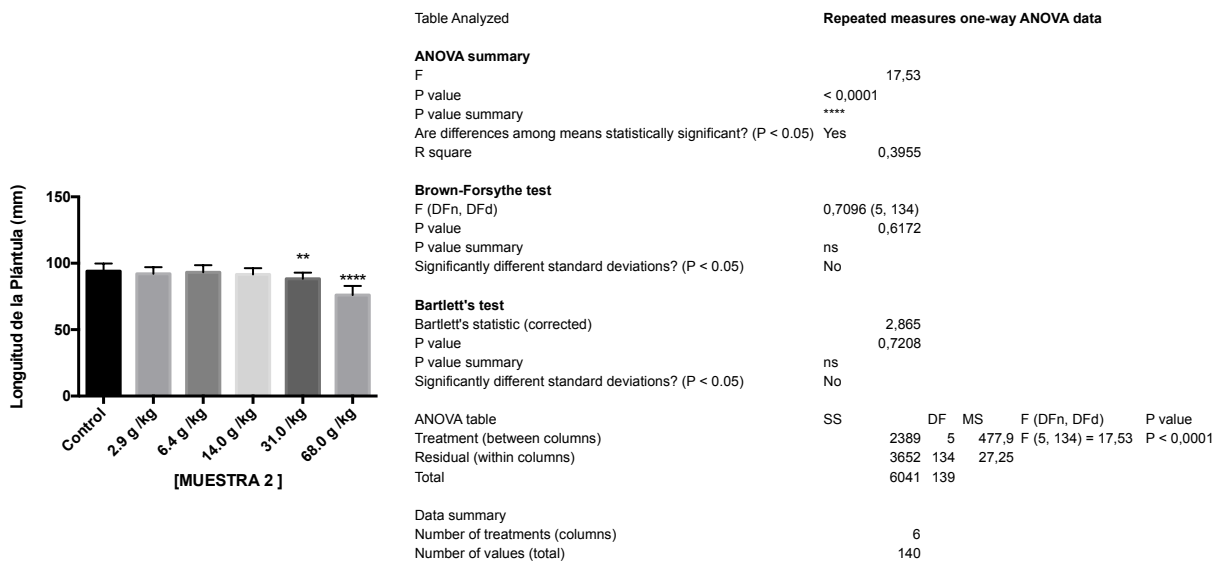
Variación de la biomasa: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante "Repeated measures one-way ANOVA" (Brown-Forsythe test y Bartlett's test) y test de comparación múltiple de Dunnett.



3.3.3-Variación de la longitud de la plántula (mm)

Se evalúa el efecto de la muestra de ensayo en el desarrollo de la plántula mediante la cuantificación de la longitud de la parte aérea formada a los 18 días desde la siembra:

Variación de la longitud de la plántula: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante "Repeated measures one-way ANOVA" (Brown-Forsythe test y Bartlett's test) y test de comparación múltiple de Dunnett.



ORDINARY ONE-WAY ANOVA-Multiple comparisons

Number of families 1
 Number of comparisons per family 5
 Alpha 0,05

Dunnett's multiple comparisons test

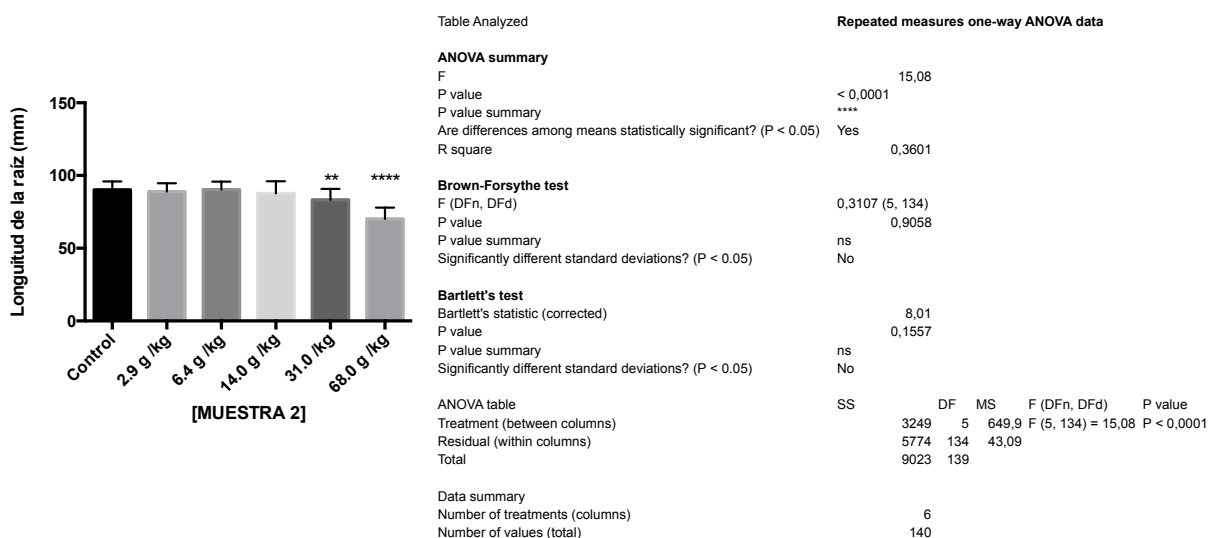
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /kg	2,167	-1,261 to 5,594	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	0,8586	-2,599 to 4,316	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	2,5	-1,095 to 6,095	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	5,767	1,809 to 9,725	Yes	**
Control vs. 68.0 g /kg	18,1	12,82 to 23,38	Yes	****

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 2.9 g /kg	94,1	91,93	2,167	1,348	30	30	1,607	134
Control vs. 6.4 g /kg	94,1	93,24	0,8586	1,359	30	29	0,6316	134
Control vs. 14.0 g /kg	94,1	91,6	2,5	1,414	30	25	1,768	134
Control vs. 31.0 /kg	94,1	88,33	5,767	1,556	30	18	3,705	134
Control vs. 68.0 g /kg	94,1	76	18,1	2,077	30	8	8,713	134

3.3.4-Variación de la longitud de la raíz (mm)

Se evalúa el efecto de la muestra de ensayo en el desarrollo de la plántula mediante la cuantificación de la longitud de la raíz formada a los 18 días desde la siembra:

Variación de la longitud de la raíz: Análisis estadístico realizado con el Software GraphPad Prisma 8.0, mediante "Repeated measures one-way ANOVA" (Brown-Forsythe test y Bartlett's test) y test de comparación múltiple de Dunnett.



ORDINARY ONE-WAY ANOVA-Multiple comparisons

Number of families	1
Number of comparisons per family	5
Alpha	0,05

Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /kg	1,2	-3,110 to 5,510	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	-0,1782	-4,525 to 4,169	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	2,487	-2,034 to 7,007	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	6,889	1,912 to 11,87	Yes	**
Control vs. 68.0 g /kg	20,04	13,40 to 26,68	Yes	****

Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 2.9 g /kg	90,17	88,97	1,2	1,695	30	30	0,708	134
Control vs. 6.4 g /kg	90,17	90,34	-0,1782	1,709	30	29	0,104	134
Control vs. 14.0 g /kg	90,17	87,68	2,487	1,778	30	25	1,399	134
Control vs. 31.0 g /kg	90,17	83,28	6,889	1,957	30	18	3,52	134
Control vs. 68.0 g /kg	90,17	70,13	20,04	2,612	30	8	7,673	134

3.4.- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

- La germinación en los ensayos **control negativo** fue del 93,75 % (media de todas las réplicas). Las plantas emergentes no presentaron signos de fitotoxicidad ni ningún otro síntoma visible de alteración morfológica o del crecimiento. La supervivencia media de las plantas del control durante el ensayo, fue del 100 %. Los parámetros de evolución de la plántula (H) y raíz (R) se consideran normales.
- El sustrato patrón empleado en las mezclas de los controles y en las diferentes concentraciones de ensayo, fue similar en todo el ensayo. Las condiciones ambientales también fueron similares en todas las réplicas de los controles y de las diferentes concentraciones ensayadas.
- La germinación en los ensayos **control positivo** fue del 0% en todas las réplicas (ácido bórico 2400 mg/Kg).
- La Inhibición de la germinación del 50% de las semillas (**IC₅₀**) se ha producido en una concentración de 37.28 g/kg. Se ha realizado un estudio estadístico mediante una ecuación de regresión en una curva dosis-respuesta por transformación logarítmica y normalización de datos. La bondad del ajuste es buena ($R^2=0,9384 \geq 0,7$), 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 Sidak de comparación múltiple. El test de Sidak permite confirmar la comparación entre las distintas concentraciones.
- Durante la germinación y el crecimiento de las plántulas, no se ha observado ninguna anomalía. Realizado análisis estadístico de los datos del resto de los parámetros analizados de las plántulas, podemos concluir que la biomasa, la longitud de la plántula y la longitud de la raíz, han variado significativamente en la concentración de 31 g/kg y superiores.
- En las plántulas emergentes no se han observado síntomas de clorosis, decoloración, mortalidad, ni ningún otro efecto que afectase al normal desarrollo de la plántula.

La muestra obtenida del ensayo realizado con el producto comercial denominado **ECOFIRE FIGHTING**, en el ensayo **ECOFIRE PARKING CONTROL** 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 208 (Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas terrestres), debe ser inferior a 10 mg/g de suelo (10g/kg); en nuestro caso es superior al ser de 37.28 g/kg.

Dr Técnico

GERARDO MENGES
GONZALEZ -
50820624P

Firmado digitalmente por
GERARDO MENGES
GONZALEZ - 50820624P
Fecha: 2025.06.25 07:54:40
+02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González