ECOTOXILAB

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 forest ("solución de cargas orgánicas en base agua")

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

ATT: Ignacio Ruiz Ezquerra

ECOTOXILAB SL
Dr. Técnico: Gerardo Mengs

27-Julio-2023

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

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 forest

Características de la muestra: Solución de cargas orgánicas en base agua (datos aportados por el cliente).

1.2-OBJETIVO DEL ESTUDIO

Establecer el riesgo de Toxicidad relacionada con el producto comercial denominado como *ECOFIRE Forest* 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 comercial *ECOFIRE Forest*, 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

Una concentración inicial de $5x10^3$ cel mL^{-1} fueron expuestas al producto sobre medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium), con un volumen inicial de 50 mL en frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidad. El cultivo se mantuvo en movimiento continuo (150 r.p.m.), condiciones constantes de luz (70 µE m^{-2} s^{-1}) y a una temperatura constante de 21±1 ºC. 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. Para prevenir un posible efecto de sombreado por parte del producto en el medio, se practicaron mediciones de absorción de luz (OD_{627} y OD_{720}), sin que en ningún paso se obtuvieran valores superiores a 0.009. 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} del producto comercial *ECOFIRE forest*, 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=0,9679) 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 EC_{10} o EC_{50}.

Dr Técnico

GERARDO MENGS GONZALEZ - 50820624P

Firmado digitalmente por GERARDO MENGS GONZALEZ - 50820624P
Fecha: 2023.06.27 21:45:01 +02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Mengs González

ANEXO 1

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

TIEMPO 0h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50

Date:	5/6/23
Time:	12:23
Measurement mode:	Fluorescence Top
Excitation wavelength:	485 nm
Emission wavelength:	670 nm
Gain:	75
Number of flashes:	3
Lag time:	0 µs
Integration time:	40 µs
Plate definition file:	GRE96fb.pdf
Shake duration (Orbital Normal):	5 s
Rawdata	Temperature: 26,3 °C

<>	1	2	BG-11	CONTROL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	11	12
A	81	66	30	55	42	36	51	22	45	55	95	58
B	75	34	122	767	554	312	632	912	613	589	42	54
C	81	52	221	464	598	464	565	412	575	582	43	48
D	79	27	220	287	452	714	434	365	486	597	17	36
E	69	64	132	579	665	733	392	399	674	532	27	20
F	44	58	135	834	556	299	846	646	576	601	65	24
G	20	37	141	551	598	932	554	707	589	593	34	35
H	22	62	69	21	17	34	64	38	84	20	32	30
			161,83	580,33	570,50	575,67	570,50	573,50	585,50	582,33		

TIEMPO 24 h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50

Date:	6/6/23
Time:	10:38
Measurement mode:	Fluorescence Top
Excitation wavelength:	485 nm
Emission wavelength:	670 nm
Gain:	75
Number of flashes:	3
Lag time:	0 µs
Integration time:	40 µs
Plate definition file:	GRE96fb.pdf
Shake duration (Orbital Normal):	5 s
Rawdata	Temperature: 26,3 °C

<>	1	2	BG-11	CONTROL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	11	12
A	68	34	62	66	64	49	47	49	32	23	58	56
B	66	44	189	1863	1764	1664	1564	1964	1761	1864	71	52
C	58	51	453	1747	1747	1737	1847	1847	1847	1947	57	58
D	95	68	164	1822	1722	1722	1722	1722	1722	1822	56	64
E	32	32	143	1812	1676	1692	1812	1832	1612	1833	43	68
F	56	56	135	1814	1814	1814	1714	1714	1854	1914	54	72
G	57	43	131	1764	1764	1964	1758	1464	1734	1265	46	57
H	77	30	35	47	50	34	23	30	36	48	49	45
			202,50	1803,67	1747,83	1765,50	1736,17	1757,17	1755,00	1774,17		

TIEMPO 48h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50

Date:	7/6/23
Time:	11:02
Measurement mode:	Fluorescence Top
Excitation wavelength:	485 nm
Emission wavelength:	670 nm
Gain:	75
Number of flashes:	3
Lag time:	0 µs
Integration time:	40 µs
Plate definition file:	GRE96fb.pdf
Shake duration (Orbital Normal):	5 s
Rawdata	Temperature: 26,3 °C

<>	1	2	BG-11	CONTROL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	11	12
A	48	32	62	66	64	49	47	49	63	78	58	59
B	42	35	126	5239	5386	5433	5682	6139	5233	5808	71	52
C	36	58	190	5522	5249	5687	5029	5072	5806	4850	57	58
D	30	35	101	5697	5262	5538	5273	5527	5979	5766	64	64
E	24	12	180	5287	5321	5247	5036	5130	5233	5869	43	68
F	81	35	182	5889	5371	4667	5107	5488	5162	5187	54	72
G	70	70	168	5939	5420	5763	5262	5462	5073	5069	34	57
H	35	35	35	47	50	35	42	39	84	48	49	59
			157,83	5595,50	5334,83	5389,17	5231,50	5469,67	5414,33	5424,83		

TIEMPO 72 h

GENios; Serial number: 12900400638; Firmware: V 4.62 - 07/01 GENios; XFLUOR4 Version: V 4.50												
Date:					8/6/23							
Time:					10:10							
Measurement mode:					Fluorescence Top							
Excitation wavelength:					485	nm						
Emission wavelength:					670	nm						
Gain:					75							
Number of flashes:					3							
Lag time:					0	µs						
Integration time:					40	µs						
Plate definition file:					GRE96fb.pdf							
Shake duration (Orbital Normal):					5	s						
Rawdata					Temperature: 26,3 °C							
<>	1	2	BG-11	CONTROL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	11	12
A	56	46	69	73	71	56	54	56	70	85	65	66
B	56	49	113	17505	16505	17505	15233	16505	17505	17505	78	59
C	50	72	177	16188	16188	16188	16188	17188	16188	17188	64	65
D	44	49	188	18963	16963	15963	16963	16963	15963	16863	71	71
E	38	26	147	16553	15553	16553	17553	16553	16553	17553	50	75
F	95	49	169	16255	16255	16255	14255	17255	16255	16255	61	79
G	84	84	155	17405	16405	15405	16405	15405	17005	16405	41	64
H	49	49	42	54	57	42	49	46	91	55	56	66
			158,17	17144,83	16311,50	16311,50	16099,50	16644,83	16578,17	16961,50		

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:

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

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	1,13	1,12	1,12	1,11	1,12	1,10	1,11
24h *vs* 48h	1,13	1,12	1,12	1,10	1,14	1,13	1,12
48h *vs* 72h	1,12	1,12	1,11	1,12	1,11	1,12	1,14
0h vs 72h	**1,13**	**1,12**	**1,11**	**1,11**	**1,12**	**1,11**	**1,12**

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

		S1	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**
% I_t		0,97	1,23	1,35	0,52	1,25	0,42

ANEXO 3

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

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
% I_y		4,86	4,86	6,10	2,92	3,31	1,07

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

Ordinary one-way ANOVA					
Table Analyzed	homogeneidad de varianza				
Data sets analyzed	A-E				
ANOVA summary					
F	0.1351				
P value	0.9679				
P value summary	ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R square	0.02116				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)					
P value					
P value summary					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?					
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	5.023				
P value	0.2849				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Treatment (between columns)	11.64	4	2.909	F (4, 25) = 0.1351	P=0.9679
Residual (within columns)	538.3	25	21.53		
Total	549.9	29			
Data summary					
Number of treatments (columns)	5				
Number of values (total)	30				

1.6- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

El producto comercial denominado ***ECOFIRE forest*** **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 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.