

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

- **Ensayo de inmovilización aguda en *Daphnia sp.* OCDE 202**

INFORME DE RESULTADOS

INFORME N° 2

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

24-Junio-2025

2. ENSAYO DE INMOVILIZACION AGUDA EN *Daphnia sp.* (Norma OCDE 202)

2.1- 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

2.2 – DESCRIPCIÓN DE ENSAYO

El ensayo consiste en la detección de la inmovilización del microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna* a las 24h y 48h, cuando es expuesto a diferentes diluciones de la muestra acuosa. El ensayo se ha realizado conforme a la norma OECD 202 (Ed. 23 de noviembre de 2004).

2.3- ESPECIE EMPLEADA EN EL ENSAYO

- Especie: *Daphnia magna*, Strauss
- Procedencia: Microbiotests Inc. (Ghent, Belgium). Batch: DM121022
- Origen: Neonatos <24h. de vida procedentes de efipias
- Temperatura de cría: $22 \pm 1^\circ\text{C}$
- Temperatura de eclosión: $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- Fotoperiodo: 12h:12h (luz : oscuridad) / 24 h durante la eclosión
- Alimentación: Durante 1h previa al ensayo con alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

2.4- CONDICIONES DEL ENSAYO

- **Numero de animales en el ensayo:** Se emplearon un total de 20 animales por dilución (4 réplicas x 5 individuos). Relación de carga: 5 mL dilución/organismo.

- **Acondicionamiento previo de la muestra:** La muestra se dejó decantar 24h a 4°C en nevera, el sobrenadante fue centrifugado a 2000 rpm. Se ajustó el pH de la muestra con NaOH (pH= 4.38 inicial; pH= 6.50 final).

Diluciones definitivas ensayadas:

- 12, 5, 1.5, 0.25 y 0.05 % de dilución de la muestra original
- Control (blank) con medio de cultivo

- **Modo de exposición:** Placas de poliestireno tipo multiwell de 30 pocillos.

- **Origen del medio de dilución:** Agua reconstituida según composición descrita en norma OECD 202 con las siguientes características químicas generales:

- pH: 7.7 ± 0.1
- Temperatura: $22 \pm 1^\circ\text{C}$
- Oxígeno disuelto: 100% saturación por burbujeo continuo previo al ensayo

- **Método de preparación de diluciones:** Diluciones, con medio de cultivo reconstituido y aireado, preparadas inmediatamente antes del test a partir de la muestra convenientemente acondicionada.

- **Iluminación en el test:** Luz fría. Intensidad 4000lux. Fotoperiodo 16:8 h. (luz: oscuridad)

- **Calculo de la CE_{50} :** Los valores de mortalidad en cada dilución se ajustaron mediante regresión probit siguiendo el método descrito por Finney (1952) (Finney, D. J. (1952). Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve (2nd ed.). Cambridge University Press.).

- **Control de calidad y criterios de aceptabilidad:** Control interno con toxico de referencia Dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$). $CE_{50-24h} = 1.55$ ppm. Rango de aceptabilidad para la CE_{50-24h} según la norma ISO 6341: 0.6-2.1 mg/L.

El criterio de aceptabilidad del test establece una mortalidad máxima en los controles negativos de hasta el 20% de lo organismos expuestos inicialmente.

2.5- RESULTADOS A 24 H DE EXPOSICIÓN

2.5.1 - PORCENTAJES DE INMOVILIDAD A 24 h DE EXPOSICIÓN

Referencia Muestra	Dilución (%)					
	Blank	12	5	1.5	0.25	0.05
Ecofire Parking Control	0	20	20	5	2	1

2.5.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS

Referencia Muestra	CE _{50-24 h} (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire Parking Control	7.55 / 101925	4.27 - 12.08

*Intervalo de Confianza ($\alpha = 0.05$)

2.5.3. – RESULTADO EN UNIDADES TOXICAS (U.T. antiguo índice Equitox/m³)

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire Parking Control	13.20	23.4 - 8.27

*Intervalo de Confianza ($\alpha = 0.05$)

2.6- RESULTADOS A 48 H DE EXPOSICIÓN

2.6.1 - PORCENTAJES DE INMOVILIDAD A 48 h DE EXPOSICIÓN

Referencia Muestra	Dilución (%)					
	Blank	12	5	1.5	0.25	0.05
Ecofire Parking Control	0	20	20	12	4	3

2.6.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS

Referencia Muestra	CE _{50-48 h} (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire Parking Control	1.07 / 14445	0.39 - 2.92

*Intervalo de Confianza ($\alpha = 0.05$)

2.6.3. – RESULTADO EN UNIDADES TOXICAS (U.T. antiguo índice Equitox/m³)

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire Parking Control	93.10	253.16 - 34.18

*Intervalo de Confianza ($\alpha = 0.05$)

2.7- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

Ensayo basado en la norma OECD 202. Durante la realización del ensayo no se produjeron incidencias técnicas reseñables.

Los valores de toxicidad en la muestra ensayada, han sido CE 50-24 h de 7.55 (% de dilución) y a las 48 horas CE-50-48 h de 1.07 (% de dilución). Corresponde a una concentración peso / volumen de 101.925 mg.L⁻¹ y 14.445 mg.L⁻¹ respectivamente del producto ECOFIRE PARKING CONTROL.

La muestra extraída del 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 Daphnia*) 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*.

Dr Técnico

GERARDO MENGES
GONZALEZ -
50820624P

Firmado digitalmente
por GERARDO MENGES
GONZALEZ - 50820624P
Fecha: 2025.06.24
21:36:01 +02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González

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 2: Ecofire Parking Control (extraída in situ 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

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

4.1- 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

4.2 – ESPECIE DE ENSAYO

Especie de ensayo: *Eisenia foetida* (Michaelsen). 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	6.67 ± 0.79 SD
2.91 g/kg	2.5 ± 5 SD	-0.17 ± 3.78 SD
6.4 g/kg	5 ± 5.77 SD	-11.95 ± 5.63 SD
14 g/kg	22.5 ± 5 SD (*)	-22.26 ± 8.11 SD
31 g/kg	77.5 ± 5 SD (*)	-28.81 ± 5.31 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	90	100	100	100
C2	6.4	100	90	100	90
C3	14	80	80	80	70
C4	31	20	20	20	30
C5	68	0	0	0	0
C6	150	0	0	0	0

% de lombrices supervivientes en cada réplica de cada concentración ensayada

Indicadores:

IC 50 = 20.70 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)

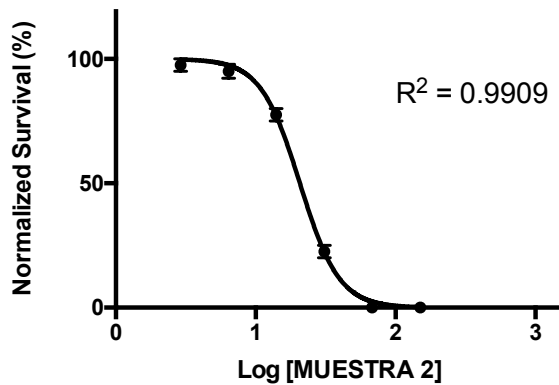
Valoración ecotoxicológica del suelo

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	1,316
HillSlope	-3,1
IC50	20,7

Std. Error

LogIC50	0,01188
HillSlope	0,1987

95% Confidence Intervals

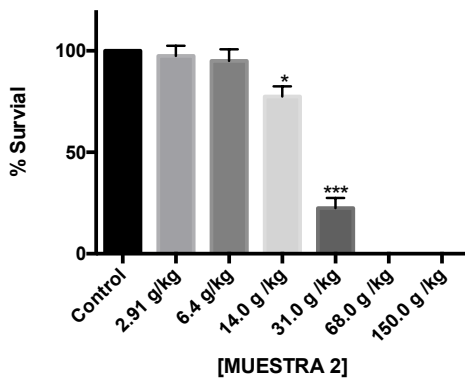
LogIC50	1,291 to 1,341
HillSlope	-3,512 to -2,688
IC50	19,55 to 21,90

Goodness of Fit

Degrees of Freedom	22
R square	0,9909
Absolute Sum of Squares	394,5
Sy.x	4,235

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	497,7				
P value	< 0,0001				
P value summary	****				
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes				
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,3021				
R square	0,994				
Was the matching effective?					
F	0,2045				
P value	0,8919				
P value summary	ns				
Is there significant matching (P < 0.05)?	No				
R square	0,0002042				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	52143	6	8690	F (1,813, 5,438) = 497,7	P < 0,0001
Individual (between rows)	10,71	3	3,571	F (3, 18) = 0,2045	P = 0,8919
Residual (random)	314,3	18	17,46		
Total	52468	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

Comparison	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	5	-12,99 to 22,99	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	22,5	6,921 to 38,08	Yes	*
Control vs. 31.0 g /kg	77,5	61,92 to 93,08	Yes	***
Control vs. 68.0 g /kg				
Control vs. 150.0 g /kg				

Test details

Comparison	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.91 g/kg	100	97,5	2,5	2,5	4	4	1	3
Control vs. 6.4 g/kg	100	95	5	2,887	4	4	1,732	3
Control vs. 14.0 g /kg	100	77,5	22,5	2,5	4	4	9	3
Control vs. 31.0 g /kg	100	22,5	77,5	2,5	4	4	31	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	7,64119601	5,7239057	6,76691729	6,532663317
C1	2.91	-0,310559	-5,1948052	0,94339623	3,879310345
C2	6.40	-7,3469388	-7,9847909	-19,5121951	-12,962963
C3	14.00	-18,877551	-17,391304	-18,3962264	-34,3891403
C4	31.00	-24,137931	-28,93617	-25,9803922	-36,2068966
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.

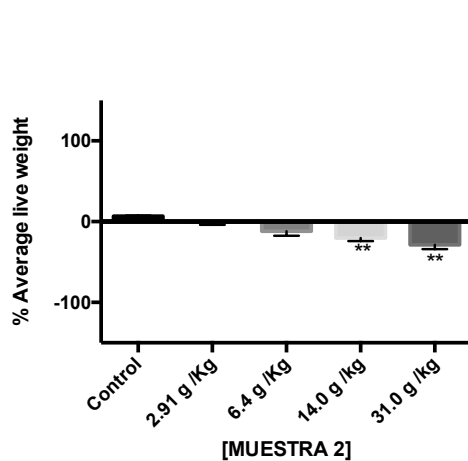


Table Analyzed		Repeated measures one-way ANOVA data	
Repeated measures ANOVA summary			
Assume sphericity?	No		
F	44,79		
P value	0,0001		
P value summary	***		
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes		
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,54		
R square	0,9372		
Was the matching effective?			
F	0,86		
P value	0,4882		
P value summary	ns		
Is there significant matching (P < 0.05)?	No		
R square	0,01332		
ANOVA table		SS	DF MS F (DFn, DFd)
Treatment (between columns)		3326	4 831,6 F (2,160, 6,480) = 44,79
Individual (between rows)		47,9	3 15,97 F (3, 12) = 0,8600
Residual (random)		222,8	12 18,57
Total		3597	19
Data summary			
Number of treatments (columns)		5	
Number of subjects (rows)		4	

Number of families	1
Number of comparisons per family	10
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Control vs. 2.91 g /Kg	6,835	-6,038 to 19,71	No	ns
Control vs. 6.4 g /Kg	18,62	-2,387 to 39,62	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	26,83	11,89 to 41,76	Yes	**
Control vs. 31.0 g /kg	35,48	17,06 to 53,91	Yes	**
2.91 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	11,78	-18,71 to 42,27	No	ns
2.91 g /Kg vs. 14.0 g /kg	19,99	-7,052 to 47,04	No	ns
2.91 g /Kg vs. 31.0 g /kg	28,65	-0,07737 to 57,37	No	ns
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	8,213	-15,41 to 31,83	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	16,87	-10,60 to 44,33	No	ns
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	8,655	-1,702 to 19,01	No	ns

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.91 g /Kg	6,665	-0,17	6,835	1,741	4	4	3,926	3
Control vs. 6.4 g /Kg	6,665	-11,95	18,62	2,84	4	4	6,554	3
Control vs. 14.0 g /kg	6,665	-20,16	26,83	2,02	4	4	13,28	3
Control vs. 31.0 g /kg	6,665	-28,82	35,48	2,492	4	4	14,24	3
2.91 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	-0,17	-11,95	11,78	4,124	4	4	2,857	3
2.91 g /Kg vs. 14.0 g /kg	-0,17	-20,16	19,99	3,658	4	4	5,466	3
2.91 g /Kg vs. 31.0 g /kg	-0,17	-28,82	28,65	3,885	4	4	7,374	3
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	-11,95	-20,16	8,213	3,195	4	4	2,571	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	-11,95	-28,82	16,87	3,715	4	4	4,541	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	-20,16	-28,82	8,655	1,401	4	4	6,179	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 replicas 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 20.70 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 ($R^2= 0.9909$) 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 concentración 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 14.0 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 ha comenzado a disminuir progresivamente a medida que se ha ido incrementando la concentración. A partir de la primera concentración ensayada, 2.91 g/kg comenzó a ser negativa, siendo mas 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 14.0 g/kg y siguientes, es estadísticamente significativa.

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 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 20.70 g/kg.

Dr Técnico

GERARDO MENGES
GONZALEZ - 50820624P

Firmado digitalmente por GERARDO
MENGES GONZALEZ - 50820624P
Fecha: 2025.06.25 07:35:11 +02'00'

Fdo. Gerardo Menges González

ECOTOXILAB

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)

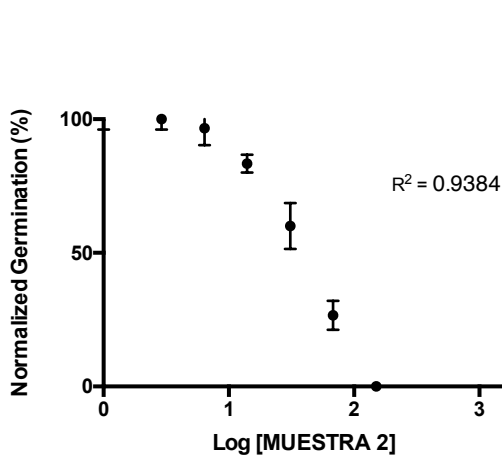
Valoración ecotoxicológica del suelo

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

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 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:



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

Best-fit values

LogIC50	1,571
HillSlope	-1,903
IC50	37,28

Std. Error

LogIC50	0,03344
HillSlope	0,2496

95% Confidence Intervals

LogIC50	1,503 to 1,640
HillSlope	-2,416 to -1,390
IC50	31,82 to 43,68

Goodness of Fit

Degrees of Freedom	26
R square	0,9384
Absolute Sum of Squares	2473
Sy.x	9,753

Number of points

Analyzed	28
----------	----

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:

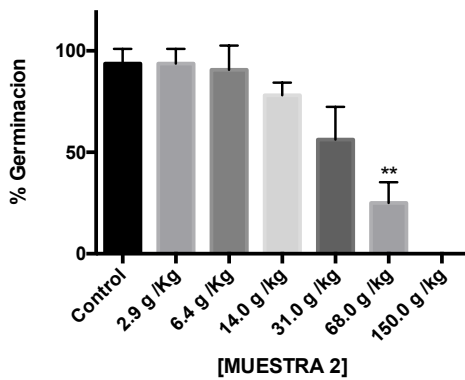


Table Analyzed

Repeated measures ANOVA summary

Assume sphericity?	No
F	55,01
P value	< 0,0001
P value summary	****
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,362
R square	0,9483

Was the matching effective?

F	0,4417
P value	0,726
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
R square	0,003793

ANOVA table

	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	33359	6	5560	F (2,172, 6,516) = 55,01	P < 0,0001
Individual (between rows)	133,9	3	44,64	F (3, 18) = 0,4417	P = 0,7260
Residual (random)	1819	18	101,1		
Total	35313	27			

Data summary

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

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

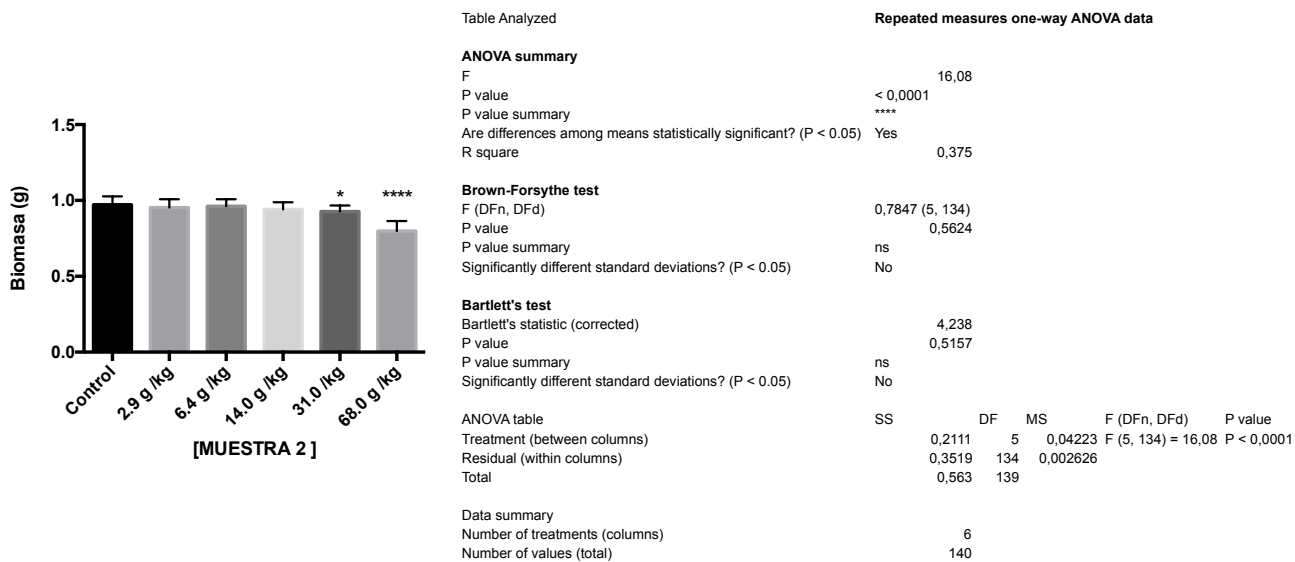
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /Kg	0	-48,71 to 48,71	No	ns
Control vs. 6.4 g /Kg	3,125	-53,99 to 60,24	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	15,63	-14,20 to 45,45	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	37,5	-59,91 to 134,9	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	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.



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

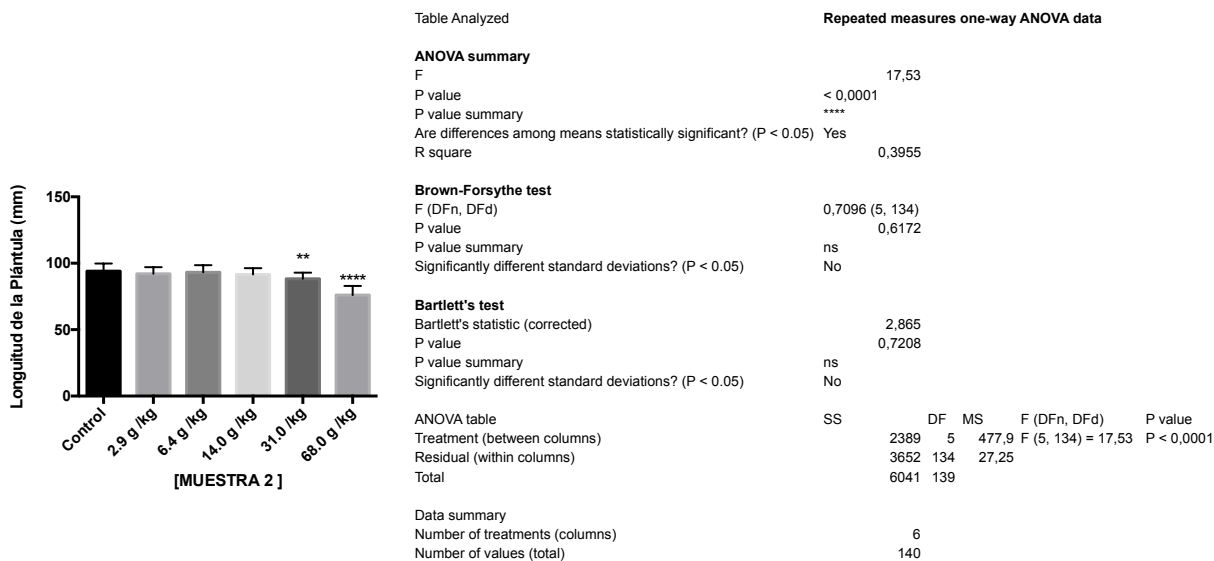
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /kg	0,018	-0,01565 to 0,05165	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	0,009954	-0,02398 to 0,04389	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	0,03053	-0,004756 to 0,06582	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	0,04467	0,005814 to 0,08352	Yes	*
Control vs. 68.0 g /kg	0,1738	0,1220 to 0,2257	Yes	****

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 2.9 g /kg	0,9713	0,9533	0,018	0,01323	30	30	1,36	134
Control vs. 6.4 g /kg	0,9713	0,9614	0,009954	0,01335	30	29	0,7459	134
Control vs. 14.0 g /kg	0,9713	0,9408	0,03053	0,01388	30	25	2,2	134
Control vs. 31.0 /kg	0,9713	0,9267	0,04467	0,01528	30	18	2,924	134
Control vs. 68.0 g /kg	0,9713	0,7975	0,1738	0,02039	30	8	8,525	134

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	****

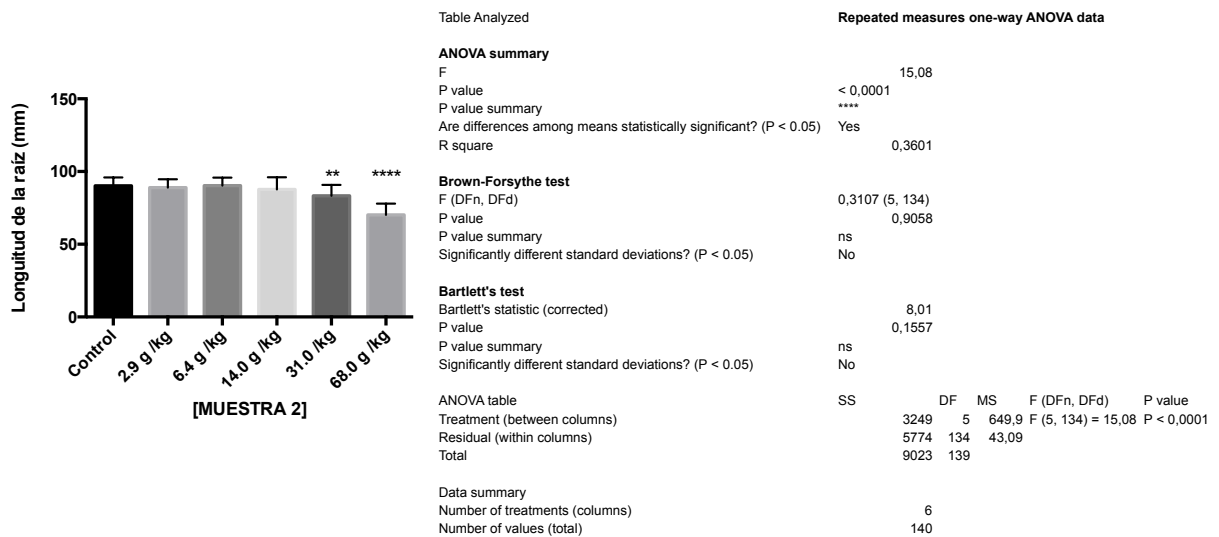
Test details

	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 /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 /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