

## 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* (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%, CaCO<sub>3</sub> (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:**

**IC<sub>50</sub> = 19.33 g/kg<sup>1</sup>**

**NOEC = 6.40 g/kg**

**LOEC = 14.00 g/kg**

(IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>; 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)

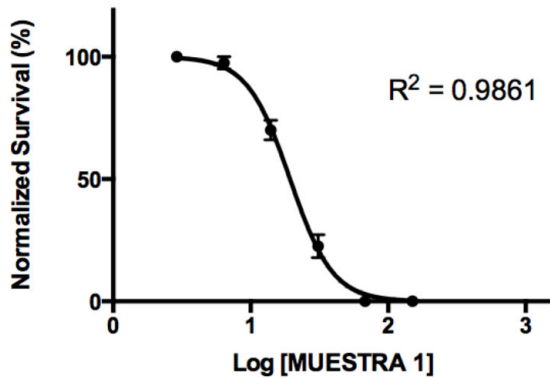
##### **Valoración ecotoxicológica del suelo**

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

<sup>1</sup>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 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra) ..., es inferior a 10 mg de suelo contaminado/g de suelo.

*Calculo de IC<sub>50</sub>: 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

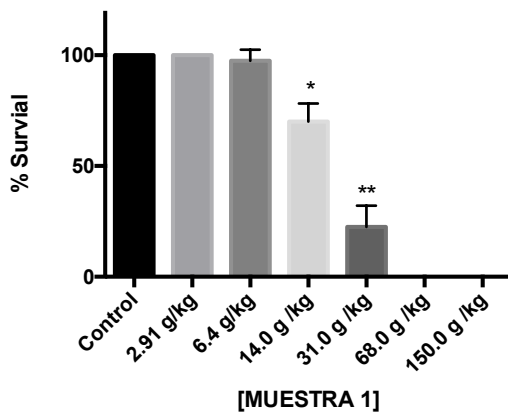
**Goodness of Fit**

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 <sup>1</sup>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**

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	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								

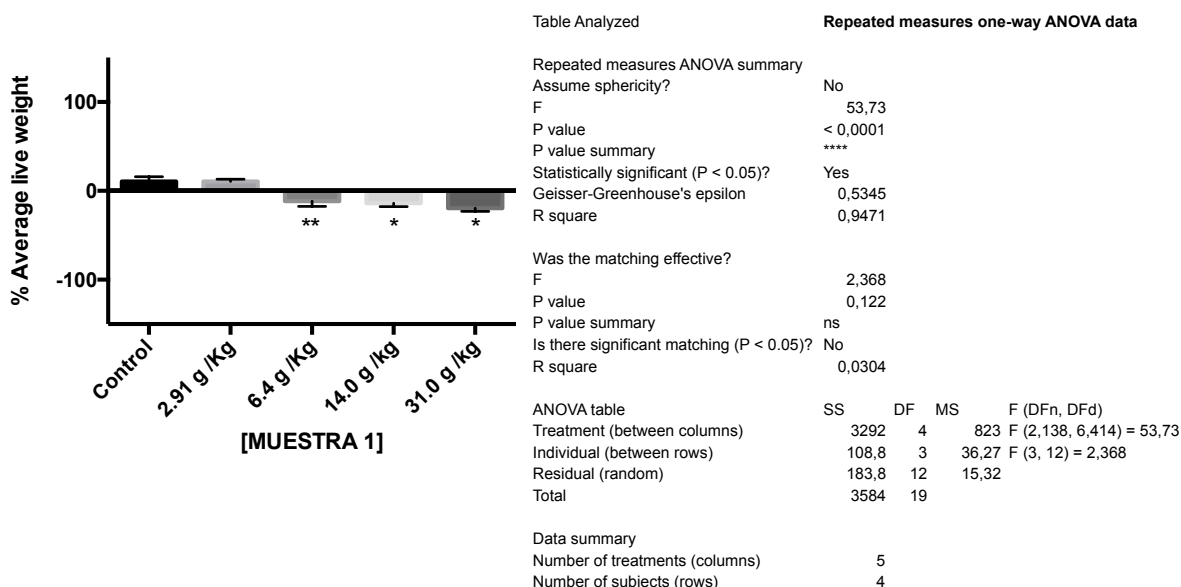
### 4.4.2-Variación del peso vivo(g)

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] gl/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.



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	-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 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 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 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 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 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 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

## 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 1: Ecofire Rack Batteries (extraída de las pruebas realizadas en el sistema de extinción de incendios Ecofire Rack Batteries)*

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

*ATT: Ignacio Ruiz Ezquerria*

**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 1: Ecofire Rack Batteries

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

### 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 ± 1°C
- Temperatura de eclosión: 20 ± 1°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= 4.35 inicial; pH= 6.54 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:  $7.7 \pm 0.1$
- 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 Rack Batteries	0	20	19	2	0	0

**2.5.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS**

Referencia Muestra	CE <sub>50-24 h</sub> (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire Rack Batteries	2.54 / 33782	1.82 - 3.50

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

**2.5.3. – RESULTADO EN UNIDADES TOXICAS (U.T. antiguo índice Equitox/m<sup>3</sup>)**

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire Rack Batteries	39.37	54.94 - 28.57

\*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 Rack Batteries	0	20	20	5	0	0

**2.6.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS**

Referencia Muestra	CE 50-48 h (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire Rack Batteries	2.12 / 28196	1.47 - 3.07

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

**2.6.3. – RESULTADO EN UNIDADES TOXICAS (U.T. antiguo índice Equitox/m<sup>3</sup>)**

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire Rack Batteries	47.16	68.1 - 32.57

\*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 2.54 (% de dilución) y a las 48 horas CE-50-48 h de 2.12 (% de dilución). Corresponde a una concentración peso / volumen de 33.782 mg.L<sup>-1</sup> y 28.196 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente de la muestra del producto empleado en el ensayo ECOFIRE RACK BATTERIES.

La muestra recogida en el ensayo **ECOFIRE RACK BATTERIES** 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<sup>-1</sup>. Igual criterio es aplicado a partir del Reglamento (CE) n° 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*.

Dr Técnico

GERARDO  
MENGES  
GONZALEZ -  
50820624P

Firmado digitalmente  
por GERARDO MENGES  
GONZALEZ - 50820624P  
Fecha: 2025.06.24  
21:31:49 +02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González

## 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 1: Ecofire Rack Batteries (extraída 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

### 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 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

#### 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 cm<sup>2</sup> 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 (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 30-150 mg/l (K<sub>2</sub>O), 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 -	3,12 ± 6,25 SD	0,98 ± 0,05 SD (100,00%)	H 93,87 ± 06,24 SD	R 90,13 ± 05,98 SD
2.9 g /kg	6,25 ± 7,22 SD	0,99 ± 0,05 SD (100,86%)	H 95,27 ± 05,21 SD	R 90,87 ± 04,86 SD
6.4 g /kg	12,50 ± 14,43 SD	0,98 ± 0,05 SD (99,66%)	H 94,11 ± 05,90 SD	R 90,36 ± 06,42 SD
14 g /kg	28,12 ± 11,97 SD	0,97 ± 0,05 SD (98,97%)	H 93,61 ± 05,57 SD	R 89,43 ± 05,44 SD
31 g kg	40,62 ± 11,97 SD	0,93 ± 0,06 SD (94,63%)	H 89,37 ± 06,63 SD	R 83,89 ± 06,75 SD
68 g /kg	78,12 ± 11,97 SD	0,84 ± 0,05 SD (85,22%)	H 78,00 ± 06,63 SD	R 73,43 ± 06,83 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	100	87,5	100	100
C1	2.9	87,5	100	100	87,5
C2	6.4	100	75	75	100
C3	14.0	62,5	87,5	75	62,5
C4	31.0	50	62,5	75	50
C5	68.0	12,5	37,5	25	12,5
C6	150.0	0	0	0	0

*% de semillas germinadas en cada réplica de cada concentración ensayada*

*Indicadores:*

**IC 50 = 33.42 g/kg <sup>1</sup>**

**NOEC = 14.00 g/kg**

**LOEC = 31.00 g/kg**

(IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>; 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)

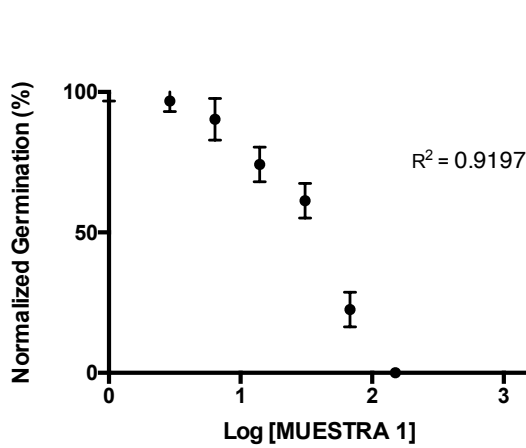
**Valoración ecotoxicológica del suelo**

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

<sup>1</sup>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 IC<sub>50</sub>: 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	1,524
HillSlope	-1,622
IC50	33,42

**Std. Error**

LogIC50	0,04044
HillSlope	0,2216

**95% Confidence Intervals**

LogIC50	1,441 to 1,607
HillSlope	-2,078 to -1,167
IC50	27,60 to 40,47

**Goodness of Fit**

Degrees of Freedom	26
R square	0,9197
Absolute Sum of Squares	3075
Sy.x	10,87

**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:*

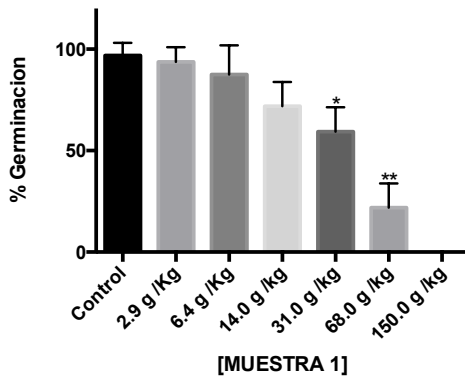


Table Analyzed

Repeated measures one-way ANOVA data

Repeated measures ANOVA summary

Assume sphericity?	No
F	50,93
P value	0,0018
P value summary	**
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,2194
R square	0,9444

Was the matching effective?

F	0,6067
P value	0,6192
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
R square	0,005594

ANOVA table

	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	33728	6	5621	F (1,316, 3,949) = 50,93	P = 0,0018
Individual (between rows)	200,9	3	66,96	F (3, 18) = 0,6067	P = 0,6192
Residual (random)	1987	18	110,4		
Total	35915	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

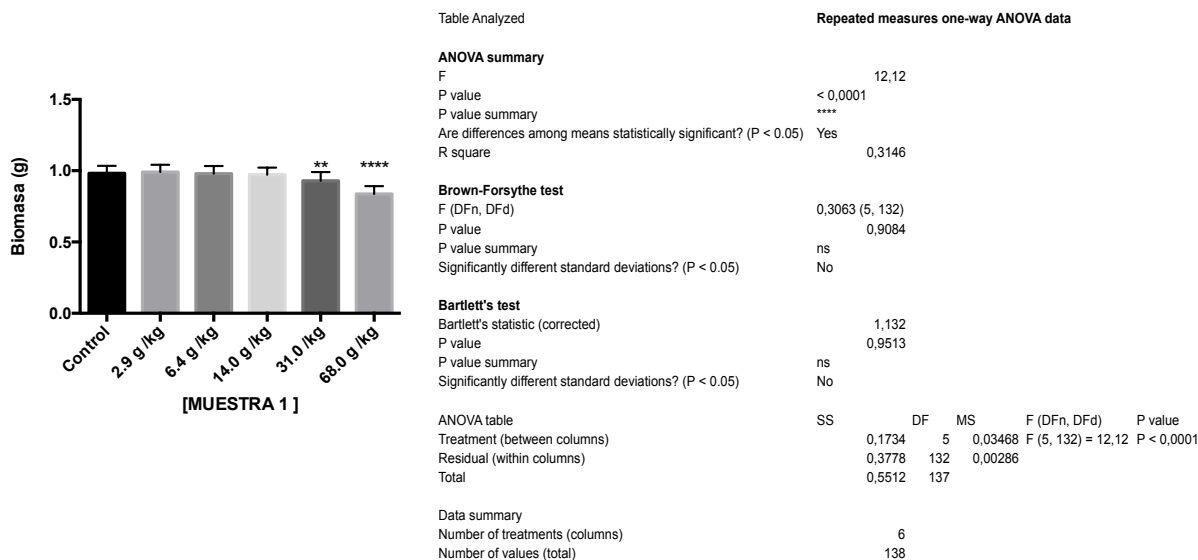
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /Kg	3,125	-53,99 to 60,24	No	ns
Control vs. 6.4 g /Kg	9,375	-47,74 to 66,49	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	25	-59,36 to 109,4	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	37,5	-31,38 to 106,4	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	75	-9,362 to 159,4	No	ns
Control vs. 150.0 g /kg	96,88	67,05 to 126,7	Yes	**
2.9 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	6,25	-97,07 to 109,6	No	ns
2.9 g /Kg vs. 14.0 g /kg	21,88	-7,952 to 51,70	No	ns
2.9 g /Kg vs. 31.0 g /kg	34,38	4,548 to 64,20	Yes	*
2.9 g /Kg vs. 68.0 g /kg	71,88	42,05 to 101,7	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	15,63	-107,4 to 138,6	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	28,13	-94,85 to 151,1	No	ns
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	65,63	-57,35 to 188,6	No	ns
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	87,5	18,62 to 156,4	Yes	*
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	12,5	-36,21 to 61,21	No	ns
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg				
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	71,88	14,76 to 129,0	Yes	*
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	37,5	-11,21 to 86,21	No	ns
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	59,38	2,262 to 116,5	Yes	*
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	21,88	-35,24 to 78,99	No	ns

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 2.9 g /Kg	96,88	93,75	3,125	5,984	4	4	0,5222	3
Control vs. 6.4 g /Kg	96,88	87,5	9,375	5,984	4	4	1,567	3
Control vs. 14.0 g /kg	96,88	71,88	25	8,839	4	4	2,828	3
Control vs. 31.0 g /kg	96,88	59,38	37,5	7,217	4	4	5,196	3
Control vs. 68.0 g /kg	96,88	21,88	75	8,839	4	4	8,485	3
Control vs. 150.0 g /kg	96,88	0	96,88	3,125	4	4	31	3
2.9 g /Kg vs. 6.4 g /Kg	93,75	87,5	6,25	10,83	4	4	0,5774	3
2.9 g /Kg vs. 14.0 g /kg	93,75	71,88	21,88	3,125	4	4	7	3
2.9 g /Kg vs. 31.0 g /kg	93,75	59,38	34,38	3,125	4	4	11	3
2.9 g /Kg vs. 68.0 g /kg	93,75	21,88	71,88	3,125	4	4	23	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	87,5	71,88	15,63	12,88	4	4	1,213	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	87,5	59,38	28,13	12,88	4	4	2,183	3
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	87,5	21,88	65,63	12,88	4	4	5,093	3
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	87,5	0	87,5	7,217	4	4	12,12	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	71,88	59,38	12,5	5,103	4	4	2,449	3
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg								
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	71,88	0	71,88	5,984	4	4	12,01	3
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	59,38	21,88	37,5	5,103	4	4	7,348	3
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	59,38	0	59,38	5,984	4	4	9,922	3
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	21,88	0	21,88	5,984	4	4	3,656	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

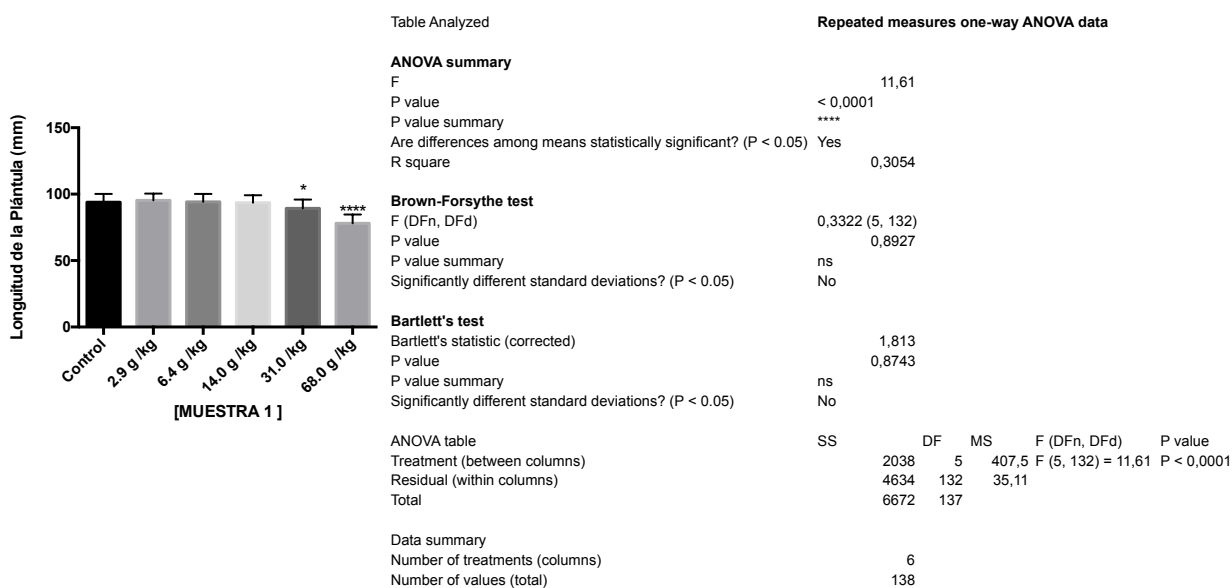
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 2.9 g /kg	-0,008409	-0,04326 to 0,02644	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	0,003329	-0,03215 to 0,03881	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	0,01008	-0,02736 to 0,04753	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	0,05278	0,01314 to 0,09243	Yes	**
Control vs. 68.0 g /kg	0,1451	0,08817 to 0,2021	Yes	****

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 2.9 g /kg	0,9823	0,9907	-0,008409	0,0137	31	30	0,6137	132
Control vs. 6.4 g /kg	0,9823	0,9789	0,003329	0,01395	31	28	0,2387	132
Control vs. 14.0 g /kg	0,9823	0,9722	0,01008	0,01472	31	23	0,6849	132
Control vs. 31.0 /kg	0,9823	0,9295	0,05278	0,01559	31	19	3,386	132
Control vs. 68.0 g /kg	0,9823	0,8371	0,1451	0,02239	31	7	6,482	132

### 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	-1,396	-5,255 to 2,464	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	-0,2362	-4,165 to 3,693	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	0,2623	-3,885 to 4,410	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	4,503	0,1118 to 8,893	Yes	*
Control vs. 68.0 g /kg	15,87	9,565 to 22,18	Yes	****

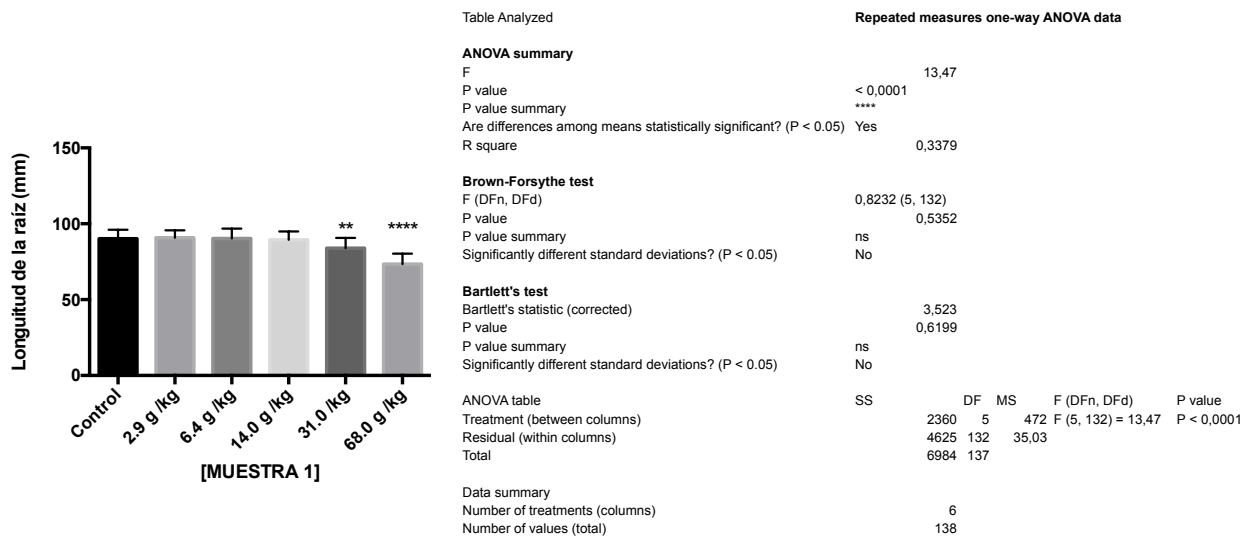
#### Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 2.9 g /kg	93,87	95,27	-1,396	1,517	31	30	0,9198	132
Control vs. 6.4 g /kg	93,87	94,11	-0,2362	1,545	31	28	0,1529	132
Control vs. 14.0 g /kg	93,87	93,61	0,2623	1,631	31	23	0,1608	132
Control vs. 31.0 /kg	93,87	89,37	4,503	1,726	31	19	2,608	132
Control vs. 68.0 g /kg	93,87	78	15,87	2,479	31	7	6,401	132

### 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	-0,7376 -4,593 to 3,118	No	ns
Control vs. 6.4 g /kg	-0,2281 -4,153 to 3,697	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	0,6942 -3,449 to 4,837	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	6,234 1,848 to 10,62	Yes	**
Control vs. 68.0 g /kg	16,7 10,40 to 23,00	Yes	****

#### Test details

Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
90,13	90,87	-0,7376	1,516	31	30	0,4866	132
90,13	90,36	-0,2281	1,543	31	28	0,1478	132
90,13	89,43	0,6942	1,629	31	23	0,4262	132
90,13	83,89	6,234	1,725	31	19	3,615	132
90,13	73,43	16,7	2,477	31	7	6,742	132

### 3.4.- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

- La germinación en los ensayos **control negativo** fue del 96,87 % (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 (**IC<sub>50</sub>**) se ha producido en una concentración de 33.42 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 ( $R^2=0,9197 \geq 0,7$ ), 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 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 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 33.42 g/kg.

Dr Técnico

GERARDO MENGES  
GONZALEZ -  
50820624P

Firmado digitalmente por  
GERARDO MENGES GONZALEZ -  
50820624P  
Fecha: 2025.06.25 07:49:16  
+02'00'

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Menges González