

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

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

INFORME DE RESULTADOS

INFORME Nº 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 forest* ("solución de cargas orgánicas en base agua")

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

ATT: *Ignacio Ruiz Ezquerria*

ECOTOXILAB SL

Dr. Técnico: Gerardo Mengs

28-Julio-2023

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

2.1- MUESTRA DE ENSAYO

Identificación:

- Muestra 1: Ecofire forest

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

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. No se ajustó el pH de la muestra.

Diluciones definitivas ensayadas:

- 3.12, 1.56, 0.78, 0.19 y 0.097 % 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 ($K_2Cr_2O_7$). $CE_{50-24h} = 1.21$ 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	3.12	1.56	0.78	0.19	0.097
Ecofire	0	100	70	15	10	0

2.5.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS

Referencia Muestra	CE _{50-24 h} (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire	1.016 / 12700	nd-n.d.

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

n.d: no es posible determinarlo

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

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire	98.4	n.d.-nd

2.6- RESULTADOS A 48 H DE EXPOSICIÓN

2.6.1 - PORCENTAJES DE INMOVILIDAD A 48 h DE EXPOSICIÓN

Referencia Muestra	Dilución (%)					
	Blank	3.12	1.56	0.78	0.19	0.097
Ecofire	0	100	90	25	15	5

2.6.2. – PARAMETROS ECOTOXICOLOGICOS

Referencia Muestra	CE _{50-48 h} (% de dilución)/ (mg/L)	I.C 95%* (% de dilución)
Ecofire	0.74 / 9250	nd-n.d.

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

n.d. : no es posible determinarlo

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

Referencia Muestra	U.T.	I.C 95%*
Ecofire	135.1	n.d.-nd

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 1.016 (% de dilución) y CE-50-48 h de 0.74 (% de dilución). Corresponden a unas concentraciones peso / volumen del producto ECOFIRE de 12.700 mg L⁻¹ y 9.250 mg L⁻¹ respectivamente.

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 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 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, comúnmente conocido como *Regulación CLP*.

Dr Técnico

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Mengs González