

ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

- **Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra OECD 207**

INFORME DE RESULTADOS

INFORME N° 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 forest ("solución de cargas orgánicas en base agua")

Nombre del Cliente: **SIMONRACK**

ATT: Ignacio Ruiz Ezquerra

ECOTOXILAB SL

Dr. Técnico: Gerardo Mengs

28-Julio-2023

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 forest (MUESTRA 1)

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

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:
6.4 g /kg, 14 g /kg, 31 g /kg, 68 g /kg, 150 g /kg y 330 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	22.78 ± 3.94 SD
6.4 g /kg	0 ± 0 SD	22.39 ± 3.62 SD
14 g /kg	2.5 ± 5.00 SD	19.17 ± 9.38 SD
31 g /kg	92,5 ± 6.45 SD (*)	-23.71 ± 1.96 SD (**)
68 g /kg	100 ± 0 SD (*)	-
150 g /kg	100 ± 0 SD (*)	-
330 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/	Réplica 1 (%)	Réplica 2 (%)	Réplica 3(%)	Réplica 4(%)
Control +	0	0	0	0	0
Control -	0	100	100	100	100
C1	6.4	100	100	100	100
C2	14	100	90	100	100
C3	31	10	0	15	5
C4	68	0	0	0	0
C5	150	0	0	0	0
C6	330	0	0	0	0

% de lombrices supervivientes en cada réplica de cada concentración ensayada

Indicadores:

IC 50 = 22.43 g/kg¹

NOEC = 14.00 g/kg

LOEC = 31.00 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)

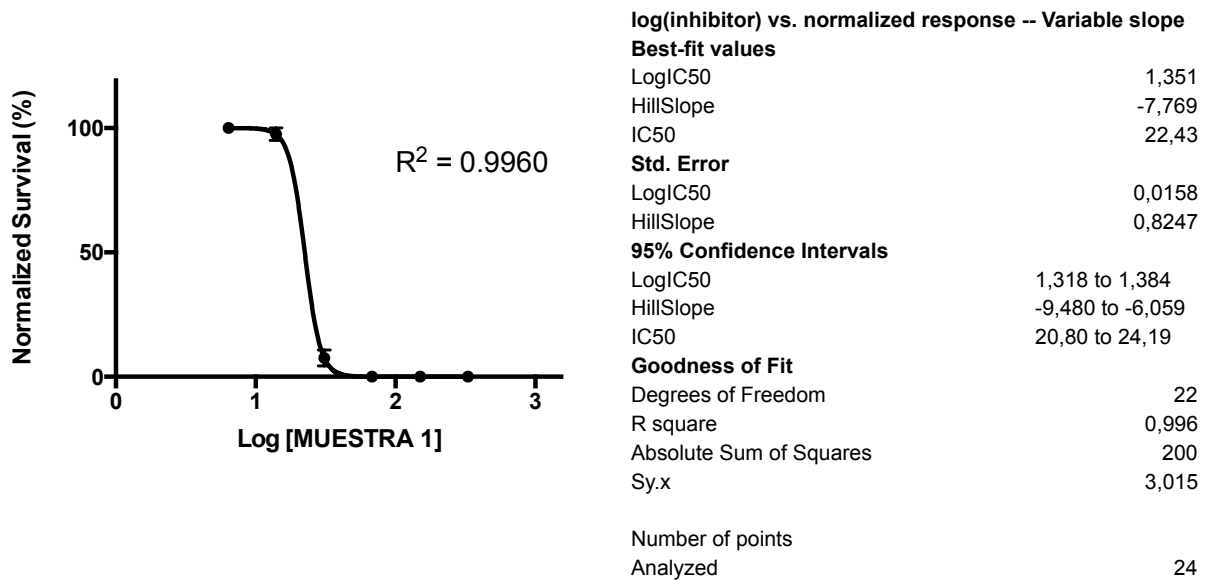
Valoración ecotoxicológica del suelo

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

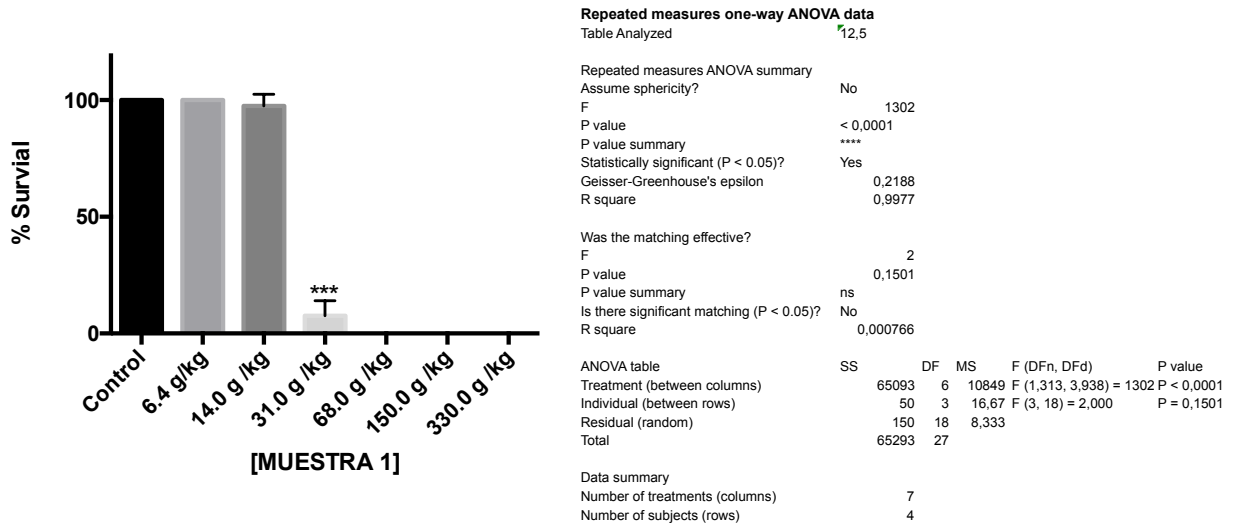
¹Valor superior a 10 mg/g (10 g/kg) (RD 9/2005 de 14 de Enero). Valoración ecotoxicológica en suelos contaminados.

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:



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.



Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0,05

Bonferroni's multiple comparisons test Mean Diff, 95% CI of diff, Significant? Summary

Control vs. 6.4 g/kg 2,5 -13,08 to 18,08 No ns
 Control vs. 14.0 g /kg 92,5 72,39 to 112,6 Yes ***
 Control vs. 31.0 g /kg
 Control vs. 68.0 g /kg
 Control vs. 150.0 g /kg
 Control vs. 330.0 g /kg

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 6.4 g/kg								
Control vs. 14.0 g /kg	100	97,5	2,5	2,5	4	4	1	3
Control vs. 31.0 g /kg	100	7,5	92,5	3,227	4	4	28,66	3
Control vs. 68.0 g /kg								
Control vs. 150.0 g /kg								
Control vs. 330.0 g /kg								

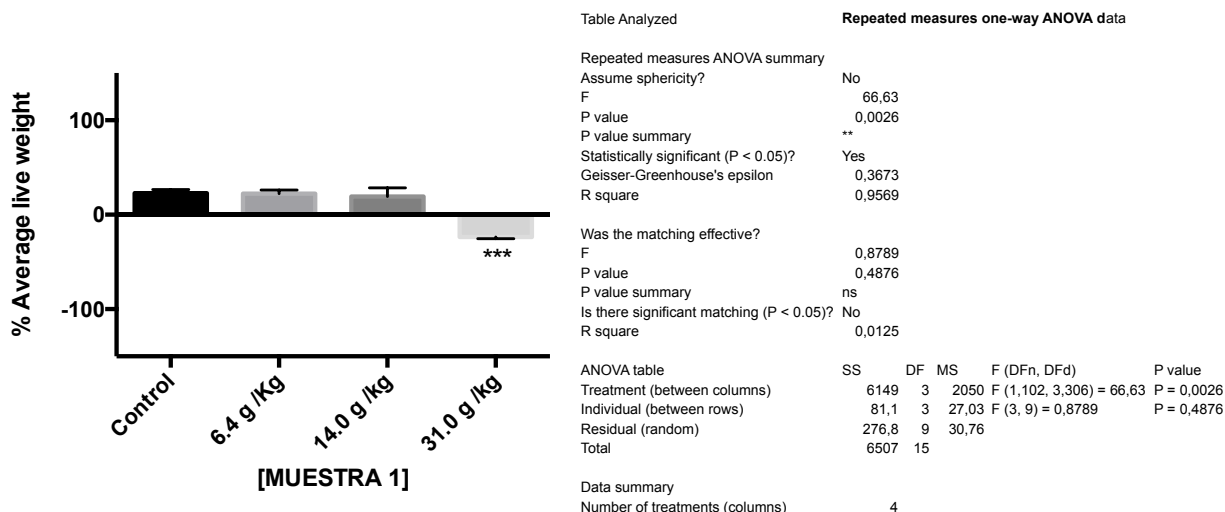
4.4.2-Variación del peso vivo(g)

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	17,7489177	23,1527094	22,8571429	27,3809524
C1	6.4	21,0300429	23,7288136	18,1818182	26,6409266
C2	14.0	26,8041237	27,7777778	10,7744108	11,3445378
C3	31.0	-23,8636364		-25,581395	-21,6730038
C4	68.0				
C5	150.0				
C6	330.0				

% 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	6
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff	95% CI of diff	Significant?	Summary
Control vs. 6.4 g /Kg	0,39	-9,856 to 10,64	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	3,613	-34,45 to 41,68	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	46,49	36,03 to 56,95	Yes	***
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	3,223	-27,55 to 34,00	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	46,1	39,51 to 52,69	Yes	***
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	42,88	13,29 to 72,47	Yes	*

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Control vs. 6.4 g /Kg	22,79	22,4	0,39	1,657	4	4	0,2354	3
Control vs. 14.0 g /kg	22,79	19,17	3,613	6,155	4	4	0,5869	3
Control vs. 31.0 g /kg	22,79	-23,71	46,49	1,691	4	4	27,5	3
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	22,4	19,17	3,223	4,976	4	4	0,6476	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	22,4	-23,71	46,1	1,065	4	4	43,27	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	19,17	-23,71	42,88	4,785	4	4	8,961	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 réplicas 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 22.43 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 ($R^2 = 0.996$) 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 31 g/kg.

- 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 concentraciones de 68 g/kg y superiores.

- 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 hasta la concentración de 31 g/kg en la que disminuyó significativamente. Como podemos ver en el análisis de los datos, la diferencia de peso de las lombrices en la concentración de 31 g/kg es estadísticamente significativa.

El producto comercial denominado **ECOFIRE forest** 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); en nuestro caso es superior al ser de 22.43 g/kg.

Dr Técnico

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Mengs González