

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 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

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 forest (MUESTRA 1)

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

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 % (07 mayo 2023)

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:

6.4 g /kg, 14 g /kg, 31 g /kg, 68 g /kg, 150 g /kg y 330 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 -	12,50 ± 10,21 SD	1,03 ± 0,07 SD (100,00%)	H 102,96 ± 06,31 SD	R 94,57 ± 04,59 SD
6.4 g /kg	9,37 ± 11,97 SD	1,05 ± 0,07 SD (102,10%)	H 103,76 ± 05,60 SD	R 95,03 ± 06,22 SD
14 g /kg	9,37 ± 11,97 SD	1,05 ± 0,06 SD (101,63%)	H 104,25 ± 05,45 SD	R 93,89 ± 05,56 SD
31 g kg	15,62 ± 6,25 SD	1,05 ± 0,07 SD (101,70%)	H 102,48 ± 05,21 SD	R 94,04 ± 05,36 SD
68 g /kg	31,25 ± 7,22 SD	0,97 ± 0,06 SD (94,10%)	H 94,91 ± 05,47 SD	R 88,54 ± 04,19 SD
150 g /kg	100	-	-	-
330 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	100	75	87,5
C1	6.4	100	100	87,5	75
C2	14.0	100	100	75	87,5
C3	31.0	87,5	87,5	75	87,5
C4	68.0	62,5	75	62,5	75
C5	150.0	0	0	0	0
C6	330.0	0	0	0	0

% de semillas germinadas en cada réplica de cada concentración ensayada

Indicadores:

IC 50 = 78.33 g/kg ¹

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)

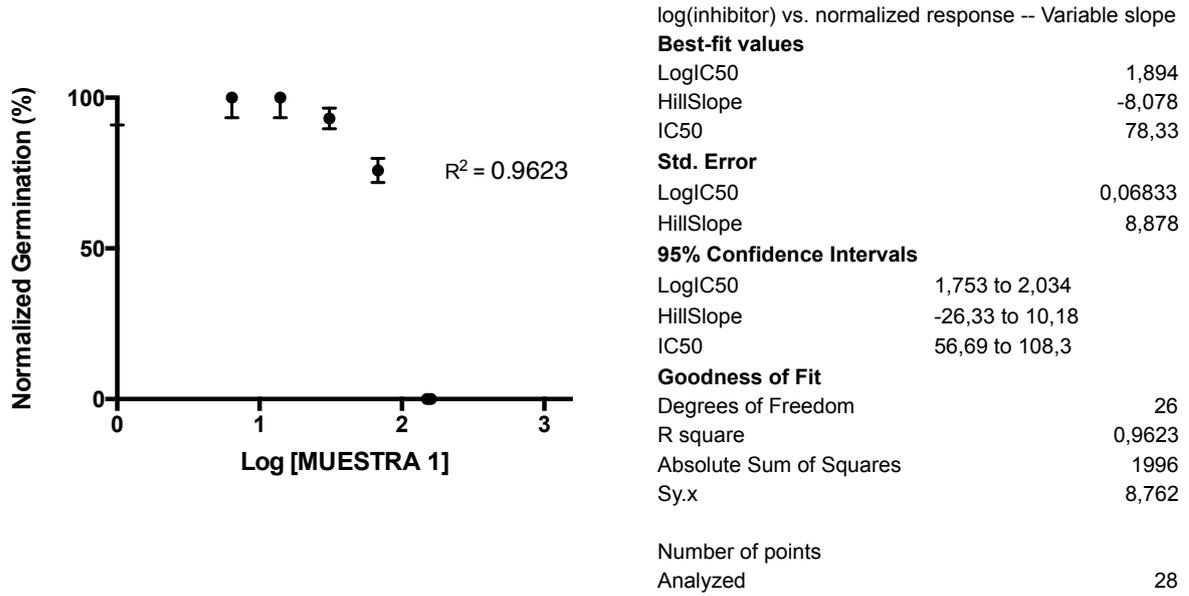
Valoración ecotoxicológica del suelo

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

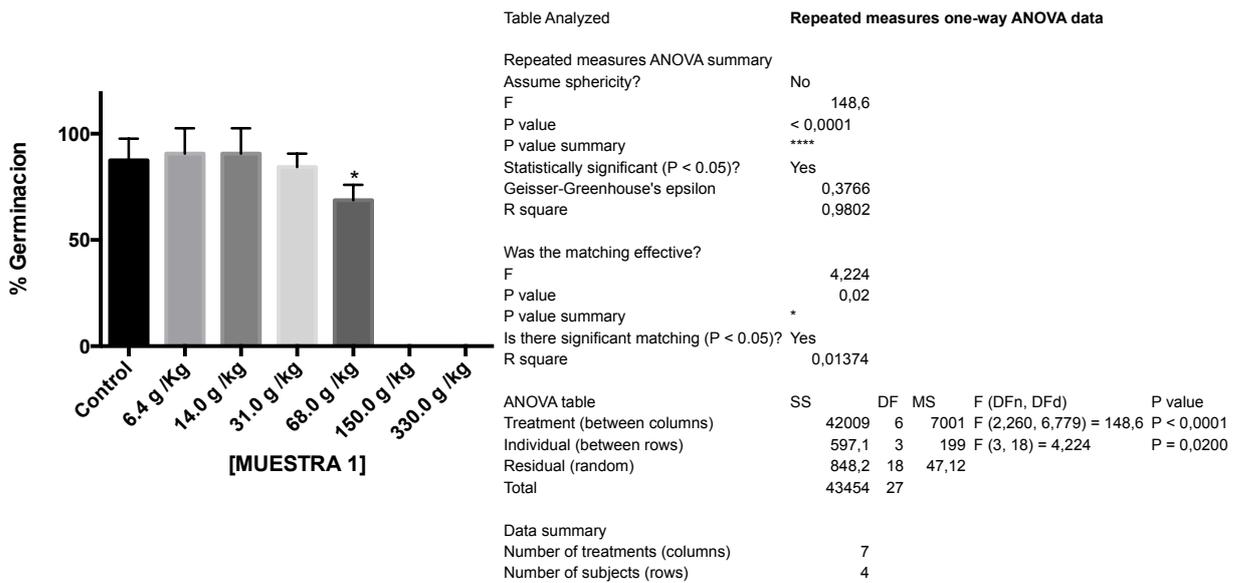
¹Valor superior a 10 mg/g (10 g/kg) (RD 9/2005 de 14 de Enero). Valoración ecotoxicológica en suelos contaminados.

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:



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:



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

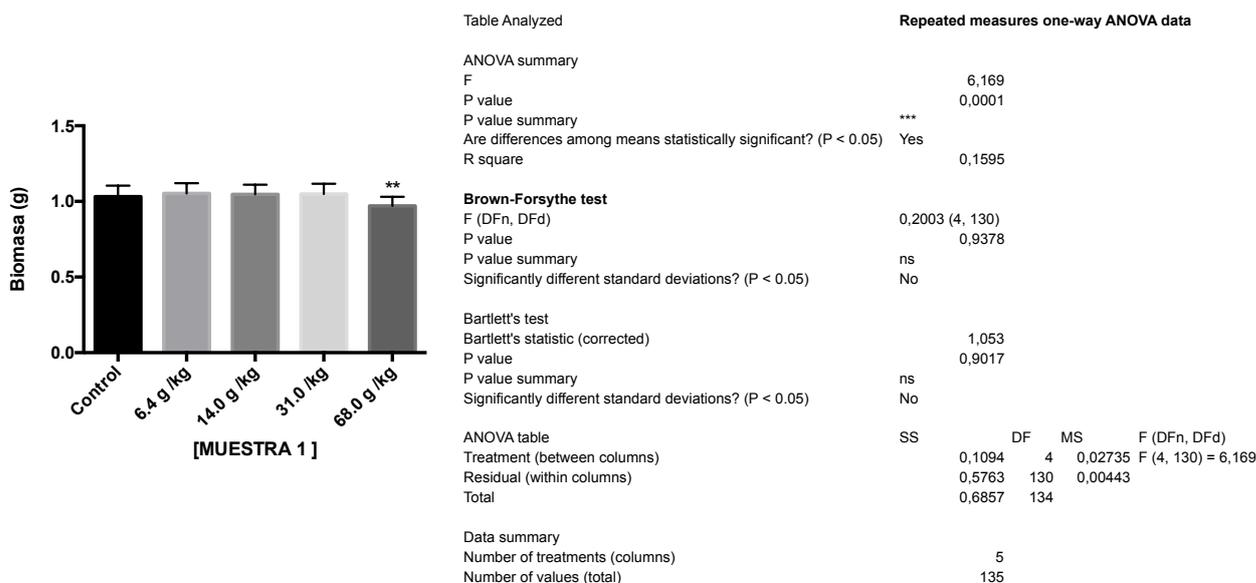
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6.4 g /Kg	-3,125	-60,24 to 53,99	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	-3,125	-32,95 to 26,70	No	ns
Control vs. 31.0 g /kg	3,125	-26,70 to 32,95	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	18,75	-15,69 to 53,19	No	ns
Control vs. 150.0 g /kg	87,5	38,79 to 136,2	Yes	**
Control vs. 330.0 g /kg	87,5	38,79 to 136,2	Yes	**
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	0	-48,71 to 48,71	No	ns
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	6,25	-53,40 to 65,90	No	ns
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	21,88	-53,19 to 96,94	No	ns
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	90,63	33,51 to 147,7	Yes	*
6.4 g /Kg vs. 330.0 g /kg	90,63	33,51 to 147,7	Yes	*
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	6,25	-28,19 to 40,69	No	ns
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	21,88	-35,24 to 78,99	No	ns
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	90,63	33,51 to 147,7	Yes	*
14.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	90,63	33,51 to 147,7	Yes	*
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	15,63	-14,20 to 45,45	No	ns
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	84,38	54,55 to 114,2	Yes	**
31.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	84,38	54,55 to 114,2	Yes	**
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	68,75	34,31 to 103,2	Yes	**
68.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	68,75	34,31 to 103,2	Yes	**
150.0 g /kg 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	87,5	90,63	-3,125	5,984	4	4	0,5222	3
Control vs. 14.0 g /kg	87,5	90,63	-3,125	3,125	4	4	1	3
Control vs. 31.0 g /kg	87,5	84,38	3,125	3,125	4	4	1	3
Control vs. 68.0 g /kg	87,5	68,75	18,75	3,608	4	4	5,196	3
Control vs. 150.0 g /kg	87,5	0	87,5	5,103	4	4	17,15	3
Control vs. 330.0 g /kg	87,5	0	87,5	5,103	4	4	17,15	3
6.4 g /Kg vs. 14.0 g /kg	90,63	90,63	0	5,103	4	4	0	3
6.4 g /Kg vs. 31.0 g /kg	90,63	84,38	6,25	6,25	4	4	1	3
6.4 g /Kg vs. 68.0 g /kg	90,63	68,75	21,88	7,864	4	4	2,782	3
6.4 g /Kg vs. 150.0 g /kg	90,63	0	90,63	5,984	4	4	15,14	3
6.4 g /Kg vs. 330.0 g /kg	90,63	0	90,63	5,984	4	4	15,14	3
14.0 g /kg vs. 31.0 g /kg	90,63	84,38	6,25	3,608	4	4	1,732	3
14.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	90,63	68,75	21,88	5,984	4	4	3,656	3
14.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	90,63	0	90,63	5,984	4	4	15,14	3
14.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	90,63	0	90,63	5,984	4	4	15,14	3
31.0 g /kg vs. 68.0 g /kg	84,38	68,75	15,63	3,125	4	4	5	3
31.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	84,38	0	84,38	3,125	4	4	27	3
31.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	84,38	0	84,38	3,125	4	4	27	3
68.0 g /kg vs. 150.0 g /kg	68,75	0	68,75	3,608	4	4	19,05	3
68.0 g /kg vs. 330.0 g /kg	68,75	0	68,75	3,608	4	4	19,05	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.



Ordinary one- way ANOVA Multiple comparisons

Number of families	1
Number of comparisons per family	4
Alpha	0,05

Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6.4 g /kg	-0,02166	-0,06528 to 0,02195	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	-0,01511	-0,05873 to 0,02850	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	-0,0171	-0,06150 to 0,02730	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	0,06088	0,01398 to 0,1078	Yes	**

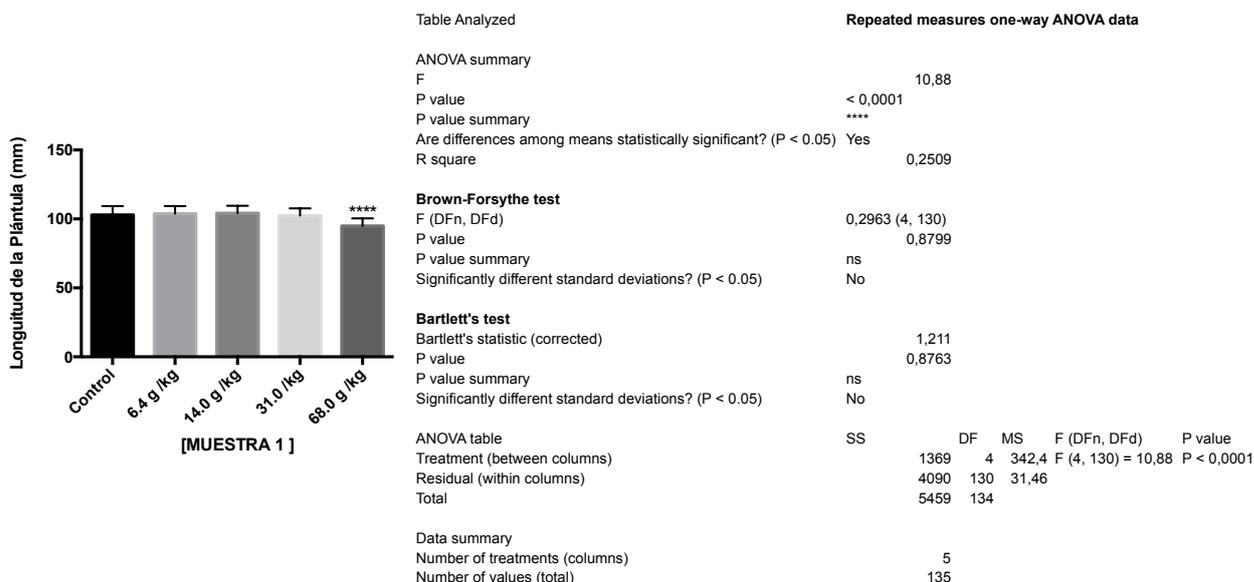
Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 6.4 g /kg	1,032	1,053	-0,02166	0,01764	28	29	1,228	130
Control vs. 14.0 g /kg	1,032	1,047	-0,01511	0,01764	28	29	0,8566	130
Control vs. 31.0 /kg	1,032	1,049	-0,0171	0,01796	28	27	0,9523	130
Control vs. 68.0 g /kg	1,032	0,9709	0,06088	0,01897	28	22	3,209	130

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	4
Alpha	0,05

Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6.4 g /kg	-0,7943	-4,468 to 2,880	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	-1,243	-4,917 to 2,431	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	0,4828	-3,257 to 4,223	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	8,055	4,105 to 12,01	Yes	****

Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 6.4 g /kg	103	103,8	-0,7943	1,486	28	29	0,5345	130
Control vs. 14.0 g /kg	103	104,2	-1,243	1,486	28	29	0,8362	130
Control vs. 31.0 /kg	103	102,5	0,4828	1,513	28	27	0,3191	130
Control vs. 68.0 g /kg	103	94,91	8,055	1,598	28	22	5,041	130

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.

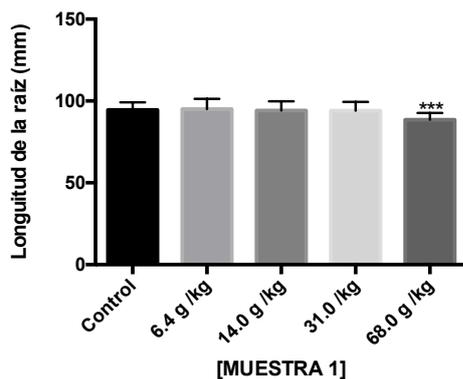


Table Analyzed		Repeated measures one-way ANOVA data				
ANOVA summary						
F						5,874
P value						0,0002
P value summary						***
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)		Yes				
R square						0,1531
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)						0,8750 (4, 130)
P value						0,4809
P value summary						ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)		No				
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)						4,723
P value						0,3169
P value summary						ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)		No				
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)		660	4	165	F (4, 130) = 5,874	P = 0,0002
Residual (within columns)		3652	130	28,09		
Total		4312	134			
Data summary						
Number of treatments (columns)			5			
Number of values (total)			135			

ORDINARY ONE-WAY ANOVA-Multiple comparisons

Number of families	1
Number of comparisons per family	4
Alpha	0,05

Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
Control vs. 6.4 g /kg	-0,4631	-3,935 to 3,009	No	ns
Control vs. 14.0 g /kg	0,4335	-3,038 to 3,905	No	ns
Control vs. 31.0 /kg	0,5344	-3,000 to 4,069	No	ns
Control vs. 68.0 g /kg	6,026	2,293 to 9,759	Yes	***

Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control vs. 6.4 g /kg	94,57	95,03	-0,4631	1,404	28	29	0,3298	130
Control vs. 14.0 g /kg	94,57	94,14	0,4335	1,404	28	29	0,3087	130
Control vs. 31.0 /kg	94,57	94,04	0,5344	1,43	28	27	0,3738	130
Control vs. 68.0 g /kg	94,57	88,55	6,026	1,51	28	22	3,991	130

3.4.- COMENTARIO DE RESULTADOS E INCIDENCIAS

- La germinación en los ensayos **control negativo** fue del 87,50 % (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 78.33 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 ($R^2=0,9623 \geq 0,7$), 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. Podemos comprobar que el test de Sidak nos confirma que la comparación entre las distintas concentraciones es estadísticamente significativa.

- 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 68 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.

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 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 78.33 g/kg.

Dr Técnico

ECOTOXILAB

Fdo. Gerardo Mengs González

