



7527/254.18a

INFORME DE ESTUDIO

EMPRESA SOLICITANTE

SUCCESS WORLD, S.L.
C/ Alfonso 12 nº 38-4.1.
28014 Madrid

COORDINADOR

ILERSAP-Servei Anàlisi el Pla, S.L.U.
Crta LL-11, km 9
C/ Ivars d'Urgell, nº 65
Edifici Neoparc 2, 4ª Planta
25191 Lleida

MATERIAL QUE PRESENTA

1 Muestra con referencia: **ECOFIRE** (Ref. interna: 032/18).

FECHA DE RECEPCIÓN DEL MATERIAL

1/06/18

TRABAJO QUE SOLICITA

Determinación de Toxicidad aguda en algas.

FECHA DE INICIO

11/06/18

FECHA DE FINALIZACIÓN

14/06/18

Los resultados de este informe conciernen exclusivamente a las muestras, productos o materiales entregados al LABORATORIO e indicados en el apartado "material que presenta".

La reproducción de este informe solo es autorizada si se hace en su totalidad. Este documento consta de 11 páginas de las cuales 9 son anexos.

7527/254.18a

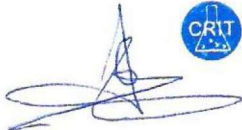
La determinación de la toxicidad aguda en algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*, anteriormente denominada *Selenastrum capricornutum*) ha sido llevada a cabo según el método operativo MO 01 basado en el método OCDE 201 (2006) (Alga, Growth Inhibition Test).

El resultado obtenido es el siguiente:

Muestra (Ref)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
	CI ₅₀ (72h) (g/L)	<i>p</i> _{0,05}
ECOFIRE	7,8	4,1-15,2

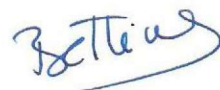
Terrassa, 25 de Junio de 2018

Responsables del Informe




Centre de Recerca i
Innovació en Toxicologia
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Fdo. Dra. M^a Carmen Riva
Dirección del CRIT



Fdo. Dra. Bettina Vallès
Dirección Técnica

ANEXOS

7527/224.16a

INDICE:

1. Resumen
2. Objetivo del Estudio
3. Sustancia / Producto de Ensayo
4. Organismo de Ensayo
5. Condiciones de ensayo
6. Desarrollo del ensayo
7. Resultados
8. Conclusión
9. Validación
10. Referencias

1.-Resumen

Se ha realizado el Estudio de la toxicidad aguda en algas de la muestra referenciada: **ECOFIRE**.

Para la Determinación de la inhibición del crecimiento algal se ha utilizado el alga unicelular de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conocida como *Selenastrum capricornutum*) y se ha seguido el método operativo MO 01 v.05 (2010) “Determinación de la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce unicelulares” basado en la guía OCDE 201 (2006)

El alga de agua dulce *Selenastrum capricornutum* ha sido expuesta a la muestra **ECOFIRE** a las concentraciones de ensayo: 0,1, 0,22, 0,48, 1, 2,2, 4,8 y 10% (1,13, 2,49, 5,42, 11,3, 24,9, 54,2 y 113 g/L). La duración total del ensayo ha sido de 72 horas.

El resultado obtenido en este ensayo indica que la muestra **ECOFIRE** presenta un valor de CI_{50} (72h) igual a 7,8 g/L (7.800 mg/L).

2.-Objetivo del Estudio

El objetivo de este estudio es la determinación de la inhibición del crecimiento algal determinado con la especie de microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* después de 72 horas de exposición.

3.-Sustancia de ensayo

Muestra con referencia: ECOFIRE

4.-Organismo de ensayo

- Cepa: *Pseudokirchneriella subcapitata* (formalmente conocida como *Selenastrum capricornutum*) CCAP 278/4
- Procedencia: Culture Collection Algae and Protozoa (Cumbria, Reino Unido).
- Condiciones de cultivo:
 - Temperatura: 22±2°C
 - Intensidad y calidad de la iluminación: 4000-5000 Lux (La superficie donde se realiza el ensayo recibe iluminación fluorescente uniforme y continua (tipo blanca-fría)
 - Agitación orbital continua

5.-Condiciones de ensayo

- Duración del ensayo: 72 horas
- Recipientes de ensayo: Tubos de ensayo (40 mL) tapados con material permeable al aire y con agitación continua para mantener las algas en suspensión.
- Volumen de medio de cultivo utilizado: 10 mL
- Densidad de Biomasa al inicio del ensayo: 1,1 10⁴ cel/mL
- Composición Medio de cultivo: Medio de cultivo definido en la norma AFNOR T90-304:

Solución	Reactivo	Concentración
1	Ca(NO ₃)·4H ₂ O	40 g/L
2	KNO ₃	100 g/L
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	30 g/L
4	K ₂ HPO ₄	40 g/L

Solución 5	Reactivo	Concentración
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	30 mg/L
	(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ·4H ₂ O	60 mg/L
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	60 mg/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	60 mg/L
	Mn(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	60 mg/L
	H ₃ BO ₃	60 mg/L
	C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O	60 mg/L

Solución 6	Reactivo	Concentración
	C ₆ H ₅ FeO ₇ 5H ₂ O	1,62 g/L
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,62 g/L
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,62 g/L

Para preparar un litro de medio de cultivo se mezclan 1 ml de las soluciones 1, 2, 3 y 4 y 0,5 mL de las soluciones 5 y 6. Se completa hasta 1L con agua desionizada.

6.-Desarrollo del ensayo

- Concentraciones de ensayo: 0,1%, 0,22%, 0,48%, 1%, 2,2%, 4,8% y 10%
- Número de replicas: 3
- Número de concentraciones de ensayo: 7 + control
- Preparación del cultivo de algas para la realización del ensayo. Debe estar en fase exponencial al ser utilizado.
- Factor de progresión geométrica utilizado: 2,2
- Preparación de las soluciones madre y de ensayo: Se ha preparado una solución madre con una concentración de 10% (100 mL/L) del material presentado (ref: **ECOFIRE**). Por lo tanto, 10 mL del material presentado se ha disuelto en 100 mL de medio de cultivo en un frasco volumétrico Clase A, de 100 mL mediante agitación, por lo que tenemos una solución madre de 10% de producto de ensayo.
- Las disoluciones utilizadas en el ensayo han sido preparadas a partir de esta solución madre, para obtener las concentraciones de ensayo.
- Para poder pasar las concentraciones expresadas en porcentaje (%) en peso (g/L), se han pesado 100 mL del material presentado (113 g). A partir de esta relación se ha deducido las concentraciones:

%	mL/L	g/L
0,1	1	1,13
0,22	2,2	2,48
0,48	4,8	5,42
1	10	11,3
2,2	22	24,9
4,8	48	54,2
10	100	113

7527/254.18a

- Condiciones de ensayo:
 - Los recipientes de ensayo se colocan en agitación orbital.
 - Intensidad y Calidad de la luz:
 - 4000-5000 Lux
 - La superficie donde se realiza el ensayo recibe iluminación fluorescente uniforme y continua (tipo blanca-fría).
 - Temperatura de incubación: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Método para la determinación de la biomasa: Espectrofotómetro, utilizando cubetas de cuarzo de 40 mm de paso óptico.

7.-Resultados

- Valor pH durante el ensayo (**Tabla 1**):

	pH inicial	pH final
Control	7,30	7,25
Conc. Min (0,1%)	7,26	6,97
Conc. Max (10%)	7,13	6,36

- Intensidad de luz (en Lux) durante el ensayo (**Tabla 2**):

	0h	24h	48h	72h
Intensidad de luz (Lux)	4272	4263	4268	4259

- Temperatura durante el ensayo (**Tabla 3**):

	0h	24h	48h	72h
Temperatura (°C)	21,0	21,0	21,0	21,0

7527/254.18a

- Porcentaje de inhibición del crecimiento algal después de 72 horas de exposición
(Tabla 4):

Conc.		% inhibición crecimiento algal (72h)
%	g/L	
0,1	1,13	0
0,22	2,49	11,6
0,48	5,42	28,7
1	11,3	62,0
2,2	24,9	96,8
4,8	54,2	100
10	113	100

Resultado

La Concentración de producto de ensayo **ECOFIRE** que produce la inhibición del crecimiento algal al 50% de la población de *Pseudokirchneriella subcapitata* después de 72 horas (CI_{50} (72h)) de exposición, ha sido determinada mediante el método Probit con unos límites de confianza del 95%, obteniendo el siguiente resultado:

$$CI_{50} (72h) = 0,68\% (0,37 - 1,35)$$

$$CI_{50} (72h) = 7,8 \text{ g/L} (4,1 - 15,2)$$

8.-Conclusión

La muestra de ensayo **ECOFIRE** presenta un valor de CI_{50} 72h igual a 7,8 g/L (7.800 mg/L) en la especie *Pseudokirchneriella subcapitata*. Este producto no presenta toxicidad por debajo de la concentración 1,13 g/L (1.130 mg/L).

9.-Validación

Los criterios de validación de este ensayo son:

- la densidad celular (o biomasa) en las soluciones control debería aumentar como mínimo en un factor de 16 en el tiempo de duración del ensayo (72 horas). En el ensayo realizado se cumple que:
 - la concentración celular a 0h: $1,09 \cdot 10^4$ cel/mL,
 - la concentración celular a 72h: $1,82 \cdot 10^5$ cel/mL,
- el coeficiente de variación de las tasas de crecimiento diario de las réplicas del control no debe exceder al 35%.
- el coeficiente de variación de las tasas de crecimiento en todo el periodo de ensayo de las réplicas del control no debe exceder al 7%.
- el pH de las soluciones control no debe haber variado más de 1,5 unidades durante el ensayo.
- El valor de CI_{50} 72h del dicromato potásico debe estar comprendido entre 0,9 – 1,5 mg/L.

10.-Referencias

1. OECD Guideline for Testing of Chemicals 201 (2006): “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”
2. MO 01 v.05 (2010) “Determinación de la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce unicelulares”
3. MO 01-1 v.03 (2010) “Mantenimiento cultivos algales”
4. MO 01-2 v.01 (2008) “Medio de cultivo algas”