

Study Sponsor:	ELF ATOCHEM
Issue Date:	06-Mar-05
Document Reference No.:	59198

[REDACTED]
Determination of Bacterial Inhibition in Pseudomonas Putida
Author(s): H. Thiebaud Coll A.M. Petit

- English Translation of Report Summary for
DuPont Chemical Solutions Enterprise
27-Jan-03

ELF ATOCHEM

Levallois Applications Center

TECHNICAL SUMMARY

Determination of growth inhibition of *Pseudomonas putida* bacteria by [REDACTED] was effected using the operating procedure described in proposed standard ISO/DIS 10712 (cf. doc 115 Afnor T90B).

The method consists in exposing the bacteria for 16 hours to a range of concentrations of the substance being studied. The inhibiting effect observed on *Pseudomonas putida* is determined by comparing the cell growth at various dilutions of the substance with the cell growth obtained for a culture under the same conditions but which does not contain the test substance. The cell growth is determined by turbidimetry using a spectrophotometer.

The percent cell growth inhibition H is given by the relation :

$$H = ((B_k - B_n)/(B_k - B_0)) \times 100$$

where B_k and B_n are the turbidities, respectively, in the control and test flasks (after deduction of non-inoculated whites) and B₀ is the turbidity at t = 0 in the control flasks.

Under the test conditions [REDACTED] presents a :

CE₅₀ - 16 h = 18 mg/l, with a confidence interval at 95 % = 14 - 24 mg/l

and a

CE₁₀ - 16 h = 5.5 mg/l, with a confidence interval at 95 % = 3 - 8.1 mg/l

The reference substance [REDACTED] has a CE₅₀ - 16 h equal to 16 mg/l and a CE₁₀ - 16 h equal to 10 mg/l

The validity criteria mentioning that the inoculum used in the control grew by at least a factor of 60X for the duration of the test was respected (growth factor = 127).

A. M. PETIT

H. THIEBAUD

Translation : Language Services
Running Fox Technologies, Inc.
A. Z. Fresco : 1/24/03

ELF ATOCHEM

D.C.R.D.

Centre d'Application de Levallois
Service Analyse Environnement

Levallois le : 06/03/95

Réf. document : 58198

N° de Séquentiel : 814020

TITRE :

[REDACTED]

DÉTERMINATION DE L'INHIBITION DE LA
CROISSANCE DES BACTÉRIES
PSEUDOMONAS PUTIDA

AUTEUR(S) : H. THIÉBAUD
Coll. A. M. PETIT

RÉSUMÉ DOCUMENTAIRE :

Détermination de l'inhibition de la croissance des bactéries *Pseudomonas putida* par le [REDACTED] en suivant le mode opératoire décrit dans la méthode du projet de norme ISO/DIS 10712 (cf. doc 118 Afnor T90 B).

[REDACTED] Inhibition de la croissance des bactéries *Pseudomonas putida*; ISO/DIS 10712

DESTINATAIRE : M. BLANDEL (DCFS)

Ce rapport comprend 3 pages et 6 feuillets non paginés (feuilles de saisie, de calcul et représentation graphique)

Copies : Chef de Service, Responsable des Archives,
Laboratoire d'écotoxicologie (copie coll.)
Secrétariat, Fichier TECH
Service Écotoxicité et Sécurité des Produits (DSEP)

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

ELF ATOCHEM
Centre d'Application de Levallois

RÉSUMÉ TECHNIQUE

La détermination de l'inhibition de la croissance des bactéries *Pseudomonas putida* par le [REDACTED] a été réalisée en suivant le mode opératoire décrit dans le projet de norme ISO/DIS 10712 (cf. doc 118 Afnor T90 B).

La méthode consiste à exposer pendant 16 heures les bactéries à une gamme de concentrations de la substance étudiée. L'effet inhibiteur sur *Pseudomonas putida* est déterminé par comparaison de la croissance cellulaire des diverses dilutions de substance avec la croissance cellulaire obtenue pour une culture réalisée dans les mêmes conditions mais ne contenant pas de substance d'essai. La croissance des bactéries est mesurée par turbidimétrie avec un spectrophotomètre.

Le pourcentage d'inhibition de la multiplication cellulaire, H, est donné par :

$$H = ((B_k - B_n)/(B_k - B_0)) \times 100$$

avec B_k et B_n, les turbidités respectivement dans les flacons témoins et dans les flacons d'essai (après déduction des blancs non inoculés) et B₀, la turbidité à t = 0 dans les flacons témoins.

Dans les conditions de l'étude, le [REDACTED] présente une :

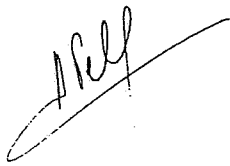
CE_{50-16h} = 18 mg/l, avec un intervalle de confiance à 95 % égal à 14 - 24 mg/l,

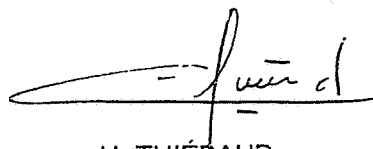
et une

CE_{10-16h} = 5,5 mg/l, avec un intervalle de confiance à 95 % égal à 3 - 8,1 mg/l.

La substance de référence, le [REDACTED] présente une CE_{50-16h} égale à 16 mg/l et une CE_{10-16h} égale à 10 mg/l.

Le critère de validité mentionnant que l'inoculum utilisé dans le témoin s'est multiplié par au moins un facteur 60 pendant la durée de l'essai a été respecté (facteur de croissance = 127).


A. M. PETIT


H. THIÉBAUD

ELF ATOCHEM
Centre d'Application de Levallois

**ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE
DE *PSEUDOMONAS PUTIDA***
(méthode décrite dans le projet de norme ISO/DIS 10712, cf. doc 118 Afnor T90 B)

Substance étudiée

Nom [REDACTED]
Référence CAL : 4820/94

Substance de référence

Nom [REDACTED]
Référence CAL (lot) : Aldrich 97% 633

Demandeur de l'étude :

M. BLANDEL (DCFS)

Directeur de l'étude :

H. THIÉBAUD

Réalisation technique :

A. M. PETIT

Date du début de l'essai :

16/11/94

Date de la rédaction du rapport d'étude :

06/03/95

Préparation de l'échantillon :

Le jour de l'essai, une solution mère à 500 mg/l
dans le milieu d'essai est préparée.

Mesures des pH :

		pH en début d'essai	pH en fin d'essai
Concentration	0 mg/l	6,95	6,01
	100 mg/l	6,90	5,90

Organisme test :

Pseudomonas putida ; Institut PASTEUR 103281

Matériel :

Verrerie stérilisée (Erlens de 10 ml)
Spectrophotomètre Perkin -Elmer lambda 5
Agitateur thermostaté 21°C +/-1°C

Gamme de concentrations :

	Volume (ml)					
	2	1	0,5	2,5 (1/10)	1,25 (1/10)	0
Solution mère ou solution mère diluée de la substance (facteur de dilution entre parenthèses)						
Eau	6	7	7,5	5,5	6,75	8
Milieu d'essai	1	1	1	1	1	1
Inoculum	1	1	1	1	1	1
Concentration (mg/l)						
	100	50	25	12,5	6,25	0

Ce document est la propriété d'ELF ATOCHEM. Il ne peut être ni copié, ni communiqué à des tiers sans autorisation formelle.
La reproduction de ce rapport d'étude n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral.

REPS4820.DOC Page 3/3

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

Essai d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas putida* - Essai définitif, 16 h -
Méthode décrite dans le projet de norme ISO/DIS 10712

Feuille de saisie des mesurages

Substance étudiée : Nom : XXXXXXXXXX
Réf. CAL : 4820/93

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Turbidité de la préculture		
nombre de mesure	absorbance (A436)	FNU
1		#N/A
2		#N/A
3		#N/A
moyenne	#DIV/0!	#DIV/0!

Inoculum dans le témoin	
Concentration initiale (% vol) :	10%
Turbidité initiale B0 (A 436) :	6,4
Facteur de croissance observé pendant la durée de l'essai :	127

Concentration (mg/l)	Mesurage de l'absorbance (A436) en fin d'essai dans les séries d'essai et le témoin						
	facteur de dilution	Essais					
		1	2	3	4	5	6
0 (témoin)	0,04	0,120	0,125	0,116	0,122	0,135	
6,25	0,05	0,150	0,125	0,134			
12,5	0,05	0,119	0,104	0,079			
25	0,05	0,048	0,041	0,041			
50	0,10	0,069	0,052	0,064			
100	1,00	0,116	0,104	0,125			

Essai d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas putida* - Essai définitif, 16 h -
Méthode décrite dans le projet de norme ISO/DIS 10712

**Feuille de calcul des pourcentages d'inhibition et des concentrations efficaces par la
méthode des Probits**

Substance étudiée : Nom : XXXXXXXXXX
Réf. CAL : 4820/93

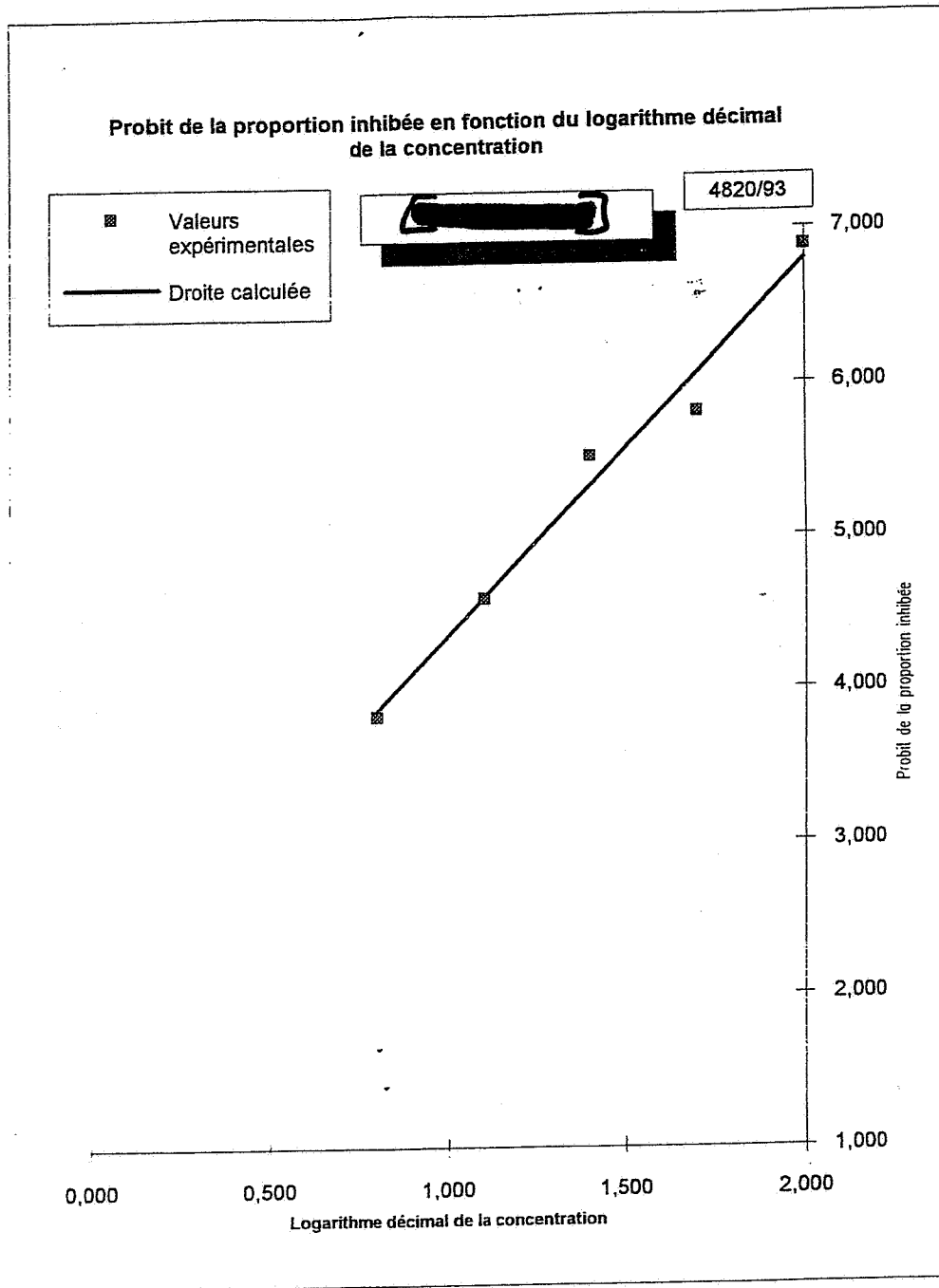
Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Concentration (mg/l)	Absorbance moyenne (A436moy)	Turbidité moyenne (FNU moy)	Inhibition (%)
0 (témoin)	0,124	810	0,0
6,25	0,136	710	12,4
12,5	0,101	530	34,8
25	0,043	240	70,9
50	0,062	170	79,6
100	0,115	30	97,1
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

CE50 =	18	mg/l
CE50 >	14	mg/l
CE50 <	24	mg/l
CE10 =	5,5	mg/l
CE10 >	3	mg/l
CE10 <	8,1	mg/l
r2 =	0,980	

#N/A : valeur non disponible.
#NOMBRE! : valeur indéterminée.

Données utilisées pour le calcul (excluant le binôme 0;0 du témoin)				
Concentration (mg/l)	Inhibition		PROBIT y	log conc. x
	(%)	corrigée (%)		
6,25	12,4	12,4	3,820	0,796
12,5	34,8	34,8	4,590	1,097
25	70,9	70,9	5,520	1,398
50	79,6	79,6	5,810	1,699
100	97,1	97,1	6,880	2,000
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
nb valeurs 5	Somme		26,620	6,990
	Moyenne		5,324	1,398



Essai d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas putida* - Essai définitif, 16 h -
Méthode décrite dans le projet de norme ISO/DIS 10712

Feuille de saisie des mesurages

Substance étudiée : Nom :

Réf. CAL : SUBSTANCE DE REFERENCE -ALDRICH-

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Turbidité de la préculture		
nombre de mesure	absorbance (A436)	FNU
1		#N/A
2		#N/A
3		#N/A
moyenne	#DIV/0!	#DIV/0!

Inoculum dans le témoin	
Concentration initiale (% vol) :	10%
Turbidité initiale B0 (A 436) :	6,4
Facteur de croissance observé pendant la durée de l'essai :	127

Concentration (mg/l)	Mesurage de l'absorbance (A436) en fin d'essai dans les séries d'essai et le témoin						
	facteur de dilution	Essais					
		1	2	3	4	5	6
0 (témoin)	0,04	0,125	0,116	0,122	0,125	0,135	
10	0,04	0,115	0,133	0,097			
15	0,07	0,063	0,096	0,066			
20	0,10	0,119	0,126	0,122			
25	0,20	0,117	0,164	0,166			
30	1,00	0,021	0,035	0,035			

Essai d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas putida* - Essai définitif, 16 h -
Méthode décrite dans le projet de norme ISO/DIS 10712

Feuille de calcul des pourcentages d'inhibition et des concentrations efficaces par la méthode des Probits

Substance étudiée : Nom :
Réf. CAL : SUBSTANCE DE REFERENCE -ALDRICH-
Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Concentration (mg/l)	Absorbance moyenne (A436moy)	Turbidité moyenne (FNU moy)	Inhibition (%)
0 (témoin)	0,125	810	0,0
10	0,115	750	7,5
15	0,075	300	63,5
20	0,122	320	61,0
25	0,149	190	77,2
30	0,030	8,7	99,7
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

CE50 =	16	mg/l
CE50 >	8,5	mg/l
CE50 <	22	mg/l
CE10 =	10	mg/l
CE10 >	2	mg/l
CE10 <	14	mg/l
r2 =	0,864	

#N/A : valeur non disponible.
#NOMBRE! : valeur indéterminée.

Données utilisées pour le calcul (excluant le binôme 0;0 du témoin)				
Concentration (mg/l)	Inhibition		PROBIT y	log conc. x
	(%)	corrigée (%)		
10	7,5	7,5	3,520	1,000
15	63,5	63,5	5,330	1,176
20	61,0	61,0	5,250	1,301
25	77,2	77,2	5,740	1,398
30	99,7	99,7	7,330	1,477
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
nb valeurs		Somme	27,170	6,352
5		Moyenne	5,434	1,270

