

Study Sponsor:	ELF ATOCHEM
Issue Date:	04-Jul-95
Document Reference No.:	95/SAEK/0489/AMP

[REDACTED]
Bacterial Growth Inhibition
Author(s): H. Thiebaud Coll: A.M. Petit

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

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

ELF ATOCHEM S.A.
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 118 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.

The inhibition values obtained during the preliminary test led us to effect a limit test at the single concentration of 100 mg/l.

Under the test conditions, [REDACTED] has an inhibition of 14 % at a concentration of 100 mg/l. The CE₅₀ is consequently higher than 100 mg/l. The reference substance, 3,5-dichlorophenol, has a CE₅₀ - 16 h equal to 17 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 195).

A. M. PETIT

H. THIEBAUD

ELF ATOCHEM S.A.

D.C.R.D.

Centre d'Application de Levallois
Service Analyse Environnement

Levallois le : 04/07/95

Réf. document : 95/SAEk/0489/AMP

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. DEVAUX (DCFS)

Ce rapport comprend 3 pages et 5 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)

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.

REPS2876.DOC Page 1/3

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

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.

Les valeurs d'inhibitions obtenues au cours de l'essai préliminaire nous ont conduit à effectuer un essai limite à la seule concentration de 100 mg/l.

Dans les conditions de l'étude, le [REDACTED] présente une inhibition de 14% à la concentration de 100 mg/l. La CE₅₀ est par conséquent supérieure à 100 mg/l. La substance de référence, le 3,5-dichlorophénol, présente une CE_{50-16h} égale à 17 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 195).



A. M. PETIT



H. THIÉBAUD

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB1

**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 [REDACTED]

Substance de référence

Nom : 3-5 Dichlorophénol
Référence lot : Aldrich 97% 633

Demandeur de l'étude :

M. Devaux (DCFS)

Directeur de l'étude :

H. Thiébaud

Réalisation technique :

A. M. Petit

Date du début de l'essai :

23/5/95

Date de la rédaction du rapport d'étude :

04/07/95

Préparation de l'échantillon :

Le jour de l'essai, une solution mère à 1 g/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	6,66	7,15
100 mg/l	7,18	7,12

Organisme test :

Pseudomonas putida ; Institut PASTEUR 103281

Matériel :

Verrerie stérilisée (Erlens de 50 ml)
Spectrophotomètre Perkin -Elmer λ 680 nm
Agitateur thermostaté 21°C $\pm$ 1°C

Gamme de concentrations :

	Volume (ml)	
Solution mère ou solution mère diluée de la substance (facteur de dilution entre parenthèses)	1	0
Eau	7	8
Milieu d'essai	1	1
Inoculum	1	1
	Concentration (mg/l)	
	100	0

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB!

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

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Turbidité de la préculture		
nombre de mesure	absorbance (A436)	FNU
1	0,199	50,60
2	0,197	50,08
3	0,196	49,83
moyenne	0,197	50,17

Inoculum dans le témoin	
Concentration initiale (% vol) :	10%
Turbidité initiale B0 (A 436) :	5,0
Facteur de croissance observé pendant la durée de l'essai :	195

Concentration (mg/l)	Mesurage de l'absorbance (A436) en fin d'essai dans les séries d'essai et le témoin							
	facteur de dilution	Essais						Témoin Substance
0 (témoin)	0,04	0,169	0,159	0,153	0,158	0,137		
100	0,10	0,324	0,341	0,324				

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 :

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Concentration (mg/l)	Absorbance moyenne (A436moy)	Turbidité moyenne (FNU moy)	Inhibition (%)
0 (témoin)	0,155	980	0,0
100	0,330	840	14,4
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
#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 = #NOMBRE!	mg/l
CE50 > #NOMBRE!	mg/l
CE50 < #NOMBRE!	mg/l
CE10 = #NOMBRE!	mg/l
CE10 > #NOMBRE!	mg/l
CE10 < #NOMBRE!	mg/l
r2 = #NOMBRE!	

#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 (%)		
100	14.4	14.4	3,920	2,000
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
nb valeurs		Somme	3,920	2,000
1		Moyenne	3,920	2,000

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 mesures

Substance étudiée : Nom : **3-5 Dichlorophénol**

Réf. CAL Aldrich 97% 633

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Turbidité de la préculture		
nombre de mesure	absorbance (A436)	FNU
1	0,199	50,60
2	0,197	50,08
3	0,196	49,83
moyenne	0,197	50,17

Inoculum dans le témoin	
Concentration initiale (% vol) :	10%
Turbidité initiale B0 (A 436) :	5,0
Facteur de croissance observé pendant la durée de l'essai :	195

Concentration (mg/l)	Mesurage de l'absorbance (A436) en fin d'essai dans les séries d'essai et le témoin							Témoin Substance
	facteur de dilution	Essais 1	2	3	4	5	6	
0 (témoin)	0,04	0,169	0,159	0,153	0,158	0,137		
30	1,00	0,476	0,439	0,504				
25	1,00	0,755	0,736	0,100				
20	0,20	0,155	0,141	0,158				
15	0,20	0,458	0,431	0,433				
10	0,10	0,341	0,376	0,373				

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 : 3-5 Dichlorophénol

Réf. CAL : Aldrich 97% 633

Souche de *Pseudomonas putida* : Institut Pasteur 103281

Concentration (mg/l)	Absorbance moyenne (A436moy)	Turbidité moyenne (FNU moy)	Inhibition (%)
0 (témoin)	0,155	980	0,0
30	0,473	120	88,2
25	0,530	140	86,2
20	0,151	190	81,0
15	0,441	560	43,1
10	0,363	930	5,1
#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 =	17	mg/l
CE50 >	13	mg/l
CE50 <	21	mg/l
CE10 =	10	mg/l
CE10 >	5,6	mg/l
CE10 <	13	mg/l
r2 =	0,932	

#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 (%)		
30	88,2	88,2	6,180	1,477
25	86,2	86,2	6,080	1,398
20	81,0	81,0	5,880	1,301
15	43,1	43,1	4,820	1,176
10	5,1	5,1	3,360	1,000
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!
nb valeurs		Somme	26,320	6,352
5		Moyenne	5,264	1,270

