

Study Sponsor:	ELF ATOCHEM
Issue Date:	22-Apr-99
Document Reference No.:	95/SAEK/0432/CKE

[REDACTED]
Algae Inhibition
Author(s): H. Thiebaud Coll: C. Kae'

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

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

TECHNICAL SUMMARY

The determination of growth inhibition (chronic toxicity) of fresh water algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (previously called *Raphidocelis subcapitata* and *Selenastrum capricornutum*) exposed to [REDACTED] for 72 hours, was effected using the operating procedure described in standard NF EN 28692.

The method consists in exposing the algae to a range of [REDACTED] concentrations dissolved in water. The toxic effect observed is inhibition of cell multiplication after 72 hours.

The study was carried out in 100 ml Erlenmeyer glass flasks, closed with carded cotton packed in gauze, containing 50 ml of the test solution seeded with an alga suspension in sufficient quantity to obtain 10^4 cells/ml at the start of the test. The test flasks were incubated at $22.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ under continuous agitation and lighting. The alga concentration was measured each day of the test. Physical and chemical analyses were effected at the start and the end of the test.

The concentration of substance under study which causes a 50 % reduction, either of the growth (CE_{50b}) or of the growth (CE_{50r}) is determined. The NOEC (No Observed Effect Concentration), which corresponds to the highest concentration tested which does not create a significant effect relative to a control, is determined by a statistical analysis test (Dunnett test). The results of the study are :

Nominal inhibiting concentration and NOEC (mg/l)		
	Value	CI at 95 %
Integral biomass		
$\text{CE}_{50b} - 72 \text{ h}$	9.6	3 - 22
$\text{CE}_{10b} - 72 \text{ h}$	2.4	0.18 - 6
NOEC_b	1.9	-
Growth rate		
$\text{CE}_{50r} - 72 \text{ h}$	23	14 - 45
$\text{CR}_{10r} - 72 \text{ h}$	4.6	1.9 - 8
NOEC_r	9.4	-

CI : confidence interval

ND : indeterminate

The study was carried out without analysis of the test solutions. Thus, the substance under study being a preparation composed of several water soluble components, the method of NF EN ISO 28692 was used rather than method C3 of the appendix to Directive 92/69/EEC. This method allows the study to be carried out without analysis of the test solutions, expressing the results based on nominal concentrations.

The inhibiting and NOEC concentrations presented in the above table were calculated using nominal [REDACTED] concentrations.

Visual observations allowed verifying the appearance of the solutions at the beginning and the end of the test : the test solutions were clear, colorless and homogeneous during the test. No precipitation was observed at the end of the test.

Microscopic examination showed that the appearance of the algae at the end of the test was normal compared to observations made on the control solution : monocellular algae in the form a moon crescent of average size 5-10 μm .

The pH variation during the test in the control series was 0.52 units.

The validity criteria of the study were respected : the density ratio (R) measured in the control solution was greater than 16 ($R = 71$); the pH of the control solutions did not vary by more than 1.5 units during the test.

The present study was carried out according to the Good Practice principles of the OCDE laboratory.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB1

Elf Atochem S.A.

DCRD

**Centre d'Application de Levallois
Service Analyse Environnement**

conformité aux BPL de l'OCDE délivrée
par le GIPC en date du 8/3/93,
reconduite le 27/11/98

Levallois, le 22/04/99

Référence

Séquentiel

Etude numéro :

RAPPORT D'ETUDE

TITRE :

INHIBITION DE LA CROISSANCE DES ALGUES

AUTEUR(S) : H. THIÉBAUD ; Coll. C. KAË

RESUME DOCUMENTAIRE :

Détermination de l'inhibition de la croissance (toxicité chronique) du [REDACTED] vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* sur 72 heures, en suivant le mode opératoire décrit dans la norme NF EN 28692 (reproduisant intégralement la norme ISO 8692). Cette étude est réalisée conformément aux principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE.

MOTS CLES :

[REDACTED] Toxicité chronique, algues, NF EN 28692

DESTINATAIRES : M. DEVAUX (DFO)
DOC FICHIER TECH

Copies :

Chef de Service, Responsable des Archives,
Secrétariat,
Service Écotoxicité et Sécurité des Produits (DSEP)

Company Sanitized. Does not contain TSCA CRT

¹ Ce rapport comprend 29 pages et 3 feuillets non paginés.

Ce document est notre propriété. Il ne peut être ni copié, ni communiqué à des tiers sans autorisation expresse d'Elf Atochem.
La reproduction de ce rapport d'étude n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral.
Etude n° 4285/98/A - RC34285.DOC page 1/29

RESUME TECHNIQUE

La détermination de l'inhibition de la croissance (toxicité chronique) des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (précédemment nommée *Raphidocelis subcapitata* et *Selenastrum capricornutum*) exposées au [REDACTED] pendant 72 heures, a été réalisée en suivant le mode opératoire décrit dans la norme NF EN 28692.

La méthode consiste à exposer les algues à une gamme de concentrations du [REDACTED] solubilisé dans l'eau de dilution. L'effet toxique observé est l'inhibition de la multiplication cellulaire au bout de 72 heures.

L'étude a été réalisée dans des fioles erlenmeyer en verre de 100 ml, bouchées à l'aide de coton cardé emballé dans de la gaze, contenant 50 ml de solution d'essai ensemencée par une suspension d'algues en quantité suffisante pour obtenir 10^4 cellules/ml en début d'essai. Les flacons d'essai ont été incubés à $22,2 \pm 0,5$ °C sous agitation et éclairage continu. La concentration algale a été mesurée à chaque jour d'essai. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées en début et en fin d'essai.

La concentration en substance à étudier qui provoque une réduction de 50%, soit de la croissance (CE_{50b}), soit du taux de croissance (CE_{50r}) est déterminée. La NOEC (No Observed Effect Concentration) ou CSEO (Concentration Sans Effet Observé), qui correspond à la plus forte concentration testée ne créant pas d'effet significatif par rapport au témoin, est par ailleurs déterminée par une méthode d'analyse statistique (test de Dunnett). Les résultats de l'étude sont :

Concentration nominale inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	Valeur	IC à 95 %
Biomasse intégrale		
$CE_{50b-72h}$	9,6	3 - 22
$CE_{10b-72h}$	2,4	0,18 - 6
$NOEC_b$	1,9	-
Taux de croissance		
$CE_{50r-72h}$	23	- 14 - 45
$CE_{10r-72h}$	4,6	1,9 - 8
$NOEC_r$	9,4	-

IC : intervalle de confiance
ND : non déterminé

Company Sanitized. Does not contain TSCA data

L'étude est réalisée sans analyse des solutions d'essai. En effet, la substance d'essai étant une préparation constituée de plusieurs composants solubles dans l'eau, la méthode NF EN ISO 28692 est appliquée plutôt que la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE. Cette méthode permet de réaliser l'étude sans analyse des solutions d'essai, en exprimant les résultats sur la base des concentrations nominales.

Les concentrations inhibitrices et NOEC présentées dans le tableau ci-dessus ont été calculées en utilisant les concentrations nominales en [REDACTED]

Les observations visuelles ont permis de vérifier l'aspect des solutions en début et en fin d'essai : les solutions d'essai ont été claires, non colorées et homogènes au cours de l'essai. Aucune précipitation n'a été observée en fin d'essai.

Les observations microscopiques ont montré que l'aspect des algues en fin d'essai était normal par comparaison aux observations réalisées dans la solution témoin : algues unicellulaires en forme de croissant de lune de taille moyenne 5-10 μm .

Les variations de pH en cours d'essai dans la série témoin a été de 0,52 unités.

Les critères de validité de l'étude ont été respectés : le rapport de densité (R) mesuré dans la solution témoin est supérieure à 16 ($R = 71$) ; Le pH des solutions témoins n'a pas varié de plus de 1,5 unités pendant l'essai.

La présente étude a été réalisée selon les principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

L'étude est réalisée sans analyse des solutions d'essai. En effet, la substance d'essai étant une préparation constituée de plusieurs composants solubles dans l'eau, la méthode NF EN ISO 28692 est appliquée plutôt que la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE. Cette méthode permet de réaliser l'étude sans analyse des solutions d'essai, en exprimant les résultats sur la base des concentrations nominales.

Les concentrations inhibitrices et NOEC présentées dans le tableau ci-dessus ont été calculées en utilisant les concentrations nominales en [REDACTED]

Les observations visuelles ont permis de vérifier l'aspect des solutions en début et en fin d'essai : les solutions d'essai ont été claires, non colorées et homogènes au cours de l'essai. Aucune précipitation n'a été observée en fin d'essai.

Les observations microscopiques ont montré que l'aspect des algues en fin d'essai était normal par comparaison aux observations réalisées dans la solution témoin : algues unicellulaires en forme de croissant de lune de taille moyenne 5-10 μm .

Les variations de pH en cours d'essai dans la série témoin a été de 0,52 unités.

Les critères de validité de l'étude ont été respectés : le rapport de densité (R) mesuré dans la solution témoin est supérieure à 16 ($R = 71$) ; Le pH des solutions témoins n'a pas varié de plus de 1,5 unités pendant l'essai.

La présente étude a été réalisée selon les principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE.

Company Sanitized. Does not contain RSCA text

TECHNICAL SUMMARY

The determination of the growth inhibition (chronic toxicity) of the freshwater algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (previously known as *Raphidocelis subcapitata* and *Selenastrum capricornutum*) exposed to the test substance [REDACTED] for a duration of 72 hours was performed following the method C3 described in Directive 92/69/EEC of the European Commission and in the guideline 201 of the OECD.

Algae were exposed to a range of concentrations of [REDACTED] dissolved in dilution water. The toxic effect measured during the assay was the inhibition of cellular multiplication over a time period of 72 hours.

The study was performed using 100 ml glass erlenmeyer flasks stoppered with cotton wool wrapped in sterilized gauze / 120 ml glass bottles stoppered with PTFE bungs and sealed with aluminium caps, containing 50 ml of test solution inoculated with an algal suspension so that the initial cell concentration was equal to 1×10^4 cells/ml. Tests flasks were incubated at $22,2 \pm 0,5$ °C continuously shaken and constantly illuminated. The algal concentration was measured daily. Physico-chemical measurements were carried out at the beginning and the end of the test.

The concentration of test substance causing a 50 % reduction in biomass (E_bC_{50}) or in growth rate (E_rC_{50}) was determined. The No Observed Effect Concentration (NOEC), corresponding to the highest tested concentration where no significant effect was observed in comparison to the control, was determined using a statistical analytical method (Dunnett test). The results were as follows :

Effect nominal concentrations and NOEC (mg/l)		
	Value	95 % CI
Biomass		
E_bC_{50-72h}	9,6	3 - 22
E_bC_{10-72h}	2,4	0,18 - 6
NOEC _b	1,9	-
Growth rate		
E_rC_{50-72h}	23	14 - 45
E_rC_{10-72h}	4,6	1,9 - 8
NOEC _r	9,4	-

CI : 95 % confident interval
ND : not determined

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB1

The study was carried out with no analytical determination of test concentrations according to the method NF EN 28692 which do not necessitate to analyse the solutions. This method has been chosen since the test substance is a mixture of soluble chemicals. The effect concentrations and NOEC shown in the previous table have been calculated using the nominal concentrations of [REDACTED]

The appearance of the test solutions was visually checked at the beginning and at the end of the test. Solutions were found to be clear and colourless over the period of the test. No precipitation was observed at the end of the test.

Microscopic observation confirmed that the algae appeared normal at the end of the test in comparison to the control : the normal form of the unicellular algae is a crescent shaped cell with an average length of 5-10 μm .

During the test, the control pH varied by 0,52 units.

The validity criteria of the study were respected : the increase in cell density (R), measured in the control solution between the end and the beginning of the test, was greater than a factor of 16 ($R = 71$) ; the control pH not varied more than 1,5 units during the test.

The study was performed according to the principles of Good Laboratory Practice (GLP) as described by OECD.

Company Sanitized. Does not contain FSCA CR

RAPPORT D'ÉTUDE

INHIBITION DE LA CROISSANCE DES ALGUES D'EAU DOUCE

N° D'ÉTUDE : [REDACTED]

SOMMAIRE

1. ASSURANCE QUALITÉ	7
2. SIGNATURES	8
3. IDENTIFICATIONS	9
3.1. Substance d'essai	9
3.2. Installation d'essais	10
3.3. Demandeur de l'étude	10
3.4. Calendrier	10
3.5. Archivage	10
4. OBJECTIF DE L'ÉTUDE	10
5. MÉTHODE D'ESSAI	10
5.1. Introduction	11
5.2. Matériel et produits	12
5.3. Mode opératoire	15
6. MODE DE CALCUL	15
6.1. Calcul des pourcentages d'inhibition	16
6.2. Calcul des rapports de densité (R)	16
6.3. Calcul des facteurs de croissance (k)	17
6.4. Calcul des concentrations inhibitrices	17
6.5. Détermination des NOEC	18
7. RÉSULTATS	18
7.1. Observations et mesures des paramètres physico-chimiques	18
7.2. Concentrations algales, biomasse, et taux de croissance	19
7.3. Pourcentages d'inhibition	19
7.4. Concentrations en substance d'essai	20
7.5. Concentrations inhibitrices et NOEC	20
7.6. Critères de Qualité de l'étude	21
8. CONCLUSIONS	22
9. ANNEXES	22
9.1. Annexe 1 : Composition de l'eau de dilution	24
9.2. Annexe 2 : Pourcentages d'inhibition et courbes de croissance	26
9.3. Annexe 3 : Concentrations inhibitrices calculées par la méthode des Probits	28
9.4. Annexe 4 : Bulletin d'analyse de la substance	28
9.5. Annexe 5 : Bulletins d'analyses statistiques	29

Company Sanitized. Does not contain TSCA

1. ASSURANCE QUALITÉ

La présente étude a été réalisée selon les principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE.

Le Service Analyse-Environnement du Centre d'Application de Levallois dispose d'une reconnaissance de conformité aux BPL émise par le Groupement Interministériel des Produits Chimiques (GIPC) en date du 8 mars 1993 et reconduite à la suite d'une inspection réalisée par le Comité Français d'Accréditation, les 9 et 10 Novembre 1998, conformément au décret n°90-206 du 7 mars 1990, pour les domaines de compétences suivants :

- Études écotoxicologiques sur les organismes aquatiques et terrestres.
- Études portant sur le comportement dans l'eau, dans le sol et dans l'air ; bioaccumulation.

L'Auditeur Qualité du Centre d'Application de Levallois procède à des inspections périodiques et à des vérifications en vue :

- d'établir la concordance de l'étude avec les Principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE,
- de s'assurer que les méthodes, les modes opératoires et les observations sont correctement décrits dans le rapport d'étude et que les résultats indiqués reflètent avec exactitude les données écrites de l'étude.

Les dates correspondant à l'audit de cette étude sont données ci-dessous :

16/10/98 - 09/03/98

L'Auditeur Qualité ou son suppléant :

Date

15/11

Signature



Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

Elf Atochem S. A.
Centre d'Application de Levallois

2. SIGNATURES

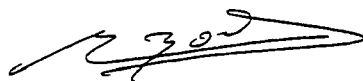
Nous, soussignés, certifions que les informations contenues dans ce rapport concernent uniquement la substance d'essai faisant l'objet de cette étude, et reflètent avec exactitude les résultats obtenus sous notre responsabilité dans le Service Analyse Environnement du Centre d'Application de Levallois.

Le Chef du Service Analyse Environnement : M. BOURALY

Date

Signature

29 / 4 / 99

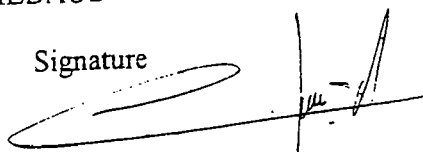


Le Directeur de l'étude : H. THIÉBAUD

Date

Signature

22 / 4 / 99



Company Sanitized. Does not contain TSCA CB

3. IDENTIFICATIONS

3.1. Substance d'essai

Dénomination : [REDACTED]

N° CAS :

N° du lot : [REDACTED]

Date de réception CAL [REDACTED]

N° d'enregistrement : [REDACTED]

Caractéristiques principales :

- apparence : liquide brun
- pureté :
- solubilité : complètement soluble à 20°C

Précaution d'emploi et de conservation : voir FDS.

Une copie du bulletin d'analyse de la substance est présentée en annexe 4.

3.2. Installation d'essais

ELF ATOCHEM
CENTRE D'APPLICATION DE LEVALLOIS (CAL)
SERVICE ANALYSE ENVIRONNEMENT
95 rue Danton
92300 LEVALLOIS-PERRET

Directeur de l'étude :

H. THIÉBAUD

Personnel impliqué dans l'étude :

H. THIÉBAUD

Technicien(s) chargé(s) de la réalisation de l'étude : C. KAË

Rédacteur du rapport d'étude : C. KAË

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

3.3. Demandeur de l'étude

M. DEVAUX (DFO)

Moniteur de l'étude : Mme BUREAU (DSEP)

3.4. Calendrier

- Approbation du plan d'étude par le Moniteur de l'étude : 20/10/98
- Début de l'étude : 18/10/98
- Fin de l'étude : 06/11/98
- Rapport d'étude : 22/04/99

3.5. Archivage

Les substances étudiées sont conservées dans le Service Analyse Environnement pendant une durée de 5 ans au maximum.

L'ensemble des documents de l'étude est conservé au moins 10 ans.

4. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette étude est de déterminer la toxicité chronique (inhibition de la croissance) du [REDACTED] vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* en suivant le mode opératoire décrit dans la norme NF EN 28692.

5. MÉTHODE D'ESSAI

5.1. Introduction

5.1.1. Principe

Les algues vertes unicellulaires sont exposées à la substance d'essai ajoutée à l'eau de dilution, dans une série de concentrations donnée, pendant une période de 72 heures. Les solutions ne sont pas renouvelées pendant l'essai.

Dans des conditions d'essai identiques et pour une gamme de concentrations adéquate, des concentrations différentes en substance d'essai ont des effets différents sur la croissance des algues, c'est à dire sur la multiplication cellulaire. En conséquence, en fin

Ce document est notre propriété. Il ne peut être ni copié, ni communiqué à des tiers sans autorisation expresse d'Elf Atochem.
La reproduction de ce rapport d'étude n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral.
Étude n° 4285/98/A - RC34285.DOC page 10/29

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

d'essai, à chaque concentration correspond un pourcentage d'inhibition de croissance des algues. La concentration en substance à étudier qui provoque une réduction de 50% soit de la croissance (CE_{50b}), soit du taux de croissance (CE_{50r}) est, si possible, déterminée par calcul. La NOEC (No Observed Effect Concentration) ou CSEO (Concentration Sans Effet Observé), qui correspond à la plus forte concentration testée qui ne crée pas d'effet significatif par rapport au témoin, est par ailleurs déterminée par une méthode d'analyse statistique.

L'étude est conduite en deux étapes :

- un essai préliminaire qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif. Cet essai consiste à exposer les algues à une gamme de concentrations généralement comprises entre 0,1 et 100 mg/l.
- un essai définitif, dont seul le résultat est retenu.

Si l'essai préliminaire montre une absence de toxicité sur la gamme de concentrations testées, un essai définitif peut être réalisé à des concentrations supérieures à 100 mg/l si la solubilité de la substance le permet. Ou alors, il peut être réalisé un essai limite à 100 mg/l ou à la limite de solubilité, si celle-ci est inférieure à 100 mg/l.

5.1.2. Références

- Norme NF EN 28692 (Mai 1993).
- Plan Qualité n°7 : «Toxicité chronique vis-à-vis des algues».
- Plan d'étude du : 14/10/98

5.1.3. Déviations

5.2. Matériel et produits

5.2.1. Matériel

L'étude a été réalisée dans une armoire de phytoculture qui permet d'incuber les flacons d'essai dans des conditions précises : la température est programmée à 22°C ; les flacons, disposés sur des plateaux à rotation alternée de 20 rpm, sont uniformément éclairés en passant devant 8 tubes fluorescents. La température relevée en continu dans un flacon d'essai a été comprise entre 21 et 23 °C.

Les paramètres physico-chimiques ont été mesurés au moyen d'un pHmètre Mettler Toledo 345 pour les mesures de pH et d'un oxymètre WTW OXI 538 pour les mesures de l'oxygène dissous.

La détermination de la concentration algale a été réalisée par comptage au microscope optique Zeiss RA34 à l'aide d'un hématimètre (cellule de Malassez) lors de l'essai définitif, et par cytofluorimétrie à l'aide du lecteur de microplaques (Cytofluor 2350) dans le cadre de l'essai préliminaire.

Les récipients pour essai sont des fioles erlenmeyer en verre de 100 ml, bouchées à l'aide de coton cardé emballé dans de la gaze.

5.2.2. Produits et réactifs

- Eau : pour la préparation des solutions mères du milieu d'essai, il est fait usage d'eau ultrapure (ultrafiltration, charbon actif, échange d'ions, filtre 0,22 μm) ; de même, pour la réalisation du milieu d'essai (eau de dilution) les solutions mères sont diluées dans de l'eau ultrapure.

- Réactif biologique : les organismes pour essai sont les algues d'eau douce, vertes et unicellulaires, *Pseudokirchneriella subcapitata* souche CCAP 278/4 (précédemment nommée *Raphidocelis subcapitata* et *Selenastrum capricornutum*) ; la souche utilisée a été obtenue auprès du Culture Center of Algae and Protozoa.

- Réactifs chimiques : les réactifs utilisés pour la préparation de l'eau de dilution (voir annexe 1) sont de qualité "pour analyse".

5.3. Mode opératoire

5.3.1. Culture et préculture des algues

Deux flacons contenant environ 100 ml chacun d'une culture mère axénique sont maintenus en permanence à 23 ± 1 °C sous éclairage photopériodique de 16 heures d'illumination pour 8 heures d'obscurité, et sous aération continue par de l'air filtré à 0,22 μm . Ces cultures mères sont renouvelées chaque semaine par deux nouvelles cultures repiquées à partir des cultures précédentes.

La qualité des cultures mères est vérifiée avant chaque utilisation par un examen microscopique pour vérifier l'absence de microorganismes et de cellules déformées.

4 jours avant le démarrage d'un essai, deux pré-cultures sont réalisées par dilution de chaque culture mère. De façon stérile, 5 ml de culture mère sont dilués dans 500 ml d'eau de dilution stérile. L'incubation est réalisée selon le même protocole que celui décrit ci-

dessus pour les cultures mères. Une seule des 2 pré-cultures sert à ensemercer les fioles d'essai, la seconde est préparée au cas où la première venait à être endommagée.

Le jour de l'essai, environ 50 ml de la pré-culture sont prélevés stérilement et transférés dans un récipient. La concentration cellulaire de cette aliquote est déterminée afin de calculer le volume de pré-culture algale à ajouter à chaque récipient d'essai pour obtenir une concentration algale de 10^4 cellules/ml à T0. La concentration algale de la pré-culture est de $7,83 \cdot 10^6$ cellules/ml pour l'essai préliminaire et de $6,69 \cdot 10^6$ cellules/ml pour l'essai définitif.

5.3.2. Préparation des solutions

Les solutions de [REDACTED] dans l'eau de dilution sont préparées le jour de l'essai.

5.3.3. Essai préliminaire

Des volumes adéquats d'une solution mère de [REDACTED] à 100 mg/l dans l'eau de dilution sont versés dans des fioles jaugées de 100 ml et complétés par de l'eau de dilution pour obtenir la gamme de concentrations nominales allant de 0,1 à 100 mg/l.

Les solutions d'essai préparées sont ensemençées afin d'obtenir une concentration initiale de 10^4 cellules/ml.

Les fioles sont alors bouchées avec du coton cardé emballé dans de la gaze et placées dans l'armoire de phytoculture.

Un récipient témoin (T) contenant l'eau de dilution et l'inoculum algal ainsi qu'un récipient "blanc" (BI) contenant seulement l'eau de dilution sont préparés et incubés dans les mêmes conditions.

Après 24 h, 48h et 72h d'incubation, un volume de 200 μ l est prélevé sous agitation dans chaque récipient d'essai et introduit dans un puits d'une microplaque en quartz qui est conservée à l'obscurité avant de mesurer la fluorescence. Cette mesure est réalisée à l'aide du cytofluorimètre et, par comparaison à une gamme d'étalonnage, la concentration algale est déterminée en fonction de la fluorescence mesurée. La concentration mesurée est utilisée pour le calcul des pourcentages d'inhibition.

Le pH et l' O_2 dissous sont mesurés à la plus forte concentration et dans le témoin, en début d'essai dans la fraction non utilisée de la solution d'essai ensemençée, et en fin d'essai dans le flacon d'essai ensemençé.

Les résultats obtenus servent à définir la gamme de concentrations de l'essai définitif.

5.3.4. Essai définitif

Des volumes adéquats d'une solution mère de [REDACTED] à 100 mg/l dans l'eau de dilution sont versés dans des fioles jaugées de 200 ml et complétés par de l'eau de dilution pour obtenir la gamme de concentrations nominales allant de 0,9 à 100 mg/l.

Les concentrations sont choisies de manière à former une progression géométrique avec un rapport de 2,2.

La préparation des solutions d'essai est réalisée comme décrit pour l'essai préliminaire. 3 répliques sont préparées par concentration testée et pour le témoin.

Les solutions d'essai préparées sontensemencées afin d'obtenir une concentration initiale de 10^4 cellules/ml.

Les flacons sont alors bouchés avec du coton cardé emballé dans de la gaze et placés dans l'armoire de phytoculture.

3 récipients témoins (T) contenant l'eau de dilution et l'inoculum algal ainsi que 3 récipients "blanc" (Bl) contenant seulement l'eau de dilution sont préparés et incubés dans les mêmes conditions.

Après 24 h, 48h et 72h d'incubation, un volume suffisant et inférieur à 1 ml, est prélevé sous agitation dans chaque récipient d'essai et introduit dans un tube à hémolyse. Après chaque prélèvement, les flacons d'essai sont repositionnés dans l'armoire de phytoculture. Les tubes à hémolyse sont conservés à l'obscurité. Au moment du comptage, les tubes sont agités manuellement, et une fraction de la solution est prélevée afin de déterminer la concentration algale dans chaque récipient d'essai. La concentration mesurée est utilisée pour le calcul des pourcentages d'inhibition et la détermination des courbes de croissances.

Le pH et l' O_2 dissous sont mesurés à toutes les concentrations en début d'essai et en fin d'essai.

5.3.5. Contrôle de sensibilité du réactif biologique

La sensibilité du réactif biologique est contrôlée environ tous les 2 mois en réalisant un essai de toxicité avec le dichromate de potassium. La CE_{50r} - 72h et la CE_{50b} - 72h du dichromate de potassium sont déterminées. À titre indicatif, les résultats du dernier essai, réalisé le 09/10/98, ont abouti à une CE_{50r} - 72h de 0,98 mg/l et une CE_{50b} - 72h de 0,33 mg/l.

6. MODE DE CALCUL

6.1. Calcul des pourcentages d'inhibition

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés en suivant deux modes, l'un utilisant les valeurs de la biomasse intégrale, le second les valeurs des taux de croissance.

Biomasse intégrale

La surface comprise entre la courbe de croissance et la ligne horizontale, ou aire sous la courbe, est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$A = \frac{N_1 - N_n}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

avec :

- A, l'aire sous la courbe ;
- N_0 , la concentration algale (cell/ml) au début de l'essai ;
- N_1 , la concentration algale (cell/ml) au temps t_1 (t_1),
- N_n , la concentration algale (cell/ml) en fin d'essai (t_n) ;
- t_1 , le temps (heures) écoulé entre le début de l'essai et le premier jour de mesurage ;
- t_n , le temps (heures) écoulé entre le début de l'essai et le dernier jour d'essai.

Les valeurs de A sont calculées pour chaque réplique des différentes solutions d'essai et du témoin. Le pourcentage moyen d'inhibition de la croissance de la biomasse I_{Ai} est ensuite calculé pour chaque concentration d'essai à l'aide de la formule suivante :

$$I_{Ai} = \frac{\overline{A_c} - \overline{A_i}}{\overline{A_c}} \times 100$$

avec :

- $\overline{A_c}$, l'aire moyenne sous la courbe de croissance du témoin ;
- $\overline{A_i}$, l'aire moyenne sous la courbe de croissance à la concentration d'essai i.

Ces valeurs $\overline{A_c}$ et $\overline{A_i}$ sont calculées en moyennant les valeurs des aires sous la courbe des répliques pour chaque concentration d'essai.

Les concentrations efficaces (inhibitrices) pour x % de la population sont notées CE_{xb} lorsque les calculs sont réalisés à partir des pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de la biomasse (I_{Ai}).

6.4. Calcul des concentrations inhibitrices

La relation existante entre l'expression de la toxicité (ici l'inhibition de croissance algale) et la concentration de la substance ne suit pas un modèle linéaire. Par conséquent, la méthode de linéarisation qui a été employée pour déterminer les concentrations inhibitrices (concentrations efficaces) est la relation Probit/log.

6.5. Détermination des NOEC

La NOEC (No Observed Effect Concentration), ou concentration sans effet observable (CSEO), a été déterminée par analyse statistique en appliquant la méthode de Dunnett à l'aide de la version 1.5 du programme établi par l'US EPA. Deux valeurs de NOEC ont été déterminées :

- La $NOEC_b$, calculée par comparaison statistique des valeurs des aires sous la courbe de croissance (A) des répliques de chaque concentration avec le témoin ;
- La $NOEC_r$, calculée par comparaison statistique des valeurs des taux de croissance (μ) des répliques de chaque concentration avec le témoin.

7. RÉSULTATS

7.1. Observations et mesures des paramètres physico-chimiques

Les observations visuelles ont permis de vérifier l'aspect des solutions en début et en fin d'essai : les solutions d'essai ont été claires, non colorées et homogènes au cours de l'essai. Aucune précipitation n'a été observée en fin d'essai.

Les observations microscopiques ont montré que l'aspect des algues en fin d'essai était normal par comparaison aux observations réalisées dans la solution témoin : algues unicellulaires en forme de croissant de lune de taille moyenne 5-10 μm .

Le pH et la teneur en oxygène dissous ont été mesurés dans les solutions d'essai en début et en fin d'essai :

Echantillon Référence	Concentration nominale (mg/l)	pH		O ₂ dissous (mg/l)	
		T0	T72h	T0	T72h
T	0	8.05	7.53	8.0	8.6
g	0.9	7.82	7.35	7.8	8.5
f	1.9	7.86	7.37	8.3	8.5
e	4.3	7.88	7.42	8.1	8.2
d	9.4	7.82	7.30	8.0	8.2
c	20.7	7.75	7.35	8.2	8.2
b	45.5	7.80	7.35	8.0	8.2
a	100	7.88	7.39	8.0	8.0

7.2. Concentrations algales, biomasse, et taux de croissance

L'annexe 2 présente les concentrations cellulaires de chaque réplique et leur moyenne mesurées au moment de l'essai définitif à 0, 24, 48 et 72 heures. Les valeurs moyennes calculées des aires sous la courbe (A) et des taux de croissance (μ) sont présentées dans cette annexe et résumées dans le tableau ci-dessous :

Echantillon Référence	Concentration nominale (mg/l)	Concentration algale moyenne (cellules/ml)				A	μ
		T0	T24h	T48h	T72h		
T	0	1.00E+04	1.40E+04	7.57E+04	7.10E+05	1.01E+07	0.0592
g	0.9	1.00E+04	1.00E+04	7.67E+04	7.57E+05	1.06E+07	0.0601
f	1.9	1.00E+04	1.20E+04	7.13E+04	7.35E+05	1.02E+07	0.0597
e	4.3	1.00E+04	7.00E+03	5.23E+04	3.46E+05	4.98E+06	0.0492
d	9.4	1.00E+04	1.13E+04	5.13E+04	3.20E+05	4.74E+06	0.0481
c	20.7	1.00E+04	9.00E+03	4.30E+04	6.60E+04	1.44E+06	0.0262
b	45.5	1.00E+04	1.33E+04	2.93E+04	2.67E+04	7.44E+05	0.0136
a	100	1.00E+04	7.00E+03	2.37E+04	2.37E+04	4.20E+05	0.0120

L'annexe 2 présente par ailleurs les moyennes des rapports de densité (R) et des facteurs de croissance (k) pour chaque concentration d'essai et pour le témoin. La valeur du rapport moyen de densité dans le témoin est de 71 ce qui est supérieur à la valeur minimale de 16 (cf. critères de validité).

Les courbes de croissance moyenne à chaque concentration et pour le témoin figurent dans l'annexe 2. Dans la série témoin, la cinétique présente bien une phase initiale de latence au début de l'essai suivie d'une phase exponentielle de croissance.

7.3. Pourcentages d'inhibition

Les pourcentages moyens d'inhibition calculés à partir de la biomasse intégrale (IAi) et des taux de croissance (I_μi) sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Echantillon Référence	Concentration nominale (mg/l)	IAi (%)	I _μ i (%)
T	0	0.00	0.00
g	0.9	-4.85	-1.49
f	1.9	-1.47	-0.81
e	4.3	50.60	16.86
d	9.4	52.94	18.72
c	20.7	85.70	55.73
b	45.5	92.61	76.99
a	100	95.83	79.79

7.4. Concentrations en substance d'essai

L'étude est réalisée sans analyse des solutions d'essai. La substance d'essai étant une préparation constituée de plusieurs composants solubles dans l'eau, la méthode NF EN ISO 28692 est appliquée plutôt que la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE. Cette méthode permet de réaliser l'étude sans analyse des solutions d'essai, en exprimant les résultats sur la base des concentrations nominales.

Les concentrations nominales sont utilisées pour les calculs des concentrations inhibitrices.

7.5. Concentrations inhibitrices et NOEC

Les calculs des concentrations inhibitrices (concentrations efficaces) sont présentés en annexe 3. Le bulletin d'analyse statistique pour la détermination des NOEC est présenté en annexe 5. Les valeurs de CE_{50} , CE_{10} , et NOEC, sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Concentration nominale inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	valeur	IC à 95 %
Biomasse intégrale		
$CE_{50b-72h}$	9.6	3 - 22
$CE_{10b-72h}$	2.4	0,18 - 6
$NOEC_b$	1.9	-
Taux de croissance		
$CE_{50r-72h}$	23	14 - 45
$CE_{10r-72h}$	4,6	1,9 - 8
$NOEC_r$	9.4	-

IC : intervalle de confiance
ND : non déterminé

7.6. Critères de Qualité de l'étude

7.6.1. Rapport de densité

Le rapport de densité R de la solutions témoin est supérieur à 16 en 72h ($R = 71$).

7.6.2. Variation de pH

Le pH des solutions témoins n'a pas varié de plus de 1,5 unités pendant l'essai.

8. CONCLUSIONS

L'étude de la toxicité chronique (inhibition de la croissance) du [REDACTED] vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* a permis de déterminer les concentrations inhibitrices et les concentrations sans effets observables présentées dans le tableau suivant :

Concentration nominale inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	valeur	IC à 95 %
Biomasse intégrale		
CE _{50b} -72h	9,6	3 - 22
CE _{10b} -72h	2,4	0,18 - 6
NOEC _b	1,9	-
Taux de croissance		
CE _{50r} -72h	23	14 - 45
CE _{10r} -72h	4,6	1,9 - 8
NOEC _r	9,4	-

IC : intervalle de confiance

ND : non déterminé

Les critères de validité de l'étude ont été respectés.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

9. ANNEXES

9.1. Annexe 1 : Composition de l'eau de dilution

Quatre solutions mères sont préparées par dilution dans l'eau ultra-pure des éléments décrits dans les tableaux suivants (cf paragraphe 4.3 de la norme NF EN 28692) :

Substance	Concentration dans la solution mère	Concentration finale
Solution mère 1 : macro-nutriments		
NH_4Cl	1.5 g/l	15 mg/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.2 g/l	12 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.8 g/l	18 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 g/l	15 mg/l
KH_2PO_4	0.16 g/l	1,6 mg/l
Solution mère 2 : Fe - EDTA		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/l	0.08 mg/l
$(\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O})$	100 mg/l	0.1 mg/l
Solution mère 3 : oligo-éléments		
H_3BO_3	185 mg/l	0.185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	0.415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l	3×10^{-3} mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/l	1.5×10^{-3} mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 mg/l	10^{-5} mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	7×10^{-3} mg/l
Solution mère 4 : NaHCO_3		
NaHCO_3	50 g/l	50 mg/l

Company Sanitized. Does not contain FSCA CBI

Les solutions mères sont préparées par dilution des substances (pesées avec une précision indiquée par le nombre de décimale dans le tableau ci-dessus) dans de l'eau ultra-pure préalablement stérilisée à l'autoclave. Elles sont ensuite stérilisées par autoclavage (solutions 1, 2 et 3) ou par filtration (solution 4) sur membrane (diamètre de pores de $0,22 \mu\text{m}$) et stockées à l'obscurité à 4°C .

Pour préparer 0,5, 1, 2 ou 5 litres d'eau de dilution à partir des solutions précédemment décrites, verser les volumes spécifiés dans le tableau ci-dessous dans environ 0,4, 0,8, 1,5 ou 4 litres d'eau ultra-pure. Ajuster à 0,5, 1, 2 ou 5 litres avec de l'eau ultra-pure et homogénéiser. Cette opération est réalisée en ambiance stérile autour d'un bec Bunsen et avec des pipettes stériles jetables.

Eau de dilution (0,5, 1, 2 ou 5 litres)				
	Volume à diluer (ml)			
Solution n° 1	5	10	20	50
Solution n° 2	0,5	1	2	5
Solution n° 3	0,5	1	2	5
Solution n° 4	0,5	1	2	5
Eau ultra-pure (QSP)	0,5 litre	1 litre	2 litres	5 litres

Après équilibrage avec l'air, le pH de l'eau de dilution est d'environ 8. Cette eau de dilution ne peut être conservée que quelques jours à $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et à l'obscurité.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB1

9.2. Annexe 2 : Pourcentages d'inhibition et courbes de croissance

Essai de toxicité vis-à-vis des algues Feuille de calcul des pourcentages d'inhibition et courbes de croissance

Echantillon : Nom : XXXXXXXXXX
Réf. CAL : XXXXXXXXXX

Date : 03-nov-98

N° d'étude : XXXXXXXXXX Initiales Technicien : CKE

Echantillon Référence	Réplicat N°	Concentration algale (Cell./ml)				A	μ
		T0	T24h	T48h	T72h		
T	1	1,0E+04	1,90E+04	8,30E+04	6,65E+05	9,83E+06	0,0583
T	2	1,0E+04	1,70E+04	8,10E+04	7,55E+05	1,08E+07	0,0601
T	3	1,0E+04	6,00E+03	6,30E+04	7,10E+05	9,58E+06	0,0592
T	moy.	1,00E+04	1,40E+04	7,57E+04	7,10E+05	1,01E+07	0,0592
g	1	1,0E+04	1,30E+04	7,70E+04	7,15E+05	1,01E+07	0,0593
g	2	1,0E+04	1,10E+04	9,90E+04	9,40E+05	1,33E+07	0,0631
g	3	1,0E+04	6,00E+03	5,40E+04	6,15E+05	8,22E+06	0,0572
g	moy.	1,00E+04	1,00E+04	7,67E+04	7,57E+05	1,06E+07	0,0601
f	1	1,0E+04	1,60E+04	7,50E+04	9,60E+05	1,31E+07	0,0634
f	2	1,0E+04	9,00E+03	4,80E+04	4,40E+05	6,05E+06	0,0526
f	3	1,0E+04	1,10E+04	9,10E+04	8,05E+05	1,15E+07	0,0609
f	moy.	1,00E+04	1,20E+04	7,13E+04	7,35E+05	1,02E+07	0,0597
e	1	1,0E+04	7,00E+03	4,70E+04	4,70E+05	6,34E+06	0,0535
e	2	1,0E+04	5,00E+03	8,20E+04	4,60E+05	7,01E+06	0,0532
e	3	1,0E+04	9,00E+03	2,80E+04	1,08E+05	1,58E+06	0,0330
e	moy.	1,00E+04	7,00E+03	5,23E+04	3,46E+05	4,98E+06	0,0492
d	1	1,0E+04	9,00E+03	5,10E+04	3,35E+05	4,86E+06	0,0488
d	2	1,0E+04	1,50E+04	5,50E+04	4,90E+05	6,96E+06	0,0541
d	3	1,0E+04	1,00E+04	4,80E+04	1,34E+05	2,40E+06	0,0360
d	moy.	1,00E+04	1,13E+04	5,13E+04	3,20E+05	4,74E+06	0,0481
c	1	1,0E+04	8,00E+03	3,30E+04	9,30E+04	1,50E+06	0,0310
c	2	1,0E+04	9,00E+03	4,10E+04	4,50E+04	1,14E+06	0,0209
c	3	1,0E+04	1,00E+04	5,50E+04	6,00E+04	1,58E+06	0,0249
c	moy.	1,00E+04	9,00E+03	4,30E+04	6,60E+04	1,44E+06	0,0262
b	1	1,0E+04	1,70E+04	3,40E+04	2,10E+04	8,76E+05	0,0103
b	2	1,0E+04	1,20E+04	1,80E+04	2,40E+04	4,08E+05	0,0122
b	3	1,0E+04	1,10E+04	3,60E+04	3,50E+04	9,48E+05	0,0174
b	moy.	1,00E+04	1,33E+04	2,93E+04	2,67E+04	7,44E+05	0,0136
a	1	1,0E+04	9,00E+03	2,00E+04	2,20E+04	3,60E+05	0,0110
a	2	1,0E+04	5,00E+03	2,00E+04	2,20E+04	2,64E+05	0,0110
a	3	1,0E+04	7,00E+03	3,10E+04	2,70E+04	6,36E+05	0,0138
a	moy.	1,00E+04	7,00E+03	2,37E+04	2,37E+04	4,20E+05	0,0120
	1					#N/A	#N/A
	2					#N/A	#N/A
	3					#N/A	#N/A
	moy.	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	1					#N/A	#N/A
	2					#N/A	#N/A
	3					#N/A	#N/A
	moy.	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Essai de toxicité vis-à-vis des algues

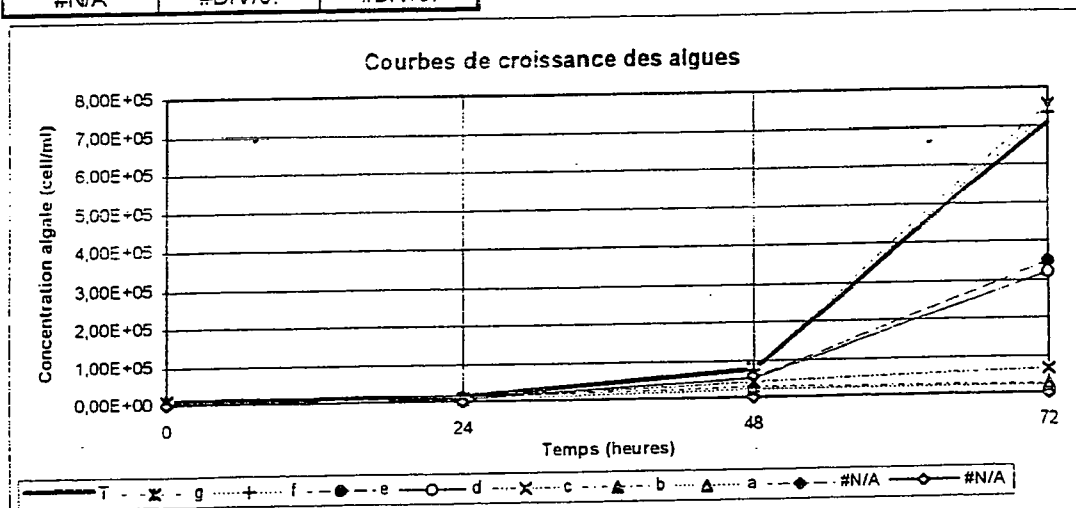
Feuille de calcul des pourcentages d'inhibition et courbes de croissance

Echantillon : Nom : XXXXXXXXXX Date : 03-nov-98
 Réf. CAL : XXXXXXXXXX
 N° d'étude : XXXXXXXXXX Initiales Technicien : CKE

Echantillon Référence	Concentration algale moyenne (Cell./ml)				Rapport (R) densités	Facteur k (J-1)
	0	24	48	72		
T	1,00E+04	1,40E+04	7,57E+04	7,10E+05	71	1,421
g	1,00E+04	1,00E+04	7,67E+04	7,57E+05	76	1,442
f	1,00E+04	1,20E+04	7,13E+04	7,35E+05	74	1,432
e	1,00E+04	7,00E+03	5,23E+04	3,46E+05	35	1,181
d	1,00E+04	1,13E+04	5,13E+04	3,20E+05	32	1,155
c	1,00E+04	9,00E+03	4,30E+04	6,60E+04	7	0,629
b	1,00E+04	1,33E+04	2,93E+04	2,67E+04	3	0,327
a	1,00E+04	7,00E+03	2,37E+04	2,37E+04	2	0,287
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Pourcentages moyens d'inhibition		
Echantillon Référence	Biomasse intégrale IAi (%)	Taux de croissance Ipi (%)
T	0,00	0,00
g	-4,85	-1,49
f	-1,47	-0,81
e	50,60	16,86
d	52,94	18,72
c	85,70	55,73
b	92,61	76,99
a	95,83	79,79
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!

Validité de l'essai
(Condition : R témoin > 16)
OUI



9.3. Annexe 3 : Concentrations inhibitrices calculées par la méthode des Probits

TOXICITÉ CHRONIQUE VIS-À-VIS DES ALGUES
Feuille de calcul des concentrations inhibitrices par la méthode des Probits

Substance étudiée :

Nom :

Réf. CAL :

Date : 06/11/98

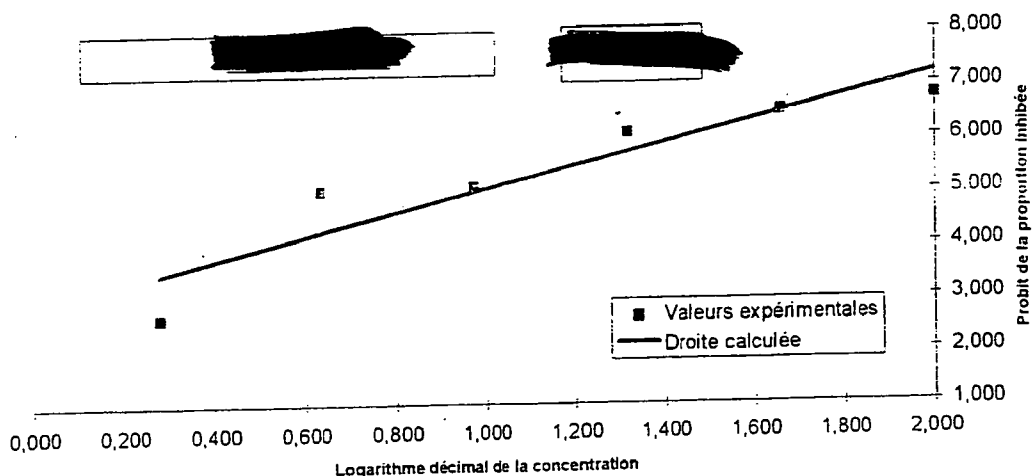
Numéro d'étude :

Initiales Technicien :

CKE

Méthode par mesure de la biomasse intégrale								
Données utilisées pour le calcul					Conc. Inhibitrices (CE _{xb}) mg/l			
Concentration nominale mg/l	inhibition (I _{ai})		PROBIT y	log conc. x	X (%)	CE _{xb} inf.	CE _{xb}	CE _{xb} sup.
	(%)	corrigée (%)						
100	95,8	96	6,750	2,000	5	0,077	1,6	4,5
45,5	92,6	93	6,480	1,658	10	0,18	2,4	6
20,7	85,7	86	6,080	1,316	15	0,32	3,1	7,4
9,4	52,9	53	5,080	0,973	20	0,5	3,9	8,8
4,3	50,6	51	5,030	0,633	25	0,74	4,7	10
1,9	-1,5	1	2,670	0,279	30	1	5,5	12
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	35	1,4	6,3	14
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	40	1,8	7,3	16
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	45	2,3	8,3	18
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	50	3	9,6	22
nb valeurs 6		Somme	32,090	6,859	55	3,8	11	26
		Moyenne	5,348	1,143	60	4,6	13	31
				r ² = 0,855	65	5,8	15	38
					70	7,1	17	47
					75	8,7	20	62
					80	11	24	86
					85	14	29	130
					90	17	38	220
					95	24	56	490

Probit de la proportion inhibée en fonction du logarithme décimal de la concentration -
Méthode par mesure de la biomasse intégrale -

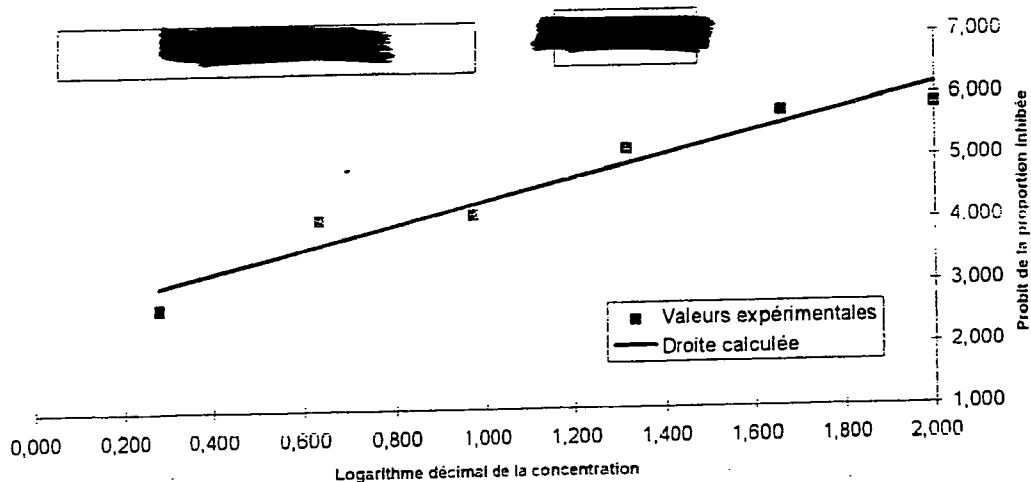


TOXICITÉ CHRONIQUE VIS-À-VIS DES ALGUES
Feuille de calcul des concentrations inhibitrices par la méthode des Probits

Substance étudiée : Nom [REDACTED] Date : 06/11/98
Réf. CAL [REDACTED]
Numéro d'étude : [REDACTED] Initiales Technicien : CKE

Méthode par mesure du taux de croissance								
Données utilisées pour le calcul					Conc. Inhibitrices (CE _{xr}) mg/l			
Concentration nominale mg/l	Inhibition (I _{pi})		PROBIT y	log conc. x	X (%)	CE _{xr} inf.	CE _{xr}	CE _{xr} sup.
	(%)	corrigée (%)						
100	79,8	80	5,840	2,000	5	0,96	2,9	5,4
45,5	77,0	77	5,740	1,658	10	1,9	4,6	8
20,7	55,7	56	5,150	1,316	15	2,9	6,2	10
9,4	18,7	19	4,120	0,973	20	4,1	8	13
4,3	16,9	17	4,050	0,633	25	5,4	10	17
1,9	-0,8	1	2,670	0,279	30	6,8	12	20
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	35	8,3	14	24
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	40	10	17	30
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	45	12	20	37
nb valeurs 6		Somme	27,570	6,859	50	14	23	45
		Moyenne	4,595	1,143	55	16	27	56
r ² = 0,933					60	19	32	69
					65	22	38	89
					70	26	45	110
					75	30	54	150
					80	36	67	200
					85	44	86	300
					90	56	120	480
					95	80	180	960

Probit de la proportion inhibée en fonction du logarithme décimal de la concentration -
Méthode par mesure du taux de croissance -



EIR Atochem S. A.
Centre d'Application de Levallois

9.4. Annexe 4 : Bulletin d'analyse de la substance

Cette annexe est constituée d'un feuillet non paginé à la suite de la présente page.

elf atochem

ATO

Établissement Villers et Paul
LABORATOIRE CONTRÔLE / QUALITÉ
LCU PG 601 - ENR 139
REV : 2 05-déc-97

Demande d'analyses n° 1420

Destinataires : M. DELAUNAY
M. DELLECASE
M. GRUPPO

Conforme

Bulletin d'analyses produit fini

Date : 29-mai-98

N° LOT

Caractéristiques	Unités	Spécifications	Résultats	Méthode de contrôle
Extrait 690	%	27-29	28.5.	LCU 622
pH		8-9	8.5	LCU 642
Mesure de la densité		1.06-1.09	1.081	LCU 662
Ethanol	%	≤ 2.5	1.7	LCU 604
Foisonnement à 0.5% ds eau de ville		≥ 6	7.5	LCU 670
Drainage 25 à 0.5% ds eau de ville	mn	≥ 3	7mn 25s	LCU 670
Tension superficielle	mN/m	≤ 16.5	15.9	LCU 663
Pouvoir Filmogène				LCU 663
Sur Heptane : 3% ds eau de ville	Seconde	≤ 40	16	

Observations :

L'analyste		Le Responsable Laboratoire	
Date : 02-jun-98	Visa	Date : 02-jun-98	Visa

Page 1 sur 1

Elf Atochem S. A.
Centre d'Application de Levallois

9.5. Annexe 5 : Bulletins d'analyses statistiques

Cette annexe est constituée de 2 feuillets non paginés à la suite de la présente page.

Taux de croissance. definitif.

Summary Statistics and ANOVA

Transformation =

None

Conc.	n	Mean	s.d.	cv%
= control	3	.0592	.0009	1.5
0.3 2	3	.0599	.0030	5.0
1.3 3	3	.0590	.0057	9.6
4.3 4	3	.0466	.0118	25.2
9.4 5	3	.0463	.0093	20.1
29.7 6*	3	.0256	.0051	19.9
45.5 7*	3	.0133	.0037	27.6
100 8*	3	.0119	.0016	13.5

) the mean for this conc. is significantly less than
the control mean at alpha = 0.05 (1-sided) by Dunnett's test

Minimum detectable difference for Dunnett's test = -.012977
this difference corresponds to -21.92 percent of control

Sum of squares between concentrations = .008740 with 7 degrees of freedom.
Error mean square = .000039 with 16 degrees of freedom.
Bartlett's test p-value for equality of variances = .072

Company Sealed. Does not contain TSCA CB

Biomasse integrale. definitif.

Summary Statistics and ANOVA

Transformation = None

Conc.	n	Mean	s.d.	cv%
1 = control	3	10070.0000	644.4377	6.4
0.9 2	3	10540.0000	2568.4236	24.4
1.8 3	3	10216.6667	3696.0565	36.2
4.3 4*	3	4976.6667	2960.6137	59.5
9.4 5*	3	4740.0000	2282.3672	48.2
20.7 6*	3	1440.0000	274.9545	19.1
45.5 7*	3	744.0000	293.2030	39.4
100 8*	3	420.0000	193.1217	46.0

*) the mean for this conc. is significantly less than
the control mean at alpha = 0.05 (1-sided) by Dunnett's test

Minimum detectable difference for Dunnett's test = -4362.417691
This difference corresponds to -43.32 percent of control

Between concentrations
Sum of squares = 402610734.500000 with 7 degrees of freedom.

Error mean square = 4355778.833333 with 16 degrees of freedom.

Bartlett's test p-value for equality of variances = .003

```
*****
*
* Warning - the test for equality of variances *
* is significant (p less than 0.01). The      *
* results of this analysis should be inter-  *
* preted with caution.                       *
*                                              *
*****
```