

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| Study Sponsor:          | ELF ATOCHEM S.A. |
| Issue Date:             | 10-Nov-95        |
| Document Reference No.: | 95/SAE6/1205/HT  |

|                                             |
|---------------------------------------------|
| [REDACTED]                                  |
| Acute Toxicity to Daphnia                   |
| Author(s): H. Thiebaud<br>Coll. P. Brochier |

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

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## TECHNICAL SUMMARY

Determination of acute toxicity (inhibition of mobility) of *Daphnia magna* by [REDACTED] over 24 and 48 hours was effected using the operating procedure described in standard ISO 6341 applicable to chemical substances, industrial and urban effluents, to surface and subterranean waters. This method differs from method C.2 in appendix II of the European directive 92/69/EEC since it does not require that the nominal concentrations of the substance be verified by analysis.

The method consists in exposing the daphnias to a range of concentrations of the substance being studied. The toxic effect observed is the immobilization at the end of 24 and 48 hours. From the dose/effect relation established with the initial concentrations, a median effective  $CE(I)_{50}$  is calculated, expressed as  $CE(I)_{50} - 24$  h and  $CE(I)_{50} - 48$  h.

Under the study conditions [REDACTED] presents a  $CE(I)_{50} - 24$  h which is above the highest concentration tested (200 mg/l) and  $CE(I)_{50} - 48$  h of 100 mg/l with a confidence interval at 95 % = 95 mg/l to 110 mg/l.

### 2. SIGNATURE

Director of the study : H. THIEBAUD

Date Signature

12/11/95

Technician who carried out the study : P. BROCHIER

Date Signature

16/11/95

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

# Elf Atochem S.A.

DCRD

Centre d'Application de Levallois  
Service Analyse Environnement

Levallois, le 10/11/95

Référence : 95/SAE6/1205/HT  
Séquentiel : 814020

## RAPPORT D'ETUDE

TITRE : [REDACTED] TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS  
DES DAPHNIES

AUTEUR(S) : H. THIÉBAUD ; Coll. P. BROCHIER

### RESUME DOCUMENTAIRE :

Détermination de la toxicité aiguë (inhibition de la mobilité) de *Daphnia magna* par le [REDACTED] sur 24 et 48 heures, en suivant le mode opératoire décrit dans la norme ISO 6341 (seconde édition, 1989).

### MOTS CLES :

[REDACTED] Toxicité aiguë daphnies, ISO 6341.

DESTINATAIRES : M. DEVAUX (DCFS)  
DOC FICHIER TECH (M. TAISNE)

Copies : Chef de Service, Responsable des Archives,  
Secrétariat,  
Service Écotoxicité et Sûreté des Produits (DSE-P)

20 NOV. 1995

D.E.S.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBP

**RESUME TECHNIQUE**

La détermination de la toxicité aiguë (inhibition de la mobilité) de *Daphnia magna* par le [REDACTED] sur 24 et 48 heures a été réalisée en suivant le mode opératoire décrit dans la norme ISO 6341 applicable aux substances chimiques, aux effluents industriels et urbains, aux eaux de surfaces et souterraines. Cette méthode diffère de la méthode C.2 de l'annexe II à la directive européenne 92/69/CEE car elle ne nécessite pas que les concentrations nominales en substance soient vérifiées par analyse

La méthode consiste à exposer les daphnies à une gamme de concentrations de la substance étudiée. L'effet toxique observé est l'immobilisation au bout de 24 heures et 48 heures. A partir de la relation dose/effet établie avec les concentrations initiales, on déduit une concentration médiane effective  $CE(I)_{50}$ , exprimée en  $CE(I)_{50} - 24 \text{ h}$  et  $CE(I)_{50} - 48 \text{ h}$ .

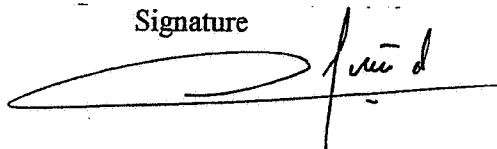
Dans les conditions de l'étude, le [REDACTED] présente une  $CE(I)_{50} - 24 \text{ h}$  supérieure à la plus forte concentration testée (200 mg/l) et une  $CE(I)_{50} - 48 \text{ h}$  de 100 mg/l avec un intervalle de confiance à 95 % de 95 mg/l à 110 mg/l.

Le Directeur de l'étude : H. THIÉBAUD

Date

12/11/95

Signature

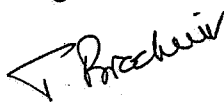


La Technicienne chargée de l'étude : P. BROCHIER

Date

le 16/11/95

Signature



Company Sanitized. Does not contain TSCA CB1

|                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p style="text-align: center;"><b>RAPPORT D'ÉTUDE</b><br/> <b>TOXICITÉ AIGÜE VIS-À-VIS DES DAPHNIES.</b></p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### SOMMAIRE

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. IDENTIFICATIONS                                                            | 4  |
| 1.1. Substance d'essai                                                        | 4  |
| 1.2. Laboratoire d'essai                                                      | 4  |
| 1.3. Demandeur de l'étude                                                     | 5  |
| 1.4. Calendrier                                                               | 5  |
| 2. OBJECTIF DE L'ÉTUDE                                                        | 5  |
| 3. MÉTHODE D'ESSAI                                                            | 5  |
| 3.1. Introduction                                                             | 5  |
| 3.1.1. Principe                                                               | 5  |
| 3.1.2. Références                                                             | 6  |
| 3.1.3. Déviations                                                             | 6  |
| 3.2. Matériel et produits                                                     | 6  |
| 3.2.1. Matériel                                                               | 6  |
| 3.2.2. Produits et réactifs                                                   | 6  |
| 3.3. Mode opératoire                                                          | 7  |
| 3.3.1. Préparation des solutions                                              | 7  |
| 3.3.2. Essai préliminaire                                                     | 7  |
| 3.3.3. Méthode d'analyse                                                      | 7  |
| 3.3.4. Essai définitif                                                        | 7  |
| 3.3.5. Contrôle de sensibilité du réactif biologique                          | 7  |
| 4. RÉSULTATS                                                                  | 7  |
| 4.1. Essai définitif                                                          | 7  |
| 4.2. Critères de Validité de l'étude                                          | 8  |
| 4.2.1. Teneur en oxygène                                                      | 8  |
| 4.2.2. Immobilisation des témoins                                             | 8  |
| 4.2.3. Sensibilité du réactif biologique                                      | 8  |
| 5. CONCLUSIONS                                                                | 9  |
| 6. ANNEXES                                                                    | 10 |
| 6.1. Annexe 1 : Milieu d'essai.                                               | 10 |
| 6.2. Annexe 2 : Concentrations utilisées et résultats des calculs à 24 heures | 11 |
| 6.3. Annexe 3 : Concentrations utilisées et résultats des calculs à 48 heures | 12 |

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## 1. IDENTIFICATIONS

### 1.1. SUBSTANCE D'ESSAI

Dénomination [REDACTED]

N° d'enregistrement [REDACTED]

Caractéristiques principales :

- apparence : liquide brun
- solubilité dans l'eau : totalement soluble

Précaution d'emploi et de conservation : voir la FDS

### 1.2. LABORATOIRE D'ESSAI

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

Directeur d'étude

M. THIÉBAUD

Personnel impliqué dans l'étude

Ingénieur : M. THIÉBAUD

Technicienne : Mlle BROCHIER

**Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI**

### 1.3. DEMANDEUR DE L'ETUDE

M. DEVAUX (DCFS)

### 1.4. CALENDRIER

|                  |          |
|------------------|----------|
| Début de l'étude | 2/10/95  |
| Fin de l'étude   | 11/10/95 |
| Rapport d'étude  | 10/11/95 |

### 2. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette étude est de déterminer la toxicité aiguë (inhibition de la mobilité) vis-à-vis des daphnies du [REDACTED] en suivant le mode opératoire décrit dans la norme ISO 6341 (seconde édition, 1989). Cette norme s'applique aux substances chimiques, aux effluents industriels et urbains, aux eaux de surfaces et souterraines.

### 3. MÉTHODE D'ESSAI

#### 3.1. INTRODUCTION

##### 3.1.1. PRINCIPE

Les daphnies sont exposées à la substance d'essai ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations donnée, pendant une période de 24 heures et éventuellement 48 heures, sans renouvellement des concentrations d'essai.

Dans des conditions identiques et pour une gamme de concentrations adéquate (définie au moyen d'un essai préliminaire), des concentrations différentes en substance d'essai ont des effets différents sur la capacité de nage des daphnies. En conséquence, en fin d'essai, à chaque concentration correspond un pourcentage différent d'immobilisation des daphnies. Les concentrations initiales provoquant 0 et 100 % d'immobilisation sont déterminées directement par l'observation. La concentration initiale efficace inhibitrice immobilisant en 24 heures 50 % des daphnies mises en expérimentation, désignée  $CE(I)_{50} - 24 \text{ h}$ , est déterminée par calcul. La  $CE(I)_{50} - 48 \text{ h}$  est éventuellement déterminée par la même méthode.

L'étude est conduite en deux étapes :

- un essai préliminaire qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif.
- un essai définitif dont seul le résultat est retenu :  $CE(I)_{50} - 24 \text{ h}$  et éventuellement  $CE(I)_{50} - 48 \text{ h}$ .

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

On constate au cours de l'essai préliminaire, que seule la concentration 100 mg/l montre une toxicité pour les daphnies significative après 48 heures. Un essai définitif est réalisé dans la gamme de concentration : 53,9 à 200 mg/l.

[REDACTED] étant un mélange de plusieurs substances pouvant évoluer différemment, les résultats sont exprimés par rapport aux concentrations nominales (mg/l) de la préparation, considérées équivalentes aux concentrations initiales.

Les pourcentages d'immobilisation en fonction des concentrations initiales, à 24 et éventuellement 48 heures, sont utilisés pour calculer, à l'aide d'un programme informatique approprié, la  $CE(I)_{50}$  (à 24 heures et éventuellement 48 heures). Les intervalles de confiance à 95 % sont, si possible, déterminés par le calcul.

### 3.1.2. REFERENCES

- Norme Internationale ISO 6341, «Qualité des eaux - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)», seconde édition du 01/10/89.

### 3.1.3. DEVIATIONS

## 3.2. MATERIEL ET PRODUITS

### 3.2.1. MATERIEL

L'étude a été réalisée dans une salle thermostatée à une température comprise entre 20 et 21 °C.

Les paramètres physico-chimiques ont été mesurés au moyen d'un combiné multifonctions JENWAY 3410 (oxymètre, conductimètre, pHmètre).

Les daphnies (*Daphnia magna* Straus) utilisées proviennent d'un élevage réalisé dans le laboratoire. La sélection d'organismes âgés de moins de 24 heures s'effectue par tamisage (toile à bluter à mailles de 0,56 mm). La composition du milieu d'essai est détaillée en annexe 1.

Les récipients pour essai sont des béciers de capacité nominale de 250 ml.

### 3.2.2. PRODUITS ET REACTIFS

- 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

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB

la réalisation du milieu d'essai (eau de dilution) les solutions mères sont diluées dans de l'eau ultrapure.

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

### 3.3. MODE OPERATOIRE

#### 3.3.1. PREPARATION DES SOLUTIONS

Une solution de [REDACTED] dans le milieu d'essai à 100 mg/l est préparée le jour de l'essai préliminaire, et à 200 mg/l le jour de l'essai définitif.

#### 3.3.2. ESSAI PRELIMINAIRE

Des volumes adéquats de la solution mère de [REDACTED] sont versés dans les récipients et complétés à 200 ml par de l'eau de dilution pour obtenir la gamme de concentrations allant de : 0,1 à 100 mg/l

10 daphnies âgées de moins de 24 heures sont ajoutées dans chaque récipient d'essai puis ceux-ci sont placés à l'obscurité dans la salle thermostatée.

Au bout de 24 heures, les daphnies encore mobiles sont dénombrées, béciers sont replacés à l'obscurité puis un deuxième dénombrement est réalisé 48 heures après le début de l'essai.

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

#### 3.3.3. ESSAI DEFINITIF

On procède à des dilutions de la solution mère dans de l'eau de dilution pour réaliser la gamme de concentrations nécessaire à la réalisation de l'essai définitif. Les différentes concentrations de cette gamme sont données dans les annexes 2 et 3.

2 béciers de 10 daphnies âgées de moins de 24 heures sont préparés pour chaque concentration et pour le témoin.

Au bout de 24 heures, les daphnies encore mobiles sont dénombrées, les récipients sont replacés à l'obscurité puis un deuxième dénombrement est réalisé 48 heures après le début de l'essai.

#### 3.3.4. CONTROLE DE SENSIBILITE DU REACTIF BIOLOGIQUE

Périodiquement, et selon le même mode opératoire, la  $CE(I)_{50}$  - 24h du dichromate de potassium est déterminée afin de contrôler la sensibilité des organismes.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## 4. RÉSULTATS

### 4.1. ESSAI DEFINITIF

Les résultats obtenus dans l'essai sont rassemblés dans les tableaux en annexe 2 (résultats à 24 heures) et en annexe 3 (résultats à 48 heures). La partie supérieure montre les données brutes obtenues ; les concentrations utilisées pour les calculs sont indiquées en dessous. Après linéarisation au moyen de la méthode des Probits, on obtient les résultats suivants :

Après 24h, la plus forte concentration testée (200 mg/l) ne montre pas de toxicité significative du FORAFAC 1157 N vis-à-vis des daphnies. La  $CE_{50-24h}$  est donc supérieure à cette concentration ;

Après 48h, les résultats permettent le calcul d'une  $CE_{50-48h}$  égale à 100 mg/l, avec un intervalle de confiance à 95 % égal à : 95 - 110 mg/l ( $r^2 = 0,981$ ).

Le pH initial à la concentration la plus élevée était de 7,66. Le tableau ci-dessous donne les résultats des mesures d'O<sub>2</sub> et de pH réalisées aux différentes concentrations :

| Concentration nominale (mg/l) | 0    | 53,9 | 70,0 | 91,0 | 118,3 | 153,8 | 200  |
|-------------------------------|------|------|------|------|-------|-------|------|
| O <sub>2</sub> à 48h (mg/l)   | 8,5  | 8,4  | 8,3  | 8,3  | 8,2   | 8,3   | 8,2  |
| pH à 48 h                     | 7,72 | 7,67 | 7,63 | 7,65 | 7,65  | 7,65  | 7,61 |

## 4.2. CRITERES DE VALIDITE DE L'ETUDE

### 4.2.1. TENEUR EN OXYGENE

À chaque concentration, la teneur en oxygène dissous, mesurée en fin d'essai, est supérieure ou égale à 2 mg/l.

### 4.2.2. IMMOBILISATION DES TEMOINS

L'immobilisation au bout de 48 heures dans la série témoin est de 5 %. La clause requérant une mortalité inférieure ou égale à 10 % en fin d'essai a donc été respectée.

### 4.2.3. SENSIBILITE DU REACTIF BIOLOGIQUE

Le dernier contrôle de la sensibilité des daphnies au dichromate de potassium a été réalisé le 06/09/95. La  $CE(I)_{50} - 24 h$  de cette substance de référence, évaluée à 0,94 mg/l, était comprise entre 0,9 mg/l et 2,4 mg/l qui est la gamme acceptable (§ 9.2 de la norme ISO 6341).

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## 5. CONCLUSIONS

L'étude de la toxicité aiguë du [REDACTED] vis-à-vis de la daphnie montre que cette substance présente une  $CE(I)_{50}$  - 24 h supérieure à 200 mg/l et une  $CE(I)_{50}$  - 48 h égale à 100 mg/l avec un intervalle de confiance à 95 % de 95 mg/l à 110 mg/l.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## 6. ANNEXES

### 6.1. ANNEXE 1 : MILIEU D'ESSAI.

L'eau de dilution (ou milieu d'essai) est préparée de la façon décrite dans la norme ISO 6341 :

- les solutions mères suivantes sont préparées :

11,76 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  par litre d'eau ultrapure,  
4,93 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  par litre d'eau ultrapure,  
2,59 g de  $\text{NaHCO}_3$  par litre d'eau ultrapure,  
0,23 g de  $\text{KCl}$  par litre d'eau ultrapure.

- l'eau de dilution est obtenue à partir de 25 ml de chacune de ces solutions par litre d'eau, puis aération jusqu'à saturation en oxygène.

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

## 6.2: ANNEXE 2 : CONCENTRATIONS UTILISEES ET RESULTATS DES CALCULS A 24 HEURES

### TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES DAPHNIES Calcul de la CE50 par la méthode du Probit

Échantillon [REDACTED]  
n° d'étude : 6349/95/A

Méthode appliquée : ISO 6341

Essai définitif, 24 heures

Daphnies par concentration : 20

| Conc. en substance<br>mg/l | % IMMO | Nombre de daphnies mobiles |             |             |             |       |
|----------------------------|--------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|                            |        | Récipient 1                | Récipient 2 | Récipient 3 | Récipient 4 | total |
| 200                        | 10     | 10                         | 8           |             |             | 18    |
| 153,8                      | 0      | 10                         | 10          |             |             | 20    |
| 118,3                      | 0      | 10                         | 10          |             |             | 20    |
| 91                         | 5      | 9                          | 10          |             |             | 19    |
| 70                         | 5      | 9                          | 10          |             |             | 19    |
| 53,9                       | 0      | 10                         | 10          |             |             | 20    |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
| 0 (témoin)                 | 0      | 10                         | 10          |             |             | 20    |
| 0 (solvant)                | 100    |                            |             |             |             | 0     |

Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI

### 6.3. ANNEXE 3 : CONCENTRATIONS UTILISEES ET RESULTATS DES CALCULS A 48 HEURES

#### TOXICITÉ AIGÜE VIS-À-VIS DES DAPHNIES Calcul de la CE50 par la méthode du Probit

Échantillon : XXXXXXXXXX  
n° d'étude : 6349/95/A

Méthode appliquée : ISO 6341

Essai définitif, 48 heures

Daphnies par concentration : 20

| Conc. en substance<br>mg/l | % IMMO | Nombre de daphnies mobiles |             |             |             |       |
|----------------------------|--------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|                            |        | Récipient 1                | Récipient 2 | Récipient 3 | Récipient 4 | total |
| 200                        | 95     | 1                          | 0           |             |             | 1     |
| 153,8                      | 75     | 3                          | 2           |             |             | 5     |
| 118,3                      | 60     | 4                          | 4           |             |             | 8     |
| 91                         | 45     | 5                          | 6           |             |             | 11    |
| 70                         | 20     | 8                          | 8           |             |             | 16    |
| 53,9                       | 5      | 9                          | 10          |             |             | 19    |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
|                            | 100    |                            |             |             |             | 0     |
| 0 (témoin)                 | 5      | 9                          | 10          |             |             | 19    |
| 0 (solvant)                | 100    |                            |             |             |             | 0     |

|         |       |      |
|---------|-------|------|
| CE50 =  | 100   | mg/l |
| CE 50 > | 95    | mg/l |
| CE50 <  | 110   | mg/l |
| r2 =    | 0,981 |      |

Données utilisées pour le calcul

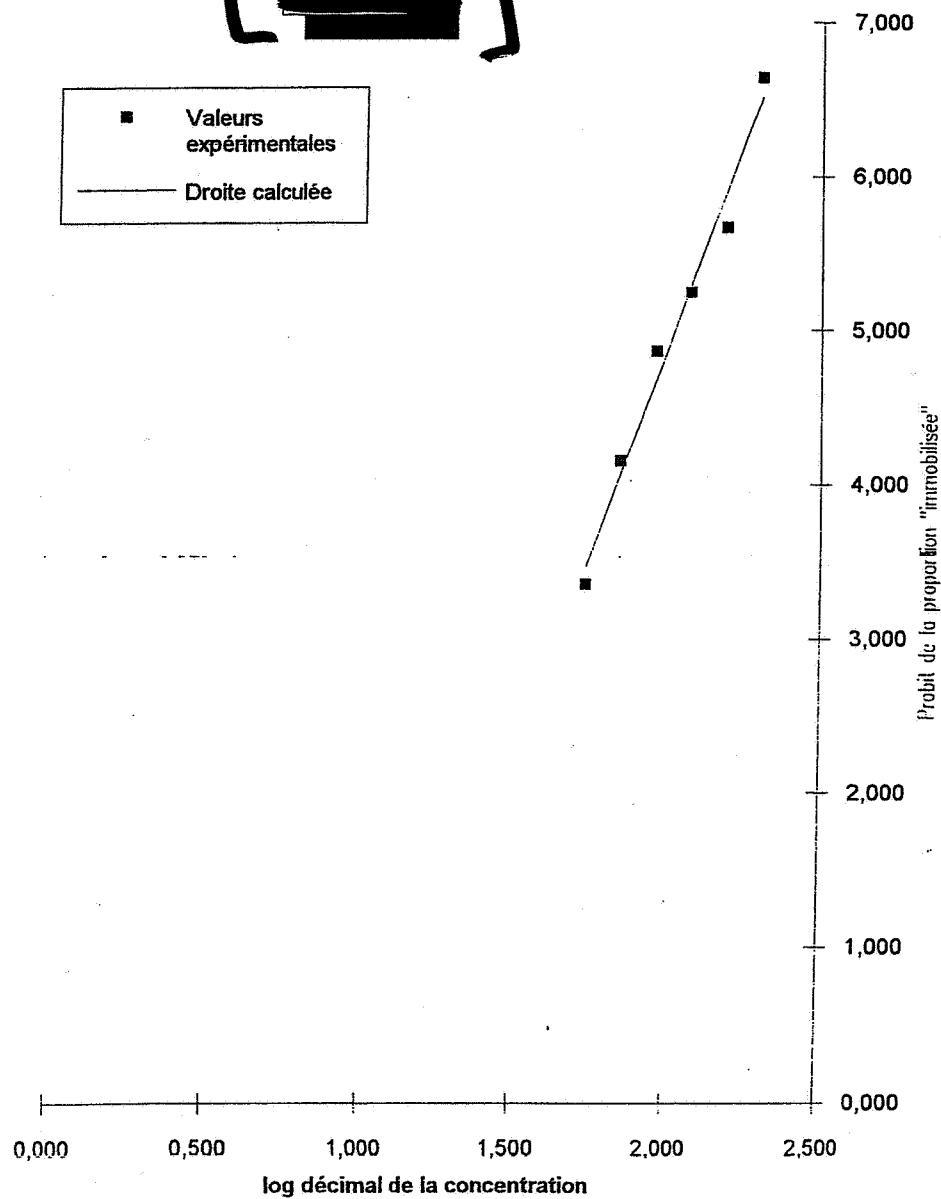
#N/A : valeur non disponible.  
#NOMBRE! : valeur indéterminée.

| concentration | % IMMO | % IMMO corrigée | PROBIT y | log conc. x |
|---------------|--------|-----------------|----------|-------------|
| 200           | 95     | 95              | 6,640    | 2,301       |
| 153,8         | 75     | 75              | 5,670    | 2,187       |
| 118,3         | 60     | 60              | 5,250    | 2,073       |
| 91            | 45     | 45              | 4,870    | 1,959       |
| 70            | 20     | 20              | 4,160    | 1,845       |
| 53,9          | 5      | 5               | 3,360    | 1,732       |
|               |        | #N/A            | #N/A     | #NOMBRE!    |
|               |        | #N/A            | #N/A     | #NOMBRE!    |
|               |        | #N/A            | #N/A     | #NOMBRE!    |
|               |        | #N/A            | #N/A     | #NOMBRE!    |
| nb valeurs    |        | Somme           | 29,950   | 12,097      |
| 6             |        | Moyenne         | 4,992    | 2,016       |

Company Sanitized. Does not contain TSCA CB

## Calcul de la CE50 à 48h selon la méthode du Probit

[REDACTED]



Company Sanitized. Does not contain TSCA CBI