



**ATOFINA**

*8EHQ-1002-15209*

RECEIVED  
OPPT CBIC

ATOFINA Chemicals, Inc.

2002 OCT 10 AM 11:26

October 9, 2002

**UPS NEXT DAY DELIVERY**



8EHQ-02-15209

Document Control Office  
Office of Pollution Prevention and Toxics  
U.S. Environmental Protection Agency  
Ariel Rios Building  
1200 Pennsylvania Avenue, N.W.  
Washington, D.C. 20460

Attn: Section 8(e) Coordinator

RE: TSCA Section 8(e) Submission



88030000004

Dear Sir/Madam:

ATOFINA Chemicals, Inc. (ATOFINA) is submitting the enclosed algal growth inhibition test to the Environmental Protection Agency (EPA) pursuant to Toxic Substances Control Act (TSCA) Section 8(e). The study was conducted according to EU Directive 92/69/CEE (Method C.3) and OECD Guideline No. 201. The study provides information on ethyl mercaptan (CAS No. 75-08-1). This study does not involve effects in humans.

Nothing in this letter or the enclosed study report is considered confidential business information of ATOFINA.

The concentration of test substance that caused a 50% reduction in growth rate (EC<sub>50</sub>) in algae at 72 hours was 3.0 mg/l, while the concentration of test substance that caused a 50% reduction in biomass of algae at 72 hours was 0.76 mg/l. ATOFINA will incorporate the information in the Ethyl Mercaptan Material Safety Data Sheet..

Further questions regarding this submission may be directed to me at (215) 419-5890.

Sincerely,

*Debra Randall*

Debra Randall, D.A.B.T.  
Product Safety Manager

Contain NO CBI

Enclosures

ATOFINA Chemicals, Inc.  
2000 Market Street  
Philadelphia, PA 19103-3222  
215-419-7000  
www.AtofinaChemicals.com

*62709*

**Elf Atochem S.A.**  
 DCRD  
 Centre d'Application de Levallois  
 Service Analyse Environnement

1- 7 JAN. 2000



Laboratoire accrédité sous le n° 1-0210  
 Reconnu pour sa conformité aux BPL de  
 l'OCDE par le GIPC en date du 8/3/93,  
 reconstruite le 11/10/99

Levallois, le 03/01/2000

Référence : 00/SAE6/0005/HT  
 Séquentiel : 4D5V20  
 Numéro d'étude BPL : 505/99/A

## RAPPORT D'ETUDE

**TITRE :**  
**ETHYL MERCAPTAN**  
 INHIBITION DE LA CROISSANCE DES ALGUES  
**AUTEUR(S) :** H. THIÉBAUD ; Coll. C. LESPAGNOL

### RESUME DOCUMENTAIRE :

Détermination de l'inhibition de la croissance (toxicité chronique) de l'ETHYL MERCAPTAN vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* sur 72 heures, en suivant le mode opératoire décrit dans la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE de la Commission des Communautés Européennes et la ligne directrice de l'OCDE n°201. Cette étude est réalisée conformément aux principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE.

### MOTS CLES :

ETHYL MERCAPTAN, Toxicité chronique, algues, 92/69/CEE, C.3

**DESTINATAIRES :** M. DAM (DTF)  
 DOC FICHER TECH

**Copies 1:** Chef de Service, Responsable des Archives,  
 Secrétariat,  
 Service Écotoxicité et Sûreté des Produits (DSEP)

L'accréditation par la Section Essais du COFRAC atteste uniquement de la compétence technique des laboratoires pour les essais ou analyses couverts par l'accréditation.

<sup>1</sup>Ce rapport comprend 31 pages et 7 feuillets non paginés.

**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 à l'ETHYL MERCAPTAN pendant 72 heures, a été réalisée en suivant le mode opératoire décrit dans la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE de la Commission des Communautés Européennes et la ligne directrice de l'OCDE n°201.

La méthode consiste à exposer les algues à une gamme de concentrations d'ETHYL MERCAPTAN 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 flacons type pénicilline de capacité nominale 120 ml bouchés par des septa en PTFE sertis par des capsules en aluminium contenant 50 ml de solution d'essaiensemencée 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  $23 \pm 1$  °C sous agitation et éclairage continu. La concentration algale a été mesurée à chaque jour d'essai. Des analyses chimiques et 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 inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	valeur	IC à 95 %
<b>Biomasse intégrale</b>		
$CE_{50b-72h}$	0,76	0,12-1,5
$CE_{10b-72h}$	0,13	0,003-0,44
$NOEC_b$	0,83	-
<b>Taux de croissance</b>		
$CE_{50r-72h}$	3,0	1,2-8,0
$CE_{10r-72h}$	0,55	0,007-1,3
$NOEC_r$	0,83	-

IC : intervalle de confiance  
ND : non déterminé

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

Les concentrations inhibitrices et NOEC présentées dans le tableau ci-dessus ont été déterminées en utilisant les moyennes géométriques des concentrations initiales et finales mesurées par Chromatographie gazeuse selon la méthode décrite en annexe de ce rapport.

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, 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  $\mu\text{m}$ .

Les variations de pH en cours d'essai dans la série témoin a été de 0,31 unités.

Le critère de validité de l'étude relatif à la croissance dans la série témoin a été respecté : le rapport de densité (R) mesuré dans la solution témoin est supérieure à 16 (R = 146).

Les résultats des analyses montrent que les concentrations n'ont, en moyenne, pas été maintenues dans la limite de 80 % des concentrations initiales. **Le critère de validité de l'étude relatif à la stabilité de la substance pendant l'essai n'ayant pas été respecté, les résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence.**

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

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

## 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 ETHYL MERCAPTAN 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 ETHYL MERCAPTAN 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 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  $1 \times 10^4$  cells/ml. Test flasks were incubated at  $23 \pm 1$  °C continuously shaken and constantly illuminated. The algal concentration was measured daily. Analytical chemistry and 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 concentrations and NOEC (mg/l)		
	Value	95 % CI
<b>Biomass</b>		
$E_bC_{50-72h}$	0.76	0.12-1.5
$E_bC_{10-72h}$	0.13	0.003-0.44
NOEC <sub>b</sub>	0.83	-
<b>Growth rate</b>		
$E_rC_{50-72h}$	3.0	1.2-8.0
$E_rC_{10-72h}$	0.55	0.007-1.3
NOEC <sub>r</sub>	0.83	-

CI : 95 % confident interval

ND : not determined

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

The effect concentrations and NOEC shown in the previous table have been estimated using the geometric means of initial and final concentrations of ETHYL MERCAPTAN determined by gas chromatography according to the method described in annex to this report.

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, 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  $\mu\text{m}$ .

During the test, the control pH varied by 0.31 units.

The validity criterion of the study related to growth in the control was respected : the increase in cell density (R), measured in the control solution between the end and the beginning of the the test, was greater than a factor of 16 (R = 146).

The chemical analysis showed that concentrations of ETHYL MERCAPTAN were, in average, not maintained within the designated limit of 80 % of the initial concentrations. Since the validity criterion related to the test substance stability was not respected, care should be taken to the interpretation of results.

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

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

**RAPPORT D'ÉTUDE**

**ETHYL MERCAPTAN**

**INHIBITION DE LA CROISSANCE DES ALGUES D'EAU DOUCE**

**N° D'ÉTUDE BPL : 505/99/A**

**SOMMAIRE**

1. ASSURANCE QUALITÉ	7
2. SIGNATURES	8
3. IDENTIFICATIONS	9
3.1. Substance d'essai	9
3.2. Installation d'essai	9
3.3. Demandeur de l'étude	10
3.4. Calendrier	10
3.5. Archivage	10
4. OBJECTIF DE L'ÉTUDE	11
5. MÉTHODE D'ESSAI	11
5.1. Introduction	11
5.2. Matériel et produits	12
5.3. Mode opératoire	13
6. Mode de calcul	16
6.1. Calcul des pourcentages d'inhibition	16
6.2. Calcul des rapports de densité (R)	17
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	23
9.1. Annexe 1 : Composition de l'eau de dilution	23
9.2. Annexe 2 : Pourcentages d'inhibition et courbes de croissance	25
9.3. Annexe 3 : Concentrations inhibitrices calculées par la méthode des Probits	27
9.4. Annexe 4 : Certificat d'analyse de la substance	28
9.5. Annexe 5 : Bulletins d'analyses statistiques	30
9.6. Annexe 6 : Méthode et bulletins d'analyses chimiques	31

## 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 8 et 9 juillet 1999, 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.

Le laboratoire est accrédité par le COFRAC pour certains essais du programme 26-2 «Essais de détermination de certaines propriétés intrinsèques des substances chimiques : essais écotoxicologiques», et est identifié sous le numéro d'accréditation : 1-0210.

L'Auditeur Qualité du Centre d'Application de Levallois procède à des audits et inspections portant sur les études, l'installation et les procédés, en vue :

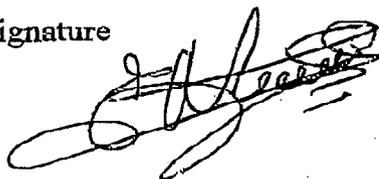
- d'établir la concordance de l'étude avec les Principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire de l'OCDE,
- de s'assurer que les méthodes, les modes opératoires et les observations sont correctement décrits dans le rapport d'étude et que les résultats indiqués reflètent avec exactitude les données écrites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

Les dates correspondant à ces audits et inspections sont présentées au paragraphe « Calendrier » de ce rapport (§ 3.4.).

L'Auditeur Qualité ou son suppléant :

Date  
04/02/2000

Signature



**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

4/1/2000

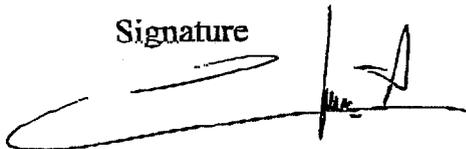


Le Directeur de l'étude : H. THIÉBAUD

Date

Signature

3/1/2000



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

### 3. IDENTIFICATIONS

#### 3.1. Substance d'essai

Dénomination : ETHYL MERCAPTAN

N° CAS : 75-08-1

N° du lot : non communiqué sur le certificat d'analyse (annexe 4)

Date de réception CAL : 15/02/99

N° d'enregistrement CAL : 505/99

Caractéristiques principales :

- apparence : liquide incolore
- pureté : 99,83%
- solubilité : 6,8 g/l dans l'eau à 20°C

Précaution d'emploi et de conservation : voir FDS.

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

#### 3.2. Installation d'essai

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 : P. BROCHIER, C. KAE, C. LESPAGNOL

Ingénieur chargé des analyses : F. PENNEQUIN

Technicien(s) chargé(s) des analyses : D. COPLLOT

Rédacteur du rapport d'étude : C. LESPAGNOL

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

**3.3. Demandeur de l'étude**

M. DAM (DTF)

Moniteur de l'étude : Mmc BUREAU (DSEP)

**3.4. Calendrier**

Les dates de début et de fin d'expérimentation et d'étude sont communiquées dans le tableau ci-dessous :

Phase		Date
Etude	Début	15/03/99
	Fin	03/01/00
Expérimentation	Début	16/03/99
	Fin	29/05/99

Les dates des audits et inspections réalisés par l'Auditeur Qualité sont les suivantes :

Type d'audit/inspection	Date	
Audit d'étude	Plan	19/03/99
	Rapport	30/12/99
Audit de l'installation (Locaux, Matériel, Système qualité)	8 au 26/4/1999	
Audit de procédés	Contrôle de sensibilité du réactif biologique	14/10/99
	Traitement des demandes d'études	14/10/99
	Gestion et archivage des substances d'essai	08/04/99
	Etablissement des rapports d'étude	16/09/99

**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 20 ans.

#### 4. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette étude est de déterminer la toxicité chronique (inhibition de la croissance) de l'ETHYL MERCAPTAN vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* en suivant le mode opératoire décrit dans la méthode C3 de l'annexe à la Directive 92/69/CEE de la Commission des Communautés Européennes qui est en conformité avec la ligne directrice de l'OCDE n°201.

#### 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 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 :

- une analyse de données existantes (littérature, etc.) ou 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 (ou l'analyse des données existantes) montre une absence de toxicité à 100 mg/l, 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.

En utilisant la méthode d'analyse retenue (voir § 5.3.4.), on réalise la mesure des concentrations réelles de la substance d'essai sur des échantillons prélevés dans les diverses solutions préparées pour l'établissement de la gamme de dilutions. Ces analyses

sont réalisées au début de l'essai (avant addition des algues) et en fin d'essai, après avoir déterminé la concentration algale. En fin d'essai, il est procédé à l'analyse des échantillons prélevés dans une série de solutions d'essai ne contenant pas les algues. Par comparaison des résultats avec ceux obtenus dans la série de solutions contenant les algues, la fraction de la substance qui s'est adsorbée sur les algues est évaluée. La méthode d'analyse est déterminée après réalisation de l'essai préliminaire, lequel a permis de préciser la limite de sensibilité nécessaire. Les analyses sont réalisées pour vérifier que la concentration est maintenue dans la limite des 80 % de la concentration initiale pendant la durée de l'essai.

### 5.1.2. Références

- Directive 92/69/CEE, annexe II, méthode C3 "Inhibition des algues".
- Ligne directrice de l'OCDE n°201(4/6/84).
- Plan Qualité n°7 : «Toxicité chronique vis-à-vis des algues».

### 5.1.3. Déviations

Mlle LESPAGNOL a participé à l'étude bien qu'elle n'ait pas été prévue dans le plan d'étude.

## 5.2. Matériel et produits

### 5.2.1. Matériel

L'étude a été réalisée dans une armoire de phyto-culture qui permet d'incuber les flacons d'essai dans des conditions précises : la température est programmée à 23°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 24 et 22,5 °C.

Les paramètres physico-chimiques ont été mesurés au moyen d'un pH-mètre 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 flacons type pénicilline de capacité nominale 120 ml bouchés par des septa en PTFE serties par des capsules en aluminium.

Le matériel analytique pour le suivi de la concentration de la substance est décrit en annexe 6.

### 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  $\mu\text{m}$ ) ; 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

Les conditions de culture sont décrites dans l'annexe 1 de la méthode C3. Deux flacons contenant environ 100 ml chacun d'une culture mère axénique sont maintenus en permanence à  $23 \pm 1$  °C sous éclaircment photopériodique de 16 heures d'illumination pour 8 heures d'obscurité, et sous aération continue par de l'air filtré à 0,22  $\mu\text{m}$ . 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.

Quatre 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 àensemencer les fioles d'essai, la seconde est préparée au cas où la première viendrait 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  $2,16 \cdot 10^6$  cellules/ml pour l'essai préliminaire et de  $1,02 \cdot 10^7$  cellules/ml pour l'essai définitif.

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

### 5.3.2. Préparation des solutions

Les solutions d'ETHYL MERCAPTAN dans l'eau de dilution sont préparées le jour de l'essai.

Les essais étant réalisés dans des flacons hermétiquement bouchés, l'eau de dilution décrite en annexe 1 est additionnée de  $\text{NaHCO}_3$  à 0,3 g/l, et de tampon HEPÈS 6 mM (sel de sodium de l'acide 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique). Cette disposition est décrite dans le projet ISO/CD 14442 : Water Quality - Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble organic and inorganic solids, volatile compounds, heavy metals and waste water.

### 5.3.3. Essai préliminaire

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

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

Les flacons sont alors bouchés avec des bouchons sertis en PTFE et placés dans l'armoire de phytoculture.

Un récipient témoin (T) contenant l'eau de dilution et l'inoculum algal ainsi qu'un récipient "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 de 200  $\mu\text{l}$  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 nominale est utilisée pour le calcul des pourcentages d'inhibition.

Le pH et l' $\text{O}_2$  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'essaiensemencée, et en fin d'essai dans le flacon d'essaiensemencé.

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

### 5.3.4. Méthode d'analyse

Les analyses de la substance en cours d'essai sont réalisées par chromatographie gazeuse selon la méthode décrite en annexe 6.

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

### 5.3.5. Essai définitif

Des volumes adéquats d'une solution mère d'ETHYL MERCAPTAN à 100 mg/l dans l'eau de dilution sont versés dans des fioles jaugées de 500 ml et complétées par de l'eau de dilution pour obtenir la gamme de concentrations nominales allant de 30 à 0,3 mg/l.

Les concentrations sont choisies de manière à former une progression géométrique avec un rapport de 2,1.

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. Une série supplémentaire de flacons d'essai est préparée et incubée dans les mêmes conditions que les flacons ensemencés ; elle sert à déterminer une éventuelle adsorption, absorption ou métabolisation de la substance d'essai par les algues.

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

Les flacons sont alors bouchés avec des bouchons en PTFE sertis et placés dans l'armoire de phytoculture.

Trois récipients témoins (T) contenant l'eau de dilution et l'inoculum algal ainsi que trois 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.

### 5.3.6. Contrôle de sensibilité du réactif biologique

La méthode C.3 ne requiert pas la réalisation d'un essai sur le dichromate de potassium dont le résultat correspondrait à un critère de qualité. La sensibilité du réactif biologique est cependant 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 29/04/99, ont abouti à une  $CE_{50r} - 72h$  de 0,76 mg/l et une  $CE_{50b} - 72h$  de 0,29 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 :

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

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 ( $I_{Ai}$ ).

#### Taux de croissance

Les taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) pour les cultures en phase de croissance exponentielle sont calculés pour chaque réplique aux différentes concentrations d'essai avec l'équation :

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

où  $t_0$  correspond au début de l'essai.

Le pourcentage moyen d'inhibition du taux de croissance spécifique ( $I_{\mu}$ ) est ensuite calculé pour chaque concentration d'essai à l'aide de la formule suivante :

$$I_{\mu} = \frac{\overline{\mu_c} - \overline{\mu_i}}{\overline{\mu_c}} \times 100$$

avec :

$\overline{\mu_c}$ , le taux de croissance spécifique moyen du témoin ;

$\overline{\mu_i}$ , le taux de croissance spécifique moyen à la concentration d'essai  $i$ .

Les concentrations efficaces (inhibitrices) pour  $x$  % de la population sont notées  $CE_{x\%}$  lorsque les calculs sont réalisés à partir des pourcentages d'inhibition du taux de croissance spécifique ( $I_{\mu}$ ).

### 6.2. Calcul des rapports de densité (R)

Le rapport de densité (R) calculé pour chaque concentration et pour le témoin, est égal au rapport des concentrations cellulaires moyennes en fin d'essai ( $N_n$ ) et au début de l'essai ( $N_0$ ) :

$$R = \frac{\overline{N_n}}{\overline{N_0}}$$

### 6.3. Calcul des facteurs de croissance (k)

Le facteur de croissance (k) est égal à :

$$k = \frac{\ln \overline{N_n} - \ln \overline{N_0}}{T}$$

où T est le temps en jour.

Le facteur de croissance est l'équivalent d'un taux de croissance moyen par jour d'essai.

### 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 Observé (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 hauteurs sous la courbe de croissance (A) des répliques de chaque concentration avec le témoin ;
- La  $NOEC_\mu$ , calculée par comparaison statistique des valeurs des taux de croissance ( $\mu$ ) 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, 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 réalisés dans la solution témoin : algues unicellulaires en forme de croissant de lune de taille moyenne 5-10  $\mu\text{m}$ .

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 <sub>2</sub> dissous (mg/l)	
		T0	T72h	T0	T72h
T	0	7,27	7,58	9,2	9,8
g	0,3	7,48	7,54	9,0	9,7
f	0,7	7,28	7,51	9,0	9,9
e	1,5	7,32	7,50	8,9	9,8
d	3,2	7,29	7,40	9,0	9,9
c	6,8	7,24	7,38	9,0	9,9
b	14,3	7,31	7,29	8,8	8,7
a	30,0	7,20	7,19	9,0	8,6

### 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 ( $\mu$ ) sont présentées dans cette annexe et résumées dans le tableau ci-dessous :

Echantillon Référence	Concentration nominale (mg/l)	Concentration algale moyenne (cellules/ml)				A	$\mu$
		T0	T24h	T48h	T72h		
T	0	$10^4$	$5,77 \cdot 10^4$	$3,46 \cdot 10^5$	$1,46 \cdot 10^6$	$2,66 \cdot 10^7$	0,0692
g	0,3	$10^4$	$5,27 \cdot 10^4$	$2,55 \cdot 10^5$	$1,40 \cdot 10^6$	$2,36 \cdot 10^7$	0,0687
f	0,7	$10^4$	$5,23 \cdot 10^4$	$3,99 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^6$	$2,68 \cdot 10^7$	0,0680
e	1,5	$10^4$	$4,50 \cdot 10^4$	$2,85 \cdot 10^5$	$1,01 \cdot 10^6$	$1,94 \cdot 10^7$	0,0641
d	3,2	$10^4$	$4,40 \cdot 10^4$	$2,57 \cdot 10^5$	$7,97 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^7$	0,0608
c	6,8	$10^4$	$4,17 \cdot 10^4$	$1,93 \cdot 10^5$	$6,53 \cdot 10^5$	$1,29 \cdot 10^7$	0,0580
b	14,3	$10^4$	$4,13 \cdot 10^4$	$6,70 \cdot 10^4$	$7,77 \cdot 10^4$	$2,92 \cdot 10^6$	0,0285
a	30,0	$10^4$	$2,27 \cdot 10^4$	$2,77 \cdot 10^4$	$3,17 \cdot 10^4$	$9,88 \cdot 10^5$	0,0160

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 146 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 ( $I\mu$ ) sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Echantillon Référence	Concentration nominale (mg/l)	IAi (%)	$I\mu$ (%)
T	0	0	0
g	0,3	11,05	0,75
f	0,7	1,19	1,75
e	1,5	26,95	7,42
d	3,2	39,05	12,11
c	6,8	51,58	16,10
b	14,3	88,96	58,85
a	30,0	96,28	76,86

#### 7.4. Concentrations en substance d'essai

Le tableau ci-dessous présente les concentrations (mg/l) en ETHYL MERCAPTAN dans les solutions d'essai nonensemencées (sans algues) en début et en fin d'essai. Entre parenthèses figurent les résultats des analyses en fin d'essai mesurées dans les solutionsensemencées avec les algues. La méthode et les bulletins d'analyses sont joints en annexe 6.

Echantillon Référence	Concentration en ETHYL MERCAPTAN				Moyenne <sup>+</sup> géométrique (mg/l)
	Nominale (mg/l)	Mesurée dans les solutions sans algues			
		Initiale (mg/l)	Finale ** (mg/l)	Final/Initial %	
T	0	< LD	< LD	-	0
g	0,3	nd	nd	-	0
f	0,7	< LD	nd	-	0
e	1,5	< LQ	nd	-	0
d	3,2	3,2	< LQ	-	0
c	6,8	1,47	0,468	31,84	0,83
b	14,3	4,51	3,19 (1,24)	70,73	3,79
a	30,0	8,68	8,20 (4,73)	94,47	8,44

< LD ou < LQ : concentration inférieure à la Limite de Détection de la méthode d'analyse soit 0,0245 mg/l ou à la Limite de Quantification de la méthode d'analyse soit 0,0815 mg/l. \* Concentrations calculées par régression linéaire d'après les moyennes géométriques des concentrations initiales et finales mesurées. \*\* entre parenthèses : concentrations mesurées en fin d'essai dans la série ensemencée avec des algues. ND : non déterminé.

À la plus forte concentration, dans les solutions d'essai nonensemencées par des algues, le rapport des concentrations mesurées en début et en fin d'essai est supérieur à 80 %. Ce rapport diminue avec la concentration puisque la concentration finale en ETHYL MERCAPTAN ne représente plus que 71 % de la concentration initiale 4,51 mg/l et seulement 32 % de 1,47 mg/l.

Par conséquent, les concentrations en substances n'ont, en moyenne, pas été maintenues stables pendant l'essai.

Les concentrations initiales mesurées n'étant pas équivalentes (< 80 %) aux concentrations nominales, et la substance n'ayant été que partiellement stable pendant la durée de l'essai, des concentrations d'exposition sont calculées. Celles-ci sont les moyennes géométriques des concentrations initiales et finales mesurées, c'est à dire la racine carrée du produit des concentrations mesurées en début et enfin d'essai :

$$C_m = \sqrt{C_i \times C_f}$$

#### 7.5. Concentrations inhibitrices et NOEC

Les calculs des concentrations inhibitrices (concentrations efficaces) présentés en annexe 3 sont réalisés avec les concentrations moyennes géométriques. 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 inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	valeur	IC à 95 %
<b>Biomasse intégrale</b>		
$CE_{50b-72h}$	0,76	0,12-1,5
$CE_{10b-72h}$	0,13	0,003-0,44
$NOEC_b$	0,83	-
<b>Taux de croissance</b>		
$CE_{50r-72h}$	3,0	1,2-8,0
$CE_{10r-72h}$	0,55	0,007-1,3
$NOEC_r$	0,83	-

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 ( $R = 146$ ).

### 7.6.2. Concentrations de la substance

Les résultats des analyses (voir § 7.4.) montrent que les concentrations finales n'ont, en moyenne, pas été maintenues dans la limite de 80 % des concentrations initiales.

### 8. CONCLUSIONS

L'étude de la toxicité chronique (inhibition de la croissance) de l'ETHYL MERCAPTAN vis-à-vis des algues d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* a permis de déterminer les concentrations inhibitrices et les Concentrations Sans Effet Observé présentées dans le tableau suivant :

Concentration inhibitrice et NOEC (mg/l)		
	valeur	IC à 95 %
Biomasse intégrale		
CE <sub>50b-72h</sub>	0,76	0,12-1,5
CE <sub>10b-72h</sub>	0,13	0,003-0,44
NOEC <sub>b</sub>	0,83	-
Taux de croissance		
CE <sub>50r-72h</sub>	3,0	1,2-8,0
CE <sub>10r-72h</sub>	0,55	0,007-1,3
NOEC <sub>r</sub>	0,83	-

IC : intervalle de confiance

ND : non déterminé

**Le critère de validité de l'étude relatif à la stabilité de la substance pendant l'essai n'ayant pas été respecté, les résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence.**

## 9. ANNEXES

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

L'eau de dilution est préparée de la façon décrite dans le paragraphe 1.6.1.2 de la méthode C.3. Quatre solutions mères sont préparées par dilution dans l'eau ultra-pure des éléments décrits dans les tableaux suivants :

Substance	Concentration dans la solution mère	Concentration finale
<b>Solution mère 1 : macro-nutriments</b>		
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l	15 mg/l
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2 g/l	12 mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8 g/l	18 mg/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g/l	15 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g/l	1.6 mg/l
<b>Solution mère 2 : Fe - EDTA</b>		
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	80 mg/l	0,08 mg/l
(Na <sub>2</sub> EDTA,2H <sub>2</sub> O)	100 mg/l	0,1 mg/l
<b>Solution mère 3 : oligo-éléments</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg/l	0,185 mg/l
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	415 mg/l	0.415 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg/l	3 x 10 <sup>-3</sup> mg/l
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5 mg/l	1,5 x 10 <sup>-3</sup> mg/l
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 mg/l	10 <sup>-5</sup> mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7 mg/l	7 x 10 <sup>-3</sup> mg/l
<b>Solution mère 4 : NaHCO<sub>3</sub></b>		
NaHCO <sub>3</sub>	50 g/l	50 mg/l

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 µm) et stockés 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.

<b>Eau de dilution (0,5, 1, 2 ou 5 litres)</b>				
	<b>Volume à diluer (ml)</b>			
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
<b>Eau ultra-pure (QSP)</b>	<b>0,5 litre</b>	<b>1 litre</b>	<b>2 litres</b>	<b>5 litres</b>

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.

**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 : Ethylmercaptan  
Réf. CAL : 505/99

Date : 28-mai-99

N° d'étude : 505/99/A      Initiales Technicien : CLL

Echantillon Référence	Réplicat N°	Concentration algale (Cell./ml)				A	u
		T0	T24h	T48h	T72h		
T	1	1,0E+04	7,00E+04	3,51E+05	1,91E+06	3,24E+07	0,0729
T	2	1,0E+04	3,80E+04	1,97E+05	5,70E+05	1,19E+07	0,0582
T	3	1,0E+04	6,50E+04	4,90E+05	1,89E+06	3,54E+07	0,0726
T	moy.	1,00E+04	5,77E+04	3,46E+05	1,46E+06	2,66E+07	0,0692
g	1	1,0E+04	5,20E+04	3,41E+05	2,27E+06	3,61E+07	0,0753
g	2	1,0E+04	4,00E+04	2,02E+05	8,60E+05	1,55E+07	0,0619
g	3	1,0E+04	6,80E+04	2,23E+05	1,08E+06	1,93E+07	0,0850
g	moy.	1,00E+04	5,27E+04	2,55E+05	1,40E+06	2,38E+07	0,0887
f	1	1,0E+04	4,10E+04	3,45E+05	1,40E+06	2,55E+07	0,0686
f	2	1,0E+04	3,50E+04	3,12E+05	4,75E+05	1,34E+07	0,0536
f	3	1,0E+04	8,10E+04	5,40E+05	2,13E+06	3,99E+07	0,0745
f	moy.	1,00E+04	5,23E+04	3,99E+05	1,34E+06	2,53E+07	0,0680
e	1	1,0E+04	3,30E+04	2,81E+05	8,50E+05	1,71E+07	0,0617
e	2	1,0E+04	5,80E+04	2,61E+05	1,05E+06	1,97E+07	0,0646
e	3	1,0E+04	4,40E+04	3,14E+05	1,12E+06	2,14E+07	0,0655
e	moy.	1,00E+04	4,50E+04	2,85E+05	1,01E+06	1,94E+07	0,0641
d	1	1,0E+04	4,10E+04	2,79E+05	8,00E+05	1,43E+07	0,0569
d	2	1,0E+04	5,00E+04	2,42E+05	9,80E+05	1,82E+07	0,0637
d	3	1,0E+04	4,10E+04	2,51E+05	8,10E+05	1,61E+07	0,0610
d	moy.	1,00E+04	4,40E+04	2,57E+05	7,97E+05	1,62E+07	0,0608
c	1	1,0E+04	3,10E+04	1,54E+05	5,90E+05	1,09E+07	0,0566
c	2	1,0E+04	4,60E+04	1,53E+05	5,90E+05	1,13E+07	0,0586
c	3	1,0E+04	4,80E+04	2,71E+05	7,80E+05	1,64E+07	0,0605
c	moy.	1,00E+04	4,17E+04	1,93E+05	6,53E+05	1,29E+07	0,0580
b	1	1,0E+04	4,00E+04	6,90E+04	3,70E+04	3,06E+06	0,0300
b	2	1,0E+04	4,70E+04	5,20E+04	7,10E+04	2,63E+06	0,0272
b	3	1,0E+04	3,70E+04	8,00E+04	7,50E+04	3,11E+06	0,0280
b	moy.	1,00E+04	4,13E+04	6,70E+04	7,77E+04	2,93E+06	0,0285
a	1	1,0E+04	1,70E+04	1,90E+04	2,90E+04	8,12E+05	0,0148
a	2	1,0E+04	2,20E+04	3,00E+04	2,20E+04	9,12E+05	0,0110
a	3	1,0E+04	2,90E+04	3,40E+04	4,40E+04	1,44E+06	0,0208
a	moy.	1,00E+04	2,27E+04	2,77E+04	3,17E+04	9,88E+05	0,0160

## Essai de toxicité vis-à-vis des algues

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

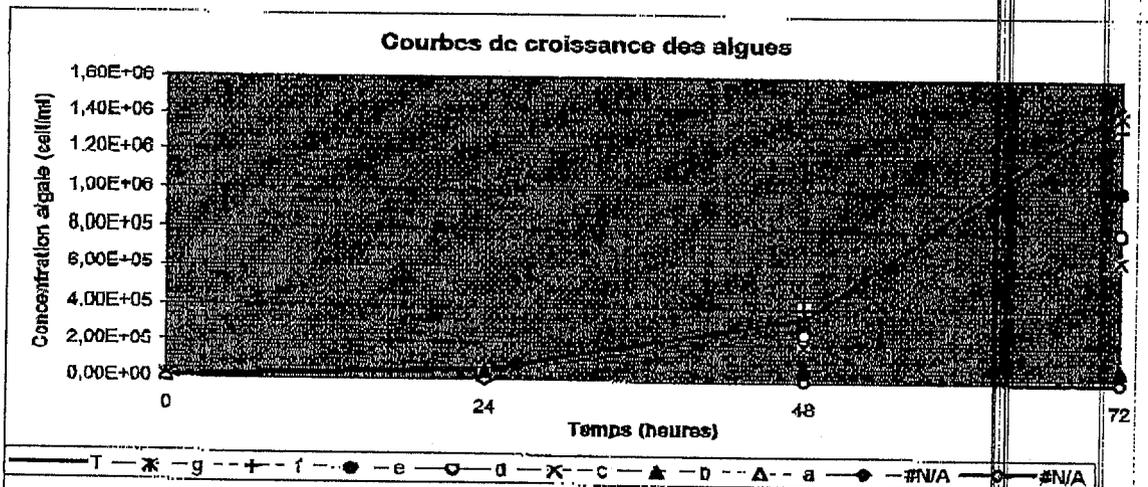
Echantillon : Nom : Ethylmercaptan      Date : 28-mai-99  
Réf. CAL : 505/99

N° d'étude : 505/99/A      Initiales Technicien : CLL

Echantillon Référence	Concentration algale moyenne (Cell./ml)				Rapport (R) densités	Facteur k (J-1)
	0	24	48	72		
T	1,00E+04	5,77E+04	3,46E+05	1,46E+06	146	1,650
g	1,00E+04	5,27E+04	2,55E+05	1,40E+06	140	1,648
f	1,00E+04	5,23E+04	3,99E+05	1,34E+06	134	1,631
e	1,00E+04	4,50E+04	2,85E+05	1,01E+06	101	1,537
d	1,00E+04	4,40E+04	2,57E+05	7,97E+05	80	1,459
c	1,00E+04	4,17E+04	1,93E+05	6,53E+05	65	1,393
b	1,00E+04	4,13E+04	6,70E+04	7,77E+04	8	0,683
a	1,00E+04	2,27E+04	2,77E+04	3,17E+04	3	0,384
#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	11,05	0,75
f	1,19	1,75
e	26,95	7,42
d	39,05	12,11
c	51,58	16,10
b	88,96	58,85
a	96,28	76,86
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!
#N/A	#DIV/0!	#DIV/0!

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



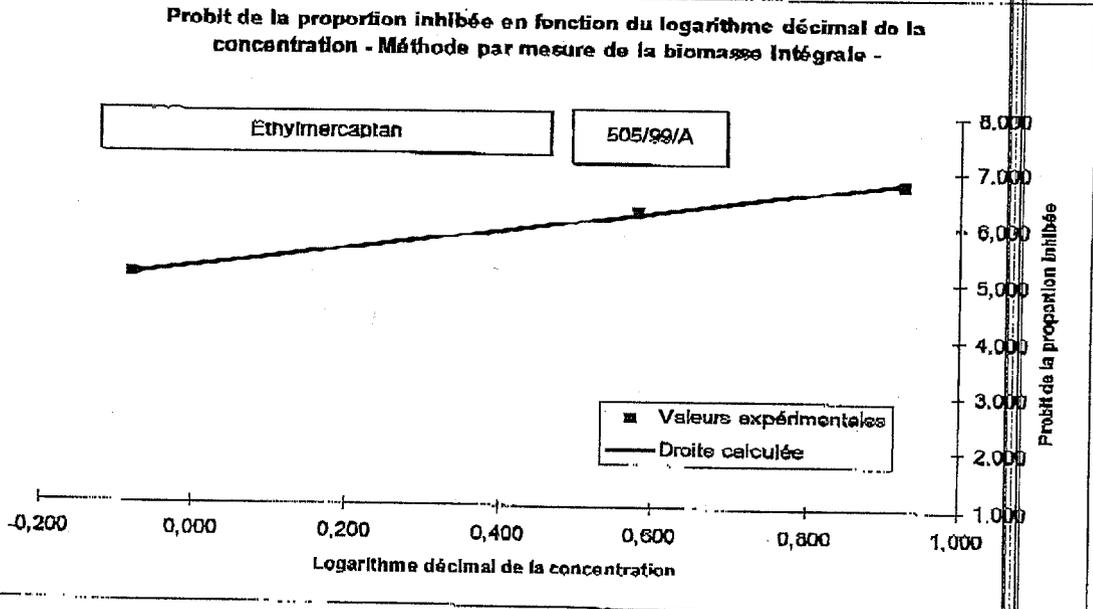
**9.3. Annexe 3 : Concentrations inhibitrices calculées par la méthode des Probits**

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

Substance étudiée : Nom : Ethylmercaptan  
Réf. CAL : 505/99 Date : 09/11/99

Numéro d'étude : 505/99/A Initiales Technicien : CUL

Méthode par mesure de la biomasse intégrale								
Données utilisées pour le calcul				Conc. Inhibitrices (CE <sub>50</sub> ) mg/l				
Concentration calculées mg/l	Inhibition (IAI)		PROBIT y	log conc. x	X (%)	CE <sub>50</sub> inf.	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub> sup.
	(%)	corrigée (%)						
8,44	96,3	96	6,750	0,926	5	0,001	0,083	0,32
3,79	88,0	89	6,230	0,579	10	0,003	0,13	0,44
0,83	51,6	52	5,050	-0,081	15	0,005	0,19	0,55
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	20	0,01	0,24	0,68
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	25	0,016	0,31	0,77
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	30	0,025	0,38	0,89
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	35	0,037	0,45	1
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	40	0,056	0,54	1,1
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	45	0,08	0,64	1,3
nb valeurs 3		Somme	18,030	1,424	50	0,12	0,76	1,5
		Moyenne	6,010	0,475	55	0,17	0,91	1,7
			r <sup>2</sup> = 0,998		60	0,24	1,1	1,9
					65	0,35	1,3	2,2
					70	0,5	1,5	2,6
					75	0,73	1,9	3,2
					80	1,1	2,4	4,2
					85	1,7	3,1	6
					90	2,5	4,3	10
					95	4	7	26



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° 505/99/A - RC3505.doc page 27/31

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

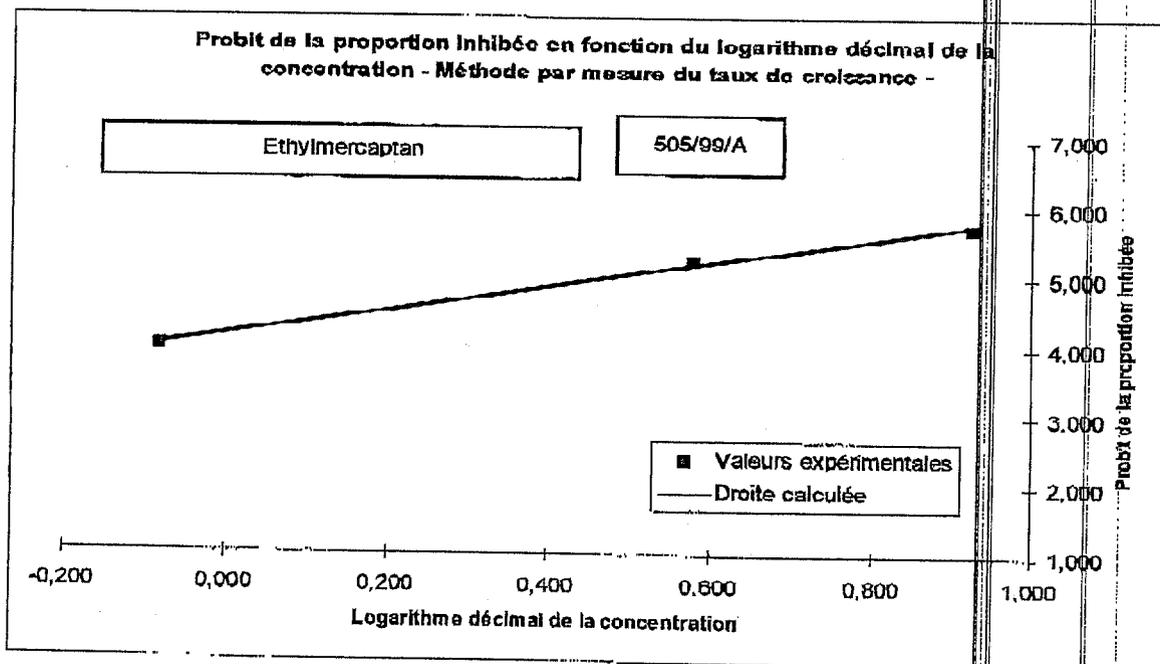
Substance étudiée : Nom : Ethylmercaptan  
Réf. CAL : 505/99

Date : 09/11/99

Numéro d'étude : 505/99/A

Initiales Technicien : CLL

Méthode par mesure du taux de croissance								
Données utilisées pour le calcul					Conc. Inhibitrices (CE <sub>xr</sub> ) mg/l			
Concentration calculées mg/l	Inhibition (I <sub>xi</sub> )		PROBIT y	log conc. x	X (%)	CE <sub>xr</sub> Inf.	CE <sub>xr</sub>	CE <sub>xr</sub> sup.
	(%)	corrigée (%)						
8,44	76,9	77	5,740	0,926	5	0,001	0,34	0,97
3,79	58,9	59	5,230	0,579	10	0,007	0,55	1,3
0,83	16,1	16	4,010	-0,081	15	0,021	0,76	1,7
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	20	0,05	0,99	2,1
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	25	0,1	1,2	2,5
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	30	0,19	1,5	3
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	35	0,32	1,8	3,6
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	40	0,53	2,2	4,6
		#N/A	#N/A	#NOMBRE!	45	0,79	2,5	5,6
nb valeurs 3	Somme		14,980	1,424	50	1,2	3	8
	Moyenne		4,993	0,475	55	1,6	3,6	12
<b>r<sup>2</sup> = 0,997</b>					60	2	4,2	18
					65	2,5	5,1	29
					70	3	6	49
					75	3,6	7,3	91
					80	4,4	9,2	160
					85	5,4	12	450
					90	6,7	16	1290
					95	9,3	27	6410



**9.4. Annexe 4 : Certificat d'analyse de la substance**

Cette annexe est constituée de 1 feuillet non paginé à la suite de la présente page.

**9.5. Annexe 5 : Bulletins d'analyses statistiques**

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

**9.6. Annexe 6 : Méthode et bulletins d'analyses chimiques**

Cette annexe est constituée de 3 feuillets non paginés à la suite de la présente page.

Essai dfinitif algues sur l'Ethylmercaptan 505/99/A

Summary Statistics and ANOVA

Transformation = None

Normal Conc. (mg/l)	n	Mean	s.d.	cv%
0.1 = control	3	2656.6667	1278.9970	48.1
0.30	3	2363.3333	1096.2360	46.4
0.70	3	2626.6667	1326.6625	50.5
1.50	4	1940.0000	216.5641	11.2
3.20	5	1620.0000	195.1922	12.0
6.80	6	1286.6667	306.6486	23.8
14.30	7*	293.3333	26.3881	9.0
30.00	8*	55.6000	38.7050	69.6

\*) 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 = -1615 511413  
 This difference corresponds to -60.81 percent of control.

Between concentrations  
 sum of squares = 21179310.820000 with 7 degrees of freedom.

Error mean square = 597353.468333 with 16 degrees of freedom.

Bartlett's test p-value for equality of variances = .001

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \* 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. \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

essai définitif algues sur l'Éthylmercaptan 505/99/A

Summary Statistics and ANOVA

Nominales (mg/l) Conc.	Transformation =		None		cv%
	n	Mean	s.d.		
0.1 = control	3	.0673	.0096		14.3
0.30	2	.0674	.0070		10.4
0.70	3	.0656	.0108		16.4
1.50	4	.0639	.0020		3.1
3.20	5	.0605	.0034		5.7
6.80	6	.0579	.0023		3.9
14.30	7*	.0284	.0014		5.1
30.00	8*	.0155	.0048		31.3

\*) 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 = .012883  
 This difference corresponds to -19.14 percent of control

Between concentrations :  
 sum of squares = .008350 with 7 degrees of freedom.  
 Error mean square = .000038 with 16 degrees of freedom.  
 Bartlett's test p-value for equality of variances = .126

adresse postale :  
B.P. 22 - 64170 Lacq  
téléphone : +33 (0)5 59 92 22 22  
Central télex/Lacq 560 804

505/99/A

505/99

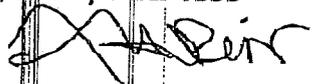
**CAL**  
BP 108  
95, rue Danton  
92300 LEVALLOIS PERRET  
FRANCE  
A l'attention de Melle VARLET

Ref: 49217

**CERTIFICAT D'ANALYSE DE L'ETHYL MERCAPTAN**

CARACTERISTIQUES		RESULTATS
Pureté	(%Poids)	99,83
DES	ppm	150
H2S	"	95
MeSH	"	254
Impuretés	"	1749
Point trouble	°C	< -40
Couleur	APHA	10
Aspect		Conforme

Lacq, le 21 janvier 1999



Chef de service  
Centre d'Applications Techniques  
E. LOPEZ

**BULLETIN D'ANALYSE**

Référence AGILAN: 007429  
 Référence document : 99/SAE7/0794/EPN  
 Référence D.E. : TO et T72heures  
 Séquentiel : 4DSV20  
 N° Etude BPL : 505/99/A  
 Réf échantillons: 2058 à 2065/99  
 2114 à 2126/99  
 Service émetteur : SAE / CHCAZ

<i>Destinataires:</i>	
THIEBAUD HERVE SAE CA LEVALLOIS	
<i>Copies:</i>	

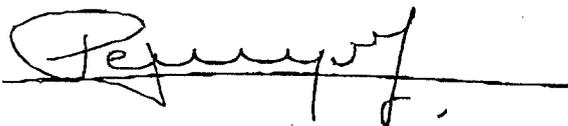
Votre demande : **ESSAI DEFINITIF ALGUES ETHYL MERCAPTAN 505/99/A**  
**TO ET T72 H**

Du : 27/07/99

*Conclusion :*

Ci-joint les résultats sur le dosage de l'éthylmercaptan lors de l'essai définitif Algues (étude 505/99/A).  
 Le rapport présente les teneurs aux temps TO et T72 heures.  
 Nous restons à votre disposition pour tout renseignement.  
 Coll: D. Coplot

Responsable d'analyse : FLORENCE PENNEQUIN

Visa : 

505 / 99 / A

• **Echantillon :** ETHYL MERCATAN TO**Secteur :** CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE**Analyse :** QUANTI

Teneur en Ethylmercaptan dans l'essai définitif Algues : TO

Solution TO 30 mg/l = 8,68 mg/l 29%

Solution TO 14,3 mg/l = 4,51 mg/l 31%

Solution TO 6,8 mg/l = 1,47 mg/l 22%

Solution TO 3,2 mg/l = 0,43 mg/l 13%

Solution TO 1,5 mg/l &lt; à la limite de quantification &lt; 5%

Solution TO 0,7 mg/l &lt; à la limite de détection &lt; 3%

Solution Témoin &lt; à la limite de détection

LD = 0,0245 mg/l

LQ = 0,0815 mg/l

• **Echantillon :** ETHYL MERCATAN T72**Secteur :** CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE**Analyse :** QUANTI

Teneur en Ethylmercaptan dans l'essai définitif Algues : T72 heures

Solution TO 30 mg/l aAe = 4,73 mg/l

Solution TO 30 mg/l aSe = 8,20 mg/l 27%

Solution TO 14,3 mg/l bAe = 1,24 mg/l

Solution TO 14,3 mg/l bSe = 3,19 mg/l 22%

Solution TO 6,8 mg/l cSc = 0,468 mg/l 3%

Solution TO 3,2 mg/l dAe &lt; à la limite de détection

Solution TO 3,2 mg/l dSe &lt; à la limite de quantification

Solution Témoin tAe et tSe &lt; à la limite de détection

LD = 0,0245 mg/l

LQ = 0,0815 mg/l

505 / 99 / A

CAL / SAE

METHODE D'ANALYSE - Annexe 1

SUBSTANCE D'ESSAI :

ETHYLMERCAPTAN

MATRICE : eau ISO algues + hépès + NaHCO<sub>3</sub>

1° PARTIE : CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

ECHANTILLONNAGE

MOYEN DE PRELEVEMENT : seringues et pipettes

CONDITIONNEMENT  gaz inerte  froid  obscurité  
DE L'ECHANTILLON  autre :

PRISE D'ESSAI (quantité d'échantillon soumise au traitement) : 7,5 ml dans des flacons de 20 ml

TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

extraction solvant :  espace de tête  
 ajout d'étalon interne

TECHNIQUE ANALYTIQUE (TA)

Quantité soumise à la technique analytique : 1 ml gaz provenant de l'espace de tête

Appareillage

GC colonne :  remplie  capillaire  autre :  
détecteur :  FID  TCD  ECD  NPD  MSD  autre :

HPLC colonne :  RP  NP  ionique  exclusion  
détecteur :  UV  RI  autre :

SPECTROMETRIE  IR  UV-VIS  émission  fluorescence  
 AAS  four  flamme  sans flamme

AUTRE :

ETUDE DE FAISABILITE:

Ordre de grandeur de la limite de quantification (de TA) : 0,08 mg/l dans la matrice ISO algues + hépès + NaHCO<sub>3</sub>

Commentaires : RAS

Date :

2° PARTIE : VALIDATION DE LA METHODE

DOMAINE D'APPLICATION ( dans la matrice ) : 0,805 mg/l à 142,824 mg/l

TECHNIQUE ANALYTIQUE (TA)

Etalonnage :  ajouts  étalon interne  étalon externe  autre :

Intervalle de calibration ( de TA ) : 0,805 mg/l à 23,804 mg/l ( unité : mg/l)

Limite de détection ( de TA ) : 0,025 mg/l

Limite de quantification ( de TA ) : 0,0815 mg/l

Répétabilité ( à niveau de concentration : m = 1,695 mg/l ) CV = 7,3 %

Justesse ( écart en % ) : 0,885 %

REFERENCES de la méthode : MO/SAE/180

Commentaires

Date de fin de validation : 25/05/99

N° du (des) cahiers labo : 729

Ingénieur responsable : F. PENNEQUIN

Visa :

