

最 終 報 告 書

2-イソブトキシエタノール（被験物質番号 K-2038）の分解度試験

（試験番号：205215）

2012 年 1 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に電子化したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

2012 年 1 月 20 日

試験責任者

陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 2-イソブトキシエタノール（被験物質番号 K-2038）の分解度試験

試験番号 205215

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める
「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2012 年 1 月 20 日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 2-イソブトキシエタノール（被験物質番号 K-2038）の分解度試験

試験番号 205215

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011年10月27日	2011年10月27日
試験計画書	2011年10月28日	2011年10月28日
培養開始時	2011年10月31日	2011年10月31日
試験計画書の変更1	2011年11月28日	2011年11月28日
培養終了時	2011年11月28日	2011年11月28日
培養終了時	2011年12月5日	2011年12月5日
生データ、最終報告書草案	2012年1月20日	2012年1月20日
最終報告書	2012年1月20日	2012年1月20日

2012 年 / 月 20 日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. GLP基準	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 要 約	8
12. 試験材料	9
12.1 被験物質	9
12.2 対照物質	9
12.3 活性汚泥	10
13. 分解度試験の実施	10
13.1 試験の準備	10
13.2 試験液の調製	10
13.3 試験液培養装置及び培養条件	11
13.4 観察、測定等	11
13.5 試験液の分析	11
13.6 分解度の算出法	15
13.7 数値の取扱い	15
14. 試験条件の確認	15
15. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
16. 試験結果及び考察	16
16.1 試験液の状況	16
16.2 試験液の分析結果	16
16.3 分解度	17
16.4 変化物の定性分析結果	17
16.5 考 察	17
17. 結 論	18
18. 備 考	18
18.1 試験に使用した主要な装置・機器	18
18.2 分析に使用した試薬	18

Tables

Table-1	Calculation table for percentage biodegradation by BOD
Table-2	Calculation table for percentage biodegradation by DOC
Table-3	Calculation table for percentage biodegradation of test item

Figures

Fig. 1	Chart of BOD
Fig. 2-1	Chromatograms of LC-MS analysis for calibration curve
Fig. 2-2	Calibration curve of test item
Fig. 3	Chromatograms of LC-MS analysis for test solution
Fig. 4	Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution (detection ion : positive)
Fig. 5	Mass spectrum ([2] Sludge + test item, detection ion : positive)
Fig. 6	Mass chromatograms of LC-MS analysis for test solution (detection ion : positive)
Fig. 7	Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution (detection ion : negative)
Fig. 8	Mass spectrum ([2] Sludge + test item, detection ion : negative)
Fig. 9	Mass chromatograms of LC-MS analysis for test solution (detection ion : negative)
Fig. 10	Mass spectrum of test item
Fig. 11-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig. 11-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion

1. 表 題

2-イソブトキシエタノール（被験物質番号 K-2038）の分解度試験

2. 試験委託者

名 称 経済産業省

住 所 〒100-8901 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

4. 試験目的

K-2038 の微生物による分解性について知見を得る。

5. 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に定める「微生物等による化学物質の分解度試験」

6. GLP基準

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

7. 試験日程

試験開始日 2011 年 10 月 28 日

実験開始日 2011 年 10 月 31 日

実験終了日 2011 年 11 月 28 日

試験終了日 2012 年 1 月 20 日

8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ及びその他の記録、並びに被験物質は当試験施設に保管する。

保管期間は試験委託者から通知を受けるまでの期間とする。なお、保管期間中の被験物質の安定性は確認しない。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

9. 試験関係者

試験責任者

(所属 試験第一課)

試験担当者（分解度試験の実施）

活性汚泥管理責任者

10. 最終報告書の承認

2012年 / 月 20 日

試験責任者

11. 要 約

試験条件

被験物質濃度	100 mg/L
活性汚泥濃度	30 mg/L（懸濁物質濃度として）
試験液量	300 mL
試験液培養温度	25±1℃
試験液培養期間	28 日間（遮光下）

分解度算出のための測定及び分析

- 閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素消費量（BOD）の測定
- 全有機炭素分析法（TOC）による溶存有機炭素（DOC）の定量分析
- 液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）による被験物質の定量分析

試験結果

		（汚泥+被験物質）系			
		[2]	[3]	[4]	平 均
BOD 分解度	%	14	16	13	14
DOC 分解度	%	11	20	11	14
被験物質分解度 （LC-MS）	%	84	84	83	84

結 論

本試験条件下において、一部の被験物質は生分解されたが、大部分は 2-イソブトキシ酢酸に変化した。2-イソブトキシ酢酸は残りの被験物質と共に残留した。

12. 試験材料

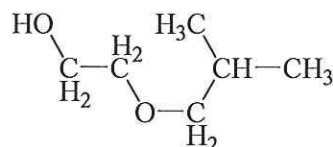
12.1 被験物質

a) 名称等

名 称	2-イソブトキシエタノール
被験物質番号	K-2038
CAS 番号	4439-24-1

b) 構造式等

構造式

分子式 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$

分子量 118.17

c) 供試試料

被験物質純度	99.4%
不純物	水分 0.15%
	残り 0.45%については不明

供給者

商品名

等 級

ロット番号

2-イソブトキシエタノール

被験物質は純度 100%として取り扱った。

d) 保管条件

室温暗所保管した。

e) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設において赤外吸収スペクトルにより構造を確認した (Fig. 11 参照)。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した (Fig. 11 参照)。

f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

12.2 対照物質

a) 名称等

名 称	アニリン
CAS 番号	62-53-3

b) 供給者及びロット番号

供給者	和光純薬工業
ロット番号	DCP5097

12.3 活性汚泥

5. の試験法に従い、日本国内の 10 か所から汚泥（河川、湖沼及び内海の表土を含む表層水、下水処理場の返送汚泥）を採集し、当試験施設において調製及び管理を行った活性汚泥（採集時期：2011 年 9 月、使用開始日：2011 年 10 月 11 日）を使用した。試験には合成下水（グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウムを精製水に溶解し、pH を 7.0 ± 1.0 に調整）を添加して 22.5 時間後の活性汚泥を用いた。

13. 分解度試験の実施

13.1 試験の準備

a) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

活性汚泥の添加量を決定するために、懸濁物質濃度を測定した。

測定方法 JIS K 0102-2010 の 14.1 に準じて行った。

測定実施日 2011 年 10 月 31 日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は 4040 mg/L であった。

b) 基礎培養基の調製

JIS K 0102-2010 の 21. に定められた組成の A、B、C 及び D 液各 3 mL に精製水（高杉製薬 日本薬局方）を加えて 1 L とする割合で 5 L 調製し、pH を 7.0 に調整した。

c) 活性汚泥の有効性の確認

アニリンを用いて活性汚泥が十分な活性度を有することを確認した。

13.2 試験液の調製

試験容器を 6 個用意し、試験液を下記の方法で調製した。これらの試験液について、13.3 の条件で培養を行った。

a) 被験物質及びアニリンの添加

1) （水+被験物質）系（1 個，試験容器 [1]）

被験物質濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に精製水 297 mL 及び 10.0 g/L の被験物質水溶液 3 mL を入れて pH を測定した。10.0 g/L の被験物質水溶液は、供試試料を電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して調製した。

2) （汚泥+被験物質）系（3 個，試験容器 [2] [3] [4]）

被験物質濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [297 mL から活性汚泥添加量 (2.23 mL) を差し引いた量] 及び 10.0 g/L の被験物質水溶液 3 mL を入れて pH を測定した。なお、10.0 g/L の被験物質水溶液は 1) で調製した被験物質水溶液を用いた。

3) （汚泥+アニリン）系（1 個，試験容器 [6]）

アニリンの濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加量 (2.23 mL) を差し引いた量] 及びアニリン 29.5 μ L (30 mg) を入れた。アニリンはマイクロシリンジで分取して添加した。

4) 汚泥ブランク系（1 個，試験容器 [5]）

試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加量 (2.23 mL) を差し引いた量] を入れた。

b) 活性汚泥の接種

2)、3)及び4)の試験液に懸濁物質濃度として 30 mg/L になるように活性汚泥を添加した。

13.3 試験液培養装置及び培養条件

a) 試験液培養装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

恒温槽（測定ユニットを含む） AI-0001（旭テクネイオン）

データ処理装置 OM7000A（大倉電気）

試験容器 ガラス製培養瓶

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム，No.1（和光純薬工業 二酸化炭素吸収用）

b) 培養条件

温 度 25±1℃

期 間 28 日間（遮光下）

攪拌方法 スターラーによる回転攪拌

c) 実施場所

機器室 1A

13.4 観察、測定等

a) 観 察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した。

b) 生物化学的酸素消費量（BOD）の測定

培養期間中、試験液の BOD の変化を連続的に閉鎖系酸素消費量測定装置で測定した。

また、閉鎖系酸素消費量測定装置の恒温槽内の温度を毎日記録した。

13.5 試験液の分析

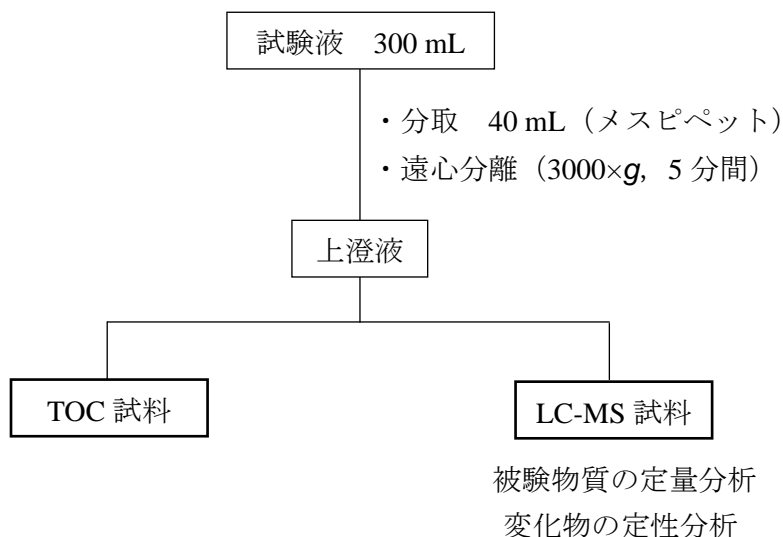
培養期間終了後、試験液中の溶存有機炭素（DOC）及び被験物質について分析し、定量困難な変化物について定性分析を実施した。

また、（水+被験物質）系及び（汚泥+被験物質）系の試験液の pH を測定した。

13.5.1 試験液の前処理

(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系及び汚泥ブランク系の試験液について以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、DOC を分析するための全有機炭素分析法 (TOC) 試料、被験物質の定量分析及び変化物の定性分析を行うための液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) 試料を調製した。

フロースキーム



13.5.2 定量及び定性分析

a) DOCの定量分析

TOC 試料中の DOC 濃度は、全炭素 (TC) 濃度から無機炭素 (IC) 濃度を差し引いて求めた。TC 濃度及び IC 濃度は TC 標準溶液 80.0 mgC/L 及び IC 標準溶液 40.0 mgC/L と TOC 試料のピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-2 参照)。なお、TC 標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解し、IC 標準溶液は炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムを精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度は DOC 濃度 1.0 mgC/L とした。

定量条件

機 器	全有機炭素計 TOC-V _{CPH} (島津製作所)
TC 炉温度	680℃
流 量	150 mL/min
注入量	50 µL

b) 被験物質の定量分析

被験物質の定量分析は、LC-MS で行った。

1) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するため、25.0、50.0 及び 100 mg/L の 3 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した (Fig. 2 参照)。その結果、得られた回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。

2) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフー質量分析計	
液体クロマトグラフ	Alliance2695	(Waters)
質量分析計	ZQ2000	(Waters)

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column2 ODS (100 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 µm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
溶離液	A (45%) : 5 mmol/L 酢酸アンモニウムのメタノール溶液 B (55%) : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液
流 量	0.2 mL/min
注入量	5 µL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	正イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン (m/z)	136 (Fig. 10 参照)
イオン源温度	120°C
脱溶媒システム温度	350°C
コーン電圧	10V

3) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 100 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを精製水で希釈して 100 mg/L の標準溶液とした。

LC-MS 試料中の被験物質の濃度は、100 mg/L の標準溶液及び LC-MS 試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-3、Fig. 3 参照)。ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 13000 (被験物質濃度 0.96 mg/L) とした。

c) 変化物の定性分析

変化物の定性分析は、LC-MS で行った。また、比較のため被験物質溶液についても同様に分析を行った (Figs. 4～9 参照)。

1) 分析条件

機 器 液体クロマトグラフー質量分析計

液体クロマトグラフ Alliance2695 (Waters)

質量分析計 ZQ2000 (Waters)

液体クロマトグラフ条件

カラム L-column2 ODS

(100 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構)

カラム温度 40°C

溶離液 A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウムのメタノール溶液/ぎ酸
(1000/1 v/v)

B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液/ぎ酸 (1000/1 v/v)

グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)
0.0	5	95
3.0	5	95
20.0	90	10

流 量 0.2 mL/min

注入量 10 μL

質量分析計条件

イオン化法 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

検出イオン 正イオン及び負イオン

検出法 スキャン

走査質量範囲 (m/z) 65～300

イオン源温度 120°C

脱溶媒システム温度 350°C

コーン電圧 正イオン : 10 V

負イオン : 30 V

2) 被験物質溶液の調製

13.5.2 b) 3) で調製した標準溶液を 100 mg/L の被験物質溶液とした。

13.5.3 回収試験

被験物質は試験液に溶解するため、回収試験は実施しなかった。

13.6 分解度の算出法

分解度は下記の式に基づき算出し、小数点以下1ケタ目を丸めて整数位で表示した。

a) BOD分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質)系の生物化学的酸素消費量(測定値: mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素消費量(測定値: mg)

TOD : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的酸素消費量
(計算値: mg)

b) DOC分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{DOCw} - \text{DOCs}}{\text{DOCw}} \times 100$$

DOCs : (汚泥+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量(測定値: mgC)

DOCw : (水+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量(測定値: mgC)

c) 被験物質分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{Sw} - \text{Ss}}{\text{Sw}} \times 100$$

Ss : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値: mg)

Sw : (水+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値: mg)

13.7 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401:1999 規則 B に従った。

なお、各元素の原子量は日本化学会が定める4桁の原子量表(2011)に従った。

14. 試験条件の確認

試験の有効性の基準値と本試験における値を下表に示す。本試験における値はいずれも基準値を満たしたことから、本試験は有効であった。

		本試験における値	基準値	Table
分解度の最大値と最小値の差	BOD 分解度	3%	20%未満	1
	DOC 分解度	9%		2
	被 験 物 質 分 解 度	1%		3
アニリンの BOD 分解度	14 日後	64%	60%以上	1

15. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

16. 試験結果及び考察

16.1 試験液の状況

試験液の状況は下表のとおりであった。

	試験液	状況（目視確認）	pH
培養開始時	（水 + 被験物質）系	被験物質は溶解した。	[1] 5.7
	（汚泥+被験物質）系	被験物質は溶解した。	[2] 7.0 [3] 7.0 [4] 7.0
培養終了時	（水 + 被験物質）系	不溶物は認められなかった。	[1] 5.8
	（汚泥+被験物質）系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖が認められた。	[2] 5.0 [3] 5.2 [4] 5.0

16.2 試験液の分析結果

28 日後の分析結果は下表のとおりであった。

		(水+被験物質)系	(汚泥+被験物質)系				理論量	Table	Fig.
		[1]	[2]	[3]	[4]				
BOD ^{*1}	mg	0.3	9.7	11.2	9.3	69.0	1	1	
DOC 残留量及び残留率 ^{*1}	mgC	19.7	17.6	15.8	17.5	18.3	2	-	
	%	108	96	86	95	-			
被験物質残留量及び残留率 (LC-MS)	mg	30.8	4.8	4.9	5.3	30.0	3	3	
	%	103	16	16	18	-			
変化物の検出 ^{*2} ・不検出 (LC-MS)	-	不検出	検出 (1成分)				-	-	4～9

*1 （汚泥+被験物質）系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示した。

*2 LC-MS による変化物の定性分析において、1 成分の変化物が（汚泥+被験物質）系で検出されたが（16.4 参照）、標品が入手不可能なため定量分析を実施することはできなかった。

16.3 分解度

28 日後の分解度は下表のとおりであった。

		(汚泥+被験物質) 系				Table
		[2]	[3]	[4]	平 均	
BOD 分解度	%	14	16	13	14	1
DOC 分解度	%	11	20	11	14	2
被験物質分解度 (LC-MS)	%	84	84	83	84	3

16.4 変化物の定性分析結果

(汚泥+被験物質) 系において、被験物質分解度 (平均 84%) よりも DOC 分解度 (平均 14%) が低かったことから、水溶性変化物の生成が示唆された。そこで、LC-MS による変化物の定性分析を実施した。

被験物質溶液、(水+被験物質) 系及び (汚泥+被験物質) 系において、正イオン検出のトータルイオンカレントクロマトグラム上保持時間約 15 分にピークが検出された (Fig. 4 参照)。このピークの質量スペクトルを解析した結果、被験物質溶液及び (水+被験物質) 系では被験物質由来のイオンのみが、(汚泥+被験物質) 系では被験物質及び変化物 (変化物 A とした) 由来のイオンが検出された (Figs. 5, 6 参照)。負イオン検出では、(汚泥+被験物質) 系で変化物 A 由来のイオンが検出された (Figs. 7~9 参照)。検出されたイオンから、変化物 A は 2-イソブトキシ酢酸と推定された (下表参照)。

(汚泥+被験物質) 系で検出された変化物 (Figs. 4~9 参照)

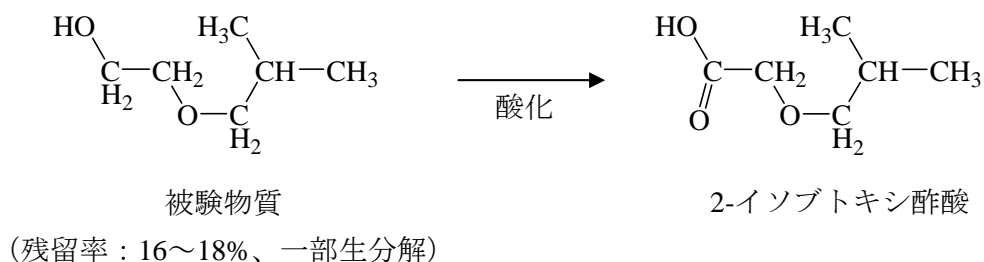
変化物	検出イオン (m/z)	推定分子量	推定構造式
A	150 $[M+NH_4]^+$ 131 $[M-H]^-$	132	

16.5 考 察

(水+被験物質) 系において、被験物質は全て残留した。一方 (汚泥+被験物質) 系では、被験物質残留率は 16~18% と低く、変化物として 2-イソブトキシ酢酸が検出された (16.4 参照)。BOD 分解度及び DOC 分解度の平均値が 14% であったこと並びにその他の変化物は検出されなかったことから、一部の被験物質については生分解されたと推察される。なお、2-イソブトキシ酢酸の生成に伴って試験液の pH が 5.0~5.2 に低下したと考えられ、このため微生物の活性が低下し被験物質の生分解が平均 14% にとどまった可能性がある。

以上より、本試験において一部の被験物質は生分解されたが、大部分は 2-イソブトキシ酢酸に変化し、2-イソブトキシ酢酸は残りの被験物質と共に残留したと結論される。

(汚泥+被験物質)系における被験物質の変化(推定)



17. 結 論

本試験条件下において、一部の被験物質は生分解されたが、大部分は 2-イソブトキシ酢酸に変化した。2-イソブトキシ酢酸は残りの被験物質と共に残留した。

18. 備 考

18.1 試験に使用した主要な装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所	IRPrestige-21
閉鎖系酸素消費量測定装置	:	11 頁参照	
全有機炭素計	:	12 頁参照	
液体クロマトグラフィー質量分析計	:	13 頁参照	
天びん	:	ザルトリウス	CP224S
	:	ザルトリウス	ME235P
pH 計	:	東亜ディーケーケー	HM-50G
遠心分離機	:	久保田製作所	5922

18.2 分析に使用した試薬

超純水	:	水道水を超純水装置システムで処理した水	
メタノール	:	和光純薬工業	HPLC 用
精製水	:	高杉製薬	日本薬局方
炭酸水素ナトリウム	:	和光純薬工業	試薬特級
炭酸ナトリウム	:	和光純薬工業	試薬特級
フタル酸水素カリウム	:	和光純薬工業	試薬特級
酢酸アンモニウム	:	和光純薬工業	試薬特級
ぎ酸	:	和光純薬工業	試薬特級

Study No. 205215

(Test item K-2038)

Cultivation conditions:

Concentration

Test item 100 (mg/L)

Reference item (aniline) 100 (mg/L)

Activated sludge 30 (mg/L)

Temperature 25 ± 1 °C

Duration 28days (Oct.31,2011 - Nov.28,2011)

Note: —

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	0.0	0.0	0.3	0.3
[2]	Sludge + test item	9.7	13.2	15.0	15.0
[3]	Sludge + test item	7.6	14.3	16.5	16.5
[4]	Sludge + test item	8.6	12.8	14.6	14.6
[5]	Control blank [B]	2.2	2.9	5.3	5.3
[6]	Sludge + aniline	49.5	61.0	69.6	69.7

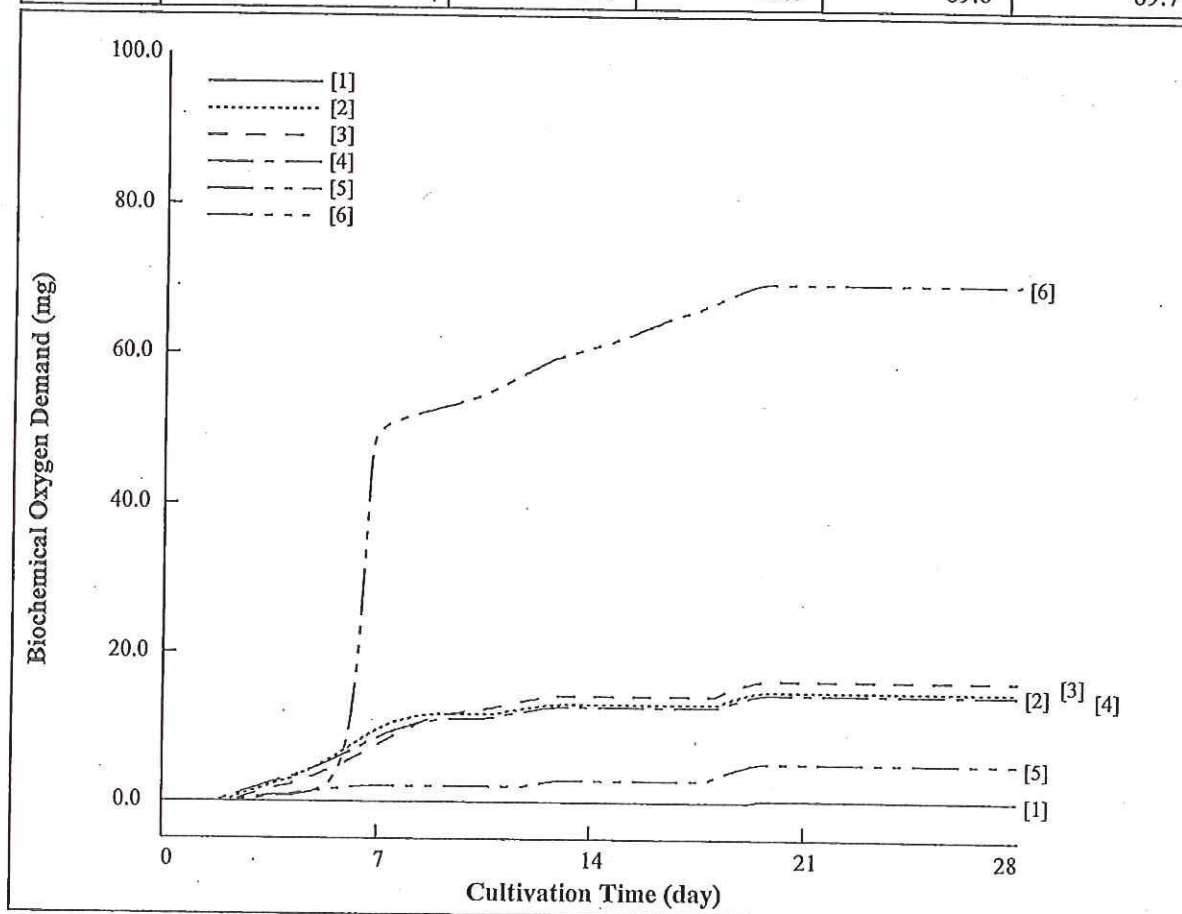


Fig. 1 Chart of BOD.

Nov.28,2011 Name