

環境庁殿

試 験 報 告 書

パルミチン酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号:NMMP/E99/1010)

平成12年12月11日作成

株式会社 東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : パルミチン酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E99/1010

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 12 年 12 月 22 日

運営管理者

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : パルミチン酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E99/1010

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。

記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 / 2年 3 月 14日	平成 12年 3 月 14 日
試験報告書監査	平成 12 年 5 月 1 日	平成 12年 10月 20 日

平成 12年 12月 22日

信頼性保証業務担当者

試験実施概要

1. 表題 : パルミチン酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的 : パルミチン酸について、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を行い、生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984年) に準拠して実施した。
4. 適用GLP : 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
- 名称 : 環境庁
- 住所 : (〒100-8975) 東京都千代田区霞が関 1-2-2
- 委託責任者 : 企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者
- 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター
- 所在地 : (〒103-0022) 東京都中央区日本橋室町 3-1-8 都ビル内
7. 試験施設
- 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部
- 所在地 : (〒455-8502) 愛知県名古屋市港区大江町 9-1

8. 試験関係者:

試験責任者 (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者 (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者 (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者 (平成 12 年 12 月 21 日)

9. 試験期間: 試験開始日 平成 11 年 11 月 16 日
 暴露期間 平成 12 年 3 月 14 日 ～ 平成 12 年 3 月 17 日
 試験終了日 平成 12 年 12 月 21 日

10. 保管:

~~試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社「東エリサーチセンター」名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。~~ 訂正

II. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
P.5 (下から4行)	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および 試験報告書は、試験報告書作成後10年 間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋 研究部の保管施設に保管する。その後の 保管については試験委託者と協議のうえ 決定する。	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および 試験報告書は、試験報告書作成後10年 間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋 研究部の保管施設あるいは当社研究部の 査察・監査のもとに外部保管施設である株 式会社ワンビシアーカイブズに保管する。そ の後の保管については試験委託者と協議の うえ決定する。	2002 年 7 月	今後、当研究部試資料保管施設 の保管容量が不足するため、外部 保管施設である株式会社ワンビシアー カイブズを利用する。

III. 署名, 承認

変更届作成日 : 2002 年 07 月 11 日

試験責任者(変更届作成者)

: _____ (2002 年 07 月 11 日)

QAU 担当者 確認 : _____ (2002 年 07 月 11 日)

運営管理者 承認 : _____ (2002 年 07 月 11 日)

試験委託者: 環境省

委託責任者

総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室 室長補佐

承認 : _____ (2002 年 8 月 5 日)

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性	9
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 培地	10
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器	10
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	11
4 結果の算出	12
4.1 藻類生長曲線	12
4.2 藻類生長阻害濃度の算出	12
4.3 無影響濃度(NOEC)の算出	13
4.4 使用した統計手法	13
5 結果および考察	14
5.1 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	14
5.2 試験液中の被験物質濃度	14
5.3 藻類生長曲線	14
5.4 生長阻害濃度(EC50)および無影響濃度(NOEC)	14
5.5 温度および pH	15
Table 1～7	16～22
Figure 1～3	23～25
添付資料－1 試験液の分析方法	26

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題パルミチン酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験試験番号

NMMP/E99/1010

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドラインNo.201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : パルミチン酸
- 2) 培養方式 : 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供試生物種 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC-22662)
- 4) 温度 : 23 ± 2 °C
- 5) 暴露期間 : 72 時間
- 6) 試験液量 : 100 mL (OECD培地)
- 7) 照明 : 4000 ~ 5000 lux (連続照明)
- 8) 初期細胞濃度 : 1×10^4 cells/mL
- 9) 試験濃度(設定) : 対照区、助剤対照区 および 10.0mg/L (限度試験)
- 10) 試験液中の被験物質の分析
: GC法 (暴露開始時、終了時)

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度

$$\text{EbC50(0-72)} = 0.9\text{mg/Lを越える} (>0.9\text{mg/L})$$
$$\text{無影響濃度(NOEC(面積法 0-72))} = 0.9\text{mg/Lを越える} (>0.9\text{mg/L})$$

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50(24-48) = 0.9mg/L を越える (>0.9mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-48)) = 0.9mg/L を越える (>0.9mg/L)

ErC50(24-72) = 0.9mg/L を越える (>0.9mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-72)) = 0.9mg/L を越える(>0.9mg/L)

(上記濃度は、全て暴露開始時の実測濃度に基づく値)

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : パルミチン酸

別名 ヘキサデカン酸(識別符号 PA)、CAS:57-10-3

構造式 : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

分子式 : $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$

分子量 : 256.43

融点 : 63℃

沸点 : 351℃

水への溶解度 : 0.82mg/L(25℃)

1-オクタノール／水 分配係数(logP) : 5.64

[上記の数値は、次のデータベースなどから引用した]

TOXNET : National Library of Medicine (Toxicology Data Network)

ICSC : International Chemical Safety Cards

ECDIN : Environmental Chemicals Data Information Network

1.2 供試試料

純度 : 95.0%以上

ロット番号 : C99714L

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量 : 25g×2本

入手日 : 平成11年9月17日

外観 : 白色結晶

1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は光遮断した試料保管庫に室温で保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定およびガスクロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定・分析したスペクトルおよびクロマトグラムと比較した結果、変化はなかった。

従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、American Type Culture Collectionより入手したATCC-22662株を、当研究部において無菌的に継代培養しているものである。

基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による72時間の生長阻害濃度(EbC50)は、0.52mg/Lであった。

前培養

試験に供す藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間培養したものを使用した。培養後、顕微鏡観察を行ない変形や異常な細胞が現れていないことを確認した。

3 試験方法

3.1 試験条件

以下の条件で試験を行った。但し、試験容器は滅菌したものを使用し、藻類の接種も無菌条件下で行った。

- | | |
|-----------|----------------------------|
| 1) 培養方式 | : 振とう培養(100rpm) |
| 2) 温度 | : 23 ± 2 °C |
| 3) 暴露期間 | : 72 時間 |
| 4) 試験液量 | : 100 mL(OECD 培地) |
| 5) 照明 | : 4000~5000 lux(連続照明) |
| 6) pH | : 暴露期間中、pH の調整は行わなかった。 |
| 7) 初期細胞濃度 | : 1×10^4 cells/mL |

3.2 培地

前培養および試験ともに OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地を調製し、滅菌して使用した。

[Table1(p.16)]

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器

- | | |
|----------|---------------------------------|
| 試験容器 | : 300 mL容ガラス製三角フラスコ(通気性のシリコン栓付) |
| 藻類培養試験装置 | : 伊藤製作所 AGP-150RL |
| 光学顕微鏡 | : ニコン 培養倒立顕微鏡 TMS-F |
| pHメーター | : 堀場製作所 カスタニーLAB pHメーター F-22 |
| 粒子計数装置 | : コールター社 コールターZ1 |

粒子計数装置用電解液：アイソトンII

温度計：アルコール温度計

照度計：東京光電(株) デジタル照度計 ANA-F12

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立って予備試験を行い、EbC50(0-72h)を 100mg/L 以上と推定した。

この結果から、助剤濃度 100mg/L 下で被験物質を均一に微分散できる最高濃度 10.0mg/L の限度試験とした。

3.5 試験液の調製

本被験物質は水に難溶のため、分散助剤として、藻類に対して毒性の低い硬化ひまし油(HCO-50)を用いた。培地に被験物質を加え100mg/L 溶液を調製し、これを被験物質原液(HCO-50 濃度:1000mg/L)とした。試験液は被験物質原液にろ過滅菌した培地を加えて調製した後、更にろ過滅菌した。濃度区および対照区毎に4個の試験容器を用いた。このうち1個は pH 測定用および試験液の分析用とし、細胞数の計数には用いなかった。対照区には培地を用いた。培地に HCO-50 100mg/L を加えた助剤対照区を設けた。試験液は無色透明で、沈殿等は見られなかった。

3.6 試験液の分析

試験液濃度の分析はガスクロマトグラフクロマトグラフ (GC) 法により行った。

暴露開始時(菌体混合直前、0時間)は各濃度区3連の試験容器とは別に用意した容器から試験液を等量ずつ採取し分析した。暴露終了時(72 時間)は各濃度区3連の試験容器から試験液を等量ずつ採取し混合後、遠心分離(2000rpm、23℃、15 分)により藻体を除去してから分析した。

分析法の詳細は添付資料-1(p.26)に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 cells/mL になるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置して試験を開始し、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験容器より試験液 0.2mL～1.0mL を採取し、電解液(アイソトン II)と混合して全量を 20mL とした後、コールタカウンターにより計測した。

試験液調製時の pH は 3 連の他に用意した予備1本についてのみ測定し、各濃度区の暴露開始時の pH とした。終了時には各濃度区の 3 連のうち1本を測定した。

試験期間中、培養装置内の温度と照度を1日1回測定した。

4 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

各濃度区および対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

4.2 藻類生長阻害濃度の算出

次に下記の方法で生長阻害濃度を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (EbC50)

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

ここで、

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率 (I_A) を次の式により算出した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

ここで、

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

限度試験のため、濃度区に対応する I_A 値が 50%を越えない場合は EbC50(0-72)は濃度区以上とした。

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度 (μ) を次の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

ここで、

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率 (I_m) を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

限度試験のため、濃度区に対応する I_m 値が 50% を越えない場合は ErC50(24-48)、ErC50(24-72) は濃度区以上とした。

4.3 無影響濃度(NOEC)の算出

F&t-test により対照区と濃度区を比較して、有意な差(5%水準)が認められない場合、無影響濃度 (NOEC) は濃度区以上とした。

4.4 使用した統計手法

F&t-test は Yukms StatLight #3 「2 群の比較」により計算した。

5 結果および考察

5.1 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

なし。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質濃度は 0.9mg/L であり、暴露 72 時間の被験物質濃度は定量限界 (0.8mg/L) 以下であった。

設定濃度 (10.0 mg/L) に対する割合は、暴露開始時が 9.0%、暴露 72 時間が <8.0% であった。

[Table 2 (p.17)]

暴露開始時の実測濃度が設定濃度の ±20% を外れたので、試験結果の算出には暴露開始時の実測濃度を用いた。

5.3 藻類生長曲線

1) 対照区および助剤対照区における細胞濃度は 72 時間の培養でそれぞれ 188.4 倍、191.1 倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。

2) 濃度区 (0.9mg/L) では 72 時間の培養で細胞濃度が 194.3 倍に増殖し、対照区と同程度の生長を示した。

[Table 3 (p.18), Figure 1 (p.23)]

5.4 生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (EbC50)

EbC50(0-72) は >0.9mg/L であった。

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度 (無影響濃度 (NOEC)) は、>0.9mg/L (NOEC(面積法 0-72)) であった。

[Table 4(p.19), Table 5(p.20), Figure 2(p.24)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

ErC50(24-48) と ErC50(24-72) は、いずれも >0.9mg/L であった。

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度 (無影響濃度 (NOEC)) は、それぞれ >0.9mg/L (NOEC(速度法 24-48))、>0.9mg/L (NOEC(速度法 24-72)) であった。

[Table 4(p.19), Table 5(p.20), Figure 3 (p.25)]

5.5 温度および pH

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 22.0～23.0℃であり、その平均温度は 22.7℃であった。

試験液の pH は暴露開始時が 7.5～7.6 であり、試験終了時が 8.4～9.1 であった。

[Table 6(p.21), Table 7(p.22)]

以 上

Table 1 OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
KH ₂ PO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15

Table 2. Measured Concentrations of Palmitic acid During a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.8	—	<0.8	—
Dispersant Control	<0.8	—	<0.8	—
10.0	0.9	9.0	<0.8	<8.0

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Measured Concentration (mg/L)	No.	Cell Density($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	6.2	32.9	194.1
	2	1.00	5.4	35.5	182.2
	3	1.00	5.9	30.4	188.9
	Average	1.00	5.8	32.9	188.4
	S.D.	0.00	0.41	2.58	5.94
Dispersant Control	1	1.00	5.3	31.7	188.8
	2	1.00	6.1	30.3	185.4
	3	1.00	6.1	32.8	199.2
	Average	1.00	5.8	31.6	191.1
	S.D.	0.00	0.47	1.24	7.18
0.9	1	1.00	5.3	35.1	195.8
	2	1.00	5.6	35.1	199.4
	3	1.00	6.1	33.2	187.7
	Average	1.00	5.7	34.5	194.3
	S.D.	0.00	0.37	1.08	5.99

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Measured Concentration		Area $\times 10^4$	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
(mg/L)	No.	A (0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _m (24-48h)	μ (24-72h)	I _m (24-72h)
Control	1	3206	—	0.0697	—	0.0718	—
	2	3108		0.0789		0.0735	
	3	3076		0.0686		0.0724	
	Average	3130		0.0724		0.0726	
Dispersant Control	1	3094	-0.05	0.0748	2.59	0.0746	-0.31
	2	3038		0.0669		0.0712	
	3	3263		0.0701		0.0727	
	Average	3131		0.0705		0.0728	
0.9	1	3260	-3.36	0.0787	-4.03	0.0752	-1.51
	2	3310		0.0762		0.0743	
	3	3135		0.0710		0.0716	
	Average	3235		0.0753		0.0737	

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on 1A value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72)	>0.9	— ~ —
NOECb (0-72)	>0.9	----

Based on Im value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48)	>0.9	— ~ —
NOECr (24-48)	>0.9	----
ErC50 (24-72)	>0.9	— ~ —
NOECr (24-72)	>0.9	----

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber During a 72-Hour Exposure

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.0
24	22.8
48	23.0
72	22.9
Average	22.7

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure

Measured Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.5	8.4
Dispersant Control	7.6	8.4
0.9	7.6	9.1

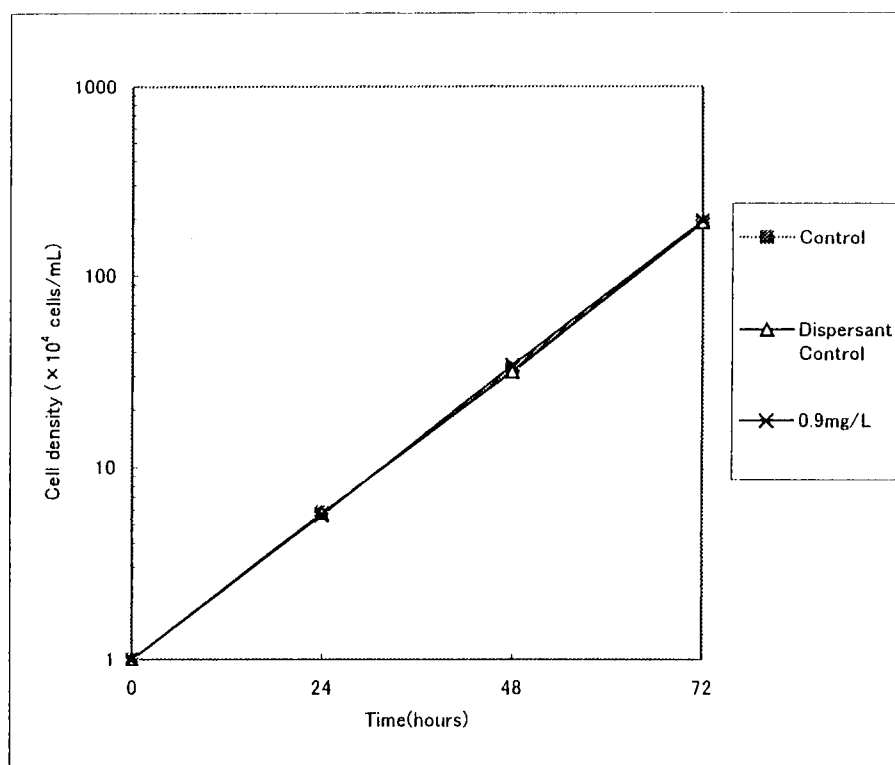
Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

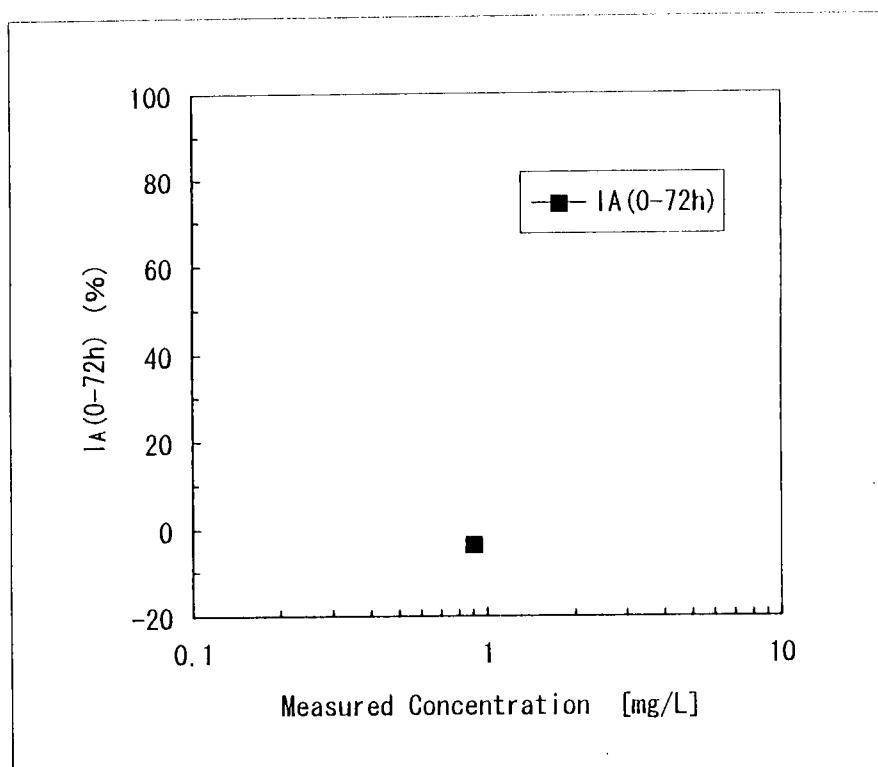
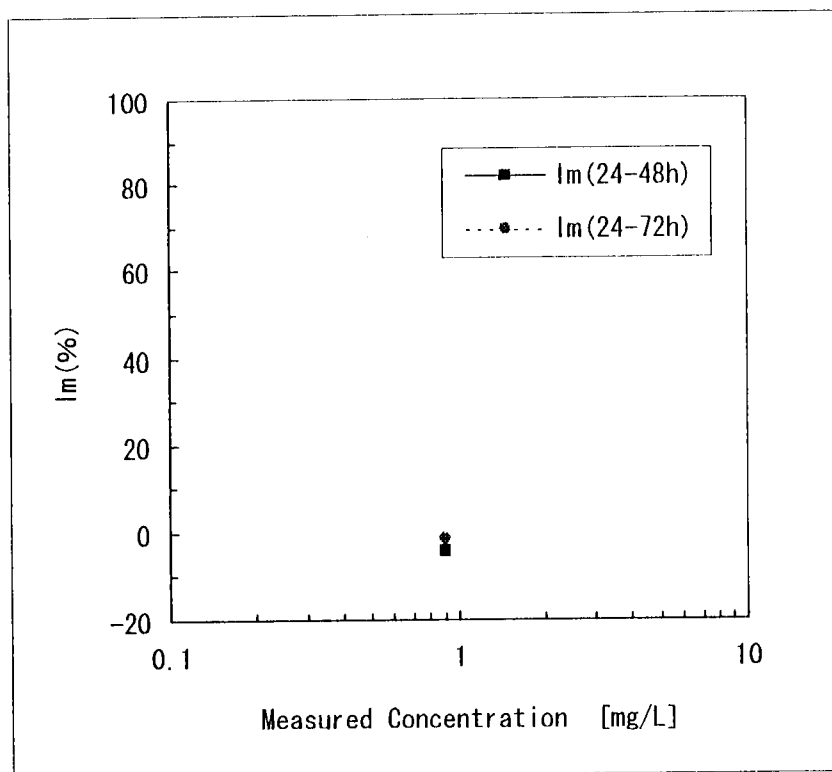


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_m value



添付資料－1

試験液の分析方法

(全 6 頁)

試験液の分析方法

1. 試験液の分析方法

暴露開始時は3連の試験容器とは別に用意した容器より、試験液各 5.0～7.0mL の一定量をスクリー管瓶に採取する。

暴露終了時は3連の試験容器より試験液各 3.0～5.0mL の一定量を採取し、合わせて遠心分離する。その上澄み液 5.0～7.0mL 程度をスクリー管瓶に採取する。

GC のオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2. ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

カラム	:TC-17、0.53mmID × 15m
カラム温度	:150℃
検出器	:FID
検出器温度	:250℃
注入口温度	:250℃
注入量	:1 μ L
キャリアガス	:He
流 量	:20 mL / min(室温)

3. 検量線

定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。

[Figure 1(p.28)]

測定日毎に 10mg/L の標準溶液を測定して、その面積値を用いて検量線を作成した。

4. 添加回収率

試験培地に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

パルミチン酸 50mg/L の回収率は 106.47%であった。

5 クロマトグラム

代表的ないくつかのクロマトグラムを示した。

[Figure 2(p.29～p.32)]

Figure 1 Calibration Curve of Palmitic acid by GC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (μ V*sec.)
1	5	2500
2	10	5119
3	20	10153
4	50	26562
5	100	53396

$$X(\text{Concentration}) = Y(\text{Peak Area}) * 0.001878$$

$$r^2 = 0.999836$$

r^2 : coefficient of correlation

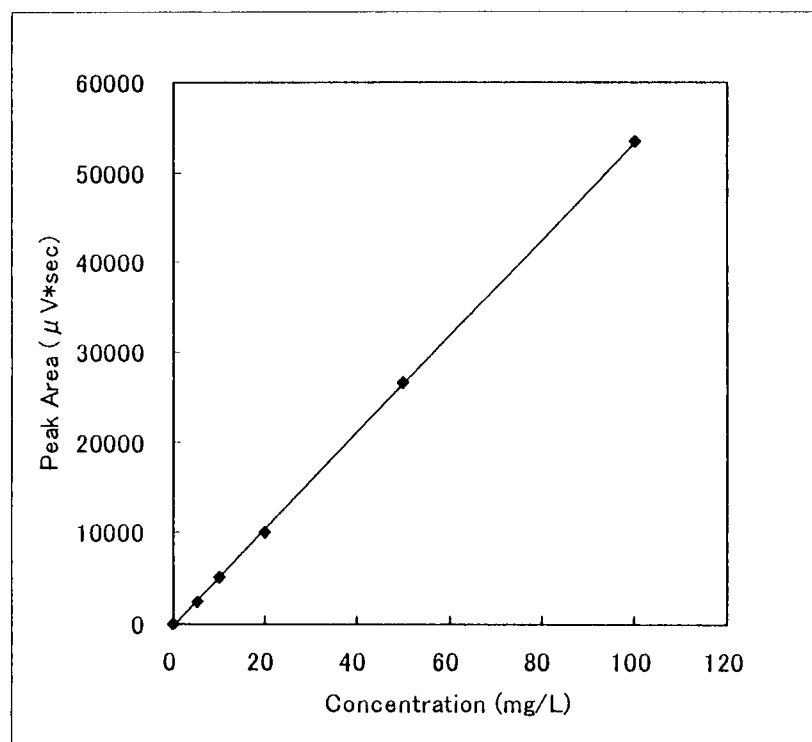
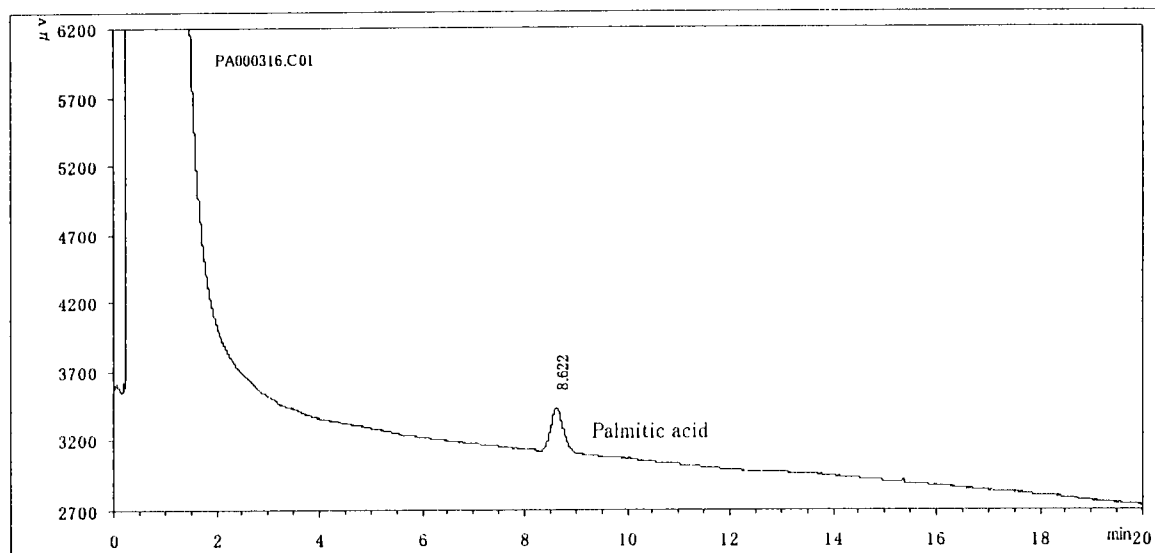


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 10 mg/L ; 0 h



(2) Standard 10 mg/L ; 72 h

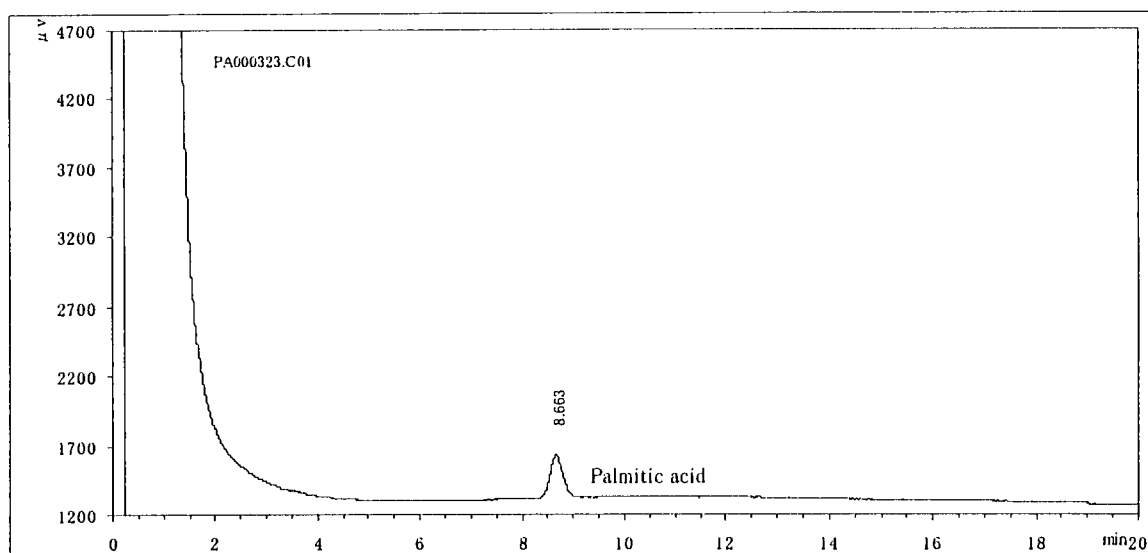
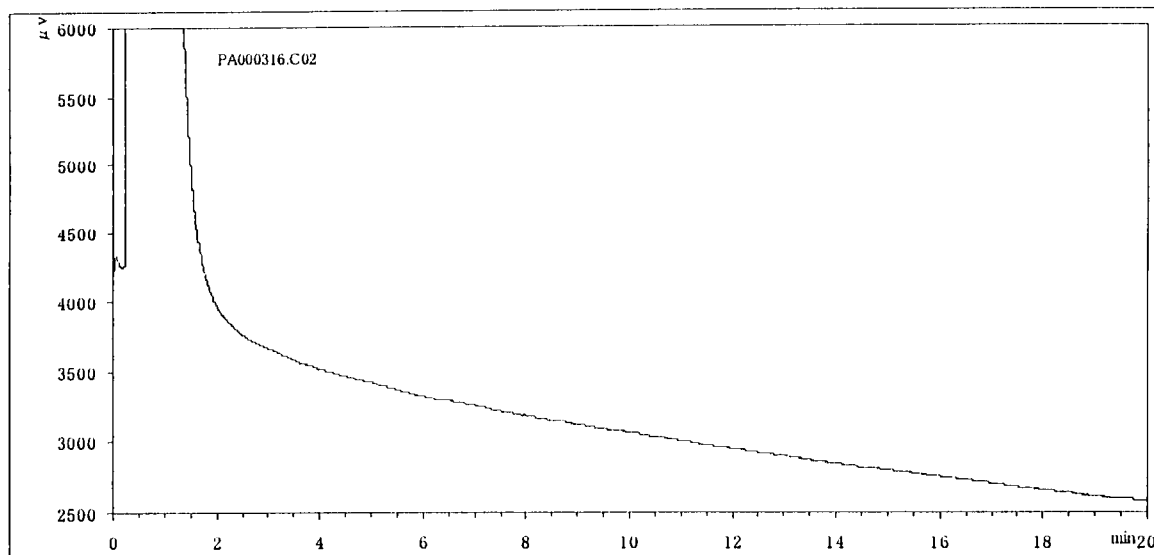


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0 h



(4) Control; 72 h

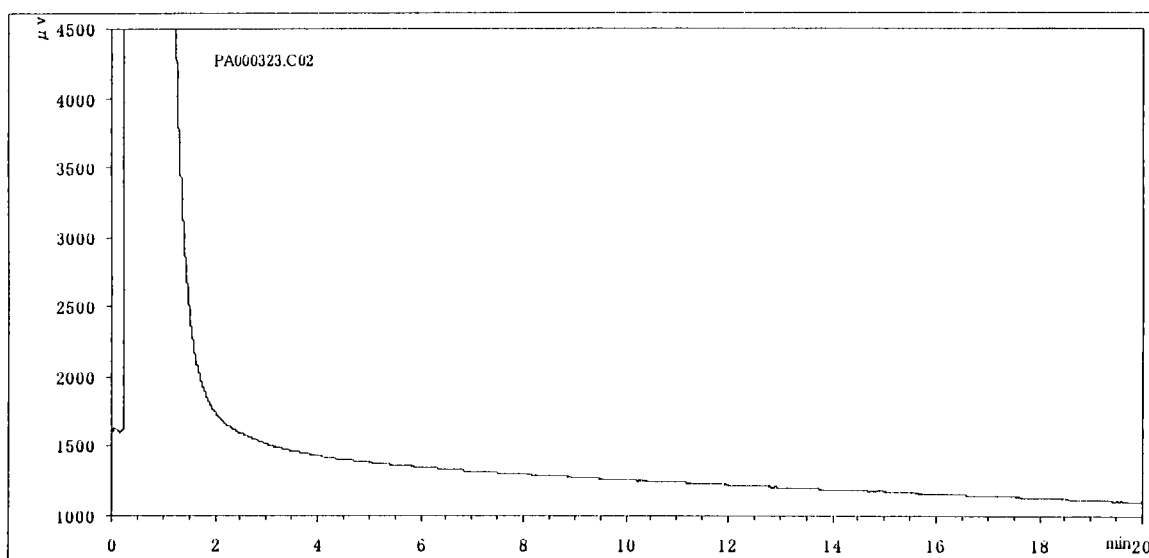
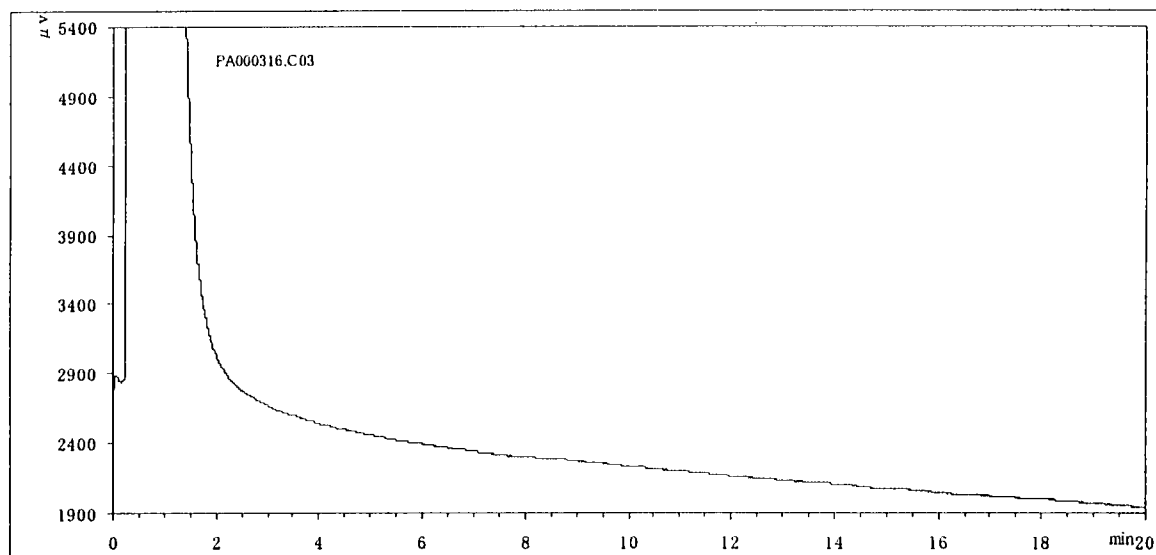


Figure 2 Continued

(5) Dispersant Control ; 0 h



(6) Dispersant Control ; 72 h

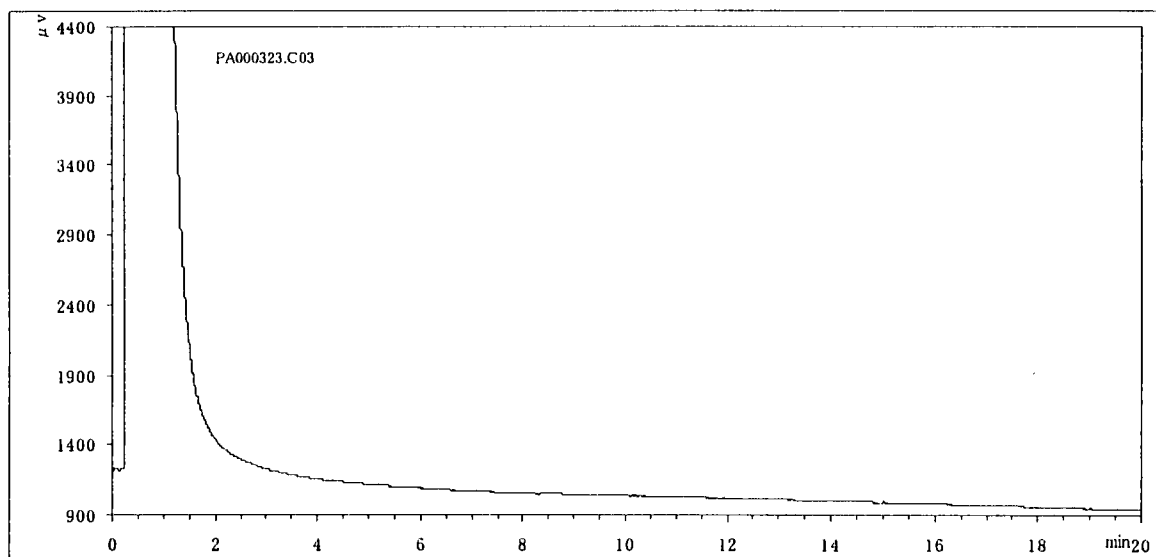
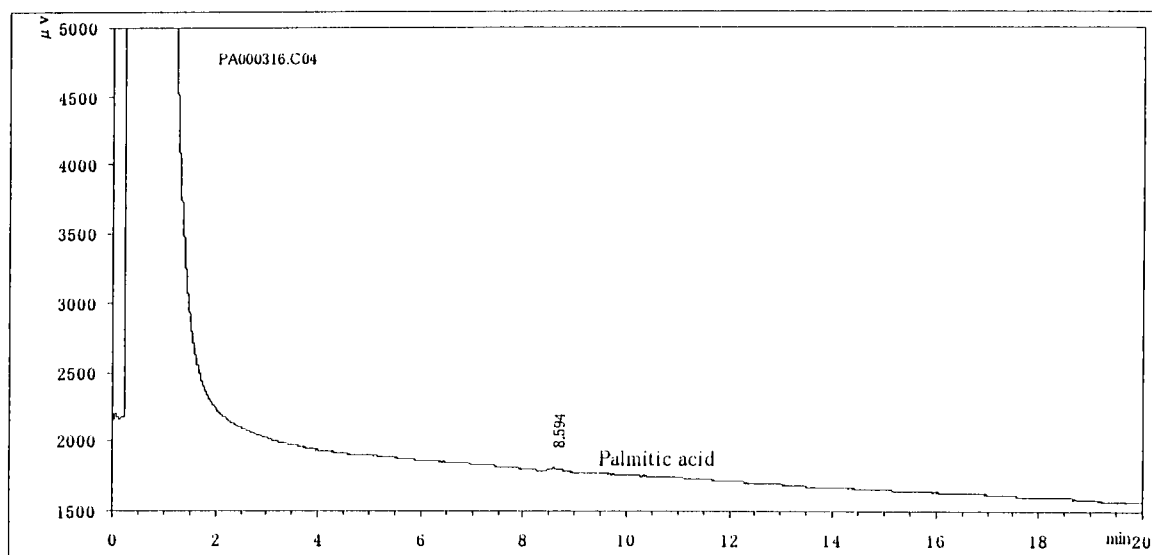


Figure 2 Continued

(7) 10.0 mg/L nominal; 0 h



(8) 10.0 mg/L nominal; 72 h

