

環境庁殿

試 験 報 告 書

2-メチル-2-プロペンアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号:NMMP/E99/1020)

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 : 2-メチル-2-プロペンアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害
試験

試験番号 : NMMP/E99/1020

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 / 2 年 / 2 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 : 2-メチル-2-プロペンアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害
試験

試験番号 : NMMP/E99/1020

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 12年 2月 2日	平成 12年 2月 2日
試験報告書監査	平成 12年 5月 / 日	平成 12年 6月 19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 :2-メチル-2-プロペンアミドの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験
2. 試験目的 :2-メチル-2-プロペンアミドについて、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

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

2-メチル-2-プロペンアミドの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

NMMP/E99/1020

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 :2-メチル-2-プロペンアミド
- 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 :1×10⁴ cells/mL
- 9) 試験濃度(設定) :対照区 および 1000 mg/L (限度試験)
556 mg/L (公比 1.8) (追加試験)
- 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
EbC50(0-72) = 1000mg/L を超える (>1000 mg/L)
無影響濃度(NOEC(面積法 0-72)) = 556mg/L

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50(24-48) = 1000mg/Lを超える (>1000 mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-48)) = 1000mg/Lを超える (>1000 mg/L)

ErC50(24-72) = 1000mg/Lを超える (>1000 mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-72)) = 1000mg/Lを超える (>1000 mg/L)

(上記濃度は、全て設定濃度に基づく値)

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称	:2-メチル-2-プロペンアミド 別名:メタクリルアミド、識別符号:MP、CAS:79-39-0
構造式	: $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$
分子式	: $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$
分子量	:85.11
融点	:109°C
沸点	:215°C
水への溶解度	:41g/100g (30°C)

[上記の数値は、次のデータベースおよび「11290の化学商品」化学工業日報社から引用した]

ECDIN :Environmental Chemicals Data Information Network

1.2 供試試料

純度	:98%以上
ロット番号	:D12358J
供給者	: XXXXXXXXXX
供給量	:25g×2本
入手日	:平成11年9月17日
外観	:白色粉末

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、変化は無かった。

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、0.52 mg/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。 [Table 1(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 1000mg/L 以上と推定した。

この結果から、本試験では 1000mg/L の限度試験とした。しかし、対照区と濃度区に有意な差が認められたため、公比 1.8 でさらに1濃度区(556 mg/L)追加して試験を行った。

3.5 試験液の調製

培地に被験物質を溶解して 1000mg/L 溶液とし、これをろ過滅菌して被験物質原液とした。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 測定用とし、試験液の分析や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。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高速液体クロマトグラフ(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

最高濃度区に対応する I_A 値が 50% を越えない場合は EbC50 (0-72) は最高濃度区以上であるとされた。

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

最高濃度区に対応する I_m 値が 50%を越えない場合は ErC50(24-48)、ErC50(24-72)は最高濃度区以上であるとした。

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)が認められない最高試験濃度を無影響濃度(NOEC)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599～1011 mg/Lであり、暴露 72 時間の被験物質濃度は556～926mg/Lであった。

設定濃度に対する割合は、暴露開始時が101.1～107.7 %、暴露 72 時間が92.6～100.0 %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%以内であったため試験結果の算出には設定濃度を用いた。

5.3 藻類生長曲線

1) 対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で201.6 ～204.4 倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。

2) 濃度区では 72 時間の培養で197.3 ～212.2 倍に増殖した。

[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>1000mg/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、556mg/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、それぞれ>1000mg/L、>1000mg/Lであり、

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 >1000mg/L (NOEC(速度法 24-48))、>1000mg/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21.8～22.8℃であり、その平均温度は22.5℃であった。追加試験における72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は21.2～23.0℃であり、その平均温度は22.5℃であった。

試験液の pH は暴露開始時が 7.0～7.3 であり、試験終了時が 8.1～8.6 であった。追加試験における試験液の pH は暴露開始時が 7.3～7.5 であり、試験終了時が 8.9～9.0 であった。

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

以上

Table 1 OECD medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
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 2-Methyl-2-propenamide During a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum*

Original Test

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.5	—	<0.5	—
1000	1011	101.1	926	92.6

Supplemental Test

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.5	—	<0.5	—
556	599	107.7	556	100.0

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*Original Test

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Cell Density($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	5.5	34.0	205.0
	2	1.00	5.0	35.1	197.2
	3	1.00	6.0	35.0	202.5
	Average	1.00	5.5	34.7	201.6
	S.D.	0.00	0.48	0.61	4.00
1000	1	1.00	4.7	32.9	191.6
	2	1.00	5.6	29.4	200.6
	3	1.00	4.7	29.6	199.9
	Average	1.00	5.0	30.6	197.3
	S.D.	0.00	0.52	1.94	5.01

Supplemental Test

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Cell Density($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	5.2	36.7	218.5
	2	1.00	5.6	36.7	202.2
	3	1.00	4.7	27.1	192.5
	Average	1.00	5.2	33.5	204.4
	S.D.	0.00	0.46	5.55	13.13
556	1	1.00	5.0	40.4	225.1
	2	1.00	5.6	38.6	204.6
	3	1.00	5.3	42.8	206.8
	Average	1.00	5.3	40.6	212.2
	S.D.	0.00	0.29	2.09	11.26

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Original Test

Nominal 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	3346	-	0.0761	-	0.0755	-
	2	3268		0.0809		0.0764	
	3	3353		0.0735		0.0733	
	Average	3323		0.0768		0.0751	
1000	1	3141	4.82	0.0808	1.59	0.0772	-2.08
	2	3187		0.0691		0.0745	
	3	3160		0.0769		0.0783	
	Average	3163		0.0756		0.0767	

Supplemental Test

Nominal 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	3569	-	0.0811	-	0.0777	-
	2	3381		0.0787		0.0749	
	3	3013		0.0734		0.0775	
	Average	3321		0.0777		0.0767	
556	1	3729	-7.99	0.0873	-9.36	0.0794	-0.34
	2	3454		0.0808		0.0751	
	3	3576		0.0869		0.0763	
	Average	3586		0.0850		0.0770	

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on IA value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72)	>1000	— ~ —
NOECb (0-72)	556	----

Based on Im value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48)	>1000	— ~ —
NOECr (24-48)	>1000	----
ErC50 (24-72)	>1000	— ~ —
NOECr (24-72)	>1000	----

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

Original Test

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	21.8
24	22.5
48	22.8
72	22.8
Average	22.5

Supplemental Test

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	21.2
24	23.0
48	22.9
72	23.0
Average	22.5

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

Original Test

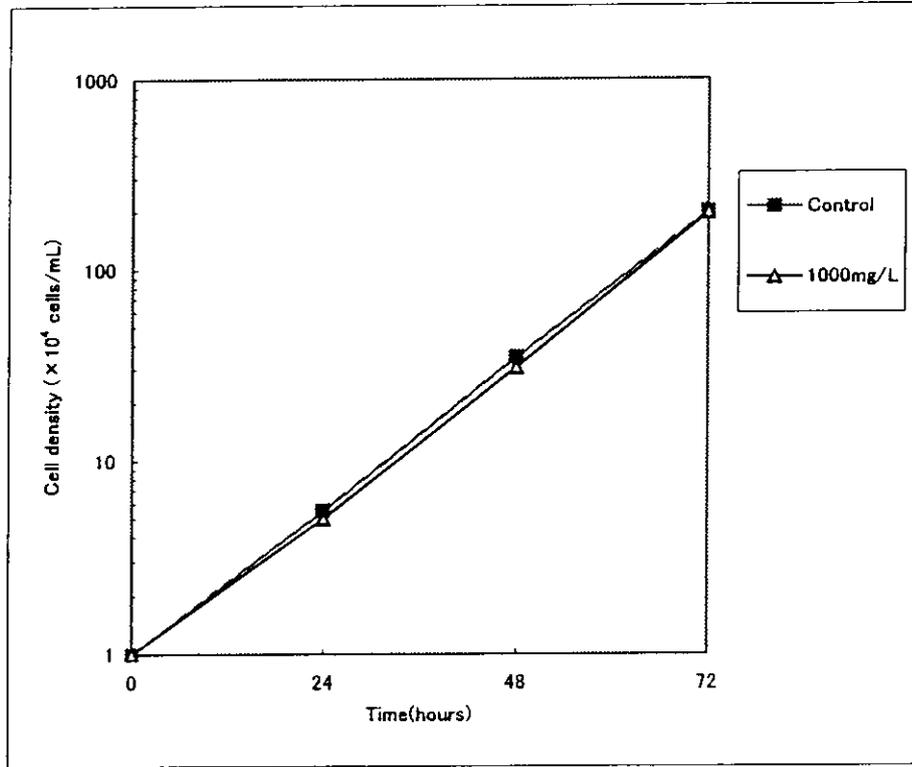
Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.0	8.1
1000	7.3	8.6

Supplemental Test

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.3	8.9
556	7.5	9.0

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

Original Test



Supplemental Test

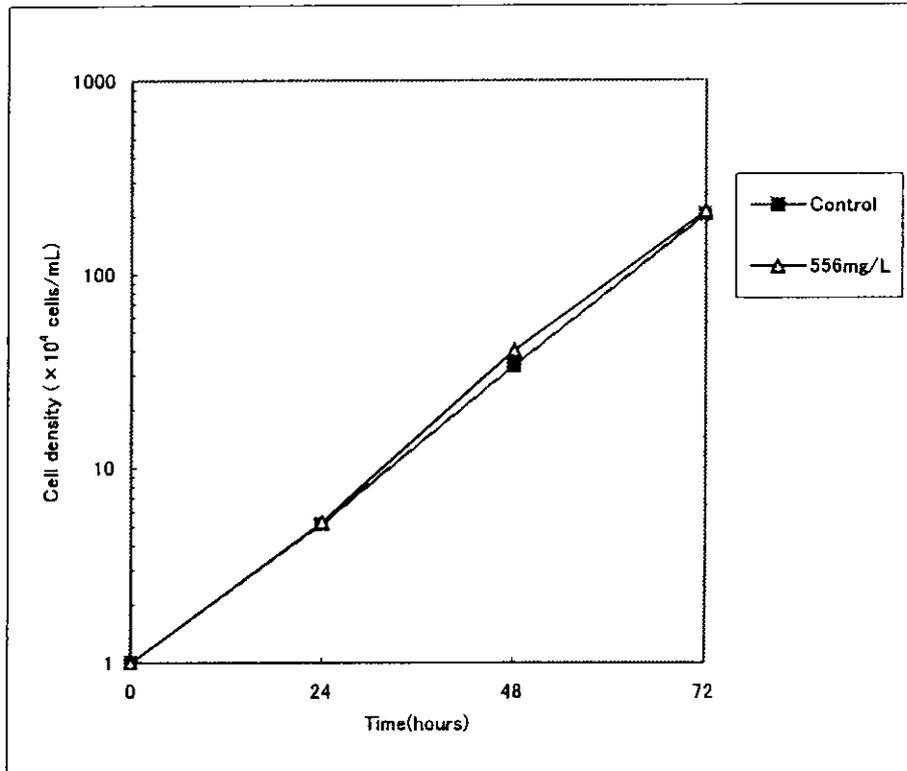


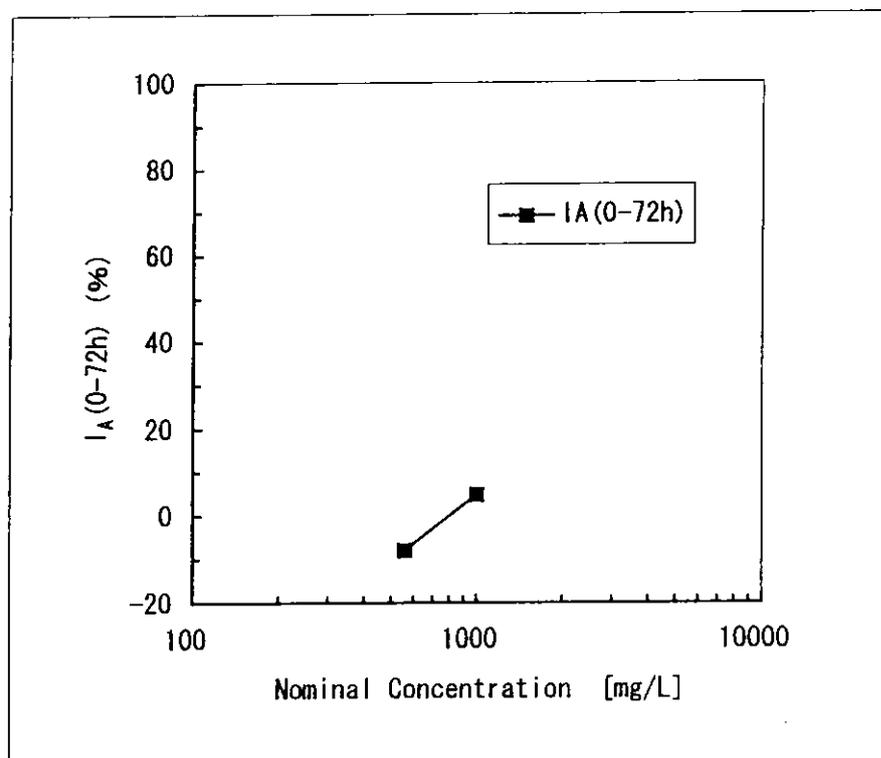
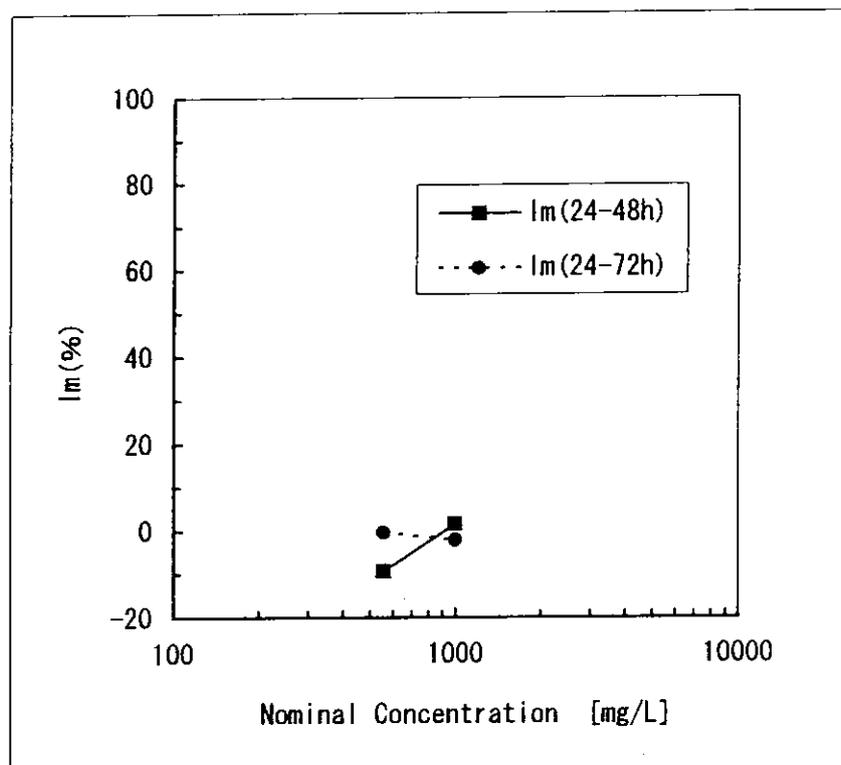
Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

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連の試験容器より等量の試験液各 0.2~1.0mL をバイアル瓶に採取する。

暴露終了時は3連の試験容器より等量の試験液各 1.0~2.0mL を採取し、合わせて遠心分離する。

その上澄み液 1.0~2.0mL 程度をバイアル瓶に採取する。

試験液の濃度が 100mg/L を超える場合は、OECD 培地で2~10 倍に希釈して分析に供する。

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-FFAP、0.53mmID × 15m
カラム温度	:130℃
検出器	:FID
検出器温度	:220℃
注入口温度	:220℃
注入量	:1 μ L
キャリアガス	:He
流量	:20mL/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100mg/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。

2-メチル-2-プロペンアミド 20mg/L の回収率は 95.6%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 2-Methyl-2-propenamide by GC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (μ V*sec.)
1	5	1642
2	10	3315
3	20	7153
4	50	18129
5	100	37245

$$X(\text{Concentration}) = 0.002704 \times Y(\text{Peak Area})$$

$$r^2 = 0.99955$$

r^2 : coefficient of correlation

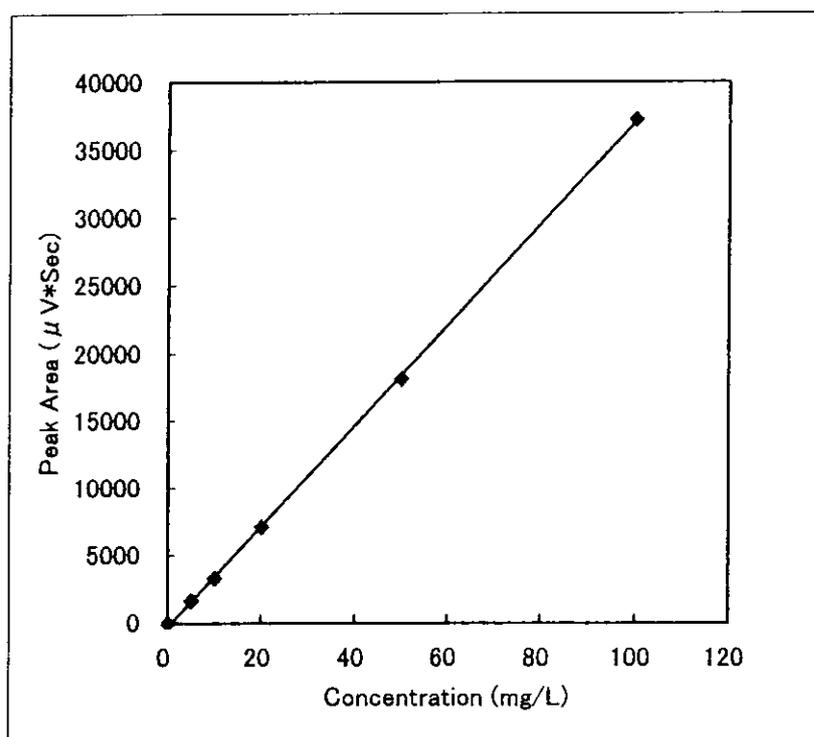
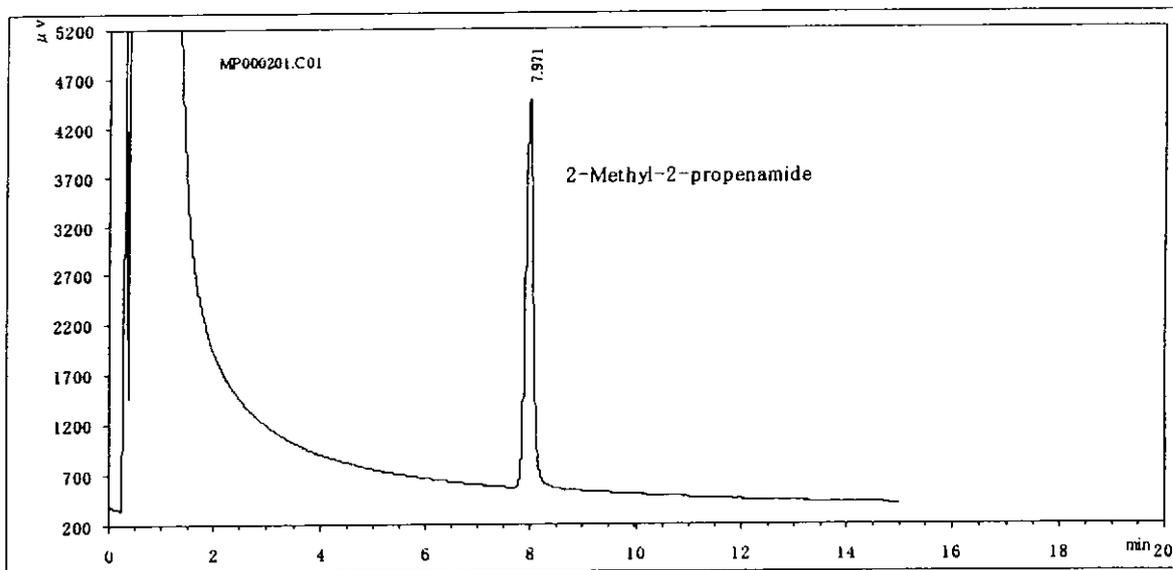


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 100 mg/L ; 0h



(2) Standard 100 mg/L ; 72h

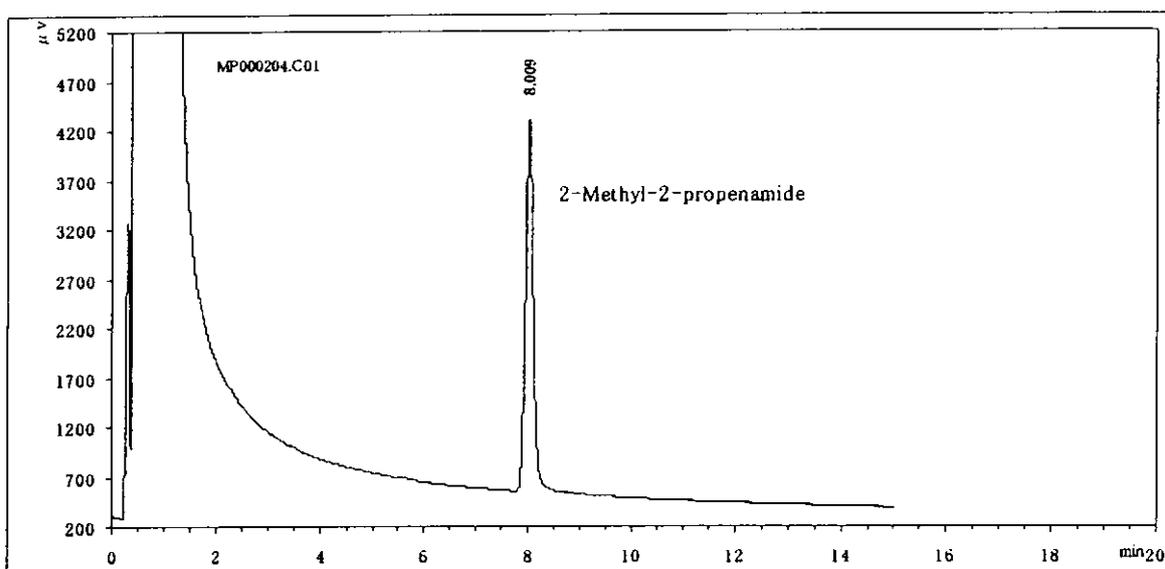
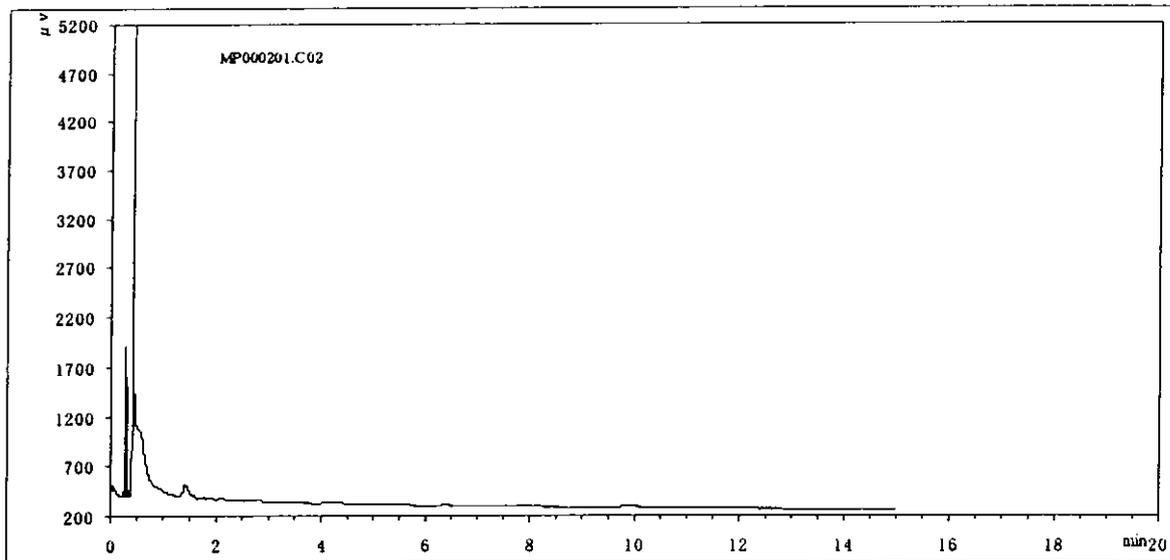


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0 h



(4) Control; 72 h

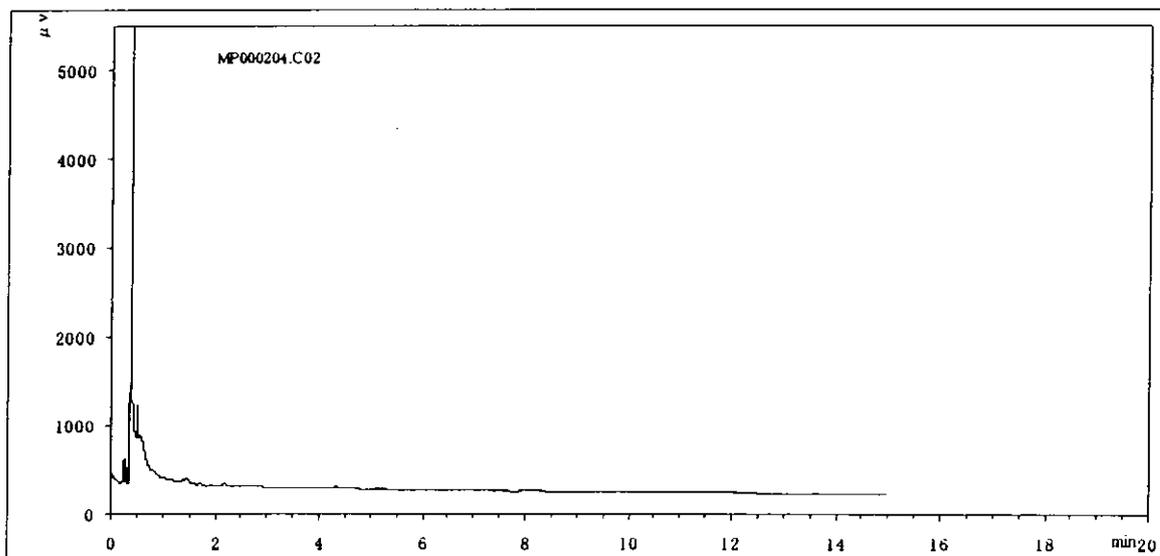
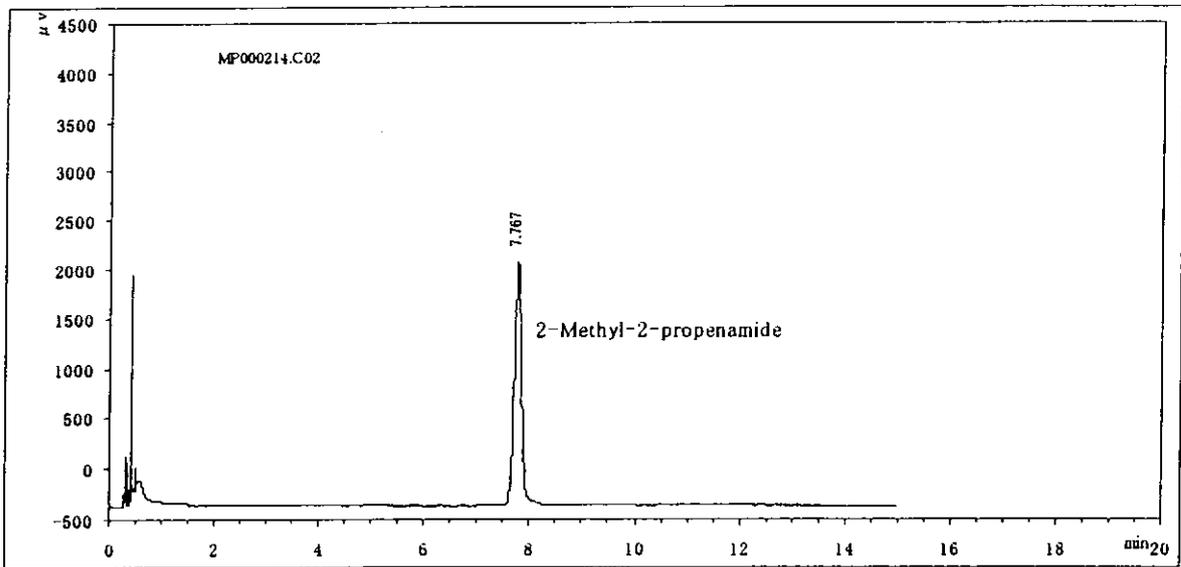


Figure 2 Continued

(5) 556 mg/L nominal; 0 h (diluted to 55.6mg/L)



(8) 556 mg/L nominal; 72 h (diluted to 55.6mg/L)

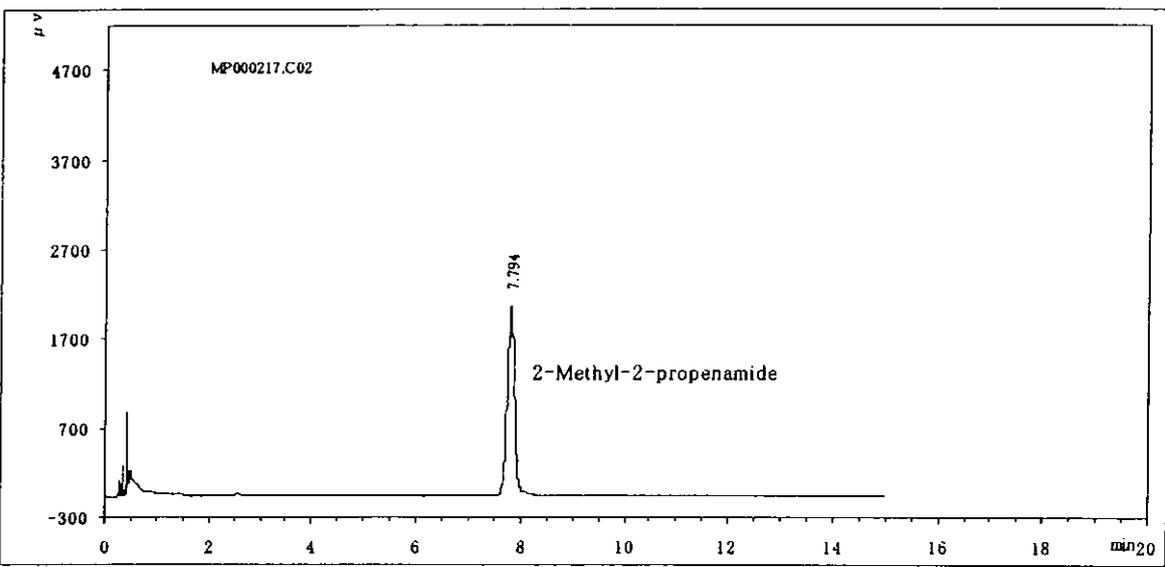
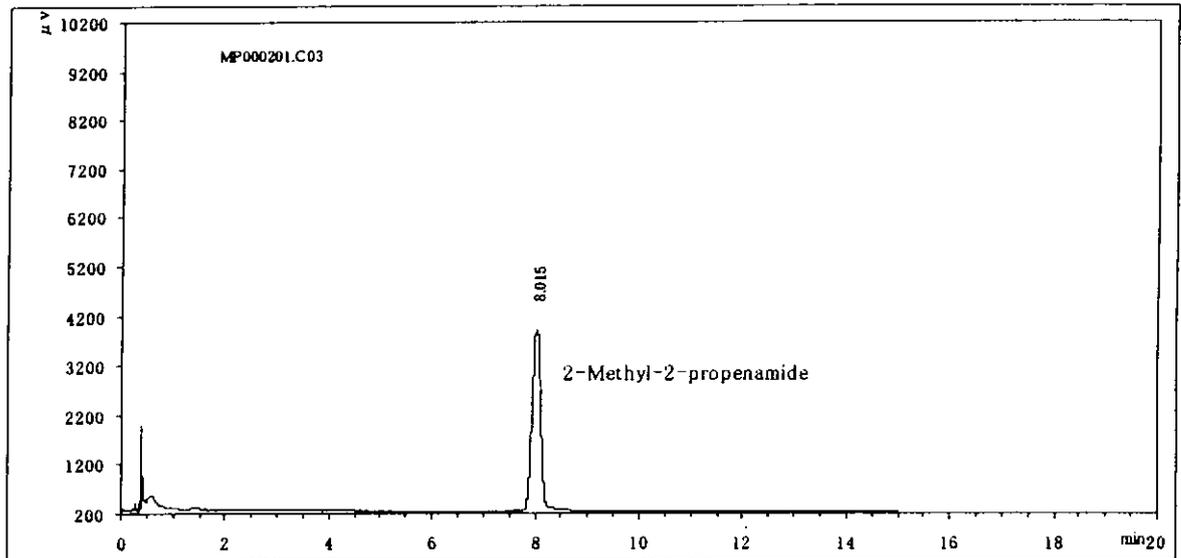


Figure 2 Continued

(7) 1000 mg/L nominal; 0 h (diluted to 100.0 mg/L)



(6) 1000 mg/L nominal; 72 h (diluted to 100.0 mg/L)

