

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者
[Redacted]

最 終 報 告 書

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号 : A 0 3 0 4 3 2 - 1)

2 0 0 5 年 3 月 2 8 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030432-1

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2005年 3月28日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030432-1

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、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項		実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		2005年 2月18日	2005年 2月18日
試験の査察	試験液の調製	2005年 2月22日	2005年 2月22日
	藻類の添加	2005年 2月22日	2005年 2月22日
	試験液の分析	2005年 2月25日	2005年 2月25日
	細胞濃度の測定	2005年 2月25日	2005年 2月25日
最終報告書監査		2005年 3月28日	2005年 3月28日

2005年 3月28日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号 : A030432-1)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験を 72 時間行い, 50% 生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 201 「藻類生長阻害試験」 (1984)
4. 適用 GLP : 日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX
環境科学 C グループ
(報告書作成)

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] 2005年 3月28日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2005年 3月28日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2005年 3月28日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2005年 3月28日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2005年 3月28日
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2005年 2月18日
実験開始日 2005年 2月22日
実験終了日 2005年 2月25日
試験終了日 2005年 3月28日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	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 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液および試験培養液の分析	12
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 生長曲線	14
4.2 生長阻害率の算出	14
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	15
4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出	15
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	16
5 結果および考察	17
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	17
5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	17
5.3 生長曲線	17
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)	18
5.5 温度およびpH	18
5.6 試験計画書からの逸脱事項	18
Table 1～6	19～23
Figure 1～3	24～26
付属資料－1 OECD推奨培地の組成	27～28
付属資料－2 試験液の調製	29～30
付属資料－3 試験液および試験培養液の分析	31～40
付属資料－4 結果の算出	41～47

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 3 2 - 1

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」
(1984)
- 2) 暴 露 方 式 : 止水式 (開放系), 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供 試 生 物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (株名: ATCC22662)
(旧学名: *Selenastrum capricornutum*)
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 0.0100, 0.0160, 0.0260, 0.0430, 0.0700 mg/L
(設定値) 公比: 1.6
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 3 容器/試験区
- 8) 初期細胞濃度: 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 9) 試 験 温 度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照 明 : 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

試 験 結 果 :

- 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 93~116 %, 暴露終了時の試験培養液において 2~8 %であった。濃度減少の主な原因は, ガラスへの吸着および藻体への移行が考えられた。阻害濃度の算出には暴露開始時の測定値を用いた。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC_{50} (0-72h) : 0.0210 mg/L (95%信頼区間 : 0.0163~0.0271 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECb$ (0-72h) : 0.0116 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-48h) : 0.0272 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-48h) : 0.0116 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72h) : 0.0305 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-72h) : 0.0116 mg/L

4) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区で細胞形態の変化（収縮，膨張，破裂等）や細胞凝集は認められず，また，対照区との相違もなかった。

1 被験物質

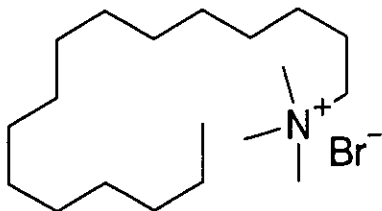
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称: ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (略称 CETAB)

別 名: 臭化セチルトリメチルアンモニウム

CAS No.: 57-09-0

構造式:



分子式: $C_{19}H_{42}BrN$

分子量^{*1}: 364.45

融点^{*1}: 240℃

水溶解度^{*1,*2}: 水に易溶^{*1}

> 1000mg/L^{*2} (精製水^{*3}, 目視判定)

*1: 供給者提供資料

*2: 当社測定値

*3: JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度^{*1}: 100%

ロット番号^{*1}: PKH1090

供給者: XXXXXXXXXX

受領量^{*1}: 25g

受領日: 2004年 1月22日

外観^{*1}: 白色粉末

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

試験開始前に、入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素封入）内に保管した。また，試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し，試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果，スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ（単細胞緑藻類）
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
（旧学名： *Selenastrum capricornutum*）
- 3) 株名： ATCC22662
- 4) 入手先： American Type Culture Collection
- 5) 入手日： 1996年6月20日
- 6) 入手後の管理： Gorham培地を用い無菌的に継代培養。定期的（約6ヶ月）に細菌検査をし無菌性を確認。
- 7) 感受性の確認： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による生長阻害試験を行い，供試生物の感受性を調べている。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度（EbC50）は，以下の通りである。
$$\text{平均値} \pm \text{標準偏差} = 0.431 \pm 0.0719 \text{ mg/L, } n=16$$
$$(\text{最小値} \sim \text{最大値} = 0.285 \sim 0.543 \text{ mg/L})$$
- 8) 前培養： 前培養期間；2005年2月18日～2005年2月22日
この間，藻類は対数増殖した。（環境条件は試験と同様）

3 試験方法

試験容器およびその他の器具は，必要に応じて滅菌したものを使用した。また，藻類の接種も無菌条件下で行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式（開放系），振とう培養（100rpm）
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器

- 4) 連数： 3 容器／試験区
- 5) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 6) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 7) 照明： 4000 lux ($\pm 20\%$ の変動内，フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH： 試験液のpH調整なし

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No. 201に示されている推奨培地を濾過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}$) 後用いた。組成表を付属資料－1に示す。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 300 mL容ガラス製三角フラスコ (IWAKI製) (通気性のシリコン栓付)
- 2) 藻類培養試験装置： 伊藤製作所製 AGP-150RL型
- 3) 光学顕微鏡： ニコン製 ECLIPSE TE300型
- 4) 粒子計数装置： シスメックス製 CDA-500型
- 5) 粒子計数装置用電解液： シスメックス製 セルパック
- 6) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型
- 9) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

試験濃度は、当該被験物質の水溶解度が $>1000 \text{ mg/L}$ (当社測定値，目視判定) のため，試験上限濃度の 100 mg/L 以下とした。

以下の表に示す予備試験 (各1連) の結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度：対照区，

0.0100, 0.0160, 0.0260, 0.0430, 0.0700 mg/L

公比：1.6

予備試験結果

No. 1

濃度 (mg/L)	対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	--
0.00100	120
0.0100	137
0.0500	7
0.100	0
1.00	0
10.0	0

No. 2

濃度 (mg/L)	対照区に対する 72時間後の生長率 (%)	0時間時分析結果 (設定値に対する 割合, %)	72時間後分析結果 (設定値に対する割合, %)	
			藻類添加有	藻類添加無
対照区	--	--	--	--
0.0100	120	72	5	5
0.0180	23	--	--	--
0.0320	2	--	--	--
0.0560	0	--	--	--
0.100	0	63	11	16

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内または恒温室内で 23 ± 2 °C にした。

付属資料-2 に示すように、被験物質原液を調製し、これを培地で希釈混合することにより、試験液を調製した。対照区は培地のみとした。なお、原液は用時調製した。

調製時の試験液の外観は全試験区においてけん濁物質、浮遊物質、沈殿物、油状物質は認められず、色調は無色であった。

3.6 試験液および試験培養液の分析

試験液および試験培養液中の被験物質濃度の分析は、高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 法を用い、全試験区について行った。

暴露開始時 (0時間) には各試験区 3 個の試験容器とは別に調製した予備 1 容器より 0.75 mL 採取したものを分析試料とした。暴露終了時 (72時間) には、各試験区 3 個の試験容器より試験培養液を 1.0 mL ずつ採取して混合し、藻類を遠心分離 (3000 rpm, 10分間) 後の上澄み

液を分析試料とした。開始時の分析試料を予備容器より採取したのは、3個の試験容器より一旦別容器に採取し混合したものを分析試料とすると、移し変え工程による濃度減少が考えられたためである。

各分析試料をメタノールで定量可能範囲内に希釈し、精製水を（希釈しない分析試料にはメタノールを）等量添加し混合後、LC/MSにより分析する。各試験液および各試験培養液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量した。

なお、報告書には、分析方法の詳細、検量線、検出限界、添加回収率を記載する。

詳細は付属資料-3に示す。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を粒子計数装置（CDA-500）および血球計算盤と顕微鏡で計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 cells/mL となるように、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（ランダム発生表に従いランダム配置、24hr毎に再配置）し試験を開始し、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験培養液 1.0 mL（72hrでは 0.5 mL）を採取し、粒子計数装置用電解液（セルパック）9.0 mL（72hrでは 9.5 mL）と混合した後、粒子計数装置（CDA-500）により計数した。

試験培養液中の藻類について、暴露開始後 0、24 および 48 時間には、肉眼による色調観察を、また、暴露終了時には、肉眼による色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液の pH を測定した。暴露開始時の pH は、各試験区 3 容器とは別に調製した予備 1 容器について測定し、暴露終了時の pH は、3 容器のうち 1 容器（No.1）について測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも 1 日 1 回測定した。

4 結果の算出

4.1 生長曲線

各試験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 生長阻害率の算出

下記の方法（面積法および速度法）で生長阻害率を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較（面積法）による生長阻害率（ I_A ）

生長曲線下の面積（A）は次の式により算出した。

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

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（A）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

2) 生長速度の比較（速度法）による生長阻害率（ I_μ ）

対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、

μ : 生長速度

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

4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定

4.4, 4.5のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は, 暴露開始時の測定値とした。

4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出

4.2で算出した面積法および速度法による生長阻害率 (I_A 値および I_m 値) を用いて, 以下の方法で50%生長阻害濃度 (EC50) を算出した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載する。	記載する。
EC50の決定方法	濃度－生長阻害率曲線において直線性の認められる点を用いて直線回帰分析 (最小二乗法) を行い, 阻害率50%との交点から算出。 可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
EC50の表記方法	I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72h) I_m 値より求めた場合: ErC50 (24-48h), ErC50 (24-72h)	

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

NOECは、面積法により求めた場合は NOECb (0-72h) , 速度法により求めた場合は NOECr (24-48h) またはNOECr (24-72h) とした。

それぞれの算出には、Bartlettの等分散検定 ($\alpha=0.01$) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$) および Dunnettの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行った。その結果、対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とした。

以上の統計解析には Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」(Yukms Corp., 東京) を用いた。

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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に、代表的なクロマトグラムを付属資料-3 に示す。

被験物質濃度分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 93～116 %、暴露終了時の試験培養液において 2～8 %であった。濃度減少の主な原因は、ガラスへの吸着および藻体への移行が考えられた。

5.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度を Table 2 および生長曲線を Figure 1 に示す。

対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で平均 337 倍増加し、試験条件（開放系条件）下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は濃度の増加とともに（用量依存的に）減少する傾向がみられた。0.0700 mg/L の濃度区の細胞濃度は、初期細胞濃度より経時的に減少した。この減少は生長阻害による細胞死亡等によると思われる。

試験培養液の肉眼による色調観察の結果、対照区および 0.0260 mg/L 以下の濃度区では、時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。0.0430 mg/L 以上の濃度区では、暴露終了時（72hr）まで緑色化することはなかった。また、暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区で細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。細胞濃度が初期細胞濃度より減少した上述の 0.0700 mg/L の濃度区についても、特に異常は観察されず正常であった。

5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)

濃度区における生長阻害率を Table 3 に, 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に, 濃度-阻害率曲線を Figure 2 および Figure 3 に, EC50 および NOEC の算出結果 (使用した統計的手法, 入力値, 入力に用いた観察点 (試験区) およびその出力結果) を付属資料-4 に示す。得られた結果から, 以下の結論を得た。

1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 0.0210 mg/L (95%信頼区間: 0.0163~0.0271 mg/L)

NOECb (0-72h) : 0.0116 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48h) : 0.0272 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECr (24-48h) : 0.0116 mg/L

ErC50 (24-72h) : 0.0305 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECr (24-72h) : 0.0116 mg/L

5.5 温度および pH

暴露期間中の培養試験装置内の温度を Table 5 に, 試験液および試験培養液の pH を Table 6 に示す。

培養試験装置内の温度は, 設定範囲 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) 内であった。pH は, 暴露開始時の試験液が 7.9 であり, 暴露終了時の試験培養液が 7.8~9.7 であった。対照区および 0.0100 mg/L の濃度区では, pH が 1 以上増加したが, 炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ 1 以上増加することがあり, 問題はないと考えられた。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0. 00006	--	<0. 00006	--
0. 0100	0. 0116	116	0. 00028	3
0. 0160	0. 0154	96	0. 00026	2
0. 0260	0. 0245	94	0. 00089	3
0. 0430	0. 0400	93	0. 00312	7
0. 0700	0. 0751	107	0. 00535	8

Table 2 Cell Densities of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	66800	495700	3239200
	2	10000	69900	538700	3459200
	3	10000	72400	517700	3409200
	Average	10000	69700	517400	3369200
	SD	0	2800	21500	115300
0.0100 [0.0116]	1	10000	71300	517700	3359200
	2	10000	72400	562700	3329200
	3	10000	70900	465700	3099200
	Average	10000	71500	515400	3262500
	SD	0	800	48500	142200
0.0160 [0.0154]	1	10000	65100	380700	2389200
	2	10000	66100	307700	2049200
	3	10000	68800	293700	2009200
	Average	10000	66700	327400	2149200
	SD	0	1900	46700	208800
0.0260 [0.0245]	1	10000	62400	209700	1599200
	2	10000	60600	207700	1529200
	3	10000	62700	252700	1539200
	Average	10000	61900	223400	1555900
	SD	0	1100	25400	37900
0.0430 [0.0400]	1	10000	11700	11800	16300
	2	10000	12300	11300	19400
	3	10000	11700	11800	15500
	Average	10000	11900	11600	17100
	SD	0	300	300	2100
0.0700 [0.0751]	1	10000	4500	3200	1900
	2	10000	6400	5500	2400
	3	10000	9000	7200	2600
	Average	10000	6600	5300	2300
	SD	0	2300	2000	400

SD: Standard deviation

*: Nominal initial densities

Table 3 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr]		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	Vessel No.	Area	Inhibition (%) [†]	Rate	Inhibition (%) [†]	Rate	Inhibition (%) [†]
		A (0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _μ (24-48h)	μ (24-72h)	I _μ (24-72h)
Control	1	51770000		0.0835		0.0809	
	2	55517000		0.0851		0.0813	
	3	54473000		0.0820		0.0803	
	Average	53920000	-	0.0835	-	0.0808	-
	SD	1934000		0.0016		0.0005	
0.0100 [0.0116]	1	53846000		0.0826		0.0803	
	2	54593000		0.0854		0.0798	
	3	49469000		0.0784		0.0787	
	Average	52636000	2.4	0.0821	1.7	0.0796	1.5
	SD	2768000		0.0035		0.0008	
0.0160 [0.0154]	1	38770000		0.0736		0.0751	
	2	32962000		0.0641		0.0715	
	3	32210000		0.0605		0.0703	
	Average	34647000	35.7**	0.0661	20.8**	0.0723	10.5**
	SD	3590000		0.0068		0.0025	
0.0260 [0.0245]	1	25121000		0.0505		0.0676	
	2	24190000		0.0513		0.0673	
	3	25440000		0.0581		0.0667	
	Average	24917000	53.8**	0.0533	36.2**	0.0672	16.8**
	SD	649000		0.0042		0.0005	
0.0430 [0.0400]	1	160000		0.0004		0.0069	
	2	199000		-0.0035		0.0095	
	3	150000		0.0004		0.0059	
	Average	170000	99.7++	-0.0009	101.1**	0.0074	90.8**
	SD	26000		0.0023		0.0019	
0.0700 [0.0751]	1	-392000		-0.0142		-0.0180	
	2	-286000		-0.0063		-0.0204	
	3	-180000		-0.0093		-0.0259	
	Average	-286000	100.5++	-0.0099	111.9**	-0.0214	126.5**
	SD	106000		0.0040		0.0041	

†] Values are the growth inhibition (%) relative to the control. SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control. (There was no sign in this test.)

** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

++ Statistical comparison test could not be performed for these concentrations since data including these concentrations did not show homogeneity of variances. However, it was concluded that these concentration levels showed adverse effect on algal growth judging from I_A values.

Table 4 Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A (0-72h) value (Areas under growth curve)

EcC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
0.0210 ^{*1}	0.0163-0.0271	0.0116

Based on I_A (24-48h) value (Growth rates)

ErC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48h) (mg/L)
0.0272 ^{*2}	--	0.0116

Based on I_A (24-72h) value (Growth rates)

ErC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72h) (mg/L)
0.0305 ^{*2}	--	0.0116

The EC50 values and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of test concentration against the growth inhibition (%) relative to the control.

- *1 using the measured concentrations of 0.0116, 0.0154, 0.0245 and 0.0400 mg/L in the regression analysis
- *2 using the measured concentrations of 0.0245 and 0.0400 mg/L in the regression analysis
- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Dunnett test, subsequent to Bartlett test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

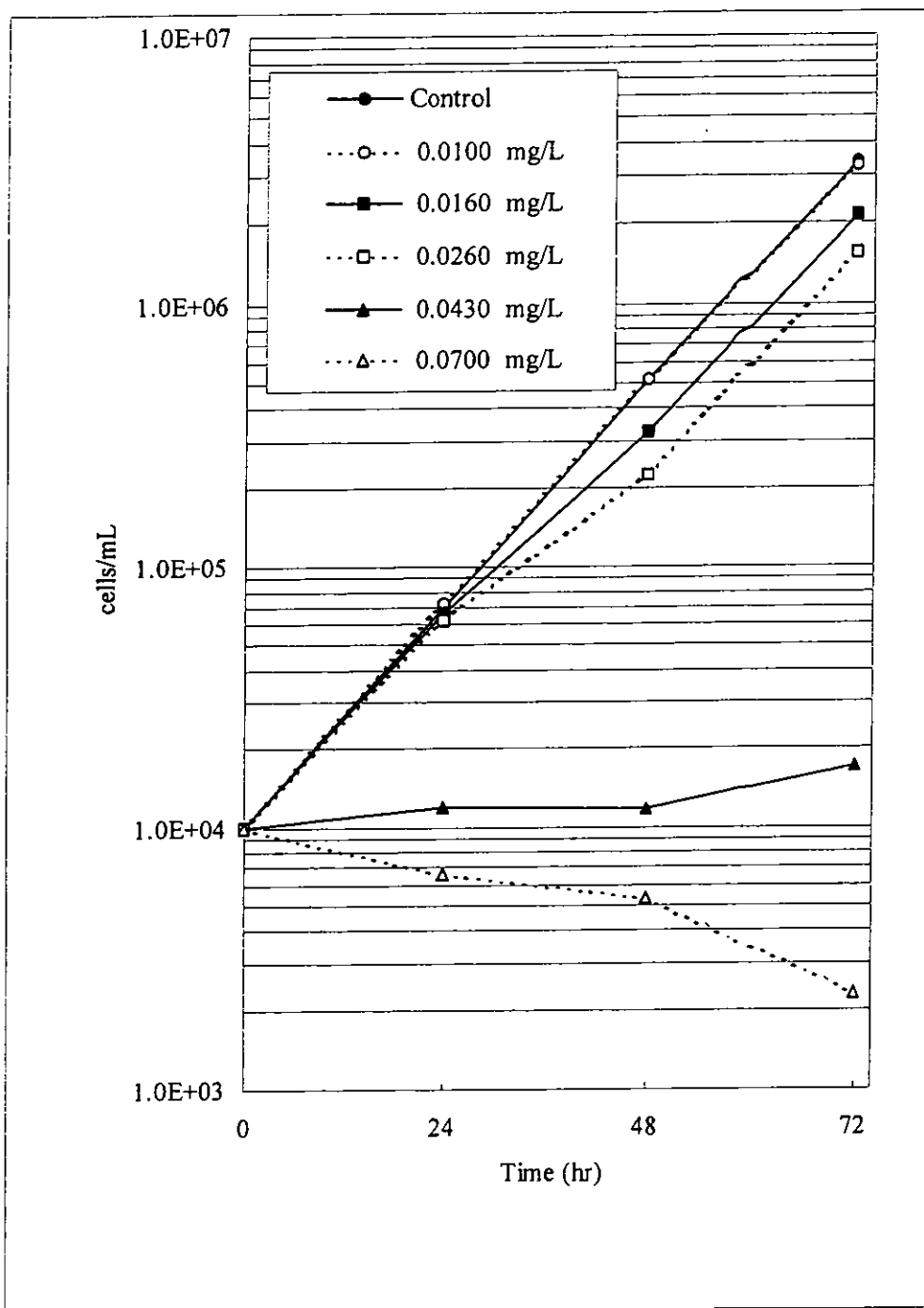
Table 5 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.5
24	22.3
48	22.5
72	22.6

Table 6 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)		pH		
		0 Hour	72 Hours (Vessel No)	
Control		7.9	9.7	(1)
0.0100	[0.0116]	7.9	9.6	(1)
0.0160	[0.0154]	7.9	8.5	(1)
0.0260	[0.0245]	7.9	8.3	(1)
0.0430	[0.0400]	7.9	7.9	(1)
0.0700	[0.0751]	7.9	7.8	(1)

Figure 1 Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Mean cell counts vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves

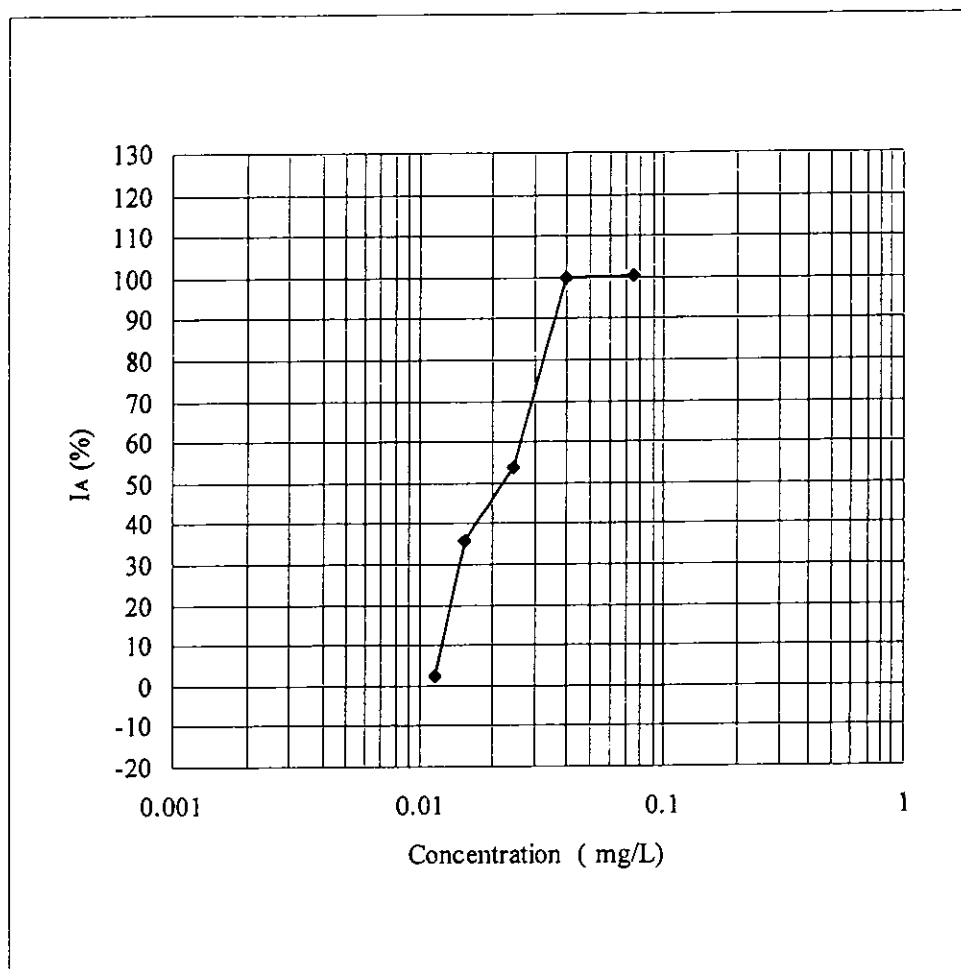
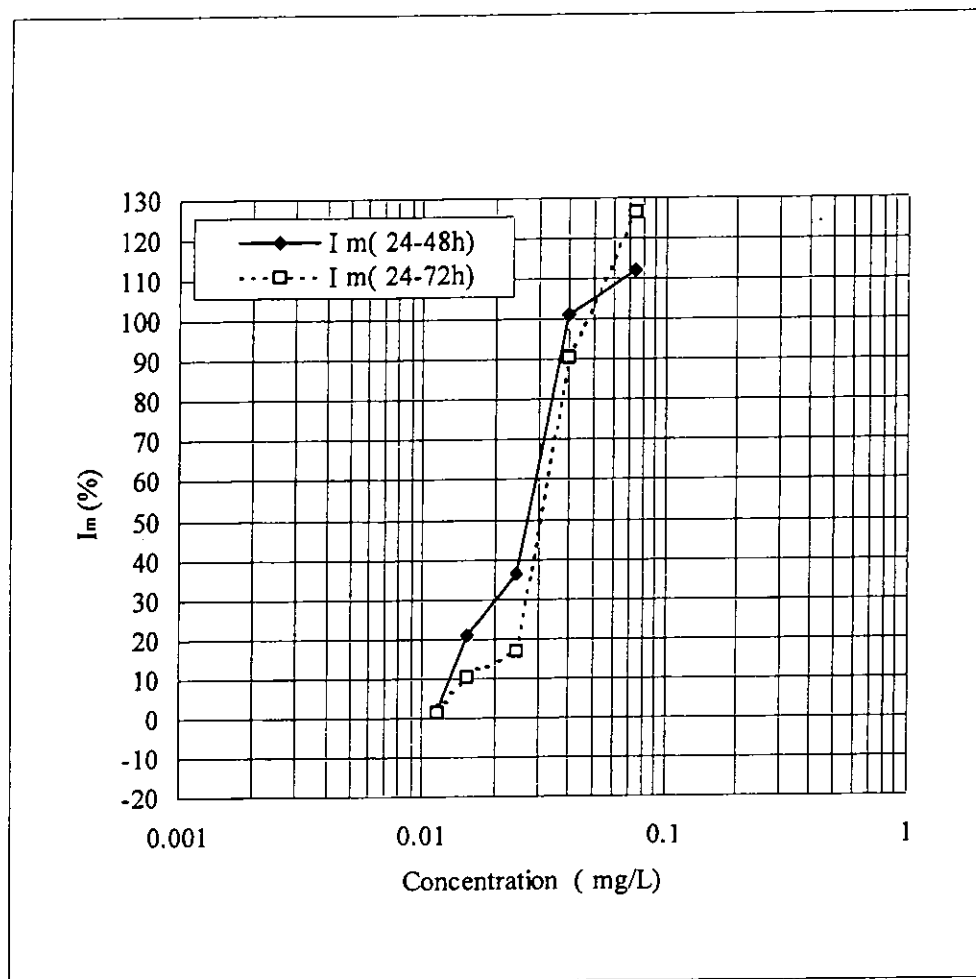


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

OECD推奨培地の組成

Table A-1 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

付属資料－ 2

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液Ⅰの調製

採取量	→	100	mg
溶媒	→	試験用水(23±2℃にしたOECD推奨培地)	
最終容量	→	100	mL
容器	→	メスボトル	
濃度	→	1000	mg/L
混合方式	→	スターラーで攪拌(5分), 密栓	

② 被験物質原液Ⅱの調製

採取量	→	100	μL
溶媒	→	試験用水(23±2℃にしたOECD推奨培地)	
最終容量	→	1000	mL
容器	→	メスフラスコ	
濃度	→	0.1000	mg/L
混合方式	→	スターラーで攪拌(5分), 密栓	

2. 試験液の調製

②の原液を下記の表の通り採取し, 試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水(最終容量)	→	0.10	L
容器	→	300mL容ガラス製三角フラスコ(WAKI製)	
混合方式	→	手で振とう攪拌, 通気性シリコン栓	
濃度公比	→	1.627	
1濃度区の連数	→	3	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	②原液Ⅱ mL
対照区	C	→ 0
0.0100	Conc.1	→ 10.0
0.0160	Conc.2	→ 16.0
0.0260	Conc.3	→ 26.0
0.0430	Conc.4	→ 43.0
0.0700	Conc.5	→ 70.0

付属資料－ 3

試験液および試験培養液の分析

1 試験液および試験培養液の分析方法

- 1) 暴露開始時 (0時間) には各試験区 3 個の試験容器とは別に調製した予備 1 容器より 0.75 mL 採取したものを分析試料とした。暴露終了時 (72時間) には、各試験区 3 個の試験容器より試験培養液を 1.0 mL ずつ採取して 10 mL 容ガラス沈殿管で混合したものを、遠心分離* (3000 rpm, 10分間) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

*装置: 日立工機製 CR 2 1 E 型

- 2) メタノールで調製した標準溶液 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、LC/MS により分析した。クロマトグラムを Figure A-3-2 (1), (6) に示した。
- 3) 各分析試料をメタノールで定量可能範囲内に希釈したもの 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、精製水を (希釈しない分析試料にはメタノールを) 等量添加し混合後、LC/MS により分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-3-2 (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10) に示した。
- 4) 各試験液および試験培養液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

2 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No3
ワークステーション: Agilent 1100 シリーズ (Windows NT)
高速液体クロマトグラフ (HPLC): Agilent Technologies 1100 型
デガッサ: G1379A 型
送液ポンプ: G1312A 型 (ハイプレッシャー)
オートサンプラ: G1313A 型
カラムオーブン: G1316A 型
質量選択検出器 (MSD): G1946D 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム: GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mm
カラムオーブン: 40°C
溶離液: A 液 0.5mM IPC-PFFA-5*水溶液 *:Nonfluorovaleric Acid
B 液 メタノール
0.00min A 液 20%, B 液 80%
0.75min A 液 5%, B 液 95%
7.00min A 液 5%, B 液 95%
7.01min A 液 20%, B 液 80%
試料注入量: 5 μ L
流速: 0.4 mL/min

[MSD 条件] API-ES (Atmospheric Pressure Ionization - Electrospray) で分析

Ionization: Electrospray
Fragmentor: 75 V
Nebulizer: N₂ (30 psi)
Drying gas: N₂ (10 L/min, 300°C)
Mode: Positive
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:
Start Time= 0 min
Quant ion= m/z 284.50

3 検量線

メタノールを用い、0.0005~0.050 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを LC/MS で測定した。横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、低濃度領域と高濃度領域の 2 つの検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は、それぞれ 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 count に設定し、これに相当する試験液または試験培養液中の被験物質濃度 0.00006 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

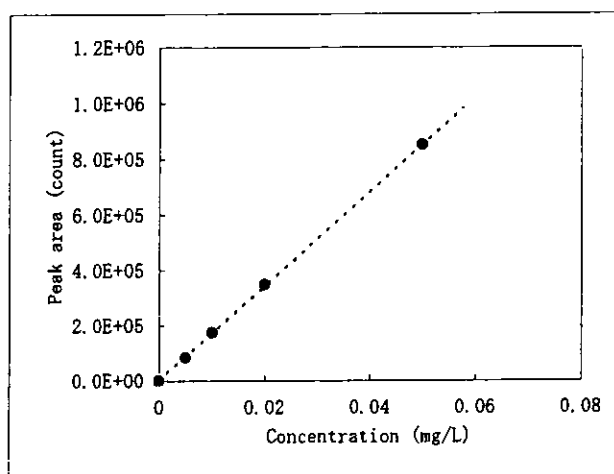
分析前処理は、「1 試験液および試験培養液の分析方法」に示したように試験液または試験培養液と精製水またはメタノールを混合する操作だけであるので添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-3-1 Calibration curves

Input Data		
No	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.005	84802
3	0.010	175369
4	0.020	348653
5	0.050	850887

$$Y = 17,089,293X$$

$$r = 1.00$$



Input Data		
No	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.0005	12621
3	0.0010	25210
4	0.0020	48301
5	0.0050	122684

$$Y = 24,513,802X$$

$$r = 1.00$$

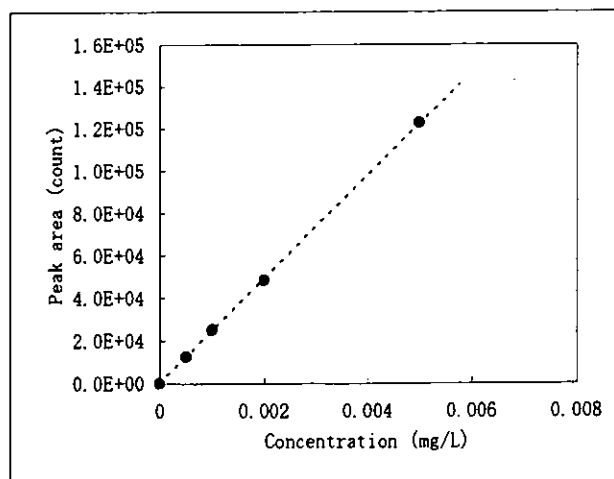
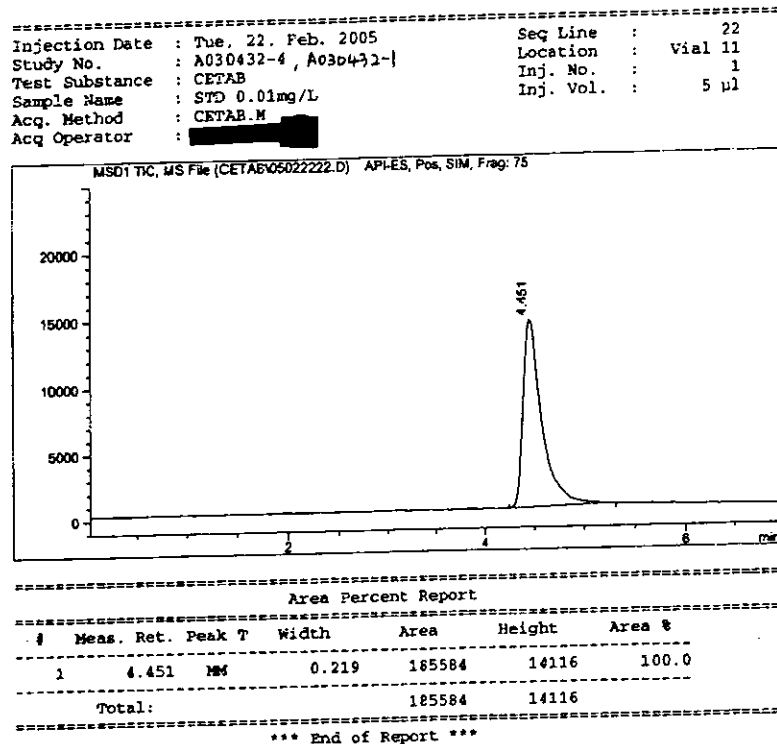


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.01 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

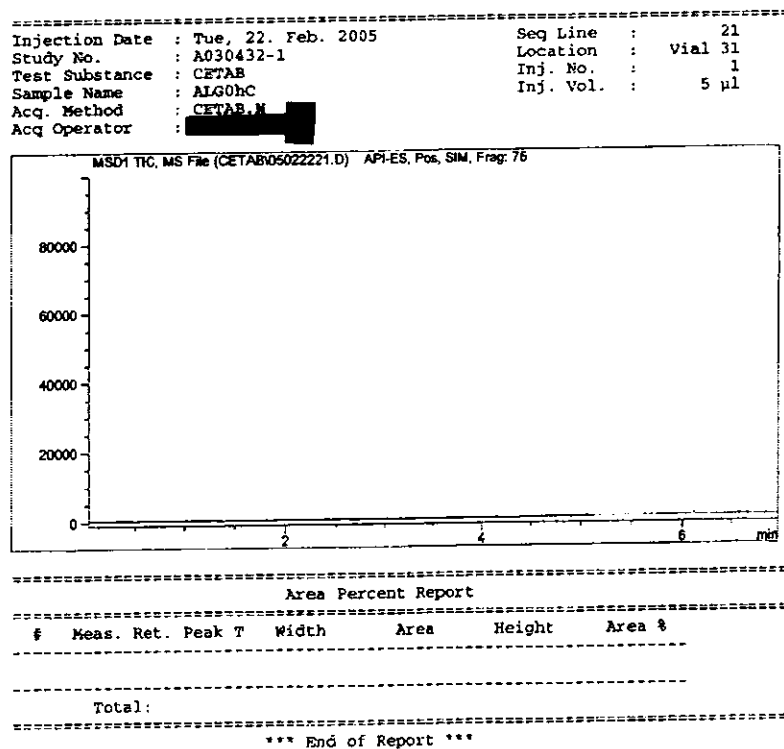
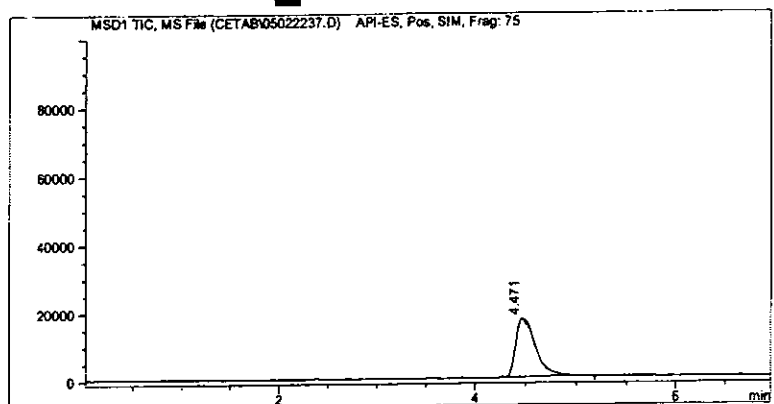


Figure A-3-2 Continued

(3) 0.0100 mg/L nominal ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line   :      1
Study No.      : A030432-1              Location    : Vial 31
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : ALGOhc1                Inj. Vol.   : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



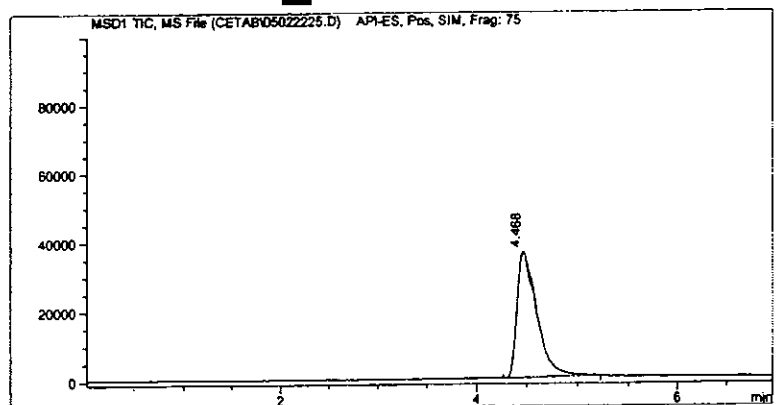
```

=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width    Area    Height    Area %
-----
1   4.471   MM         0.206   214503   17370    100.0
-----
Total:                        214503   17370
=====
*** End of Report ***
  
```

(4) 0.0260 mg/L nominal ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line   :     25
Study No.      : A030432-1              Location    : Vial 34
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : ALGOhc1 ALGOhc3    Inj. Vol.   : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



```

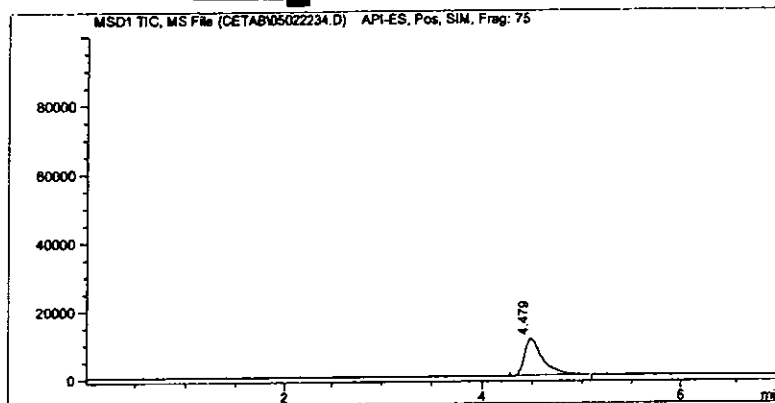
=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width    Area    Height    Area %
-----
1   4.468   MM         0.208   454396   36464    100.0
-----
Total:                        454396   36464
=====
*** End of Report ***
  
```

Figure A-3-2 Continued

(5) 0.0700 mg/L nominal ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line   :      34
Study No.      : A030432-1              Location    : Vial 36
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : ALG0hC5                Inj. Vol.   : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



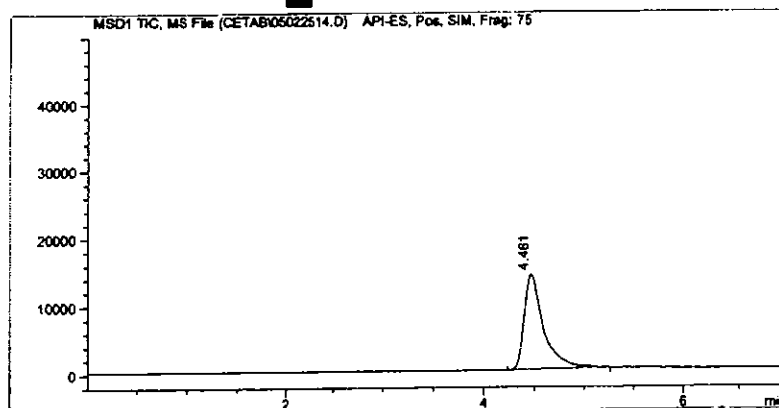
```

=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width   Area   Height   Area %
-----
1   4.479   MM         0.212  139423   10943   100.0
-----
Total:                        139423   10943
=====
*** End of Report ***
  
```

(6) Standard 0.01 mg/L ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 25. Feb. 2005      Seq Line   :      14
Study No.      : A030432-1              Location    : Vial 21
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : STD 0.01mg/L           Inj. Vol.   : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



```

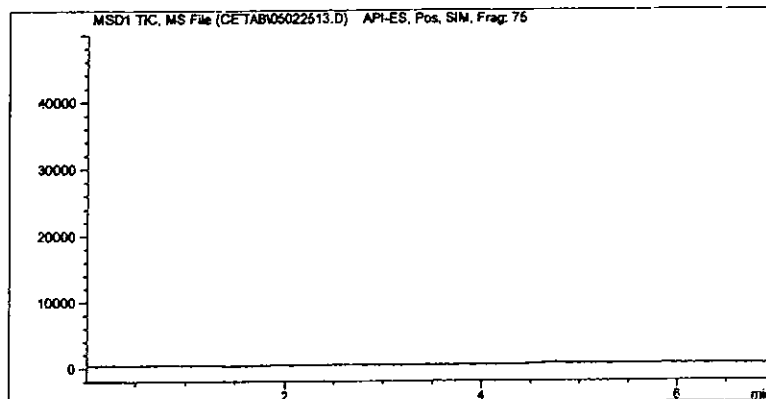
=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width   Area   Height   Area %
-----
1   4.461   MM         0.226  190251   14018   100.0
-----
Total:                        190251   14018
=====
*** End of Report ***
  
```

Figure A-3-2 Continued

(7) Control ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 25. Feb. 2005      Seq Line : 13
Study No.      : A030432-1              Location  : Vial 22
Test Substance : CETAB                   Inj. No.  : 1
Sample Name    : ALG72hC                 Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : 
=====
  
```



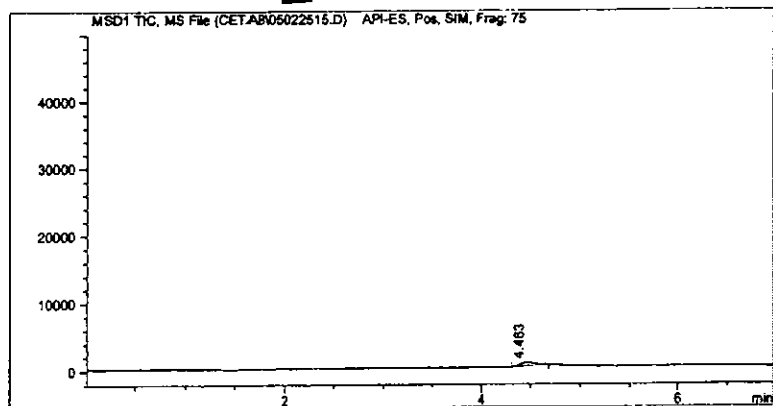
```

=====
                        Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
Total:
=====
*** End of Report ***
  
```

(8) 0.0100 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 25. Feb. 2005      Seq Line : 15
Study No.      : A030432-1              Location  : Vial 23
Test Substance : CETAB                   Inj. No.  : 1
Sample Name    : ALG72hC1               Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : 
=====
  
```



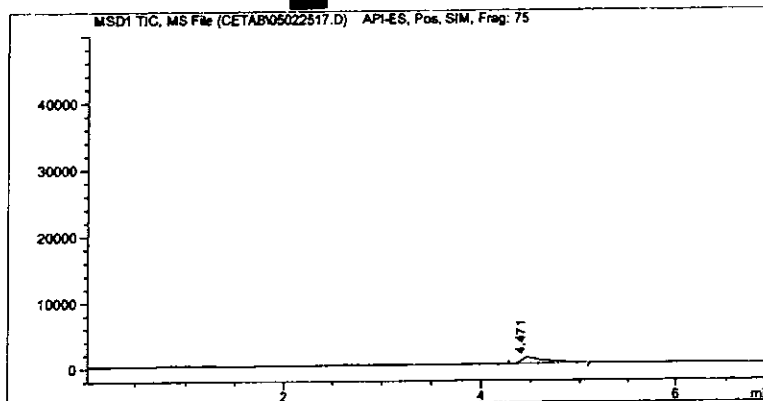
```

=====
                        Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
1 4.463 MM 0.169 5398 532 100.0
Total: 5398 532
=====
*** End of Report ***
  
```

Figure A-3-2 Continued

(9) 0.0260 mg/L nominal ; 72 Hours

```
=====
Injection Date : Fri, 25. Feb. 2005      Seq Line : 17
Study No.      : A030432-1              Location  : Vial 25
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : ALG72hC3              Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



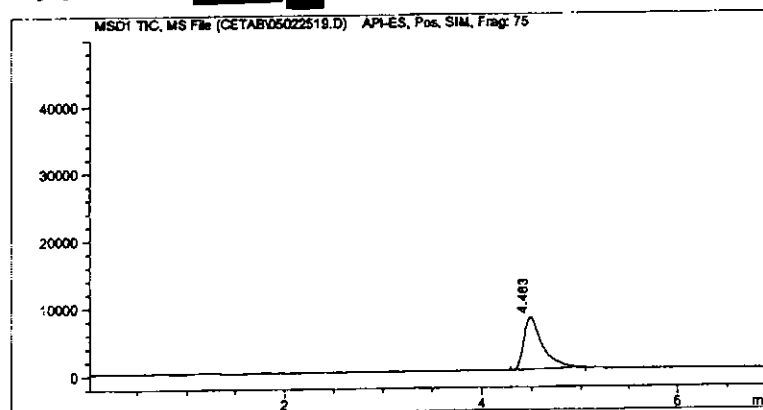
```
=====
Area Percent Report
=====
```

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.471	MM	0.293	16954	963	100.0
Total:				16954	963	

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

(10) 0.0700 mg/L nominal ; 72 Hours

```
=====
Injection Date : Fri, 25. Feb. 2005      Seq Line : 19
Study No.      : A030432-1              Location  : Vial 27
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : ALG72hC5              Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



```
=====
Area Percent Report
=====
```

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.483	MM	0.219	101778	7752	100.0
Total:				101778	7752	

```
=====
*** End of Report ***
=====
```


付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4-1 Calculation of the EC50

(1) EbC50 (0-72h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.0116	-4.46	2.4
0.0154	-4.17	35.7
0.0245	-3.71	53.8
0.0400	-3.22	99.7

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.0210	0.0163	~ 0.0271	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05, f1, f2)
Between	4787.08	1	4787.08	63.80	18.51
Within	150.06	2	75.03		
Total	4937.14	3			

Table A-4-1 Continued

(2) ErC50 (24-48h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.0245	-3.71	36.2
0.0400	-3.22	100.0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.0272	#NUM!	～ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05, f1, f2)
Between	2035.22	1	2035.22	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	2035.22	1			

Table A-4-1 Continued

(3) ErC50 (24-72h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.0245	-3.71	16.8
0.0400	-3.22	90.8

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.0305	#NUM!	～ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05, f1, f2)
Between	2738.00	1	2738.00	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	2738.00	1			

Table A-4-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Control Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6
5177.0	5384.6	3877.0	2512.1	18.0	-39.2
5551.7	5459.3	3296.2	2419.0	19.9	-28.6
5447.3	4946.9	3221.0	2544.0	15.0	-18.0

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	5,392.0000	111.6447	193.3742	37,393.5900		
2	3	5,263.6000	159.8115	276.8017	76,619.1900		
3	3	3,464.7333	207.2733	359.0078	128,886.6133		
4	3	2,491.7000	37.4983	64.9490	4,218.3700		
5	3	16.9667	1.4948	2.5891	6.7033		
6	3	-28.6000	6.1199	10.6000	112.3600		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	25.5248	11.0705	15.0863	20.5152	0.00011033
conc5を除く							
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	17.0812	9.4877	13.2767	18.4668	0.00186401
conc4,5を除く							
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	3.7002	7.8147	<11.3449	16.2667	0.2957
1-way ANOVA	Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	Prob.
		0	97.1550	>4.0662	7.5910	15.8295	1.2399E-06
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.6327	2.8797	4.0023	999.9900	0.8622
Dunnett	1 vs 3	2	9.4965	>2.8797	>4.0023	999.9900	3.5251E-05 **
Dunnett	1 vs 4	2	14.2911	>2.8797	>4.0023	999.9900	3.6505E-06 **

Table A-4-2 Continued
(2) NOECr (24-48h)

Input Data Table								
Control Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6			
	0.0835	0.0826	0.0736	0.0505	0.0004	-0.0142		
	0.0851	0.0854	0.0641	0.0513	-0.0035	-0.0063		
	0.0820	0.0784	0.0605	0.0581	0.0004	-0.0093		
Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	3	0.0835	0.0009	0.0016	0.0000			
2	3	0.0821	0.0020	0.0035	0.0000			
3	3	0.0661	0.0039	0.0068	0.0000			
4	3	0.0533	0.0024	0.0042	0.0000			
5	3	-0.0009	0.0013	0.0023	0.0000			
6	3	-0.0099	0.0023	0.0040	0.0000			
Bartlett test	Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
			0	3.9408	11.0705	<15.0863	20.5152	0.5580
1-way ANOVA	Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
			0	308.9119	>3.1059	5.0643	8.8921	0.0000
Dunnett	Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
	1 vs 2	2		0.4220	2.9013	3.8106	999.9900	0.9905
	1 vs 3	2		5.2655	>2.9013	>3.8106	999.9900	0.00084838 **
	1 vs 4	2		9.1142	>2.9013	>3.8106	999.9900	6.1513E-06 **
	1 vs 5	2		25.4533	>2.9013	>3.8106	999.9900	1.8721E-06 **
	1 vs 6	2		28.1765	>2.9013	>3.8106	999.9900	1.8721E-06 **

Table A-4-2 Continued
(3) NOECr (24-72h)

Input Data Table						
Control Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	
0.0809	0.0803	0.0751	0.0676	0.0069	-0.0180	
0.0813	0.0798	0.0715	0.0673	0.0095	-0.0204	
0.0803	0.0787	0.0703	0.0667	0.0059	-0.0259	
Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance	
1	3	0.0808	0.0003	0.0005	0.0000	
2	3	0.0796	0.0005	0.0008	0.0000	
3	3	0.0723	0.0014	0.0025	0.0000	
4	3	0.0672	0.0003	0.0005	0.0000	
5	3	0.0074	0.0011	0.0019	0.0000	
6	3	-0.0214	0.0023	0.0041	0.0000	
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Bartlett test		0	10.9536	11.0705	<15.0863	20.5152 0.0523
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
1-way ANOVA		0	1.256.1856	>3.1059	5.0643	8.8921 6.6133E-16
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.7091	2.9013	3.8106	999.9900 0.9236
Dunnett	1 vs 3	2	4.9059	>2.9013	>3.8106	999.9900 0.00152693 **
Dunnett	1 vs 4	2	7.8379	>2.9013	>3.8106	999.9900 2.2247E-05 **
Dunnett	1 vs 5	2	42.1982	>2.9013	>3.8106	999.9900 1.8721E-06 **
Dunnett	1 vs 6	2	58.7938	>2.9013	>3.8106	999.9900 1.8721E-06 **