

環境省殿

## 最 終 報 告 書

チオ尿素のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：第14023号)

2003年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

## 試験実施概要

1. 表 題：チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的：チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を行い、21 日間の最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り 50 %繁殖阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) も求める。
3. 試験方法：OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」(1998 年) に準拠
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：
  - 1) 名 称：環境省
  - 2) 住 所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
  - 3) 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 [REDACTED]
6. 試験受託者：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
  - 2) 住 所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
  - 3) 代 表 者：[REDACTED]
7. 試験施設：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
  - 2) 住 所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号  
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
  - 3) 運営管理者：[REDACTED](多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部  
氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課  
氏 名：[REDACTED]

10. 試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課  
氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] ,  
[REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課  
氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2002年12月20日

実験開始日：2003年1月22日

実験終了日：2003年2月12日

試験終了日：2003年3月31日

12. 記録及び資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、1)については最終報告書作成後10年間または品質低下を起こさずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2)から5)については10年間、財団法人日本食品分析センター多摩研究所資料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別途協議の上、定める。

- 1) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部

氏 名：   2003 年 3 月 3 / 日 承認

## 目次

|   | 頁  |
|---|----|
| 要 旨 .....                                     | 7  |
| 1 被験物質 .....                                  | 9  |
| 1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状 .....                    | 9  |
| 1.2 供試試料 .....                                | 9  |
| 1.3 保管方法及び保管条件下での安定性 .....                    | 10 |
| 2 供試生物 .....                                  | 10 |
| 3 試験方法 .....                                  | 11 |
| 3.1 試験条件.....                                 | 11 |
| 3.2 希釈水 .....                                 | 11 |
| 3.3 試験容器及び恒温槽等 .....                          | 11 |
| 3.4 試験濃度の設定 .....                             | 12 |
| 3.5 試験液の調製 .....                              | 12 |
| 3.6 試験液の分析 .....                              | 12 |
| 3.7 試験操作 .....                                | 12 |
| 4 結果の算出 .....                                 | 13 |
| 4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定 .....                    | 13 |
| 4.2 親ミジンコの半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )の算出 .....  | 13 |
| 4.3 50 %繁殖阻害濃度(EC <sub>50</sub> )の算出.....     | 13 |
| 4.4 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC).....          | 13 |
| 4.5 試験容器間の均一性解析.....                          | 13 |
| 4.6 統計的手法.....                                | 13 |
| 5 結果及び考察 .....                                | 14 |
| 5.1 試験液中の被験物質濃度 .....                         | 14 |
| 5.2 試験液の状態 .....                              | 14 |
| 5.3 ミジンコの観察結果 .....                           | 14 |
| 5.4 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC <sub>50</sub> ) ..... | 15 |
| 5.5 50 %繁殖阻害濃度(EC <sub>50</sub> ) .....       | 15 |
| 5.6 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC) .....         | 15 |
| 5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH 及び硬度 .....             | 15 |
| 5.8 試験計画書からの逸脱事項.....                         | 16 |
| 5.9 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 .....           | 16 |
| 5.10 試験の妥当性 .....                             | 16 |
| 5.11 結果の評価と考察.....                            | 16 |

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| Table 1～2 .....               | 17～18 |
| Figure 1 .....                | 19    |
| Table 3～4 .....               | 20～21 |
| Figure 2～3 .....              | 22    |
| Table 5～11 .....              | 23～26 |
| 付属資料-1 希釈水の水質 .....           | 27    |
| 付属資料-2 予備試験結果 .....           | 28    |
| 付属資料-3 統計処理データ .....          | 29～30 |
| 付属資料-4 試験液中の被験物質濃度の分析方法 ..... | 31～35 |
| 付属資料-5 ミジンコの観察結果 .....        | 36～44 |

## 要 旨

### 試験委託者

環境省

### 表 題

チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

第14023号

### 試験方法

OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠

- 1) 被験物質：チオ尿素
- 2) 暴露方式：半止水式(24時間毎全量換水)
- 3) 供試生物：オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間：21日間
- 5) 試験濃度(設定値)：  
対照区, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 及び 32 mg/l  
公比 ; 1.8
- 6) 試験液量：80 ml/容器
- 7) 連 数：10 容器/1 試験区(別に予備として2容器を追加)
- 8) 供試生物数：10 頭/試験区(1 頭/1 容器)
- 9) 試験温度：19.1～20.3 ℃
- 10) 溶存酸素濃度：8.8～10.3 mg/l(暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 7.7～8.2(試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 硬 度：84～89 mg/l (CaCO<sub>3</sub> 換算)
- 13) 照 明：室内光, 16 時間明期/8 時間暗期
- 14) 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により, 希釈水に置換して給餌した。)
- 15) 給 餌 量：開始時～7 日後 ; 0.10～0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
7 日後～14 日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
14 日後～21 日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日
- 16) 希 釈 水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの
- 17) 分 析 法：高速液体クロマトグラフィー質量分析法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

1) 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)

算出せず(死亡率に逆転が認められたため、LC<sub>50</sub>を算出しなかった。)

2) 50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)

3.6 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.6~3.7 mg/l) Logit 変換による単回帰分析法により算出した。

3) 最大無作用濃度(NOEC)

1.8 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。

4) 最小作用濃度(LOEC)

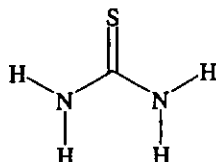
3.4 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。



## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

名称： チオ尿素  
別名： チオウレア, チオカルバミド<sup>1)</sup>  
CAS No： 62-56-6  
構造式：



分子式：  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$   
分子量： 76.12<sup>1)</sup>  
沸点： —  
融点： 176~178 °C<sup>1)2)</sup>  
水溶解度： 9 g/l (20 °C)<sup>1)</sup>, 15.3 % (21 °C)<sup>1)</sup>  
比重： 1.406 (20 °C)<sup>1)</sup>  
pKa： 解離基なし<sup>1)</sup>  
logPow： 2.5 (実測値), -1.02 (実測値), -1.02 (計算値)<sup>1)</sup>  
蒸気圧：  $1 \times 10^{-5}$  Pa ( $7.5 \times 10^{-4}$  mmHg) (20 °C)<sup>1)</sup>  
均一性： 同一ロットのものを使用した。  
安定性： —  
生分解性： 水中では微生物によって分解されにくい<sup>1)</sup>。  
その他： —  
出典： 1) 財団法人 化学物質評価研究機構：“既存化学物質安全性(ハザード)評価シート”(1997)  
2) [REDACTED]：“製品安全データシート”(1993)

### 1.2 供試試料

純度： 99.3 %  
ロット番号： 409C2143  
供給者： [REDACTED]  
供給量： 25 g×4 本  
入手日： 2002年12月5日  
外観： 白色結晶, 無臭

### 1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

#### 1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

#### 2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外分光光度計により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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。その結果、被験物質は保管条件下において安定であったと判断された。

## 2 供試生物

#### 1) 和 名：オオミジンコ

#### 2) 学 名：*Daphnia magna*

#### 3) 入 手 等：自家繁殖(1998年6月23日、国立環境研究所より入手)

#### 4) 基準物質による検定の結果：基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半、 遊泳阻害濃度(EiC<sub>50</sub>)は0.75 mg/l(2003年1月8日)であった。 当センターにおける1998年10月以降のEiC<sub>50</sub>値のバックグラウンドデータ(0.60±0.13 mg/l)と比較した結果、供試生物の感受性は、通常の状態にあると判断した。

#### 5) 試験使用の齢：雌の幼体(生後24時間以内齢)

#### 6) 供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法：

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で28日間(2002年12月25日～2003年1月22日)飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。暴露開始前日に育房内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)、親ミジンコ(28日齢)より産出された幼体を試験に用いた。

試験には、産出された幼体から健康で肉眼的に正常な個体をランダムに選別して使用した。産仔が初産の場合や親ミジンコの死亡が多い容器は使用しなかった。なお、飼育期間中、親ミジンコの成育は良好で、産出幼体の死産、墮胎卵、休眠卵及び雄の発生は認められなかった。飼育密度を35頭から25頭/l飼育水に変更した以降の親ミジンコの死亡率は0%であった。

#### 親ミジンコの飼育条件

##### ① 飼 育 水：希釈水(3.2参照)

##### ② 飼育方法：半止水式(週3回全量換水を行った。)

##### ③ 飼育容器：1 l容ガラス製ビーカー

##### ④ 飼育密度：開始時～4日後；35頭/l飼育水、5日後～28日後；25頭/l飼育水

##### ⑤ 水 温：19.1～20.5℃

##### ⑥ 照 明：室内光、16時間明期/8時間暗期

- ⑦ 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)
- ⑧ 給 餌：開始時～7日後 ; 0.01～0.06 mgC(有機体炭素)/頭/日  
8日後～14日後 ; 0.06～0.08 mgC(有機体炭素)/頭/日  
15日後～21日後 ; 0.08～0.10 mgC(有機体炭素)/頭/日  
22日後～28日後 ; 0.10 mgC(有機体炭素)/頭/日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：半止水式(24時間毎全量換水)
- 2) 暴露期間：21日間
- 3) 試験液量：80 ml/容器
- 4) 連 数：10容器/1試験区(別に予備として2容器を追加)
- 5) 供試生物数：10頭/試験区(1頭/1容器)
- 6) 試験温度：19.1～20.3℃
- 7) 溶存酸素濃度：8.8～10.3 mg/l (暴露期間中、エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 7.7～8.2 (試験液のpH調整は行わなかった。)
- 9) 硬 度：84～89 mg/l (CaCO<sub>3</sub>換算)
- 10) 照 明：室内光, 16時間明期/8時間暗期
- 11) 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)
- 12) 給 餌 量：開始時～7日後 ; 0.10～0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
7日後～14日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
14日後～21日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日

#### 3.2 希釈水

脱塩素水[水道水(茨城県つくば市)を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの。]を使用した。脱塩素水使用時には、残留塩素が無いことを確認した。硬度は83 mg/l (CaCO<sub>3</sub>換算), pHは7.3であった。

希釈水の定期的な水質測定結果は付属資料-1に示した。

#### 3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器：100 ml 容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約5 cm×高さ 約7 cm)を用いた。  
試験容器にはゴミの侵入や試験液の蒸散を防ぐ意味で蓋をした。
- 2) 恒 温 室：21.84R-5510[日立冷熱株式会社]
- 3) 水 温 計：AP-210E[安立計器株式会社]
- 4) 溶存酸素計：D0-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 5) pH 計：HM-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 6) 塩素比色計：OT-I型[理研光学株式会社]

### 3.4 試験濃度の設定

急性遊泳阻害試験(第14022号)の予備試験結果より、 $EC_{50}$ が5.6~32 mg/lの範囲内にあると予想された。また、繁殖阻害試験の予備試験結果より、1.0 mg/lの濃度区ではミジンコの繁殖阻害が認められなかったことに基づき、本試験では、32 mg/l以下の濃度を公比1.8で7濃度区(1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18及び32 mg/l)設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2に示した。

### 3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に暴気を行い、恒温槽内で $20 \pm 1$  °Cにした。

被験物質を超音波処理により希釈水に溶解させ被験物質原液(1,000 mg/l)を調製した。

この被験物質原液を希釈水に添加して各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、希釈水のみが無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が99.3%と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液は用時調製とした。

### 3.6 試験液の分析

試験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計を用いて、全試験区について暴露開始時(0時間)、1日後の換水前、7日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後及び15日後の換水前の計6回行い、その算術平均値を求めた。暴露開始時、7及び14日後の換水後は、分析用及び12連分を同時に調製した容器から試験液を50 ml採取して分析用試験液とした。また、1, 8及び15日後の換水前は、各試験区のそれぞれ12連の試験容器から全量混合した試験液を50 ml採取し、それぞれ分析用試験液とした。

なお、分析方法は付属資料-4に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH及び硬度を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の希釈水は全量で1%以内を目安とした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日後まで飼育した。暴露期間中は毎日給餌を行った。

#### ・ミジンコの観察

[親ミジンコ]：毎日、生死を計数した。また、状態を観察して異常(遊泳阻害、外観等)が認められた場合はその状況を記載した。計数後の死亡個体は取り除いた。

換水時に新しい試験液に移す際は、古い試験液は極力入らないようにした。

[産出幼体]：最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。

死亡幼体、墮胎卵、休眠卵の発生等についてはその有無を観察した。最初の幼体産出日(初産日)を記録した。

#### ・水質測定

各試験区の水温、溶存酸素濃度、pH及び硬度を、全試験区について、暴露開始時、1日後の換水前、7日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後、15日後の換水前に測定した。

暴露開始時及び各時間の換水後については同一容器で調製した試験液について実施した。各換水前については全容器から全量混合したものについて実施した。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態(外観等)を観察し、記録した。

#### 4 結果の算出

結果の算出は、12連中の試験容器番号の若いものから10連のデータを用いた。

##### 4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は測定値(算術平均)とした。

##### 4.2 親ミジンコの半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)の算出

本試験では親ミジンコの死亡率が5.6 mg/l及び10 mg/l濃度区において逆転したため、21日間の半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)は算出できなかった。また、死亡数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

##### 4.3 50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)の算出

対照区と各濃度区において21日間生存した親1頭あたりの平均累積産仔数から算出した繁殖阻害率を用いて、Logistic曲線にあてはめ、回帰分析し、21日間の50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)を算出した。それらの95 %信頼区間も算出した。また、平均累積産仔数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

##### 4.4 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)\*

各試験容器毎の21日間の生存親1頭当たりの累積産仔数を算出し、各試験区と対照区(または助剤対照区)との有意差の有無をBartlettの等分散検定、一元配置分散分析(ANOVA)及びDunnnettの多重比較検定(片側、有意水準： $\alpha=0.05$ )により求め、対照区と有意差の認められない最高濃度(NOEC)及び有意差の認められる最低濃度(LOEC)を決定した。

\* 最大無作用濃度(NOEC)：繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度

最小作用濃度(LOEC)：繁殖状態に対照区と有意差の認められる最低濃度

##### 4.5 試験容器間の均一性解析

異常値が認められなかったため、試験容器間の均一性解析は実施しなかった。

##### 4.6 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-3に示した。

Yukms 統計ライブラリー 生物検定編(ユックムス株式会社)

## 5 結果及び考察

### 5.1 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時, 1日後の換水前, 7日後の換水後, 8日後の換水前, 14日後の換水後及び15日後の換水前に試験液中の被験物質濃度を測定し, その結果をTable 1に示した。

暴露開始時, 7日後の換水後及び14日後の換水後の試験液中の測定濃度は, それぞれ1.10~35.6 mg/l(設定濃度: 1.0~32 mg/l), 1.02~11.0 mg/l, 1.08~11.2 mg/l(設定濃度: 1.0~10 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 暴露開始時が104~117%, 7日後の換水後が93~110%及び14日後の換水後が106~112%であった。

また, 1日後の換水前, 8日後の換水前及び15日後の換水前の試験液中の測定濃度は, それぞれ1.07~34.7 mg/l(設定濃度: 1.0~32 mg/l), 1.04~11.2 mg/l, 1.11~12.2 mg/l(設定濃度: 1.0~10 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 1日後の換水前が105~115%, 8日後の換水前が97~112%及び15日後の換水前が106~122%であった。

各濃度区の設定濃度に対する測定濃度の算術平均値は1.0 mg/lで1.07 mg/l, 1.8 mg/lで1.84 mg/l, 3.2 mg/lで3.35 mg/l, 5.6 mg/lで6.12 mg/l, 10 mg/lで11.5 mg/l, 18 mg/lで19.7 mg/l及び32 mg/lで35.2 mg/lであった。なお, 15日後の換水前に10 mg/lの濃度区で設定濃度に対する割合が122%となったが, 本試験では測定値が設定濃度より高めに出る傾向にあり, また, その他の濃度区においても14日後の換水後に対して, 15日後の換水前の測定値は高めに検出されていることから, 測定誤差によるものと判断した。

よって, 本被験物質は試験液中で安定であったと考えられた。

以上のことから, 以下の値(親ミジンコの半数致死濃度, 50%繁殖阻害濃度, 最大無作用濃度及び最小作用濃度)は測定値から算出した算術平均値を基に示した。

### 5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また, 1日後の試験液は全ての濃度区で開始時と比較して変化が認められなかった。

### 5.3 ミジンコの観察結果

#### 1) 親ミジンコの累積死亡数及び死亡率

21日後の親ミジンコの死亡率は対照区, 1.07 mg/l, 1.84 mg/l, 3.35 mg/l及び11.5 mg/lで0%, 6.12 mg/lで10%, 19.7 mg/l及び35.2 mg/lで100%であった。

各試験区における親ミジンコの累積死亡数をTable 2-1及びFigure 1に示した。親ミジンコの死亡率をTable 2-2に示した。

#### 2) 親ミジンコの状態

暴露開始より1日後から, 遊泳阻害が19.7 mg/lの濃度区で3個体観察された。また, 対照区と比較して小さい個体が11.5 mg/lの濃度区で10個体観察された。

#### 3) 産出幼体等の状態

暴露開始より9日以降, 死亡幼体が6.12 mg/l以上の濃度区で観察された。また, 10日以降, 墮胎卵が3.35 mg/l以上の濃度区で観察された。死亡幼体及び墮胎卵を産出する個体の割合は, 高濃度区になるほど高くなった。また, 対照区では死亡幼体及び墮胎卵は観察されなかった。なお, 全ての試験区で休眠卵の発生は認められなかった。

4) 初産日

各濃度区の初産日は、1.07 mg/l で8～9日後、1.84 mg/l、3.35 mg/l 及び6.12 mg/l で7～9日後、11.5 mg/l で11～12日後であり、19.7 mg/l 以上では産仔は観察されなかった。

対照区は8～9日後であった。

各試験区における初産日を Table 3 に示した。

5) 平均累積産仔数

各濃度区の21日後の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、1.07 mg/l で184.3頭、1.84 mg/l で167.7頭、3.35 mg/l で117.6頭、6.12 mg/l で15.2頭及び11.5mg/l で1.4頭であった。

対照区の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、179.4頭であった。

各試験区における生存親1頭当たりの平均累積産仔数を Table 4 及び Figure 2 に示した。

5.4 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)

21日後の親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)を Table 5 及び以下に示した。

親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>) : 算出せず

5.5 50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)

21日後の50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)を Table 6 及び以下に示した。また、濃度－繁殖阻害率のグラフを Figure 3 に示した。

50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>) : 3.6 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.6～3.7 mg/l)

Logit 変換による単回帰分析により算出した。

5.6 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)を Table 7 及び以下に示した。

なお、6.12 mg/l 及び11.5 mg/l 濃度区は生存幼体の平均累積産仔数が、それぞれ15.2頭及び1.4頭であり、対照区(179.4頭)と比較して明らかに少なかった。また、19.7 mg/l 及び35.2 mg/l の濃度区は親ミジンコが全て死亡した。よって、以上の濃度区はNOEC 及びLOEC の算出に用いなかった。

最大無作用濃度(NOEC) : 1.8 mg/l (Dunnett の多重比較検定法により算出した。)

最小作用濃度(LOEC) : 3.4 mg/l (Dunnett の多重比較検定法により算出した。)

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH 及び硬度

試験液の水温を Table 8、溶存酸素濃度を Table 9、pH を Table 10、硬度を Table 11 に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は19.1～20.3℃、溶存酸素濃度は8.8～10.3 mg/l、pH は7.7～8.2、硬度は84～89 mg/l (CaCO<sub>3</sub>換算)であり、水温は20±1℃、溶存酸素濃度は3 mg/l 以上、pH は6.0～9.0、硬度は10～250 mg/l の範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.8 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.9 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。

5.10 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の親ミジンコの死亡率が0%(20%以下), 平均累積産仔数が179.4頭(60頭以上)であったため, 本試験の成立が確認された。

5.11 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から, 被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって, 暴露期間中の供試生物は, ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。また, 0%繁殖阻害最高濃度と100%繁殖阻害最低濃度の間隔が狭い、とから, 本被験物質の供試生物に対する用量反応性は鋭敏であると考えられた。

本被験物質は水溶解度が高く, 難分解性物質であることから, 自然環境中に流出した場合には, 水系への拡散が早く, その地域に生息する生物に対して, 長期間の暴露影響を及ぼす可能性が高いと推察された。よって, 本試験より得られた情報のみから, その影響を推察するには注意が必要であり, より長期的な暴露による影響を確認する必要があると考えられた。



Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water during 21-day Exposure Period  
(Semi-Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Date | Measured Concentration (mg/l) |                          |            |                          |            |                          |            |                          |             |                          |             |                          | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Percent<br>of<br>Nominal |
|------------------------------------|------|-------------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|---|--------------------------|
|                                    |      | 0<br>(New)                    | Percent<br>of<br>Nominal | 1<br>(Old) | Percent<br>of<br>Nominal | 7<br>(New) | Percent<br>of<br>Nominal | 8<br>(Old) | Percent<br>of<br>Nominal | 14<br>(New) | Percent<br>of<br>Nominal | 15<br>(Old) | Percent<br>of<br>Nominal |   |                          |
| Control                            |      | < 0.05                        | ---                      | < 0.05     | ---                      | < 0.05     | ---                      | < 0.05     | ---                      | < 0.05      | ---                      | < 0.05      | ---                      | ---   | ---                      |
| 1.0                                |      | 1.10                          | 110                      | 1.07       | 107                      | 1.02       | 102                      | 1.04       | 104                      | 1.08        | 108                      | 1.11        | 111                      | 1.07  | 107                      |
| 1.8                                |      | 1.88                          | 104                      | 1.89       | 105                      | 1.68       | 93                       | 1.74       | 97                       | 1.91        | 106                      | 1.94        | 108                      | 1.84  | 102                      |
| 3.2                                |      | 3.53                          | 110                      | 3.46       | 108                      | 3.10       | 97                       | 3.19       | 100                      | 3.41        | 107                      | 3.40        | 106                      | 3.35  | 105                      |
| 5.6                                |      | 6.39                          | 114                      | 6.17       | 110                      | 5.77       | 103                      | 5.96       | 106                      | 6.00        | 107                      | 6.45        | 115                      | 6.12  | 109                      |
| 10                                 |      | 11.7                          | 117                      | 11.5       | 115                      | 11.0       | 110                      | 11.2       | 112                      | 11.2        | 112                      | 12.2        | 122                      | 11.5  | 115                      |
| 18                                 |      | 20.2                          | 112                      | 19.1       | 106                      | —          | —                        | —          | —                        | —           | —                        | —           | —                        | 19.7*   | 109                      |
| 32                                 |      | 35.6                          | 111                      | 34.7       | 108                      | —          | —                        | —          | —                        | —           | —                        | —           | —                        | 35.2*   | 110                      |

a : Arithmetic Mean, New : freshly prepared test solution, Old : test solution after 24 Hours exposure

\* : Arithmetic Mean of measured concentration during 7 days

— : No measurement was made because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

|     | Concentration (mg/l) |      | % of Nominal |      |
|-----|----------------------|------|--------------|------|
|     | Min.                 | Max. | Min.         | Max. |
| New | 1.02                 | ~    | 93           | ~    |
| Old | 1.04                 | ~    | 97           | ~    |

Table 2-1. Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

| Table 2-1. Cumulative Numbers of Dead Parental <i>Daphnia</i> |   |      |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---|---|------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l)                            | Mean* Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Days |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|   |   | 0    | 1 | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| Control   | —   | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 1.0   | 1.07                                      | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 1.8   | 1.84                                      | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 3.2   | 3.35                                      | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 5.6   | 6.12                                      | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  |
| 10  | 11.5                                      | 0    | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 18  | 19.7                                      | 0    | 3 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 32  | 35.2                                      | 0    | 7 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

a : Arithmetic Mean

Table 2-2. Mortality (%) of Parental *Daphnia*

| Nominal Conc.<br>(mg/l) | Mean* Measured Conc.<br>(mg/l) | Days |     |     |     |     |     |
|-------------------------|--------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                         |                                | 1    | 2   | 4   | 7   | 14  | 21  |
| Control                 | —                              | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 1.0                     | 1.07                           | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 1.8                     | 1.84                           | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3.2                     | 3.35                           | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 5.6                     | 6.12                           | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 10  |
| 10                      | 11.5                           | 0    | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 18                      | 19.7                           | 30   | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32                      | 35.2                           | 70   | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

a : Arithmetic Mean

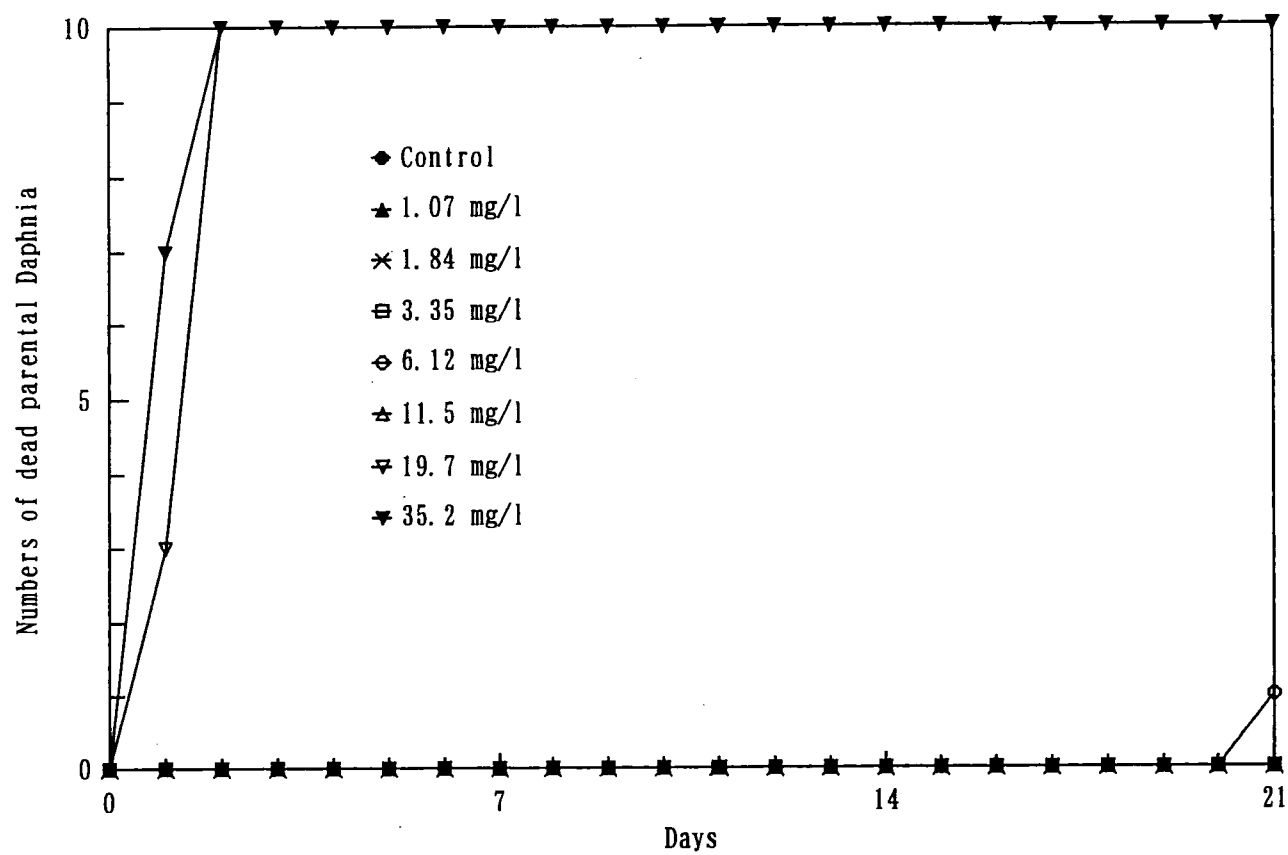


Figure 1. Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

Table 3. Time (Days) to First Brood Production

| No.  | Nominal Concentration(mg/l)                       |               |               |               |               |              |              |              |
|------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
|      | [Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)] |               |               |               |               |              |              |              |
|      | Control   | 1.0<br>[1.07] | 1.8<br>[1.84] | 3.2<br>[3.35] | 5.6<br>[6.12] | 10<br>[11.5] | 18<br>[19.7] | 32<br>[35.2] |
| 1    | 9   | 9             | 7             | 7             | 8             | 11           | D            | D            |
| 2    | 9   | 9             | 7             | 9             | 9             | 11           | D            | D            |
| 3    | 8   | 9             | 9             | 7             | 9             | —            | D            | D            |
| 4    | 9   | 9             | 9             | 7             | 8             | 11           | D            | D            |
| 5    | 9   | 8             | 9             | 9             | 7             | —            | D            | D            |
| 6    | 9   | 9             | 9             | 9             | 8             | 12           | D            | D            |
| 7    | 9   | 8             | 9             | 9             | 9             | 12           | D            | D            |
| 8    | 9   | 9             | 7             | 9             | 9             | —            | D            | D            |
| 9    | 9   | 9             | 9             | 7             | D             | —            | D            | D            |
| 10   | 9   | 9             | 9             | 9             | 9             | —            | D            | D            |
| Min. | 8   | 8             | 7             | 7             | 7             | 11           |              |              |
| Max. | 9   | 9             | 9             | 9             | 9             | 12           |              |              |

a : Arithmetic Mean

— : No brood production was observed during a 21-day testing period.

D : The parental *Daphnia* was dead during a 21-day testing period.

Table 4. Mean Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days ( $\Sigma F1/P$ )  
(Base for the data were the values standardized on the numbers of surviving parental *Daphnia* of each of the ten parallels.)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean* Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Days |     |     |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|---|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                    |   | 6    | 7   | 8   | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    |
| Control                            | —   | 0.0  | 0.0 | 0.9 | 11.4 | 11.4 | 17.7 | 40.7 | 40.8 | 46.9 | 93.1 | 93.1  | 93.1  | 140.2 | 140.3 | 140.3 | 179.4 |
| 1.0                                | 1.07                                      | 0.0  | 0.0 | 1.6 | 12.3 | 14.4 | 18.2 | 46.7 | 52.7 | 58.3 | 98.5 | 103.3 | 103.3 | 144.2 | 148.3 | 148.3 | 184.3 |
| 1.8                                | 1.84                                      | 0.0  | 3.1 | 3.1 | 12.1 | 18.3 | 18.3 | 42.0 | 56.9 | 57.0 | 88.9 | 103.5 | 103.5 | 126.8 | 132.4 | 146.4 | 167.7 |
| 3.2                                | 3.35                                      | 0.0  | 2.7 | 2.7 | 10.3 | 16.3 | 17.8 | 37.6 | 49.8 | 54.3 | 71.1 | 81.7  | 88.1  | 91.3  | 104.7 | 115.0 | 117.6 |
| 5.6                                | 6.12                                      | 0.0  | 0.7 | 2.6 | 5.1  | 5.7  | 6.6  | 10.4 | 10.5 | 11.4 | 11.4 | 12.5  | 12.8  | 12.9  | 14.3  | 14.7  | 15.2  |
| 10                                 | 11.5                                      | 0.0  | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.4  | 0.6  | 0.6  | 1.0  | 1.4  | 1.4   | 1.4   | 1.4   | 1.4   | 1.4   | 1.4   |
| 18                                 | 19.7                                      | —    | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —     | —     | —     | —     | —     | —     |
| 32                                 | 35.2                                      | —    | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —     | —     | —     | —     | —     | —     |

a : Arithmetic Mean

— : The parental *Daphnia* was dead during a 21-day testing period.

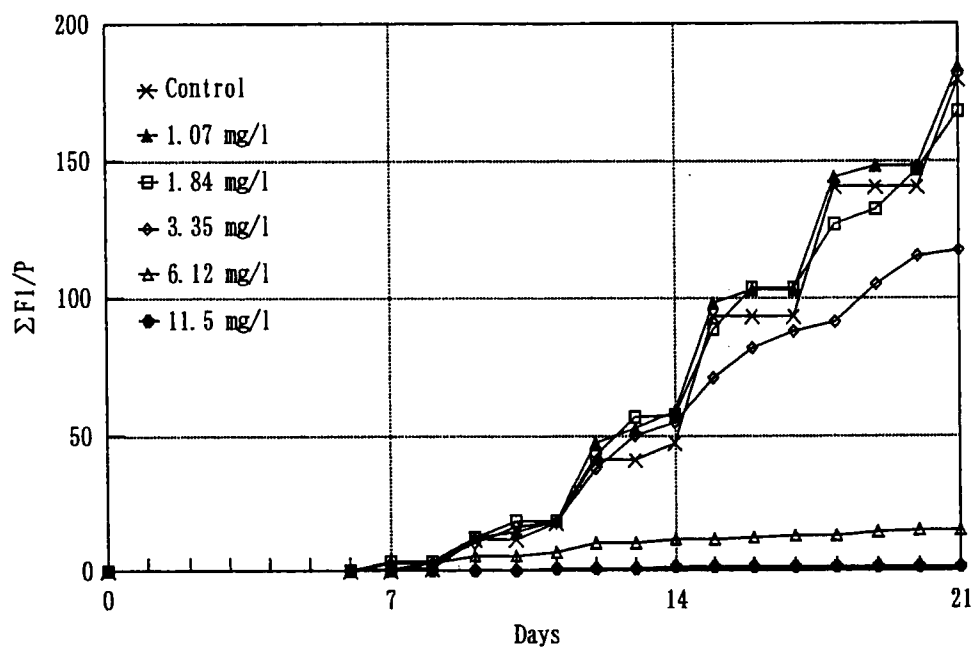


Figure 2. Time Course of  $\Sigma F1/P$  for Each Concentration Level

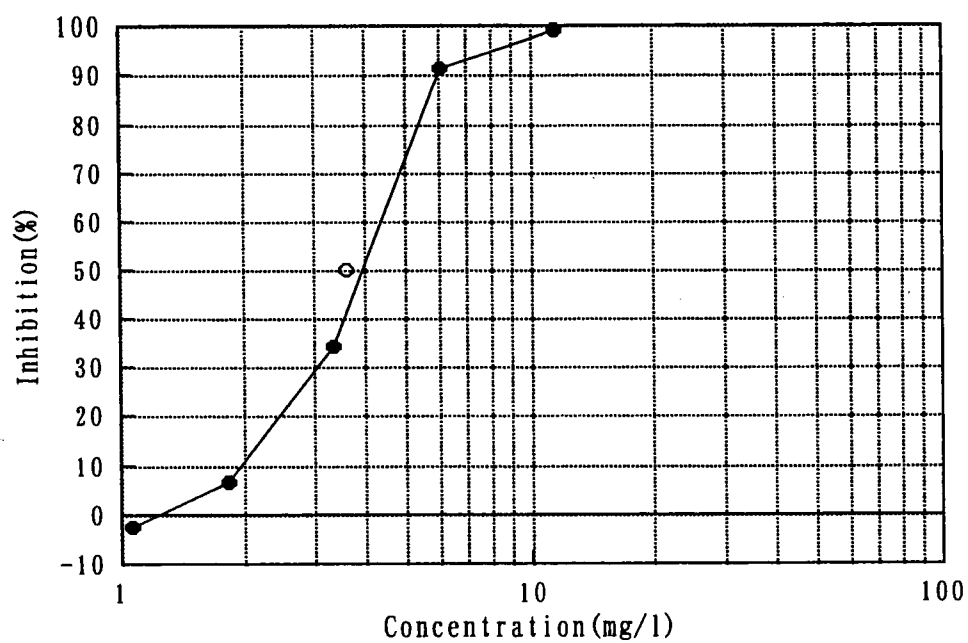


Figure 3. Concentration- Inhibition of Reproduction Curve

Table 5. Calculated  $LC_{50}$  Values for Parental *Daphnia*

| Exposure Period<br>(Days) | $LC_{50}$ (mg/l) | 95-Percent<br>Confidence Limits (mg/l) | Statistical Method |
|---------------------------|------------------|--|--------------------|
| 21                        | Not calculated   | —                                      | —                  |

Table 6. Calculated  $EC_{50}$  Values for Inhibition of Reproduction

| Exposure Period<br>(Days) | $EC_{50}$ (mg/l) | 95-Percent<br>Confidence Limits (mg/l) | Statistical Method |
|---------------------------|------------------|--|--------------------|
| 21                        | 3.6              | 3.6~3.7                                | Simple regression  |

Table 7. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days in Each Test Vessel and Result of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

| No.                    | Nominal Concentration(mg/l)                       |               |               |               |                |                |              |              |
|------------------------|---|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
|                        | [Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)] |               |               |               |                |                |              |              |
|                        | Control   | 1.0<br>[1.07] | 1.8<br>[1.84] | 3.2<br>[3.35] | 5.6<br>[6.12]  | 10<br>[11.5]   | 18<br>[19.7] | 32<br>[35.2] |
| 1                      | 174   | 186           | 186           | 128           | 4              | 7              | D            | D            |
| 2                      | 198   | 184           | 162           | 123           | 12             | 0              | D            | D            |
| 3                      | 178   | 179           | 160           | 115           | 9              | 0              | D            | D            |
| 4                      | 198   | 174           | 128           | 144           | 18             | 5              | D            | D            |
| 5                      | 183   | 207           | 176           | 93            | 17             | 0              | D            | D            |
| 6                      | 168   | 184           | 190           | 115           | 15             | 1              | D            | D            |
| 7                      | 191   | 167           | 180           | 119           | 24             | 1              | D            | D            |
| 8                      | 165   | 177           | 178           | 96            | 22             | 0              | D            | D            |
| 9                      | 171   | 188           | 183           | 145           | D              | 0              | D            | D            |
| 10                     | 168   | 197           | 134           | 98            | 16             | 0              | D            | D            |
| Mean                   | 179.4   | 184.3         | 167.7         | 117.6         | 15.2           | 1.4            | —            | —            |
| S. D.                  | 12.5  | 11.5          | 21.6          | 18.4          | 6.2            | 2.5            | —            | —            |
| Inhibition rate(%)     |   | -2.7          | 6.5           | 34.4          | 91.5           | 99.2           | —            | —            |
| Significant difference |   | —             | —             | **            | — <sup>b</sup> | — <sup>b</sup> | D            | D            |
| NOEC                   |   |               | ○             |               |                |                |              |              |
| LOEC                   |   |               |               | ○             |                |                |              |              |

a: Arithmetic Mean

\*\* :  $\alpha=0.01$ (significant difference)

b: Not included for calculation because mean cumulative numbers of living young were significantly fewer than that of the control.

D: Not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-day testing period.



Table 8. Temperature

(Semi-Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup><br>Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Date | Temperature (°C) |          |          |          |           |           | Min. | Max. |
|------------------------------------|--|------|------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------|------|
|                                    |  |      | 0<br>New         | 1<br>Old | 7<br>New | 8<br>Old | 14<br>New | 15<br>Old |      |      |
| Control                            | —  |      | 20.2             | 19.1     | 19.4     | 19.5     | 19.7      | 19.9      | 19.1 | 20.2 |
| 1.0                                | 1.07   |      | 20.2             | 19.1     | 19.2     | 20.1     | 19.5      | 20.2      | 19.1 | 20.2 |
| 1.8                                | 1.84   |      | 20.2             | 19.1     | 19.1     | 19.8     | 19.6      | 20.3      | 19.1 | 20.3 |
| 3.2                                | 3.35   |      | 20.2             | 19.1     | 19.2     | 19.8     | 19.8      | 20.1      | 19.1 | 20.2 |
| 5.6                                | 6.12   |      | 20.2             | 19.1     | 19.2     | 19.9     | 19.5      | 20.1      | 19.1 | 20.2 |
| 10                                 | 11.5   |      | 20.2             | 19.1     | 19.1     | 19.9     | 19.8      | 20.2      | 19.1 | 20.2 |
| 18                                 | 19.7   |      | 20.2             | 19.1     | —        | —        | —         | —         | 19.1 | 20.2 |
| 32                                 | 35.2   |      | 20.2             | 19.2     | —        | —        | —         | —         | 19.2 | 20.2 |
| Range                              |  |      |                  |          |          |          |           |           | 19.1 | 20.  |

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Table 9. Dissolved Oxygen Concentration

(Semi-Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup><br>Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Date | Dissolved Oxygen Concentration (mg/l) |          |          |          |           |           | Min. | Max. |
|------------------------------------|--|------|---------------------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------|------|
|                                    |  |      | 0<br>New                              | 1<br>Old | 7<br>New | 8<br>Old | 14<br>New | 15<br>Old |      |      |
| Control                            | —  |      | 9.8                                   | 10.2     | 9.5      | 9.3      | 9.3       | 9.1       | 9.1  | 10.2 |
| 1.0                                | 1.07   |      | 9.7                                   | 10.3     | 9.5      | 8.8      | 9.4       | 8.9       | 8.8  | 10.3 |
| 1.8                                | 1.84   |      | 9.6                                   | 10.0     | 9.5      | 9.0      | 9.5       | 9.0       | 9.0  | 10.0 |
| 3.2                                | 3.35   |      | 9.7                                   | 10.1     | 9.4      | 9.0      | 9.4       | 9.2       | 9.0  | 10.  |
| 5.6                                | 6.12   |      | 9.6                                   | 10.1     | 9.5      | 9.1      | 9.4       | 9.6       | 9.1  | 10.1 |
| 10                                 | 11.5   |      | 9.5                                   | 10.1     | 9.4      | 9.6      | 9.4       | 9.9       | 9.4  | 10.1 |
| 18                                 | 19.7   |      | 9.6                                   | 10.1     | —        | —        | —         | —         | 9.6  | 10.1 |
| 32                                 | 35.2   |      | 9.6                                   | 10.0     | —        | —        | —         | —         | 9.6  | 10.0 |
| Range                              |  |      |                                       |          |          |          |           |           | 8.8  | 10.3 |

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Table 10. pH Values

(Semi-Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup><br>Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Date | pH       |          |          |          |           |           | Min. | Max. |
|------------------------------------|--|------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------|------|
|                                    |  |      | 0<br>New | 1<br>Old | 7<br>New | 8<br>Old | 14<br>New | 15<br>Old |      |      |
| Control                            | —  |      | 8.1      | 8.1      | 8.0      | 7.8      | 8.1       | 7.8       | 7.8  | 8.1  |
| 1.0                                | 1.07   |      | 8.1      | 8.2      | 8.0      | 7.9      | 8.0       | 7.7       | 7.7  | 8.2  |
| 1.8                                | 1.84   |      | 8.1      | 8.2      | 8.0      | 8.0      | 8.0       | 7.7       | 7.7  | 8.2  |
| 3.2                                | 3.35   |      | 8.1      | 8.2      | 8.0      | 8.0      | 8.0       | 7.8       | 7.8  | 8.2  |
| 5.6                                | 6.12   |      | 8.1      | 8.2      | 8.0      | 8.1      | 8.0       | 7.9       | 7.9  | 8.2  |
| 10                                 | 11.5   |      | 8.1      | 8.2      | 8.1      | 8.2      | 8.1       | 8.1       | 8.1  | 8.2  |
| 18                                 | 19.7   |      | 8.1      | 8.2      | —        | —        | —         | —         | 8.1  | 8.2  |
| 32                                 | 35.2   |      | 8.1      | 8.2      | —        | —        | —         | —         | 8.1  | 8.2  |
| Range                              |  |      |          |          |          |          |           |           | 7.7  | 8.2  |

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Table 11. Total Hardness(as CaCO<sub>3</sub>)

(Semi-Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup><br>Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Date | Total Hardness(as CaCO <sub>3</sub> , mg/l) |          |          |          |           |           | Min. | Max. |
|------------------------------------|--|------|---|----------|----------|----------|-----------|-----------|------|------|
|                                    |  |      | 0<br>New                                    | 1<br>Old | 7<br>New | 8<br>Old | 14<br>New | 15<br>Old |      |      |
| Control                            | —  |      | 86  | 88       | 86       | 87       | 85        | 86        | 85   | 88   |
| 1.0                                | 1.07   |      | 86  | 87       | 86       | 86       | 86        | 86        | 86   | 87   |
| 1.8                                | 1.84   |      | 84  | 87       | 86       | 86       | 85        | 86        | 84   | 87   |
| 3.2                                | 3.35   |      | 86  | 87       | 86       | 87       | 85        | 86        | 85   | 87   |
| 5.6                                | 6.12   |      | 86  | 88       | 85       | 87       | 86        | 87        | 85   | 87   |
| 10                                 | 11.5   |      | 85  | 86       | 86       | 86       | 86        | 87        | 85   | 87   |
| 18                                 | 19.7   |      | 86  | 88       | —        | —        | —         | —         | 86   | 88   |
| 32                                 | 35.2   |      | 86  | 89       | —        | —        | —         | —         | 86   | 89   |
| Range                              |  |      |   |          |          |          |           |           | 84   | 89   |

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

| Parameter                              | Concentration | Parameter                                   | Concentration  |
|--|---------------|---|----------------|
| pH Value                               | 7.7 (20℃)     | Iprobenfos (IBP)                            | < 0.0005 mg/l  |
| Coliform Group                         | Not Detected  | Chlornitrofen (CNP)                         | < 0.00001 mg/l |
| Total residue                          | 220 mg/l      | Chemical oxygen demand (COD <sub>cr</sub> ) | < 10 mg/l      |
| Phenols                                | < 0.005 mg/l  | Biochemical oxygen demand                   | < 1 mg/l       |
| Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) | 85 mg/l       | Suspended solids                            | < 1 mg/l       |
| Nitrate and Nitrite                    | 0.7 mg/l      | Phosphorus                                  | < 0.01 mg/l    |
| Fluoride                               | 0.13 mg/l     | Bromide ion                                 | < 0.5 mg/l     |
| Dichloromethane                        | < 0.001 mg/l  | Sulfide ion (S <sup>2-</sup> )              | < 0.01 mg/l    |
| Carbon tetrachloride                   | < 0.0002 mg/l | Electric conductivity (25℃)                 | 37 mS/m        |
| 1,2-Dichloroethane                     | < 0.0002 mg/l | Alkalinity (CaCO <sub>3</sub> )             | 49 mg/l        |
| 1,1-Dichloroethylene                   | < 0.001 mg/l  | Total organic carbon (TOC)                  | 1.9 mg/l       |
| Cis-1,2-Dichloroethylene               | < 0.001 mg/l  | Ammonium nitrogen (NH <sub>3</sub> -N)      | < 0.04 mg/l    |
| 1,1,1-Trichloroethane                  | < 0.001 mg/l  | PCB   | < 0.0005 mg/l  |
| 1,1,2-Trichloroethane                  | < 0.0005 mg/l | Mercury                                     | < 0.0001 mg/l  |
| Trichloroethylene                      | < 0.001 mg/l  | Cadmium                                     | < 0.001 mg/l   |
| Tetrachloroethylene                    | < 0.001 mg/l  | Cyanide                                     | < 0.005 mg/l   |
| 1,3-Dichloropropene                    | < 0.0002 mg/l | Lead  | < 0.005 mg/l   |
| Benzene                                | < 0.001 mg/l  | Chromium (VI)                               | < 0.005 mg/l   |
| Chloroform                             | < 0.001 mg/l  | Arsenic                                     | < 0.001 mg/l   |
| Thiram                                 | < 0.0005 mg/l | Selenium                                    | < 0.001 mg/l   |
| Simazine (CAT)                         | < 0.0002 mg/l | Nickel                                      | < 0.001 mg/l   |
| Thiobencarb                            | < 0.001 mg/l  | Copper                                      | 0.02 mg/l      |
| Isoxathion                             | < 0.0005 mg/l | Zinc  | < 0.005 mg/l   |
| Diazinon                               | < 0.0005 mg/l | Aluminum                                    | < 0.05 mg/l    |
| Fenitrothion (MEP)                     | < 0.0002 mg/l | Manganese                                   | < 0.005 mg/l   |
| Isoprothiolane                         | < 0.001 mg/l  | Iron  | < 0.03 mg/l    |
| Chlorothalonil (TPN)                   | < 0.001 mg/l  | Tin   | < 0.1 mg/l     |
| Propyzamide                            | < 0.0005 mg/l | Sodium                                      | 35 mg/l        |
| EPN                                    | < 0.0005 mg/l | Potassium                                   | 7.0 mg/l       |
| Dichlorvos (DDVP)                      | < 0.001 mg/l  | Calcium                                     | 21 mg/l        |
| Fenobucarb (BPMC)                      | < 0.001 mg/l  | Magnesium                                   | 8.2 mg/l       |

Date: January 7, 2003

付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果を Table 1 に示した。

Table 1. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 12 Days in Each Test Vessel

| No.                | Nominal Concentration(mg/l) |       |      |       |
|--------------------|-----------------------------|-------|------|-------|
|                    | Control                     | 0.010 | 0.10 | 1.0   |
| 1                  | 44                          | 49    | 42   | 50    |
| 2                  | 31                          | 48    | 43   | 45    |
| 3                  | 29                          | 35    | 40   | 31    |
| 4                  | 46                          | 39    | 36   | 59    |
| 5                  | 39                          | 57    | 31   | 92    |
| 6                  | 54                          | 27    | 44   | 47    |
| 7                  | 51                          | 15    | 49   | 55    |
| 8                  | 51                          | 18    | 37   | 55    |
| 9                  | 53                          | 40    | 48   | 48    |
| 10                 | 33                          | 20    | 50   | 55    |
| 11                 | 47                          | 40    | 48   | 39    |
| 12                 | 43                          | 62    | 49   | 41    |
| Total              | 521                         | 450   | 517  | 617   |
| Mean               | 43.4                        | 37.5  | 43.1 | 51.4  |
| S. D.              | 8.7                         | 15.2  | 6.1  | 15.1  |
| Inhibition rate(%) |                             | 13.6  | 0.7  | -18.4 |

付属資料-3：統計処理データ

統計ソフトの入力値とその出力結果を以下に示した。

EC<sub>50</sub> for inhibition of reproduction after 21 days exposure

第14023号

TUR

C: 2

L: 4

>:R: 4

1.84

-2.666159

3.35

-0.645519

6.12

2.3762728

11.5

4.8202816

Simple regression test [ LOG (Response variable)]

Filename : L-EC50-2.DAT

Set up data for analysis of covariance

No. of levels : 1

No. of replicate in level

A(1) : 4

No. of covariate : 1

Data table

Y

X(1)

A(1)

0.26482

-2.66616

0.52504

-0.64552

0.78675

2.37627

1.06070

4.82028

Mean Y and X

A(1)

0.65933

0.97122

Whole

0.65933

0.97122

Function regression with each levels

Whole

Y=

0.10345\*X(1)+

0.55885

Whole

X=

9.61815\*Y +

-5.37030

Test of regression coefficient of X

Source

Sum of SQR

df

Mean SQR

Fcal

Probability

Regression(A)

0.34925

1

0.34925

399.00886

0.00250

Regression(B)

0.00175

2

0.00088

Total

0.35100

3

Estimated population mean with regression function by Fieller

[2-side]

95 percent lower

Estimated

95 percent upper

g-criterion

Entered data

confidence limit

Res. value

confidence limit

0

3.5834

3.6772

3.5794

0.00050

NOEC and LOEC values for reproduction after 21 days exposure

入力データ (YUKMS 多重比較)

試験番号 第14023号

被験物質名 TUR

21日目の累積産仔数

M:1

L:10

C:4

| 対照区    | 1      | 1.8    | 3.2    |
|--------|--------|--------|--------|
| 174.00 | 186.00 | 186.00 | 128.00 |
| 198.00 | 184.00 | 162.00 | 123.00 |
| 178.00 | 179.00 | 160.00 | 115.00 |
| 198.00 | 174.00 | 128.00 | 144.00 |
| 183.00 | 207.00 | 176.00 | 93.00  |
| 168.00 | 184.00 | 190.00 | 115.00 |
| 191.00 | 167.00 | 180.00 | 119.00 |
| 165.00 | 177.00 | 178.00 | 96.00  |
| 171.00 | 188.00 | 183.00 | 145.00 |
| 168.00 | 197.00 | 134.00 | 98.00  |

| Model: 1 Basic statistic <<Column>> File:Filename : NOEC.DAT nxl: 0 |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| No.   | 1         | 2         | 3         | 4         |
| N   | 10        | 10        | 10        | 10        |
| Mean  | 179.40000 | 184.30000 | 167.70000 | 117.60000 |
| Variance  | 156.48889 | 131.12222 | 466.23333 | 339.60000 |
| S.D.  | 12.50955  | 11.45086  | 21.59244  | 18.42824  |
| S.E.  | 3.95587   | 3.62108   | 6.82813   | 5.82752   |

Bartlett test  
Bartlett's statistic CHI-SQR( 3  
0.0500) probability

4.65876 7.81472 0.19856

| Data table File name NOEC.DAT nxl: 0 |           |           |           |           |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| No.                                  | 1         | 2         | 3         | 4         |
| N                                    | 10        | 10        | 10        | 10        |
| Mean                                 | 179.40000 | 184.30000 | 167.70000 | 117.60000 |
| Variance                             | 156.48889 | 131.12222 | 466.23333 | 339.60000 |
| S.D.                                 | 12.50955  | 11.45086  | 21.59244  | 18.42824  |
| S.E.                                 | 3.95587   | 3.62108   | 6.82813   | 5.82752   |

| 1-way ANOVA with completely randomized design |              |      |               |             |             |
|---|--------------|------|---------------|-------------|-------------|
| Factor  | Sum of squar | D.F. | Mean of squar | F Statistic | Probability |
| A   | 28036.500000 | 3    | 9345.500000   | 34.187379   | 0.000000    |
| Error   | 9841.000000  | 36   | 273.361111    |             |             |
| Total   | 37877.500000 | 39   |               |             |             |

| Estimated population means and 95 percent confidence limit |                 |                        |            |
|--|-----------------|------------------------|------------|
| Lower confidence limit                                     | Population mean | Upper confidence limit |            |
| A( 1)  | 168.796324      | 179.400000             | 190.003676 |
| A( 2)  | 173.696324      | 184.300000             | 194.903676 |
| A( 3)  | 157.096324      | 167.700000             | 178.303676 |
| A( 4)  | 106.996324      | 117.600000             | 128.203676 |

Model: 1 Basic statistic <<Column>> File:Filename : NOEC.DAT nxl: 0

| No.      | 1         | 2         | 3         | 4         |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| N        | 10        | 10        | 10        | 10        |
| Mean     | 179.40000 | 184.30000 | 167.70000 | 117.60000 |
| Variance | 156.48889 | 131.12222 | 466.23333 | 339.60000 |
| S.D.     | 12.50955  | 11.45086  | 21.59244  | 18.42824  |
| S.E.     | 3.95587   | 3.62108   | 6.82813   | 5.82752   |

| Dunnett : Parametric multiple comparison l-side |         |             |           |             |                     |
|---|---------|-------------|-----------|-------------|---------------------|
| Comparison                                      | Differ. | Critical    | Statistic | Probability | .05 table .01 table |
| mean  | value   |             |           | value       | value               |
| 1 vs 2  | -4.900  | 15.769047   | -0.66269  | 0.470134    | 2.13266 2.83836     |
| 1 vs 3  | 11.700  | 15.769047   | 1.58235   | 0.140483    | 2.13266 2.83836     |
| 1 vs 4  | 61.800  | 20.987013** | 8.35805   | 0.000001    | 2.13266 2.83836     |

## 付属資料-4：試験液中の被験物質濃度の分析方法

### 1 標準品

被験物質を使用した。

### 2 試薬、試液及び標準溶液の調製

#### 1) 試薬

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

酢酸：特級

Milli-Q水：水道水を活性炭カートリッジ、逆浸透カートリッジ及びイオン交換樹脂で精製した後 Milli-Q system で精製したもの

C<sub>18</sub>ミニカラム：Waters 社, Sep-Pak Plus C18 カートリッジ

#### 2) 試液

##### ① 1 %酢酸

Milli-Q水100 ml及び酢酸1 mlを混合した。

##### ② 0.01 %酢酸

Milli-Q水990 ml及び1 %酢酸10 mlを混合した。

#### 3) 標準溶液の調製

被験物質0.025 gを精密に秤り、Milli-Q水に溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液をMilli-Q水で希釈して40 mg/l溶液を調製し、この一定量を取りMilli-Q水で適宜希釈して0.0125, 0.0625, 0.25及び0.5 mg/lの標準溶液を調製した。

### 3 試料溶液の調製

#### 1) 対照区及び1.0 mg/lの試験液

試験液の5 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取り付け、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

#### 2) 1.8 mg/lの試験液

試験液の4 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取り付け、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

#### 3) 3.2 mg/lの試験液

試験液の2 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取り付け、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

4) 5.6 mg/lの試験液

試験液の1 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

5) 10及び18 mg/lの試験液

試験液の1 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

6) 32 mg/lの試験液

試験液の1 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験液の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、試験液の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

4 高速液体クロマトグラフ-質量分析計操作条件

機 種 : Agilent 1100 G1312Aバイナリポンプ [Agilent Technologies]

検 出 器 : Agilent 1100 G1946D LC/MSD SL [Agilent Technologies]

カ ラ ム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> AQ, φ2.0 mm×15 cm [株式会社 資生堂]

カラム温度 : 40 °C

移 動 相 : 0.01 % 酢酸

流 量 : 0.2 ml/min

イオン化法 : ESI(positiveモード)

ドラインガス : 窒素(10 l/分, 350 °C)

ネブライザーガス : 窒素(30 psi)

フラグメンター電圧 : 90 V

キャピラリー電圧 : 2,000 V

設定質量数(m/z) : 77.1

データ処理装置 : LC/MSD ChemiStation(Rev. A. 09. 01) [Agilent Technologies]

5 定量

2の3)で調製した標準溶液及び3で調製した試料溶液4 µlを高速液体クロマトグラフ-質量分析計に注入した。標準溶液の濃度とピーク高から検量線を作成し、試験液中の被験物質濃度を算出した。



## 6 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.05 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{2 \text{ ml} \times 1,000}{4 \mu\text{l}} \times \frac{1}{0.5 \text{ ml}^*} = 0.05 \text{ mg/l}$$

$$* 0.5 \text{ ml} = \frac{5 \text{ ml}}{20 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}$$

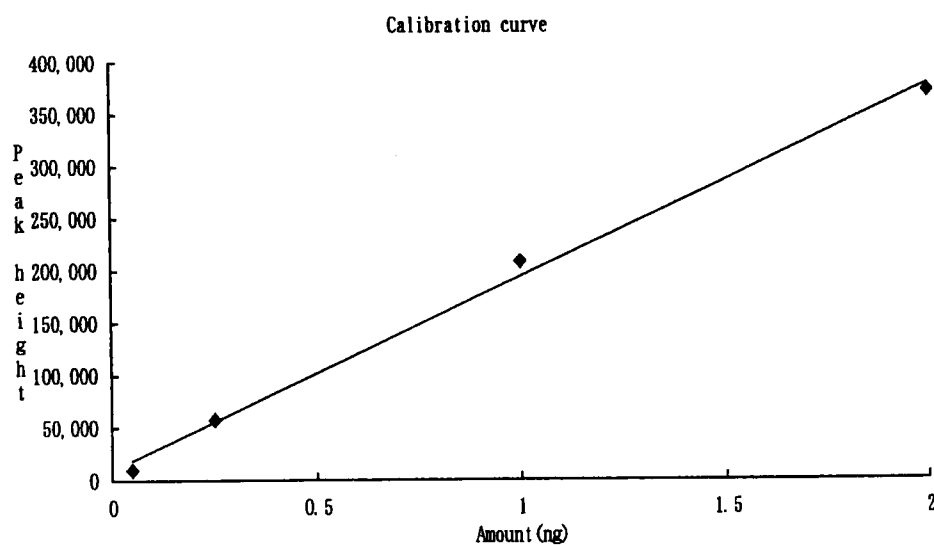
## 7 添加回収試験

### 1) 低濃度添加

希釈水に被験物質を1 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は113.1 %, 109.1 %, 108.3 %(平均110.2 %)であった。

### 2) 高濃度添加

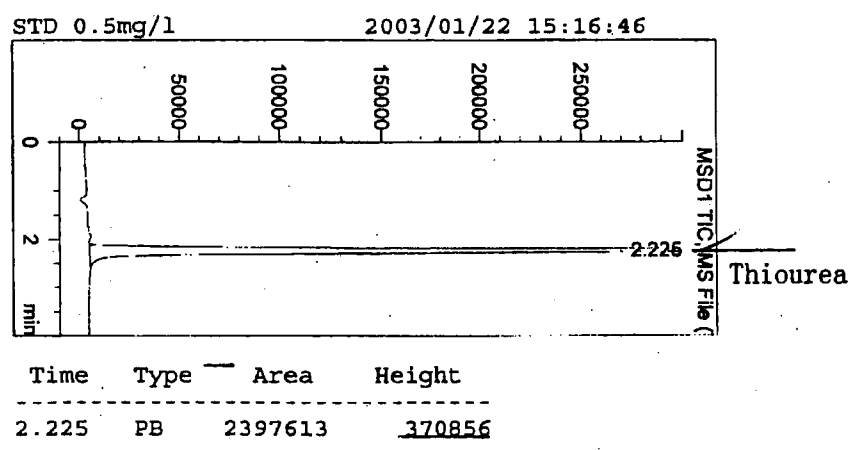
希釈水に被験物質を50 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は112.1 %, 111.2 %, 111.0 %(平均111.4 %)であった。



| Amount (ng) | Peak height |
|-------------|-------------|
| 2           | 370,856     |
| 1           | 208,417     |
| 0.25        | 57,445      |
| 0.05        | 9,994       |

Figure 1. Calibration curve of Thiourea by HPLC analysis

Standard (0.5 mg/l): 0 day



Control: 0 day

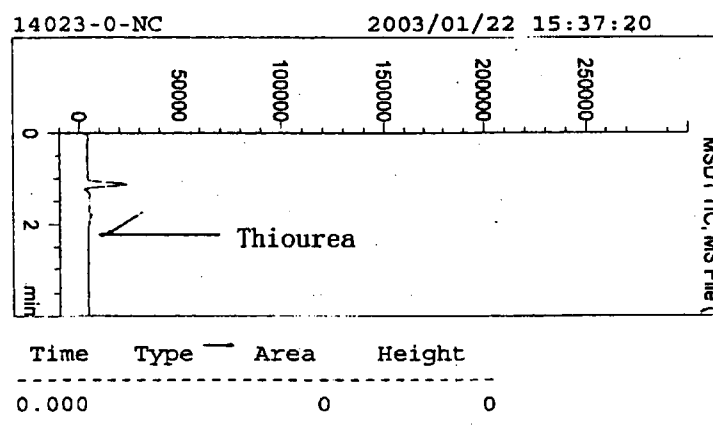
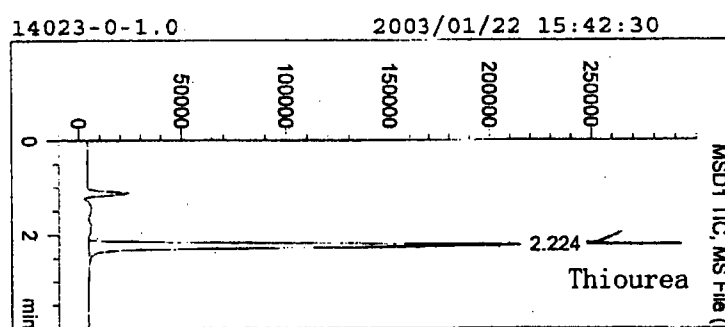


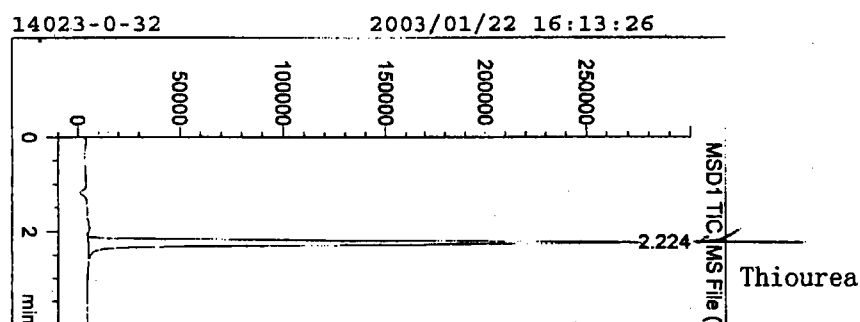
Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (1.0 mg/l): 0 day



| Time  | Type | Area    | Height |
|-------|------|---------|--------|
| 2.224 | PB   | 1333735 | 211865 |

Test solution (32 mg/l): 0 day



| Time  | Type | Area    | Height |
|-------|------|---------|--------|
| 2.224 | PB   | 1745605 | 272298 |

Figure 2-2. Representative chromatograms

付属資料-5：ミジンコの観察記録

Table A-1 Result of reproduction test: Control

| Table A-1  |                           |      | Result of reproduction test: Control |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|--|---------------------------|------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Rep. No.   | Counts                    |      | Time                                 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | total |
|  |                           |      | 1/23<br>1d                           | 1/24<br>2d | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d | 1/30<br>8d | 1/31<br>9d | 2/1<br>10d | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d | 2/4<br>13d | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d |       |
| 1  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 13         | 0          | 0          | 21         | 0          | 0          | 62         | 0          | 0          | 44         | 0           | 0           | 34          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 13         | 13         | 13         | 34         | 34         | 34         | 96         | 96         | 96         | 140        | 140         | 140         | 174         |       |
| 2  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12         | 0          | 0          | 35         | 1          | 0          | 55         | 0          | 0          | 56         | 0           | 0           | 39          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12         | 12         | 12         | 47         | 48         | 48         | 103        | 103        | 103        | 159        | 159         | 159         | 198         |       |
| 3  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 1          | 0          | 33         | 0          | 0          | 8          | 43         | 0          | 0          | 47         | 0           | 0           | 37          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 10         | 10         | 43         | 43         | 43         | 51         | 94         | 94         | 94         | 141        | 141         | 141         | 178         |       |
| 4  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 7          | 0          | 0          | 43         | 0          | 0          | 54         | 0          | 0          | 50         | 0           | 0           | 44          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 7          | 7          | 7          | 50         | 50         | 50         | 104        | 104        | 104        | 154        | 154         | 154         | 198         |       |
| 5  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12         | 0          | 0          | 30         | 0          | 0          | 57         | 0          | 0          | 46         | 0           | 0           | 38          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12         | 12         | 12         | 42         | 42         | 42         | 99         | 99         | 99         | 145        | 145         | 145         | 183         |       |
| 6  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 11         | 0          | 0          | 28         | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 42         | 0           | 0           | 39          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 11         | 11         | 11         | 39         | 39         | 39         | 87         | 87         | 87         | 129        | 129         | 129         | 168         |       |
| 7  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 0          | 30         | 0          | 0          | 53         | 0          | 0          | 0          | 52         | 0           | 0           | 47          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 9          | 39         | 39         | 39         | 92         | 92         | 92         | 92         | 144        | 144         | 144         | 191         |       |
| 8  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 0          | 0          | 25         | 0          | 0          | 46         | 0          | 0          | 44         | 1           | 0           | 40          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 9          | 9          | 9          | 34         | 34         | 34         | 80         | 80         | 80         | 124        | 125         | 125         | 165         |       |
| 9  | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 14         | 0          | 0          | 27         | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 40         | 0           | 0           | 42          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 14         | 14         | 14         | 41         | 41         | 41         | 89         | 89         | 89         | 129        | 129         | 129         | 171         |       |
| 10   | P generation              | Live | 1                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |       |
|  | FI generation             | Live | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 17         | 0          | 0          | 21         | 0          | 0          | 49         | 0          | 0          | 50         | 0           | 0           | 31          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0    | 0                                    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 17         | 17         | 17         | 38         | 38         | 38         | 87         | 87         | 87         | 137        | 137         | 137         | 168         |       |
| P generation: ○; not detected immobility      FI generation: F; observed the first brood |                           |      |                                      |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |

P generation: ○; not detected immobility FI generation: F; observed the first brood

Table A-2 Result of reproduction test: Nominal concentration: 1.0 mg/l Measured concentration: 1.07 mg/l

| Rep. No.                                 | Counts                    | Time       |            |            |            |            |            |            |                 |                 |            |            |                 |            |            |            |            |            |            |             |             |  | total |
|--|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|--|-------|
|  |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d | 1/30<br>8d      | 1/31<br>9d      | 2/1<br>10d | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d      | 2/4<br>13d | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d  |       |
| 1  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 10 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 31              | 0          | 0          | 56         | 0          | 0          | 47         | 0           | 0           | 42   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 10              | 10         | 10         | 41              | 41         | 41         | 97         | 97         | 97         | 144        | 144         | 144         | 186  | 186   |
| 2  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 16 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 37              | 1          | 0          | 49         | 0          | 0          | 44         | 0           | 0           | 37   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 16              | 16         | 16         | 53              | 54         | 54         | 103        | 103        | 103        | 147        | 147         | 147         | 184  | 184   |
| 3  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 13 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 36              | 0          | 0          | 49         | 0          | 0          | 39         | 0           | 0           | 42   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 13              | 13         | 13         | 49              | 49         | 49         | 98         | 98         | 98         | 137        | 137         | 137         | 179  | 179   |
| 4  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 11 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 30              | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 46         | 0           | 0           | 39   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 11              | 11         | 11         | 41              | 41         | 41         | 89         | 89         | 89         | 135        | 135         | 135         | 174  | 174   |
| 5  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 15 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 38         | 0               | 0          | 56         | 0          | 0          | 0          | 51         | 1           | 0           | 46   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 15              | 15              | 15         | 53         | 53              | 53         | 109        | 109        | 109        | 109        | 160        | 161         | 161         | 207  | 207   |
| 6  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 15 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 35              | 1          | 0          | 54         | 0          | 0          | 44         | 0           | 0           | 35   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 15              | 15         | 15         | 50              | 51         | 51         | 105        | 105        | 105        | 149        | 149         | 149         | 184  | 184   |
| 7  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 1 <sup>F</sup>  | 0               | 21         | 0          | 0               | 57         | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 40          | 0           | 0  |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 1               | 1               | 22         | 22         | 22              | 79         | 79         | 79         | 127        | 127        | 127        | 167         | 167         | 167  | 167   |
| 8  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 14 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 35              | 0          | 0          | 47         | 0          | 0          | 48         | 0           | 0           | 33   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 14              | 14         | 14         | 49              | 49         | 49         | 96         | 96         | 96         | 144        | 144         | 144         | 177  | 177   |
| 9  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 16 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 37 <sup>△</sup> | 1          | 0          | 49         | 0          | 0          | 44         | 0           | 0           | 41   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 16              | 16         | 16         | 53              | 54         | 54         | 103        | 103        | 103        | 147        | 147         | 147         | 188  | 188   |
| 10                                       | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |  |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 44              | 0          | 0          | 50         | 0          | 0          | 46         | 0           | 0           | 45   |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 12              | 12         | 12         | 56              | 56         | 56         | 106        | 106        | 106        | 152        | 152         | 152         | 197  | 197   |
| P generation: ○; not detected immobility |                           |            |            |            |            |            |            |            |                 |                 |            |            |                 |            |            |            |            |            |            |             |             | F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs |       |

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs

Table A-3 Result of reproduction test: Nominal concentration: 1.8 mg/l Measured concentration: 1.84 mg/l

| Rep. No.   | Counts                    | Time       |            |            |            |            |            |                 |            |                 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | total |
|--|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|  |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d      | 1/30<br>8d | 1/31<br>9d      | 2/1<br>10d | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d | 2/4<br>13d | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d |       |
| 1  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0               | 24         | 0          | 0          | 52         | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 0           | 50          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12              | 12         | 12              | 36         | 36         | 36         | 88         | 88         | 88         | 136        | 136        | 136        | 136         | 186         | 186         |       |
| 2  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 7 <sup>F</sup>  | 0          | 0               | 22         | 0          | 0          | 46         | 0          | 0          | 48         | 0          | 0          | 0           | 39          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 7               | 7          | 7               | 29         | 29         | 29         | 75         | 75         | 75         | 123        | 123        | 123        | 123         | 162         | 162         |       |
| 3  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 14 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 33         | 0          | 0          | 39         | 0          | 0          | 38         | 0           | 0           | 36          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 14              | 14         | 14         | 47         | 47         | 47         | 86         | 86         | 86         | 124        | 124         | 124         | 160         |       |
| 4  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 16 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 26         | 0          | 0          | 44         | 0          | 0          | 0          | 42          | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 16              | 16         | 16         | 42         | 42         | 42         | 86         | 86         | 86         | 86         | 128         | 128         | 128         |       |
| 5  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 35         | 1          | 0          | 49         | 0          | 0          | 39         | 0           | 0           | 40          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12              | 12         | 12         | 47         | 48         | 48         | 97         | 97         | 97         | 136        | 136         | 136         | 176         |       |
| 6  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 13 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 35         | 0          | 0          | 47         | 0          | 0          | 52         | 0           | 0           | 43          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 13              | 13         | 13         | 48         | 48         | 48         | 95         | 95         | 95         | 147        | 147         | 147         | 190         |       |
| 7  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 15 <sup>F</sup> | 1          | 0          | 36         | 0          | 0          | 39         | 0          | 0          | 42         | 0           | 0           | 47          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 15              | 16         | 16         | 52         | 52         | 52         | 91         | 91         | 91         | 133        | 133         | 133         | 180         |       |
| 8  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0               | 15         | 0          | 0          | 50         | 0          | 0          | 50         | 0          | 0          | 0           | 51          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12              | 12         | 12              | 27         | 27         | 27         | 77         | 77         | 77         | 127        | 127        | 127        | 127         | 178         | 178         |       |
| 9  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0          | 41         | 0          | 1          | 49         | 0          | 0          | 33         | 0           | 0           | 47          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12              | 12         | 12         | 53         | 53         | 54         | 103        | 103        | 103        | 136        | 136         | 136         | 183         |       |
| 10   | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 8 <sup>F</sup>  | 0          | 0          | 31         | 0          | 0          | 52         | 0          | 0          | 29         | 14          | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 8               | 8          | 8          | 39         | 39         | 39         | 91         | 91         | 91         | 120        | 134         | 134         | 134         |       |
| P generation: ○: not detected immobility      F1 generation: F: observed the first brood |                           |            |            |            |            |            |            |                 |            |                 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood

Table A-4 Result of reproduction test: Nominal concentration: 3.2 mg/l Measured concentration: 3.35 mg/l

| Rep. No.   | Counts                    | Time       |            |            |            |            |            |                 |            |                 |                 |            |                 |                 |            |            |            |            |            |                 |             |             | total |
|--|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|-------------|-------------|-------|
|  |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d      | 1/30<br>8d | 1/31<br>9d      | 2/1<br>10d      | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d      | 2/4<br>13d      | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d     | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d |       |
| 1  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 8 <sup>F</sup>  | 0          | 0               | 12 <sup>Δ</sup> | 0          | 0               | 42              | 0          | 0          | 32         | 0          | 0          | 0               | 34          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 8               | 8          | 8               | 20              | 20         | 20              | 62              | 62         | 62         | 94         | 94         | 94         | 94              | 128         | 128         | 128   |
| 2  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 10 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 36              | 1               | 0          | 8          | 32         | 0          | 0          | 36              | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 10              | 10              | 10         | 46              | 47              | 47         | 55         | 87         | 87         | 87         | 123             | 123         | 123         | 123   |
| 3  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 2 <sup>F</sup>  | 0          | 0               | 8               | 15         | 0               | 0               | 41         | 0          | 0          | 25         | 0          | 0               | 0           | 24          |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 2               | 2          | 2               | 10              | 25         | 25              | 25              | 66         | 66         | 66         | 91         | 91         | 91              | 91          | 115         | 115   |
| 4  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0          | 0               | 16              | 0          | 0               | 37 <sup>Δ</sup> | 4          | 0          | 0          | 39         | 0          | 0               | 36          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 12              | 12         | 12              | 28              | 28         | 28              | 65              | 69         | 69         | 69         | 108        | 108        | 108             | 144         | 144         | 144   |
| 5  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 10 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 30              | 0               | 0          | 28         | 0          | 0          | 0          | 25              | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 10              | 10              | 10         | 40              | 40              | 40         | 68         | 68         | 68         | 68         | 93              | 93          | 93          | 93    |
| 6  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 16 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 37              | 0               | 0          | 33         | 0          | 0          | 0          | 29 <sup>x</sup> | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 16              | 16              | 16         | 53              | 53              | 53         | 86         | 86         | 86         | 86         | 115             | 115         | 115         | 115   |
| 7  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 34              | 0               | 0          | 40         | 0          | 0          | 32         | 0               | 0           | 1           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 12              | 12              | 12         | 46              | 46              | 46         | 86         | 86         | 86         | 118        | 118             | 118         | 119         | 119   |
| 8  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 13 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 33 <sup>Δ</sup> | 0               | 0          | 30         | 0          | 0          | 0          | 20              | 0           | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 13              | 13              | 13         | 46              | 46              | 46         | 76         | 76         | 76         | 76         | 96              | 96          | 96          | 96    |
| 9  | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 5 <sup>F</sup>  | 0          | 0               | 24              | 0          | 0               | 41 <sup>Δ</sup> | 0          | 0          | 42         | 0          | 0          | 0               | 33          | 0           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 5               | 5          | 5               | 29              | 29         | 29              | 70              | 70         | 70         | 112        | 112        | 112        | 112             | 145         | 145         | 145   |
| 10   | P generation Live         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1               | 1               | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1               | 1           |             |       |
|  | F1 generation Live        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 15 <sup>F</sup> | 0               | 0          | 28              | 1               | 0          | 29         | 0          | 0          | 0          | 24              | 0           | 1           |       |
|  | Cumulative reproductivity | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0               | 0          | 15              | 15              | 15         | 43              | 44              | 44         | 73         | 73         | 73         | 73         | 97              | 97          | 98          | 98    |
| P generation: O; not detected immobility      F1 generation: F; observed the first brood, Δ; observed aborted eggs, x; observed dead offspring |                           |            |            |            |            |            |            |                 |            |                 |                 |            |                 |                 |            |            |            |            |            |                 |             |             |       |

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, Δ; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring



Table A-5 Result of reproduction test: Nominal concentration: 5.6 mg/l Measured concentration: 6.12 mg/l

| Rep. No. | Counts                    | Time       |            |            |            |            |            |            |                |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |                             |                             |                |                             |                |                             | total |
|----------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-------|
|          |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d | 1/30<br>8d     | 1/31<br>9d                  | 2/1<br>10d                  | 2/2<br>11d                  | 2/3<br>12d                  | 2/4<br>13d                  | 2/5<br>14d                  | 2/6<br>15d      | 2/7<br>16d                  | 2/8<br>17d                  | 2/9<br>18d     | 2/10<br>19d                 | 2/11<br>20d    | 2/12<br>21d                 |       |
| 1        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 3 <sup>F</sup>              | 1                           | 0                           | 0 <sub>x</sub>              | 0                           | 0                           | 0 <sup>Δ</sup>  | 0                           | 0                           | 0              | 0 <sup>Δ</sup>              | 0              | 0 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 3                           | 4                           | 4                           | 4 <sub>x</sub>              | 4                           | 4                           | 4               | 4                           | 4                           | 4              | 4                           | 4              | 4                           |       |
| 2        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 0                           | 2 <sup>F</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 4 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0               | 0                           | 0 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0              | 0                           | 6              | 0                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 0                           | 2                           | 2                           | 2                           | 6 <sub>x</sub>              | 6                           | 6               | 6                           | 6                           | 6              | 12                          | 12             | 12                          |       |
| 3        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 0                           | 2 <sup>F</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 5 <sup>Δ</sup>              | 0 <sub>x</sub>              | 0               | 0                           | 1 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0              | 0                           | 1 <sub>x</sub> | 0                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 0                           | 2                           | 2                           | 2                           | 7                           | 7 <sub>x</sub>              | 7               | 7                           | 8 <sub>x</sub>              | 8              | 8                           | 9              | 9                           |       |
| 4        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 8 <sup>F</sup>              | 0                           | 0                           | 3 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 4 <sub>x</sub>  | 0                           | 0                           | 1              | 0 <sup>Δ</sup>              | 0              | 2 <sub>x</sub>              |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 8                           | 8                           | 8                           | 11 <sub>x</sub>             | 11                          | 11                          | 15 <sub>x</sub> | 15                          | 15                          | 16             | 16                          | 16             | 18 <sub>x</sub>             |       |
| 5        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 6 <sup>F</sup> | 0                           | 0                           | 5 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 3 <sub>x</sub>              | 0               | 0                           | 2                           | 0              | 0                           | 0              | 1                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 6              | 6                           | 6                           | 11 <sub>x</sub>             | 11                          | 11                          | 14 <sub>x</sub>             | 14              | 14                          | 16                          | 16             | 16                          | 16             | 17                          |       |
| 6        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 6 <sup>F</sup>              | 0                           | 0                           | 5 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 1               | 0 <sup>Δ</sup>              | 0                           | 0              | 1 <sup>Δ</sup>              | 0              | 2                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 6                           | 6                           | 6                           | 11 <sub>x</sub>             | 11                          | 11                          | 12              | 12                          | 12                          | 13             | 13                          | 13             | 15                          |       |
| 7        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 7 <sup>F</sup>              | 0                           | 0                           | 8 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 0               | 2 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0              | 6 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 1              | 0                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 7                           | 7                           | 7                           | 15                          | 15                          | 15                          | 15              | 17                          | 17                          | 17             | 23                          | 24             | 24                          |       |
| 8        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 6 <sup>F</sup>              | 0                           | 0                           | 10                          | 0                           | 0                           | 0               | 6 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0              | 0                           | 0              | 0                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 6                           | 6                           | 6                           | 16                          | 16                          | 16                          | 16              | 22                          | 22                          | 22             | 22                          | 22             | 22                          |       |
| 9        | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 0 <sub>x</sub> | 0 <sub>x</sub>              |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 1 <sup>F</sup> | 0                           | 6 <sub>x</sub>              | 2 <sub>x</sub>              | 0                           | 0                           | 3 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0               | 0                           | 0                           | 1 <sup>Δ</sup> | 0                           | 0              | 3 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 1              | 1                           | 7                           | 9                           | 9                           | 9                           | 12                          | 12              | 12                          | 12                          | 13             | 13                          | 13             | 16                          |       |
| 10       | P generation              | Live       | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          | 1              | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1                           | 1               | 1                           | 1                           | 1              | 1                           | 1              | 1                           |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 5 <sup>F</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0                           | 7                           | 1 <sub>x</sub>              | 0                           | 0               | 1 <sup>Δ</sup> <sub>x</sub> | 0                           | 0              | 0                           | 2 <sub>x</sub> | 0                           |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0              | 0                           | 5                           | 5                           | 5                           | 12                          | 13 <sub>x</sub>             | 13              | 13                          | 14 <sub>x</sub>             | 14             | 14                          | 14             | 16                          |       |

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, Δ; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring  
 ---; not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-6 Result of reproduction test: Nominal concentration: 10 mg/l Measured concentration: 11.5 mg/l

| Rep. No.  | Counts                    | Time       |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                | total          |   |
|---|---------------------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|
|   |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d     | 1/25<br>3d     | 1/26<br>4d     | 1/27<br>5d     | 1/28<br>6d     | 1/29<br>7d     | 1/30<br>8d     | 1/31<br>9d     | 2/1<br>10d     | 2/2<br>11d     | 2/3<br>12d     | 2/4<br>13d     | 2/5<br>14d     | 2/6<br>15d     | 2/7<br>16d     | 2/8<br>17d     | 2/9<br>18d     | 2/10<br>19d    | 2/11<br>20d    | 2/12<br>21d    |                |   |
| 1   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 3 <sup>F</sup> | 0              | 0              | 0              | 4              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 3              | 3              | 3              | 3              | 7              | 7              | 7              | 7              | 7              | 7              | 7              | 7              | 7 |
| 2   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>F</sup> | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| 3   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| 4   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1 <sup>F</sup> | 0              | 0              | 4              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1              | 1              | 1              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5              | 5 |
| 5   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| 6   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1 <sup>F</sup> | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1 |
| 7   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1 <sup>F</sup> | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1 |
| 8   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| 9   | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| 10  | P generation              | Live       | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> | 1 <sup>○</sup> |   |
|   | F1 generation             | Live       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 <sup>△</sup> | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |   |
|   | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0 |
| P generation: ○; not detected immobility. s; smaller than that of the control F1 generation: F; observed the first brood. △; observed aborted eggs. ×; observed dead offspring. |                           |            |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |   |

P generation: ○; not detected immobility, s; smaller than that of the control F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring.

Table A-7 Result of reproduction test: Nominal concentration: 18 mg/l Measured concentration: 19.7 mg/l

| Rep. No. | Counts                    | Time       |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|----------|---------------------------|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|          |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d     | 1/25<br>3d | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d | 1/30<br>8d | 1/31<br>9d | 2/1<br>10d | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d | 2/4<br>13d | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d | total |
| 1        | P generation              | Live       | 0              | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 2        | P generation              | Live       | 0              | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 3        | P generation              | Live       | 1 <sup>o</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 4        | P generation              | Live       | 1 <sup>Δ</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 5        | P generation              | Live       | 1 <sup>o</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 6        | P generation              | Live       | 1 <sup>o</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 7        | P generation              | Live       | 0              | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 8        | P generation              | Live       | 1 <sup>Δ</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 9        | P generation              | Live       | 1 <sup>Δ</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 10       | P generation              | Live       | 1 <sup>o</sup> | 0          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |

P generation: ○; not detected immobility, Δ; detected immobility, ×; mortality, ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-8 Result of reproduction test: Nominal concentration: 32 mg/l Measured concentration: 35.2 mg/l

| Rep. No. | Counts                    | Time       |                |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | Total |
|----------|---------------------------|------------|----------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|          |                           | 1/23<br>1d | 1/24<br>2d     | 1/25<br>3d     | 1/26<br>4d | 1/27<br>5d | 1/28<br>6d | 1/29<br>7d | 1/30<br>8d | 1/31<br>9d | 2/1<br>10d | 2/2<br>11d | 2/3<br>12d | 2/4<br>13d | 2/5<br>14d | 2/6<br>15d | 2/7<br>16d | 2/8<br>17d | 2/9<br>18d | 2/10<br>19d | 2/11<br>20d | 2/12<br>21d |       |
| 1        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 2        | P generation              | Live       | 1 <sub>o</sub> | 0 <sub>x</sub> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 3        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 4        | P generation              | Live       | 1 <sub>o</sub> | 0 <sub>x</sub> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 5        | P generation              | Live       | 1 <sub>o</sub> | 0 <sub>x</sub> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              | 0              |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 6        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 7        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 8        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 9        | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |
| 10       | P generation              | Live       | 0 <sub>x</sub> |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | F1 generation             | Live       | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             |       |
|          | Cumulative reproductivity |            | 0              |                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |             |             |             | ---   |

P generation: O; not detected immobility, X; mortality, ---: not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-day testing period

## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14023号

3 試験の表題

チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

上記試験は、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）を遵守して実施したものです。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14023号

3 試験の表題

チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

上記試験は、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）を遵守して実施したものです。

なお、試験実施にあたっては、OECD 化学品テストガイドライン No. 211「オオミジンコ繁殖試験」（1998年）を遵守しました。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



## 信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14023号

3 試験の表題

チオ尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

4 検閲

本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

| 検 閲 内 容              | 検閲実施日       | 試験責任者への<br>報告年月日 | 運営管理者への<br>報告年月日 |
|----------------------|-------------|------------------|------------------|
| 試験計画書                | 2002年12月20日 | 2002年12月20日      | 2002年12月20日      |
| 被験物質の受領              | 2003年01月08日 | 2003年01月09日      | 2003年01月09日      |
|                      |             |                  |                  |
| 試験の実施                | 2003年01月21日 | 2003年01月23日      | 2003年01月23日      |
| 試験計画書                | 2003年01月22日 | 2003年01月22日      | 2003年01月22日      |
| 試験の実施                | 2003年01月22日 | 2003年01月23日      | 2003年01月23日      |
| 分析の実施, 試薬等<br>機器, 検体 | 2003年01月22日 | 2003年01月23日      | 2003年01月23日      |
| 試験の実施, 試薬等, 機器       | 2003年01月23日 | 2003年01月24日      | 2003年01月24日      |
| 試験の実施, 被験物質          | 2003年02月05日 | 2003年02月06日      | 2003年02月06日      |
| 分析の実施                | 2003年02月10日 | 2003年02月12日      | 2003年02月12日      |
| 試験の実施                | 2003年02月12日 | 2003年02月12日      | 2003年02月12日      |
| 試験中の保管文書             | 2003年03月25日 | 2003年03月25日      | 2003年03月25日      |
| 最終報告書草案及び生データ        | 2003年03月28日 | 2003年03月28日      | 2003年03月28日      |
| 最終報告書                | 2003年03月31日 | 2003年03月31日      | 2003年03月31日      |

上記検閲の結果、本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され、報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証部門責任者

