

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

トリクロロエチレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：5 B 4 5 7 G)

1996年3月29日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： トリクロロエチレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖  
阻害試験

試験番号： 5 B 4 5 7 G

本試験は環境庁の G L P 規則に従って実施したものである。

1 9 9 6 年 3 月 2 9 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

## 信頼性保証証明

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： トリクロロエチレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖  
阻害試験

試験番号： 5 B 4 5 7 G

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

### 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	1996年 2月14日	1996年 2月14日
	1996年 3月 6日	1996年 3月 6日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996年 3月29日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]


[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

## 試験実施概要

1. 表題： トリクロロエチレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： トリクロロエチレンについて、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を21日間行い、繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度 (NO EC<sub>r</sub>) 及び産仔数を50%減少させると算定される濃度 (50%繁殖阻害濃度: ErC<sub>50</sub>) を求める。
3. 適用ガイドライン： 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称： 環境庁  
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2  
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 
6. 試験受託者：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所  
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日

1995年10月23日

試験終了日

1996年 3月29日

暴露期間

1996年 2月14日～1996年 3月 6日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

## 目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	13
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出	13
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	14
5 結果および考察	15
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 ミジンコの観察結果	15
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	16
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)	17
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	17
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	17
Table 1~10	18~27
Figure 1, 2	20, 22
付属資料-1 希釈水の水質	28~29
付属資料-2 試験液の分析方法	30~36
付属資料-3 ミジンコの観察結果	37~44

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

トリクロロエチレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

5 B 4 5 7 G

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類，急性遊泳阻害試験および繁殖試験」（1984年）に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： トリクロロエチレン
- 2) 暴露方式： 半止水式（週に3回，試験液の全量を交換，密閉容器）
- 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，助剤対照区，0.10，0.30，1.0，3.0，10 mg/L  
（公比 3.2，助剤濃度一定：10 mg/L，HCO-30を使用）
- 6) 試験液量： 850 mL
- 7) 連数： 4 容器／濃度区
- 8) 供試生物数： 40頭／濃度区（1 連につき10頭で1 濃度区40頭）
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明／8時間暗
- 11) 被験物質の分析： G C 法

## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に測定した試験液の調製時および換水前の被験物質実測濃度が、設定値の±20%を超えたため、各影響濃度の算出には実測値（時間加重平均値）を採用した。

### 2) 21 日間の親ミジンコの半数致死濃度（LC50）：

> 7.5 mg/L

### 3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度（ErC50）：

4.3 mg/L （95%信頼限界：2.7～8.7 mg/L）

### 4) 21 日間の最大無作用濃度（NOECr）：

2.1 mg/L

### 5) 21 日間の最小作用濃度（LOECr）：

7.5 mg/L



## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： トリクロロエチレン  
構造式：  $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$   
分子式：  $\text{C}_2\text{HCl}_3$   
分子量\*1： 131.39  
水への溶解度\*2： 1100 ppm (25 °C) , 160 ppm (25 °C)  
蒸気圧\*2： 60 mmHg (20 °C)  
融点\*2： -86.4 °C  
沸点\*2： 86.7 °C  
密度\*1： 1.464 g/mL (20 °C)

\*1:供給者提供資料

\*2:環境化学物質要覧—環境庁環境化学物質研究会編，丸善（昭和63年）

### 1.2 供試試料

純度\*1： 99.9 %  
水分\*1： 0.002 %  
不揮発物\*1： 0.001 %以下  
ロット番号\*1： ESL3504  
供給者： XXXXXXXXXX  
供給量\*1： 500 mL  
入手日： 1995年10月2日  
外観\*1： 無色澄明液体

\*1:供給者提供資料

### 1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は保管中は安定であったと判断された。

## 2 供試生物

試験には生後24時間令以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、1995年7月18日に国立環境研究所より入手したものを、当研究所において継代飼育しているものである。また、基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級）による48時間の半数遊泳阻害濃度（ $EC_{50}$ ）は 0.14 mg/L であった。

### 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、以下の条件で約2週間飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に2回幼体を除去した。暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育房内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた。

- 1) 飼育水: 希釈水 (3.2参照)
- 2) 飼育密度: 幼体時 100 頭/3L 飼育水  
成熟個体 50 頭/3L 飼育水
- 3) 水温:  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明: 室内光, 16時間明/8時間暗
- 5) 餌: *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量: ミジンコ1頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) /日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式(3回/週 試験液を全量交換, 密閉容器)
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 850 mL (溶存酸素濃度を維持するため, 試験液量を増やした。また, 密閉容器内を試験液で満たした。)
- 4) 連数： 4 容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 40 頭/濃度区 (1 連につき 10 頭で 1 濃度区 40 頭)
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光, 16 時間明/8 時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり  $0.1 \sim 0.2 \text{ mgC}$  (有機炭素含量) / 日

#### 3.2 希釈水

脱塩素水 (横浜市水道水を活性炭処理し, 残留塩素等を除去した後, 充分通気したもの) を使用した。希釈水の硬度は  $50 \text{ mg/L}$  ( $\text{CaCO}_3$ 換算), pH は 7.9 であった。

[付属資料-1]

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 850 mL 容ガラス製 密閉深型シャーレ
- 2) 恒温槽： PVC 製水槽 (恒温装置 TAITEC 製 COOLNIT CL-80F 型)
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型

#### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害濃度(48hr-EiC50値:  $11 \text{ mg/L}$ )の結果から, 本試験は公比 3.2 で5段階を設定した。各濃度区は以下の通りである。

(対照区, 助剤対照区, 0.10, 0.30, 1.0, 3.0 および  $10 \text{ mg/L}$ )

### 3.5 試験液の調製

被験物質を 250mg 採取し、HCO-30 を 250 mg 加え混合した。これを純水で希釈し、250 mL に定容とし、被験物質濃度 1000 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 1000 mg/L (HCO-30 1000 mg/L) を調製した。

5.0 L 容の密閉ガラス容器に希釈水 4.0 L を入れ、上記被験物質原液を各濃度に応じて添加した後、助剤濃度が一定 (10 mg/L) になるように助剤原液を加え、被験物質濃度 0.10, 0.30, 1.0, 3.0 および 10 mg/L の各試験液を調製した。

助剤対照区には、被験物質を含まないもの (助剤濃度: 10 mg/L) を調製した。

対照区には、希釈水のみを用いた。

### 3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間後に各試験水槽より試験液 5.0 mLを採取し、n-ヘキサンで抽出後、GCにより分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準液 (濃度1.0 mg/L) の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度 (D.O.)、pHを測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った (3.1参照)。

#### ・ミジンコの観察:

(親ミジンコ) 観察は生存数、遊泳阻害数、育苗内に卵を持つ個体数および大きさと状態を対照区と比較し、毎日記録した。計数後の親ミジンコの死亡個体は取り除いた。

(産出幼体) 幼体の生死の数および大きさ、休眠卵の発生等について、換水時に観察し、計数後の幼体は取り除いた。最初の幼体産出日を記録した。

- ・水温： 全濃度区（但し，各1試験容器）について，換水前後に測定した。
- ・溶存酸素濃度(D.O.)：全ての試験液について，換水前後に測定した。
- ・pH： 全濃度区（但し，各1試験容器）について，換水前後に測定した。

#### 4 結果の算出

##### 4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

通常は各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数（40頭）から，Probit法，Moving average 法または Binomial法により各暴露期間の半数致死濃度（LC50）およびその95%信頼限界を算出するが，本試験では21日間の暴露期間中，親ミジンコの死亡数が50%未満であったため，LC50の算出は不可能であった。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出

###### 累積産仔数の算出

各試験容器の親1頭当たりの暴露期間中の累積産仔数（TF）及び平均累積産仔数（ $\overline{TF}$ ）を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} \frac{2 \times F_n}{P_{n-1} + P_n}$$

ここで，

- n: 幼体観察回数
  - F<sub>n</sub>: 暴露開始後n回目の幼体数（但し，生存幼体）
  - P<sub>n</sub>: 暴露開始後n回目の観察時の親の数
  - P<sub>n-1</sub>: 暴露開始後n-1回目の親の数
  - P<sub>0</sub>: 最初に幼体を観察した日の前日の親の数
  - ne: 最終観察回
- （但し，P<sub>n-1</sub> + P<sub>n</sub>が0の場合は，無視した。）

$$\overline{TF} = \frac{\sum_{n=1}^m TF_n}{m}$$

ここで，

- TF<sub>n</sub>: 各試験容器の累積産仔数
- m: 濃度区当たりの連数（試験容器数：4）

#### ErC50 値の算出

各濃度区での累積産仔数と対照区での累積産仔数の比から、各濃度区での累積産仔数に及ぼす阻害率を求めた。その値を用いて、Probit 法により14および21日目の50% 繁殖阻害濃度 (ErC50) およびその95%信頼限界を算出した。その際、供試個体数に 100 (対照区の値を100%として)、死亡数に各濃度区での阻害率 (%) を適用した。尚、阻害率算出において、マイナスの値を示すものについては、0 %阻害とした。

#### 4.3 最大無作用濃度 (NOECr)および最小作用濃度 (LOECr)

各試験容器毎の親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し、各濃度区と対照区との有意差の有無を Dunnettの多重比較検定 (Yukms 統計ライブラリー I 統計解析編 ver.3.0, 両側検定) 法により求め、対照区と比較して有意差 (5 %水準) が認められない最高濃度 (最大無作用濃度: NOECr)および有意差が認められる最低濃度 (最小作用濃度: LOECr) を決定した。

## 5 結果および考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および16日目の試験液調製時の分析結果を下記に示した。

(設定値 0.10, 0.30, 1.0, 3.0, 10 mg/L)

暴露開始時 (設定値に対する割合 77～97 %)

暴露開始16日目 (設定値に対する割合 81～97 %)

また、それらの2または3日後(換水前)の分析結果を下記に示した。

暴露開始2日目 (設定値に対する割合 71～100 %)

暴露開始19日目 (設定値に対する割合 50～77 %)

したがって、実測濃度が設定値の±20%を超えたため、実測値を用いて各濃度の21日間の時間加重平均値(0.089, 0.27, 0.76, 2.1, 7.5mg/L)を算出し、阻害濃度算出の基準とした。

[Table 1 (p.18), 付属資料-2]

### 5.3 ミジンコの観察結果

#### 親ミジンコの死亡数および死亡率

対照区での親ミジンコの死亡率は暴露終了時で5%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

暴露終了時の親ミジンコの死亡率は助剤対照区で5%、0.089 mg/L 区で0%、0.27 mg/L 区で2.5%、0.76 mg/L 区で2.5%、2.1mg/L 区で0%、7.5 mg/L 区で7.5%であった。

[Table 2-1, 2-2 (p.19), Figure 1 (p.20) 付属資料-3]

### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始8日目または9日目であり、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

各濃度区における親ミジンコの初産日は、助剤対照区、0.089、0.27、0.76および2.1mg/L区で暴露開始8日目、7.5 mg/L区で9～12日目であった。

[Table 3 (p.21), 付属資料-3]

### 平均累積産仔数

対照区での親ミジンコは全容器とも3腹以上産出し、1頭当たりの平均累積産仔数は62頭であった。試験成立条件である3腹以上を産出し、平均累積産仔数20頭の基準を満たした。

各濃度区における親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は、助剤対照区で50頭、0.089 mg/L区で49頭、0.27mg/L区で49頭、0.76mg/L区で48頭、2.1mg/L区で53頭、7.5mg/L区で13頭であった。

[Table 4 (p.22), Figure 2 (p.22) 付属資料-3]

### 親ミジンコの大きさ状態

暴露開始17日目以降最高濃度区である7.5 mg/L区において、親ミジンコが対照区と比較して小さいことが認められた。

その他の濃度区においては、全暴露期間を通して対照区と比較して親ミジンコの大きさに差は認められなかった。

### 休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、対照区および全濃度区において休眠卵の発生は認められなかった。

## 5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は >7.5 mg/Lであった。

その他の観察日 (1, 2, 4, 7および14日目) の半数致死濃度も >7.5 mg/Lであった。

[Table 5 (p.23)]



#### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

14日間の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は、3.7 mg/L で、その95%信頼限界は 3.3～4.2 mg/Lであった。また、21日間のErC50は、4.3 mg/L で、その95%信頼限界は 2.7～8.7 mg/Lであった。

[Table 6 (p.23) ]

#### 5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr)および最小作用濃度 (LOECr)

親ミジンコ 1 頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOECr)は 2.1 mg/L で、最小作用濃度 (LOECr)は 7.5 mg/L であった。

[Table 7 (p.24) ]

#### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH

21日間の暴露期間中の水温は 19.5～20.9 °Cであり、設定範囲内であった。

溶存酸素濃度は 5.3～11.0 mg/Lであり、すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持された (20.0°C水中の飽和溶存酸素濃度： 8.8 mg/L)。

pHは 7.0～8.8であり 1 以上の変動があったが、ミジンコの成育条件としては問題ない範囲と思われる。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度およびpHは、ミジンコの成育条件として適切な範囲内であったと思われる。

[Table 8 (p.25), Table 9 (p.26), Table 10 (p.27) ]

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	0 day new	2 day old
Control	< 0.008	< 0.008	----	----
Solvent Control	< 0.008	< 0.008	----	----
0.10	0.092	0.096	92	96
0.30	0.29	0.30	97	100
1.0	0.81	0.80	81	80
3.0	2.3	2.2	77	73
10	8.2	7.1	82	71

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal		Time-weighted Mean during 21 days (mg/L)
	16 day new	19 day old	16 day new	19 day old	
Control	< 0.008	< 0.008	----	----	----
Solvent Control	< 0.008	< 0.008	----	----	----
0.10	0.090	0.077	90	77	0.089
0.30	0.29	0.20	97	67	0.27
1.0	0.81	0.59	81	59	0.76
3.0	2.5	1.5	83	50	2.1
10	9.4	5.4	94	54	7.5

new: freshly prepared test solution

old: test solutions 2days or 3days after freshly prepared

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

Measured Conc. (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
cont	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
sol. cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
0.089	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0.76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3	3

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

Measured Conc. (mg/L)	Days					
	1	2	4	7	14	21
cont	0	0	2.5	2.5	2.5	5
sol. cont.	0	0	0	0	0	5
0.089	0	0	0	0	0	0
0.27	0	0	0	0	0	2.5
0.76	0	0	0	0	2.5	2.5
2.1	0	0	0	0	0	0
7.5	0	0	0	0	0	7.5

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

(Based on measured concentration)

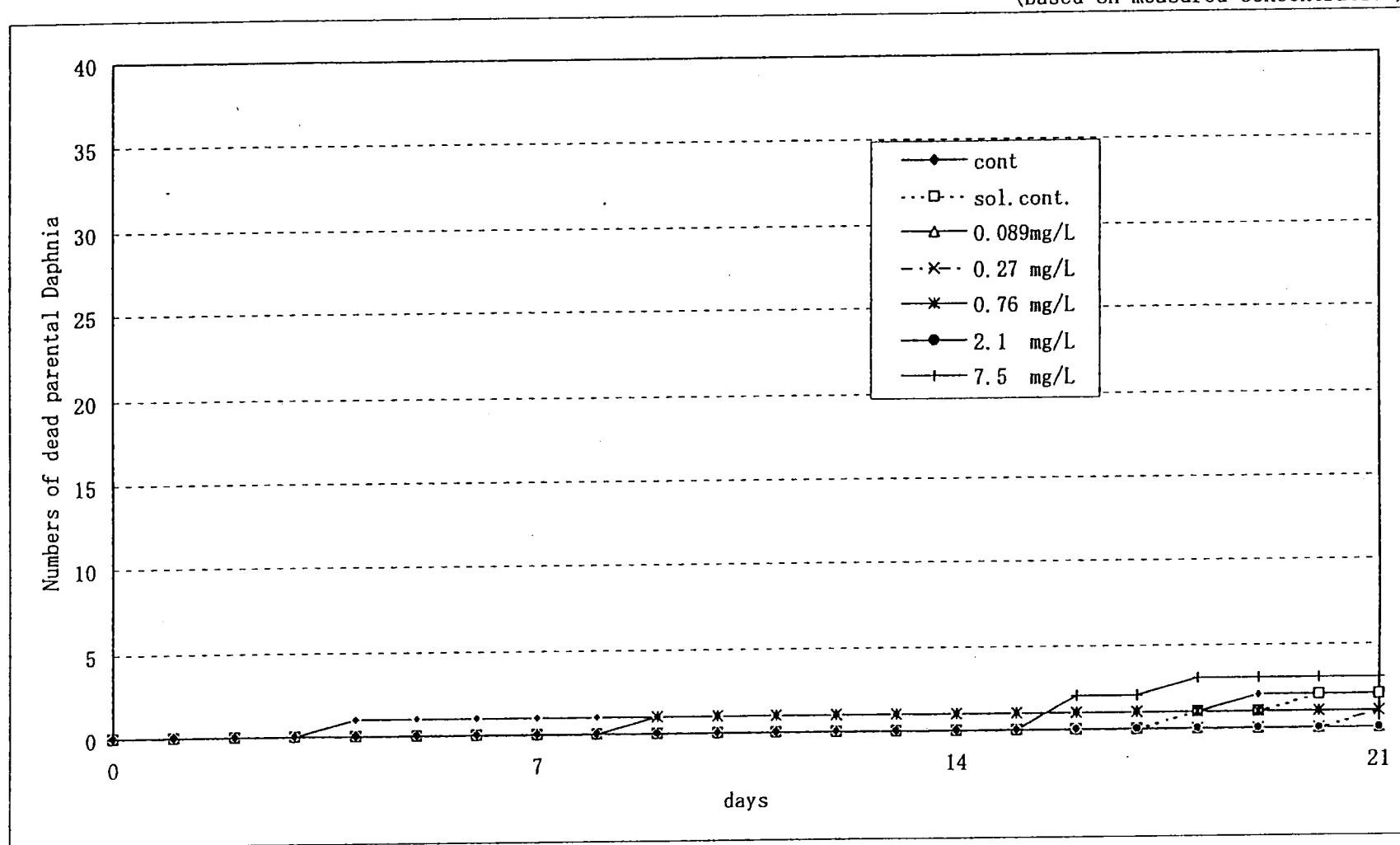


Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Measured Concentration (mg/L)						
	Solvent						
	Control	control	0.089	0.27	0.76	2.1	7.5
1	9	8	8	8	8	8	9
2	9	8	8	8	8	8	12
3	8	8	8	8	8	8	9
4	8	8	8	8	8	8	12
Mean	8.50	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	10.50

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ )

Measured Conc. (mg/L)	Days									
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21
cont	0	0	0	0	3.97	8.95	20.38	32.29	52.56	62.21
sol. cont.	0	0	0	0	4.65	12.33	26.15	33.60	39.73	50.45
0.089mg/L	0	0	0	0	5.23	11.60	27.00	34.75	44.28	48.75
0.27 mg/L	0	0	0	0	3.75	11.08	23.90	33.60	43.75	48.51
0.76 mg/L	0	0	0	0	3.18	8.09	23.01	33.86	41.04	47.82
2.1 mg/L	0	0	0	0	2.58	7.73	18.25	20.75	34.98	52.58
7.5 mg/L	0	0	0	0	0.08	0.48	3.60	5.93	11.25	13.31

Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ ) during 21 days

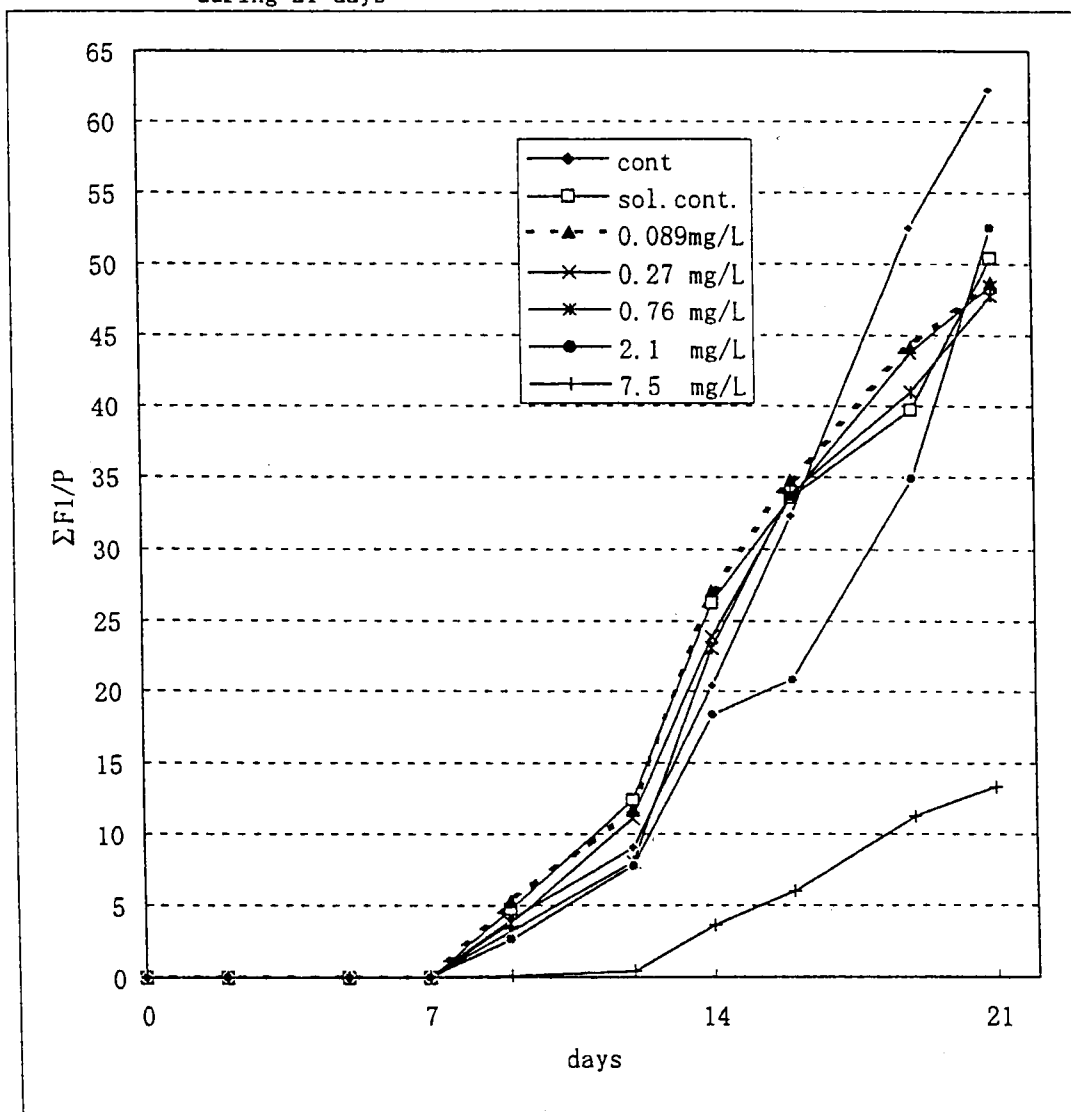


Table 5     Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
1	> 7.5	-	-
2	> 7.5	-	-
4	> 7.5	-	-
7	> 7.5	-	-
14	> 7.5	-	-
21	> 7.5	-	-

Table 6     Calculated ErC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	3.7	3.3 - 4.2	Probit
21	4.3	2.7 - 8.7	Probit

Table 7      Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in  
control and test vessels after 21 days  
(by Dunnett multiple comparison procedure, Two-sided test)

Vessel N	Measured Concentration(mg/L)						
	Solvent						
o.	Control	control	0.089	0.27	0.76	2.1	7.5
1	55.67	67.38	47.50	43.60	54.90	47.40	14.50
2	66.00	46.40	58.90	66.20	51.97	60.70	13.60
3	68.70	44.24	52.50	37.84	49.30	41.10	14.96
4	58.47	43.80	36.10	46.40	35.10	61.10	10.20
Mean	62.21	50.45	48.75	48.51	47.82	52.58	13.31
S.D.	6.14	11.34	9.64	12.32	8.78	9.95	2.15
Inhibition rate(%)		18.9	21.6	22.0	23.1	15.5	78.6
Significant difference							**

\*: 5%, \*\*: 1% Significant Level



Table 8 Temperature Values during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Seemi-Static Test)

		Temperature, °C						
days		Measured Concentration (mg/L)						
		Control	Sol. cont	0.089	0.27	0.76	2.1	7.5
0	new	20.8	20.8	20.8	20.9	20.8	20.9	20.8
2	old	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
2	new	20.7	20.7	20.8	20.9	20.9	20.9	20.9
5	old	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.8
5	new	19.8	20.1	20.1	20.7	20.7	20.2	20.8
7	old	20.1	20.1	20.1	20.2	20.3	20.3	20.3
7	new	20.1	20.3	20.3	20.2	20.2	20.3	20.2
9	old	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
9	new	20.2	20.1	20.0	20.2	20.1	20.2	20.2
12	old	20.2	20.3	20.3	20.3	20.3	20.3	20.3
12	new	20.6	20.6	20.5	20.4	20.4	20.4	20.4
14	old	19.8	19.8	19.9	19.8	19.9	19.9	19.9
14	new	19.9	20.3	20.3	20.4	20.4	20.5	20.6
16	old	19.8	19.9	19.8	19.8	19.8	19.9	19.9
16	new	19.9	20.3	20.3	20.4	20.4	20.4	20.4
19	old	20.0	20.0	19.9	20.3	20.4	20.5	20.5
19	new	19.9	20.0	19.7	19.5	19.7	19.9	19.8
21	old	19.9	19.8	19.7	19.9	19.8	19.8	19.8

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

D. O. (mg/L)		Measured Concentration (mg/L)						
days		Control	Sol. cont	0.089	0.27	0.76	2.1	7.5
0	new	8.1	8.3	8.5	8.4	8.1	8.4	8.1
2	old	8.2-8.5	7.2-7.6	7.2-7.4	7.2-7.8	7.4-7.5	7.4-8.1	8.0-8.5
2	new	8.5	8.1	8.4	8.4	8.4	8.3	8.3
5	old	8.9-9.3	8.1-8.7	8.4-9.1	8.1-8.7	8.5-8.7	8.2-8.7	9.1-9.5
5	new	8.6	8.5	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4
7	old	8.2-8.9	7.6-8.0	7.8-8.3	7.6-7.8	7.7-8.0	8.1-8.2	8.8-9.1
7	new	8.4	8.5	8.6	8.6	8.3	8.5	8.5
9	old	9.7-10.1	9.1-9.4	8.9-9.4	9.4-10.3	7.6-8.8	8.4-8.9	9.8-9.9
9	new	8.6	8.7	8.8	8.8	8.8	8.7	8.6
12	old	6.7-8.2	7.0-8.5	5.8-8.1	6.9-8.5	6.1-7.4	6.5-8.6	9.9-11.0
12	new	8.4	8.7	8.6	8.6	8.8	8.7	8.4
14	old	7.3-8.1	6.9-7.6	6.3-7.6	7.0-8.2	5.5-6.4	6.6-7.5	8.5-9.1
14	new	8.8	8.8	8.7	8.7	8.7	8.9	8.6
16	old	6.2-7.5	6.1-6.8	6.0-6.6	6.0-6.9	5.4-6.4	6.2-7.2	8.6-8.9
16	new	8.9	8.5	7.5	7.8	8.3	8.4	8.4
19	old	5.4-5.8	5.3-5.4	5.4-6.3	5.3-5.5	5.3-5.4	5.3-5.6	7.8-8.4
19	new	8.1	8.1	8.0	7.8	8.1	8.0	7.9
21	old	6.3-6.6	5.3-5.5	5.4-6.7	5.3-5.5	5.3-5.4	5.4-5.8	6.9-7.7

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

Table 10 pH during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test  
(Semi-Static Test)

pH		Measured Concentration (mg/L)						
days		Control	Sol. cont	0.089	0.27	0.76	2.1	7.5
0	new	7.9	7.9	7.9	7.9	8.0	7.9	7.9
2	old	8.0	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	8.1
2	new	7.9	7.8	7.8	7.9	8.0	8.0	8.0
5	old	8.0	8.0	7.8	8.0	7.9	8.0	8.2
5	new	7.8	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9
7	old	7.9	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	8.0
7	new	7.8	7.9	8.0	7.9	7.9	7.8	7.9
9	old	8.1	8.0	7.9	8.5	7.8	8.0	8.3
9	new	7.8	7.9	7.9	7.8	7.9	7.8	7.9
12	old	7.3	8.1	7.3	7.6	7.5	8.0	8.8
12	new	7.7	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9
14	old	7.4	7.6	7.3	7.4	7.4	7.5	7.9
14	new	7.8	7.9	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9
16	old	7.4	7.5	7.3	7.5	7.4	7.5	8.0
16	new	7.7	7.9	7.9	7.9	8.0	7.9	7.9
19	old	7.0	7.0	7.2	7.0	7.1	7.0	7.8
19	new	7.7	7.8	7.7	7.7	7.8	7.8	7.8
21	old	7.4	7.1	7.2	7.1	7.2	7.2	7.6

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

## 付属資料－ 1

希釈水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.9 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.05 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	<0.1 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Selenium	<0.01 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	140 $\mu$ S/cm
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	50 mg/L
Alkalinity	40 mg/L
Sodium	6.6 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	7.8 mg/L
Magnesium	3.6 mg/L

measured date: November 24, 1995

## 付属資料－ 2

### 試験液の分析方法

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

各試験液 5.0 mLを 10 mL容ガラス沈殿管に採取し、n-ヘキサンを 2.0 mL加え振とう・抽出・分離した。この操作を2回繰り返し、n-ヘキサンで定容としたものをGC測定試料とした。各試験液の被験物質濃度は標準液のピーク面積との比から定量した。

- (1) 各分析試料 5.0 mLを 10 mL容ガラス沈殿管に採取  
↓
- (2) 各分析試料に n-ヘキサン 2.0mLを加え振とう  
大洋科学製レシプロシェーカーSR-II (10分間, 速度目盛7)  
↓
- (3) 遠心分離機で水層とヘキサン層を分離  
日立製CR5B (3000rpm, 10分間)  
↓
- (4) ヘキサン層をバースツールベットで採取し、定容容器 (メストル又はメスフラスコ)に採取  
↓
- (5) (2)～(4)の操作をもう一度くり返し、ヘキサンで定容  
↓
- (6) (5)の定容液をGC測定用バイアルに約1～2 mL採取  
↓
- (7) GC測定

#### ・ヘキサンによる定容量

試験液設定濃度 (mg/L)	定容量 (mL)
対照	5.0
助剤対照	5.0
5.0	5.0
7.0	5.0
10	5.0
14	10
20	25

## 2 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

### (装置)

ガスクロマトグラフ : HEWLETT PACKARD HP G1800A GCD (No.1)  
オートサンプラ : 7673A  
検出器 : EID (Electron Ionization Detector)  
データ処理装置 : HP GCD ChemStation

### (条件)

カラム : HP-624 M. S. 30m×0.25mm×1.40 μm  
キャリアーガス : ヘリウム 0.6mL/min  
オープン温度 : 40℃ (1.0min) → 10℃/min → 130℃ (0min)  
注入口温度 : 200℃  
検出器温度 (インターフェース) : 260℃  
注入方法 : Splitless, Sampling Time : 60sec  
注入量 : 1.0 μL  
検出器条件 : Solvent Delay 6.5min  
Quant ion 129.85m/z  
Qualifier ion 94.90m/z

## 3 検量線

被験物質の1000mg/L n-ヘキサン溶液を調製し、順次、n-ヘキサンで希釈し0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を、GCに注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は0.99997と良好であった。

## 4 定量限界

最小検出ピーク面積を2000countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.008mg/Lを定量限界とした。

## 5 添加回収試験

被験物質濃度 5.0 mg/Lの試験溶液を調製し、この溶液を「1 試験液の分析方法」に従って分析した。2回行った添加回収試験の平均値は83 %であった。試料の分析結果は、この添加回収率で補正した値を用いた。



Figure A-2-1 Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	0.2	64120
2	0.5	162533
3	1.0	322789
4	2.0	657058
5	5.0	1644111
6	10.0	3357648
7	20.0	6793521

$$Y = -17,500 + 339,600 X$$

$$r = 0.99997$$

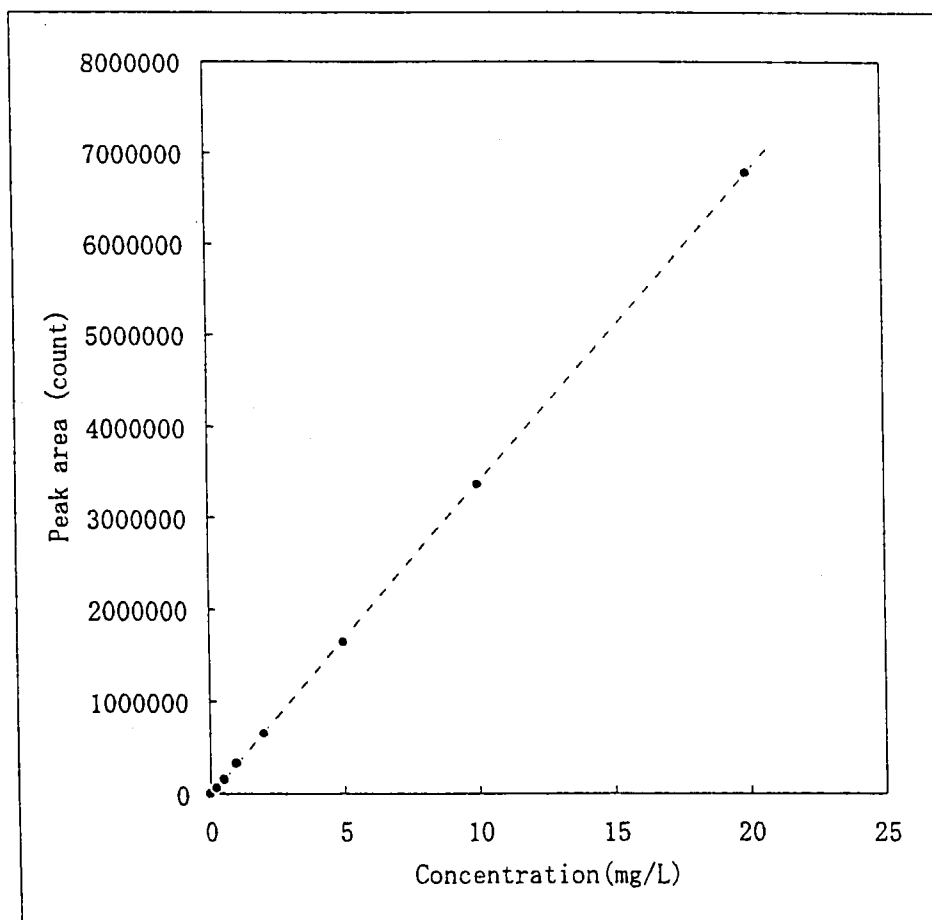
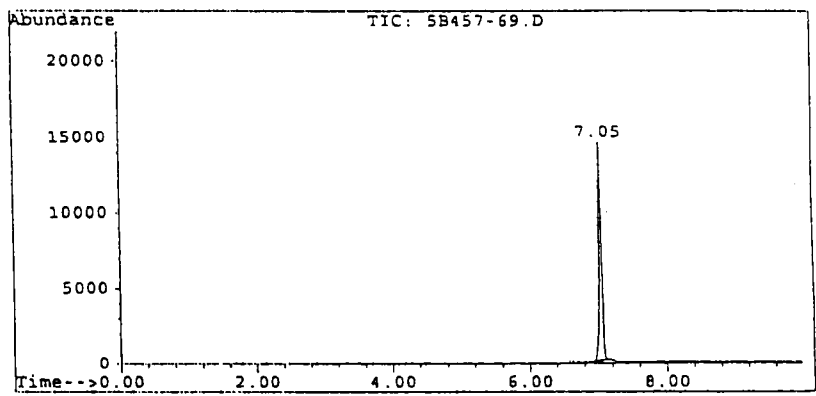


Figure A-2-2 Representative Chromatograms

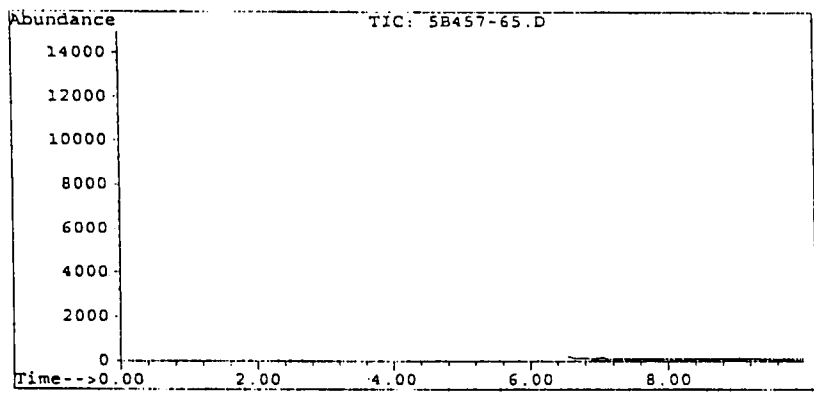
(1) Standard 1.0 mg/L; Day 16



TIC: 5B457-69.D  
E-95 std 1.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.046	M	0.046	401433	6.948	7.165

(2) Solvent control ; Day 16 (new)

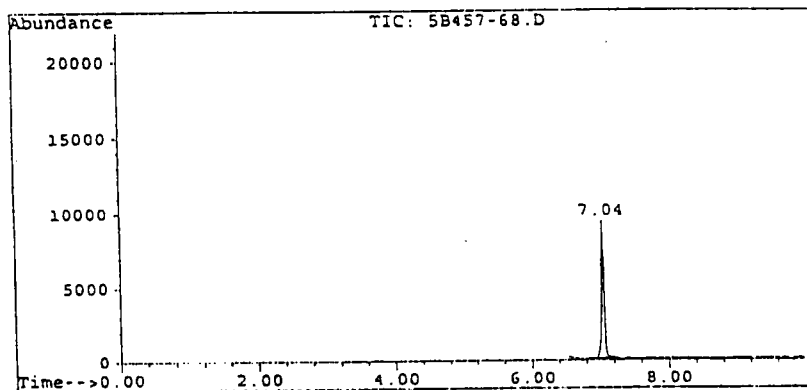


TIC: 5B457-65.D  
solvent control 16day new

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

Figure A-2-2Continued

(3) 1.0 mg/L nominal; Day 16 (new)

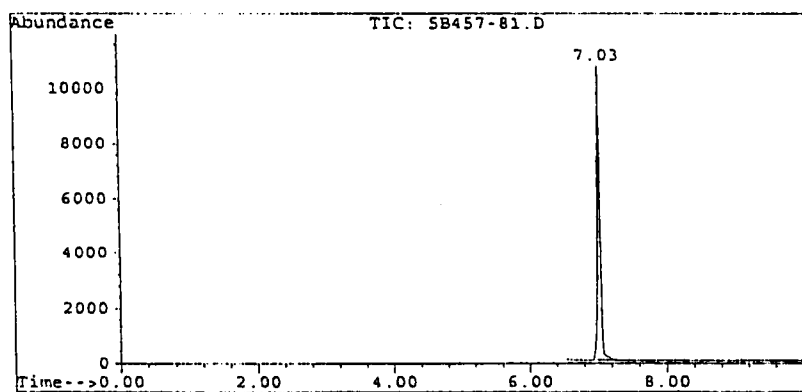


TIC: 5B457-68.D

conc-3 1.0ppm 16day new

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.045	M	0.048	270937	6.924	7.272

(4) Standard 1.0 mg/L; Day 19



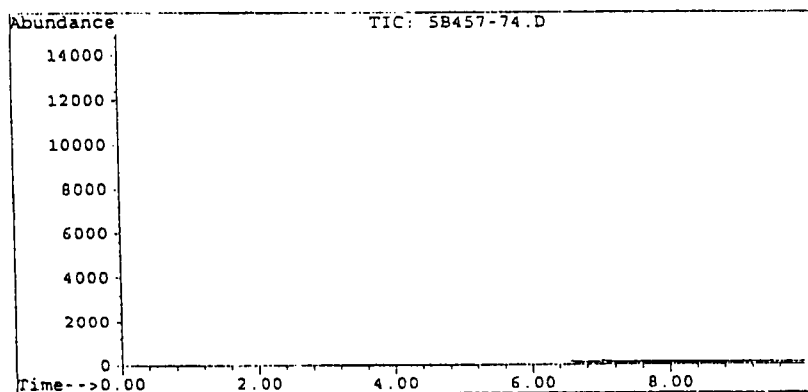
TIC: 5B457-81.D

E-95 std 1.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.028	M	0.048	312002	6.897	7.230

Figure A-2-2Continued

(5) Solvent control ; Day 19 (old)

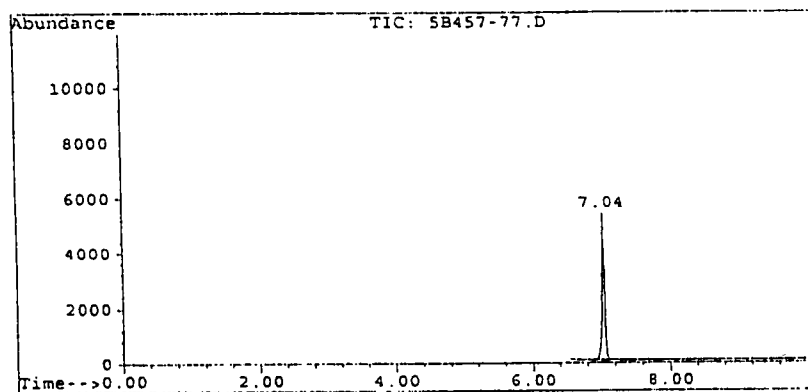


TIC: SB457-74.D

solvent control 19day old

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

(6) 1.0 mg/L nominal; Day 19 (old)



TIC: SB457-77.D

conc-3 1.0ppm 19day old

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.035	M	0.048	153220	6.882	7.241

## 付属資料－3

### ミジンコの観察結果

## Appendix 3-1 Result of reproduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 0 mg/L,

Dispersant conc.: 0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	Fl generation	Live		0		0		0		43			37		138		86			156		41	501
		Dead		0		0		0		1			4		0		0			0		0	5
		Total		0		0		0		44			41		138		86			156		0	506
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.78			4.11		15.33		9.56			17.33		4.56	55.67
2		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		4.78			8.89		24.22		33.78			51.11		55.67	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		42			74		89		124			221		110	660
		Dead		0		0		0		2			1		0		0			1		9	13
		Total		0		0		0		44			75		89		124			222		119	673
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.20			7.40		8.90		12.40			22.10		11.00	66.00
3		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		4.20			11.60		20.50		32.90			55.00		66.00	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		48			48		122		122			251		96	687
		Dead		0		0		0		2			0		0		0			5		0	7
		Total		0		0		0		50			48		122		122			256		96	694
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.80			4.80		12.20		12.20			25.10		9.60	68.70
4		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		4.80			9.60		21.80		34.00			59.10		68.70	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	--
	Fl generation	Live		0		0		0		21			36		93		135			157		121	563
		Dead		0		0		0		8			2		1		9			3		1	24
		Total		0		0		0		29			38		94		144			160		122	587
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.10			3.60		9.30		13.50			16.53		13.44	58.47
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.10			5.70		15.00		28.50			45.03		58.47	

The time (days) to first brood: 1: 9 days, 2: 9 days, 3: 8 days, 4: 8 days.

## Appendix 3-2 Result of repropduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)  
(Nominal conc.: 0 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/L)

		(Nominal conc. : 0 mg/L,										Dispersion conc. : 10 mg/L)											
Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	--	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	--	
	Live		0			0		0		39			52		180		145						
	Dead		0			0		0		2			0		3		2			1		9	
	Total		0			0		0		41			52		183		147			58		179	660
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		3.90			5.20		18.00		14.50			6.00		19.78	67.38
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		3.90			9.10		27.10		41.60			47.60		67.38	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	
	Live		0			0		0		56			101		120		65			77		45	464
	Dead		0			0		0		0			0		2		1			2		4	9
	Total		0			0		0		56			101		122		66			79		49	473
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		5.60			10.10		12.00		6.50			7.70		4.50	46.40
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		5.60			15.70		27.70		34.20			41.90		46.40	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	--
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	--
	Live		0			0		0		41			98		129		34			32		103	437
	Dead		0			0		0		0			0		2		1			0		1	4
	Total		0			0		0		41			98		131		35			32		104	441
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.10			9.80		12.90		3.40			3.20		10.84	44.24
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		4.10			13.90		26.80		30.20			33.40		44.24	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	
	Live		0			0		0		50			56		124		54			76		78	438
	Dead		0			0		0		0			2		2		5			0		1	10
	Total		0			0		0		50			58		126		59			76		79	448
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		5.00			5.60		12.40		5.40			7.60		7.80	43.80
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		5.00			10.60		23.00		28.40			36.00		43.80	

The time (days) to first brood: 1; 8 days, 2; 8 days, 3; 8 days, 4; 8 days.

## Appendix 3-3 Result of reprodution test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 0.10 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		54			63		148		27			47		136	475
		Dead		0		0		0		0			1		5		1			1		11	19
		Total		0		0		0		54			64		153		28			48		147	494
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		5.40			6.30		14.80		2.70			4.70		13.60	47.50
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		5.40			11.70		26.50		29.20			33.90		47.50	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		55			74		160		123			155		22	589
		Dead		0		0		0		0			3		4		2			3		1	13
		Total		0		0		0		55			77		164		125			158		23	602
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		5.50			7.40		16.00		12.30			15.50		2.20	58.90
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		5.50			12.90		28.90		41.20			56.70		58.90	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		58			55		145		111			135		21	525
		Dead		0		0		0		1			0		1		5			1		1	9
		Total		0		0		0		59			55		146		116			136		22	534
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		5.80			5.50		14.50		11.10			13.50		2.10	52.50
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		5.80			11.30		25.80		36.90			50.40		52.50	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		42			63		163		49			44		0	361
		Dead		0		0		0		0			0		6		1			1		1	9
		Total		0		0		0		42			63		169		50			45		1	370
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.20			6.30		16.30		4.90			4.40		0.00	36.10
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		4.20			10.50		26.80		31.70			36.10		36.10	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.



## Appendix 3-4 Result of repropduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 0.30 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		22			62		97		119			135		1	436
		Dead		0		0		0		0			0		1		6			2		1	10
		Total		0		0		0		22			62		98		125			137		2	446
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.20			6.20		9.70		11.90			13.50		0.10	43.60
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.20			8.40		18.10		30.00			43.50			43.60
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		44			96		157		166			61		138	662
		Dead		0		0		0		0			0		1		0			0		2	3
		Total		0		0		0		44			96		158		166			61		140	665
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.40			9.60		15.70		16.60			6.10		13.80	66.20
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		4.40			14.00		29.70		46.30			52.40			66.20
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	--
	Fl generation	Live		0		0		0		38			77		108		53			55		45	376
		Dead		0		0		0		0			0		0		2			1		0	3
		Total		0		0		0		38			77		108		55			56		45	379
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		3.80			7.70		10.80		5.30			5.50		4.74	37.84
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		3.80			11.50		22.30		27.60			33.10			37.84
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		46			58		151		50			155		4	464
		Dead		0		0		0		0			0		2		0			4		0	6
		Total		0		0		0		46			58		153		50			159		4	470
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.60			5.80		15.10		5.00			15.50		0.40	46.40
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		4.60			10.40		25.50		30.50			46.00			46.40

The time (days) to first brood: 1; 8 days, 2; 8 days, 3; 8 days, 4; 8 days.

## Appendix 3-5 Result of reproduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 1.0 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		25			47		154		117			135		71	549
		Dead		0		0		0		0			3		3		1			4		0	11
		Total		0		0		0		25			50		157		118			139		71	560
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.50			4.70		15.40		11.70			13.50		7.10	54.90
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.50			7.20		22.60		34.30			47.80		54.90	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0		0		0		24			48		142		144			39		72	469
		Dead		0		0		0		0			10		2		1			2		0	15
		Total		0		0		0		24			58		144		145			41		72	484
2	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.53			5.33		15.78		16.00			4.33		8.00	51.97
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.53			7.86		23.64		39.64			43.97		51.97	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		44			48		137		115			69		80	493
		Dead		0		0		0		0			9		0		2			1		0	12
		Total		0		0		0		44			57		137		117			70		80	505
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		4.40			4.80		13.70		11.50			6.90		8.00	49.30
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		4.40			9.20		22.90		34.40			41.30		49.30	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
3		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		33			48		148		42			40		40	351
		Dead		0		0		0		0			1		0		0			4		0	5
		Total		0		0		0		33			49		148		42			44		40	356
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		3.30			4.80		14.80		4.20			4.00		4.00	35.10
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		3.30			8.10		22.90		27.10			31.10		35.10	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	F1 generation	Live		0		0		0		33			48		148		42			40		40	351
		Dead		0		0		0		0			1		0		0			4		0	5
		Total		0		0		0		33			49		148		42			44		40	356
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		3.30			4.80		14.80		4.20			4.00		4.00	35.10
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		3.30			8.10		22.90		27.10			31.10		35.10	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.

## Appendix 3-6 Result of reproduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 3.0 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/L)

Rep. No.		Counts	Time																					Total
			2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	
	F1 generation	Live		0			0		0		21		41		96		22			152		142	474	
		Dead		0			0		0		0		0		0		3			1		6	10	
		Total		0			0		0		21		41		96		25			153		148	484	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.10		4.10		9.60		2.20			15.20		14.20	47.40		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.10		6.20		15.80		18.00			33.20		47.40			
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		26		57		148		37			180		159	607	
		Dead		0			0		0		0		0		4		1			2		1	8	
		Total		0			0		0		26		57		152		38			182		160	615	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.60		5.70		14.80		3.70			18.00		15.90	60.70		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.60		8.30		23.10		26.80			44.80		60.70			
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		28		36		61		11			102		173	411	
		Dead		0			0		0		0		0		7		9			9		1	26	
		Total		0			0		0		28		36		68		20			111		174	437	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.80		3.60		6.10		1.10			10.20		17.30	41.10		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.80		6.40		12.50		13.60			23.80		41.10			
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		28		72		116		30			135		230	611	
		Dead		0			0		0		0		0		8		2			1		7	18	
		Total		0			0		0		28		72		124		32			136		237	629	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		2.80		7.20		11.60		3.00			13.50		23.00	61.10		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		2.80		10.00		21.60		24.60			38.10		61.10			

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.

## Appendix 3-7 Result of reproduction test

(Test chemical: Trichloroethylene)

(Nominal conc.: 10 mg/L,

Dispersant conc.: 10 mg/l)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	2/29	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0			0		0		2		2		29		24		54		28	139	
		Dead		0			0		0		0		0		3		5		1		0	9	
		Total		0			0		0		2		2		32		29		55		28	148	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		0.20		0.20		2.90		2.40		5.68		3.11	14.50		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		0.20		0.40		3.30		5.70		11.38		14.50			
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	
	F1 generation	Live		0			0		0		0		9		24		27		62		14	136	
		Dead		0			0		0		0		0		0		39		1		0	40	
		Total		0			0		0		0		9		24		66		63		14	176	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		0.00		0.90		2.40		2.70		6.20		1.40	13.60		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		0.00		0.90		3.30		6.00		12.20		13.60			
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8	--	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	--	
	F1 generation	Live		0			0		0		1		1		43		21		52		13	131	
		Dead		0			0		0		0		0		1		37		7		1	46	
		Total		0			0		0		1		1		44		58		59		14	177	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		0.10		0.10		4.30		2.33		6.50		1.63	14.96		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		0.10		0.20		4.50		6.83		13.33		14.96			
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	
	F1 generation	Live		0			0		0		0		4		29		19		29		21	102	
		Dead		0			0		0		0		0		3		23		0		0	26	
		Total		0			0		0		0		4		32		42		29		21	128	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		0.00		0.40		2.90		1.90		2.90		2.10	10.20		
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		0.00		0.40		3.30		5.20		8.10		10.20			

The time (days) to first brood: 1: 9 days, 2: 12 days, 3: 9 days, 4: 12 days.