

環境庁殿

## 最 終 報 告 書

ジクロロブロモメタンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：91506)

1996 年 3 月 28 日作成

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター 残留化学物研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： ジクロロブロモメタンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

試験番号： 91506

上記試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に準拠  
したものである。

1996年 3月 28日

運営管理者



## 信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： ジクロロプロモメタンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

試験番号： 91506

本試験は試験計画書及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。

| 監査又は査察内容 | 実施日         | 報告日 (運営管理者) | 報告日 (試験責任者) |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| 試験計画書監査  | 1996年 1月29日 | 1996年 1月29日 | 1996年 1月29日 |
| 試験実施状況査察 | 1996年 1月29日 | 1996年 2月 5日 | 1996年 2月 5日 |
| 試験実施状況査察 | 1996年 1月30日 | 1996年 2月 5日 | 1996年 2月 5日 |
| 試験実施状況査察 | 1996年 2月 2日 | 1996年 2月 5日 | 1996年 2月 5日 |
| 最終報告書監査  | 1996年 3月28日 | 1996年 3月28日 | 1996年 3月28日 |

1996 年 3 月 28 日

信頼性保証部門責任者：



## 試験実施概要

### 1. 表 題

ジクロロプロモメタンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

### 2. 試験目的

ジクロロプロモメタンについて、藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度(EC50)及び無影響濃度(NOEC)を求める。

### 3. 試験方法

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

### 4. 適用GLP

本試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に準拠した。

### 5. 試験委託者

名 称： 環境庁  
住 所： 〒100 東京都千代田区霞が関一丁目2-2

### 6. 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会  
所在地： 〒136 東京都江東区亀戸5-6-21

### 7. 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所  
所在地： 〒830 福岡県久留米市中央町19-14  
運営管理者： XXXXXXXXXX

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

生物試験担当

分析担当

データ処理担当

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書の承認

1996年 3月 28日

試験責任者

氏名

10. 試験期間

試験開始日 1996年1月29日

試験終了日 1996年3月28日

暴露期間 1996年1月30日～1996年2月2日

11. 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人化学品検査協会 化学品安全センター 久留米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 .....                            | 1     |
| 1. 被験物質 .....                        | 2     |
| 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....            | 2     |
| 1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....        | 3     |
| 2. 供試生物 .....                        | 3     |
| 3. 試験方法 .....                        | 3     |
| 3.1 試験条件 .....                       | 3     |
| 3.2 培地 .....                         | 3     |
| 3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器 .....          | 4     |
| 3.4 試験濃度の設定 .....                    | 4     |
| 3.5 試験液の調製 .....                     | 4     |
| 3.6 試験液の分析 .....                     | 4     |
| 3.7 試験操作 .....                       | 5     |
| 3.8 数値の取扱い .....                     | 5     |
| 4. 結果の算出 .....                       | 5     |
| 4.1 藻類生長曲線 .....                     | 5     |
| 4.2 藻類生長阻害濃度の算出 .....                | 5     |
| 4.3 無影響濃度(NOEC)の算出 .....             | 6     |
| 5. 結果及び考察 .....                      | 7     |
| 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 .....  | 7     |
| 5.2 試験液中の被験物質濃度 .....                | 7     |
| 5.3 藻類生長曲線 .....                     | 7     |
| 5.4 半数影響濃度(EC50)及び無影響濃度 (NOEC) ..... | 7     |
| 5.5 温度、pH及び照度 .....                  | 8     |
| 5.6 試験液の状態 .....                     | 8     |
| Table 1～8 .....                      | 9～16  |
| Figure 1～3 .....                     | 17～18 |
| 付属資料－1 試験液の分析方法及び分析チャート              |       |

## 要 旨

試験委託者

環境庁

表 題ジクロロプロモメタンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験試験番号

91506

試験方法

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

- 1) 被 験 物 質 : ジクロロプロモメタン
- 2) 供 試 生 物 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662)
- 3) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 培 養 方 式 : 振とう培養(100 rpm)
- 6) 試 験 濃 度 : 20, 8.0, 3.20, 1.28, 0.512 mg/L (公比:2.5), 助剤対照区  
(ジメチルスルホキシド 100 mg/L) 及び対照区
- 7) 連 数 : 1試験区につき3連
- 8) 試 験 液 量 : 100 mL(OECD培地)/容器×3容器/1試験区
- 9) 温 度 :  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 10) 照 明 : 10,000 lux(連続照明)
- 11) 試験液中の被験物質の分析: ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(HS-GC)  
(暴露開始時、終了時)

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度

$$E_b C_{50}(0-72h) = 6.36 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度(NOEC)} = 0.802 \text{ mg/L}$$

- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

$$E_r C_{50}(24-48h) = 5.48 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度(NOEC)} = 0.802 \text{ mg/L}$$

$$E_r C_{50}(24-72h) = 9.23 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度(NOEC)} = 5.09 \text{ mg/L}$$

(上記濃度は、全て暴露開始時測定値に基づく値)





## 1.2 被験物質の確認及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、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

## 2. 供試生物

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

本種は、American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland, 20852-1776 U.S.A.)より入手した ATCC 22662株を、当研究所において無菌的に継代培養しているものである。基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)の72時間  $E_bC_{50}$ は、0.395 mg/Lであった。

### 前培養

試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間培養したものを使用した。

## 3. 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 振とう培養(100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72時間
- 3) 連数 : 1試験区につき3連
- 4) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 5) 試験液量 : 100 mL(OECD培地)/容器×3容器/1試験区
- 6) 温度 :  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 7) 照明 : 10,000 lux(連続照明)

### 3.2 培地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。

[Table-1 (p.9)]

### 3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器： 500 mL容ガラス製三角フラスコ(密閉コック付)
- 2) 藻類培養試験装置： 温度維持及び連続振とう培養が可能で、連続照明及び一定の照度を保てる装置(高崎科学器械)を用いた。
- 3) 光学顕微鏡： システム顕微鏡BHS(オリンパス光学工業)
- 4) pH メーター： ガラス電極式水素イオン濃度計HM-11P
- 5) コールタカウンタ： コールターカウンターZI型
- 6) 電 解 液： アイソトンII(コールター)
- 7) 温 度 計： 測温抵抗体PT100オーム(培養装置設備)

### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果では 20 mg/Lで100%生長阻害、5.0 mg/Lで0 %生長阻害と考えられたので、試験濃度は 20 mg/Lを最高濃度として濃度公比 2.5 で 5 濃度区( 20, 8.0, 3.20, 1.28 及び 0.512 mg/L)を設定した。対照には培地のみの対照区とジメチルスルホキシドを 100 mg/L含んだ培地の助剤対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

被験物質 1.0g を正確に秤量し、ジメチルスルホキシド 5mL に溶解させ、 $2 \times 10^5$  mg/Lの試験原液を調製した。さらにこの原液を各試験濃度の  $10^4$  倍になるように適宜ジメチルスルホキシドで希釈した。試験液はこれらの試験原液を培地 100mL が入った試験容器にマイクロシリンジで $10 \mu\text{L}$ ずつ添加して調製した。また本物質は揮発性があるため、試験液中の被験物質濃度を安定にするために本試験と同様の条件下で 24 時間振とうしてから試験に供した。

### 3.6 試験液の分析

暴露開始時には試験液分析用及び水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)から一部を採取し HS-GC により分析した。終了時には各試験区の 3 容器の中層から試験液を等量採取して混合した後、遠心分離 (3,000rpmで10分間)をして、藻体を除去し、その上澄液を分析に供した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液(濃度 5.0 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-1に示した。

### 3.7 試験操作

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

各試験容器を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養装置に設置し試験を開始し、24、48及び72 時間に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験容器より試験液を少量採取し、電解液 (ISOTON-II)で適宜希釈後、コールターカウンターにより計測した。

試験液調製時のpHは 3連の他に予備1本について測定し各濃度区の暴露開始時のpHとし、終了時には 3 連全て測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を 1 日 1 回測定した。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 A によった。

## 4. 結果の算出

得られたデータを基に以下の 3 項目の結果を算出した。結果の算出には暴露開始時の被験物質濃度の測定値が設定値の  $\pm 20\%$ 以上であったので測定値(暴露開始時)を用いた。

### 4.1 藻類生長曲線

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

### 4.2 藻類生長阻害濃度の算出

次に下記の方法で生長阻害濃度を算出した。

#### 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度( $E_b C50$ )

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

ここで、

$A$  : 生長曲線下の面積

$N_0$  : 暴露開始時の設定細胞濃度(cells/mL)

$N_1$  :  $t_1$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$N_n$  :  $t_n$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$t_1$  : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

$t_n$  : 暴露開始後  $n$  回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで、

$A_c$  : 対照区の生長曲線下の面積

$A_t$  : 各濃度区における生長曲線下の面積

各濃度区に対応する $I_A$ 値を片対数紙にプロットし回帰直線 (最小二乗法) の切片から $E_bC50(0-72)$ 及び可能な場合、その95%信頼区間を算出した。

## 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度( $E_rC50$ )

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

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

ここで、

$N_1$  :  $t_1$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$N_n$  :  $t_n$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$t_1$  : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

$t_n$  : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで、

$\mu_c$  : 対照区の平均生長速度

$\mu_t$  : 各濃度区における平均生長速度

各濃度区に対応する $I_m$ 値を片対数紙にプロットし回帰直線 (最小二乗法) の切片から $E_rC50(24-48)$ 、 $E_rC50(24-72)$ 及び可能な場合、その95%信頼区間を算出した。

## 4.3 無影響濃度(NOEC)の算出

各試験容器毎の生長曲線下面積及び生長速度について、一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法により有意差の検定を行い、対照区と比較して有意差 (5%水準) が認められない最高試験濃度を無影響濃度 (NOEC)とした。

## 5. 結果及び考察

### 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

該当する要因はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び終了時(暴露開始後72時間)に試験液中の被験物質濃度を測定した。暴露開始時の被験物質濃度は0.312～13.1 mg/L(設定値0.512～20 mg/L)であり、設定値に対する割合は、60.9～65.5%であった。終了時の被験物質濃度は0.266～12.6 mg/Lであり、設定値に対する割合は、50.5～62.8%であった。暴露開始時の測定値が設定値の80%を下回ったため、結果の算出には設定濃度ではなく測定濃度(暴露開始時)を用いた。

[Table 2 (p.10), 付属資料-1]

### 5.3 藻類生長曲線

対照群(対照区及び助剤対照区)における細胞濃度は暴露終了時まで60倍以上に増殖した。これは試験条件下で正常な生長をしたことを示す。また、対照区と助剤対照区では生長に有意な差は認められなかった。各濃度区の生長は対照群と比較して以下のとおりであった。20mg/L(測定濃度13.1mg/L)区では暴露開始後24時間からかなりの生長阻害が認められ、その後終了時まで全く生長を示さなかった。3.20及び8.0 mg/L(測定濃度2.02及び5.09mg/L)区では暴露開始後24時間においては対照群とほぼ同じ生長を示したが、48時間では若干生長が抑制され、その後回復する傾向がみられた。また両者とも全く同じ生長を示した。1.28mg/L(測定濃度0.802mg/L)以下の濃度区では対照群とほぼ同じ生長を示した。

[Table 3 (p.11), Figure 1 (p.17)]

### 5.4 半数影響濃度(EC50)及び無影響濃度(NOEC)

#### 1) 生長曲線下面積の比較による生長阻害濃度( $E_bC_{50}$ )

ジクロロプロモメタンの測定値に基づく $E_bC_{50}(0-72h)$ は6.36 mg/Lであり、その95%信頼区間は本試験の結果からは得られなかった(対数正規確率紙を用いて算出した場合、 $E_bC_{50}(0-72h)$ は4.13 mg/Lで、その95%信頼区間は得られなかった)。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度(無影響濃度(NOEC))は0.802 mg/L(測定濃度)と判定された。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 2(p.18)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 ( $E_T C50$ )

ジクロロプロモメタンの測定値に基づく  $E_T C50$  (24-48h)、 $E_T C50$  (24-72h) は、それぞれ 5.48 mg/L、9.23 mg/L であり、それらの95%信頼区間は共に本試験の結果からは得られなかった(対数正規確率紙を用いて算出した場合、 $E_T C50$  (24-48h)、 $E_T C50$  (24-72h) は、それぞれ 2.42mg/L、6.54 mg/L であり、それらの95%信頼区間は共に得られなかった)。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度(無影響濃度(NOEC))は、それぞれ 0.802 mg/L、5.09 mg/L(共に測定濃度)と判定された。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 3 (p.18)]

## 5.5 温度、pH及び照度

72 時間の暴露期間中の藻類培養装置内の温度は 23.1 ~ 23.5 °C であった。試験液の pH は暴露開始時が 7.54~7.56 であり、暴露終了時が 8.01~10.42 であった。72時間の暴露期間中の藻類培養装置内の照度は 10,000 lux であった。

[Table 6,7,8 (p.14~16)]

## 5.6 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明であり、終了時では 20mg/L(測定濃度 13.1 mg/L)区で無色透明であり、それ以下の濃度区では細胞増殖のため緑色を呈していた。

以 上

Table 1. OECD medium

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

Table 2. Concentrations of dichlorobromomethane in growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum* under static conditions

| Nominal concentration<br>(mg/L) | Observed concentration (mg/L)<br>(Percent of nominal) |                       |                    |
|---------------------------------|---|-----------------------|--------------------|
|                                 | 0-hour <sup>a)</sup>                                  | 72-hour <sup>b)</sup> | Mean <sup>c)</sup> |
| Control                         | 0   | 0                     | -                  |
| 0.512                           | 0.312<br>(60.9)                                       | 0.266<br>(51.9)       | 0.288<br>(56.3)    |
| 1.28                            | 0.802<br>(62.6)                                       | 0.647<br>(50.5)       | 0.722<br>(56.4)    |
| 3.20                            | 2.02<br>(63.3)  | 1.69<br>(52.9)        | 1.85<br>(57.9)     |
| 8.0                             | 5.09<br>(63.7)  | 4.79<br>(59.9)        | 4.94<br>(61.8)     |
| 20.0                            | 13.1<br>(65.5)  | 12.6<br>(62.8)        | 12.8<br>(64.2)     |

a) initial

b) final

c) The values are expressed as time-weight means calculated by the following equation.

$$(C_0 - C_{72}) \times 72 / (\ln C_0 - \ln C_{72}) \times 72$$

where

$C_0$  : the observed concentration at 0-hour

$C_{72}$  : the observed concentration at 72-hour

$\ln C_0$  : the natural logarithm of  $C_0$

$\ln C_{72}$  : the natural logarithm of  $C_{72}$



Table 3 . Cell density of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to dichlorobromomethane

| Observed<br>concentration<br>(mg/L) | No.     | Cell density ( $\times 10^4$ cells/mL) |         |         |         |
|-------------------------------------|---------|--|---------|---------|---------|
|                                     |         | 0-hour                                 | 24-hour | 48-hour | 72-hour |
| Control                             | 1       | 1.0                                    | 8.6     | 48.9    | 64.2    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 8.1     | 45.4    | 87.1    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 8.0     | 43.0    | 77.3    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 8.2     | 45.8    | 76.2    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.3     | 2.9     | 11.5    |
| Solvent control                     | 1       | 1.0                                    | 8.7     | 44.4    | 75.2    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 10.0    | 44.3    | 96.9    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 8.3     | 46.9    | 78.1    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 9.0     | 45.2    | 83.4    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.9     | 1.5     | 11.8    |
| 0.312                               | 1       | 1.0                                    | 9.7     | 48.9    | 73.0    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 8.6     | 35.7    | 70.0    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 7.8     | 38.9    | 66.8    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 8.7     | 41.2    | 69.9    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 1.0     | 6.9     | 3.1     |
| 0.802                               | 1       | 1.0                                    | 7.9     | 40.8    | 74.6    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 9.0     | 36.9    | 61.2    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 8.2     | 39.3    | 62.2    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 8.4     | 39.0    | 66.0    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.6     | 1.9     | 7.4     |
| 2.02                                | 1       | 1.0                                    | 7.6     | 27.7    | 61.5    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 7.2     | 28.5    | 61.4    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 8.2     | 25.0    | 58.8    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 7.7     | 27.1    | 60.6    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.5     | 1.8     | 1.6     |
| 5.09                                | 1       | 1.0                                    | 7.1     | 26.5    | 61.5    |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 7.0     | 23.4    | 60.7    |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 8.3     | 31.2    | 64.8    |
|                                     | Average | 1.0                                    | 7.5     | 27.0    | 62.3    |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.7     | 4.0     | 2.2     |
| 13.1                                | 1       | 1.0                                    | 4.2     | 4.4     | 4.2     |
|                                     | 2       | 1.0                                    | 4.6     | 4.4     | 4.2     |
|                                     | 3       | 1.0                                    | 3.9     | 3.0     | 2.9     |
|                                     | Average | 1.0                                    | 4.2     | 3.9     | 3.7     |
|                                     | S.D.    | 0.0                                    | 0.4     | 0.8     | 0.8     |

Table 4. Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to dichlorobromomethane

| Observed<br>concentration<br>(mg/L) | No.     | Area     | Inhibition<br>(%)      | Rate      | Inhibition<br>(%)       | Rate      | Inhibition<br>(%)       |
|-------------------------------------|---------|----------|------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
|                                     |         | A(0-72h) | I <sub>A</sub> (0-72h) | μ(24-48h) | I <sub>m</sub> (24-48h) | μ(24-72h) | I <sub>m</sub> (24-72h) |
| Control                             | 1       | 2090     | -                      | 0.0723    | -                       | 0.0837    | -                       |
|                                     | 2       | 2270     | -                      | 0.0720    | -                       | 0.0992    | -                       |
|                                     | 3       | 2090     | -                      | 0.0699    | -                       | 0.0943    | -                       |
|                                     | Average | 2150     | -                      | 0.0714    | -                       | 0.0924    | -                       |
| Solvent control                     | 1       | 2120     | 1.56                   | 0.0677    | 5.20                    | 0.0897    | 2.94                    |
|                                     | 2       | 2410     | -11.9                  | 0.0622    | 12.8                    | 0.0948    | -2.58                   |
|                                     | 3       | 2200     | -2.42                  | 0.0721    | -0.933                  | 0.0933    | -0.999                  |
|                                     | Average | 2240     | -4.24                  | 0.0673    | 5.70                    | 0.0926    | -0.215                  |
| 0.312                               | 1       | 2220     | -3.37                  | 0.0673    | 5.81                    | 0.0839    | 9.16                    |
|                                     | 2       | 1840     | 14.3                   | 0.0594    | 16.9                    | 0.0874    | 5.46                    |
|                                     | 3       | 1870     | 13.3                   | 0.0668    | 6.51                    | 0.0893    | 3.39                    |
|                                     | Average | 1980     | 8.06                   | 0.0645    | 9.73                    | 0.0869    | 6.00                    |
| 0.802                               | 1       | 2000     | 6.84                   | 0.0685    | 4.10                    | 0.0936    | -1.30                   |
|                                     | 2       | 1780     | 17.3                   | 0.0587    | 17.8                    | 0.0798    | 13.7                    |
|                                     | 3       | 1830     | 15.0                   | 0.0650    | 8.92                    | 0.0842    | 8.89                    |
|                                     | Average | 1870     | 13.1                   | 0.0641    | 10.3                    | 0.0859    | 7.09                    |
| 2.02                                | 1       | 1530     | 29.0                   | 0.0538    | 24.7                    | 0.0870    | 5.81                    |
|                                     | 2       | 1530     | 28.8                   | 0.0575    | 19.4                    | 0.0895    | 3.12                    |
|                                     | 3       | 1440     | 32.9                   | 0.0462    | 35.3                    | 0.0818    | 11.5                    |
|                                     | Average | 1500     | 30.2                   | 0.0525    | 26.5                    | 0.0861    | 6.80                    |
| 5.09                                | 1       | 1490     | 30.9                   | 0.0547    | 23.4                    | 0.0897    | 2.89                    |
|                                     | 2       | 1400     | 35.0                   | 0.0501    | 29.8                    | 0.0899    | 2.74                    |
|                                     | 3       | 1670     | 22.5                   | 0.0554    | 22.4                    | 0.0859    | 7.07                    |
|                                     | Average | 1520     | 29.5                   | 0.0534    | 25.2                    | 0.0885    | 4.23                    |
| 13.1                                | 1       | 196      | 90.9                   | 0.00195   | 97.3                    | 0.000387  | 99.6                    |
|                                     | 2       | 206      | 90.4                   | -0.00223  | 103                     | -0.00455  | 105                     |
|                                     | 3       | 139      | 93.5                   | -0.0112   | 116                     | -0.0126   | 114                     |
|                                     | Average | 180      | 91.6                   | -0.00382  | 105                     | -0.00557  | 106                     |

Table 5. Calculated EC50 and NOEC of dichlorobromomethane  
in *Selenastrum capricornutum*

| Based on I <sub>A</sub> value |                      |                   |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|
|                               | Dichlorobromomethane | 95-Percent        |
|                               | (mg/L)               | confidence limits |
|                               |                      | (mg/L)            |
| EbC50(0-72h)                  | 6.36                 | - ~ -             |
| NOECb(0-72h)                  | 0.802                | -                 |

| Based on I <sub>m</sub> value |                      |                   |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|
|                               | Dichlorobromomethane | 95-Percent        |
|                               | (mg/L)               | confidence limits |
|                               |                      | (mg/L)            |
| ErC50(24-48h)                 | 5.48                 | - ~ -             |
| NOECr(24-48h)                 | 0.802                | -                 |
| ErC50(24-72h)                 | 9.23                 | - ~ -             |
| NOECr(24-72h)                 | 5.09                 | -                 |

Table 6. Temperature in the incubation chamber during 72-hour exposure to dichlorobromomethane

| Exposure time<br>(hour) | Temperature<br>(°C) |
|-------------------------|---------------------|
| 0                       | 23.1                |
| 24                      | 23.1                |
| 48                      | 23.3                |
| 72                      | 23.5                |
| Average                 | 23.3                |

Table 7. pH values of media at 0-hour and 72-hour exposure to dichlorobromomethane

| Observed<br>concentration<br>(mg/L) | No. | pH     |         |
|-------------------------------------|-----|--------|---------|
|                                     |     | 0-hour | 72-hour |
| Control                             | 1   |        | 10.24   |
|                                     | 2   | 7.54   | 10.33   |
|                                     | 3   |        | 10.35   |
| Solvent control                     | 1   |        | 10.40   |
|                                     | 2   | 7.54   | 10.42   |
|                                     | 3   |        | 10.40   |
| 0.312                               | 1   |        | 10.36   |
|                                     | 2   | 7.55   | 10.30   |
|                                     | 3   |        | 10.29   |
| 0.802                               | 1   |        | 10.42   |
|                                     | 2   | 7.56   | 10.36   |
|                                     | 3   |        | 10.38   |
| 2.02                                | 1   |        | 10.19   |
|                                     | 2   | 7.56   | 10.33   |
|                                     | 3   |        | 10.29   |
| 5.09                                | 1   |        | 9.95    |
|                                     | 2   | 7.55   | 9.92    |
|                                     | 3   |        | 9.93    |
| 13.1                                | 1   |        | 8.13    |
|                                     | 2   | 7.56   | 8.04    |
|                                     | 3   |        | 8.01    |

Table 8. Light intensity in the incubation chamber during 72-hour exposure to dichlorobromomethane

| Exposure time<br>(hour) | Light intensity<br>(lux) |
|-------------------------|--------------------------|
| 0                       | 10,000                   |
| 24                      | 10,000                   |
| 48                      | 10,000                   |
| 72                      | 10,000                   |
| Average                 | 10,000                   |

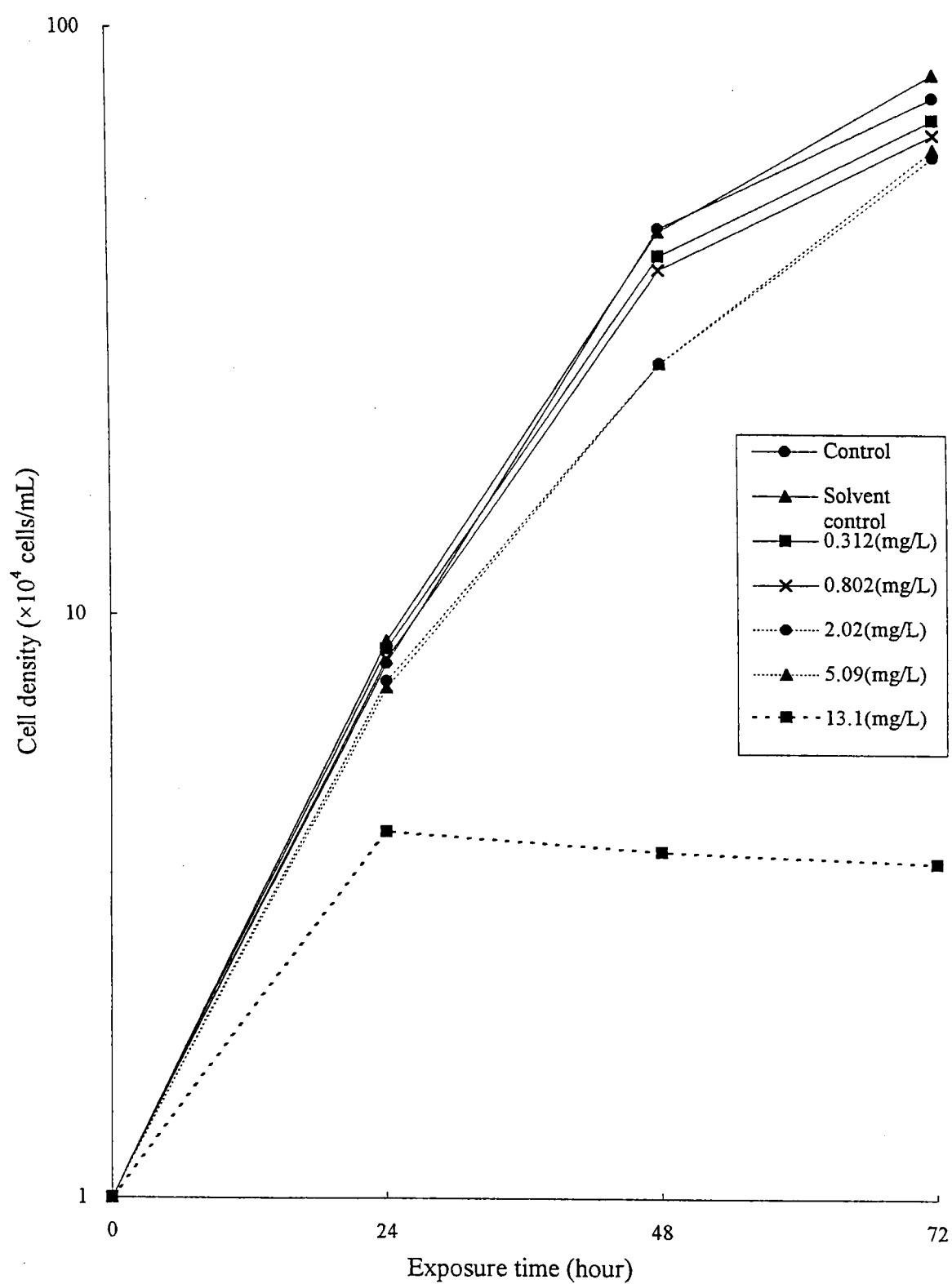


Figure 1. Growth curve of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to dichlorobromomethane.

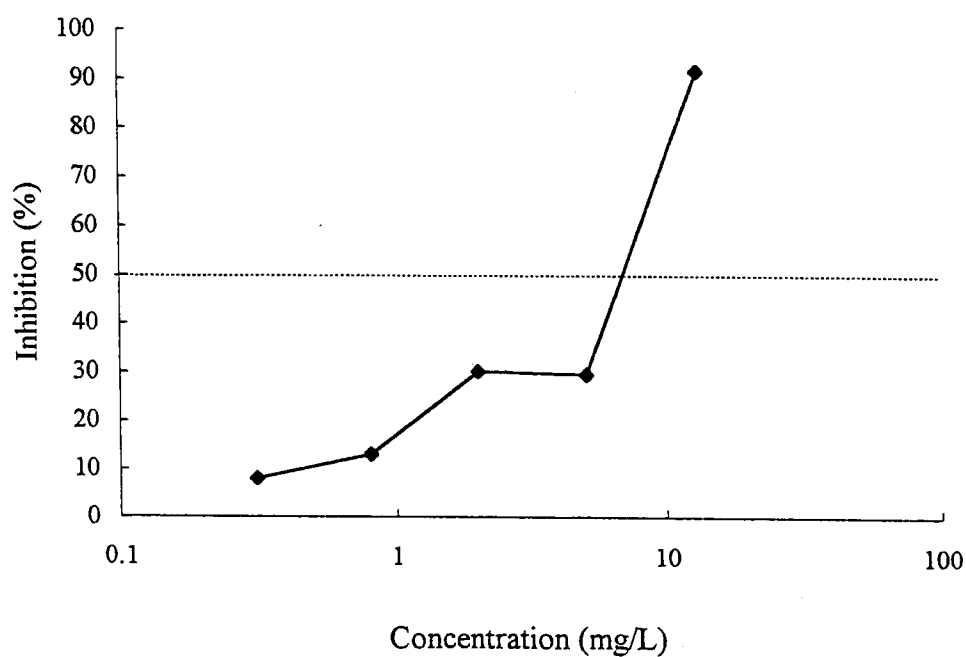


Figure 2. Concentration-inhibition curve of dichlorobromomethane in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_A$  value.

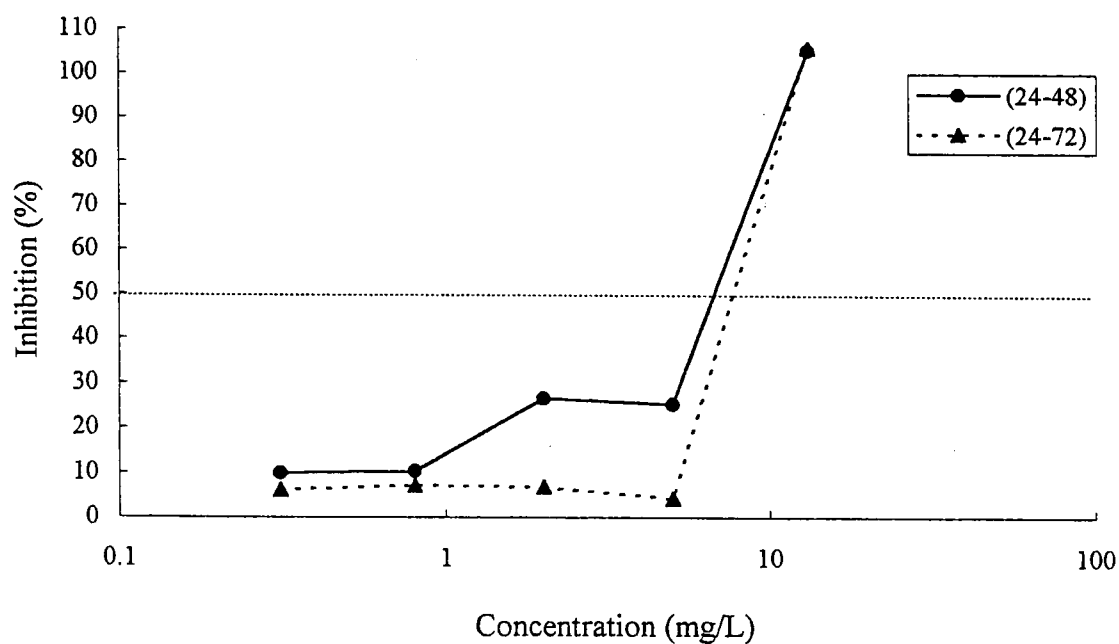


Figure 3. Concentration-inhibition curve of dichlorobromomethane in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_m$  value.



## 付属資料－1

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 11 頁)

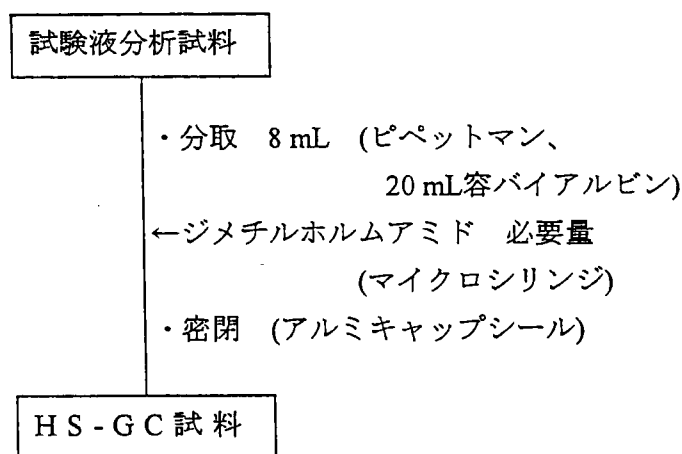
試 験 名 : 藻類生長阻害試験  
 被験物質物質名 : ジクロロブロモメタン

1) 試験液の分析方法

① 試験液の前処理操作

混合した溶液は、そのままもしくは蒸留水で希釈して、以下のフロースキームに従いヘッドスペース - ガスクロマトグラフィー(HS-GC)によって分析した。

フロースキーム



最終定容溶液中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

② 被験物質溶液の調製

被験物質 100 mg を正確にはかりとり、ジメチルホルムアミドに溶解して 1,000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをジメチルホルムアミドで希釈して 10 及び 100 mg/L の被験物質溶液を調製した。

③ 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。20 mL 容バイアルビンに蒸留水 8 mL を添加し、これに 1,000 mg/L の被験物質溶液を 40  $\mu$  L 添加した後、ただちにアルミキャップシールを行い、5.0 mg/L の標準溶液を調製した。

## 2) GCの分析条件

## ヘッドスペース オートサンプラー条件

|            |   |  |
|------------|---|--|
| ・機         | 器 | PERKIN ELMER Head Space Sampler HS40<br>PERKIN ELMER 製 |
| ・サンプル加熱温度  |   | 80℃  |
| ・加 温 時 間   |   | 60 分   |
| ・ニードル温度    |   | 140℃   |
| ・トランスファー温度 |   | 150℃   |

## ガスクロマトグラフ条件

|            |   |  |
|------------|---|--|
| ・機         | 器 | HP5890 Series -II<br>HEWLETT PACKARD 製 |
| ・検 出 器     |   | 水素炎イオン化検出器 (FID)                       |
| ・検 出 器 温 度 |   | 250℃                                   |
| ・カ ラ ム     |   | NeutraBond-1 (0.25 mmID×50 m)          |
| ・カ ラ ム 温 度 |   | 40℃ (2 min) → 200℃ (2 min)             |
| ・昇 温 速 度   |   | 10℃/min                                |
| ・試料導入部温度   |   | 200℃                                   |
| ・キャリアーガス   |   | ヘリウム 160 kPa                           |
| ・水         | 素 | 1.2 Kg/cm <sup>2</sup>                 |
| ・空         | 気 | 2.0 Kg/cm <sup>2</sup>                 |
| ・スプリット比    |   | 1:50                                   |
| ・感         | 度 | レンジ 1 V                                |

3) 検量線の作成

1) ③の標準溶液の調製と同様にして5.0及び25.0 mg/Lの標準溶液を調製した。また、10及び100 mg/Lの被験物質溶液より、それぞれ0.20及び1.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of dichlorobromomethane by GC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.  
( standard solution of 5.0 mg/L, 0-hour )
- Figure 2-2. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of 3.20 mg/L as nominal concentration, 0-hour )
- Figure 2-3. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of solvent control, 0-hour )
- Figure 2-4. Example of chromatogram.  
( standard solution of 5.0 mg/L, 72-hour )
- Figure 2-5. Example of chromatogram.  
( expired test solution of 3.20 mg/L as nominal concentration, 72-hour )
- Figure 2-6. Example of chromatogram.  
( expired test solution of solvent control, 72-hour )

## Input data

| Run | Concentration<br>(mg/L) | Peak area<br>( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) |
|-----|-------------------------|---|
| 1   | 0.20                    | 1362  |
| 2   | 1.0                     | 7359  |
| 3   | 5.0                     | 37665   |
| 4   | 25.0                    | 175912  |

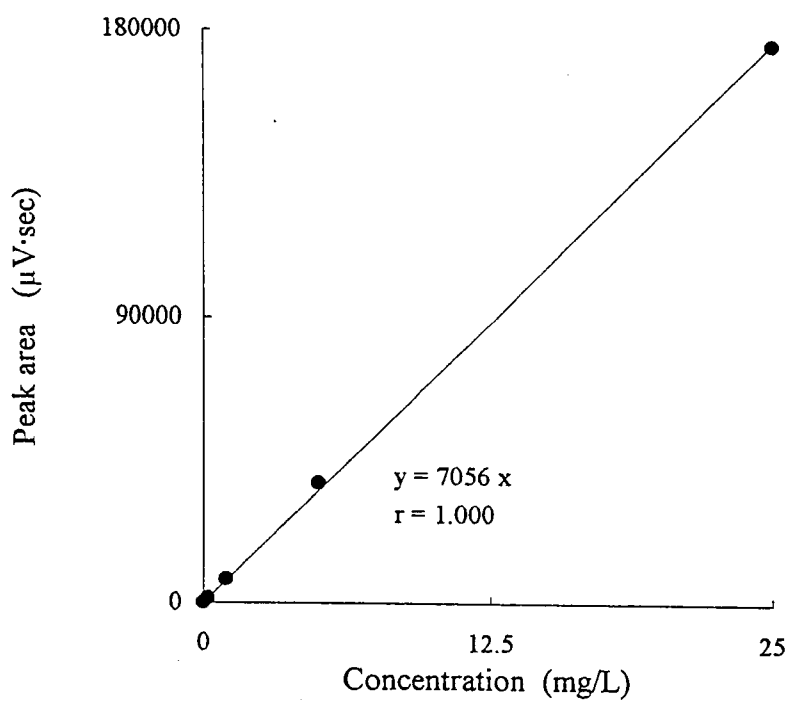


Figure 1. Calibration curve of dichlorobromomethane by GC analysis.

1996. 1.25

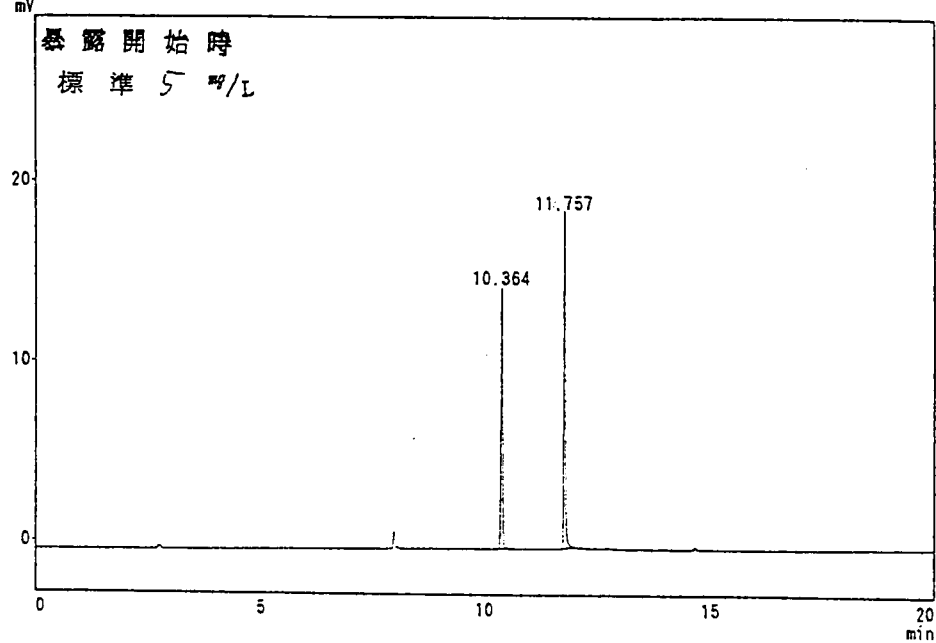
1996.1.31

CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=87 データ=91506H1S.D01 96/01/30 21:54:16  
 サンプル : DCBM/std.  
 ID : 5  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : WFID  
 オペレータ名: [REDACTED]

(3/2)

試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名:91506H1S.C01



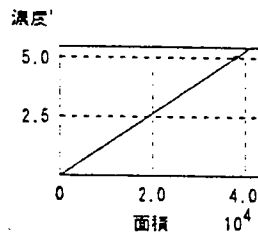
| PKNO | TIME   | AREA(μV·Sec) | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------------|--------|----|------|------|------|
| 1    | 10.364 | 37892        | 14586  |    | 1    |      | DCBM |
| 2    | 11.757 | 47564        | 18782  |    |      |      |      |
|      |        | 85455        | 33368  |    |      |      |      |

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\* ID テーブル \*\*

| IDNO | 成分名  | 時間    | 濃度 | F1          | F2 |
|------|------|-------|----|-------------|----|
| 1    | DCBM | 10.37 | 5  | 0.000131955 |    |

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
NAME: DCBM  
TIME: 10.37

| (1) 濃度'     | 面積    |
|-------------|-------|
| 5           | 37892 |
| (1) RF1     | RF2   |
| 0.000131955 | 0     |
| r2 = 1      |       |

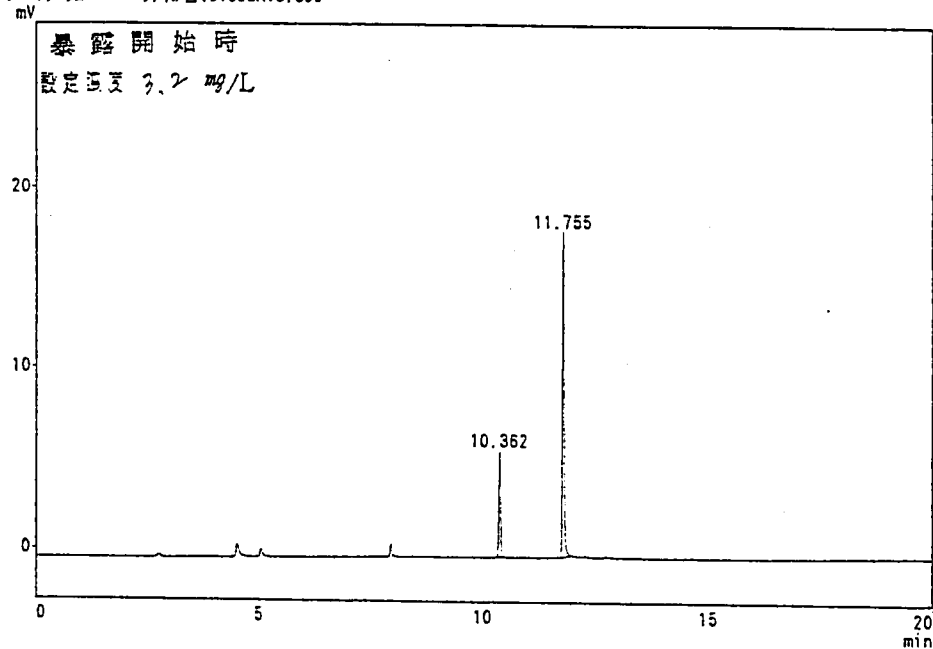
Figure 2-1. Example of chromatogram.  
 ( standard solution of 5.0 mg/L, 0-hour )

1996. 1. 31

CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 試験番号=90 テータ=91506H1C.D00 96/01/30 23:40:00  
 サンプル : DCBM/S3/0h  
 ID : 3.2  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : WFI  
 サンプル名: [REDACTED]

(6/12)  
 試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名:91506H1C.D00



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

| PKNO | TIME   | AREA(μV·Sec) | HEIGHT | PK | IDNO | CONC   | NAME |
|------|--------|--------------|--------|----|------|--------|------|
| 1    | 10.362 | 15341        | 5966   |    | 1    | 2.0244 | DCBM |
| 2    | 11.755 | 46343        | 18237  |    |      |        |      |
|      |        | 61684        | 24203  |    |      | 2.0244 |      |

Figure 2-2. Example of chromatogram.  
 ( fresh test solution of 3.20 mg/L as nominal concentration, 0-hour )



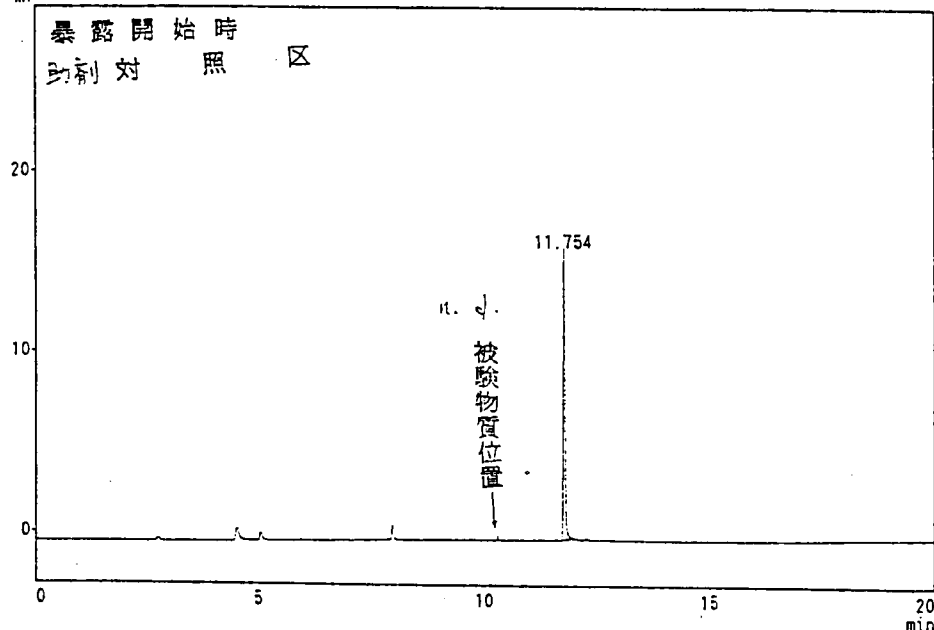
1996.1.31

(11/2)

CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=95 テータ=91506H1Y.D00 96/01/31 02:36:06  
 サンプル : DCBM/SB/0h  
 ID : 助剤対照区  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : WFID  
 オペレータ名 :

試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名:91506H1Y.C00  
 mV



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*

| PKNO | TIME   | AREA(μV·Sec) | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------------|--------|----|------|------|------|
| 1    | 11.754 | 41368        | 16224  |    |      |      |      |
|      |        | 41368        | 16224  |    |      |      |      |

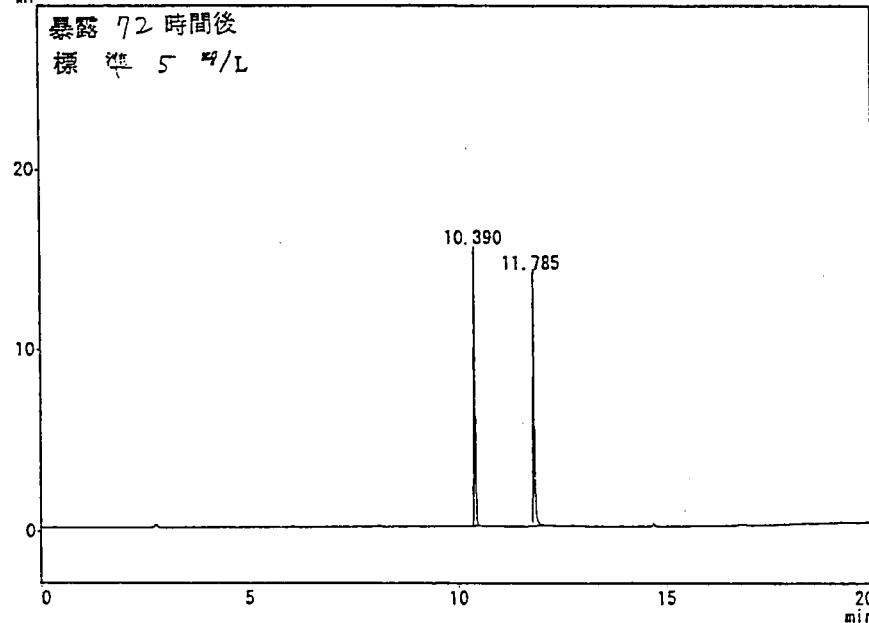
Figure 2-3. Example of chromatogram.  
 ( fresh test solution of solvent control, 0-hour )

CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=97 データ=91506H1S.D11 96/02/03 05:13:54  
 サンプル : DCBM/std.  
 ID : 5  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : WFLD  
 サンプル名 :

1996.2.4

試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名:91506H1S.C11  
 mV



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

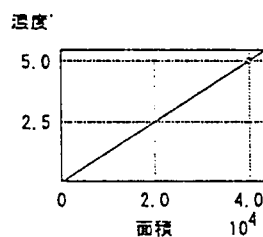
| PKNO | TIME   | AREA (μV·Sec) | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|---------------|--------|----|------|------|------|
| 1    | 10.390 | 39859         | 15418  |    | 1    |      | DCBM |
| 2    | 11.785 | 36199         | 14164  |    |      |      |      |
|      |        | 76059         | 29582  |    |      |      |      |

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\*\* ID テーブル \*\*\*

| IDNO | 成分名  | 時間    | 温度 | F1          | F2 |
|------|------|-------|----|-------------|----|
| 1    | DCBM | 10.38 | 5  | 0.000125442 |    |

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
 NAME: DCBM  
 TIME: 10.38

濃度  
 (1) 5 面積 39859

RF1 RF2  
 (1) 0.000125442 0

r2 = 1

Figure 2-4. Example of chromatogram.  
 ( standard solution of 5.0 mg/L, 72-hour )

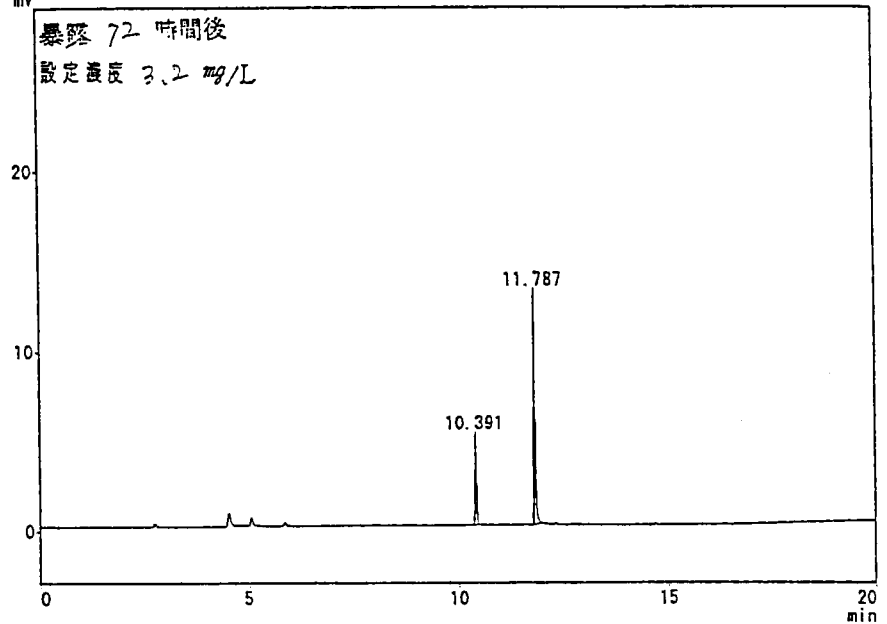
CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=100 ファイル名=91506H1C.D10 96/02/03 06:59:36  
 サンプル : DCBM/S3/72h  
 ID : 3.2  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : WFID  
 オペレータ名 :

1996.2.4

(6/10)

試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名:91506H1C.C10



| PKNO | TIME   | AREA(μV·Sec) | HEIGHT | MK | IDNO | CONC   | NAME |
|------|--------|--------------|--------|----|------|--------|------|
| 1    | 10.391 | 13503        | 5226   |    | 1    | 1.6938 | DCBM |
| 2    | 11.787 | 33939        | 13197  |    |      |        |      |
|      |        | 47441        | 18423  |    |      | 1.6938 |      |

Figure 2-5. Example of chromatogram.  
 (expired test solution of 3.20 mg/L as nominal concentration, 72-hour)

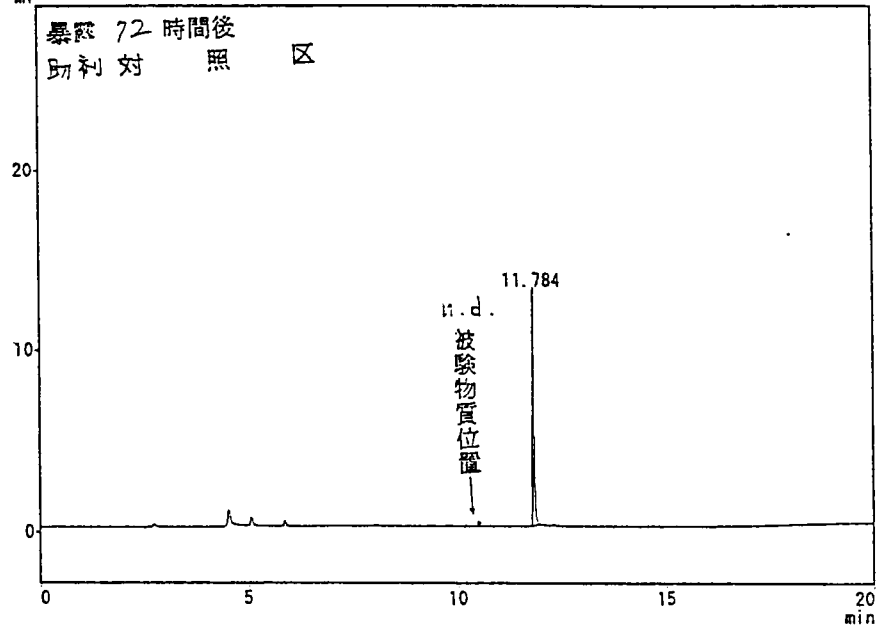
CLASS-GC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=103 データ=91506H1Y.D10 96/02/03 08:45:18  
 サンプル : DCBM/S6/72h  
 ID : 助剤対照区  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : WFI D  
 サンプル名 :

1976.2.4

(9/10)

試験番号 91506

\*\*\* クロマトグラム \*\*\* ファイル名: 91506H1Y.C10  
 mV



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

| PKNO | TIME   | AREA(μV·Sec) | HEIGHT | WK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------------|--------|----|------|------|------|
| 1    | 11.784 | 33671        | 13179  |    |      |      |      |

Figure 2-6. Example of chromatogram.  
 (expired test solution of solvent control, 72-hour)