

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号: EDR96001)

平成 9 年 6 月 30 日作成

住化テクノス株式会社

## 最終報告書修正書

試験番号：EDR96001

修正書番号：1

表題：2, 2-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験施設：住化テクノサービス株式会社

修正内容：

- 1) 8ページ、1.1、被験物質の分子式を以下の通り修正した。

修正前： $C_8H_{12}O_4$

修正後： $C_8H_{12}N_4$

修正理由：

- 1) 記載に誤りがあったため。

試験責任者

2002年4月18日

## 信頼性保証書

本修正事項は、当社の信頼性保証部門によって下記の監査を受けている

項 目	監査日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
草 稿	2002年4月18日		
最終版	2002年4月18日	2002年4月18日	2002年4月18日

信頼性保証責任者：

2002年4月18日

## 陳 述 書

住化テクノス株式会社

試験委託者： 環境庁

表題：2, 2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

試験番号： EDR96001

上記試験は環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものである。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者



## 信頼性保証証明書

試験表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する  
繁殖阻害試験

試験番号： EDR96001

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って下記の  
査察を受けている。

査察項目	査察日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
試験計画書	平成9年3月14日	平成9年3月14日	平成9年3月14日
	平成9年4月1日	平成9年4月1日	平成9年4月1日
	平成9年4月3日	平成9年4月3日	平成9年4月3日
	平成9年5月7日	平成9年5月7日	平成9年5月7日
	平成9年5月13日	平成9年5月13日	平成9年5月13日
	平成9年5月23日	平成9年5月23日	平成9年5月23日
試験査察	平成9年3月18日	平成9年3月24日	平成9年3月24日
	平成9年3月24日		
最終報告書	平成9年6月18日	平成9年6月19日	平成9年6月30日
	平成9年6月30日	平成9年6月30日	

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験した方法、手順が正確に記録され、  
かつ、試験の生データを正確に反映していることを認めます。

平成 9 年 6 月 30 日  
住化テクノス株式会社  
信頼性保証責任者




## 試験実施概要

1. 表題：2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： 2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) 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、繁殖状態に对照区と有意差の認められない最高濃度 (NOECr) および幼体産出数を50%減少させると算定される濃度 (50%繁殖阻害濃度：ErC50) 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「生態影響試験実施に関する基準」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1丁目2番2号  
委託担当者： XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：  
名称： 住化テクノス株式会社  
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号
7. 試験施設：  
名称： 住化テクノス株式会社  
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

## 8. 試験関係者：

試験責任者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当責任者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当者



(平成 9 年 6 月 30 日)

## 9. 試験期間： 試験開始日

平成 9 年 3 月 14 日

試験終了日

平成 9 年 6 月 30 日

暴露期間

平成 9 年 5 月 14 日～平成 9 年 6 月 4 日

## 10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、住化テクノス株式会社の試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協議のうえ決定する。

## 目 次

	頁
要 旨 .....	7
1 被験物質 .....	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状 .....	8
1.2 供試試料 .....	8
1.3 被験物質の確認および保管条件下の安定性 .....	8
2 供試生物 .....	9
3 試験方法 .....	10
3.1 試験条件 .....	10
3.2 希釈水 .....	10
3.3 試験容器および恒温槽等 .....	10
3.4 試験濃度の設定 .....	10
3.5 試験液の調製 .....	11
3.6 試験液の分析 .....	11
3.7 試験操作 .....	11
4 結果の算出 .....	12
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出 .....	12
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出 .....	12
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .....	13
5 結果および考察 .....	14
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....	14
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	14
5.3 ミジンコの観察結果 .....	14
5.4 親ミジンコの50%致死濃度 (LC50) .....	15
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) .....	15
5.6 累積幼体産出数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .....	16
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH .....	16
Table 1~10. ....	17~24
Figure 1, 2 .....	19, 21
付属資料-1 希釈水の水質 .....	25
付属資料-2 試験液の分析方法 .....	27
付属資料-3 ミジンコの観察結果 .....	45
付属資料-4 餌料の有機炭素含量測定 .....	53

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

EDR 9 6 0 0 1

### 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: 2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル)
- 2) 暴露方法: 半止水式 (週3回以上の頻度で試験液の全量を交換)
- 3) 供試生物: オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間: 21日間
- 5) 連数: 1 試験区につき4連
- 6) 生物数: 40頭 / 1 試験区 (1連につき10頭で1 試験区40頭)
- 7) 試験濃度: 対照区, 助剤対照区 (助剤濃度 100mg/L) 0.46, 1.0, 2.2, 4.6および10 mg/L
- 8) 試験液量: 1000 mL
- 9) 照明: 室内照明、16時間明 / 8時間暗
- 10) 試験水温: 20±1℃

### 結 果

対照区の幼体産出数が助剤対照区および低濃度区と比較して明らかに低かったため、助剤対照区を用いて検定した値を用いた。

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| 1) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度 (LC50) | : >10mg/L                  |
| 2) 21日間の50%繁殖阻害濃度 (ErC50)    | : 7.5mg/L                  |
|                              | [95%信頼区間 : 4.6mg/L~10mg/L] |
| 3) 最大無作用濃度 (NOECr)           | : 2.2mg/L                  |
| 4) 最小作用濃度 (LOECr)            | : 4.6mg/L                  |

(上記濃度は全て設定値に基づく値)



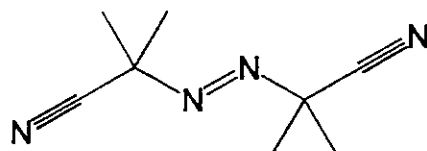
## 1 被験物質

## 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : 2, 2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル)

(CAS番号: 78-67-1、略称: AMP、識別番号: 96E-2)

構造式 :



分子式 : ~~C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>~~ C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub> **訂正**

分子量 : 164.21

## 1.2 供試試料

購入先 :

入手日 : 平成8年12月20日

ロット番号: DLE7785

外観 : 白色結晶性粉末

純度 : 99.3%

## 1.3 被験物質の確認および保管条件下の安定性

被験物質は当社の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質についてIR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。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無かったことより、被験物質は当社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

試験には生後24時間以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。本種は、国立環境研究所より入手したものを、当社において累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、Lot No. KCE6888 和光純薬工業㈱）による急性遊泳阻害試験の48時間 $EC_{50}$ は0.80mg/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

累代飼育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、別に用意した容器に移し、翌日、産出された幼体を別の容器に分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で2～4週間飼育した。成熟し幼体産出開始後は1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。2～4週間後、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）、産出された幼体を試験に用いた。供試ミジンコの親を飼育中、多数の死亡個体および休眠卵や雄は生じなかった。

飼育水 : 希釈水 (3.2参照)

飼育密度: 20～50 頭/L 飼育水 (但し、成熟個体の場合は、25頭以下/Lとした)

水温 : 20±1℃

照明 : 室内光、16時間明/8時間暗

餌 : *Chlorella vulgaris*

市販のクロレラ濃縮液（商品名：生クロレラV12、クロレラ工業㈱）を遠心操作により、希釈水に置換して懸濁液を調製し給餌した。

1%懸濁液の有機炭素含量は1050mgC/Lであり、この値を基に餌の添加量を決定した。実際の有機炭素含量の測定は、広栄テクノサービス㈱に委託した。

[付属資料－4]

給餌量 : 原則として、ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を0.1～0.2mgC (有機炭素含量) /日の割合で与えた。

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方法： 暴露8日目までは週3回（月、水、金曜日）、暴露9日目以降は溶存酸素濃度の減少を考慮して毎日の頻度で試験液の全量を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 連数： 1試験区に付き4連
- 4) 生物数： 40頭／1試験区（1連に付き10頭で1試験区40頭）
- 5) 試験液量： 1000 mL／容器
- 6) 試験水温：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内照明、16時間明／8時間暗
- 8) 給餌量： ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を0.1～0.2mgC（有機炭素含量）／日の割合で与えた。餌の添加量は1%懸濁液の有機炭素含量（1050mgC/L）から求めた。[付属資料－4]

#### 3.2 希釈水

脱塩素水（宝塚市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので充分通気したもの）を使用した。希釈水の主な水質として、総硬度が 約63mg/L（ $\text{CaCO}_3$ 換算）、pHが 8.1 であった。[付属資料－1]

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器： 1000mL容ガラス製ビーカー  
 恒温槽： ミジンコ試験用恒温槽  
 水温計： 電子温度計（PC-2200 ㈱佐藤計量器製作所製）  
 pH計： F-8AT型（堀場製作所製）  
 溶存酸素計： 58型（YSI製）

#### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する急性遊泳阻害の結果、48hr-EiC50値は10mg/L（最高助剤濃度100mg/Lで均一分散可能な最高濃度）以上であったことから、繁殖阻害試験は10mg/Lを最高濃度とし、それ以下の濃度を公比2.2で5段階設定した。対照には希釈水のみの対照区と、助剤対照区としてアセトン100mg/L区を設けた。各試験区は以下の通りである。

「対照区，助剤対照区，0.46，1.0，2.2，4.6 および10 mg/L」（設定値）

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を電子天秤を用いて秤量し、これに溶解助剤としてアセトンに10倍量添加して十分に混合した後、希釈水を加えて定容、攪拌し試験原液を調製した。設定濃度の試験液を調製するのに必要な試験原液をメスシリンダーではかり取り、希釈水を加えて5000mLあるいは4000mLに定容攪拌して試験液を調製した。4個の試験容器にそれぞれ1000mLとなるよう試験液を分注した。

対照区は、被験物質を加えない希釈水を用いた。

助剤対照区は、アセトンを電子天秤を用いて秤量し、希釈水を加えて定容、攪拌し100mg/L溶液を調製した。

### 3.6 試験液の分析

暴露7日、9日、19日および20日目に全試験区の試験液（但し、各1試験容器）について、栓付ガラス製遠沈管（約50mL）に採取した。採取した試験液はフィルター濾過後、HPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、試料のピーク面積から絶対検量線法により定量した。詳細は付属資料-2に示した。なお、実際の物理化学的試験は株式会社分析センターに委託した。

### 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、試験容器に供試ミジンコを放泳し、その時点を暴露開始とした。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放泳した。その際、試験液量に対してピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。その後、試験液交換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。暴露期間中は毎日給餌を行った（3.1参照）。

#### ・ミジンコの観察：

（親ミジンコ） 毎日、生存数を計数し、状態（遊泳障害数、外観など）を対照区と比較した。なお、計数後の親ミジンコの死亡個体は取り除いた。

（産出幼体） 初産日から毎日、幼体の生死を計数した。墮胎卵、休眠卵の発生等についてその有無を観察した。計数後の幼体は廃棄した。また、最初の幼体産出日（初産日）を記録した。

・水質測定： 水温、溶存酸素濃度（D.O.）、pHを、全試験区について、暴露期間中に週1回（試験液交換前後）の頻度で測定した。1試験区につき1容器について測定した。

#### 4 結果の算出

対照区の親ミジンコの状態に特筆すべき点は認められなかったが、暴露12日頃から幼体産出数が助剤対照区や低濃度暴露群に比べて減少傾向となり、暴露終了時での累積幼体産出数は、統計学的にも有意に少なかった。

この原因は特定できなかったが、ミジンコの繁殖生理上にとって何らかの阻害因子が生じたためと推測される。従って、本試験での影響評価には対照区は不適切と判断し、助剤対照区を採用した。

##### 4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

試験最高濃度区 (10mg/L) の死亡率が5%であったため、統計的手法 (Binomial法、Moving average法または Probit法) は適用できなかった。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出

###### 累積幼体産出数の算出

各試験容器の親1頭当たりの暴露期間中の累積幼体産出数 ( $TF$ ) および平均累積幼体産出数 ( $\overline{TF}$ ) 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

$F_n$  :  $n$  回目の生存幼体数

$P_n$  :  $n$  回目の観察時の親ミジンコの生存数

$P_{n-1}$  :  $n-1$  回目の親ミジンコの生存数

$P_0$  : 最初に幼体を観察した日の前日の親の数

$ne$  : 最終観察回

( $P_{n-1} + P_n$  が 0 の場合は、無視した。)

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

ここで

$TF_n$  : 各試験容器の累積幼体産出数

$m$  : 試験区当たりの連数 (試験容器数 : 4)

###### ErC50値の算出

供試生物数に助剤対照区の平均累積幼体産出数を、反応数に助剤対照区と各濃度区の平均累積幼体産出数の差を適用して、Binomial法により、14および21日目の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) を算出し、95%信頼区間も算出した。

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

4.2に示したように各試験容器毎の親1頭当たりの累積幼体産出数を算出し、各濃度区と助剤対照区との有意差の有無を平均値の差の検定 (t 検定) により有意水準5%で求め、助剤対照区と有意差の認められない最高濃度 (最大無作用濃度: NOECr) および有意差の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

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は認められなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時の被験物質濃度は、暴露7日目で 0.44, 0.98, 2.1, 4.4, 9.2mg/L、暴露19日目では0.43, 0.88, 2.0, 4.7, 10mg/L [設定値0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10mg/L] であった。設定値に対する割合はそれぞれ92~98%、88~100%であり、設定の±20%以内であった。

また、それらの2日後または1日後（試験液交換前）の濃度はそれぞれ 0.42, 0.95, 2.1, 4.2, 9.0mg/L、0.42, 0.91, 2.1, 4.3, 9.2mg/L [設定値0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10mg/L] であった。設定値に対する割合はそれぞれ 90~95%、91~94%であり、設定の±20%以内であった。

これらの被験物質の実測濃度の21日間の時間加重平均値は 0.43, 0.93, 2.0, 4.4, 9.4mg/L [設定値 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10mg/L] であった。

[Table 1(p.17), 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0.0%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

2, 2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10mg/L濃度区および助剤対照区の死亡率は、それぞれ0.0, 0.0, 2.5, 0.0, 5.0および2.5%であった。

[Table 2-1, 2-2(p.18), Figure 1(p.19) 付属資料-3]

#### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は7日であり、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

2, 2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) 全濃度区および助剤対照区の初産日は対照区と同様の7日であった。

[Table 3(p.20), 付属資料-3]

#### 平均累積幼体産出数

対照区での親ミジンコの平均累積幼体産出数は 71.6頭であり、試験成立条件である 40頭の基準を満たした。

なお、今回の試験では、「4. 結果」の項で記述したように対照区で何らかの繁殖阻害が生じたものと判断したため、助剤対照区を基に検定した。

助剤対照区の平均累積幼体産出数は99.7頭であったのに対し、2, 2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル) 0.46, 1.0および2.2mg/L濃度区は、それぞれ90.7, 87.0および86.0頭でいずれも有意差は認められなかった。4.6および10mg/L濃度区は、74.2および34.8頭で助剤対照区に対して有意に少なかった。

[Table 4(p.21), Figure 2(p.21) 付属資料-3]

#### 親ミジンコの大きさや状態

2, 2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル) 0.46, 1.0, 2.2, 4.6mg/L濃度区および助剤対照区は、対照区と比較して大きさや状態に差が無かった。ただし、対照区を含む全試験区において暴露18日目以降、水底で一時期に横転する個体が少数散見されたが、外部刺激を与えることにより水中を正常遊泳することから、一過性の変化であり被験物質に起因するものではないと判断された。10mg/L濃度区では、暴露19日目から体色白化や遊泳阻害の症状が認められた。

#### 休眠卵の発生等

いずれの試験区とも暴露期間中に休眠卵の発生は全く認められなかった。

墮胎卵は暴露期間中、対照区および助剤対照区を含む全ての試験区で、不規則に産出され、濃度に依存して若干多く認められた。

#### 5.4 親ミジンコの50%致死濃度 (LC50)

14日間および21日間の親ミジンコの50%致死濃度 (LC50) は、10mg/L以上であった。

[Table 5(p.22)]

#### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

14日間および21日間の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は、8.0mg/L [95%信頼区間 4.6 mg/L～10mg/L]、7.5mg/L [95%信頼区間4.6mg/L～10mg/L] であった。

[Table 6(p.22)]



## 5.6 累積幼体産出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頭あたりの累積幼体産出数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOECr) は、2.2mg/Lであり、最小作用濃度 (LOECr) は4.6mg/Lであった。

[Table 7(p.23)]

## 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20.2～20.9℃で、設定どおりであった。

溶存酸素濃度 (D.O.) は、助剤対照区で暴露9日目に飽和の52% (4.6mg/L) に低下したため暴露9日目から試験液交換を毎日に変更したところ、飽和の60%以上 (7.5～8.0mg/L) を確保できた。対照区では暴露期間中、60%以上 (7.5～8.3mg/L) であった。他の試験区の溶存酸素濃度は5.4～8.4mg/Lで飽和溶存酸素濃度の60%以上であった (20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.8mg/L)。

pHは 7.4～8.1の範囲で変動は1以下であった。

以上のことから溶存酸素濃度が一時的に飽和の60%を下回った以外は、水温、pHともミジンコの生育条件としては適切な範囲であったと思われる。

[Table 8, Table 9, Table 10(p.24)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)				Time Weighted Mean
	(Percent of Nominal)				
	7 day new	9 day old	19 day new	20 day old	
Control	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	—
Solvent Control	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	—
0.46	0.44 (96)	0.42 (90)	0.43 (94)	0.42 (92)	0.43 (93)
1.0	0.98 (98)	0.95 (95)	0.88 (88)	0.91 (91)	0.93 (93)
2.2	2.1 (94)	2.1 (94)	2.0 (91)	2.1 (94)	2.0 (93)
4.6	4.4 (95)	4.2 (91)	4.7 (100)	4.3 (94)	4.4 (96)
10	9.2 (92)	9.0 (90)	10 (100)	9.2 (92)	9.4 (94)

new : Freshly prepared test solution.

old : Test solutions 1~2days after freshly prepared.

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

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
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sol. Cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2

\*: Nominal Concentration

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

Conc. * (mg/L)	Days	
	14	21
Control	0.0	0.0
Sol. Cont.	0.0	2.5
0.46	0.0	0.0
1.0	0.0	0.0
2.2	0.0	2.5
4.6	0.0	0.0
10	0.0	5.0

\*: Nominal Concentration

EDR96001 18/58

Figure 1. Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

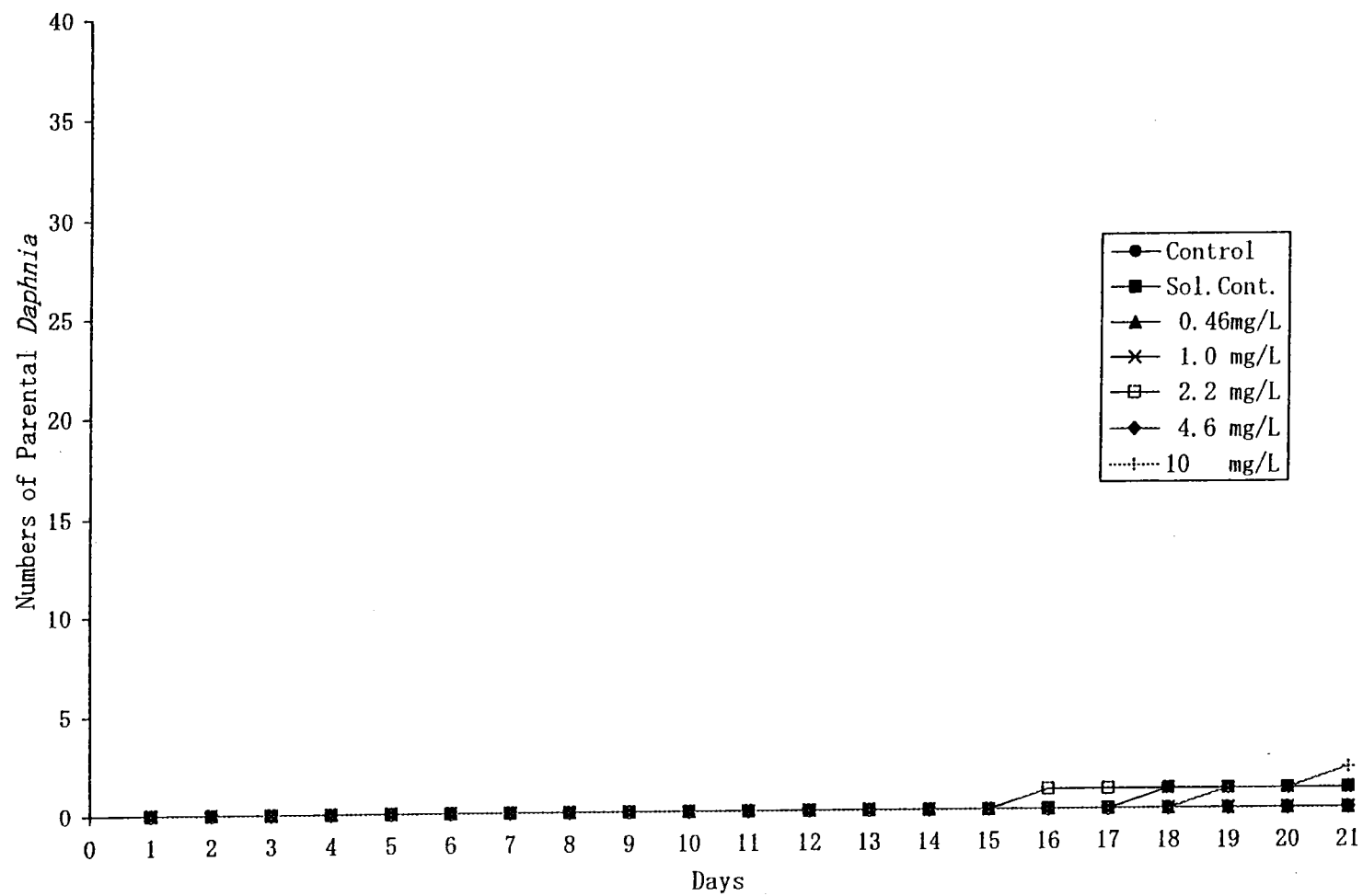


Table 3. Time(days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)						
	Control	Sol. Cont.	0.46	1.0	2.2	4.6	10
A	7	7	7	7	7	7	7
B	7	7	7	7	7	7	7
C	7	7	7	7	7	7	7
D	7	7	7	7	7	7	7
Mean	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

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

Conc. * (mg/L)	Days												
	0	2	4	6	7	8	10	12	14	16	18	20	21
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	12.7	23.7	37.9	50.6	60.7	64.9	71.2	71.6
Sol. Cont.	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	13.3	29.1	45.7	75.7	94.2	98.4	99.2	99.7
0.46	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	10.1	27.4	48.8	73.1	87.1	89.9	90.3	90.7
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	11.5	25.8	41.5	68.5	83.3	85.6	86.2	87.0
2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	12.6	20.7	39.7	62.6	81.1	84.6	86.0	86.0
4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	10.5	21.6	38.4	54.0	69.7	73.7	74.1	74.2
10	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	7.6	14.8	23.1	31.0	34.3	34.8	34.8	34.8

\*: Nominal Concentration.

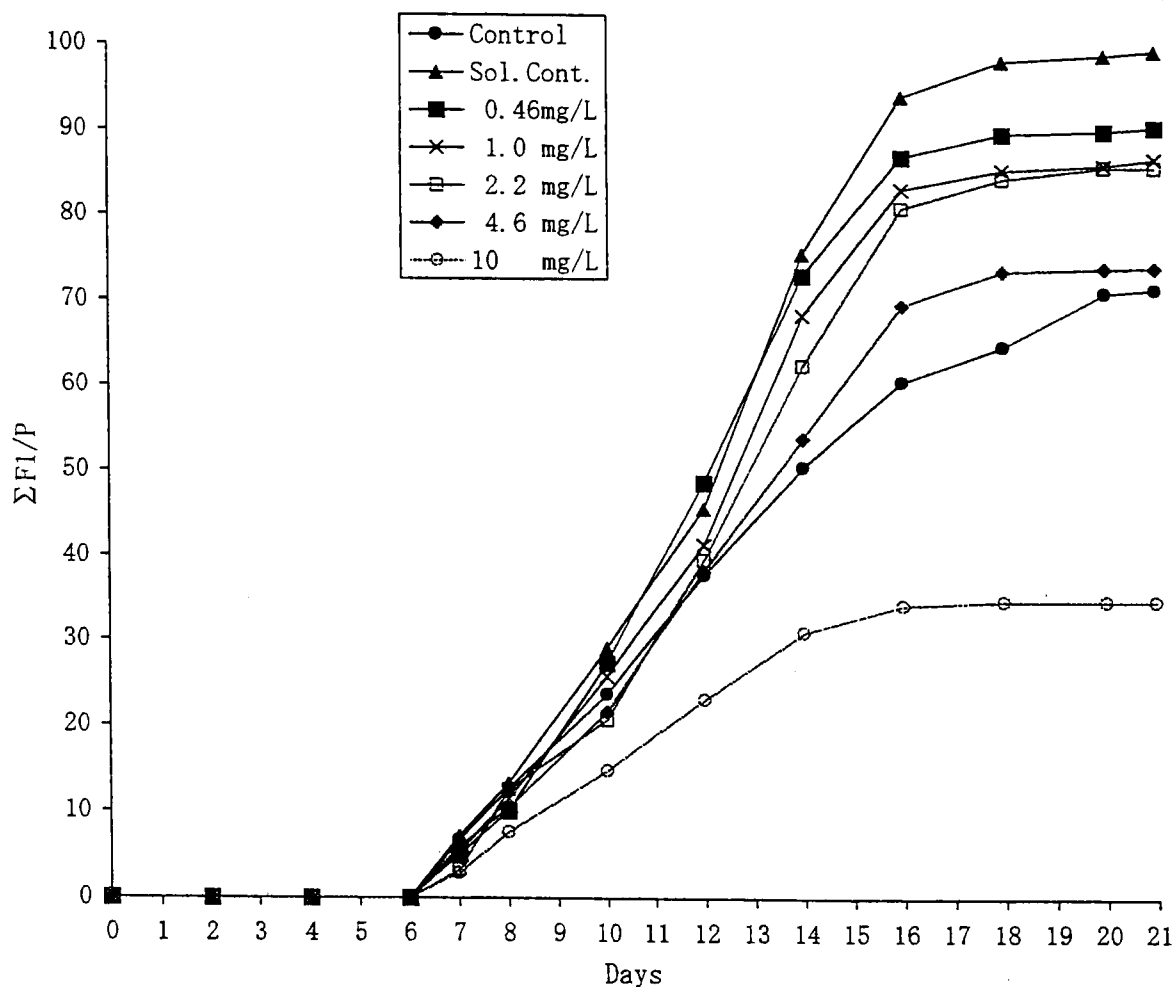
Figure 2. Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ )

Table 5. Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure period (days)	LC50 (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	>10	—	—
21	>10	—	—

Nominal Concentration.

Table 6. Calculated ErC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (days)	ErC50 (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	8.0	4.6~10	Binomial
21	7.5	4.6~10	Binomial

Nominal Concentration.

Table 7. Significance Test of Difference between the Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult in Solvent control and Test Vessels after 21 days (Two-sided test of F-test and t-test)

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)						
	Control	Sol. Cont.	0.46	1.0	2.2	4.6	10
A	64.0	119.9	99.7	85.3	83.6	68.7	39.6
B	84.4	108.8	86.4	89.2	79.8	75.1	32.1
C	64.7	73.1	88.9	84.0	79.9	68.5	35.2
D	73.2	97.1	87.8	89.3	100.6	84.3	32.1
Mean	71.6	99.7	90.7	87.0	86.0	74.2	34.8
S.D.	9.5	20.0	6.1	2.7	9.9	7.4	3.5
F-test			F value				
			10.844	54.755	4.091	7.280	31.908
			Equality				
			YES	YES	NO	NO	YES
t-test (Probability)			0.444	0.293	0.265	0.054	0.007
Significant difference (95%)			NO	NO	NO	YES	YES

## Statistic

i	4	4	4	4	4	4
n	24					
xi	398.900	362.800	347.800	343.900	296.600	139.000
$\sum xi^2/i$	39780.303	32905.960	30241.210	29566.803	21992.890	4830.250
$\sum sx^2$	40985.470	33017.100	30263.220	29861.370	22158.440	4868.020
t	1889.000					
xbb	78.708					
ct	148680.042					

## ANOVA TABLE

Source	Sum of Sq.	DF	Mean Sq.	F ratio f(0.05, f1, f2)	
Among	10637	5	2127	21	2.77
Within	1836	18	102		
Total	12473	23	2229		

No observed effect concentration (NOECr) = 2.2 mg/L

Lowest effect concentration (LOECr) = 4.6 mg/L



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

		Temperature, °C						
days		Nominal Concentration (mg/L)						
		Control	Sol. Cont.	0.46	1.0	2.2	4.6	10
0	new	20.4	20.4	20.4	20.3	20.3	20.3	20.3
2	old	20.7	20.7	20.7	20.9	20.8	20.8	20.8
7	new	20.3	20.2	20.3	20.3	20.3	20.3	20.3
9	old	20.7	20.7	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6
14	new	20.7	20.8	20.8	20.8	20.8	20.8	20.9
15	old	20.7	20.9	20.7	20.7	20.7	20.7	20.7

new: Freshly prepared test solutions.

old: Test solutions after 1~2days exposure.

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

		D.O. (mg/L)						
days		Nominal Concentration (mg/L)						
		Control	Sol. cont.	0.46	1.0	2.2	4.6	10
0	new	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.8	7.9
2	old	8.0	8.0	7.6	7.9	7.9	7.9	7.8
7	new	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.4
9	old	7.5	4.6	6.7	5.6	5.4	5.7	5.8
14	new	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.9
15	old	7.8	7.5	7.6	7.7	7.7	7.6	7.7

new: Freshly prepared test solutions.

old: Test solutions after 1~2days exposure.

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

		pH						
days		Nominal Concentration (mg/L)						
		Control	Sol. cont.	0.46	1.0	2.2	4.6	10
0	new	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0
2	old	7.8	8.0	8.0	8.1	8.1	8.1	8.1
7	new	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
9	old	7.4	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
14	new	7.9	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
15	old	7.5	7.5	7.6	7.9	7.9	7.9	7.9

new: Freshly prepared test solutions.

old: Test solutions after 1~2days exposure.

付属資料－ 1

希釈水の水質  
(全 1 頁)

## Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Phosphorus	<0.01 mg/L
pH	8.1 (15.0°C)
E. coli	N.D.
Total mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminum	<0.02 mg/L
Nickel	<0.02 mg/L
Total chromium	<0.02 mg/L
Soluble manganese	<0.005 mg/L
Tin	<0.03 mg/L
Soluble iron	<0.03 mg/L
Cyanide	N.D (<0.01 mg/L)
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	0.5 mg/L
Fluoride	0.29 mg/L
Sulfide ion	<0.1 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L
Selenium	<0.001 mg/L
Evaporated residue	230 mg/L
Electro conductivity	38 mS/m
Total hardness	63.1 mg/L
M-alkalinity	59 mg/L
Sodium	54 mg/L
Potassium	3.6 mg/L
Calcium	6.6 mg/L
Magnesium	3.9 mg/L
Total chlorinated pesticides	<0.001 mg/L
Total organophosphorus pesticides	<0.001 mg/L
PCB	<0.0005 mg/L

Date: Nov. 8, 1996

付属資料－ 2

試験液の分析方法  
(全17頁)

## 試験結果報告書

表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオン)のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験 (物理・化学系)

(試験番号： EDR96001)

1997年 6月25日

運営管理者

大阪事業所 所長



株式会社 住化分析センター

大阪事業所

ESOP/REC/011 RS-01

## 陳 述 書

試験委託者 :

名 称 住化テクノス株式会社  
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験の表題 : 2,2'-77'-ビス(2-メチル-6-ホルミル)のオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験 (物理・化学系)

試験番号 : EDR96001

上記試験は、環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものであり、  
提出した資料は原本と相違ありません。

1997 年 6 月 25 日

(所属)

株式会社 住化分析センター  
大阪事業所 所長

(氏名)

運営管理者

# 監査・査察報告書 (951025)

試験の表題: 2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験 (物理・化学系)

試験番号: EDR96001

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って  
 下記の監査・査察を受けている。

QAU 監査・査察日	運営管理者および 試験責任者への報告日	監査・査察 項目
1997年 3月20日	1997年 3月20日	試験計画書
1997年 3月20日	1997年 3月20日	試験操作
1997年 3月24日	1997年 3月24日	試験操作
1997年 4月 3日	1997年 4月 3日	試験計画書変更書
1997年 4月11日	1997年 4月11日	試験操作
1997年 5月13日	1997年 5月13日	試験計画書変更書
1997年 5月21日	1997年 5月21日	試験操作
1997年 6月20日	1997年 6月20日	最終報告書 (草稿)
1997年 6月25日	1997年 6月25日	最終報告書

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験で使用方法、手順が正確  
 に記録され、かつ試験の生データを正確に反映していることを認めます。

1997年 6月25日

株式会社 住化分析センター 大阪事業所

QA責任者

ESOP/QAU/001 RS-11

試験番号：EDR96001

表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験 (物理・化学系)

## 試験委託者

名 称 住化テクノス株式会社  
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

## 試験期間

自： 1997年 3 月 20 日  
至： 1997年 6 月 25 日

## 試験施設

名 称 株式会社 住化分析センター 大阪事業所  
住 所 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験責任者



1997 年 6 月 25 日

試験担当責任者



1997 年 6 月 25 日

試験担当者



1997 年 6 月 25 日

最終報告書作成者



1997 年 6 月 25 日

運営管理者



1997 年 6 月 25 日



## 目 次

1. 要約
2. 緒言
3. 試験物質、試薬および装置
4. 試験の実施
  - (1) 用いた試験方法
  - (2) 試験装置
  - (3) 試験液の分析
5. 試験結果
  - (1) 添加回収試験結果
  - (2) 試験液測定結果
6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因
7. SOPまたは試験計画書からの逸脱
8. 資料の保管
9. 添付資料

## 1. 要約

生態影響試験「2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のオオミジンコに対する繁殖阻害試験(試験番号:EDR96001)」時の試験液(試料)中の被験物質濃度を測定した。

## 2. 緒言

試料中の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフにて測定した。

## 3. 試験物質、試薬および装置

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)標準品:

より提供された純度既知の被験物質

Lot. No. : DLE7785

純 度 : 99.3%

ジクロロメタン:	残留農薬試験用	関東化学㈱製
アセトニトリル:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学㈱製
蒸留水:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学㈱製
n-オクチルアルコール:	特級	和光純薬㈱製
無水硫酸ナトリウム:	残留農薬試験用	関東化学㈱製
フィルター:	DISMIC-13HP (PTFE 0.45 $\mu$ m)	ADVANTEC
高速液体クロマトグラフ用ポンプ:	LC-5A	㈱島津製作所製
紫外分光光度計検出器:	SPD-6A	㈱島津製作所製
自動注入装置:	KMT-60A-II型	㈱協和精密製作所製
データ処理装置:	C-R4A	㈱島津製作所製
天秤:	AT-250	メトラー社製

## 4. 試験の実施

## (1) 用いた試験方法

試験水を液々抽出後、高速液体クロマトグラフにて定量した。

## (2) 試験装置

高速液体クロマトグラフ操作条件

カラム: Sumipax ODS A-212  
(粒径 5  $\mu$ m, 内径 6 mm, 長さ 15 cm)  
移動相: アセトニトリル/水 = 2/3 (V/V)  
カラム温度: 室温  
流量: 1.0 mL/min

保持時間： 約 12.5 分

測定波長： 205 nm

注 入 量： 50  $\mu$  L

### (3) 試験液の分析

#### 1) 検量線の作成

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)標準品約 30 mg を精密に秤り取り 30 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニリルを加えて溶かし、定容とした。この液より一定量を採取し、蒸留水で希釈し、約 1, 5, 10, 20 mg/L の標準溶液を調製した。

4. (2) の条件に調整した高速液体クロマトグラフに注入し、それぞれの標準溶液のピーク面積と標準品の重量から検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

なお、検量線のバラツキの許容範囲は相関係数が、0.95 以上であることとした。

#### 2) 試料の分析

- a. 試料は、50 mL 容遠沈管に満たした状態で試験委託者より受け取った。
- b. あらかじめ塩化ナトリウム 1 g を入れた 100 mL 容分液ロートに試料(a.) 20 mL を採取し、ジクロロメタン(40 mL  $\times$  2 回)を加え、振盪抽出(5 分間  $\times$  2 回)した。5 分間静置した後、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムを載せた三角ロートにて脱水濾過後、2% n-オクチルアルコール/ジクロロメタン 1 mL を加え、ロータリーエバポレーターを用いて、浴温 40℃ 以下で減圧濃縮した。

アセトニトリル/水 = 2/3 (V/V) で被験物質の濃度が 1~20 mg/L になるように希釈し、フィルターで濾過後、4. (2) の測定条件にて絶対検量線法で濃度を求めた。

感度確認のため、測定終了後に標準溶液を注入し、感度変化のないことを確認した。

#### 3) 検出限界

装置の最小検出量	: 50 ng	最終液量	: 2 mL
注入量	: 50 $\mu$ L	試料量	: 20 mL

$$50 \text{ ng} / 50 \mu \text{ L} \times 2 \text{ mL} / 20 \text{ mL} = 0.1 \text{ mg} / \text{L}$$

## 5. 試験結果

## (1) 添加回収試験結果

検出限界の10倍濃度(1 mg/L)における回収試験を行ったところ、以下の結果が得られた。なお、変動係数は10%以内であった。

設定濃度 mg/L	回収率 %	平均回収率 %
1.004	82.46	81.73
	81.53	
	81.20	

## (2) 試験液測定結果

設定濃度 mg/L	測定値 mg/L			
	7日後	9日後	19日後	20日後
対照区	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
助剤対照区	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
0.46	0.4428	0.4156	0.4344	0.4232
1.0	0.9800	0.9494	0.8837	0.9145
2.2	2.073	2.065	1.996	2.061
4.6	4.375	4.174	4.722	4.316
10	9.249	9.036	10.09	9.223

## 6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因は特に認められなかった。

## 7. SOPまたは試験計画書からの逸脱

SOPまたは試験計画書からの逸脱は特に認められなかった。

## 8. 資料の保管

試験計画書、生データ、資料、最終報告書は、試験報告書作成後10年間、当社施設の資料保管室に保管する。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。

## 9. 添付資料

検量線

標準溶液のクロマトグラム

試料のクロマトグラム

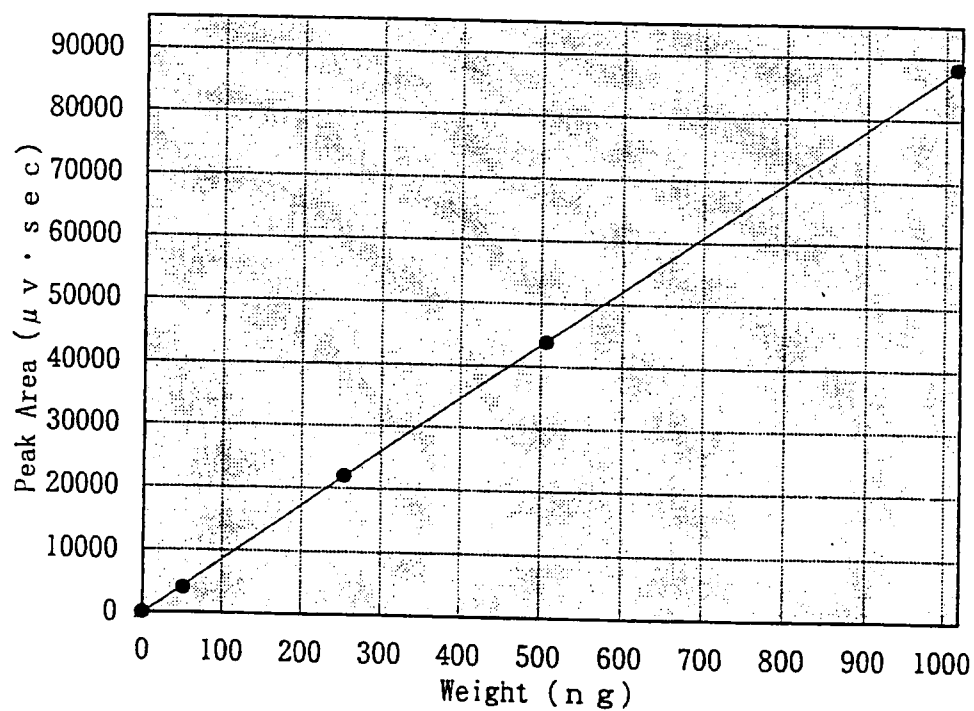
Figure 1 Typical Calibration Curve of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) by HPLC Analysis

## Input Data

No.	Weight (n g)	Peak Area ( $\mu v \cdot sec$ )
1	50.70	3978
2	253.5	21975
3	507.0	43823
4	1014	88226

$$Y(\text{Peak Area}) = -357.2 + 87.35X (\text{Weight})$$

$$r = 1.000$$



## Appendix 2

Figure 2 Representative Chromatograms  
 (1) Standard 10.14 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=4 クロマト=1:970521.C04 97/05/21 15:35:02

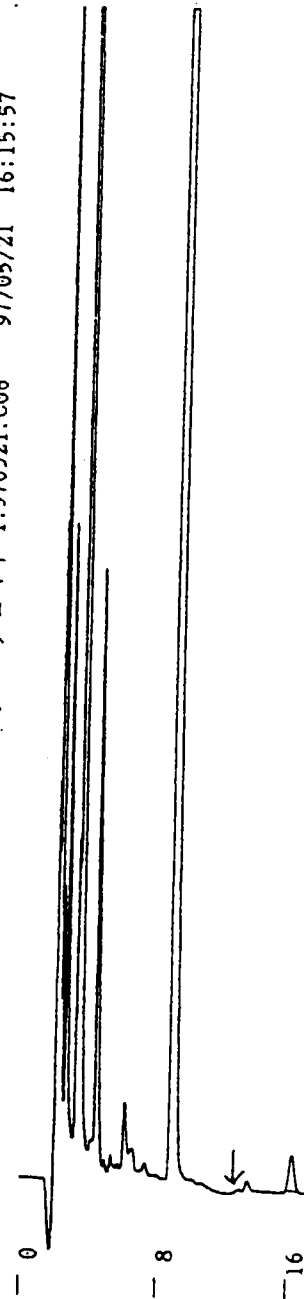


## \*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.697	43823	2528			100	
TOTAL			43823	2528			100	

(2) Control; Day 7

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=6 クロマト=1:970521.C06 97/05/21 16:15:57



## \*\* 定量計算結果 \*\*

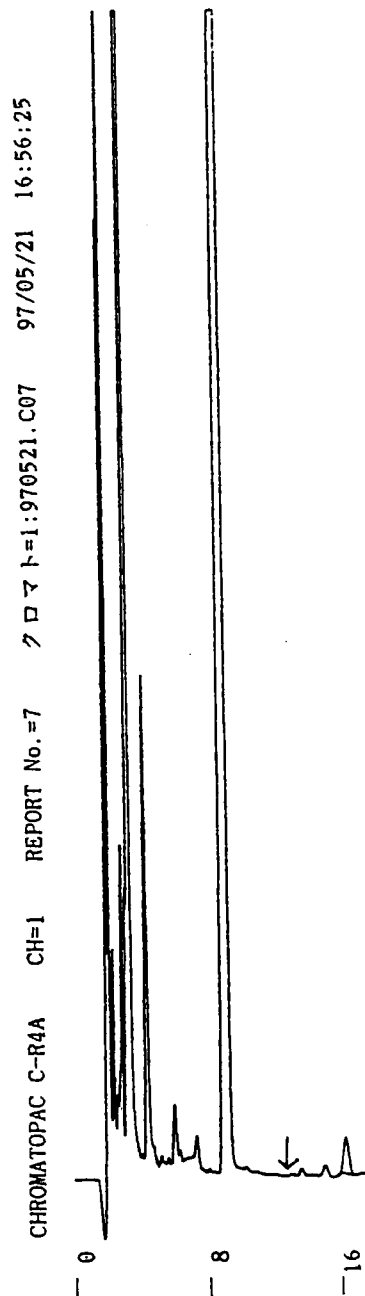
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	16.319	6001	259			100	
TOTAL			6001	259			100	

## Appendix 2

Figure 2 Continued

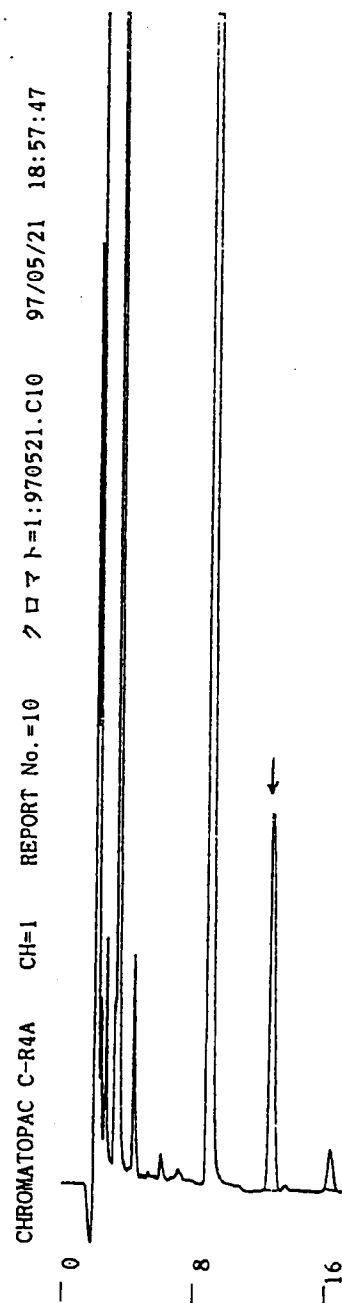
(3) Solvent Control; Day 7

(4) 2.2mg/L nominal; Day 7



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	16.332	5620	247			100	
TOTAL			5620	247			100	



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.784	44921	2596			87.0333	
	2	16.371	6693	285			12.9667	
TOTAL			51614	2881			100	

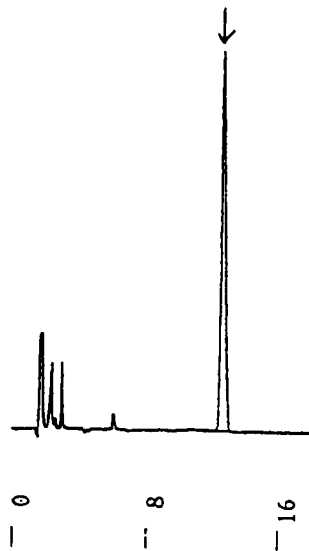
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(5) Standard 10.14 mg/L

(6) Control; Day 9

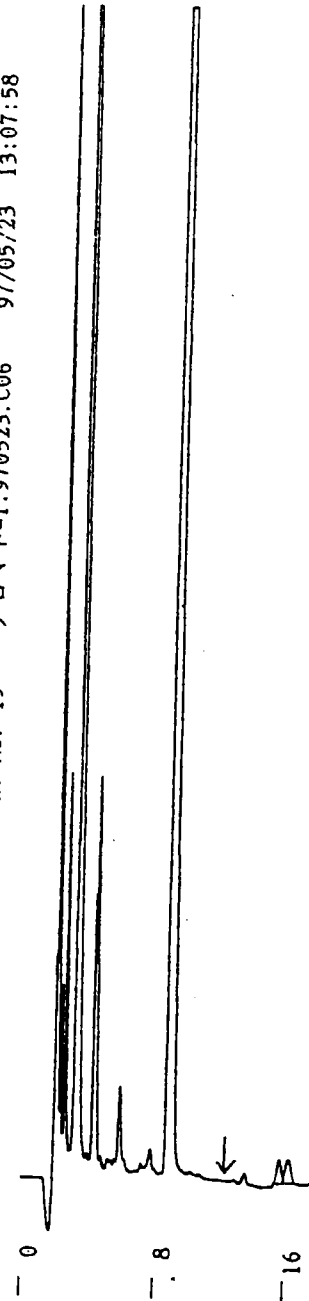
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=17 クロマト=1:970523.C04 97/05/23 12:27:03



## \*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.713	44951	2616			100	
TOTAL			44951	2616			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=19 クロマト=1:970523.C06 97/05/23 13:07:58



## \*\* 定量計算結果 \*\*

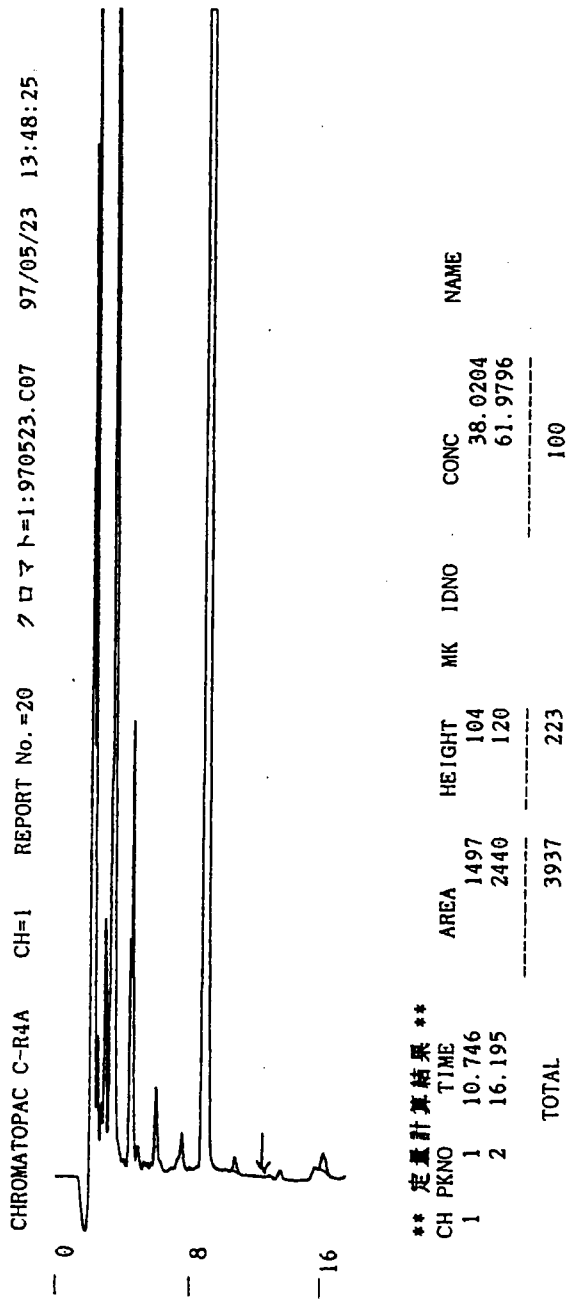
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	15.714	3322	170			46.6581	
	2	16.286	3798	167	V		53.3419	
TOTAL			3	338			100	



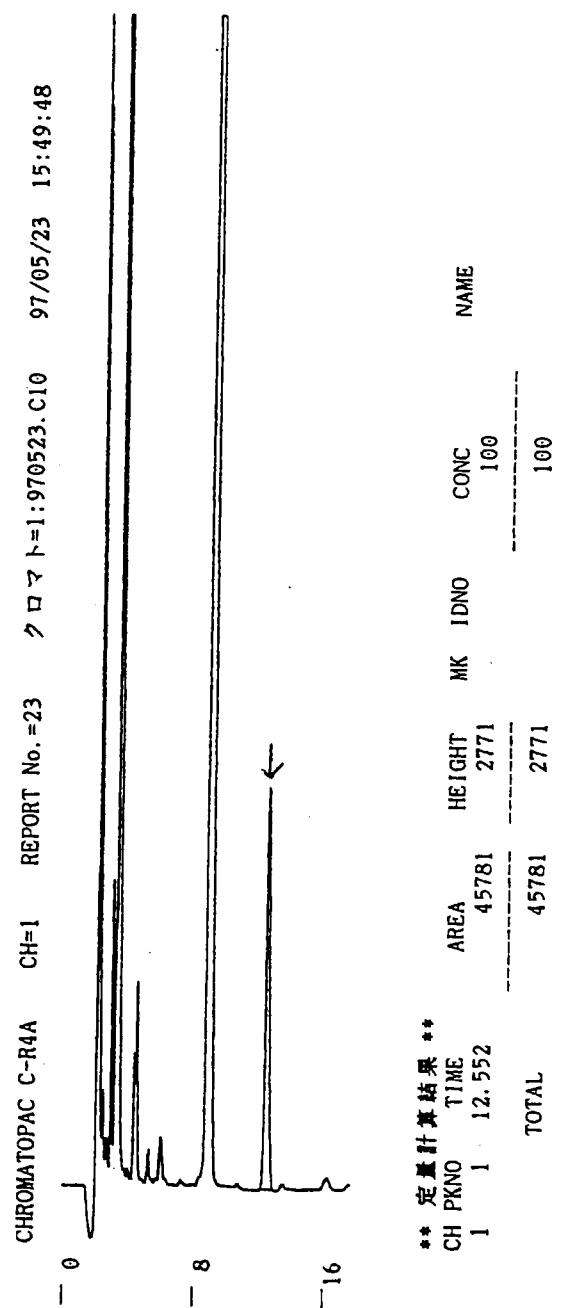
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(7) Solvent Control; Day 9



(8) 2.2mg/L nominal; Day 9



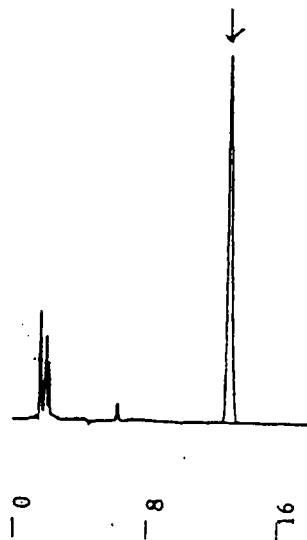
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(9) Standard 9.963 mg/L

(10) Control; Day 19

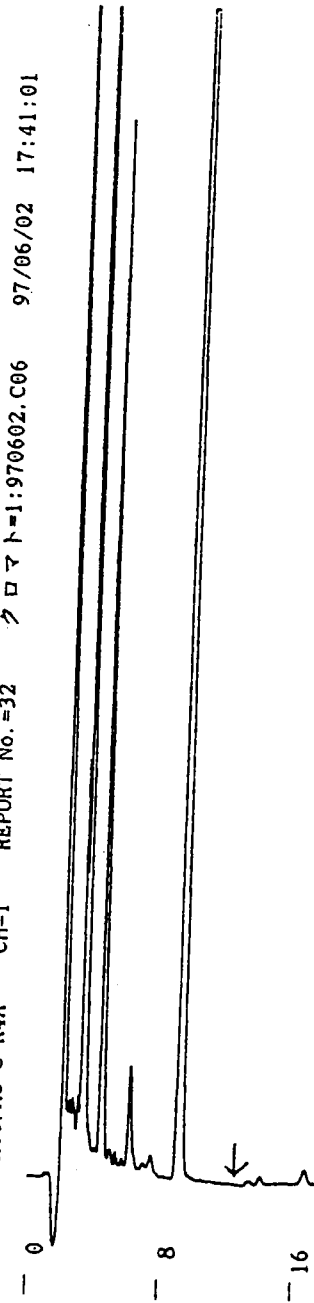
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=30 クロマト=1:970602.C04 97/06/02 17:00:06



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	13.096	44533	2527			100	
TOTAL			44533	2527			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=32 クロマト=1:970602.C06 97/06/02 17:41:01



\*\* 定量計算結果 \*\* 注意 1)-有 CALERROR: 1

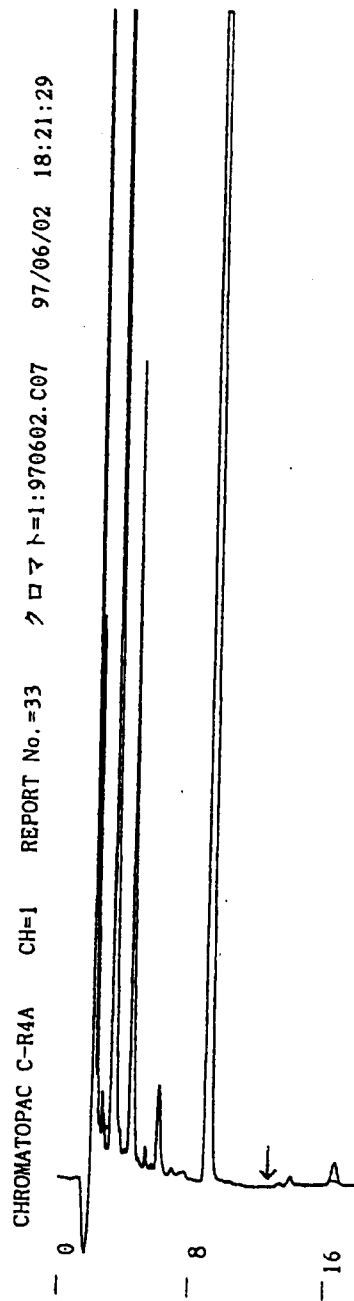
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

## Appendix 2

Figure 2 Continued

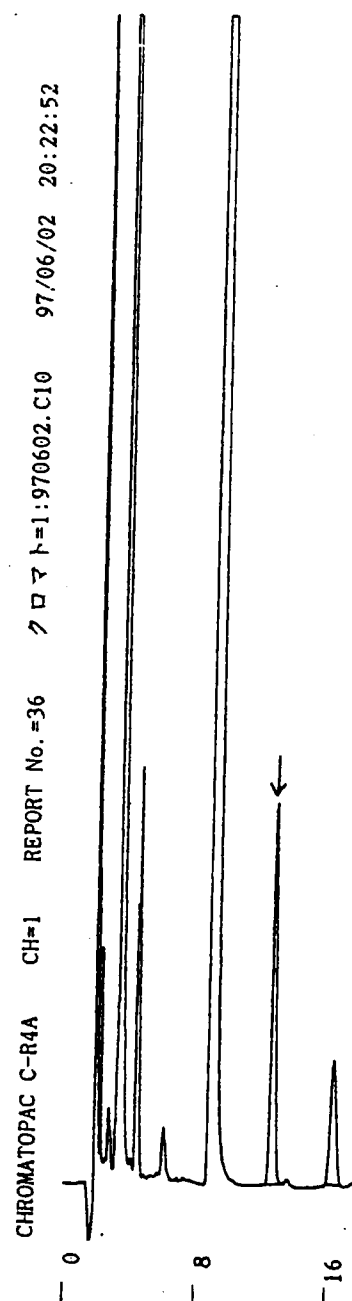
(11) Solvent Control; Day 19

(12) 2.2mg/L nominal; Day 19



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	16.63	2846	139			100	
TOTAL			2846	139			100	



\*\* 定量計算結果 \*\*

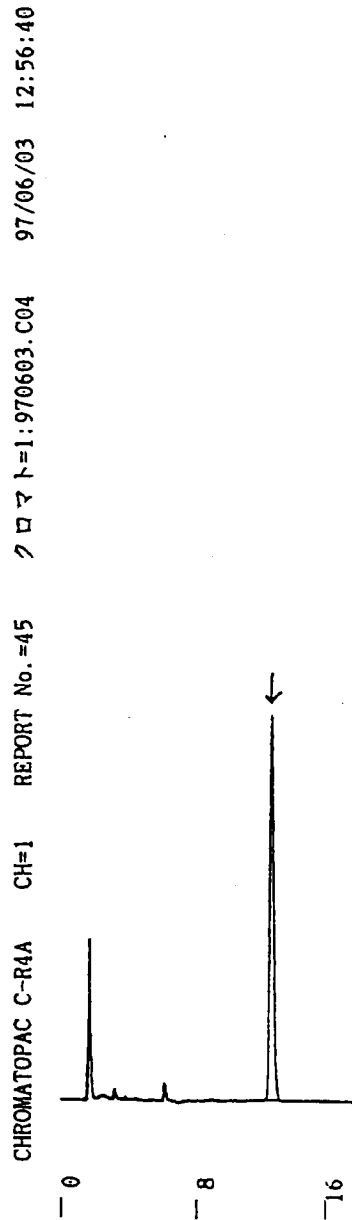
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.808	4446	2615			67.9982	
2	2	16.452	20918	859			32.0018	
TOTAL			65364	3474			100	

## Appendix 2

Figure 2 Continued

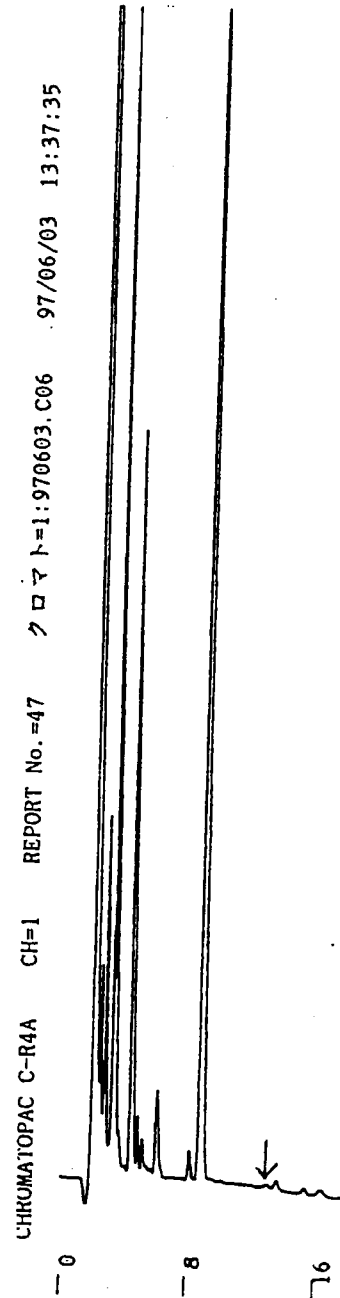
(13) Standard 9.963 mg/L

(14) Control; Day 20



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.649	45216	2645			100	
TOTAL			45216	2645			100	



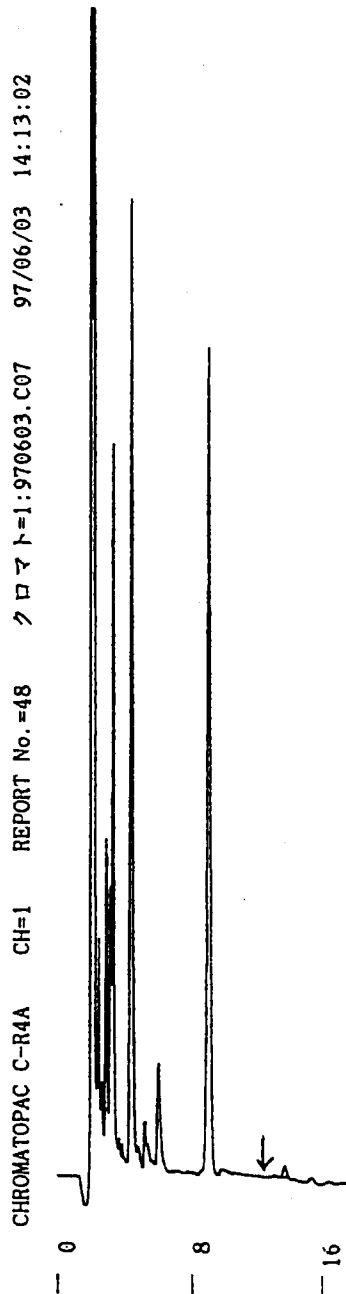
\*\* 定量計算結果 \*\* 注意 13-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
			0	0			0	
TOTAL			0	0			0	

## Appendix 2

Figure 2 Continued

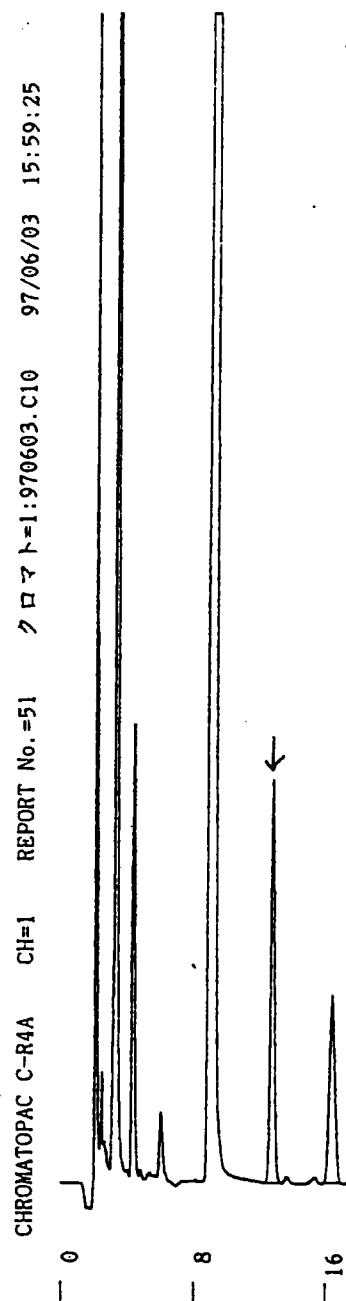
(15) Solvent Control; Day 20



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	13.721	1163	80			100	
TOTAL			1163	80			100	

(16) 2.2mg/L nominal; Day 20



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.823	46191	2774			59.3391	
	2	16.444	31651	1295			40.6609	
TOTAL			77842	4069			100	

付属資料－ 3

ミジンコの観察結果  
(全7頁)

Appendix 3-1 Result of reproduction test

(Test conc. : 0 mg/L, Dispersant conc. : 0 mg/L)

Test conc. : Nominal concentration

			Test conc. : 0 mg/L, Dispersant conc. : 0 mg/L)										Test conc. : Nominal concentration													
No.	Counts		Time (days)																							
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									23	128	9	23	78	1	130	19	25	64	8	18	11	103	0	640
		Dead									4	5	2	2	9	2	2	159	8	17	133	7	3	8	5	366
		Total									27	133	11	25	87	3	132	178	33	81	141	25	14	111	5	1006
	Reproductivity/P										2.3	12.8	0.9	2.3	7.8	0.1	13.0	1.9	2.5	6.4	0.8	1.8	1.1	10.3	0.0	64.0
Cumulative reproductivity										2.3	15.1	16.0	18.3	26.1	26.2	39.2	41.1	43.6	50.0	50.8	52.6	53.7	64.0	64.0	—	
B	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									56	47	87	28	77	166	47	35	107	38	0	95	30	17	14	844
		Dead									2	6	5	3	2	29	0	58	48	32	85	17	19	44	11	361
		Total									58	53	92	31	79	195	47	93	155	70	85	112	49	61	25	1205
	Reproductivity/P										5.6	4.7	8.7	2.8	7.7	16.6	4.7	3.5	10.7	3.8	0.0	9.5	3.0	1.7	1.4	84.4
Cumulative reproductivity										5.6	10.3	19.0	21.8	29.5	46.1	50.8	54.3	65.0	68.8	68.8	78.3	81.3	83.0	84.4	—	
C	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									89	44	2	121	75	49	158	22	27	21	0	0	35	4	0	647
		Dead									4	2	1	8	0	0	49	23	7	80	59	3	44	64	0	344
		Total									93	46	3	129	75	49	207	45	34	101	59	3	79	68	0	991
	Reproductivity/P										8.9	4.4	0.2	12.1	7.5	4.9	15.8	2.2	2.7	2.1	0.0	0.0	3.5	0.4	0.0	64.7
Cumulative reproductivity										8.9	13.3	13.5	25.6	33.1	38.0	53.8	56.0	58.7	60.8	60.8	60.8	64.3	64.7	64.7	—	
D	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									98	23	45	124	32	92	94	0	109	13	0	48	48	6	0	732
		Dead									9	2	3	11	0	8	35	31	57	138	24	7	104	19	0	448
		Total									107	25	48	135	32	100	129	31	166	151	24	55	152	25	0	1180
	Reproductivity/P										9.8	2.3	4.5	12.4	3.2	9.2	9.4	0.0	10.9	1.3	0.0	4.8	4.8	0.6	0.0	73.2
Cumulative reproductivity										9.8	12.1	16.6	29.0	32.2	41.4	50.8	50.8	61.7	63.0	63.0	67.8	72.6	73.2	73.2	—	
A-D Mean	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
	Mortality (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
	Cumulative reproductivity										6.7	12.7	16.3	23.7	30.2	37.9	48.7	50.6	57.3	60.7	60.9	64.9	68.0	71.2	71.6	—
The time (days) to first brood:			A: 7 days					B: 7 days					C: 7 days					D: 7 days								

Appendix 3-2 Result of reproduction test

(Test conc.: 0 mg/L, Dispersant conc.: 100 mg/L)

		Time(days)																							
No.	Counts	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								87	60	87	69	94	175	184	69	132	92	23	100	7	0	20	1199
		Dead								12	3	3	0	0	0	4	20	50	28	43	46	25	23	38	295
		Total								99	63	90	69	94	175	188	89	182	120	66	146	32	23	58	1494
		Reproductivity/P								8.7	6.0	8.7	6.9	9.4	17.5	18.4	6.9	13.2	9.2	2.3	10.0	0.7	0.0	2.0	119.9
	Cumulative reproductivity								8.7	14.7	23.4	30.3	39.7	57.2	75.6	82.5	95.7	104.9	107.2	117.2	117.9	117.9	119.9	—	
B	P generation	Live	10	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	0	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live								67	58	4	154	84	42	334	34	91	170	0	38	9	0	0	1085
		Dead								11	0	0	2	0	1	7	22	4	134	39	14	150	20	0	404
		Total								78	58	4	156	84	43	341	56	95	304	39	52	159	20	0	1489
		Reproductivity/P								6.7	5.8	0.4	15.4	8.4	4.2	33.4	3.4	9.1	17.0	0.0	4.0	1.0	0.0	0.0	108.8
	Cumulative reproductivity								6.7	12.5	12.9	28.3	36.7	40.9	74.3	77.7	86.8	103.8	103.8	107.8	108.8	108.8	108.8	—	
C	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								67	53	34	112	80	72	163	51	62	43	0	0	4	0	0	731
		Dead								10	0	0	4	1	2	46	64	28	88	96	29	132	27	0	527
		Total								77	53	34	116	81	74	209	115	80	131	96	29	136	27	0	1258
		Reproductivity/P								6.7	5.3	3.4	11.2	8.0	7.2	16.3	5.1	5.2	4.3	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	73.1
	Cumulative reproductivity								6.7	12.0	15.4	26.6	34.6	41.8	58.1	63.2	68.4	72.7	72.7	72.7	73.1	73.1	73.1	—	
D	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								67	74	4	165	75	44	323	43	31	126	0	7	12	0	0	971
		Dead								16	0	0	4	0	3	17	20	11	177	32	8	113	38	0	439
		Total								83	74	4	169	75	47	340	63	42	303	32	15	125	38	0	1410
		Reproductivity/P								6.7	7.4	0.4	16.5	7.5	4.4	32.3	4.3	3.1	12.6	0.0	0.7	1.2	0.0	0.0	97.1
	Cumulative reproductivity								6.7	14.1	14.5	31.0	38.5	42.9	75.2	79.5	82.6	95.2	95.2	95.9	97.1	97.1	97.1	—	
A-D Mean	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	—	
	Mortality(%)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.5	2.5	2.5	—	
	Cumulative reproductivity								7.2	13.3	16.6	29.1	37.4	45.7	70.8	75.7	83.4	94.2	94.7	98.4	99.2	99.2	99.7	—	
	The time (days) to first brood:								A: 7 days				B: 7 days				C: 7 days				D: 7 days				



Appendix 3-3 Result of reproduction test

(Test conc. : 0.46 mg/L, Dispersant conc. : 4.6 mg/L)

(Test conc. : 0.46 mg/L, Dispersant conc. : 4.6 mg/L)			Time(days)																							
No.	Counts		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									28	55	80	126	51	210	160	15	132	62	0	56	4	0	18	997
		Dead									12	6	0	2	0	1	2	0	97	72	20	71	75	17	6	381
		Total									40	61	80	128	51	211	162	15	229	134	20	127	79	17	24	1378
	Reproductivity/P										2.8	5.5	8.0	12.6	5.1	21.0	16.0	1.5	13.2	6.2	0.0	5.6	0.4	0.0	1.8	99.7
B	Cumulative reproductivity										2.8	8.3	16.3	28.9	34.0	55.0	71.0	72.5	85.7	91.9	91.9	97.5	97.9	97.9	99.7	—
	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									53	40	57	87	58	166	204	26	105	23	0	45	0	0	0	864
		Dead									18	2	0	0	0	0	5	23	66	89	15	36	84	20	21	379
		Total									71	42	57	87	58	166	209	49	171	112	15	81	84	20	21	1243
Reproductivity/P										5.3	4.0	5.7	8.7	5.8	16.6	20.4	2.6	10.5	2.3	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	86.4	
C	Cumulative reproductivity										5.3	9.3	15.0	23.7	29.5	46.1	66.5	69.1	79.6	81.9	81.9	86.4	86.4	86.4	86.4	—
	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									26	69	70	97	101	89	253	19	79	71	0	10	3	2	0	889
		Dead									11	9	1	0	0	2	0	29	55	126	39	16	54	48	13	403
		Total									37	78	71	97	101	91	253	48	134	197	39	26	57	50	13	1292
Reproductivity/P										2.6	6.9	7.0	9.7	10.1	8.9	25.3	1.9	7.9	7.1	0.0	1.0	0.3	0.2	0.0	88.9	
D	Cumulative reproductivity										2.6	9.5	16.5	26.2	36.3	45.2	70.5	72.4	80.3	87.4	87.4	88.4	88.7	88.9	88.9	—
	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									95	37	41	136	55	126	252	43	48	38	0	1	6	0	0	878
		Dead									4	0	0	3	0	3	11	7	73	131	24	61	75	25	0	417
		Total									99	37	41	139	55	129	263	50	121	169	24	62	81	25	0	1295
Reproductivity/P										9.5	3.7	4.1	13.6	5.5	12.6	25.2	4.3	4.8	3.8	0.0	0.1	0.6	0.0	0.0	87.8	
A-D Mean	Cumulative reproductivity										9.5	13.2	17.3	30.9	36.4	49.0	74.2	78.5	83.3	87.1	87.1	87.2	87.8	87.8	87.8	—
	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
		Mortality(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
Cumulative reproductivity											5.1	10.1	16.3	27.4	34.1	48.8	70.6	73.1	82.2	87.1	87.1	89.9	90.2	90.3	90.7	—
The time (days) to first brood:			A: 7 days							B: 7 days							C: 7 days							D: 7 days		

Appendix 3-4 Result of reproduction test

(Test conc. : 1.0 mg/L, Dispersant conc. :10 mg/L)

		Time(days)																							
No.	Counts	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	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	0		
	F1 generation	Live								73	38	66	81	70	128	237	18	40	38	0	48	11	0	5	853
		Dead								5	25	0	0	0	9	2	1	67	131	15	37	40	36	11	379
		Total								78	63	66	81	70	137	239	19	107	169	15	85	51	36	16	1232
		Reproductivity/P								7.3	3.8	6.6	8.1	7.0	12.8	23.7	1.8	4.0	3.8	0.0	4.8	1.1	0.0	0.5	85.3
		Cumulative reproductivity								7.3	11.1	17.7	25.8	32.8	45.6	69.3	71.1	75.1	78.9	78.9	83.7	84.8	84.8	85.3	—
B	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								38	85	33	135	41	86	229	37	63	128	0	0	6	0	11	892
		Dead								4	14	6	0	0	7	18	9	33	99	51	25	50	28	1	345
		Total								42	99	39	135	41	93	247	46	96	227	51	25	56	28	12	1237
		Reproductivity/P								3.8	8.5	3.3	13.5	4.1	8.6	22.9	3.7	6.3	12.8	0.0	0.0	0.6	0.0	1.1	89.2
		Cumulative reproductivity								3.8	12.3	15.6	29.1	33.2	41.8	64.7	68.4	74.7	87.5	87.5	87.5	88.1	88.1	89.2	—
C	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								72	43	19	125	62	89	234	37	69	43	0	43	4	0	0	840
		Dead								13	17	5	0	0	4	3	9	47	145	23	41	81	21	4	413
		Total								85	60	24	125	62	93	237	46	116	188	23	84	85	21	4	1253
		Reproductivity/P								7.2	4.3	1.9	12.5	6.2	8.9	23.4	3.7	6.9	4.3	0.0	4.3	0.4	0.0	0.0	84.0
		Cumulative reproductivity								7.2	11.5	13.4	25.9	32.1	41.0	64.4	68.1	75.0	79.3	79.3	83.6	84.0	84.0	84.0	—
D	P generation	Live	10	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	0	—	
	F1 generation	Live								31	81	23	87	104	50	219	69	58	154	0	1	0	0	16	893
		Dead								3	26	2	0	0	4	14	22	32	81	54	25	11	18	2	294
		Total								34	107	25	87	104	54	233	91	90	235	54	26	11	18	18	1187
		Reproductivity/P								3.1	8.1	2.3	8.7	10.4	5.0	21.9	6.9	5.8	15.4	0.0	0.1	0.0	0.0	1.6	89.3
		Cumulative reproductivity								3.1	11.2	13.5	22.2	32.6	37.6	59.5	66.4	72.2	87.6	87.6	87.7	87.7	87.7	89.3	—
A-D	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
Mean	Mortality(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
Cumulative reproductivity										5.4	11.5	15.1	25.8	32.7	41.5	64.5	68.5	74.3	83.3	83.3	85.6	86.2	86.2	87.0	—
The time (days) to first brood:			A: 7 days				B: 7 days				C: 7 days				D: 7 days										

Appendix 3-5 Result of reproduction test

(Test conc. : 2.2 mg/L, Dispersant conc. : 22 mg/L)

(Test conc. : 2.2 mg/L,			Dispersant conc. : 22 mg/L)																							
			Time(days)																							
No.	Counts		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									29	96	16	35	162	39	139	69	52	176	16	2	0	5	0	836
		Dead									2	28	2	0	2	4	20	117	21	15	109	25	34	39	10	428
		Total									31	124	18	35	164	43	159	186	73	191	125	27	34	44	10	1264
	Reproductivity/P										2.9	9.6	1.6	3.5	16.2	3.9	13.9	6.9	5.2	17.6	1.6	0.2	0.0	0.5	0.0	83.6
	Cumulative reproductivity										2.9	12.5	14.1	17.6	33.8	37.7	51.6	58.5	63.7	81.3	82.9	83.1	83.1	83.6	83.6	—
B	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									19	96	21	65	143	33	109	125	18	121	47	1	0	0	0	798
		Dead									0	19	0	2	8	12	9	95	36	24	96	1	23	31	3	359
		Total									19	115	21	67	151	45	118	220	54	145	143	2	23	31	3	1157
	Reproductivity/P										1.9	9.6	2.1	6.5	14.3	3.3	10.9	12.5	1.8	12.1	4.7	0.1	0.0	0.0	0.0	79.8
	Cumulative reproductivity										1.9	11.5	13.6	20.1	34.4	37.7	48.6	61.1	62.9	75.0	79.7	79.8	79.8	79.8	79.8	—
C	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									52	81	52	63	92	109	83	54	143	42	0	9	0	19	0	799
		Dead									2	6	7	0	11	19	14	94	67	22	92	30	26	11	0	401
		Total									54	87	59	63	103	128	97	148	210	64	92	39	26	30	0	1200
	Reproductivity/P										5.2	8.1	5.2	6.3	9.2	10.9	8.3	5.4	14.3	4.2	0.0	0.9	0.0	1.9	0.0	79.9
	Cumulative reproductivity										5.2	13.3	18.5	24.8	34.0	44.9	53.2	58.6	72.9	77.1	77.1	78.0	78.0	79.9	79.9	—
D	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	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	1	1	—	
	F1 generation	Live									32	99	0	73	182	0	144	190	32	148	61	0	27	0	0	988
		Dead									11	11	0	1	6	0	21	70	2	54	86	1	5	7	0	275
		Total									43	110	0	74	188	0	165	260	34	202	147	1	32	7	0	1263
	Reproductivity/P										3.2	9.9	0.0	7.3	18.2	0.0	14.4	19.0	3.2	15.6	6.8	0.0	3.0	0.0	0.0	100.6
	Cumulative reproductivity										3.2	13.1	13.1	20.4	38.6	38.6	53.0	72.0	75.2	90.8	97.6	97.6	100.6	100.6	100.6	—
A-D Mean	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	—	
	Mortality(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	—	
	Cumulative reproductivity										3.3	12.6	14.8	20.7	35.2	39.7	51.6	62.6	68.7	81.1	84.3	84.6	85.4	86.0	86.0	—

The time (days) to first brood:

A: 7 days

B: 7 days

C: 7 days

D: 7 days

Appendix 3-6 Result of reproduction test

(Test conc. : 4.6 mg/L, Dispersant conc. : 46 mg/L)

				Time(days)																						
No.	Counts		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									47	53	31	0	115	62	39	115	54	105	57	8	0	0	1	687
		Dead									7	41	3	0	32	36	8	80	60	14	85	43	8	14	4	435
	Total										54	94	34	0	147	98	47	195	114	119	142	51	8	14	5	1122
	Reproductivity/P										4.7	5.3	3.1	0.0	11.5	6.2	3.9	11.5	5.4	10.5	5.7	0.8	0.0	0.0	0.1	68.7
Cumulative reproductivity										4.7	10.0	13.1	13.1	24.6	30.8	34.7	46.2	51.6	62.1	67.8	68.6	68.6	68.6	68.7	—	
B	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									56	50	23	117	62	96	99	59	51	94	28	16	0	0	0	751
		Dead									3	34	2	9	18	29	34	64	78	55	64	29	21	10	13	463
	Total										59	84	25	126	80	125	133	123	129	149	92	45	21	10	13	1214
	Reproductivity/P										5.6	5.0	2.3	11.7	6.2	9.6	9.9	5.9	5.1	9.4	2.8	1.6	0.0	0.0	0.0	75.1
Cumulative reproductivity										5.6	10.6	12.9	24.6	30.8	40.4	50.3	56.2	61.3	70.7	73.5	75.1	75.1	75.1	75.1	—	
C	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									53	34	31	77	76	45	116	79	27	106	26	2	9	4	0	685
		Dead									9	28	6	4	2	41	47	47	66	68	78	11	37	14	0	458
	Total										62	62	37	81	78	86	163	126	93	174	104	13	46	18	0	1143
	Reproductivity/P										5.3	3.4	3.1	7.7	7.6	4.5	11.6	7.9	2.7	10.6	2.6	0.2	0.9	0.4	0.0	68.5
Cumulative reproductivity										5.3	8.7	11.8	19.5	27.1	31.6	43.2	51.1	53.8	64.4	67.0	67.2	68.1	68.5	68.5	—	
D	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									82	45	115	48	54	162	65	55	132	59	20	0	1	4	1	843
		Dead									20	0	1	6	7	66	30	30	127	46	44	53	47	5	6	488
	Total										102	45	116	54	61	228	95	85	259	105	64	53	48	9	7	1331
	Reproductivity/P										8.2	4.5	11.5	4.8	5.4	16.2	6.5	5.5	13.2	5.9	2.0	0.0	0.1	0.4	0.1	84.3
Cumulative reproductivity										8.2	12.7	24.2	29.0	34.4	50.6	57.1	62.6	75.8	81.7	83.7	83.7	83.8	84.2	84.3	—	
A-D Mean	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
	Mortality(%)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
	Cumulative reproductivity										6.0	10.5	15.5	21.6	29.2	38.4	46.3	54.0	60.6	69.7	73.0	73.7	73.9	74.1	74.2	—
The time (days) to first brood:							A: 7 days				B: 7 days				C: 7 days				D: 7 days							

Appendix 3-7 Result of reproduction test

(Test conc. : 10 mg/L, Dispersant conc. : 100 mg/L)

			(Test conc. : 10 mg/L, Dispersant conc. : 100 mg/L)										Time (days)													
No.	Counts		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
A	P generation	Live	10	10	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	0	0	1	1	1	—	
	F1 generation	Live									27	65	20	37	72	31	55	39	0	41	9	0	0	0	0	396
		Dead									4	27	0	14	43	46	54	81	0	48	22	1	12	0	0	352
		Total									31	92	20	51	115	77	109	120	0	89	31	1	12	0	0	748
	Reproductivity/P										2.7	6.5	2.0	3.7	7.2	3.1	5.5	3.9	0.0	4.1	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	39.6
	Cumulative reproductivity										2.7	9.2	11.2	14.9	22.1	25.2	30.7	34.6	34.6	38.7	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	—
B	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									24	35	4	68	49	24	42	37	27	2	3	6	0	0	0	321
		Dead									24	46	0	29	35	18	113	107	27	64	21	10	5	3	8	510
		Total									48	81	4	97	84	42	155	144	54	66	24	16	5	3	8	831
	Reproductivity/P										2.4	3.5	0.4	6.8	4.9	2.4	4.2	3.7	2.7	0.2	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0	32.1
	Cumulative reproductivity										2.4	5.9	6.3	13.1	18.0	20.4	24.6	28.3	31.0	31.2	31.5	32.1	32.1	32.1	32.1	—
C	P generation	Live	10	10	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	0	0	—	
	F1 generation	Live									50	53	36	54	51	21	28	44	7	8	0	0	0	0	0	352
		Dead									22	27	4	8	32	79	63	49	30	88	11	0	3	0	7	423
		Total									72	80	40	62	83	100	91	93	37	96	11	0	3	0	7	775
	Reproductivity/P										5.0	5.3	3.6	5.4	5.1	2.1	2.8	4.4	0.7	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35.2
	Cumulative reproductivity										5.0	10.3	13.9	19.3	24.4	26.5	29.3	33.7	34.4	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	—
D	P generation	Live	10	10	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	0	0	1	—	
	F1 generation	Live									15	33	37	34	26	59	36	34	16	29	2	0	0	0	0	321
		Dead									30	34	2	11	34	77	85	65	12	175	18	3	6	0	0	552
		Total									45	67	39	45	60	136	121	99	28	204	20	3	6	0	0	873
	Reproductivity/P										1.5	3.3	3.7	3.4	2.6	5.9	3.6	3.4	1.6	2.9	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	32.1
	Cumulative reproductivity										1.5	4.8	8.5	11.9	14.5	20.4	24.0	27.4	29.0	31.9	32.1	32.1	32.1	32.1	32.1	—
A-D Mean	P generation	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	—		
	Mortality (%)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.5	5	—		
	Cumulative reproductivity									2.9	7.6	10.0	14.8	19.8	23.1	27.2	31.0	32.3	34.3	34.6	34.8	34.8	34.8	34.8	—	
The time (days) to first brood:			A: 7 days					B: 7 days					C: 7 days					D: 7 days								

付属資料－ 4

餌料の有機炭素含量測定  
(全5頁)

# 報 告 書

藻類懸濁液中の全有機炭素量測定  
(試験番号6001)

広栄テクノサービス株式会社

## 信頼性保証報告書

試験の種類

藻類懸濁液中の全有機炭素量測定

試験No. 6001

本試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」（昭和63年11月18日環企研第233号、衛生第38号及び63基局第823号）に従って適正に行われており、報告書には、試験で使用方法および手順が正確に記載され、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保証する。

## 記

監査・査察の対象

監査・査察実施日

報告日

試験実施日

平成8年11月21日

平成8年11月21日

報告書監査

平成8年11月27日

平成8年11月27日

平成 8年11月28日

信頼性保証業務担当者

所属 広栄テクノサービス株式会社 大阪事業所

職 副事業所長

氏名





試験No.6001

表題：藻類懸濁液の全有機炭素量測定

試験期間

自：平成 8 年 11 月 19 日

至：平成 8 年 11 月 27 日

測定実施日

平成 8 年 11 月 21 日

試験機関の名称と所在地

広栄テクノサービス株式会社 大阪事業所  
大阪市城東区放出西2丁目12-13

運営管理者氏名

[REDACTED]

[REDACTED]

平成 8 年 11 月 27 日

試験責任者氏名

[REDACTED]

[REDACTED]

平成 8 年 11 月 27 日

試験担当者氏名

[REDACTED]

[REDACTED]

平成 8 年 11 月 27 日

報告書作成者名

[REDACTED]

[REDACTED]

最終報告書作成年月日

平成 8 年 11 月 27 日

KOEI TECHNO SERVICE

## 1. 測定試料

Chlorella vulgaris 1%懸濁液 (生クロレラ V12) Lot.Y-961119

## 2. 試料の前処理

- ①測定試料5mlを100mlのメスフラスコにオートペットで取り、超純水<sup>\*1</sup>でメスアップした。  
 ②測定試料8mlを100mlのメスフラスコにオートペットで取り、超純水<sup>\*1</sup>でメスアップした。

<sup>\*1</sup> 当GLP試験施設において管理している超純水  
 : MILLI-Q (ミリポア製超純水製造装置) による自製

## &lt;標準液の調製&gt;

TC標準液: 7%硫酸水素ナトリウム0.085gを正確にはかり採り、超純水で100mlにメスアップする。これを更に4倍希釈したものを標準液とした。

IC標準液: 炭酸水素ナトリウム0.14g、炭酸ナトリウム0.177gを正確にはかり採り、超純水で100mlにメスアップする。これを更に4倍希釈したものを標準液とした。

## 3. 全有機炭素 (TOC) 分析測定結果

試 料	TC 濃度 (mg/l)	IC 濃度 (mg/l)	TOC 濃度 (mg/l)
TC標準液	100.3	—	—
IC標準液	—	100.5	—
①Chlorella vulgaris 1%懸濁液 (20倍希釈)	52.6	0.0	52.6
②Chlorella vulgaris 1%懸濁液 (12.5倍希釈)	83.8	0.0	83.8

Chlorella vulgaris 1%懸濁液の全有機炭素濃度: ①  $52.6 \times 20 = 1052$  (mg/l)  
 ②  $83.8 \times 12.5 = 1048$  (mg/l)  
 平均: 1050 (mg/l)

## 4. 全有機炭素量測定条件

装 置: TOC分析装置 TOC-500 (島津製作所製)  
 range:  $\times 10$   
 注 入 量: 30  $\mu$ l  
 触 媒: TC触媒  
 キャリガス: 空気  
 流 速: 150ml/min

## 5. データの解析に使用する統計学的方法

TOCのデータ処理は、分析計に付属するデータ処理装置で行った。  
 TOCの濃度 (mg/l) は、小数以下1桁に丸めて表示した。  
 数値を平均する場合は、算術平均とした。  
 数値の丸め方は、JIS Z 8401-1961による。

## 6. 添付資料

全有機炭素測定データ (生データ写し)

## 7. 資料の保管

当該試験に関する記録及び資料は 広栄テクノサービス (株) が保有する試資料保管室に保管する。

MEAN 000000

CAL.FACTOR

A	100.0
B	49.88

TOC-500 ANAL-CONDIT.

DATE 96.11.21

RANGE X10

FLOW 15X10ML/MIN

INJ-VOL 030MICRO.L

MEMO

T O C 分析 Lot.Y-961119

Chlorella vulgaris 懸濁液 (1%)

試験 No. 6001

試験責任者

STD-HI 100.3

TC 01 020077

TC 02 020149

TC 03 020155

MEAN 020127

CAL.FACTOR

A	100.0
B	49.83

STD-LO 0.0

TC 01 000000

TC 02 000000

TC 03 000000

MEAN 000000

CAL.FACTOR

A	100.0
B	49.83

STD-HI 100.5

IC 01 020097

IC 02 020134

IC 03 020221

MEAN 020151

CAL.FACTOR

A	100.0
B	49.88

STD-LO 0.0

IC 01 000000

IC 02 000000

IC 03 000000

MEAN 000000

CAL.FACTOR

A	100.0
B	49.88

Chlorella vulgaris 懸濁液 (1%)

SMPL01 (20倍希釈)

TC 01 010489 52.3

TC 02 010660 53.1

TC 03 010501 52.3

MEAN 010550 52.6

Chlorella vulgaris 懸濁液 (1%)

SMPL01 (20倍希釈)

IC 01 000000 0.0

IC 02 000000 0.0

IC 03 000000 0.0

MEAN 000000 0.0

Chlorella vulgaris 懸濁液 (1%)

SMPL02 (12.5倍希釈)

TC 01 016814 83.8

TC 02 016871 84.1

TC 03 016779 83.6

MEAN 016821 83.8

Chlorella vulgaris 懸濁液 (1%)

SMPL02 (12.5倍希釈)

IC 01 000000 0.0

IC 02 000000 0.0

IC 03 000000 0.0

MEAN 000000 0.0

NO	TC	IC	TOC
01	52.6	0.0	52.6
02	83.8	0.0	83.8

NO VOC

END