

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルヒドラジド）の
藻類（*Selenastrum capricornutum*）に対する生長阻害試験

（試験番号：A020358-1）

2004年 2月27日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシピス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の藻類
(*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A020358-1

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2004年 2月27日

試験責任者

■■■■■

■■■■■

信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシピス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の藻類
(*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A020358-1

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

記

実 施 事 項		実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		2003年 1月17日	2003年 1月17日
試験の査察	試験液の調製	2003年 3月11日	2003年 3月11日
	藻類の投入	2003年 3月11日	2003年 3月11日
	藻類の観察	2003年 3月14日	2003年 3月14日
最終報告書監査		2004年 2月27日	2004年 2月27日

2004年 2月27日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
(試験番号: A020358-1)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を 72 時間行い, 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984 年)
4. 適用 GLP : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [redacted]

生態科学研究部

(2003年 9月 1日付, グループ再編により名称変更)

9. 試験担当者 : [redacted]

[redacted] 2004年 2月27日

(試験実施, 分析実施)

[redacted]

[redacted] 2004年 2月27日

(報告書作成)

10. 試験日程 : 試験開始日 2003年 1月17日
実験開始日 2003年 3月11日
実験終了日 2003年 3月14日
試験終了日 2004年 2月27日

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

目 次

	頁
要 約	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	11
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液および試験培養液の分析	13
3.7 試験操作	14
4 結果の算出	15
4.1 生長曲線	15
4.2 生長阻害率の算出	15
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	16
4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出	16
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	17
5 結果および考察	18
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	18
5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	18
5.3 生長曲線	18
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)	19
5.5 温度およびpH	19
5.6 計画書からの逸脱事項	19
Table 1～6	20～24
Figure 1～3	25～27
付属資料－1 OECD培地の組成	28～29
付属資料－2 試験液および試験培養液の分析	30～40
付属資料－3 結果の算出	41～47

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシビス(ベンゼンスルホニルヒドラジド)の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 2 0 3 5 8 - 1

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」
(1984年)
- 2) 暴 露 方 式 : 止水式(開放系), 連続振とう培養(100rpm)
- 3) 供 試 生 物 : *Selenastrum capricornutum* (株名: ATCC22662)
(現在 *Pseudokirchneriella subcapitata*と学名が変更されている。)
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 0.50, 0.82, 1.40, 2.20, 3.70, 6.10, 10.0 mg/L
(設定値) 公比: 1.6
助剤濃度一定: 100 μ L/L (ジメチルホルムアミド使用)
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL (OECD培地) / 容器
- 7) 連 数 : 3 容器 / 試験区
- 8) 初期細胞濃度 : 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 9) 試 験 温 度 : 23 ± 2 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 4000 lux ($\pm 20\%$ の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試 験 結 果 :

- 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 82~90 %, 暴露終了時の試験培養液において <1 (検出限界以下) ~1 %であった。濃度減少の主な原因は被験物質の分解と考えられた。阻害濃度の算出には開始時の測定値を用いた。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC_{50} (0-72h) : 3.45 mg/L (95%信頼区間 : 3.20~3.72 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECb$ (0-72h) : 0.70 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-48h) : >8.21 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

(推定濃度 : 34.1 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-48h) : 5.20 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72h) : >8.21 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

(推定濃度 : 71.8 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-72h) : 5.20 mg/L

4) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区において細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、対照区および助剤対照区との相違もなかった。

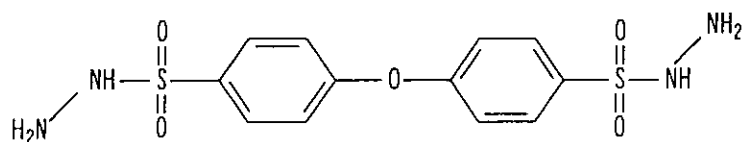
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 4, 4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) (略称 OB SH)

CAS No： 80-51-3

構造式：



分子式： $C_{12}H_{14}N_4O_5S_2$

分子量^{*1}： 358.4

分解温度^{*1}： 150～165℃ (自己反応性物質，白煙を発生して分解)

溶解度^{*1}： ジメチルスルホキシド；易溶， ケトン類；反応して溶解

水溶解度^{*1,*2}： 0.02g/100g (20℃) ^{*1}

25.7mg/L (精製水^{*3}， 20℃， 48時間攪拌， HPLC測定) ^{*2}

比重^{*1}： 1.525

*1： 供給者提供資料

*2： 当社測定値

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

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.3 wt%

[不純物： 4, 4'-オキシビス (ベンゼンスルホン酸) 及び 4, 4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルクロライド) を微量に含有する]

ロット番号^{*1}： 403650

供給者：

受領量^{*1}： 100 g

受領日： 2002年12月12日

外観： 白色微粉末

*1： 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

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

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

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ (単細胞緑藻類)
- 2) 学名： *Selenastrum capricornutum*
- 3) 株名： ATCC22662
- 4) 入手先： American Type Culture Collection
- 5) 入手日： 1996年6月20日
- 6) 入手後の管理： Gorham培地を用い無菌的に継代培養。定期的 (約6ヶ月) に細菌検査をし無菌性を確認。
- 7) 感受性の確認： 定期的 (約6ヶ月毎) に基準物質 (重クロム酸カリウム, 試薬特級) による生長阻害試験を行い, 供試生物の感受性を調べている。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度 (EbC50) は, 以下の通りである。
平均値 ± 標準偏差 = 0.433 ± 0.0802 mg/L, n=12
(最小値 ~ 最大値 = 0.285 ~ 0.543 mg/L)
- 8) 前培養： 前培養期間; 2003年3月7日~2003年3月11日
この間, 藻類は対数増殖した。(環境条件は試験と同様)

3 試験方法

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

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式 (開放系), 連続振とう培養 (100rpm)
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL (OECD培地, 3.2参照) / 容器
- 4) 連数： 3 容器 / 試験区
- 5) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 6) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 7) 照明： 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH： 試験液のpH調整なし

3.2 培地

前培養および試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地をろ過滅菌 (0.22 μm) 後用いた。組成表を付属資料-1に示した。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 300 mL容ガラス製三角フラスコ（IWAKI製）（通気性のシリコン栓付）
- 2) 藻類培養試験装置： 伊藤製作所製 AGP-150RL型
- 3) 光学顕微鏡： ニコン製 ECLIPSE TE300型
- 4) 粒子計数装置： シスメックス製 CDA-500型
- 5) 粒子計数装置用電解液： シスメックス製 セルパック
- 6) pH計： 東亜電波工業製 卓上pH計 HM-40V型 No. 2
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型

3.4 試験濃度の設定

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

本試験濃度：対照区、 助剤対照区、

0.50, 0.82, 1.40, 2.20, 3.70, 6.10, 10.0 mg/L（公比：1.6）

予備試験結果

（1回目）

濃度 (mg/L)	対照区 に対する 72時間後の 生長率 (%)	助剤対照区 に対する 72時間後の 生長率 (%)
対照区	100	--
助剤対照区	84	100
0.200 [0]*	85	101
2.00 [0]*	62	73
20.0 [1]* 変化物ピークあり	1	1
20.0** [1]* 変化物ピークあり	--	--
20.0** 密閉系 [1]* 変化物ピークあり	--	--
20.0** 室温・室内光放置 密閉 [1]* 変化物ピークあり	--	--

（2回目）

濃度 (mg/L)	対照区 に対する 72時間後の 生長率 (%)	助剤対照区 に対する 72時間後の 生長率 (%)
対照区	100	--
助剤対照区	96	100
0.500	95	99
0.800	82	86
1.00	79	82
5.00	34	36
10.0	3	3

* 72時間後の分析結果 [設定値に対する%]

** 藻体添加なし

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内または恒温室内で $23 \pm 2^\circ\text{C}$ にした。

以下の表の通りに、被験物質原液－１，被験物質原液－２および助剤原液を調製した。

		被験物質原液－１	被験物質原液－２	助剤原液
調製方法	被験物質 または 溶解助剤の 採取量	被験物質 1000 mg	被験物質 10.0 mg (被験物質原液－１ を 100 μL 採取)	溶解助剤 (ジメチルホルムアミド) 250 μL
	定容液	ジメチルホルムアミド	培地	培地
	定容量	10 mL	1000 mL	2500 mL
	溶解方法	手で振とう	スターラーで攪拌 15 分	スターラーで攪拌 15 分
	被験物質濃度	100000 mg/L	10.0 mg/L 助剤(ジメチルホルムアミド) 濃度：100 $\mu\text{L/L}$	0 mg/L 助剤(ジメチルホルムアミド) 濃度：100 $\mu\text{L/L}$
調製頻度		暴露開始時	暴露開始時	暴露開始時
保管条件等		保管せず	保管せず	保管せず

試験液は、これらの原液を用いて3.4に示した各試験濃度になるよう各試験容器に 100 mL 調製した。1 濃度区につき3個の試験容器を準備した。各試験容器に原液添加量分を差し引いた量の培地を入れ、被験物質原液－２を等比級数的に添加し、同時に全濃度区で助剤濃度が一定(100 $\mu\text{L/L}$)になるよう助剤原液を添加した。

対照区は培地のみとし、助剤対照区には助剤のみを含むもの(助剤濃度：100 $\mu\text{L/L}$)を調製した。

調製時の試験液の状態(外観)は全試験区において無色透明であった。

3.6 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時(0hr)には各試験区3個の試験容器より試験液を 2.0 mL ずつ採取して混合したもの进行分析試料とした。暴露終了時(72hr)には、各試験区3個の試験容器より試験培養液を 2.0 mL ずつ採取して混合し、藻類を遠心分離(3000rpm, 10分間)後の上澄み液进行分析試料とした。

各分析試料 0.75 mL にアセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。各試験液および各試験培養液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量した。詳細は付属資料－２に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を粒子計数装置（CDA-500）および血球計算盤と顕微鏡で直接計数し、細胞濃度が 1×10^4 cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置し試験を開始し、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験培養液 1.0 mL（72hr では 0.5 mL）を採取し、粒子計数装置用電解液（セルパック）9.0 mL（72hr では 9.5 mL）と混合した後、粒子計数装置（CDA-500）により計測した。

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

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液の pH を測定した。暴露開始時の pH は、各試験区 3 容器とは別に調製した予備 1 容器について測定し、暴露終了時の pH は、3 容器のうち 1 容器（Na 1）について測定した。ただし、10.0 mg/L の濃度区については最終細胞濃度が 2 倍以上異なったため、3 容器全てを測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも 1 日 1 回測定した。

4 結果の算出

4.1 生長曲線

各試験区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

4.2 生長阻害率の算出

下記の方法（面積法および速度法）で生長阻害率を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較（面積法）による生長阻害率（ I_A ）

生長曲線下の面積（A）は次の式により算出した。

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

ここで、

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで、

A_c : 対照区（助剤使用時は助剤対照区）の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

2) 生長速度の比較（速度法）による生長阻害率（ I_μ ）

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

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

ここで、

μ : 生長速度

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで,

μ_c : 対照区 (助剤使用時は助剤対照区) の平均生長速度

μ_i : 各濃度区における平均生長速度

4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定

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

4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出

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

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

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

Bartlettの等分散検定 ($\alpha=0.01$) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$) および Williams の多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行い、助剤対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とした。その際、面積法により求めた場合は NOEC_b (0-72h) , 速度法により求めた場合は NOEC_r (24-48h) または NOEC_r (24-72h) とした。

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

5 結果および考察

5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に、代表的なクロマトグラムを付属資料-2 に示した。

被験物質濃度分析 (3.6 参照) の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 82~90 %, 暴露終了時の試験培養液において 3.70 mg/L 以上の濃度区では 1 %, 2.20 mg/L 以下の濃度区では <1 % (検出限界以下) であった。

暴露終了時の濃度減少の主な原因は被験物質の分解と考えられ、クロマトグラム上に変化物ピークが出現した。3.4 に示した予備試験 1 回目の結果からも分解と判断され、72 時間後の被験物質濃度が設定値の 1 % で、クロマトグラム上に変化物ピークが出現した。これは、試験条件下に設置した藻類添加の試験培養液、藻類無添加の試験液 (開放系、密閉系) および室温・室内光条件下に放置した試験液 (密閉) と同じであった。

以下の結果、50 % 生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) の算出には開始時の測定値を用いた。

5.3 生長曲線

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

対照区および助剤対照区における細胞濃度は 72 時間の培養でそれぞれ平均 334 倍、323 倍増加し、試験条件 (開放系条件) 下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は濃度の増加とともに (用量依存的に) 減少する傾向がみられた。なお、10.0 mg/L の濃度区では 3 容器間の最高と最低で 2 倍以上細胞濃度が異なった。この相違は、阻害を受ける濃度範囲での生物反応のばらつきによるものと考えられた。

試験培養液の肉眼による色調観察の結果、全試験区で時間の経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。

また、暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区において細胞形態の変化 (収縮、膨張、破裂等) や細胞凝集は認められず、また、対照区および助剤対照区との相違もなかった。

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

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

1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 3.45 mg/L (95%信頼区間: 3.20~3.72 mg/L)

NOECb (0-72h) : 0.70 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48h) : >8.21 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

(推定濃度: 34.1 mg/L)

NOECr (24-48h) : 5.20 mg/L

ErC50 (24-72h) : >8.21 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

(推定濃度: 71.8 mg/L)

NOECr (24-72h) : 5.20 mg/L

5.5 温度およびpH

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

培養試験装置内の温度は, 設定範囲 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) 内であった。pH は, 暴露開始時の試験液が 7.7~7.8 であり, 暴露終了時の試験培養液が 8.1~9.4 であった。助剤対照区および 6.10 mg/L 以下の濃度区では, pH が 1 以上増加したが, 炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ 1 以上増加することがあり, 問題はないと考えられた。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.01	---	<0.01	---
Solvent Control	<0.01	---	<0.01	---
0.50	0.45	90	<0.01	<2
0.82	0.70	85	<0.01	<2
1.40	1.17	84	<0.01	<1
2.20	1.83	83	<0.01	<1
3.70	3.11	84	0.04	1
6.10	5.20	85	0.04	1
10.0	8.21	82	0.08	1

Table 2 Cell Densities of *Selenastrum capricornutum* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	57800	412700	2889200
	2	10000	64700	475700	3519200
	3	10000	67100	477700	3609200
	Average	10000	63200	455400	3339200
	SD	0	4800	37000	392300
Solvent Control	1	10000	63300	475700	3289200
	2	10000	70100	457700	3219200
	3	10000	70100	472700	3179200
	Average	10000	67800	468700	3229200
	SD	0	3900	9600	55700
0.50 [0.45]	1	10000	60400	428700	3409200
	2	10000	54300	431700	3229200
	3	10000	57700	415700	3749200
	Average	10000	57500	425400	3462500
	SD	0	3100	8500	264100
0.82 [0.70]	1	10000	52400	399700	3379200
	2	10000	54600	381700	2979200
	3	10000	57500	373700	3059200
	Average	10000	54800	385000	3139200
	SD	0	2600	13300	211700
1.40 [1.17]	1	10000	47700	342700	2619200
	2	10000	41000	324700	2699200
	3	10000	47600	375700	3069200
	Average	10000	45400	347700	2795900
	SD	0	3800	25900	240100
2.20 [1.83]	1	10000	44200	319700	2349200
	2	10000	45200	342700	2499200
	3	10000	38200	313700	2039200
	Average	10000	42500	325400	2295900
	SD	0	3800	15300	234600
3.70 [3.11]	1	10000	33100	225700	1739200
	2	10000	33400	199700	1849200
	3	10000	30600	215700	1559200
	Average	10000	32400	213700	1715900
	SD	0	1500	13100	146400
6.10 [5.20]	1	10000	21100	176700	1359200
	2	10000	27600	134700	1249200
	3	10000	28400	151700	1329200
	Average	10000	25700	154400	1312500
	SD	0	4000	21100	56900
10.0 [8.21]	1	10000	18600	80100	414200
	2	10000	24700	124700	1039200
	3	10000	23300	127700	981200
	Average	10000	22200	110800	811500
	SD	0	3200	26700	345300

SD = Standard deviation

Table 3 Growth Inhibition (%) of *Setenastrum capricornutum*

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr]		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	Vessel No.	Area A (0-72h)	Inhibition (%) ^{*1} I _A (0-72h)	Rate μ (24-48h)	Inhibition (%) ^{*1} I _μ (24-48h)	Rate μ (24-72h)	Inhibition (%) ^{*1} I _μ (24-72h)
Control	1	45362000		0.0819		0.0815	
	2	54600000		0.0831		0.0833	
	3	55786000		0.0818		0.0830	
	Average	51916000	-	0.0823	-	0.0826	-
	SD	5707000		0.0007		0.0010	
Solvent Control	1	51806000		0.0840		0.0823	
	2	50698000		0.0782		0.0797	
	3	50578000		0.0795		0.0795	
	Average	51027000	-	0.0806	-	0.0805	-
	SD	677000		0.0030		0.0016	
0.50 [0.45]	1	52049000		0.0817		0.0840	
	2	49814000		0.0864		0.0851	
	3	55752000		0.0823		0.0870	
	Average	52538000	-3.0	0.0835	-3.6	0.0854	-6.1
	SD	2999000		0.0026		0.0015	
0.82 [0.70]	1	50801000		0.0847		0.0868	
	2	45622000		0.0810		0.0833	
	3	46459000		0.0780		0.0828	
	Average	47627000	6.7	0.0812	-0.7	0.0843	-4.7
	SD	2780000		0.0034		0.0022	
1.40 [1.17]	1	40200000		0.0822		0.0835	
	2	40567000		0.0862		0.0872	
	3	46390000		0.0861		0.0868	
	Average	42386000	16.9**	0.0848	-5.2	0.0858	-6.6
	SD	3473000		0.0023		0.0020	
2.20 [1.83]	1	36324000		0.0824		0.0828	
	2	38700000		0.0844		0.0836	
	3	32316000		0.0877		0.0829	
	Average	35780000	29.9**	0.0848	-5.2	0.0831	-3.2
	SD	3227000		0.0027		0.0004	
3.70 [3.11]	1	26482000		0.0800		0.0825	
	2	27185000		0.0745		0.0836	
	3	24022000		0.0814		0.0819	
	Average	25896000	49.3**	0.0786	2.5	0.0827	-2.7
	SD	1661000		0.0036		0.0009	
6.10 [5.20]	1	20458000		0.0885		0.0868	
	2	18286000		0.0661		0.0794	
	3	19673000		0.0698		0.0801	
	Average	19472000	61.8**	0.0748	7.2	0.0821	-2.0
	SD	1100000		0.0120		0.0041	
10.0 [8.21]	1	6739000		0.0608		0.0646	
	2	15456000		0.0675		0.0779	
	3	14798000		0.0709		0.0779	
	Average	12331000	75.8**	0.0664	17.6**	0.0735	8.7**
	SD	4854000		0.0051		0.0077	

*1 Values are the growth inhibition (%) relative to the solvent control. SD Standard deviation
 * Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the solvent control. (There was no sign in this test.)
 ** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the solvent control.

Table 4 Calculated EC50 and NOEC

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

EcC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
3.45 ^{*1}	3.20~3.72	0.70

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

ErC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48h) (mg/L)
>8.21 (34.1) ^{*2}	--	5.20

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

ErC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72h) (mg/L)
>8.21 (71.8) ^{*2}	--	5.20

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

- *1 using the measured concentrations of 1.17, 1.83, 3.11, 5.20 and 8.21 mg/L in the regression analysis
- *2 estimated using the measured concentrations of 5.20 and 8.21 mg/L in the regression analysis
- not calculated

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

Table 5 Temperature in the Incubation Chamber

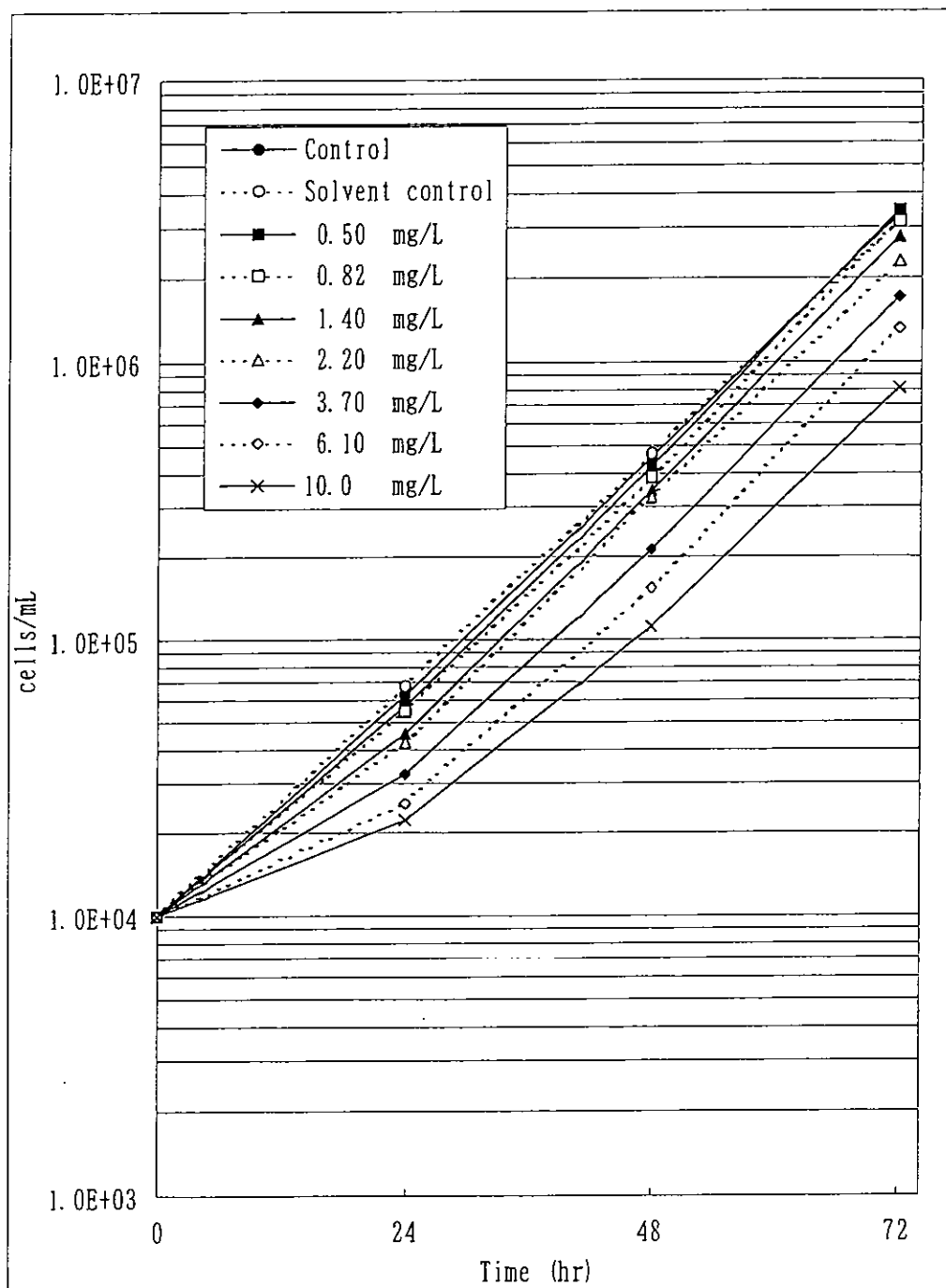
Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.2
24	23.1
48	23.1
72	23.4

Table 6 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	pH		
	0 Hour	72 Hours (Vessel No)	
Control	7.8	8.6	(1)
Solvent Control	7.7	9.3	(1)
0.50 [0.45]	7.8	9.2	(1)
0.82 [0.70]	7.8	9.4	(1)
1.40 [1.17]	7.8	9.4	(1)
2.20 [1.83]	7.8	9.3	(1)
3.70 [3.11]	7.7	8.8	(1)
6.10 [5.20]	7.7	8.7	(1)
10.0*	7.8	8.1	(1)
		8.4	(2)
		8.4	(3)

* : After 72 hours incubation, pH in each vessel was measured because the cell densities were different more than twice between vessels.

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

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

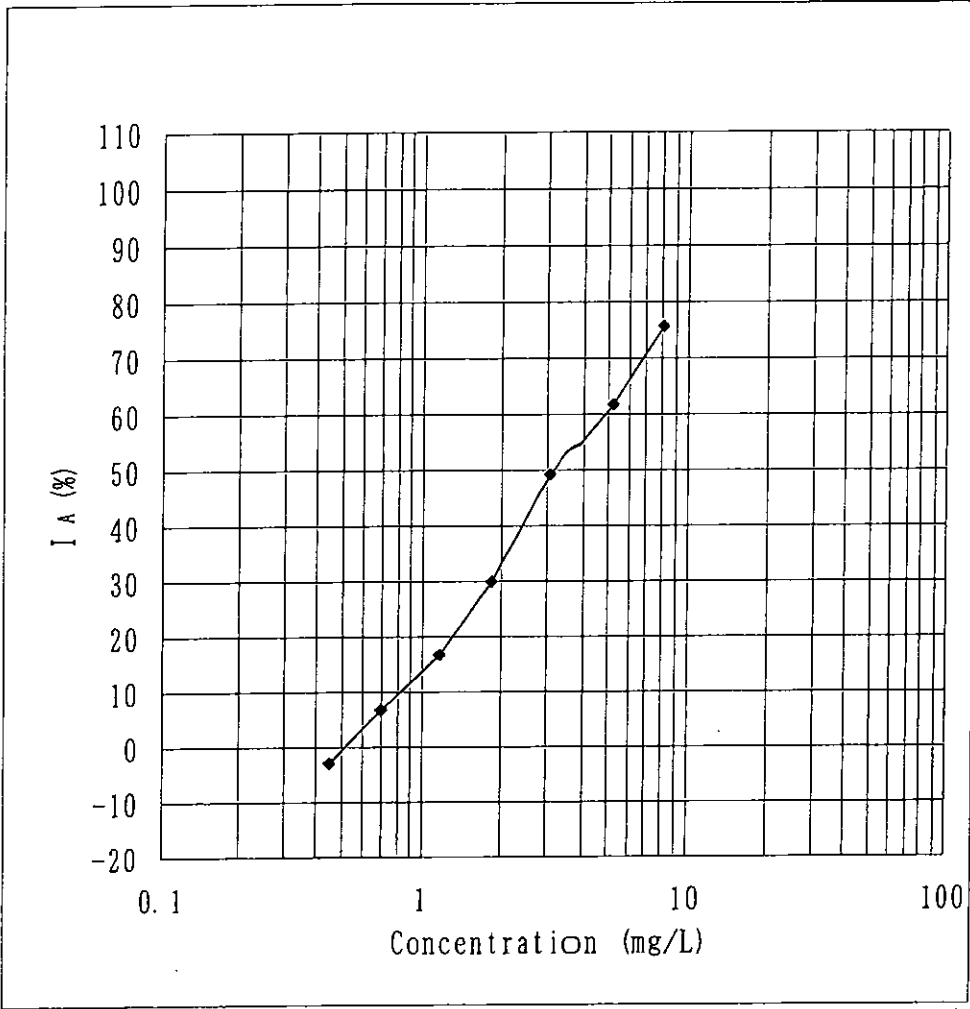
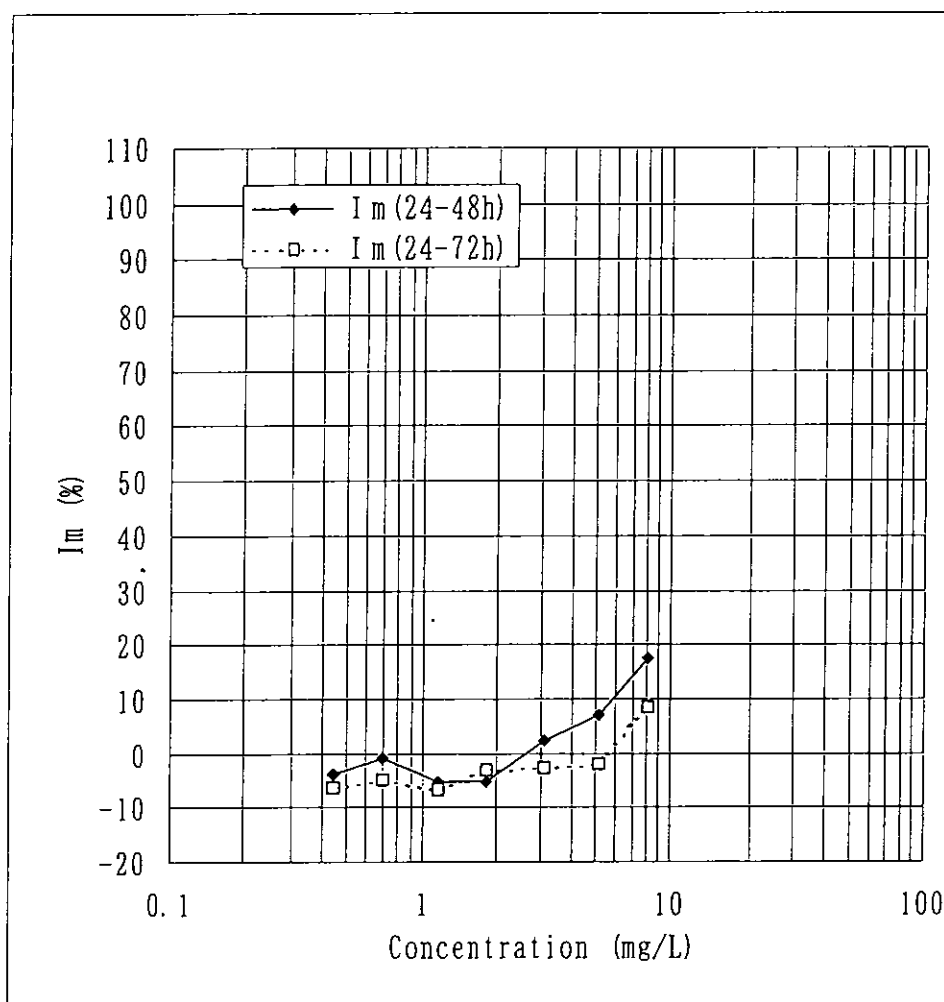


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

OECD 培地の組成

Table A-1 OECD medium

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

付属資料－ 2

試験液および試験培養液の分析

1 試験液および試験培養液の分析方法

- 1) 各濃度区 3 個の試験容器より試験液または試験培養液 2.0 mL ずつを採取して 10 mL 容ガラス沈殿管で混合した。

暴露開始時はこれを分析試料とした。

暴露終了時はこれを遠心分離* (3000 rpm, 10分間) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

* 装置: 日立工機製 CR 2 1 E 型

- 2) 各分析試料 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLC により分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-2-2 (3), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (13) に示した。

- 3) アセトニトリルで調製した標準溶液 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、HPLC により分析した。クロマトグラムを Figure A-2-2 (1), (2), (8) に示した。

- 4) 各試験液および試験培養液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

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

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ: Agilent 1100型 カラムスイッチング装置付 (No.2)
ワークステーション: Agilent 1100シリーズ ミニステーション (Windows NT)
デガッサ: G1322A型
送液ポンプ: G1311A型 (クォータリポンプ, 分析用)
G1311A型 (クォータリポンプ, 濃縮用)
オートサンプラ: G1313A型
カラムオープン: G1316A型 (カラムスイッチングバルブ)
フォトダイオードアレイ検出器: G1315B型

(条件)

カラム:	分析用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6mm i.d. \times 150mm
	濃縮用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4mm i.d. \times 10mm
カラムオープン:	40 $^{\circ}$ C	
溶離液:	分析用	アセトニトリル/0.1% リン酸 = 25/75 (v/v)
	濃縮用	アセトニトリル/0.1% リン酸 = 10/90 (v/v)
流速:	分析用	1.0 mL/min
	濃縮用	0 ~ 3 min 2.5 mL/min 3 ~ 13 min 0.05 mL/min 13 ~ 15 min 2.5 mL/min
カラムスイッチングバルブ:	0min (濃縮側), 3min (分析側), 13min (濃縮側)	
測定波長:	247nm	
試料注入量:	20 μ L	

3 検量線

アセトニトリルを用い, 0, 0.05~50.0 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものをHPLCで測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 0.999 と良好であった。作成した検量線を Figure A-2-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 0.1 count に設定し, これに相当する試験液または試験培養液中の被験物質濃度 0.01 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

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

Figure A-2-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.05	0.5
3	0.10	1.0
4	0.20	1.9
5	0.50	4.7
6	1.00	10.2
7	2.00	20.7
8	5.00	49.0
9	10.0	97.3
10	20.0	194.5
11	50.0	443.2

$$Y = 9.02X$$

$$r = 0.999$$

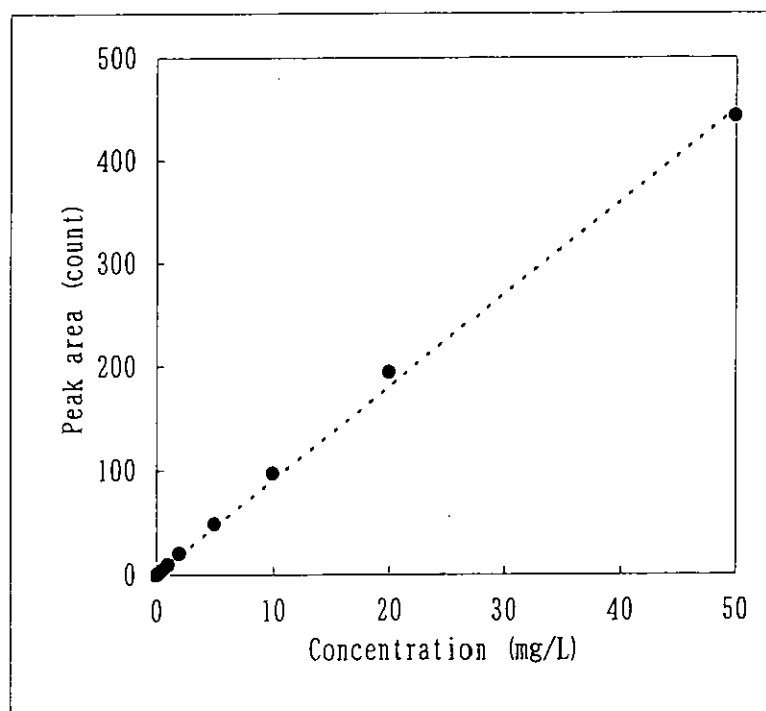
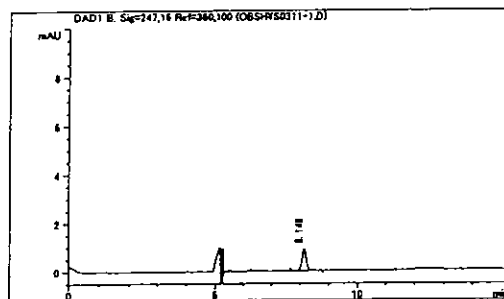


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 1.00 mg/L ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/11 シーケン : 3
 試験番号 : A020358 OHSB N 179 No. : 103
 分析物質 : OHSB M 注入 No. : 1
 サンプル名 : 10.0mg/L 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :

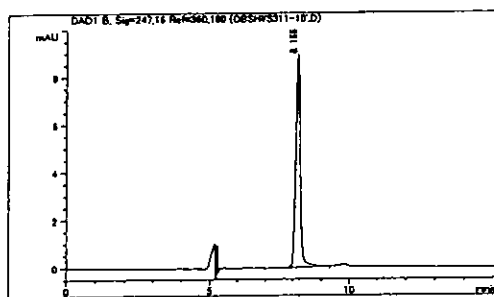


面積パーセント						
ピーク #	RT [min]	タイプ	保留 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.148	NM	8.145	10.3	0.9	100
トータル:				10.3	0.9	

*** End of Report ***

(2) Standard 10.0 mg/L ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/11 シーケン : 2
 試験番号 : A020358 OHSB N 179 No. : 103
 分析物質 : OHSB M 注入 No. : 1
 サンプル名 : 10.0mg/L 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :



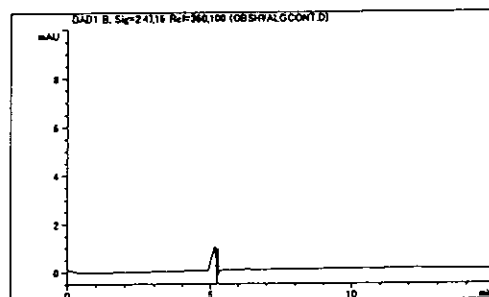
面積パーセント						
ピーク #	RT [min]	タイプ	保留 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.156	NM	8.192	103.6	9.0	100
トータル:				103.6	9.0	

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(3) Control ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/11 シラントミン : 4
 試験番号, 名称 : A020358 OESM バイタ No. : 104
 分析機名 : OESM 注入 No. : 1
 サンプル名 : sig001.com 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :



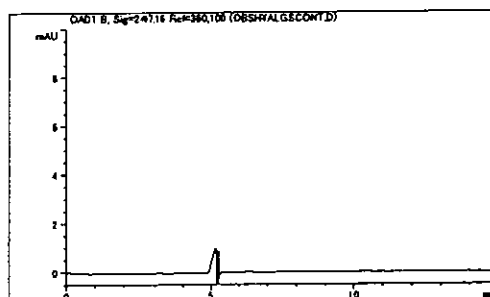
測定 4ペー - 1

ピーク #	RT [min]	タイム [min]	幅 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1-78:						

*** End of Report ***

(4) Solvent control ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/11 シラントミン : 5
 試験番号, 名称 : A020358 OESM バイタ No. : 105
 分析機名 : OESM 注入 No. : 1
 サンプル名 : sig001.com 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :



測定 4ペー - 1

ピーク #	RT [min]	タイム [min]	幅 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1-78:						

*** End of Report ***

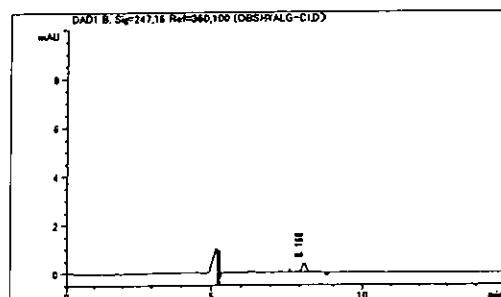
Figure A-2-2 Continued

(5) 0.50 mg/L nominal ; 0 Hour

=====

注入日	2903/03/11	シートNo.	6
試料番号	A020256 OBSH	ハイクNo.	106
分析機	OBSH M	注入No.	1
シフト名	alg04rcoc4	注入量	20 ul
測定レポート	[REDACTED]		

=====



=====

面積% - ピーク -

ピーク	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積%
1	0.158	ND	0.289	4.6	0.4	100
トータル:				4.6	0.4	

=====

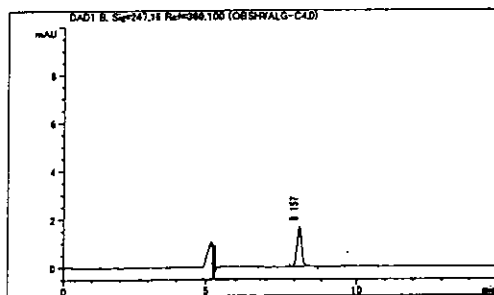
*** End of Report ***

(6) 2.20 mg/L nominal ; 0 Hour

=====

注入日	2903/03/11	シートNo.	9
試料番号	A020256 OBSH	ハイクNo.	106
分析機	OBSH M	注入No.	1
シフト名	alg04rcoc4	注入量	20 ul
測定レポート	[REDACTED]		

=====



=====

面積% - ピーク -

ピーク	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積%
1	0.157	ND	0.938	18.9	1.7	100
トータル:				18.9	1.7	

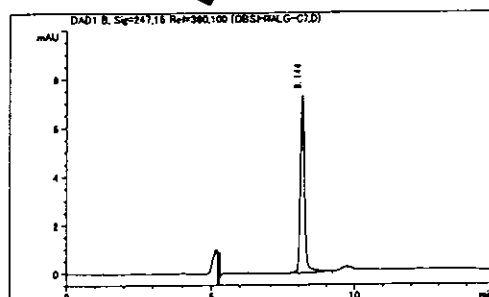
=====

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(7) 10.0 mg/L nominal ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/11 シーラサイン : 12
 試験番号, 名称 : A020358 OHSB N-178 No. : 112
 分析ソフト : OHSB M 注入 No. : 1
 サンプル名 : alg00rcooc7 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :



=====

面積パーセントレポート

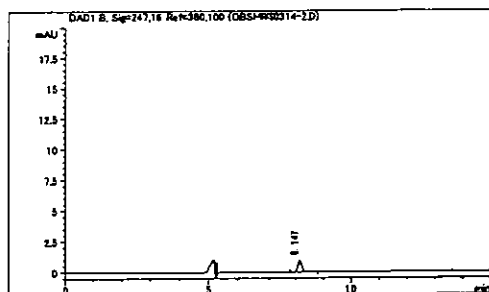
=====

ピーク #	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.144	ND	0.193	85.1	7.4	100
トータル:				85.1	7.4	

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

(8) Standard 1.00 mg/L ; 72 Hours

注入日 : 2003/03/14 シーラサイン : 12
 試験番号, 名称 : A020358 OHSB N-178 No. : 112
 分析ソフト : OHSB M 注入 No. : 1
 サンプル名 : 1.01 mg/L 注入量 : 20 μ l
 測定 4ペー :



=====

面積パーセントレポート

=====

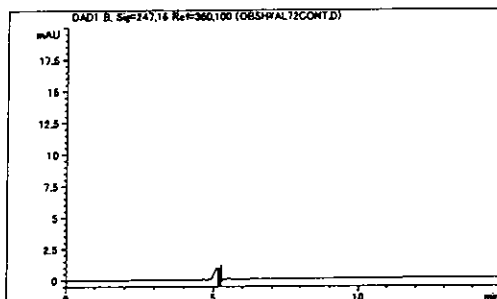
ピーク #	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.147	ND	0.164	10.6	0.9	100
トータル:				10.6	0.9	

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

Figure A-2-2 Continued

(9) Control ; 72 Hours

注入日 : 2003/03/14 シーリット : 2
 試験番号 : A020358 DBSH N (72) No. : 102
 分析物質 : DBSH M 注入 No. : 1
 サンプル名 : algoldcont 注入量 : 20 μ l
 測定サンプル :



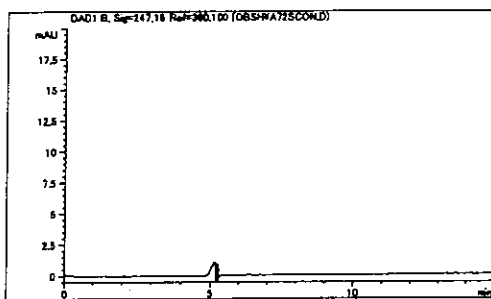
===== 検出ピークデータ =====

ピーク No.	RT (min)	タイプ	保留 時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
ピーク:						

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

(10) Solvent control ; 72 Hours

注入日 : 2003/03/14 シーリット : 3
 試験番号 : A020358 DBSH N (72) No. : 103
 分析物質 : DBSH M 注入 No. : 1
 サンプル名 : algoldcont 注入量 : 20 μ l
 測定サンプル :



===== 検出ピークデータ =====

ピーク No.	RT (min)	タイプ	保留 時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
ピーク:						

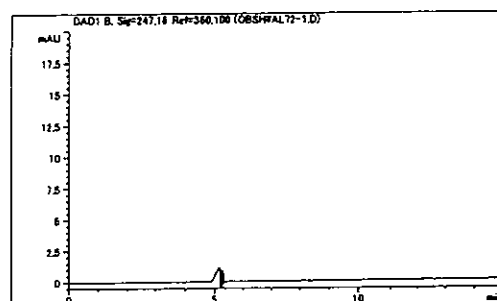
===== *** End of Report *** =====

Figure A-2-2 Continued

(11) 0.50 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
注入日       : 2001/03/14          シート35(2)          4
試験番号 名称 : 1070358 OBSH        N-178 No.       104
分析物質     : OBSH.M              注入量           1
シフト名     : algoldconc1         注入量           20 ml
測定レベル   : ██████████
  
```



```

=====
表題N-7(1)4'-1
=====

```

Time	RT	Peak	Area	Height	Area %
→	(min)	(min)	(mAU*s)	(mAU)	(%)
1-78:					

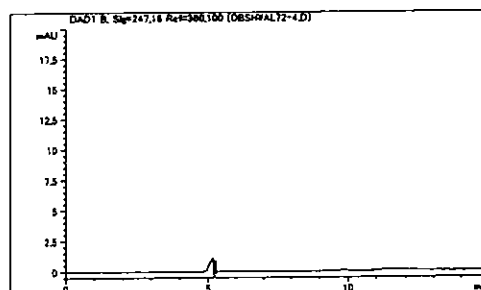
```

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

(12) 2.20 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
注入日       : 2001/03/14          シート35(2)          7
試験番号 名称 : 1070358 OBSH        N-178 No.       107
分析物質     : OBSH.M              注入量           1
シフト名     : algoldconc4         注入量           20 ml
測定レベル   : ██████████
  
```



```

=====
表題N-7(1)4'-1
=====

```

Time	RT	Peak	Area	Height	Area %
→	(min)	(min)	(mAU*s)	(mAU)	(%)
1-78:					

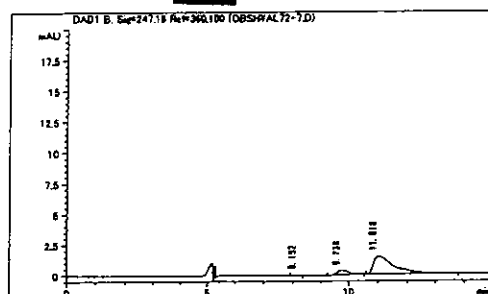
```

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

Figure A-2-2 Continued

(13) 10.0 mg/L nominal ; 72 Hours

注入日 : 2003/03/14 シラジシン : 10
 試験番号 : A020358 OBSR K 178 No. : 110
 分析カラム : OBSR II 注入量 : 20 μl
 サンプル名 : algaIdconc7
 測定オペレータ :



===== 面積パーセント =====

ピーク	RT [min]	タイプ	時間 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1	4.152	MM	4.152	0.8	0.1	0
2	9.738	MM	9.507	11.9	0.4	13
3	11.018	MM	9.817	71.8	1.5	85
トータル:				83.4	1.9	

*** End of Report ***

付属資料－ 3

結果の算出

Table A-3-1 Calculation of the EC50

(1) EbC50 (0-72h)

直線回帰分析 (EC50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
1.17	0.16	16.9
1.83	0.60	29.9
3.11	1.13	49.3
5.20	1.65	61.8
8.21	2.11	75.8

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
3.45	3.20	~ 3.72	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	2244.36	1	2244.36	899.15	>10.13
Within	7.49	3	2.50		
Total	2251.85	4			

Table A-3-1 Continued

(2) ErC50 (24-48h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
5.20	1.65	7.2
8.21	2.11	17.6

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

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	54.08	1	54.08	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	54.08	1			

Table A-3-1 Continued

(3) ErC50 (24-72h)

直線回帰分析 (E C50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
5.20	1.65	0.0
8.21	2.11	8.7

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

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	37.85	1	37.85	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	37.85	1			

Table A-3-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7	Conc. 7 Group8
5180.6	5204.9	5080.1	4020.0	3632.4	2648.2	2045.8	673.9
5069.8	4981.4	4562.2	4056.7	3870.0	2718.5	1828.6	1545.6
5057.8	5575.2	4645.9	4639.0	3231.6	2402.2	1967.3	1479.8

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance
1	3	5,102.7333	39.0871	67.7009	4,583.4133
2	3	5,253.8333	173.1526	299.9091	89,945.4633
3	3	4,762.7333	160.5123	278.0155	77,292.6233
4	3	4,238.5667	200.4968	347.2706	120,596.8633
5	3	3,578.0000	186.2867	322.6580	104,108.1600
6	3	2,589.6333	95.8888	166.0842	27,583.9633
7	3	1,947.2333	63.4979	109.9816	12,095.9633
8	3	1,233.1000	280.2445	485.3977	235,610.8900

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	7.3515	14.0672	<18.4753	24.3220	0.3932

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
1-way ANOVA		0	82.2017	>2.6572	4.0259	6.4604	2.398E-11

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 2	2	0	2.1200	2.9210	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 3	2	1.7563	2.1930	2.9570	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 4	2	3.9716	>2.2160	>2.9910	999.9900	999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 5	2	6.7634	>2.2270	>2.9980	999.9900	999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 6	2	10.9405	>2.2340	>3.0020	999.9900	999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 7	2	13.6555	>2.2380	>3.0050	999.9900	999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 8	2	16.6737	>2.2409	>3.0067	999.9900	999.9900 **

Table A-3-2 Continued

(2) NOECr (24-48h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7	Conc. 7 Group8
0.0840	0.0817	0.0847	0.0822	0.0824	0.0800	0.0885	0.0608
0.0782	0.0864	0.0810	0.0862	0.0844	0.0745	0.0661	0.0675
0.0795	0.0823	0.0780	0.0861	0.0877	0.0814	0.0698	0.0709

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0806	0.0018	0.0030	0.0000		
2	3	0.0835	0.0015	0.0026	0.0000		
3	3	0.0812	0.0019	0.0034	0.0000		
4	3	0.0848	0.0013	0.0023	0.0000		
5	3	0.0848	0.0015	0.0027	0.0000		
6	3	0.0786	0.0021	0.0036	0.0000		
7	3	0.0748	0.0069	0.0120	0.0001		
8	3	0.0664	0.0030	0.0051	0.0000		
Method Bartlett test	vs	Side 0	Stat. 9.5272	0.05 14.0672	0.01 <18.4753	0.001 24.3220	Prob. 0.2170
Method 1-way ANOVA	vs	Side 0	Stat. 4.1606	0.0500 >2.6572	0.0100 4.0259	0.0010 6.4604	Prob. 0.00865406
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 2	2	0	2.1200	2.9210	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 3	2	0	2.1930	2.9570	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 4	2	0	2.2160	2.9910	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 5	2	0	2.2270	2.9980	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 6	2	1.0091	2.2340	3.0020	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 7	2	1.8976	2.2380	3.0050	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 8	2	3.8447	>2.2409	>3.0067	999.9900	999.9900 **

Table A-3-2 Continued

(3) NOECr (24-72h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7	Conc. 7 Group8
0.0823	0.0840	0.0868	0.0835	0.0828	0.0825	0.0868	0.0646
0.0797	0.0851	0.0833	0.0872	0.0836	0.0836	0.0794	0.0779
0.0795	0.0870	0.0828	0.0868	0.0829	0.0819	0.0801	0.0779

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0805	0.0009	0.0016	0.0000		
2	3	0.0854	0.0009	0.0015	0.0000		
3	3	0.0843	0.0013	0.0022	0.0000		
4	3	0.0858	0.0012	0.0020	0.0000		
5	3	0.0831	0.0003	0.0004	0.0000		
6	3	0.0827	0.0005	0.0009	0.0000		
7	3	0.0821	0.0024	0.0041	0.0000		
8	3	0.0735	0.0044	0.0077	0.0001		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	16.4134	14.0672	<18.4753	24.3220	0.0216
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
1-way ANOVA		0	4.0985	>2.6572	4.0259	6.4604	0.00924807
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 2	2	0	2.1200	2.9210	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 3	2	0	2.1930	2.9570	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 4	2	0	2.2160	2.9910	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 5	2	0.3283	2.2270	2.9980	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 6	2	0.4863	2.2340	3.0020	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 7	2	0.6930	2.2380	3.0050	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 8	2	3.8419	>2.2409	>3.0067	999.9900	999.9900 **