

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

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

4,4'-スルホニルジフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

(試験番号：9 B 4 7 9 G)

2000年 6月30日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： 4,4'-スルホニルジフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 7 9 G

本試験は環境庁の G L P 規則に従って実施したものである。

2 0 0 0 年 6 月 3 0 日

運営管理者





# 信 頼 性 保 証 証 明

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： 4,4'-スルホニルジフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 7 9 G

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

## 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	2000年 5月23日	2000年 5月23日
	2000年 6月13日	2000年 6月13日
試験報告書監査	2000年 6月30日	2000年 6月30日

2000年 6月30日

信頼性保証担当者：









## 試験実施概要

1. 表題： 4,4'-スルホニルジフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を21日間行い、最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求める。
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. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年) に準拠した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称： 環境庁  
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2  
委託担当者： 企画調整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：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所  
所在地： 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
所在地： 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)
試験担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)
	[REDACTED]		(2000年 4月28日 退職)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)
分析担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 6月30日)

9. 試験期間： 試験開始日 1999年11月16日  
試験終了日 2000年 6月30日  
暴露期間 2000年 5月23日～2000年 6月13日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、試験報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

# 目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	14
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	14
4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	14
5 結果および考察	15
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 ミジンコの観察結果	15
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	16
5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	16
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	16
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度	16
Table 1~11	17~25
Figure 1, 2	19, 21
付属資料-1 希釈水の水質	26~27
付属資料-2 試験液の分析方法	28~34
付属資料-3 ミジンコの観察結果	35~41

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

4, 4' -スルホニルジフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

9 B 4 7 9 G

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 4, 4' -スルホニルジフェノール
- 2) 暴露方式： 半止水式 (48時間毎に試験液の全量を交換)  
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度 (設定値) :  
対照区, 0. 30, 0. 95, 3. 00, 9. 50, 30. 0mg/L  
公比 : 3. 2
- 6) 試験液量： 80 mL / 容器
- 7) 連数： 10容器 / 濃度区
- 8) 供試生物数： 10頭 / 濃度区 (1頭 / 容器)
- 9) 試験温度： 20 ± 1℃
- 10) 照明： 16時間明 / 8時間暗
- 11) 分析法： H P L C 法

## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の測定濃度が設定値の±20%を超えたものがあったため、各影響濃度の算出には測定値（時間加重平均値）を採用した。

### 2) 21 日間暴露の各影響濃度結果を以下に示す。

親ミジンコの半数致死濃度（LC50）： >27.5 mg/L

（95%信頼限界：算出不可）

50% 繁殖阻害濃度（EC50）： 13.5 mg/L

（95%信頼限界：11.2～17.0 mg/L）

最大無作用濃度（NOEC）： 2.65 mg/L

最小作用濃度（LOEC）： 8.76 mg/L



## 1 被験物質

### 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

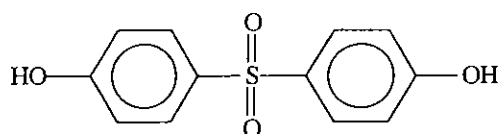
名 称 : 4, 4'-スルホニルジフェノール (略称 SDP)

別 名 : ビスフェノールS

ビス(4-ヒドロキシフェニル)スルホン

CAS No : 80-09-1

構造式 :



分子式 :  $C_{12}H_{10}O_4S$

分子量<sup>\*1</sup> : 250. 27

融点<sup>\*1</sup> : 241℃

その他<sup>\*1</sup> : 酸化剤, 強塩基との接触に注意

\*1:供給者提供資料

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup> : 99. 4% (中和法)

ロット番号<sup>\*1</sup> : GG01

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量<sup>\*1</sup> : 50 g

入手日 : 1999年9月3日

外観<sup>\*1</sup> : 白色粉末

\*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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の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。試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中は安定であったと判断された。

## 2 供試生物

- 1) 和名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所
- 4) 入手日： 1995 年 7 月 18 日
- 5) 入手後の管理： 継代培養（最大飼育期間；4 週間，換水頻度；少なくとも週 3 回）
- 6) 感受性の確認： 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による 48 時間の半数遊泳  
障害濃度（ $EC_{50}$ ）＝ 0.57 mg/L（この値は当研究所における 1998 年 6  
月以降の  $EC_{50}$  値 0.59～1.02 mg/L（ $n=3$ ）にほぼ一致する。）
- 7) 親の馴化： 馴化期間；2000 年 5 月 3 日～2000 年 5 月 23 日  
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 0% で休眠卵および雄の発生は認めら  
れなかった。（馴化条件は以下に示す。）
- 8) 供試令： 生後 24 時間令以内の幼体

### 馴化条件

- 1) 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
- 2) 飼育密度： 1 頭／80mL 飼育水（25 頭／2L）
- 3) 水温：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 5) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.2 mgC（有機炭素含量）／日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（48 時間毎に試験液の全量を換水），水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 80 mL／容器
- 4) 連数： 10 容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 10 頭／濃度区（1 頭／容器）
- 6) 試験温度： 20±1℃
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.15 mgC（有機炭素含量）／日

#### 3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」に記載してある調製水，Elendt M4 を用いた。成分表を付属資料－1 に示した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL 容ガラスビーカー，テフロンシート製蓋
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 6) 硬度： 共立理化学研究所製 ドロップテスト 全硬度 WAD-TH

#### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験の結果（設定濃度に基づく48hr-EiC50値：99.7 mg/L）に基づき，1.00～100 mg/L で5段階（公比 3.2）を設定し，1回目の試験を実施したが，1.00 mg/L 区 および 3.20 mg/L 区における親ミジンコの死亡率が 30%および 60%と高く，無影響濃度の算出が困難であった。以上を踏まえて，本試験は より低濃度で5段階（公比 3.2）を設定した。各濃度区は以下の通りである。

対照区，0.30，0.95，3.00，9.50，30.0 mg/L

### 3.5 試験液の調製

被験物質を 400 mg 秤取し、これを希釈水に溶解させ 2000 mL に定容し、被験物質濃度 200 mg/L の原液を調製した。

1.0 L 容のメスフラスコに希釈水を入れ、上記被験物質原液を各濃度区に応じて添加し、各試験液を調製した。1 濃度区に付き 10 個の試験容器に 80 mL ずつ分注して、試験に用いた。

対照区には、希釈水のみを用いた。

### 3.6 試験液の分析

全濃度区（但し、各 1 試験容器）について、暴露期間中に 3 回、換水前後の各試験液 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後 HPLC により分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（1.00 および 20.0 mg/L）は、等量の水で希釈したものを HPLC 測定試料とした。各試験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

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

・ミジンコの観察：

（親ミジンコ）生死，遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して，記録した。計数後の死亡個体は取り除いた。

（産出幼体） 最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し，計数後の幼体は取り除いた。死亡幼体，墮胎卵および休眠卵の発生等については，その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を，初産日として記録した。

・水質測定： 水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度を，全濃度区（但し，各1試験容器）について，暴露期間中に4回，換水前後に測定した。

## 4 結果の算出

### 4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数 (10頭) を用いて, Binomial法, Moving average法 および Probit法により, 21日間の半数致死濃度 (LC50) を算出し, いずれか適切な結果を採用するが, 本試験においては最高濃度区においても 50%以上の死亡が認められなかったため, 算出不可能であった。

### 4.2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出

各濃度区での生存親 1 頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体) から阻害率を求め, Logit 法 (Yukms 統計ライブラリー「生物検定編 Ver. 5.0」 (Yukms Corp., 東京) により, 50%繁殖阻害濃度 (EC50) を算出し, 可能な限りその95%信頼限界を算出した。

### 4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

各濃度区の容器毎に21日間生存した親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し, 各濃度区と対照区との有意差の有無を以下の統計手法により求めた。有意差が認められない最高濃度を最大無作用濃度 (NOEC), 有意差が認められる最低濃度を最小作用濃度 (LOEC) とした。

統計手法: Bartlettの等分散検定, 一元配置分散分析 (1-way ANOVA), Dunnettまたは Williamsの多重比較検定 ( $\alpha=0.05$ , 両側)

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 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中の試験液中の被験物質濃度を測定した結果を、Table 1 に示した。

設定濃度に対して±20%を超える分析結果があったため、阻害濃度の算出には測定濃度の時間加重平均値を基に示した。

### 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

暴露期間中の各濃度区における親ミジンコの累積死亡数および死亡率の結果を Table 2-1, Table 2-2 および Figure 1 に示した。

対照区における親ミジンコの死亡率は暴露終了時で 10%であり、試験成立条件である 20%以下の基準を満たした。最高濃度区における死亡率は暴露終了時で 30%であった。

#### 初産日

各濃度区における親ミジンコの初産日を Table 3 に示した。

対照区における親ミジンコの初産日は、暴露開始 8日後であり、正常な範囲内と判断された。

最高濃度区における親ミジンコは、3頭が初産前に死亡し、4頭が初産のないまま暴露終了を迎えた。残り3頭の初産日は、暴露開始11, 17および18日後と遅く、大きくばらついた。

#### 平均累積産仔数

暴露期間中の各濃度区における親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数の結果を Table 4 および Figure 2 に示した。

対照区における21日間での親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数は127頭であり、試験成立条件である60頭の基準を満たした。

最高濃度区における21日間での親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数は 4頭であった。

### 休眠卵の発生等

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

#### 5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) を Table 5 および以下に示した。

本試験では、最高濃度区においても50%以上の死亡が認められなかったため、LC50の算出は不可能であった。したがって、LC50を 最高濃度区以上と表記した。

21日間 LC50 : > 27.5 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

#### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) を Table 6 および以下に示した。

21日間 EC50 : 13.5 mg/L (95%信頼区間 : 11.2~17.0 mg/L)

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

親ミジンコ 1 頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間暴露の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を Table 7に示し、以下の結論を得た。

21日間 NOEC : 2.65 mg/L

21日間 LOEC : 8.76 mg/L

#### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

暴露期間中における試験液の水温を Table 8, 溶存酸素濃度を Table 9, pHを Table 10, 硬度を Table 11 に示した。

水温はすべての濃度区で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で、溶存酸素濃度はすべての試験液槽で飽和溶存酸素濃度 ( $20.0^\circ\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度 : 8.8mg/L) の60%以上であり、いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲 (6.0~9.0で1.5の変動内) 内にあった。また、硬度も適正範囲内 (250mg/L前後) と判断した。

以 上



Table 1-1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water during a 21-day Exposure Period  
(*Daphnia* Reproduction Inhibition Test under the Semi-Static Test Conditions)

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM*1 (mg/L)	% of Nominal
		0 New	2 Old	12 New	14 Old	20 New	21 Old		
Control		<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	-	-
0.30		0.29	0.27	0.28	0.26	0.25	0.17	0.27	90
0.95		0.91	0.85	0.88	0.82	0.87	0.54	0.86	91
3.00		2.78	2.68	2.77	2.50	2.81	1.54	2.65	88
9.50		8.88	8.73	8.80	8.65	8.40	8.80	8.76	92
30.0		27.7	27.1	27.8	27.5	27.7	27.7	27.5	92

Table 1-2 Measured Concentrations as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 New	2 Old	12 New	14 Old	20 New	21 Old
0.30		97	90	93	87	83	57
0.95		96	89	93	86	92	57
3.00		93	89	92	83	94	51
9.50		93	92	93	91	88	93
30.0		92	90	93	92	92	92

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

\*1: Time-weighted mean measured concentration during 21 days.

	Concentration (mg/L)			% of Nominal		
	Min.		Max.	Min.		Max.
New	0.25	~	27.8	83	~	97
Old	0.17	~	27.7	51	~	93

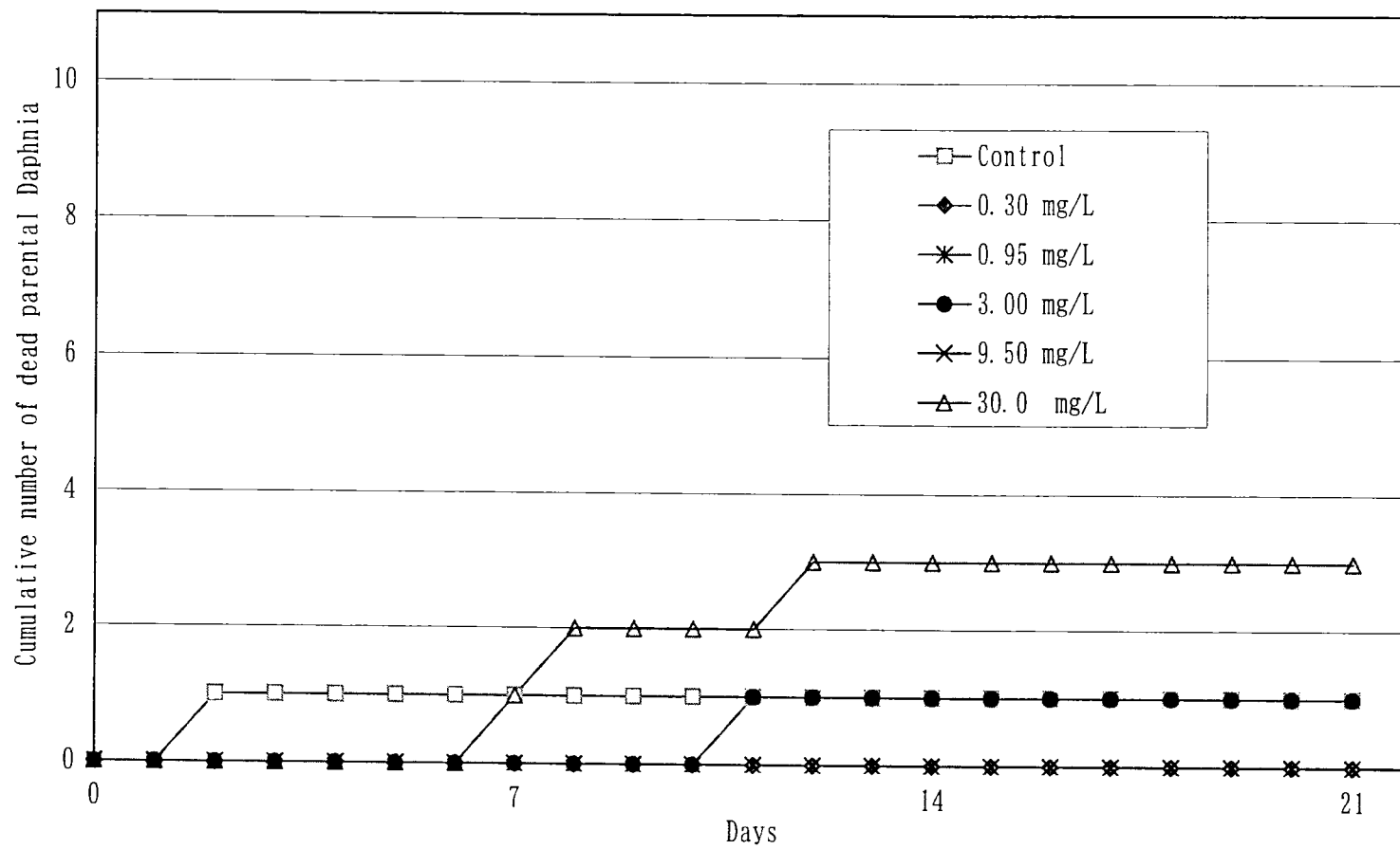
Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

Nominal conc.	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	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.30 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.95 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.00 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9.50 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.0 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

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

Nominal conc.	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	10	10	10	10	10
0.30 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.95 mg/L	0	0	0	0	0	0
3.00 mg/L	0	0	0	0	10	10
9.50 mg/L	0	0	0	0	0	0
30.0 mg/L	0	0	0	10	30	30

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 3 Time (Days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L *1)					
	Control	0.30 (0.27)	0.95 (0.86)	3.00 (2.65)	9.50 (8.76)	30.0 (27.5)
1	8	8	8	8	11	—
2	8	8	8	8	8	11
3	8	8	8	8	8	18
4	8	8	8	8	8	17
5	8	8	8	8	11	*
6	—	8	8	8	8	*
7	8	8	8	8	8	—
8	8	8	8	8	12	—
9	8	8	8	8	8	*
10	8	8	8	8	8	*
Min	8	8	8	8	8	11
Max	8	8	8	8	12	> 21

\*1: Time-weighted mean measured concentration.

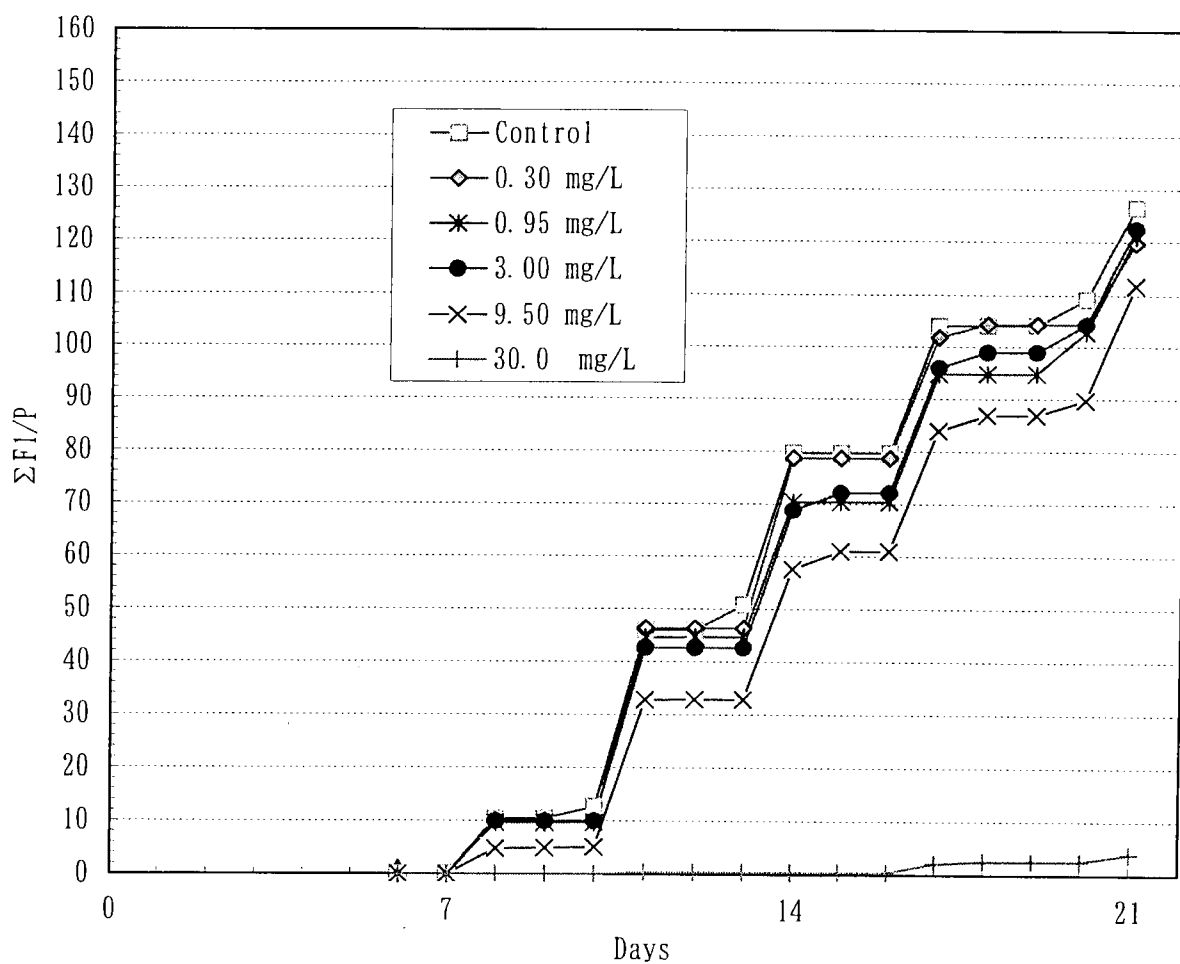
—: The parental *Daphnia* was dead before first brood production.

\*: No brood production for 21 days.

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days ( $\Sigma F1/P$ )

Nominal Conc.	Days															
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0.0	0.0	10.4	10.4	12.7	46.0	46.0	50.9	79.7	79.7	79.7	104.0	104.1	104.1	109.1	126.6
0.30 mg/L	0.0	0.0	10.0	10.0	10.0	46.4	46.4	46.4	78.7	78.7	78.7	101.8	104.3	104.3	104.3	119.7
0.95 mg/L	0.0	0.0	9.6	9.6	9.7	44.6	44.7	44.7	70.4	70.4	70.4	94.8	94.8	94.8	102.8	120.9
3.00 mg/L	0.0	0.0	10.0	10.0	10.0	42.7	42.7	42.7	68.8	72.1	72.1	96.0	99.0	99.0	104.2	122.4
9.50 mg/L	0.0	0.0	4.8	4.9	5.1	32.8	32.9	32.9	57.6	61.0	61.0	83.9	86.9	86.9	89.8	111.7
30.0 mg/L	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	2.1	2.6	2.6	2.6	3.9

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 5      Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50* <sup>1</sup> (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	> 27.5	--   --   --	--

\*1: Based on the time-weighted mean measured concentration

The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of parental *Daphnia* at the maximum concentration level was less than 50%.

Table 6      Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50* <sup>1</sup> (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	13.5	11.2   --   17.0	Logit

\*1: Based on the time-weighted mean measured concentration

Table 7 Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days in Each Test Vessels and Results of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration*1, mg/L)					
	Control	0.30 (0.27)	0.95 (0.86)	3.00 (2.65)	9.50 (8.76)	30.0 (27.5)
1	130	127	114	134	99	D
2	121	125	104	125	132	15
3	111	123	125	132	121	7
4	123	120	142	126	110	5
5	126	125	124	139	87	0
6	D	114	120	83	123	0
7	131	125	132	D	130	D
8	147	117	121	125	89	D
9	121	105	121	125	113	0
10	129	116	106	113	113	0
Mean	126.6	119.7	120.9	122.4	111.7	3.9
S. D.	9.8	6.8	11.3	16.5	15.8	5.7
Inhibition rate (%)		5.4	4.5	3.2	11.7	97.0
Significant difference		-	-	-	*	**

\*1: Time-weighted mean measured concentration.

D: Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

-: Indicates no significant difference.

\*: Indicates a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) from the control.

\*\*: Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the control.

No Observed Effect Concentration (NOEC): 2.65 mg/L  
 Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): 8.76 mg/L

Table 8 Temperature during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Temperature (°C)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	12 new	14 old	18 new	20 old		
Control		20.1	20.3	20.1	20.2	20.1	20.0	20.0	20.1	20.0	20.3
0.30		20.1	20.3	20.1	20.2	20.0	20.0	20.0	20.2	20.0	20.3
0.95		20.2	20.3	20.1	20.2	20.0	20.0	20.0	20.2	20.0	20.3
3.00		20.2	20.3	20.1	20.2	20.0	20.0	20.0	20.2	20.0	20.3
9.50		20.2	20.3	20.1	20.2	20.0	20.0	20.0	20.2	20.0	20.3
30.0		20.2	20.3	20.1	20.2	20.0	20.0	20.0	20.2	20.0	20.3
Total										20.0	20.3

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D. O.) during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	D. O. (mg/L)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	12 new	14 old	18 new	20 old		
Control		8.7	8.0	8.8	7.8	8.8	7.6	8.7	7.6	7.6	8.8
0.30		8.8	8.4	9.0	7.9	8.7	7.7	8.8	7.7	7.7	9.0
0.95		8.8	8.3	9.1	7.9	8.9	7.7	8.7	7.6	7.6	9.1
3.00		8.6	8.4	9.1	7.9	8.6	7.7	8.8	7.5	7.5	9.1
9.50		8.7	8.5	8.9	8.0	8.8	7.7	8.8	7.8	7.7	8.9
30.0		8.7	8.6	8.8	8.0	8.7	8.0	8.8	7.7	7.7	8.8
Total										7.5	9.1

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal



Table 10 pH during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	pH								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	12 new	14 old	18 new	20 old		
Control		8.1	7.7	8.6	7.3	8.5	7.5	8.1	7.2	7.2	8.6
0.30		8.2	7.9	8.1	7.3	8.5	7.5	8.1	7.2	7.2	8.5
0.95		8.2	8.0	8.1	7.3	8.5	7.6	8.1	7.2	7.2	8.5
3.00		8.2	7.9	8.0	7.3	8.5	7.6	8.1	7.2	7.2	8.5
9.50		8.0	7.8	8.0	7.4	8.2	7.3	8.0	7.3	7.3	8.2
30.0		7.6	7.7	7.7	7.4	7.9	7.4	7.6	7.2	7.2	7.9
Total										7.2	8.6

new: freshly prepared test solution,      old: old test solution before renewal

Table 11 Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>) during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	12 new	14 old	18 new	20 old		
Control		215	215	215	215	215	220	220	220	215	220
0.30		210	215	220	215	215	225	220	220	210	225
0.95		215	215	215	215	215	225	220	225	215	225
3.00		205	220	215	210	215	225	215	215	205	225
9.50		210	220	215	215	215	225	220	225	210	225
30.0		210	215	220	210	215	220	220	225	210	225
Total										205	225

new: freshly prepared test solution,      old: old test solution before renewal

## 付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No. 211

Used as Dilution Water

Macro nutrients	Concentration	Unit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8	mg /L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3	mg /L
KCl	5.80	mg /L
$\text{NaHCO}_3$	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
$\text{NaNO}_3$	0.274	mg /L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143	mg /L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184	mg /L
Trace elements	Concentration	Unit
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.8595	mg /L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3605	mg /L
LiCl	0.3060	mg /L
RbCl	0.0710	mg /L
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152	mg /L
NaBr	0.0160	mg /L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0630	mg /L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0168	mg /L
$\text{ZnCl}_2$	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19	$\mu\text{g/L}$
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	mg /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9955	mg /L
Vitamines	Concentration	Unit
Thiamine hydrochloride	75.0	$\mu\text{g/L}$
Cyanocobalamine (B12)	1.00	$\mu\text{g/L}$
Biotine	0.750	$\mu\text{g/L}$

## 付属資料－ 2

試験液の分析方法

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

各試験液 0.75 mLを測定用バイアルに採取し、アセトニトリル 0.75 mLを加え混合し、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（1.00 および 20.0 mg/L）は、等量の水で希釈したものをHPLC測定試料とした。各試験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。

### 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：	Hewlett Packard製 HP-1100型 (No.1)
ワークステーション：	HPケミステーション (Windows 95)
パソコン：	HP Vectra XM, ディスプレイ； Vectra VCA 1280
プリンター：	HP製 LASER JET 4 PLUS
デガッサー：	G1322A型
送液ポンプ：	G1312A型
オートサンプラ：	G1313A型
カラムオープン：	G1316A型
紫外可視分光検出器：	G1314A型

#### （条件）

カラム：	Inertsil ODS-3V, 5 $\mu$ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液：	アセトニトリル 70 %, 0.01M リン酸二水素ナトリウム水溶液 30 %
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	256 nm
試料注入量：	20 $\mu$ L
カラムオープン温度：	40℃

### 3 検量線

被験物質の1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、順次、アセトニトリルで希釈し 0, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を等量の水で希釈したものを、HPLC測定試料とした。横軸に濃度を (mg/L), 縦軸にピーク面積 (count表示) をとり、検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は、1.000であった。

### 4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.02 mg/Lを検出限界とした。

### 5 添加回収試験

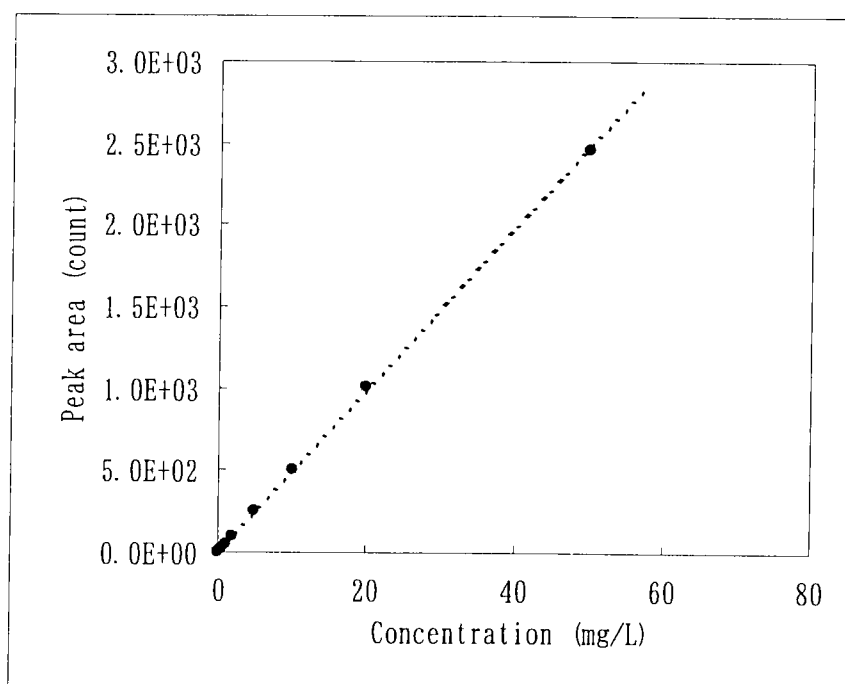
HPLC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.10	5.2
3	0.20	10.4
4	0.50	25.9
5	1.00	51.2
6	2.00	101.6
7	5.00	253.7
8	10.0	503.4
9	20.0	1006.6
10	50.0	2460.3

$$Y = 49.4X$$

$$r = 1.000$$

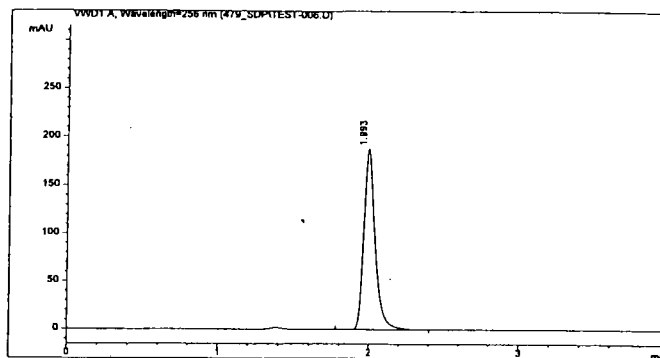


(1) Standard 20.0 mg/L ; Day 0

```

=====
Injection Date   : 00/05/23                      Seq Line       : 6
Test No.        : 9B479G                        Vial No.       : 2
Test Substance  : SDP                          Inj. Vol.      : 20 µl
Sample Name     : std 20 ppm
Acq Operator    : ████████████████████
Acq. Method     : 9B479G.M
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B479G.M
=====

```



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	1.993	VBA	0.080	1015.6	188.78	100
Total :				1015.6		

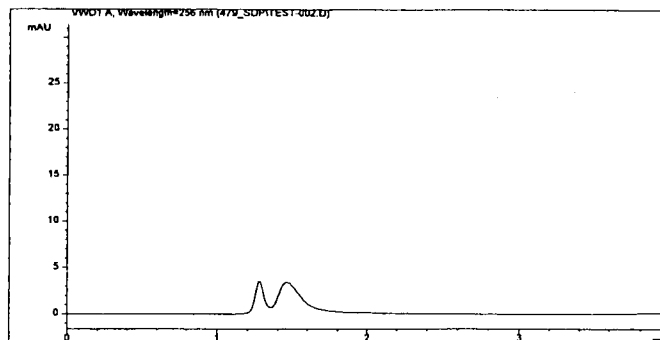
\*\*\* End of Report \*\*\*

(2) Control ; Day 0

```

Injection Date :00/05/23                               Seq Line   :          2
Test No.       :9B479G                                Vial No.    :         11
Test Substance :SDP                                    Inj. Vol.    :        20 µl
Sample Name    :control 0day
Acq Operator   :████████████████████
Acq. Method    :9B479G.M
Analysis Method:C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B479G.M

```



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	------------

No peaks found

\*\*\* End of Report \*\*\*

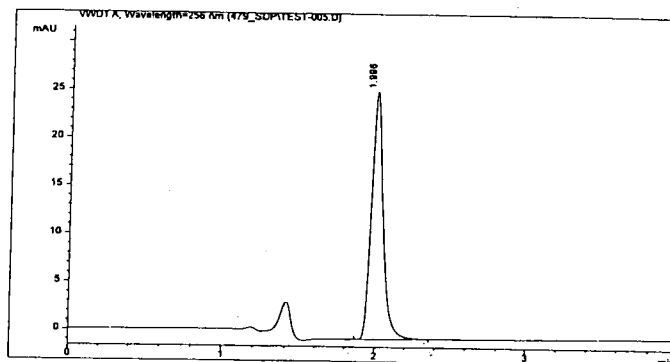


(3) 3.00 mg/L nominal ; Day 0

```

Injection Date   : 00/05/23
Test No.        : 9B479G
Test Substance   : SDP
Sample Name      : conc-3 0day
Acq Operator     : 
Acq. Method      : C:\HPCHRG\M
Analysis Method  : C:\HPCHRG\M\METHODS\1999.M\9B479G.M

```



Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
1	1.196	MM	0.090	139.8	25.91	100
Total :				139.8		

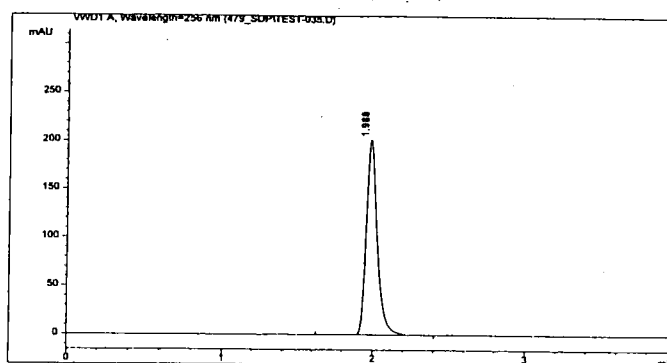
\*\*\* End of Report \*\*\*

(4) Standard 20.0 mg/L ; Day 2

```

-----
Injection Date   : 00/05/25                               Seq Line   : 16
Test No.        : 9B479G                                   Vial No.    : 4
Test Substance   : SDP                                     Inj. Vol.    : 20 µl
Sample Name      : STD 20 ppm
Acq Operator     : ██████████
Acq. Method      : 9B479G.M
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B479G.M

```

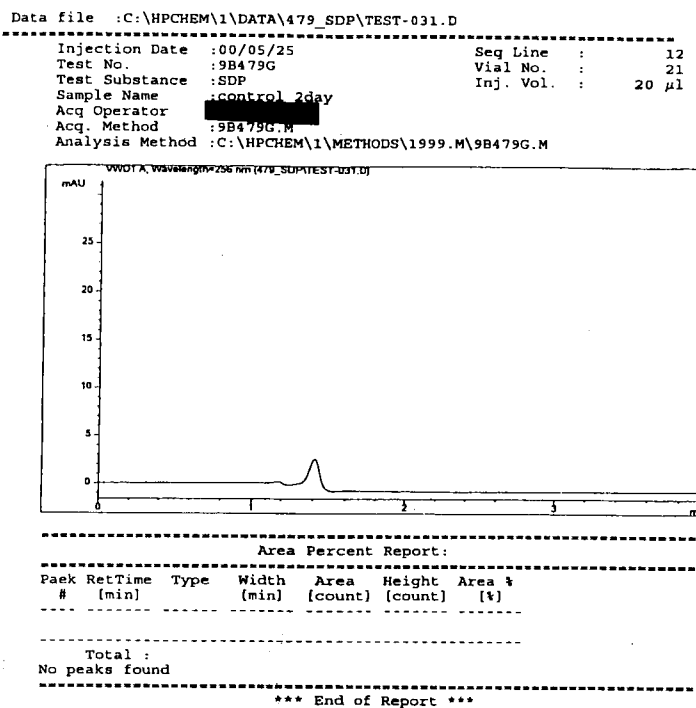


Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	1.988	BBA	0.076	1019.1	202.11	100
Total :				1019.1		

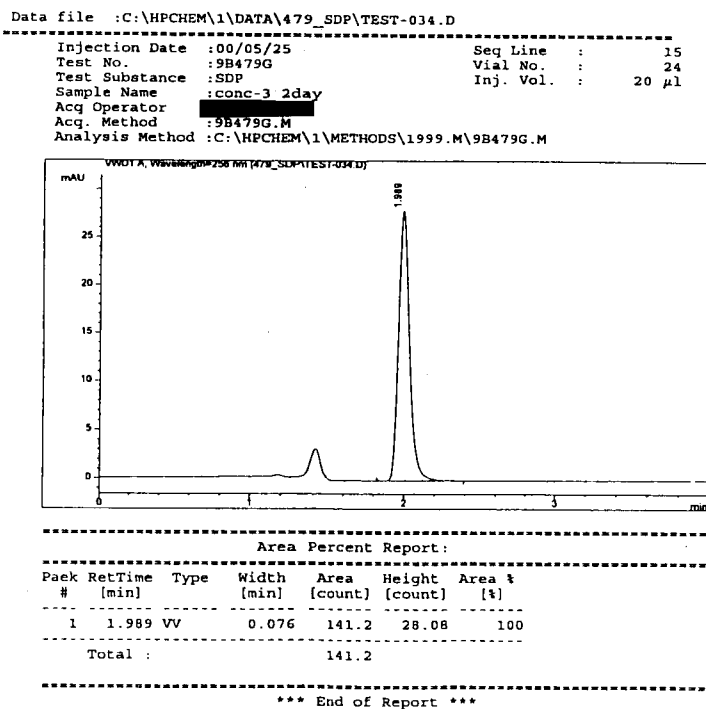
\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-2-2 Continued

(5) Control ; Day 2



(6) 3.00 mg/L nominal ; Day 2



### 付属資料－3

ミジンコの観察結果

## Appendix 3-1 Result of repropduction test

Test chemical:

SDP

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	38	0	0	32	0	0	22	0	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	51	51	51	83	83	83	105	105	105	105	130	130
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	24	0	0	35	0	0	32	0	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	32	32	32	67	67	67	99	99	99	99	121	121
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	29	0	0	28	0	0	22	0	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	40	40	40	68	68	68	90	90	90	90	111	111
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	30	0	0	32	0	0	27	0	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	42	42	42	74	74	74	101	101	101	101	123	123
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	40	0	0	36	0	0	23	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	44	44	44	80	80	80	103	103	103	103	126	126
6	P generation	Live	1	0																				
	F1 generation	Live	0	0																				
	Cumulative reproductivity		0	0																				--
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	42	0	0	36	0	0	24	0	0	18	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	53	53	53	89	89	89	113	113	113	131	131	131
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	20	20	0	44	0	0	0	26	0	0	27	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	30	50	50	94	94	94	94	120	120	120	147	147	147
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	39	0	0	29	0	0	19	1	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	52	52	52	81	81	81	100	101	101	101	121	121
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	38	0	0	31	0	0	24	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	50	50	50	81	81	81	105	105	105	105	129	129

-- : Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

## Appendix 3-2 Result of repropduction test

Test chemical: SDP

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	35	0	0	32	0	0	27	0	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	47	47	47	79	79	79	106	106	106	106	127	127
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	36	0	0	33	0	0	24	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	44	44	44	77	77	77	101	101	101	101	125	125
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	35	0	0	35	0	0	22	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	43	43	43	78	78	78	100	100	100	100	123	123
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	28	0	0	37	0	0	26	0	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	37	37	37	74	74	74	100	100	100	100	120	120
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	39	0	0	30	0	0	22	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	49	49	49	79	79	79	101	101	101	101	125	125
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	43	0	0	24	0	0	0	25	0	0	8	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	57	57	57	81	81	81	81	106	106	106	114	114
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	43	0	0	35	0	0	31	0	0	0	8	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	51	51	51	86	86	86	117	117	117	117	125	125
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	31	0	0	38	0	0	27	0	0	0	9	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	43	43	43	81	81	81	108	108	108	108	117	117
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	31	0	0	29	0	0	27	0	0	0	8	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	41	41	41	70	70	70	97	97	97	97	105	105
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	43	0	0	30	0	0	25	0	0	0	9	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	52	52	52	82	82	82	107	107	107	107	116	116

## Appendix 3-3 Result of reproduction test

Test chemical: SDP

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	37	0	0	17	0	0	25	0	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	45	45	45	62	62	62	87	87	87	87	114	114
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	22	1	0	26	0	0	23	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	31	32	32	58	58	58	81	81	81	81	104	104
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	32	0	0	32	0	0	26	0	0	25	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	42	42	42	74	74	74	100	100	100	125	125	125
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	45	0	0	34	0	0	25	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	57	57	57	91	91	91	116	116	116	142	142	142
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	41	0	0	21	0	0	25	0	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	51	51	51	72	72	72	97	97	97	97	124	124
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	39	0	0	24	0	0	24	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	49	49	49	73	73	73	97	97	97	97	120	120
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	43	0	0	29	0	0	25	0	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	52	52	52	81	81	81	106	106	106	106	132	132
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	41	0	0	18	0	0	22	0	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	55	55	55	73	73	73	95	95	95	95	121	121
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	1	23	0	0	25	0	0	33	0	0	29	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	11	34	34	34	59	59	59	92	92	92	121	121	121
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	26	0	0	31	0	0	16	0	0	0	29	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	30	30	30	61	61	61	77	77	77	77	106	106

## Appendix 3-4 Result of repropduction test

Test chemical: SDP

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	39	0	0	29	0	0	30	1	0	24	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	50	50	50	79	79	79	109	110	110	134	134	134
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	27	0	0	34	0	0	29	0	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	35	35	35	69	69	69	98	98	98	98	125	125
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	39	0	0	31	0	0	29	0	0	23	3	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	46	46	46	77	77	77	106	106	106	129	132	132
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	35	0	0	31	0	0	25	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	46	46	46	77	77	77	102	102	102	102	126	126
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	40	0	0	27	0	0	31	0	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	53	53	53	80	80	80	111	111	111	111	139	139
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	32	0	0	21	0	0	13	0	0	0	6	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	43	43	43	64	64	64	77	77	77	77	83	83
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0											
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	16											
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	27											--
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	16	0	0	40	0	0	31	0	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	26	26	26	66	66	66	97	97	97	97	125	125
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	35	0	0	0	30	0	0	26	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	45	45	45	45	75	75	75	101	101	101	125	125
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	31	0	0	22	0	0	27	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	40	40	40	62	62	62	89	89	89	89	113	113

-- : Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

## Appendix 3-5 Result of reproduction test

Test chemical: SDP

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	2	29	0	0	29	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	16	45	45	45	74	74	74	99	99
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	34	0	0	32	0	0	30	0	0	1	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	43	43	43	75	75	75	105	105	105	106	132	132
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	37	0	0	28	0	0	25	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	44	44	44	72	72	72	97	97	97	97	121	121
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	24	0	0	27	0	0	26	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	34	34	34	61	61	61	87	87	87	87	110	110
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	22	0	0	18	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	45	45	45	63	63	63	63	87	87
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	0	2	38	0	0	27	0	0	26	0	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	8	46	46	46	73	73	73	99	99	99	99	123	123
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	44	0	0	29	0	0	26	0	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	5	5	49	49	49	78	78	78	104	104	104	104	130	130
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	19	5	0	35	1	0	28	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	20	25	25	60	61	61	89	89	89
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	32	0	0	31	0	0	20	0	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	37	37	37	68	68	68	88	88	88	88	113	113
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	31	0	0	30	0	0	23	0	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	38	38	38	68	68	68	91	91	91	91	113	113



## Appendix 3-6 Result of repropduction test

Test chemical: SDP

(Concentration 5)

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

-- : Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.