

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

9, 10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：9 B 4 8 2 G)

2000年 6月30日 作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

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

修正番号：01

試験報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：9,10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号：9B482G

修正内容

修正箇所：21頁 Figure 2 (図中に0.400 mg/L区のデータ表示がされていない)

理由

データ表示不足

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2002年 2月 1日 作成 試験責任者

2002年 2月 1日 確認 信頼性保証業務担当者

2002年 2月 1日 承認 運営管理者

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： 9,10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 8 2 G

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

2000年 6月30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： 9,10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 8 2 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 30日	2000年 5月30日
	2000年 6月 20日	2000年 6月20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： 9, 10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： 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)
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30日～2000年 6月20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 試験液の水溫, 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	35~42

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

9, 10-アントラキノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

9 B 4 8 2 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： 9, 10-アントラキノン
- 2) 暴露方式： 半止水式 (24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, 助剤対照区, 0.020, 0.042, 0.089, 0.190, 0.400*¹ mg/L

公比：2.1

助剤濃度一定：100 mg/L (テトラヒドローラン使用)

*) 分散可能最高濃度

- 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： HPLC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) : > 0.333 mg/L

(95%信頼限界 : 算出不可)

50% 繁殖阻害濃度 (EC50) : > 0.333 mg/L

(95%信頼限界 : 算出不可)

最大無作用濃度 (NOEC) : > 0.333 mg/L

最小作用濃度 (LOEC) : > 0.333 mg/L

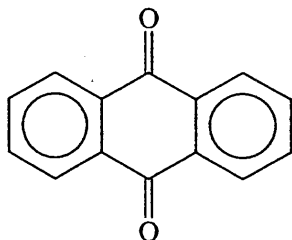
1 被験物質

1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称: 9, 10-アントラキノン (ATQ)

CAS No: 84-65-1

構造式:



分子式: $C_{14}H_8O_2$

分子量^{*1}: 208.2

沸点^{*1}: 379~381℃

融点^{*1}: 286℃

水溶解度: 0.257 mg/L (室温) (当社測定値)

比重^{*1}: 1.4 (20℃)

オクタノール/水分配係数 (log P) ^{*1}: 3.39

安定性^{*2}: 通常の取扱条件下で安定, 酸化剤との接触に注意

その他^{*2}: 生分解性良好

*1: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed.

ed. by Verschueren, K., Von Nostrand Reinhold Company, New York (1996)

*2: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 99.4% (GC法)

ロット番号^{*1}: FGB01

供給者: XXXXXXXXXX

供給量^{*1}: 50 g

入手日: 1999年9月3日

外観^{*1}: 淡黄色粉体

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質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 10 日～2000 年 5 月 30 日
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 5% 未満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（24 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 クールニット 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：> 0.400 mg/L）に基づき，0.400 mg/L（分散可能最高濃度）のみの限度試験を実施したが，暴露開始15日目に 0.400 mg/L 区の親ミジンコが全滅した。突然の死亡で，操作手違い等の原因を追求したが不明であったため，本試験濃度を 公比 2.1 で5段階に設定した。各濃度区は以下の通りである。

対照区，助剤対照区，0.020，0.042，0.089，0.190，0.400^{*)} mg/L

*) 分散可能最高濃度

3.5 試験液の調製

被験物質を 100 mg 秤取し、テトラヒドロフランで溶解して 25 mL に定容し、被験物質濃度 4000 mg/L の原液（第 5 濃度区用）を調製した。この原液をさらにテトラヒドロフランで希釈して、第 1～第 4 濃度区それぞれの試験濃度の 10000 倍となるように調製し、各濃度区用の原液とした。同時に被験物質を含まないテトラヒドロフランを助剤原液とした。

試験区には、1000mL のメスフラスコに希釈水を入れ、上記各濃度区用被験物質原液を 0.100 mL ずつ添加して調製したもの（助剤濃度：100 mg/L）を用いた。1 濃度区につき 10 個の試験容器に 80 mL ずつ分注して、試験に用いた。

助剤対照区には、被験物質を含まないもの（助剤濃度：100 mg/L）を調製した。

対照区には、希釈水のみを用いた。

3.6 試験液の分析

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（0.020 および 0.200 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もので, 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%以上の繁殖阻害が認められなかったもので, 算出不可能であった。

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, 各濃度区と助剤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。

対照区および助剤対照区における親ミジンコの死亡率は暴露終了時で共に 0% 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0%であった。

なお、暴露開始6日後の 0.089 mg/L 区 No. 10 容器において、ミジンコを移しかえ時、誤って落下させたため、この容器の結果は欠測値とした。

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。

対照区および助剤対照区における親ミジンコの初産日は、助剤対照区の1頭のみ 暴露開始11日後であったが、他は全て暴露開始 9日以内であり、正常な範囲内と判断された。最高濃度区においては、暴露開始 8日後であった。

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。

対照区および助剤対照区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数はそれぞれ114頭および98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平均累積産仔数は、100頭であった。

休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、対照区、助剤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 : > 0.333 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。

本試験では、最高濃度区においても50%以上の繁殖阻害が認められなかったため、EC50の算出は不可能であった。したがって、EC50を 最高濃度区以上と表記した。

21日間 EC50 : > 0.333 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

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 : > 0.333 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

21日間 LOEC : > 0.333 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

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°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 ($6.0 \sim 9.0$ 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	1 Old	8 New	9 Old	14 New	15 Old		
Control		<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	—	—
Solvent control		<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	—	—
0.020		0.022	0.017	0.021	0.021	0.020	0.017	0.020	100
0.042		0.042	0.037	0.044	0.041	0.037	0.036	0.039	93
0.089		0.095	0.081	0.098	0.104	0.082	0.079	0.090	101
0.190		0.186	0.162	0.199	0.176	0.198	0.158	0.179	94
0.400		0.388	0.280	0.475	0.282	0.366	0.240	0.333	83

Table 1-2 Measured Concentrations as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 New	1 Old	8 New	9 Old	14 New	15 Old
0.020		110	85	105	105	100	85
0.042		100	88	105	98	88	86
0.089		107	91	110	117	92	89
0.190		98	85	105	93	104	83
0.400		97	70	119	71	92	60

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

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

*: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

	Concentration (mg/L)			% of Nominal		
	Min.		Max.	Min.		Max.
New	0.020	~	0.475	88	~	119
Old	0.017	~	0.282	60	~	117

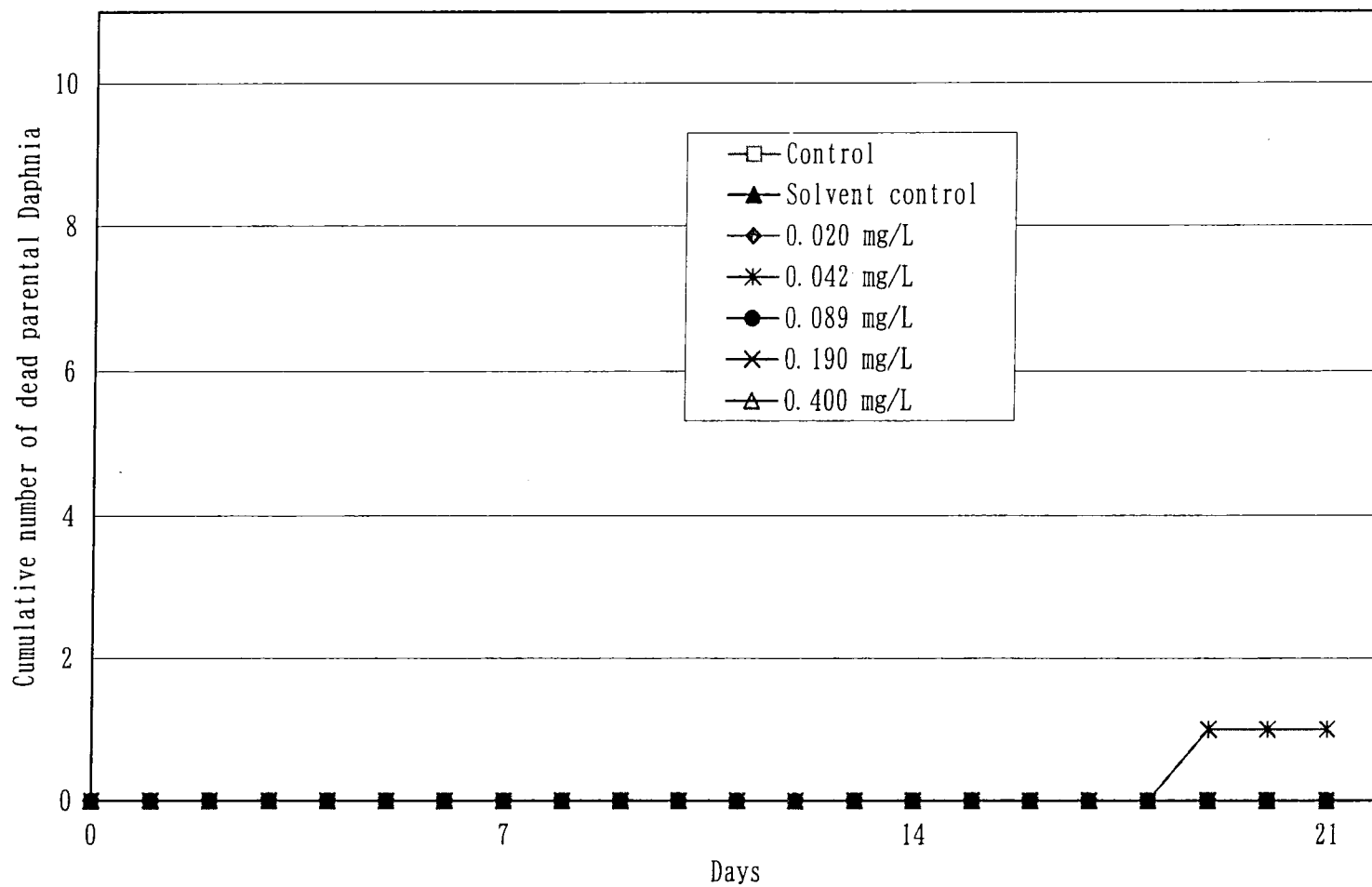
Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solvent control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.020 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.042 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.089 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.190 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.400 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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

Nominal conc.	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
Solvent control	0	0	0	0	0	0
0.020 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.042 mg/L	0	0	0	0	0	10
0.089 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.190 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.400 mg/L	0	0	0	0	0	0

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	Solvent control	0.020 (0.020)	0.042 (0.039)	0.089 (0.090)	0.190 (0.179)	0.400 (0.333)
1	8	8	8	8	8	8	8
2	8	8	8	8	8	8	8
3	8	8	11	8	8	8	8
4	8	9	8	8	8	8	8
5	8	8	8	8	8	8	8
6	8	8	8	8	8	8	8
7	8	8	8	8	8	8	8
8	8	8	11	8	8	8	8
9	8	8	8	8	8	8	8
10	8	11	8	8	M	8	8
Min	8	8	8	8	8	8	8
Max	8	11	11	8	8	8	8

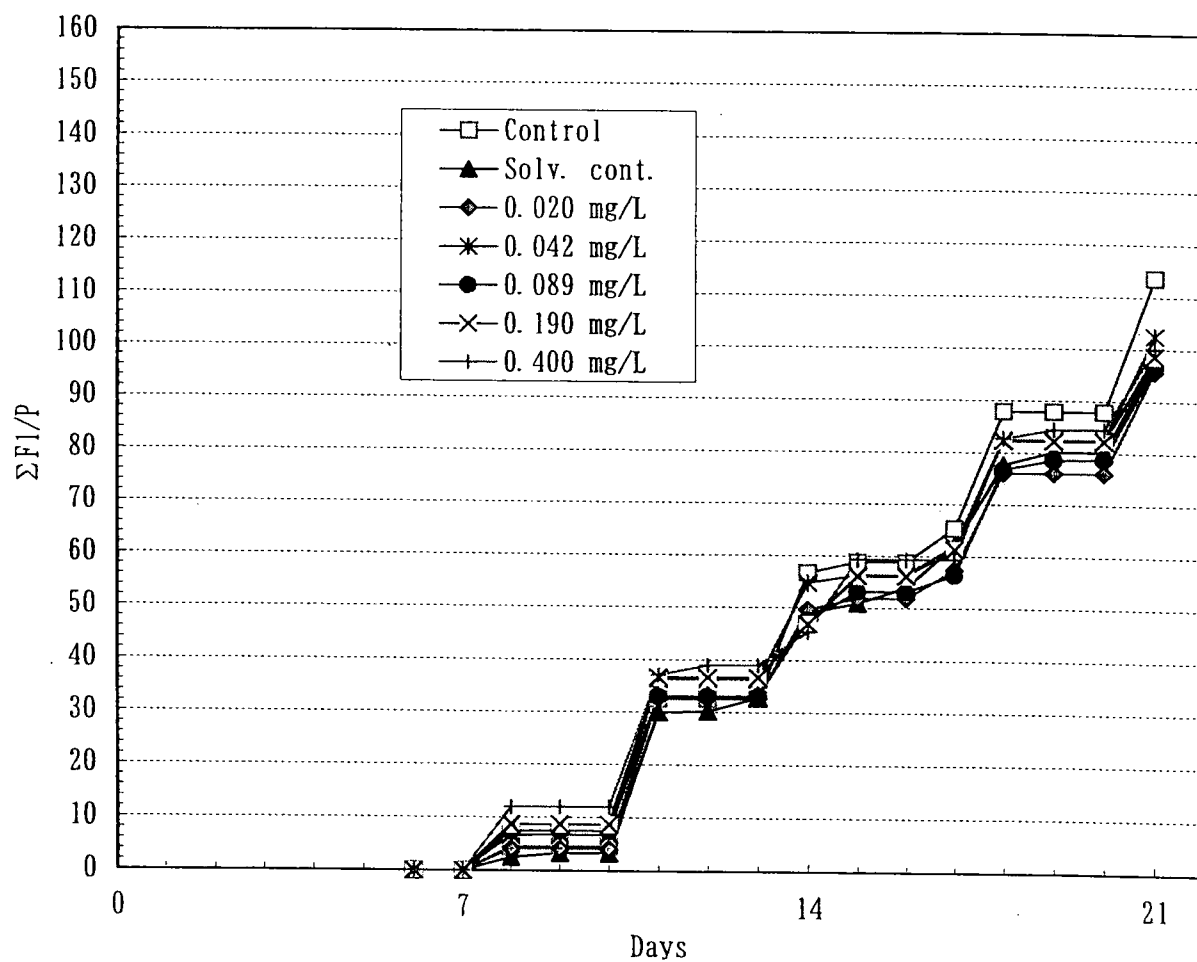
*1: Time-weighted mean measured concentration.

M: Was treated as a missing value because the adult was dropped out of the glass before first brood production.

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	4.5	4.6	4.6	32.6	32.6	32.6	56.7	58.9	58.9	65.4	87.9	87.9	87.9	113.6
Solv. cont.	0.0	0.0	2.5	3.3	3.3	30.0	30.2	32.8	49.0	50.9	54.0	61.9	77.7	80.2	80.2	97.8
0.020 mg/L	0.0	0.0	4.1	4.1	4.1	32.7	32.7	32.7	49.7	51.9	51.9	57.4	76.1	76.1	76.1	95.7
0.042 mg/L	0.0	0.0	6.7	6.8	6.8	36.3	36.3	36.3	54.8	56.4	56.4	62.0	82.6	82.6	82.6	102.6
0.089 mg/L	0.0	0.0	7.6	7.6	7.6	33.1	33.1	33.1	47.8	53.2	53.2	56.3	76.8	78.7	78.8	96.6
0.190 mg/L	0.0	0.0	8.7	8.7	8.7	36.7	36.7	36.7	47.0	56.2	56.2	61.3	82.3	82.3	82.3	98.7
0.400 mg/L	0.0	0.0	12.0	12.0	12.0	37.1	39.0	39.0	45.4	59.4	59.4	59.4	82.7	84.5	84.6	100.1

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

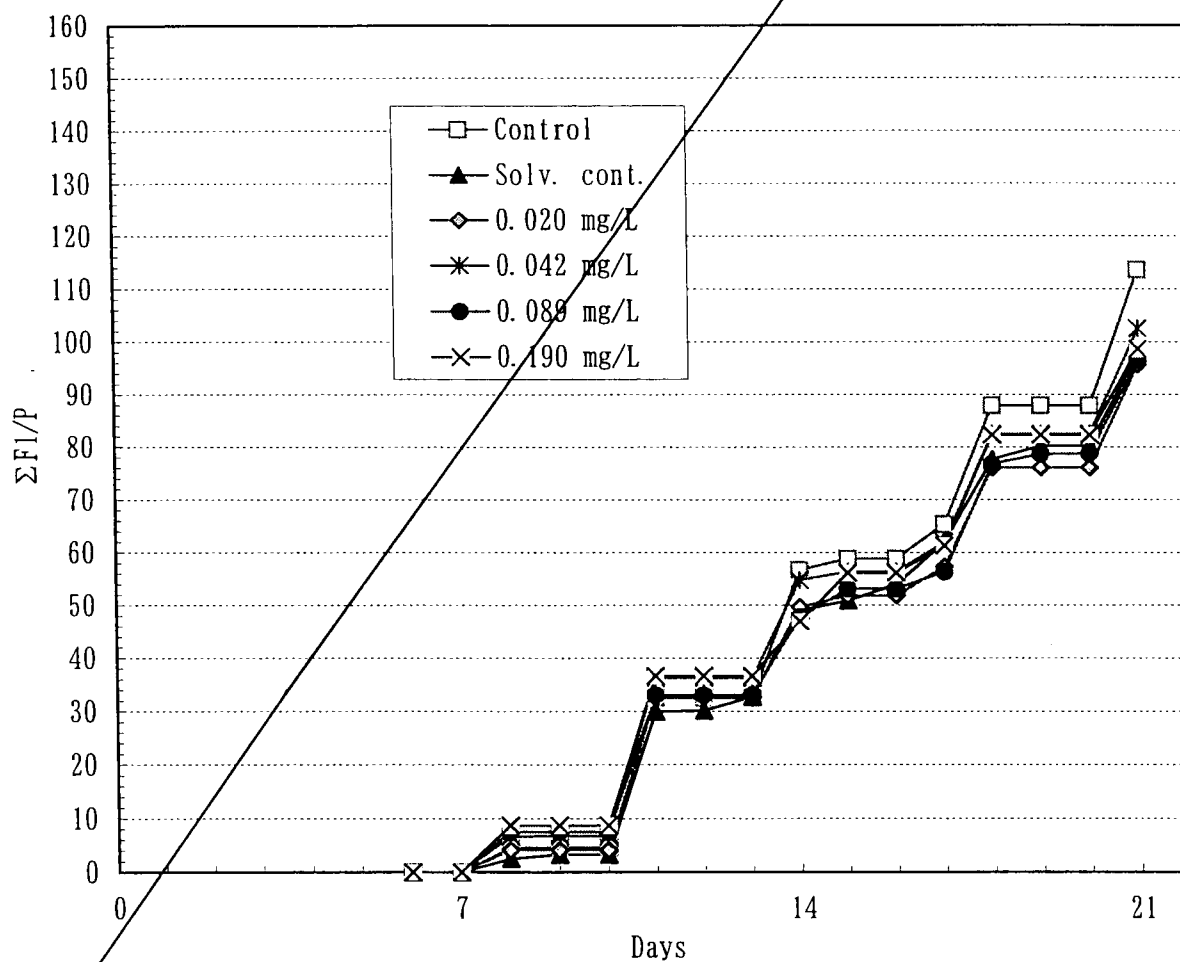


Values in legend are given in the nominal concentration.

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	4.5	4.6	4.6	32.6	32.6	32.6	56.7	58.9	58.9	65.4	87.9	87.9	87.9	113.6	
Solv. cont.	0.0	0.0	2.5	3.3	3.3	30.0	30.2	32.8	49.0	50.9	54.0	61.9	77.7	80.2	80.2	97.8	
0.020 mg/L	0.0	0.0	4.1	4.1	4.1	32.7	32.7	32.7	49.7	51.9	51.9	57.4	76.1	76.1	76.1	95.7	
0.042 mg/L	0.0	0.0	6.7	6.8	6.8	36.3	36.3	36.3	54.8	56.4	56.4	62.0	82.6	82.6	82.6	102.6	
0.089 mg/L	0.0	0.0	7.6	7.6	7.6	33.1	33.1	33.1	47.8	53.2	53.2	56.3	76.8	78.7	78.8	96.6	
0.190 mg/L	0.0	0.0	8.7	8.7	8.7	36.7	36.7	36.7	47.0	56.2	56.2	61.3	82.3	82.3	82.3	98.7	
0.400 mg/L	0.0	0.0	12.0	12.0	12.0	37.1	39.0	39.0	45.4	59.4	59.4	59.4	82.7	84.5	84.6	100.1	

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 ^{*1} (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	>0.333	-- -- --	--

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

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50 ^{*1} (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	>0.333	-- -- --	--

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

The LC50 and EC50 values and their associated 95% confidence limits could not be determined by statistical methods because the mortality of parental *Daphnia* and the reproduction inhibition rates at the maximum concentration level were less than 50%.

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	Solv. cont.	0.020 (0.020)	0.042 (0.039)	0.089 (0.090)	0.190 (0.179)	0.400 (0.333)
1	90	86	78	70	67	77	66
2	112	96	99	104	113	112	92
3	116	106	64	111	118	108	103
4	117	91	111	108	115	109	137
5	114	115	112	109	124	101	107
6	115	71	108	D	55	80	105
7	106	96	103	100	74	92	81
8	116	103	86	110	113	91	112
9	114	113	101	95	90	107	113
10	136	101	95	116	M	110	85
Mean	113.6	97.8	95.7	102.6	96.6	98.7	100.1
S. D.	11.3	13.1	15.5	13.7	25.6	12.9	19.9
Inhibition rate (%)			2.1	-4.9	1.3	-0.9	-2.4
Significant difference			-	-	-	-	-

*1: Time-weighted mean measured concentration.

M: Was treated as a missing value because the adult was dropped out of the glass after 6 days exposure.

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 solvent control.
(There was no sign in this test.)

** : Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the solvent control.
(There was no sign in this test.)

No Observed Effect Concentration (NOEC): $\underline{\underline{> 0.333}}$ mg/L

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): $\underline{\underline{> 0.333}}$ 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	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.1	20.6
Solvent control		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.1	20.6
0.020		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.1	20.6
0.042		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.1	20.6
0.089		20.1	20.0	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.0	20.6
0.190		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.3	20.2	20.2	20.1	20.6
0.400		20.1	20.1	20.3	20.2	20.6	20.4	20.2	20.2	20.1	20.6
Total										20.0	20.6

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	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		8.5	8.3	8.6	8.1	8.5	7.6	8.6	7.4	7.4	8.6
Solvent control		8.5	8.4	8.7	8.0	8.3	8.1	8.6	7.8	7.8	8.7
0.020		8.7	8.4	8.8	7.9	8.3	7.9	8.7	7.8	7.8	8.8
0.042		8.6	8.5	8.5	8.2	8.3	8.0	8.6	7.9	7.9	8.6
0.089		8.5	8.5	8.6	8.0	8.3	8.2	8.7	7.9	7.9	8.7
0.190		8.4	8.5	8.7	8.2	8.5	8.1	8.7	7.9	7.9	8.7
0.400		8.4	8.5	8.7	8.2	8.6	7.9	8.8	7.8	7.8	8.8
Total										7.4	8.8

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	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		8.4	8.2	8.6	8.0	8.1	7.1	7.9	7.4	7.1	8.6
Solvent control		8.7	8.5	8.6	7.9	8.1	7.4	8.0	7.4	7.4	8.7
0.020		8.7	8.5	8.6	7.9	8.2	7.2	8.0	7.4	7.2	8.7
0.042		8.7	8.6	8.7	8.1	8.2	7.3	8.1	7.5	7.3	8.7
0.089		8.7	8.6	8.7	8.1	8.2	7.4	8.1	7.5	7.4	8.7
0.190		8.7	8.6	8.7	8.1	8.2	7.3	8.1	7.5	7.3	8.7
0.400		8.7	8.5	8.7	8.1	8.2	7.3	8.1	7.4	7.3	8.7
		Total								7.1	8.7

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

Table 11 Total Hardness (as CaCO₃) during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO ₃ , mg/L)								Min.	Max.
		0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		215	215	210	215	220	210	215	210	210	220
Solvent control		210	220	215	215	220	210	215	205	205	220
0.020		210	210	215	220	220	210	215	205	205	220
0.042		210	210	215	215	215	205	215	205	205	215
0.089		210	215	210	215	220	215	215	215	210	220
0.190		210	210	210	210	215	210	215	210	210	215
0.400		215	210	215	220	220	210	220	205	205	220
		Total								205	220

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
NaHCO_3	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
NaNO_3	0.274	mg /L
KH_2PO_4	0.143	mg /L
K_2HPO_4	0.184	mg /L
Trace elements	Concentration	Unit
H_3BO_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
ZnCl_2	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
Na_2SeO_3	2.19	$\mu\text{g/L}$
NH_4VO_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（0.020 および 0.200 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：	日立製作所製 L-7000型（No.1）
ワークステーション：	Windows NT及びD-7000型HPLCシステムマネージャ
パソコン：	COMPAQ PROLINEA 590, ディスプレイ； 171FS
プリンター：	Canon LASER SHOT LBP-A404F
送液ポンプ：	L-7100型（2台）
オートサンプラ：	L-7200型
カラムオープン：	L-7300型
検出器：	L-7400型
データ処理装置：	D-7000型

（条件）

カラム：	Inertsil ODS-3V, 5 μ m, 4.6 x150 mm（GL Sciences Inc.）
溶離液：	Acetonitrile 80 %, Water 20 %
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	251 nm
試料注入量：	20 μ L
カラムオープン温度：	40℃

3 検量線

被験物質の 10 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て 0, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200, 0.500, 1.00 mg/Lの標準溶液を調製し、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 100 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.002 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	0.010	995
3	0.020	1964
4	0.050	5088
5	0.100	10282
6	0.200	21298
7	0.500	54260
8	1.00	107263

$$Y = 107,432X$$

$$r = 1.000$$

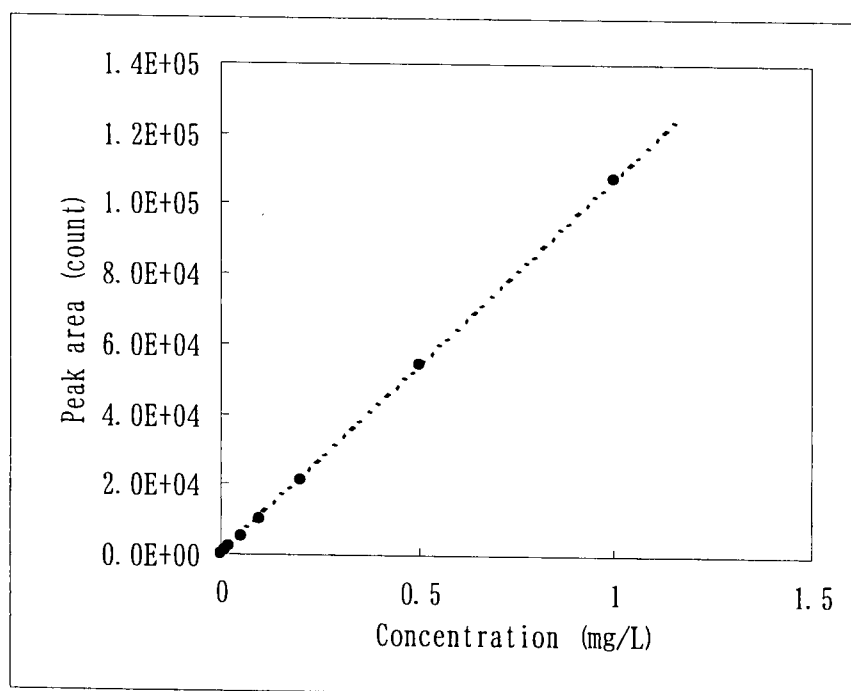
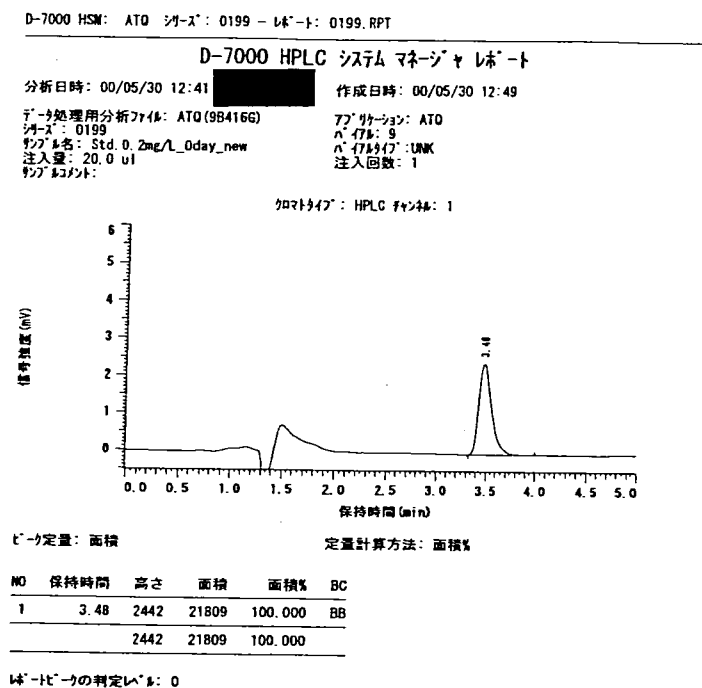


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.200 mg/L ; Day 0



(2) Solvent Control ; Day 0

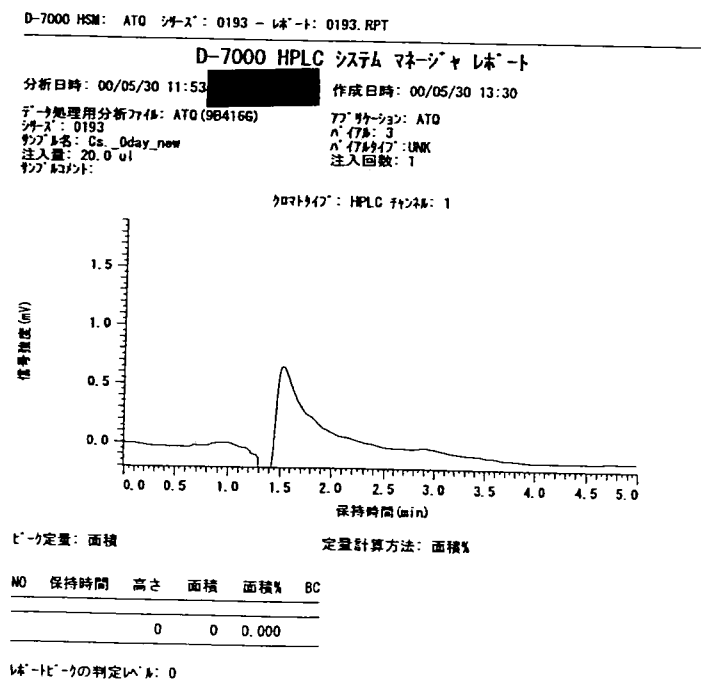
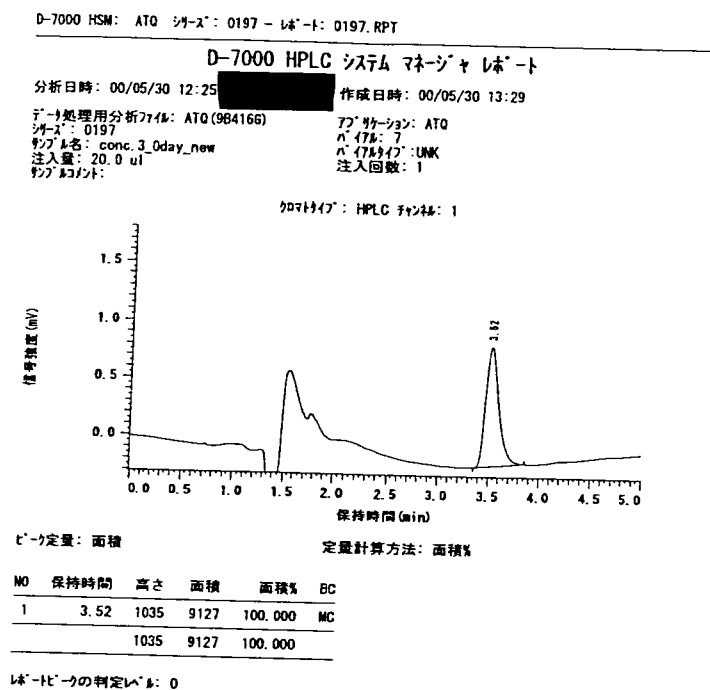


Figure A-2-2 Continued

(3) 0.089 mg/L nominal ; Day 0



(4) Standard 0.200 mg/L ; Day 1

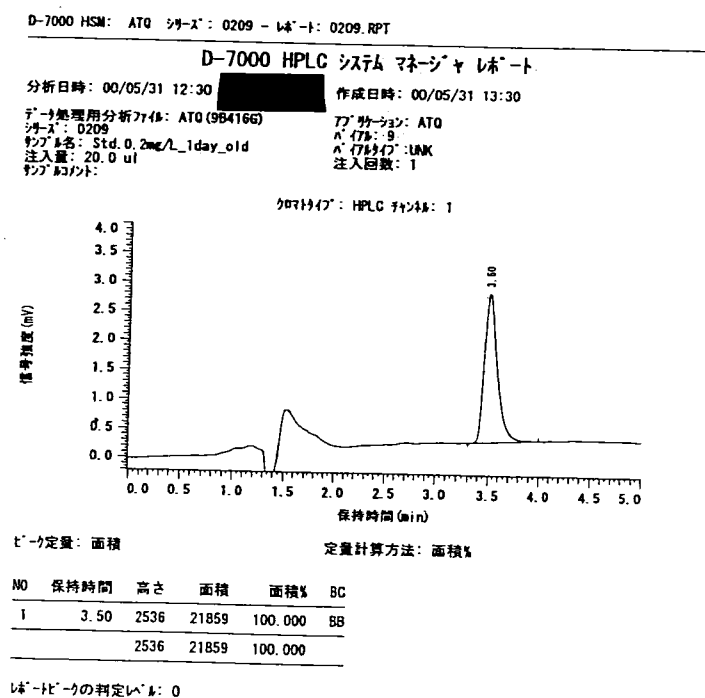
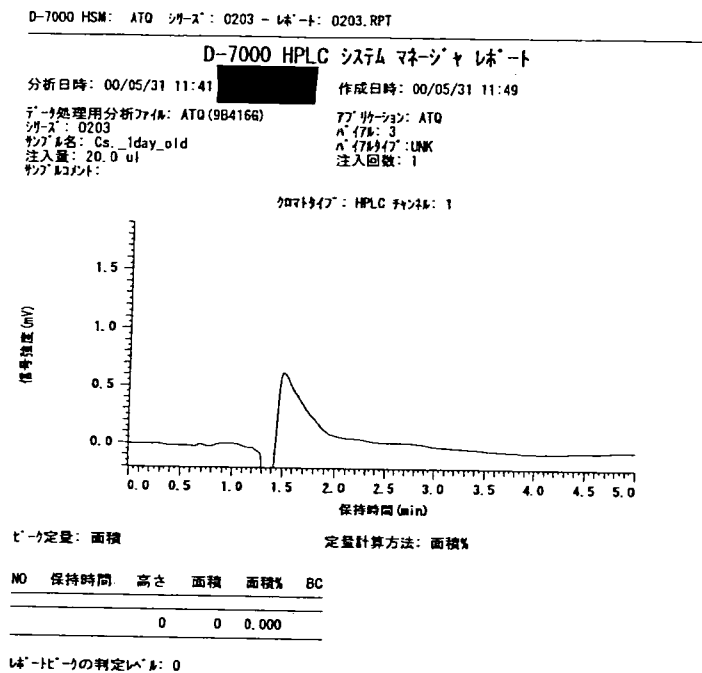
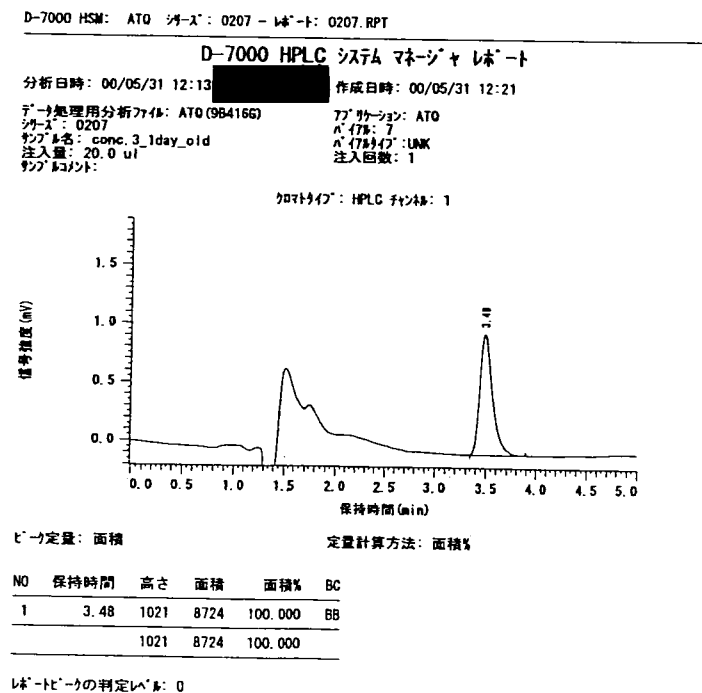


Figure A-2-2 Continued

(5) Solvent Control ; Day 1



(6) 0.089 mg/L nominal ; Day 1



付属資料－3

ミジンコの観察結果

Appendix 3-1 Result of reproduction test

Test chemical: ATQ

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	
			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	4	0	0	3	0	0	0	22	0	0	34	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	7	7	7	7	29	29	29	63	63	63	90	90
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	4	0	0	30	0	0	29	0	0	0	29	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	34	34	34	63	63	63	63	92	92	92	112	112
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	4	0	0	23	0	0	25	0	0	0	24	0	0	40	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	27	27	27	52	52	52	52	76	76	76	116	116
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	1	0	31	0	0	26	0	0	5	23	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	11	11	42	42	42	68	68	68	73	96	96	96	117	117
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	2	0	0	30	0	0	29	0	0	28	0	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	32	32	32	61	61	61	89	89	89	89	114	114
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	4	0	0	36	0	0	23	0	0	0	28	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	40	40	40	63	63	63	63	91	91	91	115	115
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	3	0	0	30	0	0	25	0	0	0	26	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	33	33	33	58	58	58	58	84	84	84	106	106
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	5	0	0	29	0	0	28	0	0	0	29	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	34	34	34	62	62	62	62	91	91	91	116	116
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	4	0	0	30	0	0	26	0	0	0	30	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	34	34	34	60	60	60	60	90	90	90	114	114
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	5	0	0	38	0	0	30	0	0	32	2	0	0	29	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	43	43	43	73	73	73	105	107	107	107	136	136

Appendix 3-2 Result of repropduction test

Test chemical: ATQ

(Solvent control)

Rep. No.	Counts		Time																				Total
			5/31 1 d	6/1 2 d	6/2 3 d	6/3 4 d	6/4 5 d	6/5 6 d	6/6 7 d	6/7 8 d	6/8 9 d	6/9 10 d	6/10 11 d	6/11 12 d	6/12 13 d	6/13 14 d	6/14 15 d	6/15 16 d	6/16 17 d	6/17 18 d	6/18 19 d	6/19 20 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	4	0	0	26	0	0	6	0	0	0	29	0	0	21
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	30	30	30	36	36	36	36	65	65	65	86
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	2	0	0	32	0	0	17	0	0	26	0	0	0	19
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	34	34	34	51	51	51	77	77	77	77	96
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	1	0	0	31	0	0	22	0	0	0	29	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	32	32	32	54	54	54	54	83	83	83	106
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	7	0	0	2	26	0	0	31	0	0	25	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	9	35	35	35	66	66	66	91	91	91
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	6	0	0	34	0	0	27	0	0	0	22	0	0	26
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	40	40	40	67	67	67	67	89	89	89	115
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	5	0	0	22	0	0	0	19	0	0	25	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	27	27	27	27	46	46	46	71	71	71	71
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	1	0	0	30	0	0	15	0	0	0	28	0	0	22
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	31	31	31	46	46	46	46	74	74	74	96
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	4	1	0	32	0	0	19	0	0	0	24	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	5	5	37	37	37	56	56	56	56	80	80	80	103
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	2	0	0	36	0	0	29	0	0	23	0	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	38	38	38	67	67	67	90	90	90	90	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	0	0	0	24	0	0	27	0	0	30	1	0	0	19
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	51	51	51	81	82	82	82	101

Appendix 3-3 Result of reproduction test

Test chemical: ATQ

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	
		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	6	0	0	29	0	0	0	22	0	0	21	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	35	35	35	35	57	57	57	78	78	78	78
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	4	0	0	29	0	0	18	0	0	0	22	0	0	26
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	33	33	33	51	51	51	51	73	73	73	99
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	13	0	0	6	0	0	0	20	0	0	25
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	19	19	19	19	39	39	39	64
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	5	0	0	32	0	0	26	0	0	0	26	0	0	22
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	37	37	37	63	63	63	63	89	89	89	111
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	9	0	0	30	0	0	25	0	0	27	0	0	0	21
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	39	39	39	64	64	64	91	91	91	91	112
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	4	0	0	33	0	0	24	0	0	28	0	0	0	19
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	37	37	37	61	61	61	89	89	89	89	108
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	6	0	0	33	0	0	18	0	0	0	27	0	0	19
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	39	39	39	57	57	57	57	84	84	84	103
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	30	0	0	13	0	0	0	24	0	0	19
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	30	30	43	43	43	43	67	67	67	86
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	3	0	0	29	0	0	22	0	0	0	24	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	32	32	32	54	54	54	54	78	78	78	101
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	28	0	0	18	0	0	0	23	0	0	22
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	32	32	32	50	50	50	50	73	73	73	95

Appendix 3-4 Result of reproduction test

Test chemical: ATQ

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	
			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	4	0	0	27	0	0	0	15	0	0	24	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	31	31	31	31	46	46	46	70	70	70	70	70
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	6	0	0	28	0	0	13	0	0	0	30	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	34	34	34	47	47	47	47	77	77	77	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	9	0	0	29	0	0	26	0	0	26	0	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	38	38	38	64	64	64	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	11	0	0	30	0	0	17	0	0	0	25	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	41	41	41	58	58	58	58	83	83	83	108	108
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	5	0	0	31	0	0	29	0	0	24	0	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	36	36	36	65	65	65	89	89	89	89	109	109
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0	32	0	0	18	0	0	0	28	0			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	8	8	40	40	40	58	58	58	58	86	86			--
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	2	0	0	30	0	0	20	0	0	0	29	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	32	32	32	52	52	52	52	81	81	81	100	100
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	5	1	0	30	0	0	27	0	0	0	24	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	6	6	36	36	36	63	63	63	63	87	87	87	110	110
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	9	0	0	27	0	0	14	0	0	0	27	0	0	18	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	36	36	36	50	50	50	50	77	77	77	95	95
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	34	0	0	20	0	0	0	26	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	43	43	43	63	63	63	63	89	89	89	116	116

-- : 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: ATQ

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts		Time																				Total	
			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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19		6/20
			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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	15	0	0	15	3	0	0	26	0	0	0	1
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	22	22	22	37	40	40	40	66	66	66	67	67
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	30	0	0	21	0	0	0	29	0	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	40	40	40	61	61	61	61	90	90	90	113	113
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	32	0	0	24	0	0	28	0	0	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	43	43	43	67	67	67	95	95	95	95	118	118
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	30	0	0	24	0	0	0	30	0	0	0	25
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	36	36	36	60	60	60	60	90	90	90	115	115
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	32	0	0	16	4	0	0	32	0	0	0	28
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	44	44	44	60	64	64	64	96	96	96	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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	17	0	0	9	0	0	0	4	0	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	19	19	19	28	28	28	28	32	32	32	55	55
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	20	0	0	0	23	0	0	5	17	1	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	28	28	28	28	51	51	51	56	73	74	74	74
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	31	0	0	23	0	0	0	30	0	0	0	23
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	37	37	37	60	60	60	60	90	90	90	113	113
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	23	0	0	0	19	0	0	28	0	0	0	14
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	29	29	29	29	48	48	48	76	76	76	90	90
10	P generation	Live																						
	F1 generation	Live																						
	Cumulative reproductivity																							M

M: Was treated as a missing value because the adult was dropped out of the glass after 6 days exposure.

Appendix 3-6 Result of repropduction test

Test chemical: ATQ

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts		Time																				Total	
			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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19		6/20
			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	10	0	0	26	0	0	0	15	0	0	26	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	36	36	36	36	51	51	51	77	77	77	77	77
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	7	0	0	30	0	0	0	23	0	0	26	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	37	37	37	37	60	60	60	86	86	86	112	112
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	31	0	0	24	0	0	23	0	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	39	39	39	63	63	63	86	86	86	86	108	108
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	7	0	0	28	0	0	24	0	0	0	25	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	35	35	35	59	59	59	59	84	84	84	109	109
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	3	0	0	27	0	0	23	0	0	28	0	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	30	30	30	53	53	53	81	81	81	81	101	101
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	16	0	0	27	0	0	0	12	0	0	25	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	43	43	43	43	55	55	55	80	80	80	80	80
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	7	0	0	30	0	0	4	4	0	0	24	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	37	37	37	41	45	45	45	69	69	69	92	92
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	13	0	0	29	0	0	0	22	0	0	27	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	42	42	42	42	64	64	64	91	91	91	91	91
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	9	0	0	24	0	0	21	0	0	0	28	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	33	33	33	54	54	54	54	82	82	82	107	107
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	28	0	0	7	16	0	0	29	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	35	35	35	42	58	58	58	87	87	87	110	110

Appendix 3-7 Result of reproduction test

Test chemical: ATQ

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			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	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	
			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	0	19	0	0	16	0	0	0	18	1	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	12	31	31	31	47	47	47	47	65	66	66	66
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	16	0	0	26	0	0	0	23	0	0	27	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	42	42	42	42	65	65	65	92	92	92	92	92
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	9	0	0	15	0	0	20	0	0	0	31	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	24	24	24	44	44	44	44	75	75	75	103	103
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	15	0	0	31	0	0	0	29	0	0	31	0	0	31	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	46	46	46	46	75	75	75	106	106	106	137	137
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	31	0	0	22	0	0	0	23	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	41	41	41	63	63	63	63	86	86	86	107	107
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	13	0	0	30	0	0	13	0	0	0	24	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	43	43	43	56	56	56	56	80	80	80	105	105
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	29	0	0	0	22	0	0	19	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	40	40	40	40	62	62	62	81	81	81	81	81
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	11	0	0	27	0	0	9	14	0	0	25	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	38	38	38	47	61	61	61	86	86	86	112	112
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	12	0	0	34	0	0	0	16	0	0	27	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	46	46	46	46	62	62	62	89	89	89	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	11	0	0	28	0	0	0	20	0	0	26	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	39	39	39	39	59	59	59	85	85	85	85	85