

環境省殿

## 最 終 報 告 書

Butanoic acid, 2-ethyl-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：92330)

2001 年 4 月 27 日作成

化学物質評価研究機構

水質汚濁対策部

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者： 環境省

表 題： Butanoic acid, 2-ethyl-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害  
試験

試験番号： 92330

本試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

運営管理者

2001 年 5 月 1 日

[Redacted signature area]

## 信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者： 環境省

表 題： Butanoic acid, 2-ethyl-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害  
試験

試験番号： 92330

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

監査又は査察内容	実施日	報告日(試験責任者)	報告日(運営管理者)
試験計画書監査	2000年12月25日	2000年12月25日	2000年12月25日
試験実施状況査察	2001年1月19日	2001年1月19日	2001年1月22日
試験実施状況査察	2001年2月2日	2001年2月13日	2001年2月13日
試験実施状況査察	2001年2月9日	2001年2月13日	2001年2月13日
最終報告書監査	2001年5月1日	2001年5月1日	2001年5月1日

2001年5月 / 日

信頼性保証業務担当者



## 試験実施概要

### 1 表 題

Butanoic acid, 2-ethyl-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

### 2 試験目的

Butanoic acid, 2-ethyl-について、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を21日間行い、繁殖状態に及ぼす最小作用濃度(LOEC)と最大無作用濃度(NOEC)を求め、できる限り産仔数を50%減少させると算定される濃度(50%繁殖阻害濃度：EC50)を求める。

### 3 試験方法

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

本試験は環境省のGLP規則に準拠した。

### 5 試験委託者

名 称： 環境省

住 所： (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験委託責任者： 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 [REDACTED]

### 6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構

住 所： (〒112-0004)東京都文京区後楽 1-4-25

### 7 試験施設

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構

実施施設名： 久留米事業所

住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： [REDACTED]

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

9 最終報告書の作成

2001年4月27日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

[REDACTED]

10 試験日程

試験開始日

2000年12月25日

試験終了日

2001年4月27日

暴露期間

2001年1月19日～2001年2月9日

11 記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、久留米事業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試験委託者と協議の上定める。

- 1) 試験計画書、同変更等の記録
- 2) 最終報告書
- 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 .....	1
1 被 験 物 質 .....	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	2
1.2 供 試 試 料 .....	2
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	3
2 試 験 生 物 .....	3
3 試 験 方 法 .....	4
3.1 試 験 条 件 .....	4
3.2 希 釈 水 .....	4
3.3 試験容器及び恒温槽等 .....	4
3.4 試験濃度の設定 .....	4
3.5 試験液の調製 .....	5
3.6 被験物質の分析 .....	5
3.7 試 験 操 作 .....	5
3.8 数値の取扱い .....	5
4 結果の算出 .....	6
4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出 .....	6
4.2 50%繁殖阻害濃度(EC50)の算出 .....	6
4.3 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC) .....	7
5 結果及び考察 .....	7
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....	7
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	7
5.3 ミジンコの観察結果 .....	7
5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50) .....	8
5.5 50%繁殖阻害濃度(EC50) .....	8
5.6 繁殖に及ぼす最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC) .....	8
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度 .....	9
5.8 試験液の状態 .....	9
Table 1～11 .....	10～19
Figure 1, 2 .....	20, 21
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	
付属資料－3 ミジンコの観察結果	

## 要 旨

試験委託者

環境省

表 題Butanoic acid, 2-ethyl-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

92330

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： Butanoic acid, 2-ethyl-
- 2) 試 験 生 物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生 物 数： 10頭／1試験区(1連に付き1頭で1試験区10頭)
- 4) 暴 露 期 間： 21日間
- 5) 暴 露 方 式： 半止水式(週に3回、試験液を交換)
- 6) 試 験 濃 度： 100、50.0、25.0、12.5及び6.25 mg/L(公比：2.0)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区に付き10連
- 8) 試 験 液 量： 1試験容器(1連)に付き80.0 mL
- 9) 試 験 水 温： 20±1℃
- 10) 照 明： 16時間明(1,200 lux以下)／8時間暗
- 11) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)  
(0、3、10、12、17及び19日目)

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の±20%を超えたため、各影響濃度の算出には測定濃度(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)：48.1 mg/L(95%信頼限界：33.4～83.3 mg/L)  
50%繁殖阻害濃度(EC50)：71.2 mg/L(95%信頼限界：48.9～101 mg/L)  
最大無作用濃度(NOEC)：48.9 mg/L  
最小作用濃度(LOEC)：101 mg/L





## 1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は久留米事業所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かった。

以上の結果から、被験物質は暴露終了時まで安定であったと確認された。

## 2 試験生物

- 1) 和 名： オオミジンコ
- 2) 学 名： *Daphnia magna* (Clone A)
- 3) 入 手 先： 英国Sheffield大学(所在地；Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)
- 4) 入 手 日： 1990 年 7 月 9 日
- 5) 入手後の管理： 継代飼育(最大飼育期間；31日間)
- 6) 感受性の確認： 基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)による48時間の半数遊泳阻害濃度(EiC50)=0.171 mg/L[久留米事業所における1998年1月以降のEiC50：0.128～0.296 mg/L(n=20)の範囲にある。]
- 7) 親の順化： 順化期間；2000 年 12 月 25 日～2001 年 1 月 19 日  
暴露開始前2週間の親の死亡率は5%以下で休眠卵及び雄の発生は認められなかった。(順化条件は以下に示す。)
- 8) 供 試 令： 生後24時間令以内の幼体

順化条件

- 1) 飼 育 水： 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼 育 密 度： 10～30頭／800 mL飼育水
- 3) 水 温： 20±1℃
- 4) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 5) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 6) 給 餌 量： ミジンコ1頭当たり0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。試験は、週に3回試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 連数： 1試験区に付き10連
- 4) 生物数： 10頭／1試験区(1連に付き1頭で1試験区10頭)
- 5) 試験液量： 1試験容器(1連)に付き80.0 mL
- 6) 試験水温：  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光、16時間明(1,200 lux以下)／8時間暗
- 8) 給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。

#### 3.2 希釈水

脱塩素水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気し、温度調節したもの)を使用した。希釈水使用時には、オルトトリジン法により、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。希釈水の水質は付属資料－1に示した。

#### 3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mLビーカー
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温が $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持可能な恒温槽を用いた。
- 3) 水温計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 4) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

#### 3.4 試験濃度の設定

急性遊泳障害試験の結果である48時間 $\text{EiC}_{50}$ (71.7 mg/L)及び本試験に先立ち行った予備試験の結果から、試験濃度は100 mg/Lを最高濃度として公比2.0で5濃度区(100、50.0、25.0、12.5及び6.25 mg/L)を設定した。また、希釈水のみの対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質に脱塩素水を加えて攪拌し、1,000 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と脱塩素水を混合し、調製した。この試験液を各試験容器に分割した。

### 3.6 被験物質の分析

全試験区(ただし、各1試験容器)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で採取し、換水前のものについては遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして餌を除いた後、HPLCにより分析した。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度5.00 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

試験生物を投入し、その時点暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて試験生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで暴露した。暴露期間中は毎日給餌を行った(3.1参照)。

#### ・ミジンコの観察：

(親ミジンコ) 毎日、生存数、遊泳阻害数、大きさと状態を対照区と比較して観察した。死亡した親ミジンコは計数後に取り除いた。

(産出幼体) 毎日、幼体の生死の数、墮胎卵及び休眠卵の発生等について観察した。計数後の幼体は取り除いた。最初の幼体産出日を記録した。

・水質測定： 水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度を全試験区(ただし、各1試験容器)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で測定した。硬度はEDTA滴定法により測定した。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401-1999 規則 Bによった。

#### 4 結果の算出

得られたデータを基に以下3項目の結果を算出した。結果の算出には、被験物質の測定濃度が設定の±20%を超えたため、測定濃度(時間加重平均値)を用いた。

##### 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、Moving average法により14及び21日目のLC50を算出した。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度(EC50)の算出

###### 累積産仔数の算出

各試験容器(親1頭当たり)の暴露期間中の累積産仔数(TF)及び平均累積産仔数( $\overline{TF}$ )を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} F_n$$

ここで、

$n$  : 幼体観察回数

$F_n$  :  $n$ 回目の幼体数(ただし、生存幼体)

$ne$  : 最終観察回

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

ここで、

$n$  : 試験容器数

$TF_n$  : 各試験容器(親1頭当たり)の累積産仔数

$m$  : 試験区当たりの系列数(最大10)

###### EC50の算出

Binomial法によりEC50を算出した。ただし、供試個体数に全試験区における最大平均累積産仔数(小数点以下切上げ)を、生存数に各濃度区での平均累積産仔数を適用して計算した。14及び21日目のEC50を算出し、それらの95%信頼限界も示した。

#### 4.3 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

4.2に示した方法で算出した各試験容器毎の親1頭当たりの累積産仔数について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無をKruskal-Wallisの順位和検定により求めた。また、親ミジンコの死亡数についてはKruskal-Wallisの順位和検定及びノンパラメトリックの多重比較法(Dunnett)、初産日についてはKruskal-Wallisの順位和検定により各濃度区と対照区との有意差の有無を求めた。この結果に観察された親並びに産出幼体の状態等も含めて、NOEC及びLOECを評価した。

### 5 結果及び考察

#### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する要因はなかった。

#### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露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。

被験物質の測定濃度の設定に対する割合は、調製時で98.8～103%、換水前で66.2～105%であった。

#### 5.3 ミジンコの観察結果

##### 親ミジンコの死亡数及び死亡率

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及び死亡率の結果をTable 2及びFigure 1に示した。

対照区での親ミジンコの累積死亡率は暴露終了時で10%であり、試験成立条件である20%を超えないという基準を満たした。

100 mg/L区では暴露終了時に100%の累積死亡率であり、対照区と比較して統計的に有意差( $p=0.01$ )が認められた。それ以外の濃度区では有意差は認められなかった。

##### 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。

対照区での親ミジンコの初産日は平均7.1日であり、正常な範囲内であった。

濃度区の親ミジンコの初産日は平均7.0～7.3日であり、対照区との有意差はみられなかった。

### 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及びFigure 2に示した。

対照区の21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は149頭であり、試験成立条件である60頭の基準を満たした。

48.9～5.88 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数はそれぞれ173、143、135及び142頭であり、48.9 mg/L区では対照区よりもやや多かったが有意差は認められなかった。

### 親ミジンコの大きさと状態

暴露期間中、体色明化及び成長阻害が対照区を含む全ての試験区で観察された。濃度区における特異的状态は観察されなかった。

### 休眠卵の発生等

暴露期間中、いずれの試験区でも休眠卵の発生は認められなかった。

死亡仔虫は全試験区でみられたが、いずれも僅かであり有意なものではなかった。落下卵についても全試験区で観察され、濃度区では対照区よりも多い傾向がみられたが、有意なものではなかった。

## 5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)

14及び21日間暴露の親ミジンコのLC50をTable 5及び以下に示した。

14日間LC50： 55.8 mg/L(95%信頼限界；43.3～75.7 mg/L)

21日間LC50： 48.1 mg/L(95%信頼限界；33.4～83.3 mg/L)

## 5.5 50%繁殖阻害濃度(EC50)

14及び21日間暴露のEC50をTable 6及び以下に示した。

14日間EC50： 71.6 mg/L(95%信頼限界；48.9～101 mg/L)

21日間EC50： 71.2 mg/L(95%信頼限界；48.9～101 mg/L)

## 5.6 繁殖に及ぼす最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数の有意差検定結果をTable 7に示す。

4.3の結果の算出をもとに、繁殖に及ぼすNOEC及びLOECに関して以下の結論を得た。

21日間NOEC： 48.9 mg/L

21日間LOEC： 101 mg/L

### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度

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。

暴露期間中に測定した水温は19.9～20.5℃であり、 $20\pm1^{\circ}\text{C}$ の範囲であった。DOは8.2～8.9 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102-2000)。pHは5.1～7.7であり、高濃度区でpHの低下がみられた。硬度は39.0～44.0 mgCaCO<sub>3</sub>/Lであり、10～250 mgCaCO<sub>3</sub>/Lの範囲であった。

以上のことから、水温及びDOについては、ミジンコの試験環境として適正範囲であったと考えられる。pHについては、高濃度区において被験物質の影響によると思われる低下がみられ、100 mg/L区ではミジンコの生存環境として適正範囲(pH=6-9)ではなかったと考えられる。

### 5.8 試験液の状態

試験液調製時には無色透明であり、換水前ではクロレラを給餌したことによりうす緑色を呈していた。

以 上

Table 1. Concentrations of butanoic acid, 2-ethyl- in reproduction test using *Daphnia magna* under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)			
	0-day <sup>a)</sup>	3-day <sup>b)</sup>	10-day <sup>a)</sup>	12-day <sup>b)</sup>
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6.25	6.18 (98.8)	6.32 (101)	6.42 (103)	5.65 (90.4)
12.5	12.6 (101)	12.8 (102)	12.8 (102)	11.9 (95.5)
25.0	24.9 (99.7)	26.3 (105)	25.7 (103)	24.6 (98.3)
50.0	49.9 (99.9)	50.2 (100)	50.4 (101)	49.9 (99.8)
100	98.8 (98.8)	103 (103)		

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		Time-weighted mean <sup>c)</sup> (mg/L)
	17-day <sup>a)</sup>	19-day <sup>b)</sup>	
Control	n.d.	n.d.	-
6.25	6.42 (103)	4.14 (66.2)	5.88 (94.1)
12.5	12.6 (101)	10.7 (85.7)	12.3 (98.4)
25.0	25.2 (101)	21.5 (86.0)	24.8 (99.2)
50.0	50.8 (102)	41.3 (82.6)	48.9 (97.8)
100			101 (101)

n.d. : &lt;0.500 mg/L

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$\{3(C_0-C_3)/(\ln C_0-\ln C_3)+2(C_{10}-C_{12})/(\ln C_{10}-\ln C_{12})+2(C_{17}-C_{19})/(\ln C_{17}-\ln C_{19})\}/7$$

where

 $C_x$  : the measured concentration at x-day $\ln C_x$  : the natural logarithm of  $C_x$ .



Table 2. Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration ( mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
5.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
12.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
24.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
48.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
101	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	( 0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)

Table 2. (continued)

Measured concentration ( mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)
5.88	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	(10.0)	(10.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)
12.3	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	( 0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)
24.8	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	( 0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)
48.9	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	( 0)	(10.0)	(10.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)
101	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)

The values in parentheses express mortality (%) of *Daphnia* .

Table 3. Time (days) required to first brood production during exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration (mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	7	7	7	8	7	7	7
5.88	7	7	7	7	7	7	7
12.3	7	7	7	7	7	7	7
24.8	7	7	7	7	7	7	7
48.9	7	7	8	7	7	7	8
101	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. (continued)

Measured concentration (mg/L)	Vessel No.			Mean
	8	9	10	
Control	7	7	7	7.1
5.88	7	7	7	7.0
12.3	7	7	7	7.0
24.8	7	7	7	7.0
48.9	7	8	7	7.3
101	-	-	-	-

Table 4. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive ( $\Sigma F_1/P$ ) during exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	19.2	24.3	24.3	55.7
5.88	0	0	0	0	0	0	0	20.4	20.5	20.5	56.9
12.3	0	0	0	0	0	0	0	19.8	19.8	19.8	56.5
24.8	0	0	0	0	0	0	0	16.8	19.3	19.3	53.9
48.9	0	0	0	0	0	0	0	8.4	18.9	18.9	53.1
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4. (continued)

Measured concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	57.8	57.8	87.7	87.7	87.7	87.7	118	118	118	149	149
5.88	56.9	56.9	88.6	89.3	89.3	95.0	121	121	121	142	142
12.3	56.5	56.5	84.8	84.8	84.8	103	110	110	115	135	135
24.8	53.9	53.9	85.3	85.3	85.8	101	117	117	123	143	143
48.9	53.6	53.6	92.0	92.0	92.0	115	136	136	139	173	173
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 5. Calculated LC50 values of butanoic acid, 2-ethyl- for parental *Daphnia* based on measured concentrations

Exposure time (day)	LC50 ( mg/L)	95-Percent confidence limits ( mg/L)	Statistical method
14	55.8	43.3 – 75.7	Moving average
21	48.1	33.4 – 83.3	Moving average

Table 6. Calculated EC50 values of butanoic acid, 2-ethyl- for inhibition of reproduction based on measured concentrations

Exposure time (day)	EC50 ( mg/L)	95-Percent confidence limits ( mg/L)	Statistical method
14	71.6	48.9 – 101	Binomial
21	71.2	48.9 – 101	Binomial

Table 7. Significant difference between the mean cumulative number of juveniles produced per adult alive in control and test vessels after 21days exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration ( mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	-	171	137	155	138	148	184
5.88	160	69	-	171	-	64	189
12.3	87	-	167	-	91	61	179
24.8	95	70	172	179	-	-	176
48.9	167	160	161	-	163	-	171
101	-	-	-	-	-	-	-

Table 7. (continued)

Measured concentration ( mg/L)	Vessel No.			Mean	S.D.	Significant difference
	8	9	10			
Control	116	150	140	149	19.9	
5.88	142	177	166	142	48.7	
12.3	186	131	176	135	49.2	
24.8	110	178	167	143	44.3	
48.9	192	189	178	173	12.5	
101	-	-	-	-	-	

The data of 101 mg/L was omitted from statistical analysis.

Table 8. Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration ( mg/L)		Temperature (°C)					
		0-day	3-day	10-day	12-day	17-day	19-day
Control	new	19.9		20.2		20.0	
	old		20.1		20.1		20.5
5.88	new	19.9		20.2		20.0	
	old		20.1		20.1		20.5
12.3	new	19.9		20.2		20.0	
	old		20.1		20.1		20.5
24.8	new	19.9		20.2		20.0	
	old		20.1		20.1		20.5
48.9	new	19.9		20.2		20.0	
	old		20.1		20.1		20.5
101	new	19.9		n		n	
	old		n		n		n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 48- or 72-hour after preparation

Table 9. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 21-day  
*Daphnia* reproduction test to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
		0-day	3-day	10-day	12-day	17-day	19-day
Control	new	8.7		8.8		8.9	
	old		8.7		8.8		8.5
5.88	new	8.8		8.8		8.9	
	old		8.7		8.7		8.2
12.3	new	8.8		8.8		8.9	
	old		8.7		8.7		8.3
24.8	new	8.8		8.8		8.9	
	old		8.7		8.6		8.4
48.9	new	8.8		8.8		8.9	
	old		8.8		8.6		8.6
101	new	8.9		n		n	
	old		n		n		n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 48- or 72-hour after preparation

Table 10. pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration ( mg/L)		pH					
		0-day	3-day	10-day	12-day	17-day	19-day
Control	new	7.6		7.6		7.6	
	old		7.7		7.5		7.6
5.88	new	7.3		7.5		7.5	
	old		7.7		7.5		7.6
12.3	new	7.3		7.3		7.4	
	old		7.7		7.5		7.4
24.8	new	7.1		6.9		7.1	
	old		7.7		7.2		7.4
48.9	new	6.6		6.4		6.6	
	old		7.6		7.1		7.3
101	new	5.1		n		n	
	old		n		n		n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 48- or 72-hour after preparation

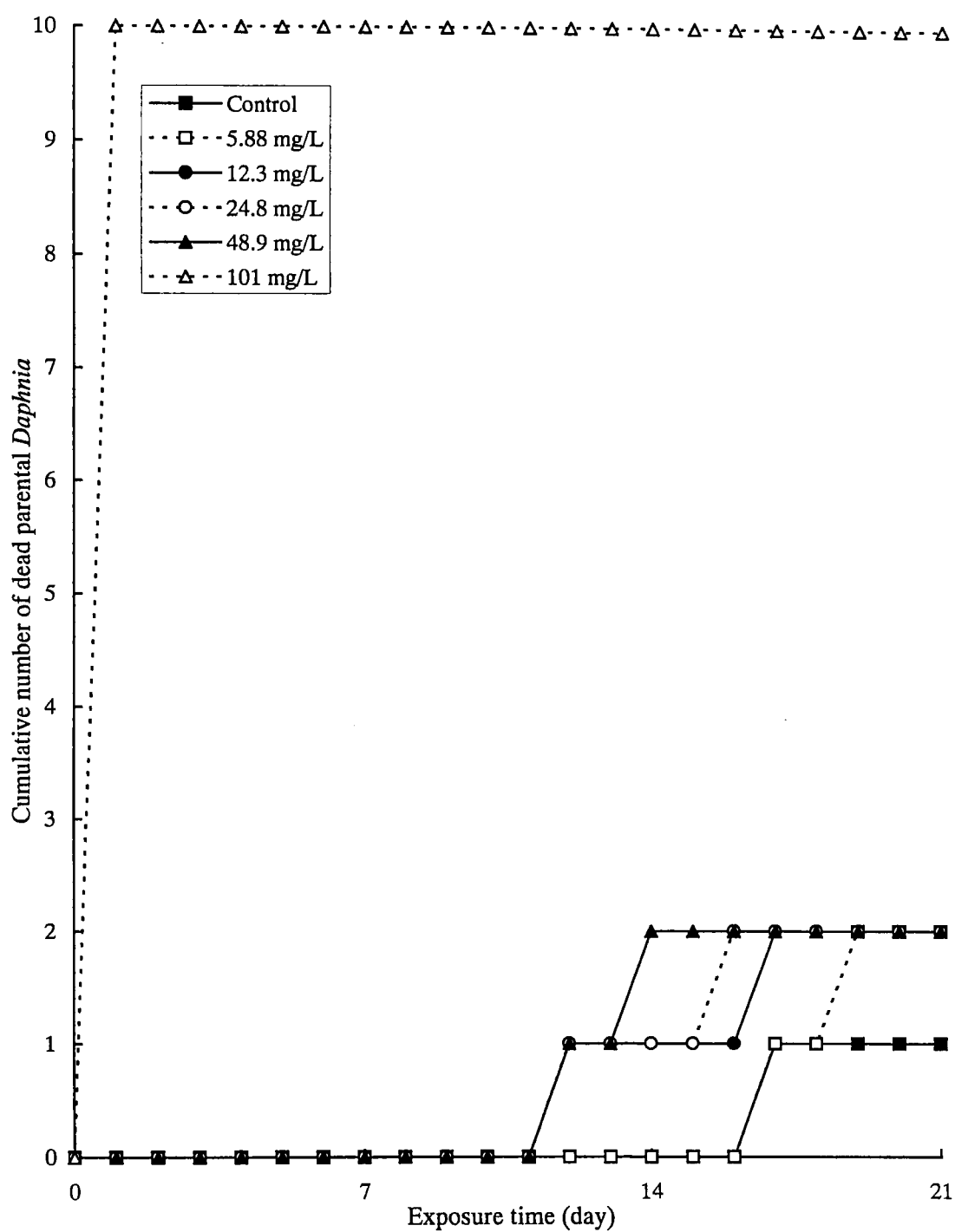


Table 11. Total hardness values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to butanoic acid, 2-ethyl-

Measured concentration		Total hardness (mgCaCO <sub>3</sub> /L)					
( mg/L)		0-day	3-day	10-day	12-day	17-day	19-day
Control	new	39.0		40.0		42.0	
	old		42.8		42.0		42.4
5.88	new	42.4		41.0		41.0	
	old		43.6		41.0		42.6
12.3	new	43.0		41.6		42.6	
	old		43.6		42.0		43.2
24.8	new	43.0		42.2		42.0	
	old		44.0		42.0		43.6
48.9	new	42.0		41.6		43.0	
	old		44.0		42.0		42.6
101	new	43.0		n		n	
	old		n		n		n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 48- or 72-hour after preparation

Figure 1. Cumulative number of dead parental *Daphnia*.

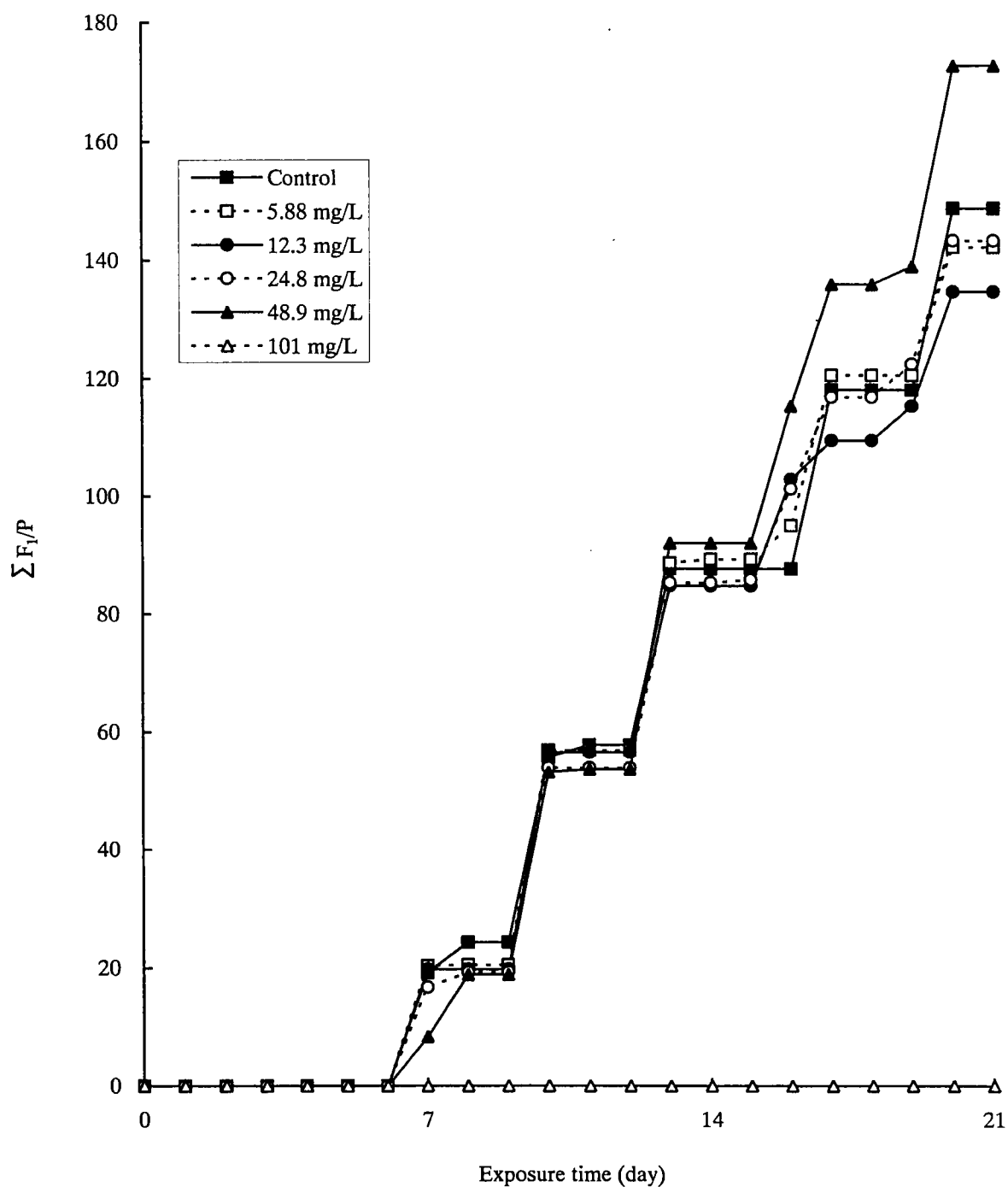


Figure 2. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive ( $\Sigma F_1/P$ ).

## 付属資料－1

希釈水の水質

(全2頁)

## Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
pH		7.4	
COD	(mg/L)	<0.5	
Coliform group bacteria (MPN/100 mL)		0	
Total phosphorus	(mg/L)	0.015	
Total mercury	(mg/L)	n.d.	0.0005
Copper	(mg/L)	n.d.	0.005
Cadmium	(mg/L)	n.d.	0.005
Zinc	(mg/L)	n.d.	0.01
Lead	(mg/L)	n.d.	0.005
Aluminium	(mg/L)	n.d.	0.1
Nickel	(mg/L)	n.d.	0.01
Total chromium	(mg/L)	n.d.	0.02
Manganese	(mg/L)	n.d.	0.01
Tin	(mg/L)	n.d.	0.5
Iron	(mg/L)	0.03	
Cyanide	(mg/L)	n.d.	0.1
Free chlorine	(mg/L)	n.d.	0.01
Bromide ion	(mg/L)	n.d.	0.1
Fluoride	(mg/L)	n.d.	0.15
Sulfide ion	(mg/L)	n.d.	0.1
Ammonia nitrogen	(mg/L)	0.01	
Arsenic	(mg/L)	n.d.	0.002
Selenium	(mg/L)	n.d.	0.002
Evaporation residue	(mg/L)	145	
Electric conductivity	( $\mu$ S/cm)	186	
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )		61.0	
		(mg/L)	
Alkalinity	(mg/L)	36.5	
Sodium	(mg/L)	18.5	
Potassium	(mg/L)	3.93	
Calcium	(mg/L)	14.0	
Magnesium	(mg/L)	6.32	

## Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	n.d.	0.006
Diazinon	(mg/L)	n.d.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	n.d.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	n.d.	0.004
Oxine copper	(mg/L)	n.d.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	n.d.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	n.d.	0.0008
EPN	(mg/L)	n.d.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	n.d.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	n.d.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	n.d.	0.0008
Chlornitrofen (CNP)	(mg/L)	n.d.	0.0005
Thiram	(mg/L)	n.d.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Thiobencarb	(mg/L)	n.d.	0.002
PCB	(mg/L)	n.d.	0.0005

n.d. : not detected

Date of measurement : August 7, 2000

## 付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全5頁)

試 験 名 : ミジンコ繁殖阻害試験

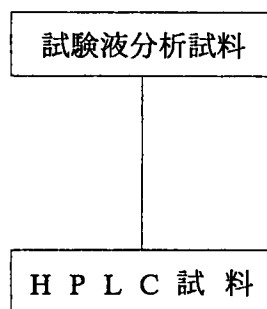
被験物質名 : Butanoic acid, 2-ethyl-

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

採取した溶液はそのまま若しくは脱塩素水で希釈して試験液分析試料とし、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



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

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、脱塩素水に溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを脱塩素水で希釈して100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。100 mg/Lの被験物質溶液を脱塩素水で希釈して5.00 mg/Lの標準溶液とした。



## 2) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ		島津製作所製 LC-10AD
検出器		島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター		島津製作所製 SIL-10A <sub>XL</sub>
カラム		L-column ODS
		15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度		40℃
溶離液		アセトニトリル/5 mM TBA*溶液 15/85 (v/v)
流量		1.0 mL/min
測定波長		210 nm
注入量		100 μL
感度		
検出器		1 AU/1 V
記録計		ATTEN 2 <sup>2</sup>

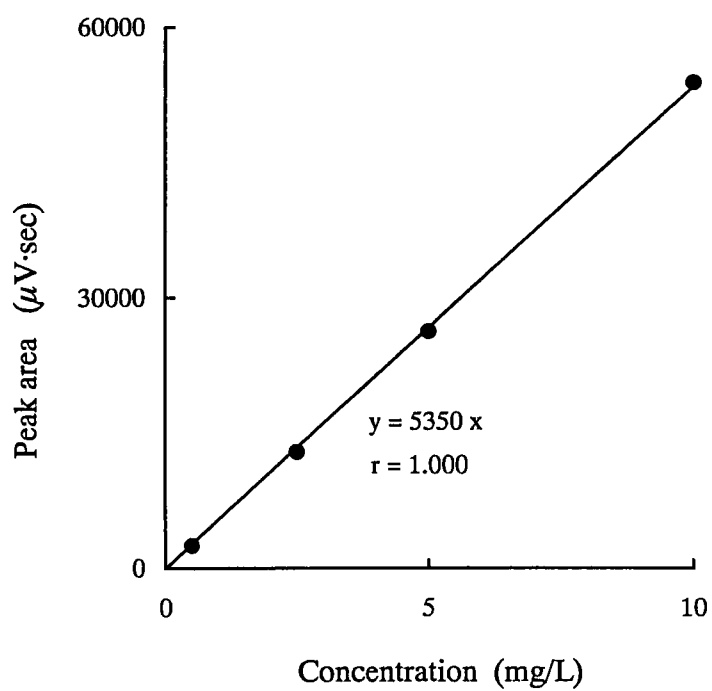
\* Tetra-n-butylammonium phosphate

## 3) 検量線の作成

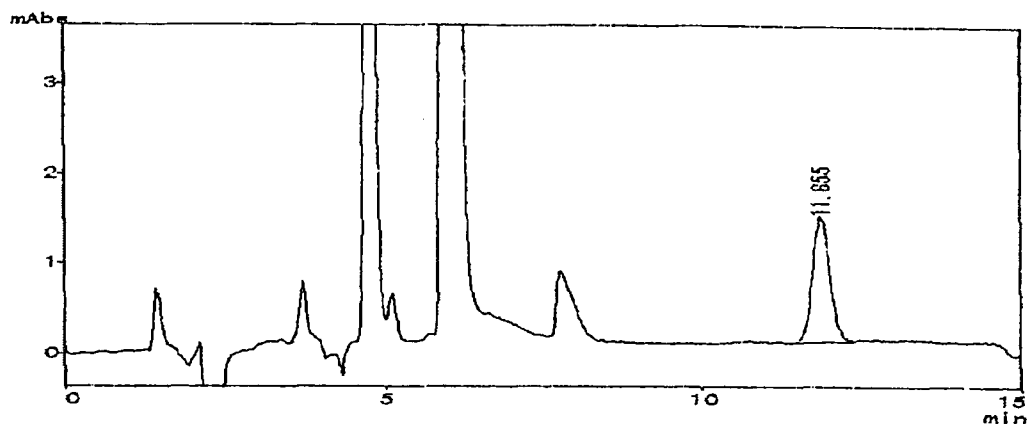
1)(3)の標準溶液の調製と同様にして0.500、2.50、5.00及び10.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

## Input data

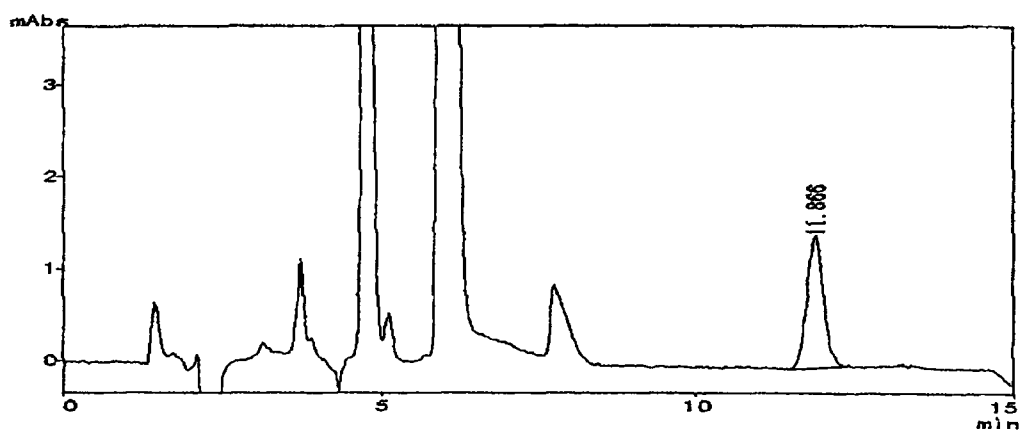
Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu$ V·sec)
1	0.500	2419
2	2.50	12789
3	5.00	26274
4	10.0	53902



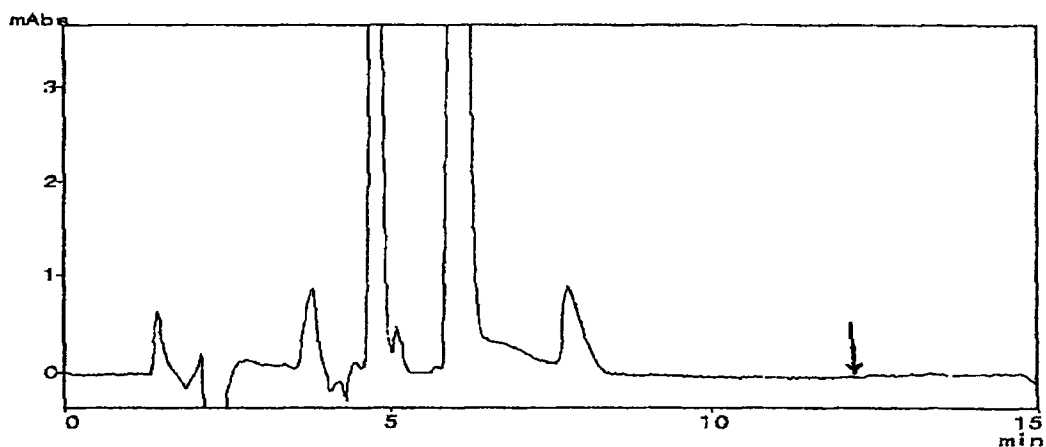
Appendix 2-1. Calibration curve of butanoic acid, 2-ethyl- by HPLC analysis.



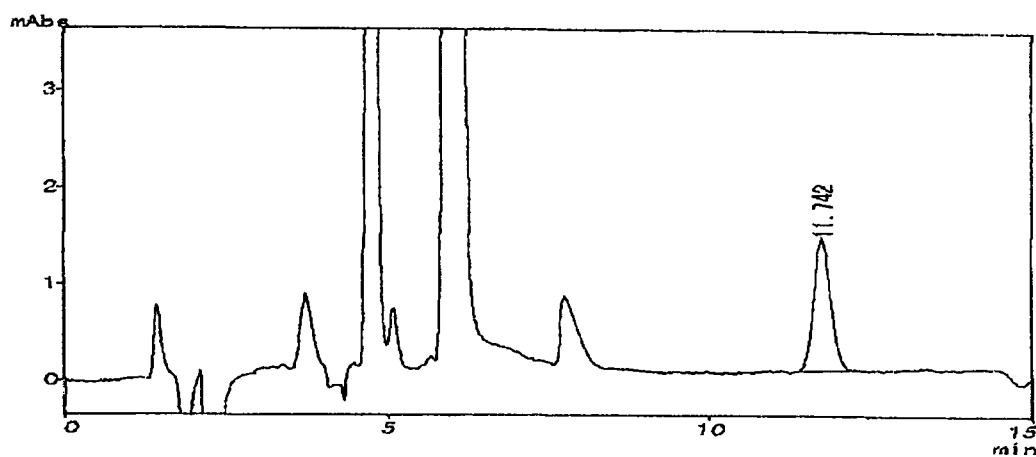
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 5.00 mg/L butanoic acid, 2-ethyl- standard at 0-day.



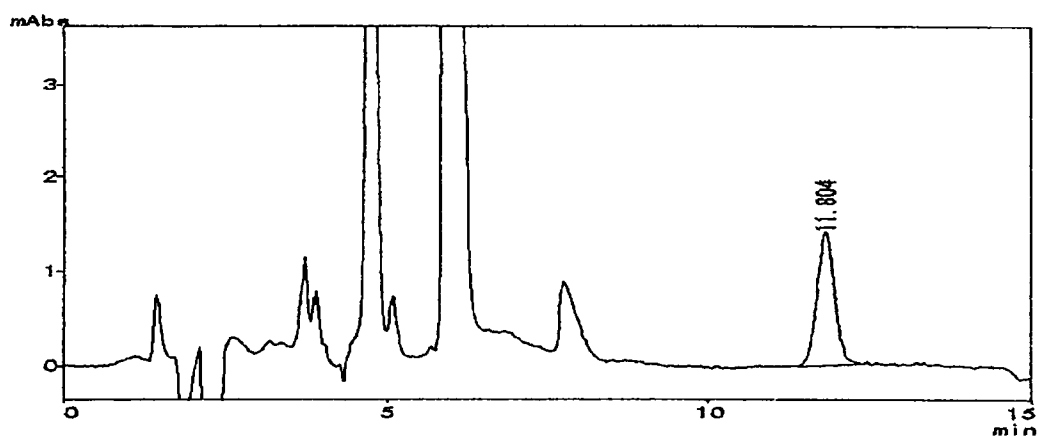
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 25.0 mg/L test solution at 0-day.



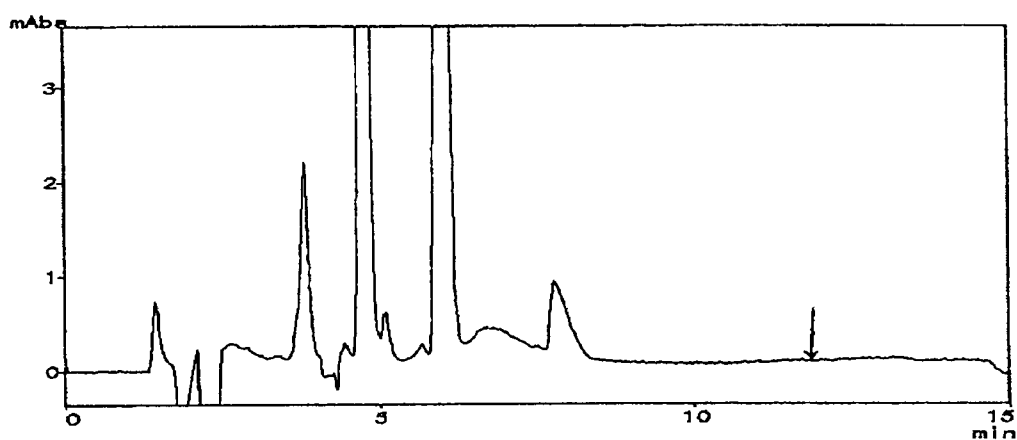
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of control solution at 0-day.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 5.00 mg/L butanoic acid, 2ethyl- standard at 3-day.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 25.0 mg/L test solution at 3-day.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of control solution at 3-day.

## 付属資料－3

ミジンコの観察結果  
(全12頁)

## Appendix 3-1. Result of reproduction test

( Measured concentration : Control )

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	21	1	0	27	0	0	10	0	0	0	M	-	-	-	-	(59)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	21	1	0	27	0	0	10	0	0	0	-	-	-	-	-	(59)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	21	22	22	49	49	49	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	38	0	0	36	0	0	0	46	0	0	32	0	171
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	19	0	0	38	0	0	36	0	0	0	46	0	0	32	0	171
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	19	19	19	57	57	57	93	93	93	93	139	139	139	171	171		
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	26	0	0	26	0	0	34	0	0	0	25	0	0	26	0	137
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	26	0	0	26	0	0	34	0	0	0	25	0	0	26	0	137
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	26	26	26	52	52	52	86	86	86	86	111	111	111	137	137		
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	26	0	11	19	0	35	0	0	0	34	0	0	30	0	155	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	0	0	27	0	11	19	0	35	0	0	0	34	0	0	30	0	156
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	26	26	37	56	56	91	91	91	91	125	125	125	155	155		
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	35	0	0	38	0	0	0	22	0	0	28	0	138
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	15	0	0	35	0	0	38	0	0	0	22	0	0	28	0	138
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	15	15	15	50	50	50	88	88	88	88	110	110	110	138	138		
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	28	0	0	31	0	0	28	0	0	0	33	0	0	28	0	148
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	28	0	0	31	0	0	28	0	0	0	33	0	0	28	0	148
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	28	28	28	59	59	59	87	87	87	87	120	120	120	148	148		
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	32	0	0	30	0	0	41	0	0	0	44	0	0	37	0	184
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	32	0	0	30	0	0	41	0	0	0	44	0	0	37	0	184
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	32	32	32	62	62	62	103	103	103	103	147	147	147	184	184		

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

Appendix 3-1. Continued

( Measured concentration : Control )

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	25	0	0	36	0	0	5	0	0	0	17	0	0	33	0	116
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	36	0	0	5	0	0	0	17	0	0	33	0	116
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	61	61	61	66	66	66	66	83	83	83	116	116	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	25	0	0	38	0	0	36	0	0	0	22	0	0	29	0	150
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	38	0	0	36	0	0	0	22	0	0	29	0	150
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	63	63	63	99	99	99	99	121	121	121	150	150	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	3	20	0	37	0	0	16	0	0	0	31	0	0	33	0	140
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	3	20	0	37	0	0	16	0	0	0	31	0	0	33	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	3	23	23	60	60	60	76	76	76	76	107	107	107	140	140	

## Appendix 3-2. Result of reproduction test

( Measured concentration : 5.88 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	17	0	0	32	0	0	34	0	0	0	43	0	0	34	0	160
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	34	0	0	0	43	0	0	34	0	161
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	17	17	17	49	49	49	83	83	83	83	126	126	126	160	160	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	23	0	0	30	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	69
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	23	0	0	30	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	69
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	23	23	23	53	53	53	61	61	61	61	69	69	69	69	69	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	7	0	0	0	M	-	-	-	-	(68)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	(0)
	Total	0	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	7	0	0	0	-	-	-	-	-	(68)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	23	23	23	61	61	61	68	68	68	68	68	68	68	68	68	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	17	1	0	37	0	0	45	0	0	0	39	0	0	32	0	171
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	17	1	0	37	0	0	45	0	0	0	39	0	0	32	0	171
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	17	18	18	55	55	55	100	100	100	100	139	139	139	171	171	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	20	0	0	34	0	0	17	0	0	0	0	0	M	-	-	(71)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	(1)
	Total	0	0	0	0	0	0	20	0	0	34	0	0	18	0	0	0	0	0	-	-	-	(72)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	20	20	20	54	54	54	71	71	71	71	71	71	71	71	71	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	20	0	0	36	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	64
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	20	0	0	36	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	64
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	20	20	20	56	56	56	59	64	64	64	64	64	64	64	64	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	21	0	0	37	0	0	43	0	0	46	0	0	0	42	0	189
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	21	0	0	37	0	0	43	0	0	46	0	0	0	42	0	189
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	21	21	21	58	58	58	101	101	101	147	147	147	147	189	189	

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.



## Appendix 3-2. Continued

( Measured concentration : 5.88 mg/L )

		(Measured concentration: 1.566 mg/L)																						
Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	41	0	0	43	0	0	0	39	0	0	0	0	142
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	41	0	0	43	0	0	0	40	0	0	0	0	143
Cumulative reproductivity			0	0	0	0	0	0	19	19	19	60	60	60	103	103	103	103	142	142	142	142	142	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	29	0	0	36	0	0	37	0	0	0	42	0	0	33	0	177
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	36	0	0	37	0	0	0	42	0	0	33	0	177
Cumulative reproductivity			0	0	0	0	0	0	29	29	29	65	65	65	102	102	102	102	144	144	144	177	177	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	17	0	0	42	0	0	41	0	0	0	34	0	0	32	0	166
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	43	0	0	41	0	0	0	34	0	0	32	0	167
Cumulative reproductivity			0	0	0	0	0	0	17	17	17	59	59	59	100	100	100	100	134	134	134	166	166	

## Appendix 3-3. Result of reproduction test

( Measured concentration : 12.3 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	21	0	0	29	0	0	20	0	0	0	17	0	0	0	0	87
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	21	0	0	29	0	0	20	0	0	0	17	0	0	0	0	87
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	21	21	21	50	50	50	70	70	70	70	87	87	87	87	87	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	19	0	0	36	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(55)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Total	0	0	0	0	0	0	19	0	0	36	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(55)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	19	19	19	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	22	0	0	34	0	0	38	0	0	0	36	0	0	37	0	167
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	Total	0	0	0	0	0	0	22	0	0	34	0	0	38	0	0	0	38	0	0	37	0	169
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	22	22	22	56	56	56	94	94	94	94	130	130	130	167	167	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	24	0	0	36	0	0	10	0	0	0	M	-	-	-	-	(70)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	(0)
	Total	0	0	0	0	0	0	24	0	0	36	0	0	10	0	0	0	-	-	-	-	-	(70)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	24	24	24	60	60	60	70	70	70	70	70	70	70	70	70	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	21	0	0	41	0	0	15	0	0	0	0	0	0	14	0	91
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	21	0	0	41	0	0	15	0	0	0	0	0	0	14	0	91
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	21	21	21	62	62	62	77	77	77	77	77	77	77	91	91	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	14	0	0	36	0	0	9	0	0	0	0	0	2	0	0	61
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	14	0	0	36	0	0	9	0	0	0	0	0	2	0	0	61
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	14	14	14	50	50	50	59	59	59	59	59	59	61	61	61	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	22	0	0	38	0	0	30	0	0	50	0	0	0	39	0	179
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	22	0	0	38	0	0	30	0	0	50	0	0	0	39	0	179
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	22	22	22	60	60	60	90	90	90	140	140	140	140	179	179	

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

## Appendix 3-3. Continued

( Measured concentration : 12.3 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	38	0	0	37	0	0	47	0	0	45	0	0	186
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	19	0	0	38	0	0	37	0	0	48	0	0	45	0	0	187	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	19	19	19	57	57	57	94	94	94	141	141	141	186	186	186		
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	18	0	0	37	0	0	37	0	0	0	0	0	39	0	131	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	18	0	0	37	0	0	37	0	0	0	0	0	0	39	0	131	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	18	18	18	55	55	55	92	92	92	92	92	92	92	131	131		
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	21	0	0	41	0	0	40	0	0	48	0	0	26	0	176	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	21	0	0	41	0	0	40	0	0	48	0	0	0	26	0	176	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	21	21	21	62	62	62	102	102	102	150	150	150	150	176	176		

## Appendix 3-4. Result of reproduction test

( Measured concentration : 24.8 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	25	0	0	32	0	0	5	0	4	0	0	0	0	29	0	95
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	25	0	0	32	0	0	5	0	5	0	0	0	0	29	0	96
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	25	25	25	57	57	57	62	62	66	66	66	66	66	95	95	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	70
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	23	0	0	39	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	71
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	23	23	23	61	61	61	70	70	70	70	70	70	70	70	70	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	11	0	0	35	0	0	38	0	0	14	34	0	0	40	0	172
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	11	0	0	35	0	0	38	0	0	14	34	0	0	40	0	172
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	11	11	11	46	46	46	84	84	84	98	132	132	132	172	172	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	19	0	0	35	0	0	39	0	0	41	0	0	45	0	0	179
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	19	0	0	35	0	0	39	0	0	41	0	0	45	0	0	179
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	19	19	19	54	54	54	93	93	93	134	134	134	179	179	179	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	19	0	0	34	0	0	7	0	5	M	-	-	-	-	-	(65)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	19	0	0	34	0	0	7	0	5	-	-	-	-	-	-	(65)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	19	19	19	53	53	53	60	60	65	65	65	65	65	65	65	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	19	0	0	26	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(45)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	19	0	0	26	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(45)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	19	19	19	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	5	20	0	37	0	0	41	0	0	1	42	0	0	30	0	176
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	5	20	0	37	0	0	41	0	0	1	42	0	0	30	0	176
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	5	25	25	62	62	62	103	103	103	104	146	146	146	176	176	

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

## Appendix 3-4. Continued

( Measured concentration : 24.8 mg/L )

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	14	0	0	31	0	0	38	0	0	24	3	0	0	0	0	110
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	14	0	0	31	0	0	38	0	1	24	3	0	0	0	0	111	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	14	14	14	45	45	45	83	83	83	107	110	110	110	110	110		
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	41	0	0	44	1	0	0	43	0	178
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	41	0	0	44	1	0	0	43	0	178	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	14	14	14	49	49	49	90	90	90	134	135	135	135	178	178		
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	23	0	0	34	0	0	40	0	0	0	45	0	0	25	0	167
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	23	0	0	34	0	0	40	0	0	0	45	0	0	25	0	167	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	23	23	23	57	57	57	97	97	97	97	142	142	142	167	167		

## Appendix 3-5. Result of reproduction test

( Measured concentration : 48.9 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	1	21	0	32	0	0	35	0	0	0	41	0	0	37	0	167
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	1	21	0	32	0	0	35	0	0	0	42	0	0	37	0	168
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	1	22	22	54	54	54	89	89	89	89	130	130	130	167	167	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	15	0	0	36	0	0	39	0	0	38	0	0	0	32	0	160
		Dead	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	16	0	0	36	0	0	39	0	0	38	0	0	0	32	0	161
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	15	15	15	51	51	51	90	90	90	128	128	128	128	160	160	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	20	0	23	4	0	34	0	0	0	40	0	0	40	0	161
		Dead	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	0	21	0	23	4	0	34	0	0	0	40	0	0	40	0	162
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	20	20	43	47	47	81	81	81	81	121	121	121	161	161	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	22	0	0	22	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(44)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	22	0	0	22	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(44)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	22	22	22	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	15	0	0	38	0	0	39	0	0	48	0	0	0	23	0	163
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	15	0	0	38	0	0	39	0	0	48	0	0	0	23	0	163
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	15	15	15	53	53	53	92	92	92	140	140	140	140	163	163	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	17	0	0	31	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	(48)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	17	0	0	31	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	(48)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	17	17	17	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	25	0	39	0	0	32	0	0	0	35	0	0	40	0	171
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	25	0	39	0	0	32	0	0	0	35	0	0	40	0	171
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	25	25	64	64	64	96	96	96	96	131	131	131	171	171	

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

## Appendix 3-5. Continued

( Measured concentration : 48.9 mg/L )

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	22	0	0	32	0	0	41	0	0	51	0	0	0	46	0	192
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	22	0	0	32	0	0	41	0	0	51	0	0	0	46	0	192	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	22	22	22	54	54	54	95	95	95	146	146	146	146	192	192		
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	39	0	0	42	0	0	0	49	0	24	17	0	189
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	39	0	0	42	0	0	0	49	0	24	17	0	189	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	18	18	57	57	57	99	99	99	99	148	148	172	189	189		
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	45	0	0	50	0	0	0	34	0	178
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	45	0	0	50	0	0	0	34	0	178	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	14	14	14	49	49	49	94	94	94	144	144	144	144	178	178		

## Appendix 3-6. Result of reproduction test

( Measured concentration : 101 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.



## Appendix 3-6. Continued

( Measured concentration : 101 mg/L )

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1/20	1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	1/26	1/27	1/28	1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

\*M' shows mortality of parental *Daphnia* .