

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

1-メチルナフタレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)

に対する繁殖阻害試験

(試験番号：9 B 4 8 3 G)

2000年 3月31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： 1-メチルナフタレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 8 3 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 3 月 3 1 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： 1-メチルナフタレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 8 3 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	1999年12月 1日	1999年12月 1日
	1999年12月 22日	1999年12月22日
試験報告書監査	2000年 3月 31日	2000年 3月31日

2000年 3月 31日

信頼性保証担当者：









試験実施概要

1. 表題： 1-メチルナフタレンのオオミジンコ (*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 3月31日)
試験担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
分析担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1999年11月16日
試験終了日 2000年 3月31日
暴露期間 1999年12月 1日～1999年12月22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

1-メチルナフタレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

9 B 4 8 3 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： 1-メチルナフタレン
- 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, 助剤対照区, 0.0250, 0.0800, 0.250, 0.800, 2.50 mg/L
公比 : 3.2
助剤濃度一定 : 30.0 mg/L (HCO-40 および 2-メトキシエタノール使用)
- 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%を超えたものがあつたため、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）： 1.26 mg/L

(95%信頼限界：0.716～2.21 mg/L)

50% 繁殖阻害濃度（EC50）： 0.637 mg/L

(95%信頼限界：0.517～0.829 mg/L)

最大無作用濃度（NOEC）： 0.223 mg/L

最小作用濃度（LOEC）： 0.716 mg/L

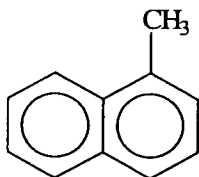
1 被験物質

1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称: 1-メチルナフタレン (略称 MeNa)

CAS No.: 90-12-0

構造式:



分子式: $C_{11}H_{10}$

分子量^{*1}: 142.19

沸点^{*1}: 240~243℃

融点^{*1}: -22℃

水溶解度^{*1}: 26~28 mg/L (25℃)

比重^{*1}: 1.025

オクタノール/水分配係数 (log P) ^{*1}: 3.84

安定性^{*2}: 通常取扱条件で安定

その他^{*2}: 光により変質 (着色), 酸化剤との接触に注意

*1: [REDACTED]
[REDACTED]

*2: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 97.0% (GC法)

ロット番号^{*1}: FGF02

供給者: [REDACTED]

供給量^{*1}: 50 mL

入手日: 1999年9月7日

外観^{*1}: ほとんど無色透明液体

*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
阻害濃度（ 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；1999 年 11 月 17 日～1999 年 12 月 1 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： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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：2.24 mg/L）から，本試験は公比 3.2 で5段階を設定した。各濃度区は以下の通りである。

対照区，助剤対照区，0.0250，0.0800，0.250，0.800，2.50 mg/L

3.5 試験液の調製

被験物質を 125 mg 秤取し、2-メトキシエタノール 750 mg に溶解後、HCO-40 750 mg を加え混合した。これを純水で希釈し 500 mL に定容し、被験物質濃度 250 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 3000 mg/L (2-メトキシエタノール 1500 mg/L, HCO-40 1500 mg/L) 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た後、助剤濃度が一定 (30.0 mg/L) になるように助剤原液を加え、各試験液を調製した。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 : 30.0 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 (0.0500, 0.500 および 1.00 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

試験液の水溫、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した。また, 可能な限りその95%信頼限界を算出した。

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 10%および 20%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 100%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。

対照区および助剤対照区における親ミジンコの初産日は暴露開始 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、初産前に全親ミジンコが死亡した。

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120頭および155頭であり、試験成立条件である60頭の基準を満たした。

最高濃度区においては初産前に全親ミジンコが死亡した。

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。

21日間 LC50 : 1.26 mg/L (95%信頼区間 : 0.716~2.21 mg/L)

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 : 0.637 mg/L (95%信頼区間 : 0.517~0.829 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)

統計解析の結果、助剤対照区と比べ 0.0250 mg/L区において有意差が認められたが 0.0800 mg/L区 および 0.250 mg/L区においては有意差が認められなかったことより、0.0250 mg/L区において認められた差は被験物質による影響ではないものと判断された。以上の結果から得られた親ミジンコ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 および以下に示した。

21日間 NOEC : 0.223 mg/L

21日間 LOEC : 0.716 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℃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。

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	8 New	10 Old	20 New	21 Old		
Control		<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	-	-
Solvent control		<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	-	-
0.0250		0.0247	0.0198	0.0250	0.0208	0.0242	0.0201	0.0225	90
0.0800		0.0768	0.0646	0.0762	0.0641	0.0813	0.0579	0.0701	88
0.250		0.246	0.201	0.247	0.206	0.253	0.134	0.223	89
0.800		0.787	0.662	0.788	0.660	0.804	0.429	0.716	90
2.50		2.47	1.97	*	*	*	*	2.21	88

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	8 New	10 Old	20 New	21 Old
0.0250		99	79	100	83	97	80
0.0800		96	81	95	80	102	72
0.250		98	80	99	82	101	54
0.800		98	83	99	83	101	54
2.50		99	79	*	*	*	*

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	0.0242	~	2.47	95	~	102
Old	0.0198	~	1.97	54	~	83

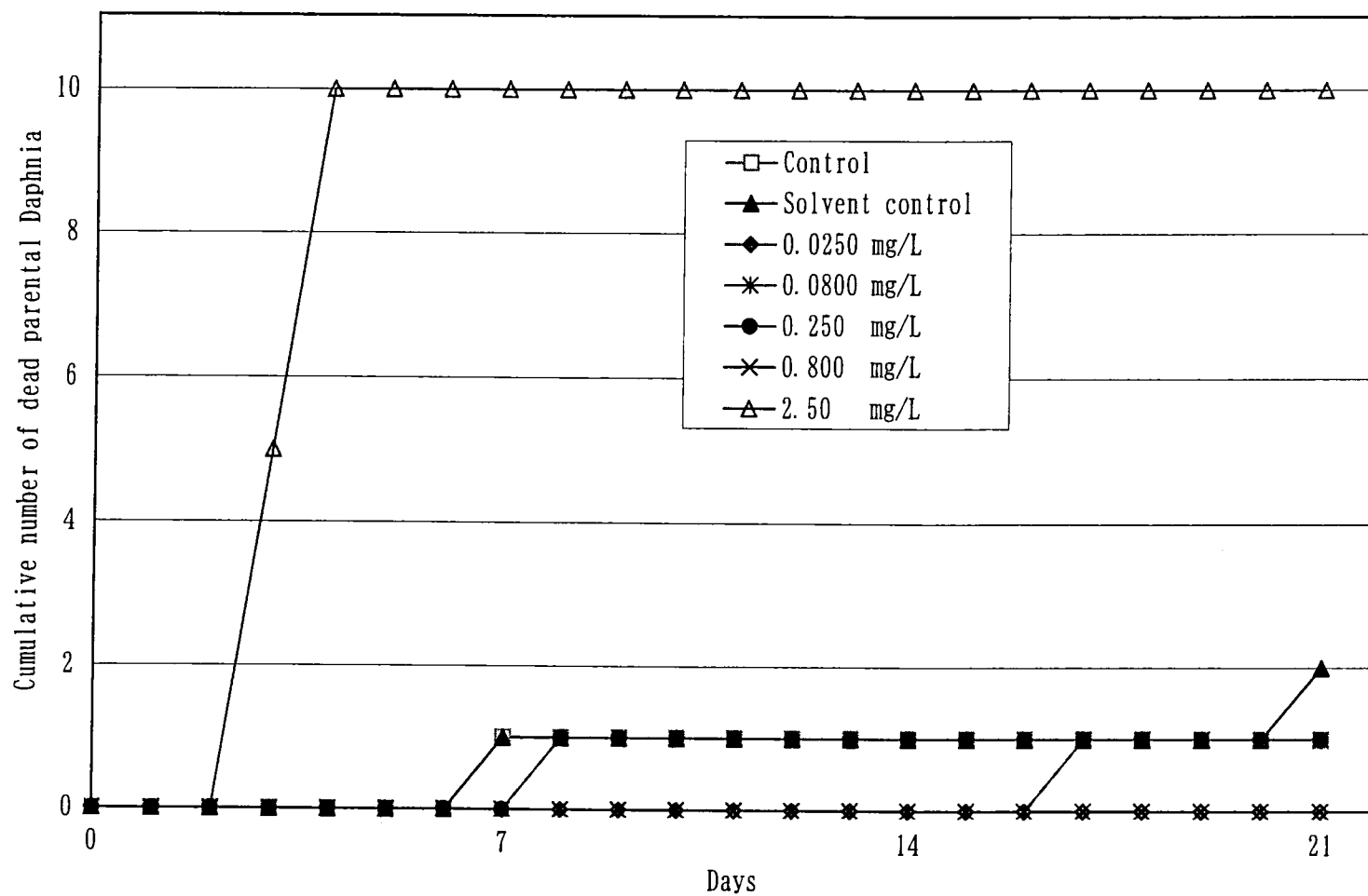
Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

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	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solvent control	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
0.0250 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0800 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0.250 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.800 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.50 mg/L	0	0	0	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

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

Nominal conc.	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	10	10	10
Solvent control	0	0	0	10	10	20
0.0250 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.0800 mg/L	0	0	0	0	0	10
0.250 mg/L	0	0	0	0	10	10
0.800 mg/L	0	0	0	0	0	0
2.50 mg/L	0	0	100	100	100	100

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. 0250 (0. 0225)	0. 0800 (0. 0701)	0. 250 (0. 223)	0. 800 (0. 716)	2. 50 (2. 21)
1	9	7	7	7	7	7	-
2	9	7	7	8	8	7	-
3	7	7	7	8	7	9	-
4	7	7	7	7	9	9	-
5	7	7	8	7	7	8	-
6	-	7	7	9	-	9	-
7	7	7	7	7	7	8	-
8	7	7	7	7	7	7	-
9	7	-	7	7	7	8	-
10	7	8	7	7	7	9	-
Min	7	7	7	7	7	7	-
Max	9	8	8	9	9	9	-

*1: Time-weighted mean measured concentration.

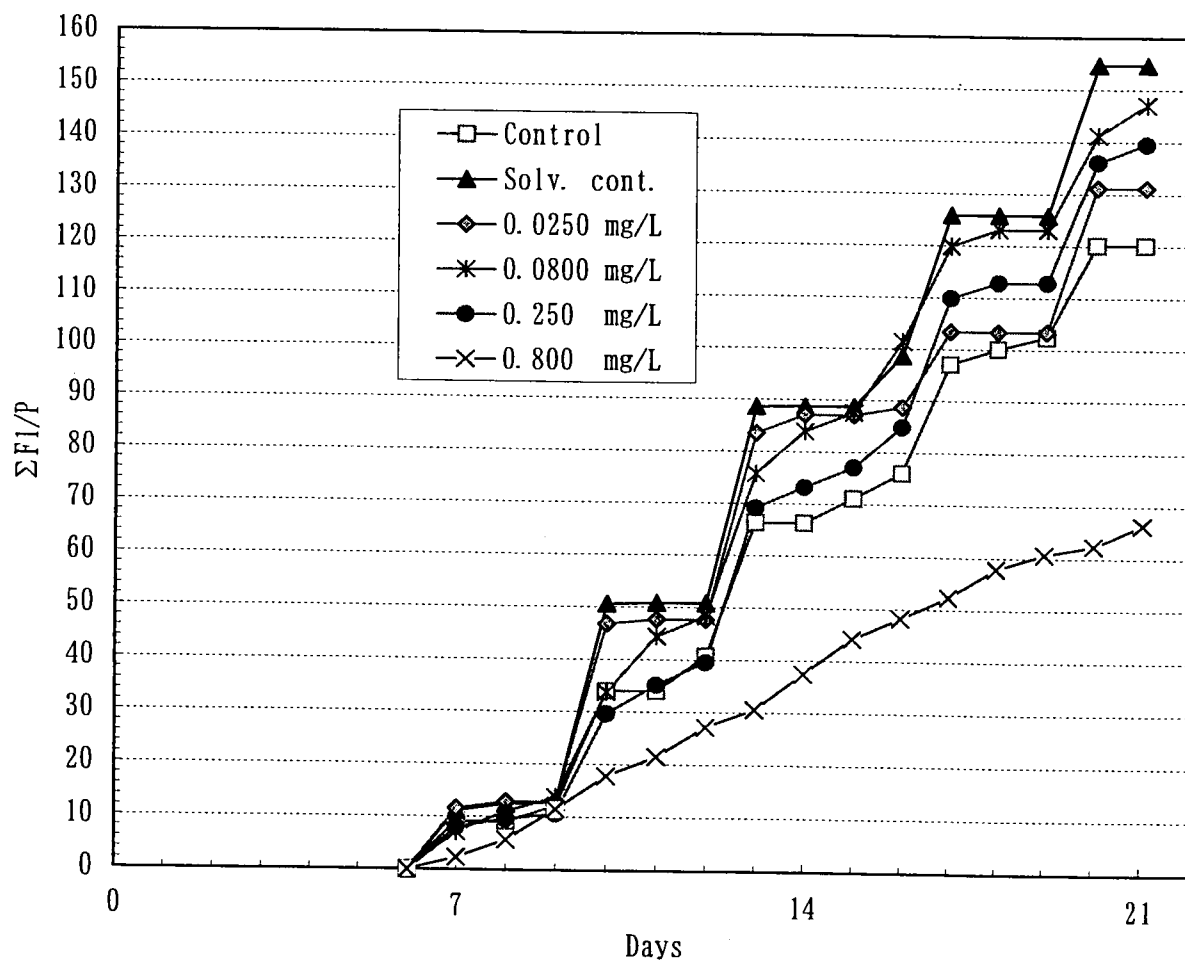
-: The parental *Daphnia* was dead before first brood production.

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	9.1	9.1	12.1	34.0	34.0	40.8	66.3	66.3	71.1	76.1	97.1	100.1	102.4	120.2	120.2
Solv. cont.	0.0	11.1	12.5	12.9	50.6	50.9	50.9	88.6	88.8	88.8	98.6	125.9	125.9	125.9	154.8	154.8
0.0250 mg/L	0.0	11.6	12.9	12.9	46.8	47.7	47.7	83.5	87.1	87.1	88.7	103.4	103.4	103.4	131.2	131.2
0.0800 mg/L	0.0	7.1	11.0	13.8	33.8	44.4	48.3	75.8	83.9	87.6	101.4	119.9	123.1	123.1	141.2	147.1
0.250 mg/L	0.0	8.0	9.6	10.7	29.7	35.2	39.6	69.2	73.2	77.1	84.9	109.9	112.9	112.9	136.1	139.6
0.800 mg/L	0.0	2.3	5.6	11.5	17.8	21.5	27.2	30.6	37.5	44.3	48.3	52.4	57.9	60.7	62.4	66.4
2.50 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: All parental *Daphnia* were dead during a 21-days testing period.

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	1.26	0.716 — 2.21	Binomial

*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	0.637	0.517 — 0.829	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	Solv. cont.	0. 0250 (0. 0225)	0. 0800 (0. 0701)	0. 250 (0. 223)	0. 800 (0. 716)	2. 50 (2. 21)
1	88	153	148	148	137	50	D
2	105	147	138	174	154	83	D
3	127	D	123	153	157	63	D
4	136	145	127	141	137	86	D
5	119	149	138	158	137	94	D
6	D	156	131	120	D	44	D
7	131	167	131	144	138	47	D
8	125	159	134	D	126	76	D
9	127	D	121	146	142	55	D
10	124	162	121	140	128	66	D
Mean	120. 2	154. 8	131. 2	147. 1	139. 6	66. 4	0. 0
S. D.	14. 9	7. 7	8. 7	14. 6	10. 4	17. 6	
Inhibition rate (%)			15. 2	4. 9	9. 8	57. 1	100. 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 solvent control.
(There was no sign in this test.)

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

++ : Statistical comparison test could not be performed for this concentration because adult alive after 21 days was none.
However, we concluded that this concentration level showed adverse effect on *Daphnia* reproduction.

No Observed Effect Concentration (NOEC):

0. 223 mg/L

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC):

0. 716 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	2	6	8	12	14	18	20		
		new	old	new	old	new	old	new	old		
Control		19.9	20.1	20.2	20.0	20.1	19.9	20.0	19.7	19.7	20.2
Solvent control		19.9	20.0	20.2	20.0	20.1	19.9	19.9	19.7	19.7	20.2
0.0250		19.9	20.1	20.3	20.0	20.2	19.9	20.0	19.6	19.6	20.3
0.0800		19.9	20.1	20.3	20.0	20.1	20.0	20.0	19.7	19.7	20.3
0.250		19.9	20.1	20.2	20.0	20.1	19.9	20.0	19.6	19.6	20.2
0.800		20.0	20.1	20.2	20.0	20.1	20.0	19.9	19.7	19.7	20.2
2.50		20.0	20.1	-	-	-	-	-	-	20.0	20.1
Total										19.6	20.3

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

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

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	2	6	8	12	14	18	20		
		new	old	new	old	new	old	new	old		
Control		8.9	8.6	8.7	7.8	8.7	7.6	8.7	8.0	7.6	8.9
Solvent control		8.7	8.4	8.6	7.3	8.6	7.1	8.6	7.3	7.1	8.7
0.0250		8.7	8.4	8.7	7.2	8.8	7.3	8.7	6.8	6.8	8.8
0.0800		8.9	8.3	8.7	7.4	8.7	7.2	8.8	7.0	7.0	8.9
0.250		8.7	8.4	8.6	7.5	8.7	7.4	8.6	7.5	7.4	8.7
0.800		8.7	8.4	8.7	7.7	8.8	7.8	8.7	7.4	7.4	8.8
2.50		8.8	8.4	-	-	-	-	-	-	8.4	8.8
Total										6.8	8.9

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

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

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		8.3	8.0	8.3	7.4	8.1	7.2	8.2	7.3	7.2	8.3
Solvent control		8.2	7.7	8.4	7.1	8.1	7.1	8.2	7.1	7.1	8.4
0.0250		8.2	7.7	8.3	7.2	8.1	7.1	8.2	7.1	7.1	8.3
0.0800		8.1	7.7	8.3	7.1	8.1	7.1	8.2	7.1	7.1	8.3
0.250		8.3	7.8	8.3	7.1	8.4	7.1	8.3	7.1	7.1	8.4
0.800		8.2	7.7	8.3	7.2	8.1	7.2	8.3	7.1	7.1	8.3
2.50		8.2	7.8	-	-	-	-	-	-	7.8	8.2
Total										7.1	8.4

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

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

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	2 old	6 new	8 old	12 new	14 old	18 new	20 old		
Control		245	220	210	220	235	215	220	210	210	245
Solvent control		240	225	215	215	235	210	225	210	210	240
0.0250		245	230	210	215	240	215	225	200	200	245
0.0800		245	230	215	220	235	210	225	210	210	245
0.250		240	225	215	215	240	215	220	210	210	240
0.800		250	230	210	220	240	210	230	210	210	250
2.50		250	235	-	-	-	-	-	-	235	250
Total										200	250

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

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

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（0.0500, 0.500 および 1.00 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. 2)
ワークステーション：	HPキーステーション (Windows NT)
パソコン：	HP Kayak XA, ディスプレイ； D2837
プリンター：	Canon LASER SHOT LBP-450
デガッサー：	G1322A型
送液ポンプ：	G1311A型
オートサンブラ：	G1313A型
カラムオープン：	G1316A型
フोटodiodeアレイ検出器：	G1315A型

（条件）

カラム：	Inertsil ODS-3V, 5 μ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液：	Acetonitrile 90 %, Water 10 %
流速：	1.0 mL/min
検出器条件	
測定波長：	222 nm (Bw : 16)
リファレンス波長：	360 nm (Bw : 100)
スリット：	16 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, 0.0100, 0.0200, 0.0500, 0.100, 0.200, 0.500, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0 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 0.1 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.0005 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 Calibration Curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.0100	2.05
3	0.0200	4.23
4	0.0500	10.52
5	0.100	19.83
6	0.200	42.24
7	0.500	101.91
8	1.00	203.74
9	2.00	412.21
10	5.00	1027.95
11	10.0	1998.53
12	20.0	3819.28

$$Y = 193X$$

$$r = 1.000$$

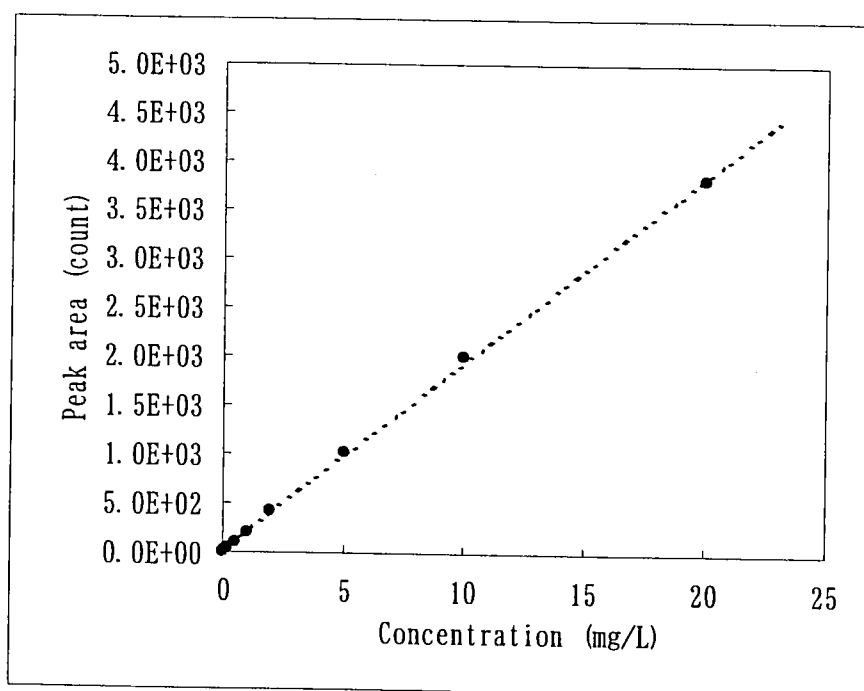
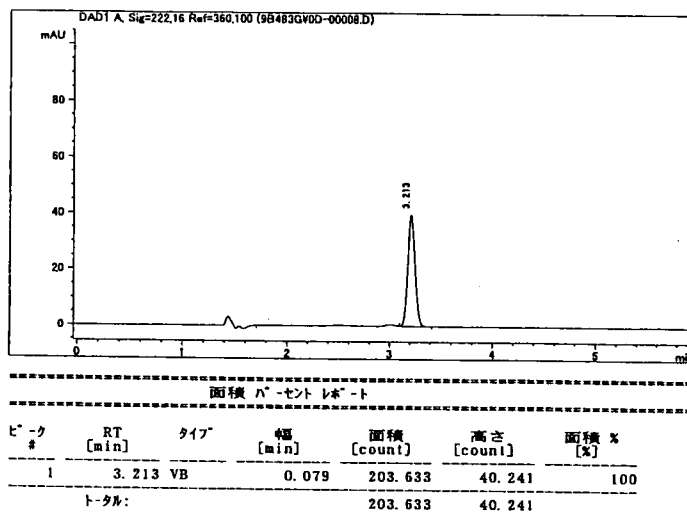


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 1.00 mg/L ; Day 0

注入日 : Wed. 1. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : std 1.0mg/L 0d
 測定ホレタ : 9B417G.M
 分析メソッド : C:VHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 8
 バイアル No. : 2
 注入量 : 20 ul



(2) Solvent Control ; Day 0

注入日 : Wed. 1. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : S-Control 0d
 測定ホレタ : 9B417G.M
 分析メソッド : C:VHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 2
 バイアル No. : 12
 注入量 : 20 ul

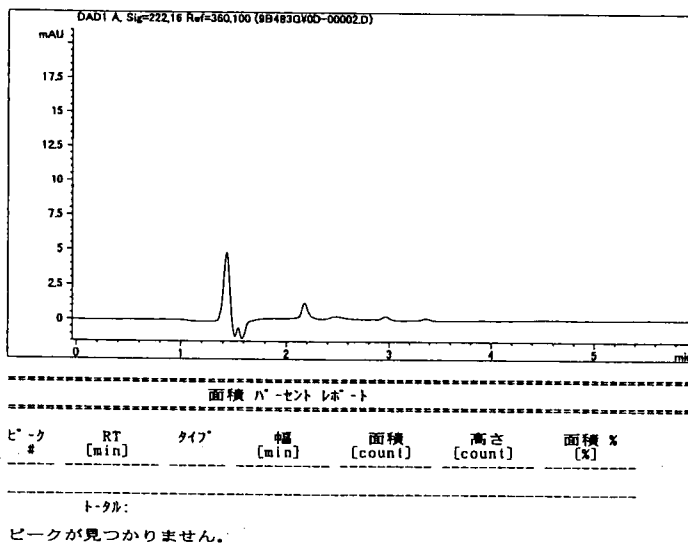
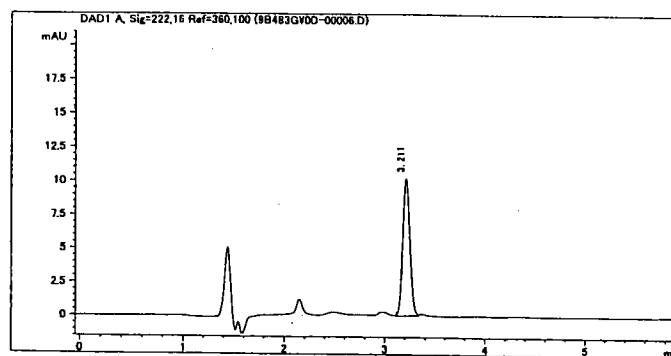


Figure A-2-2 Continued

(3) 0.250 mg/L nominal ; Day 0

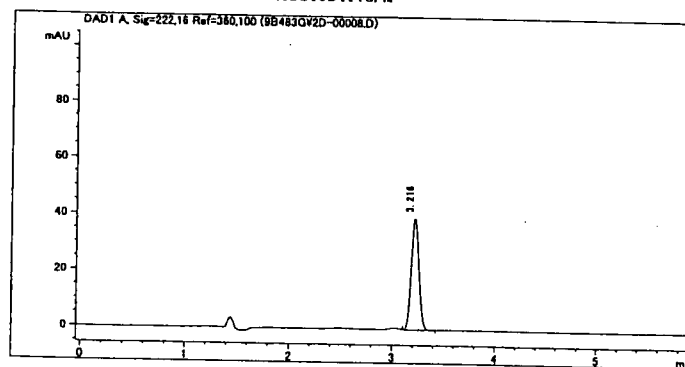
注入日 : Wed. 1. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : C-3 0.25mg/L 0d
 測定オペレータ :
 分析メソッド : 9B417G.M
 解析メソッド : C:\VHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 6
 バイアル No. : 15
 注入量 : 20 ul



面積 パーセント レポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [count]	面積 %
1	3.211	MM	0.081	50.406	10.311	100
トータル:				50.406	10.311	

(4) Standard 1.00 mg/L ; Day 2

注入日 : Fri. 3. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : std 1.0mg/L 2d
 測定オペレータ :
 分析メソッド : 9B417G.M
 解析メソッド : C:\VHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 8
 バイアル No. : 2
 注入量 : 20 ul

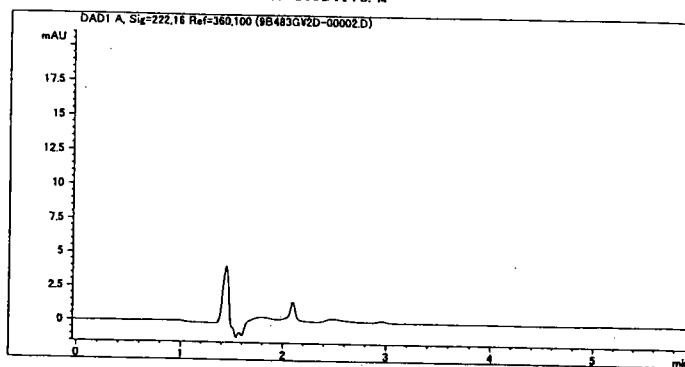


面積 パーセント レポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [count]	面積 %
1	3.218	VB	0.080	204.170	39.779	100
トータル:				204.170	39.779	

Figure A-2-2 Continued

(5) Solvent Control ; Day 2

注入日 : Fri, 3. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : S-Control 2d
 測定レベル : 9B417G.M
 分析メソッド : C:\YHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 2
 バイアル No. : 12
 注入量 : 20 ul



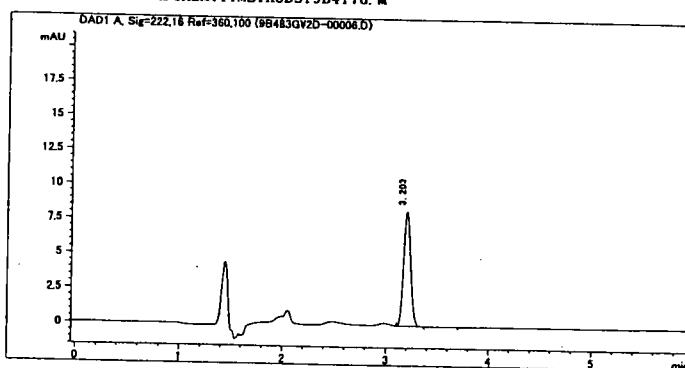
面積パーセントレポート

ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [count]	面積 %
トータル:						

ピークが見つかりません。

(6) 0.250 mg/L nominal ; Day 2

注入日 : Fri, 3. Dec. 1999
 試験番号 : 9B483G
 被験物質 : MeNa
 サンプル名 : c-3 0.25mg/L 2d
 測定レベル : 9B417G.M
 分析メソッド : C:\YHPCHEM\1\METHODS\9B417G.M
 シーケンスライン : 6
 バイアル No. : 15
 注入量 : 20 ul



面積パーセントレポート

ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [count]	面積 %
1	3.203	BP	0.077	40.360	8.300	100
トータル:				40.360	8.300	

付属資料－3

ミジンコの観察結果

Appendix 3-1 Result of reproduction test

Test chemical: MeNa

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			12/2	12/3	12/4	12/5	12/6	12/7	12/8	12/9	12/10	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15	12/16	12/17	12/18	12/19	12/20	12/21	12/22	
			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	12	0	0	26	0	0	15	14	0	0	21	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	38	38	38	53	67	67	67	88	88	88	88
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	15	0	0	35	0	0	28	0	0	27	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	50	50	50	78	78	78	105	105	105	105	105
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	14	0	0	32	0	0	26	0	0	0	33	0	0	22	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	46	46	46	72	72	72	72	105	105	105	127	127	127
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	14	0	0	32	0	0	37	0	0	31	0	0	0	22	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	46	46	46	83	83	83	114	114	114	114	136	136	136
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	11	0	0	26	0	0	34	0	0	0	28	0	0	20	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	11	11	11	37	37	37	71	71	71	71	99	99	99	119	119	119
6	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															--
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	10	0	0	34	0	0	32	0	0	0	31	0	0	24	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	10	10	10	44	44	44	76	76	76	76	107	107	107	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	8	0	0	21	0	0	39	0	0	0	33	0	0	24	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	8	29	29	29	68	68	68	68	101	101	101	125	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	14	0	0	27	0	0	31	0	0	0	32	0	0	23	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	41	41	41	72	72	72	72	104	104	104	127	127	127
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	11	0	0	25	0	0	31	0	0	0	32	0	0	25	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	11	11	11	36	36	36	67	67	67	67	99	99	99	124	124	124

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

Appendix 3-2 Result of reproduction test

Test chemical: MeNa

(Solvent control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			12/2	12/3	12/4	12/5	12/6	12/7	12/8	12/9	12/10	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15	12/16	12/17	12/18	12/19	12/20	12/21	12/22	
			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	16	0	0	38	0	0	37	0	0	0	33	0	0	29	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	16	16	16	54	54	54	91	91	91	91	124	124	124	153	153	153
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	8	0	0	34	0	0	42	0	0	0	35	0	0	28	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	8	42	42	42	84	84	84	84	119	119	119	147	147	147
3	P generation	Live	1	1	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	12	0	0	45	0	0	39	0	0	28	5	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	57	57	57	96	96	96	124	129	129	129	155	155	--
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	12	0	0	37	0	0	33	1	0	6	30	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	49	49	49	82	83	83	89	119	119	119	145	145	145
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	14	0	0	36	0	0	36	0	0	34	0	0	0	29	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	50	50	50	86	86	86	120	120	120	120	149	149	149
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	9	0	0	43	0	0	33	0	0	0	43	0	0	28	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	9	52	52	52	85	85	85	85	128	128	128	156	156	156
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	17	0	0	33	0	0	48	0	0	39	0	0	0	30	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	17	17	17	50	50	50	98	98	98	137	137	137	137	167	167	167
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	13	0	0	41	0	0	38	0	0	0	38	0	0	29	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	54	54	54	92	92	92	92	130	130	130	159	159	159
9	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															--
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	3	40	2	0	35	0	0	0	39	0	0	32	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	14	54	56	56	91	91	91	91	130	130	130	162	162	162

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

Appendix 3-3 Result of repropduction test

Test chemical: MeNa

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		12/2	12/3	12/4	12/5	12/6	12/7	12/8	12/9	12/10	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15	12/16	12/17	12/18	12/19	12/20	12/21	12/22	
		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	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	49	0	0	39	0	0	0	17	0	0	28	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	15	64	64	64	103	103	103	103	120	120	120	148	148
2	P generation	Live	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	9	0	0	34	0	0	41	0	0	0	25	0	0	29	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	9	43	43	43	84	84	84	84	109	109	109	138	138
3	P generation	Live	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	8	0	0	30	0	0	41	0	0	16	2	0	0	26	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	8	38	38	38	79	79	79	95	97	97	97	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	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	13	0	0	34	0	0	36	0	0	0	14	0	0	30	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	47	47	47	83	83	83	83	97	97	97	127	127
5	P generation	Live	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	38	9	0	0	36	0	0	14	0	0	28	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	51	60	60	60	96	96	96	110	110	110	138	138
6	P generation	Live	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	14	0	0	34	0	0	42	0	0	0	15	0	0	26	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	48	48	48	90	90	90	90	105	105	105	131	131
7	P generation	Live	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	12	0	0	29	0	0	43	0	0	0	17	0	0	30	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	41	41	41	84	84	84	84	101	101	101	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	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	18	0	0	30	0	0	41	0	0	0	16	0	0	29	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	18	18	18	48	48	48	89	89	89	89	105	105	105	134	134
9	P generation	Live	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	12	0	0	32	0	0	37	0	0	0	13	0	0	27	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	44	44	44	81	81	81	81	94	94	94	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	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	29	0	0	38	0	0	0	14	0	0	25	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	15	44	44	44	82	82	82	82	96	96	96	121	121

Appendix 3-4 Result of reprodution test

Test chemical: MeNa

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			12/2	12/3	12/4	12/5	12/6	12/7	12/8	12/9	12/10	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15	12/16	12/17	12/18	12/19	12/20	12/21	12/22	
			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	13	0	0	30	0	0	39	0	0	0	38	1	0	27	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	43	43	43	82	82	82	82	120	121	121	148	148	148
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	10	0	0	48	0	49	0	0	40	0	0	0	27	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	58	58	107	107	107	147	147	147	147	174	174	174
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	12	0	1	48	0	0	37	1	0	29	0	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	13	61	61	61	98	99	99	128	128	128	128	153	153
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	14	0	0	24	0	0	0	36	0	0	39	0	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	38	38	38	38	74	74	74	113	113	113	113	141	141
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	1	13	0	35	0	0	44	0	0	0	36	0	0	29	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	1	14	14	49	49	49	93	93	93	93	129	129	129	158	158	158
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	25	0	0	35	0	0	32	0	0	28	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	60	60	60	92	92	92	120	120	120	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	13	0	0	27	0	0	38	0	0	14	24	0	0	28	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	40	40	40	78	78	78	92	116	116	116	144	144	144
8	P generation	Live	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	11	0	0	25	0	0	46	0	0	0	34					
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	11	11	11	36	36	36	82	82	82	82	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	14	0	0	32	0	0	39	0	0	35	0	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	46	46	46	85	85	85	120	120	120	120	146	146	146
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	9	0	0	31	0	0	38	0	0	36	0	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	9	40	40	40	78	78	78	114	114	114	114	140	140	140

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

Appendix 3-5 Result of repropduction test

Test chemical: MeNa

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		12/2 1 d	12/3 2 d	12/4 3 d	12/5 4 d	12/6 5 d	12/7 6 d	12/8 7 d	12/9 8 d	12/10 9 d	12/11 10 d	12/12 11 d	12/13 12 d	12/14 13 d	12/15 14 d	12/16 15 d	12/17 16 d	12/18 17 d	12/19 18 d	12/20 19 d	12/21 20 d	12/22 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	12	0	0	17	0	0	44	0	0	0	39	0	0	25	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	12	12	12	29	29	29	73	73	73	73	112	112	112	137	137	137
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	14	0	0	47	0	0	36	0	0	27	0	0	26	4	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	61	61	61	97	97	97	124	124	124	150	154	154
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	6	0	0	37	0	0	39	0	0	0	47	0	0	28	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	6	6	6	43	43	43	82	82	82	82	129	129	129	157	157	157
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	10	0	3	39	0	0	35	0	0	23	0	0	27	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	13	52	52	52	87	87	87	110	110	110	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	11	0	0	28	0	0	37	0	0	0	37	1	0	23	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	11	11	11	39	39	39	76	76	76	76	113	114	114	137	137	137
6	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														--
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	10	0	0	17	0	0	43	0	0	0	40	0	0	28	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	10	10	10	27	27	27	70	70	70	70	110	110	110	138	138	138
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	7	0	0	24	0	0	39	0	0	31	0	0	0	25	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	7	7	7	31	31	31	70	70	70	101	101	101	101	126	126	126
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	16	0	0	27	0	0	34	0	0	39	0	0	0	26	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	16	16	16	43	43	43	77	77	77	116	116	116	116	142	142	142
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	10	0	0	21	0	0	31	0	0	0	35	3	0	28	0	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	10	10	10	31	31	31	62	62	62	62	97	100	100	128	128	128

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

Appendix 3-6 Result of reproduction test

Test chemical: MeNa

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			12/2	12/3	12/4	12/5	12/6	12/7	12/8	12/9	12/10	12/11	12/12	12/13	12/14	12/15	12/16	12/17	12/18	12/19	12/20	12/21	12/22	
			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	4	0	0	15	0	0	6	0	0	17	0	0	0	8	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	4	4	4	19	19	19	25	25	25	42	42	42	42	50	50	50
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	9	0	0	32	0	0	19	0	0	0	14	0	0	9	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	9	41	41	41	60	60	60	60	74	74	74	83	83	83
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	16	1	0	20	0	0	13	0	0	13	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	17	17	37	37	37	50	50	50	63	63	63	63	63
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	18	0	0	12	0	0	21	0	0	19	0	0	16	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	30	30	30	51	51	51	70	70	70	86	86
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	12	1	0	17	0	0	24	0	0	27	0	0	0	13	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	13	13	30	30	30	54	54	54	81	81	81	81	94	94
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	13	0	0	10	0	0	12	0	0	9	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	23	23	23	35	35	35	35	44	44	44	44
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	14	0	0	10	0	0	18	0	0	0	5	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	24	24	24	42	42	42	42	47	47	47	47	47
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	10	0	0	15	0	0	9	0	0	23	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	10	10	10	25	25	25	34	34	34	57	57	57	76	76	76	76
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	7	0	0	10	0	0	27	0	0	0	0	0	0	11	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	17	17	17	44	44	44	44	44	44	44	55	55
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	11	0	0	15	0	0	22	0	0	18	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	26	26	26	48	48	48	66	66	66	66	66

Appendix 3-7 Result of repropduction test

Test chemical: MeNa

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		12/2 1 d	12/3 2 d	12/4 3 d	12/5 4 d	12/6 5 d	12/7 6 d	12/8 7 d	12/9 8 d	12/10 9 d	12/11 10 d	12/12 11 d	12/13 12 d	12/14 13 d	12/15 14 d	12/16 15 d	12/17 16 d	12/18 17 d	12/19 18 d	12/20 19 d	12/21 20 d	12/22 21 d	
1	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
2	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
3	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
4	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
5	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
6	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
7	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
8	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
9	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
10	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--

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