

環境省殿

試 験 報 告 書

平成15年度 底生生物生態影響予備試験
ペンタクロロフェノールのセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)
に対する底質/水系毒性試験(底質処理)

(試験番号：STS(2)-03010)

2004年3月31日

住化テクノサービス株式会社

試験実施概要

1 表題

ペンタクロフェノールのセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する底質/水系毒性試験(底質処理)

2 試験目的

被験物質のセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する底質/水系毒性試験(底質処理)の予備検討を行い、試験法の確立に資する。

3 試験方法

OECD 化学品テストガイドライン No.218 「Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment」(Draft, 2001年)の改訂版(ENV/JM/TG(2003)26, 2003年)に準拠した。

4 適用GLP

GLP適用外。

5 試験委託者

- 1) 名称：環境省
- 2) 住所：〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
- 3) 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 馬場 康弘

6 試験受託者

- 1) 名称：住化テクノサービス株式会社
- 2) 住所：〒665-0051 兵庫県宝塚市高司四丁目2番1号
- 3) 委託責任者：社長 菅 和郎

7 試験施設

- 1) 名称：住化テクノサービス株式会社
- 2) 住所：〒665-0051 兵庫県宝塚市高司四丁目2番1号

8 試験責任者

- 1) 氏名： (2004年3月31日)
- 2) 所属： 環境生態部 環境生態チーム

9 試験日程

- 1) 試験開始日 : 2004年1月27日
- 2) 実験開始日 : 2004年2月4日
- 3) 実験終了日 : 2004年3月4日
- 4) 試験終了日 : 2004年3月31日

目次

	頁
1 要約	5
2 緒言	5
3 被験物質	5
3.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	5
3.2 供試試料.....	5
3.3 保管方法.....	6
4 供試生物	6
5 試験方法	6
5.1 試験環境.....	6
5.2 試験容器.....	6
5.3 希釈水.....	7
5.4 底質.....	7
5.5 試験濃度の設定.....	7
5.6 石英砂への被験物質の吸着.....	7
5.7 実験操作.....	8
5.8 試験に使用する機器等.....	9
6 結果の算出	9
7 結果	9
7.1 試験計画書からの逸脱および試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項....	9
7.2 半数遊泳阻害濃度 (EC50)	10
7.3 羽化率、Development rate および中毒症状.....	10
7.4 上層水の水質.....	10
8 考察	11
表 1~8.....	12~16
図 1~3.....	17~18

1 要約

ペンタクロロフェノールの底質処理によるセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsu*)に対する半数羽化阻害濃度 (EC50) は、37mg/kg であり、最大無影響濃度(NOEC)は 14mg/kg であった。

2 緒言

OECD 化学品テストガイドライン No.218 「Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment」(Draft, 2001 年)の改訂版 (ENV/JM/TG(2003)26, 2003 年)に準拠し、ペンタクロロフェノールの底質処理によるセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsu*)に対する底質/水系毒性試験(底質処理)を行い、影響濃度を求めるとともに、試験条件を検討した。

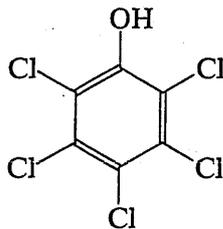
3 被験物質

3.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称：ペンタクロロフェノール (略称：PCP)

CAS No.：87-86-5

構造式：



分子式： C_6Cl_5OH

分子量：266.34

沸点：309-310°C

融点：188-191°C

水溶解度：80mg/L

比重：1.987

その他：logPow=3.32

出典 M.L.Richardson & S.Gandolli eds. The Dictionary of Substances and their Effects, Vol.6. The Royal Society of Chemistry (1994)

3.2 供試試料

純度：99%

ロット番号： RWP9881
供給者： 独立行政法人 国立環境研究所
製造者： 和光純薬工業株式会社
受領量： 200 mg×2本
受領日： 2004年1月21日
外観： 白色結晶

3.3 保管方法

冷蔵庫で保管した。

4 供試生物

試験には、セスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)の1令幼虫(24時間以内令)を用いた。

独立行政法人国立環境研究所で保有する感受性系統(起源は栃木県日光市湯元産)の卵の分譲を受けた。孵化までに要する時間は25℃で48時間程度であるため、孵化想定2日前に国立環境研究所より郵送してもらったが、発送2日後には十分数の個体が孵化しなかったため、未孵化の卵塊を別容器に移し、発送3日後に孵化後24時間以内の水中に泳ぎだした個体を使用した。

5 試験方法

5.1 試験環境

照明： 室内光，16時間明／8時間暗とした。
水温： 23±1℃に設定した。
試験期間中および全試験容器の水温が上記の範囲内にあること。
pH： 実験スタート時点で6～9の範囲。
溶存酸素： ごく弱い通気を行い、飽和濃度の60%以上に保つ。
硬度： 上層水の硬度は250以下(CaCO₃換算で250mg/L以下)。
濃度段階： 2.5, 4.5, 8, 14, 25, 45, 80mg/kg乾燥底質および対照区、各濃度とも繰り返し数4とした。
幼虫密度： 20個体/容器。
餌： ホウレンソウ粉末(C1)を独立行政法人国立環境研究所より供与を受け、底質調製時に底質(乾燥重量)の1%量練り込んで給餌した。

5.2 試験容器

500mLビーカーを用いた。試験容器にはゴミの侵入、羽化成虫の逃亡や試験水の蒸散を防ぐ目的で蓋をした。

5.3 希釈水

脱塩素水（水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気したもの）を使用した。脱塩素水使用時には、残留塩素がないことを確認した。硬度は250mg/L (CaCO₃換算) 以下、pHは6.0~9.0であることを確認した。

5.4 底質

OECD 人工底質を用いた。その調製法は以下の通りとした。500mL ビーカーを試験容器として用いた場合、ピートモス、カオリン、石英砂を乾燥重量で各々5g、20g、75g 使用すると底質の厚さが約2cm となった。

- 1) 独立行政法人国立環境研究所より配布された *Sphagnum* spp. の粉末ピートモス（乾燥、粉碎し、オープニング250 μ m の篩を通したもので、pH無調整）を20g*量り、1Lビーカーに移して少量の純水で練り、均一にペースト状にした。これを8セット準備した（7濃度区+対照区用）。

* 練り返し数4回分

- 2) ペースト状になったピートモスに中和の目的で炭酸カルシウムを1200mg**加え、練り込んだ。

** 予備検討であらかじめ算出した適量

- 3) 上記に脱塩素水を加え、マグネチックスターラーで3日間攪拌した。
- 4) 静置して沈殿した画分をステンレス製混合容器に移した。實際上ほとんどが沈殿画分となった。
- 5) 試薬級のカオリン（和光純薬製）を20%相当量（80g）を処理済みピートモスを入れたステンレス製混合容器に入れた。
- 6) 未処理の石英砂（メルク社、Quarz, fine granular, 1.07536.1000）260g、および3.5項に従って被験物質を吸着させた石英砂40gをステンレス製混合容器に入れた。石英砂全体として75%量となる。
- 7) 餌としてハウレンソウ粉末4g（底質の乾燥重量の1%相当）をステンレス製混合容器に入れた。
- 8) ピートモス（水分を含む）、カオリン、石英砂、ハウレンソウ粉末を混合した。
- 9) 調製した底質を各試験容器に4等分した。
- 10) 希釈水をごくゆっくり所定量（水深で底質の4倍量）まで入れた。

5.5 試験濃度の設定

本試験での濃度は、国立環境研究所で得られた予備試験の結果を基に、対照区、2.5、4.5、8、14、25、45および80mg/kgとした。

5.6 石英砂への被検物質の吸着

- 1) 石英砂を40g（1試験容器当たり10g）をガラス製シャーレにとった。
- 2) アセトン4mLに溶かした被検物質を先細のガラス製ピペットで石英砂全体に注ぎ、直ちにステンレス製葉さじで混合した。上記試験濃度に対応したアセトン溶液は、対照区、2.5、4.5、8、14、25、45および80mg/kgについて各々0、1、1.8、3.2、5.6、10、18および32mgの被検物質を4mLのアセトンに溶解したものとなる。
- 3) ドラフトの中に放置してアセトンを蒸発させて除去した。
- 4) 上記5.4 6)に加えた。

5.7 実験操作

1) 通気

暴露3日前に通気用のステンレス製管を底質表面から3-4cmの位置にセットし、3日間通気した。暴露当日、ユスリカ幼虫導入前に通気を止め、導入約3時間後に通気を再開した。

2) ユスリカ幼虫の導入

通気を止めた後、セスジユスリカ1令幼虫（ふ化後24時間以内）、1濃度区当たり5個体ずつ4回、計20個体をピペットを用いて試験容器に入れた。

3) 水質測定

実験開始時にpH、DO、水温について全容器、アンモニア濃度、硬度について対照区および最高濃度区で水質測定を実施した。

その後、pH、DO、水温についてはほぼ3回/週の間隔で測定を行った。

実験終了時にpH、DO、水温については全容器、アンモニア濃度、硬度について対照区および最高濃度区で水質測定を実施した。

4) 給餌

底質に練り込んだ量のみとし、ユスリカ幼虫の導入後、実験終了時まで給餌を行わなかった。

5) 被検物質濃度測定

測定しなかった。

6) 蒸発した水の補給

蒸留水を加えて水量を一定に保った。

7) 異常行動の観察

底質からでた幼虫数を計数した。

8) 羽化の観察

暴露開始14日後頃より対照区で羽化（♂の方が2日程度早い）が始まるため、暴露開始12日後より毎日観察を行い、羽化および羽化失敗数（雌雄別）を記録し、羽化個体および羽化殻を取り除いた。

9) 実験終了

対照区で最後の羽化が観察された日から数えて5日経過した段階、または28日経過した時点で実験を終了してよい。

5.8 試験に使用する機器等

水温計： 電子温度計（PC-2200 株佐藤計量器製作所製）

溶存酸素計： 58型（YSI製）

pH計： F-22型（株堀場製作所製）

硬度： ドロップテストWAD-TH（株共立理化学研究所製）

アンモニア： テトラテスト アンモニア試薬（テトラベルケ社）

試験不成立条件：

- ・ 対照区でのユスリカの羽化率が実験終了時で70%未満の場合
- ・ 対照区でのユスリカの羽化が実験開始12~23日から逸脱する場合
- ・ 実験終了時の溶存酸素が飽和の60%を下回る、またはpHが6~9の範囲から逸脱した場合
- ・ 水温が±1℃を超えた場合

6 結果の算出

1) 羽化個体数の集計

羽化個体数（雌雄別）を容器毎に集計した。

2) 被検物質濃度

被検物質濃度は設定底質濃度（底質乾燥重当たりの被検物質重量）を用いた。

3) NOEC/LOECの算出

羽化率（ $ER = n_e / n_a$ ：1容器当たり羽化数 / 1容器に入れた幼虫数：20個体）を求め、 $ER_{arc} = \arcsin(\sqrt{ER})$ に変換し、ANOVA法でNOEC/LOECを求めた。

4) EC50の算出

羽化個体数および被検物質濃度との関係から、Probit法により計算した。

5) Development rateの算出

下記の式により平均生長時間を求めた。

$$x = \sum f_i x_i / n_e$$

f_i : i-1~i日に羽化した個体数

x_i : $1/(i-1/2)$ 1/day

n_e : 1容器当たり羽化個体数

7 結果

7.1 試験計画書からの逸脱および試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項

試験計画書に、溶存酸素濃度 (D.O.) を飽和の 60% 以上に保つ旨記載したが、暴露 14 日目の 4.5mg/kg 区-4、8mg/kg 区-1 および-2、28 日目の 14mg/kg 区-3 において基準を下回った。4.5mg/kg 区-4、8mg/kg 区-1 および-2 では、これらの濃度の他の連より若干羽化数が少ない傾向があり (有意差はなし)、低 D.O. の影響を受けた可能性もある。

その他、試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項はなかった。

7.2 羽化率、Development rate および中毒症状

Table 1 に雄、Table 2 に雌の羽化パターン、Table 3、Figure 1 および Figure 2 に雌雄別の羽化数および Development rate を示す。各試験区の雌雄の羽化数は試験区によって多少のばらつきが認められたが、最初の雌雄比が不明なため、化合物の影響は評価できない。平均羽化率は対照区 85%、2.5mg/kg 86%、4.5mg/kg 79%、8mg/kg 89%、14mg/kg 83%、25mg/kg 71%、45mg/kg 39%、80mg/kg 1% であり、25mg/kg 以上の濃度区で有意に低下した。各試験区の Development rate も羽化率と同様、25mg/kg 以上の濃度区で低下が認められた。

1 日に観察された 1 容器当たりの巣からの最大脱出個体数は、対照区、2.5mg/kg 区、4.5mg/kg 区および 8mg/kg 区では 2 個体以下であったが、14mg/kg 区、25mg/kg 区、45mg/kg 区および 80mg/kg 区では 5 個体、11 個体、2 個体および 5 個体であった。暴露中に発見された死亡幼虫数の合計は、対照区、2.5mg/kg 区、4.5mg/kg 区、8mg/kg 区、14mg/kg 区、25mg/kg 区、45mg/kg 区および 80mg/kg 区で各々 0、0、0、0、4、3、10 および 29 個体であった。実験終了時に見出された生存幼虫数は 45mg/kg 区および 80mg/kg 区で各々 3 および 4 個体のみであった。以上、実験終了時までには羽化した個体数と生存幼虫数から、最終的な各試験区における死亡率は各々 15、14、21、11、18、29、58 および 94% と算出された (Figure 3)。幼虫の活動等による上層水の濁りのため、死亡した幼虫を全て回収することは困難であったが、25mg/kg 区以上の濃度区において濃度依存が認められた。

7.3 NOEC、LOEC および EC50

ペンタクロロフェノールのセスジユスリカの羽化に対する NOEC は 14mg/kg、LOEC は 25mg/kg であった。Probit 法を用いて計算した EC50 は 37mg/kg (95% 信頼限界: 29~50mg/kg) であった。

7.4 上層水の水質

試験中の総硬度は70~90mg/L (Table 4) で、250mg/L以下の条件を満たした。アンモニアは暴露開始時より1.5~3mg/L観察され、最初から餌を混合しておいた影響があったものと考えられた。その後、アンモニアは試験中に著しく増加し、最高30mg/Lに達した (Table 5)。水温は22.5~23.4℃と安定しており、23±1℃の条件を満たした (Table 6)。溶存酸素濃度 (D.O.) は暴露開始前より低い傾向があり、飽和の60% (23℃における飽和D.O.=8.39mg/L) を下回る恐れがあったため、通気を多い目 (>5 bubble/秒) に維持した。それでも数回D.O.が飽和の60%を下回った (5.1項参照) (Table 7)。pHは底質調整時には7前後であったものの、暴露開始時には8前後と高まり、その後も徐々に高くなって実験終了時には9に接近した。しかしながら、6~9の条件は満たした (Table 8)。上層水は餌のホウレンソウの影響で緑茶色を呈した。

8 考察

今回の試験では、餌を最初から底質に練り込む手法を採用した。この手法により、上層水の水質に様々な影響が生じたものと考えられた。

最も影響をこうむったと考えられる水質はD.O.であり、>5 bubble/秒でようやく飽和D.O.の60%をほぼ維持できた。ガイドライン記載の条件 (1または数bubble/秒) では到底飽和の60%を維持できるとは考えられなかった。Bubble数を増やすことにより最も危惧される影響は、羽化の攪乱であるが、今回の試験条件での羽化失敗は観察されなかったため、D.O.維持のためbubble数を増やすことは問題ないと考えられた。

アンモニアは暴露開始時より高いレベルで検出され、更に試験中増加して、最高30mg/Lに達した。これは、餌のホウレンソウの分解によるものと考えられるが、対照区や低濃度区の高い羽化率より、この程度のアンモニアの影響はなかったものと推察される。pHが高めに推移した原因もアンモニアの増加によるものと考えられる。PHを中性付近にとどめるためには、底質調製の際に炭酸カルシウムによる中和操作をpH6付近に抑える必要があると考えられる。

以上、餌を最初から底質に練り込む手法は、毎日の給餌の手間を省ける利点がある一方、D.O.の顕著な低下や、毎日給餌以上のpH、アンモニアの上昇を考慮する必要がある。

以上

Table 1 Emergence pattern in male *Chironomus yoshimatsui* exposed to pentachlorophenol

Concentration (mg/kg)	Days after hatching																
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Control	-1	0	0	1	4	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	4	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	0	0	1	0	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	6	13	7	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5	-1	1	0	3	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	1	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	1	1	11	12	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
4.5	-1	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	4	7	7	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
8	-1	0	0	3	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	1	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	6	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	6	7	14	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
14	-1	0	0	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	1	14	9	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0		
25	-1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
	-3	0	0	0	1	3	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
Total	0	0	0	3	6	5	5	3	0	2	1	0	1	0	0		
45	-1	0	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Total	0	0	1	1	1	0	2	3	0	1	2	0	0	0	0		
80	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		

Table 2 Emergence pattern in female *Chironomus yoshimatsui* exposed to pentachlorophenol

Concentration (mg/kg)	Days after hatching																
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Control	-1	0	0	0	1	0	3	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	2	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	0	0	0	0	0	3	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	1	1	3	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	1	4	6	10	3	7	2	2	0	0	0	0	0	0	
2.5	-1	0	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	2	0	1	3	3	1	0	1	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	2	3	4	2	0	0	1	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	1	3	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	1	8	5	7	9	5	2	1	1	0	0	0	0		
4.5	-1	0	0	1	1	0	1	2	0	2	2	1	0	0	1	0	
	-2	0	0	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	6	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	1	9	3	6	8	2	2	2	2	0	0	1	0		
8	-1	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	3	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	0	0	1	0	
	-4	0	0	0	0	4	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	0	0	7	6	10	6	1	1	2	0	0	1	0		
14	-1	0	0	0	0	2	1	3	0	1	2	0	0	0	1	0	
	-2	0	0	0	1	1	1	2	3	2	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	2	3	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	1	0	3	1	1	0	0	0	1	0	0	
Total	0	0	0	3	7	4	9	4	4	2	0	0	1	1	1		
25	-1	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	2	1	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4	1	0	1	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	0	1	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	2	0	1	
Total	0	0	0	0	0	1	1	4	8	5	4	2	5	0	1		
45	-1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	
Total	0	0	0	0	0	2	2	3	2	2	2	0	5	0	0		
80	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 3 Emergence rates and development rates of *Chironomus yoshimatsui* exposed to pentachlorophenol

Concentration (mg/kg)	No. of emergence		Development rate		
	Male	Female	Male	Female	Average
Control - 1	9	8	0.062	0.054	0.058
- 2	9	8	0.065	0.060	0.063
- 3	7	9	0.059	0.053	0.056
- 4	8	10	0.063	0.058	0.060
Total	33	35	0.062	0.056	0.059
2.5 - 1	10	7	0.066	0.058	0.063
- 2	3	11	0.058	0.054	0.055
- 3	7	12	0.066	0.058	0.061
- 4	10	9	0.067	0.058	0.063
Total	30	39	0.064	0.057	0.060
4.5 - 1	6	11	0.062	0.052	0.056
- 2	8	7	0.070	0.059	0.065
- 3	5	12	0.067	0.060	0.062
- 4	8	6	0.060	0.054	0.058
Total	27	36	0.065	0.056	0.060
8 - 1	9	7	0.064	0.055	0.060
- 2	9	9	0.060	0.056	0.058
- 3	11	8	0.058	0.048	0.054
- 4	8	10	0.065	0.057	0.060
Total	37	34	0.062	0.054	0.058
14 - 1	7	10	0.062	0.052	0.056
- 2	6	10	0.062	0.054	0.057
- 3	9	9	0.064	0.058	0.061
- 4	8	7	0.058	0.052	0.055
Total	30	36	0.062	0.054	0.057
25 - 1	5	9	0.055	0.047	0.050
- 2	7	8	0.056	0.048	0.051
- 3	10	7	0.057	0.046	0.053
- 4	4	7	0.052	0.045	0.048
Total	26	31	0.055	0.046	0.050
45 - 1	6	7	0.059	0.053	0.056
- 2	1	4	0.044	0.043	0.044
- 3	3	4	0.049	0.041	0.045
- 4	1	5	0.047	0.044	0.044
Total	11	20	0.050	0.045	0.047
80 - 1	1	0	0.044	-	0.044
- 2	0	0	-	-	-
- 3	0	0	-	-	-
- 4	0	0	-	-	-
Total	1	0	-	-	-

Table 4. Total Hardness of Surface Water (mg/L, as CaCO₃)

Concentration (mg/kg)	Days after exposure	
	0	28
Control-1	75	85
Control-2	70	85
Control-3	75	90
Control-4	75	90
1000-1	70	90
1000-2	75	85
1000-3	85	90
1000-4	70	90

Table 5. Ammonia Detected in Surface Water (mg/L)

Concentration (mg/kg)	Days after exposure				
	0	7	14	22	28
Control-1	3	15	30	30	15
Control-2	1.5	7.5	7.5	30	15
Control-3	3	15	30	30	15
Control-4	1.5	7.5	30	30	30
1000-1	1.5	7.5	15	15	15
1000-2	1.5	7.5	7.5	7.5	15
1000-3	3	7.5	7.5	7.5	7.5
1000-4	0.25	7.5	15	15	15

Table 6. Water Temperature of Surface Water (°C)

Concentration (mg/kg)	Days after exposure											
	0	2	5	8	12	15	16	19	21	23	26	28
Control-1	23.0	22.7	23.1	23.2	22.9	22.8	22.9	22.8	22.8	22.5	22.9	22.7
Control-2	23.0	22.7	23.3	23.3	22.9	22.9	22.9	22.8	22.8	22.6	22.8	22.8
Control-3	23.0	22.6	23.2	23.1	22.9	22.9	22.9	22.8	22.8	22.6	22.8	22.8
Control-4	23.0	22.7	23.3	23.2	22.9	22.9	22.8	22.8	22.8	22.6	22.7	22.8
Average	23.0	22.7	23.2	23.2	22.9	22.9	22.9	22.8	22.8	22.6	22.8	22.8
SD	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
2.5-1	23.0	22.7	23.3	23.4	22.6	22.8	22.8	22.7	22.8	22.6	22.7	22.9
2.5-2	23.0	22.7	23.3	23.3	22.7	22.8	22.8	22.7	22.7	22.7	22.8	22.9
2.5-3	23.0	22.8	23.3	23.3	22.8	22.9	23.0	22.8	22.8	22.8	22.9	22.7
2.5-4	23.0	22.9	23.3	23.4	22.8	22.9	23.0	22.8	22.8	22.6	22.7	22.7
Average	23.0	22.8	23.3	23.4	22.7	22.9	22.9	22.8	22.8	22.7	22.8	22.8
SD	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
4.5-1	23.0	23.0	23.2	23.3	22.6	22.7	22.9	22.6	22.9	22.7	22.7	22.7
4.5-2	23.0	22.9	23.3	23.2	22.7	22.7	23.0	22.6	23.0	22.8	22.7	22.7
4.5-3	23.0	22.8	23.3	23.3	22.8	22.7	22.9	22.7	22.9	22.9	22.9	22.9
4.5-4	23.0	22.9	23.3	23.3	22.9	22.8	22.9	22.8	22.9	22.8	23.0	22.9
Average	23.0	22.9	23.3	23.3	22.8	22.7	22.9	22.7	22.9	22.8	22.8	22.8
SD	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
8-1	23.0	22.8	23.3	23.2	22.6	22.8	23.0	22.6	22.8	22.6	22.7	22.5
8-2	23.0	22.8	23.3	23.2	22.7	22.8	23.0	22.7	22.9	22.8	22.7	22.5
8-3	23.0	22.7	23.3	23.3	22.9	22.9	22.9	22.7	23.0	22.8	22.7	22.7
8-4	23.0	22.7	23.3	23.3	22.9	23.0	22.9	22.8	23.0	22.9	22.9	22.7
Average	23.0	22.8	23.3	23.3	22.8	22.9	23.0	22.7	22.9	22.8	22.8	22.6
SD	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
14-1	22.9	22.9	23.2	23.3	22.8	22.8	22.9	22.5	22.9	22.8	22.7	22.5
14-2	23.0	22.9	23.2	23.4	22.8	22.9	22.9	22.9	22.6	22.9	22.8	22.5
14-3	23.0	22.9	23.1	23.4	22.9	23.0	23.0	22.6	23.0	22.8	23.0	22.5
14-4	23.0	22.8	23.2	23.4	22.9	23.0	23.0	22.7	23.0	22.7	23.0	22.6
Average	23.0	22.9	23.2	23.4	22.9	22.9	23.0	22.7	22.9	22.8	22.9	22.5
SD	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
25-1	23.0	22.7	23.1	23.3	22.7	22.8	22.9	22.6	22.9	22.8	22.8	22.8
25-2	23.0	22.8	23.1	23.3	22.7	22.9	23.0	22.6	22.9	22.9	22.8	22.9
25-3	23.0	22.8	23.3	23.4	22.9	23.0	23.0	22.7	23.0	22.9	22.8	22.9
25-4	23.0	22.8	23.3	23.4	22.9	23.0	23.0	22.7	23.1	22.8	22.8	23.0
Average	23.0	22.8	23.2	23.4	22.8	22.9	23.0	22.7	23.0	22.9	22.8	22.9
SD	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1
45-1	23.0	22.7	23.2	23.3	22.6	22.9	22.9	22.6	22.8	22.7	22.8	22.7
45-2	23.0	22.7	23.2	23.3	22.8	22.9	23.0	22.7	22.9	22.8	22.9	22.7
45-3	23.0	22.7	23.2	23.3	22.9	22.9	23.0	22.8	23.0	22.9	22.8	22.9
45-4	23.0	22.8	23.2	23.4	22.9	23.0	23.1	22.8	23.0	22.9	22.9	22.8
Average	23.0	22.7	23.2	23.3	22.8	22.9	23.0	22.7	22.9	22.8	22.9	22.8
SD	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
80-1	23.0	22.7	23.1	23.3	22.6	22.9	22.9	22.6	22.9	22.8	22.8	22.7
80-2	23.0	22.8	23.2	23.3	22.8	22.9	23.0	22.6	23.0	22.9	22.9	22.9
80-3	23.0	22.7	23.2	23.4	22.9	23.0	23.0	22.6	23.0	22.9	22.9	22.8
80-4	23.0	22.7	23.2	23.4	22.9	23.0	23.1	22.7	23.0	22.8	22.9	22.7
Average	23.0	22.7	23.2	23.4	22.8	23.0	23.0	22.6	23.0	22.9	22.9	22.8
SD	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1

Table 7. Dissolved Oxygen Concentration of Surface Water (mg/L)

Concentration (mg/kg)	Days after exposure											
	-1	1	4	7	11	13	15	18	20	22	25	27
Control-1	6.64	6.10	7.41	6.88	6.85	7.12	7.45	7.63	7.74	8.00	7.91	8.02
Control-2	7.14	6.59	7.69	6.59	5.53	6.87	7.83	7.66	7.91	7.95	8.04	8.13
Control-3	7.29	6.93	7.34	7.00	5.97	6.05	5.85	7.34	7.95	8.24	7.87	8.07
Control-4	7.04	5.92	7.50	6.80	6.83	5.29	7.34	7.87	8.00	8.32	8.07	8.11
Average	7.03	6.39	7.49	6.82	6.30	6.33	7.12	7.63	7.90	8.13	7.97	8.08
SD	0.28	0.46	0.15	0.17	0.65	0.83	0.87	0.22	0.11	0.18	0.10	0.05
2.5-1	7.75	5.88	7.80	7.09	6.85	5.73	7.65	7.47	7.97	8.39	8.05	8.09
2.5-2	7.65	6.22	7.96	7.35	5.43	5.48	7.60	7.81	7.93	8.37	7.97	7.99
2.5-3	7.63	6.26	7.85	7.22	7.09	6.88	7.55	7.68	7.91	8.27	7.98	7.98
2.5-4	7.80	6.10	7.87	6.77	7.39	5.29	7.57	7.75	7.90	8.07	7.97	8.00
Average	7.71	6.12	7.87	7.11	6.69	5.85	7.59	7.68	7.93	8.28	7.99	8.02
SD	0.08	0.17	0.07	0.25	0.87	0.71	0.04	0.15	0.03	0.15	0.04	0.05
4.5-1	7.18	7.51	7.89	7.81	6.74	6.23	7.76	7.76	8.08	8.30	8.08	8.04
4.5-2	7.50	7.36	7.90	7.68	6.05	5.08	7.52	7.65	7.93	8.33	8.04	7.85
4.5-3	5.99	7.10	7.61	7.77	7.19	6.11	7.67	7.61	7.90	8.29	7.96	7.95
4.5-4	6.11	6.54	7.59	7.03	7.09	3.27	7.39	7.62	7.74	8.13	7.79	7.77
Average	6.70	7.13	7.75	7.57	6.77	5.17	7.59	7.66	7.91	8.26	7.97	7.90
SD	0.76	0.43	0.17	0.37	0.52	1.37	0.16	0.07	0.14	0.09	0.13	0.12
8-1	7.41	7.30	7.65	7.85	6.09	4.64	7.76	7.79	8.03	8.37	8.09	7.95
8-2	7.16	6.10	7.32	7.83	6.04	4.45	7.87	7.54	7.75	8.23	8.13	7.93
8-3	7.44	7.02	7.66	7.52	6.71	6.84	7.10	7.49	7.86	8.24	8.05	7.87
8-4	7.34	7.02	7.84	7.68	5.82	6.01	7.38	7.58	7.74	8.19	8.09	7.91
Average	7.34	6.86	7.67	7.72	6.17	5.49	7.53	7.60	7.85	8.26	8.09	7.94
SD	0.13	0.52	0.26	0.15	0.38	1.14	0.35	0.13	0.13	0.08	0.03	0.03
14-1	7.75	7.38	7.71	7.47	7.24	6.29	7.68	7.79	7.97	8.29	7.99	7.96
14-2	7.81	6.78	7.47	7.11	6.78	5.08	7.75	7.79	7.99	8.29	8.01	8.00
14-3	7.63	7.17	7.66	7.56	7.51	7.31	7.34	7.74	7.89	8.27	7.92	4.55
14-4	7.75	7.51	7.77	7.61	7.62	7.47	7.33	7.78	8.04	8.23	8.00	7.76
Average	7.74	7.21	7.65	7.44	7.29	6.54	7.53	7.78	7.97	8.27	7.98	7.07
SD	0.08	0.32	0.13	0.23	0.37	1.10	0.22	0.02	0.06	0.03	0.04	1.66
25-1	7.48	7.67	7.78	7.66	7.55	7.04	7.79	7.96	8.00	8.40	7.98	7.99
25-2	7.49	7.61	7.71	7.64	7.66	7.17	6.16	7.78	7.99	8.22	8.00	7.92
25-3	7.01	7.51	7.73	7.80	7.26	6.89	7.11	7.78	7.82	8.18	7.85	7.88
25-4	7.34	6.52	7.62	7.56	7.05	7.29	7.09	7.64	7.83	8.16	7.84	7.64
Average	7.33	7.33	7.71	7.59	7.38	7.10	7.04	7.79	7.91	8.24	7.92	7.86
SD	0.22	0.54	0.07	0.07	0.28	0.17	0.67	0.13	0.10	0.11	0.08	0.15
45-1	7.30	7.90	7.62	7.25	7.77	6.83	7.85	7.81	7.84	8.22	8.04	7.98
45-2	6.18	7.46	7.77	7.70	7.50	6.01	7.49	7.57	7.78	8.09	8.10	7.65
45-3	7.39	7.89	7.83	7.11	7.61	7.05	5.66	7.62	7.84	8.05	8.07	7.69
45-4	7.21	7.84	7.41	7.06	7.30	6.46	7.24	7.54	7.79	8.01	7.99	7.84
Average	7.02	7.77	7.66	7.28	7.55	6.59	7.06	7.64	7.81	8.09	8.05	7.79
SD	0.56	0.21	0.19	0.29	0.20	0.46	0.97	0.12	0.03	0.09	0.05	0.15
80-1	7.28	7.85	7.64	7.54	7.70	7.68	7.80	7.73	7.93	8.19	8.08	7.80
80-2	6.99	7.78	7.72	7.74	6.71	7.59	7.78	7.69	7.98	8.13	8.00	7.68
80-3	7.18	7.46	7.95	7.80	7.70	7.35	7.87	7.78	8.10	8.26	8.06	8.05
80-4	6.94	7.64	7.88	7.40	7.00	7.18	7.44	7.78	8.10	8.26	7.90	7.74
Average	7.10	7.68	7.80	7.62	7.28	7.45	7.72	7.75	8.03	8.21	8.01	7.82
SD	0.16	0.17	0.14	0.18	0.50	0.23	0.19	0.04	0.09	0.06	0.08	0.16

Table 8. pH of Surface Water

Concentration (mg/kg)	Days after exposure											
	-1	1	4	7	11	13	15	18	20	22	25	27
Control-1	8.02	7.97	8.52	8.55	8.48	8.55	8.66	8.74	8.73	8.78	8.86	8.89
Control-2	8.08	8.14	8.61	8.44	8.34	8.46	8.73	8.67	8.70	8.70	8.94	8.93
Control-3	8.13	8.13	8.69	8.73	8.35	8.52	8.63	8.74	8.87	8.93	8.92	8.95
Control-4	8.13	8.19	8.57	8.58	8.67	8.32	8.61	8.87	8.87	8.94	8.98	8.98
Average	8.09	8.11	8.60	8.58	8.46	8.46	8.66	8.76	8.79	8.84	8.93	8.94
SD	0.05	0.10	0.07	0.12	0.15	0.10	0.05	0.08	0.09	0.12	0.05	0.04
2.5-1	8.33	8.22	8.62	8.48	8.49	8.30	8.73	8.55	8.71	8.81	8.94	8.87
2.5-2	8.22	7.85	8.72	8.65	8.37	8.22	8.67	8.77	8.79	8.83	8.98	8.92
2.5-3	8.28	8.24	8.69	8.67	8.57	8.57	8.73	8.80	8.82	8.87	8.96	8.95
2.5-4	8.38	8.08	8.67	8.54	8.63	8.66	8.78	8.81	8.74	8.88	8.92	8.94
Average	8.30	8.10	8.68	8.59	8.52	8.44	8.73	8.73	8.77	8.85	8.95	8.92
SD	0.07	0.18	0.04	0.09	0.11	0.21	0.05	0.12	0.05	0.03	0.03	0.04
4.5-1	7.92	8.06	8.61	8.65	8.63	8.38	8.67	8.69	8.74	8.84	8.88	8.88
4.5-2	8.05	8.28	8.57	8.63	8.31	8.22	8.62	8.69	8.75	8.84	8.91	8.75
4.5-3	8.06	8.22	8.60	8.64	8.55	8.23	8.61	8.71	8.75	8.87	8.98	8.98
4.5-4	7.85	8.01	8.63	8.63	8.59	8.19	8.66	8.74	8.74	8.84	8.87	8.90
Average	7.97	8.14	8.60	8.64	8.52	8.26	8.64	8.71	8.75	8.85	8.91	8.88
SD	0.10	0.13	0.02	0.01	0.14	0.09	0.03	0.02	0.01	0.02	0.05	0.10
8-1	8.05	8.30	8.57	8.75	8.42	8.16	8.77	8.80	8.84	8.92	8.98	8.95
8-2	7.99	8.01	8.32	8.74	8.41	8.25	8.79	8.73	8.76	8.86	8.94	8.92
8-3	8.06	8.30	8.64	8.51	8.34	8.25	8.41	8.65	8.59	8.85	8.94	8.96
8-4	8.05	8.37	8.62	8.71	8.35	8.31	8.63	8.71	8.64	8.85	8.94	8.93
Average	8.04	8.25	8.54	8.68	8.38	8.24	8.65	8.72	8.71	8.87	8.95	8.94
SD	0.03	0.16	0.15	0.11	0.04	0.06	0.18	0.06	0.11	0.03	0.02	0.02
14-1	8.19	8.29	8.59	8.60	8.51	8.23	8.70	8.72	8.85	8.88	8.90	8.89
14-2	8.21	8.29	8.52	8.52	8.42	8.21	8.76	8.80	8.80	8.84	8.97	8.96
14-3	8.06	8.12	8.47	8.45	8.28	8.23	8.42	8.57	8.72	8.72	8.78	8.49
14-4	8.18	8.32	8.59	8.60	8.53	8.38	8.53	8.65	8.79	8.81	8.83	8.81
Average	8.16	8.26	8.54	8.54	8.44	8.26	8.60	8.69	8.82	8.84	8.87	8.79
SD	0.07	0.09	0.06	0.07	0.11	0.08	0.16	0.10	0.08	0.09	0.08	0.21
25-1	8.02	8.20	8.51	8.52	8.41	8.22	8.58	8.67	8.73	8.72	8.81	8.79
25-2	8.08	8.31	8.66	8.69	8.58	8.34	8.39	8.64	8.78	8.79	8.88	8.85
25-3	8.17	8.27	8.60	8.65	8.55	8.44	8.62	8.74	8.83	8.85	8.90	8.87
25-4	7.95	8.06	8.56	8.57	8.40	8.30	8.46	8.62	8.77	8.78	8.86	8.83
Average	8.06	8.21	8.58	8.61	8.49	8.33	8.51	8.67	8.78	8.79	8.86	8.84
SD	0.09	0.11	0.06	0.08	0.09	0.09	0.11	0.05	0.04	0.05	0.04	0.03
45-1	8.05	8.23	8.46	8.43	8.48	8.26	8.61	8.70	8.74	8.78	8.92	8.90
45-2	7.93	8.22	8.58	8.60	8.49	8.32	8.46	8.56	8.52	8.70	8.90	8.74
45-3	8.09	8.22	8.55	8.42	8.33	8.32	8.25	8.50	8.54	8.60	8.81	8.83
45-4	8.11	8.28	8.46	8.47	8.39	8.34	8.42	8.49	8.54	8.67	8.77	8.80
Average	8.05	8.24	8.51	8.46	8.42	8.31	8.44	8.56	8.59	8.69	8.85	8.82
SD	0.08	0.03	0.06	0.08	0.08	0.03	0.15	0.10	0.10	0.07	0.07	0.07
80-1	8.05	8.26	8.41	8.46	8.43	8.39	8.47	8.47	8.53	8.60	8.77	8.71
80-2	7.91	8.20	8.47	8.61	8.18	8.46	8.53	8.54	8.59	8.59	8.70	8.68
80-3	8.10	8.21	8.56	8.57	8.32	8.36	8.50	8.52	8.52	8.60	8.71	8.69
80-4	8.02	8.25	8.63	8.59	8.33	8.43	8.51	8.51	8.60	8.68	8.78	8.82
Average	8.02	8.23	8.52	8.56	8.32	8.41	8.50	8.51	8.56	8.62	8.74	8.73
SD	0.08	0.03	0.10	0.07	0.10	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.06

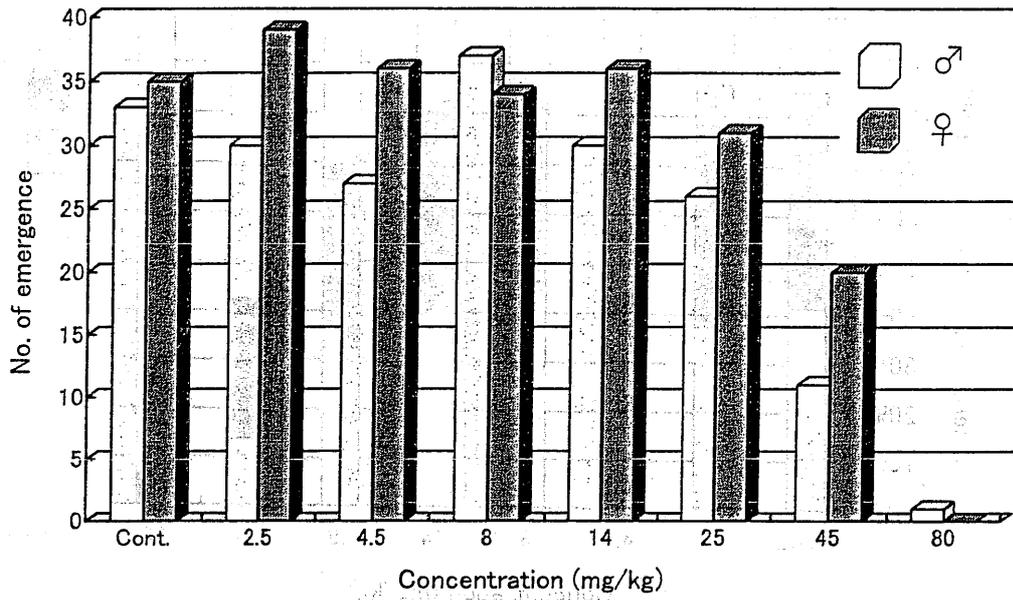


Figure 1. Number of emergence of *Chironomus yoshimatsui* exposed to pentachlorophenol

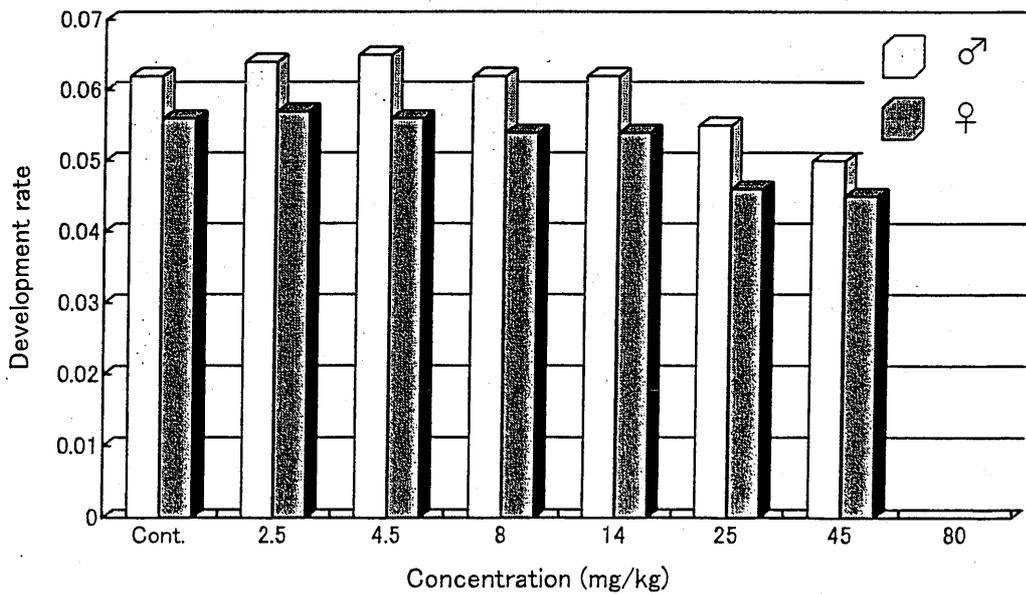


Figure 2. Development rates of *Chironomus yoshimatsui* exposed to pentachlorophenol

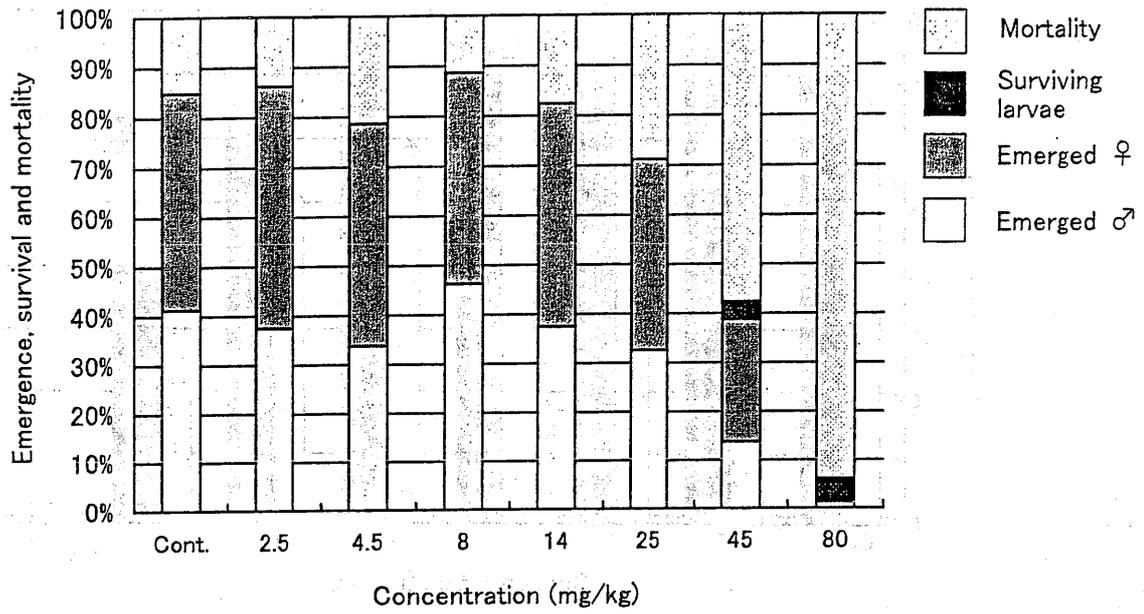


Figure 3. Emergence rates, survivals and mortalities of *Chironomus yoshimatsui* at the termination of exposure to pentachlorophenol