

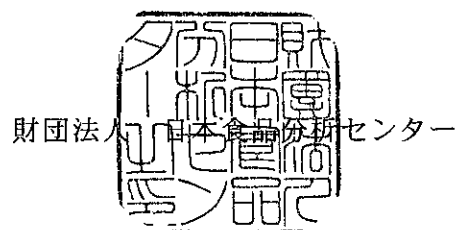
環境省殿

試 験 報 告 書

PCPのセスジユスリカ (*Chironomus yoshimatsuï*) に対する底質/水系毒性試験

(試験受託番号：第104031433号)

2004年3月31日



試験実施概要

1. 表 題：PCPのセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する底質/水系毒性試験
2. 試験目的：PCPの底質添加によるセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する底質/水系毒性試験の予備試験を実施する。
3. 試験方法：OECDドラフトテストガイドライン218に従う試験手順書及びSediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment Revised Draft Guideline 218 (December 2002)に従って実施する。
4. 試験委託者：
 - 1) 名 称：環境省
 - 2) 住 所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
 - 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
5. 試験受託者：
 - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
 - 2) 住 所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
 - 3) 代 表 者：齋藤 文一
6. 試験施設：
 - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
 - 2) 住 所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
7. 試験責任者
所 属：環境科学部 環境生物安全課
氏 名：
8. 試験担当者
生物系
所 属：環境科学部 環境生物安全課
氏 名：
分析系
所 属：応用試験部 農薬試験課
氏 名：

目次

	頁
要 旨	4 ~ 5
1 被験物質	6
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	6
1.2 供試試料	6
2 供試生物	7
3 試験方法	7
3.1 試験条件	7
3.2 希积水	7
3.3 石英砂への被験物質の吸着	7
3.4 人工底質の調製	8
3.5 試験容器及び恒温室等	8
3.6 試験濃度の設定	9
3.7 試験底質/水系中の被験物質濃度の分析	9
3.8 試験操作	9
4 結果の算出	9
4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定	9
4.2 半数羽化阻害濃度 (EC ₅₀) の算出	10
4.3 平均生長時間	10
5 結果及び考察	10
5.1 試験底質/水系中の被験物質濃度	10
5.2 上層水及び幼虫の状態	10
5.3 半数羽化阻害濃度 (EC ₅₀)	11
5.4 平均生長時間	11
5.5 上層水の水温, 溶存酸素濃度, pH, 硬度及びアンモニア濃度	11
5.6 試験の妥当性	11
5.7 テストガイドラインに関する疑問点, 改善・改変すべき点など	12 ~ 13
Table 1 ~ 10	14 ~ 19
Figure 1	19
付属資料-1 希积水の水質測定結果	20
付属資料-2 人工底質	21
付属資料-3 試験底質/水系中の被験物質濃度の分析方法	22 ~ 23

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

PCPのセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する底質/水系毒性試験

試験受託番号

第104031433号

試験方法

OECDドラフトテストガイドライン218に従う試験手順書及びSediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment Sediment Revised Draft Guideline 218 (December 2002)に従って実施した。

なお、本試験1回目において操作対照区における羽化率が70 %を超えなかったため再試験(本試験2回目)を実施したが、底質表面に微生物の集落が形成され、試験生物が死亡したため、再試験2回目(本試験3回目)を実施した。

- 1) 被験物質：PCP
- 2) 暴露方式：止水式
- 3) 供試生物：セスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)
- 4) 暴露期間：28日間
- 5) 試験濃度(設定値)：操作対照区，2.5，4.5，8.0，14，25，45，80 mg/kg，公比；1.8
- 6) 試験容器：500 ml容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 7.8 cm×高さ 15 cm)
アクリル製のふた(ふたのサイズ；内径 6.5 cm×高さ 5 cm)
- 7) 試験液量：上層水量；約224 ml，間隙水量；約11 ml
- 8) 底 質：人工底質，底質の高さ；2.0 cm，液面の高さ；7.9 cm
- 9) 連 数：4容器/1試験区
- 10) 収容密度：2.4 cm²/個体
- 11) 供試生物数：80頭/試験区
- 12) 試験温度：24.2～24.9
- 13) 溶存酸素濃度：6.0～7.8 mg/l
- 14) エアレーション：極弱い通気(約8 ml/min)を行った。
- 15) 上層水のpH：7.4～8.6(試験液のpH調整は行わなかった。)
- 16) アンモニア濃度：<0.2～10 mg/l(NH₄⁺として)
- 17) 底質の安定平衡化期間：48時間
- 18) 照 明：白色蛍光灯(560 lx.)，16時間明期/8時間暗期

- 19) 餌 料：植物粉末*
* 市販のハウレンソウを105 で乾燥後，0.2 mm以下に粉碎した。
- 20) 給 餌 量：人工底質に対し乾燥重量で0.63 % (0.5 g/底質80 g)
- 21) 希 釈 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの
- 22) 分 析 法：高速液体クロマトグラフ - 質量分析法

結 果

以下の値は設定濃度を基に示した。

半数羽化阻害濃度 (EC₅₀)

41 mg/kg [Doudoroff法により算出した。]

参考値：46 mg/kg* [Probit法により算出した。]

* 本試験結果からは，95 %信頼区間が18～570,000 mg/kgと適切な95 %信頼区間を求めることができなかつたため，参考値とした。

1 被験物質

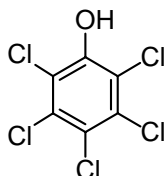
1.1 名称，構造式及び物理化学的性状

名称：PCP

別名：ペンタクロロフェノール¹⁾，ペンタクロロヒドロキシベンゼン¹⁾

CAS : 87-86-5

構造式：



分子式：C₆HCl₅O

分子量：266.3

沸点：309 ~ 310 ²⁾

融点：191 ²⁾

水溶解度：80 mg/l (30 ²⁾)，10 mg/l (20 ³⁾)

比重：d₄²² 1.978³⁾

pKa：4.71²⁾

logPow：5.1 (25 ²⁾)

土壌吸着係数(Koc)：1,000³⁾

蒸気圧：1.5 × 10⁻⁴ mmHg¹⁾，16 Pa²⁾

均一性：同一ロットのものを使用した。

安定性：安定²⁾，光により変質する⁴⁾

分解性：好氣的条件下で難分解性³⁾

その他：加水分解を受け易い化学結合あり³⁾

出典：1) 浦野 紘平：“PRTR・MSDS対象化学物質の毒性ランクと物性情報”，
第1版，267(2001) 化学工業日報社。

2) “The e-Pesticide Manual 2001-2002(Twelfth Edition)”，BRITISH
CROP PROTECTION COUNCIL.

3) 財団法人 化学物質評価研究機構：“化学物質安全性(ハザード)評価シ
ート”(2002)

4) 和光純薬工業株式会社：“製品安全データシート(MSDS No.JW160830)”

1.2 供試試料

純度：100.0 %

ロット番号：RWP9881

製造者：和光純薬工業株式会社

供給量：200 mg × 2本 (独立行政法人国立環境研究所より供与された。)

外観：白色 ~ ほとんど白色の結晶 ~ 結晶性粉末，特異臭

2 供試生物

- 1) 和名：セスジユスリカ
- 2) 学名：*Chironomus yoshimatsui*
- 3) 入手：1994年栃木県日光市湯元で採取された個体を独立行政法人国立環境研究所において継代飼育された成虫より採取した卵塊を入手した。
- 4) 入手方法：郵送
- 5) 試験使用の幼虫の齢：孵化後24時間以内の1齢幼虫
- 6) 孵化率：本試験1回目，再試験（本試験2回目）及び再試験2回目（本試験3回目）のいずれにおいても全て90%以上

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：止水式
- 2) 暴露期間：28日間
- 3) 試験液量：上層水量；約224 ml，間隙水量；約11 ml
- 4) 底質：人工底質，底質の高さ；2.0 cm，液面の高さ；7.9 cm
- 5) 連数：4容器/1試験区
- 6) 収容密度：2.4 cm²/個体
- 7) 供試生物数：80頭/試験区
- 8) 試験温度：24.2～24.9
- 9) 溶存酸素濃度：6.0～7.8 mg/l
- 10) エアレーション：極弱い通気(約8 ml/min)を行った。
- 11) 上層水のpH：7.4～8.6(試験液のpH調整は行わなかった。)
- 12) アンモニア濃度：<0.2～10 mg/l(NH₄⁺として)
- 13) 底質の安定平衡化期間：48時間
- 14) 照明：白色蛍光灯(560 lx.)，16時間明期/8時間暗期
- 15) 餌料：植物粉末^{*}
* 市販のハウレンソウを105℃で乾燥後，0.2 mm以下に粉碎した。
- 15) 給餌量：人工底質に対し乾燥重量で0.63%(0.5 g/底質80 g)

3.2 希釈水

脱塩素水[水道水(東京都多摩市)を活性炭処理し，残留塩素等を除去した後，充分通気したもの。]を使用した。脱塩素水使用時には，残留塩素が無いことを確認した。硬度は70 mg/l(CaCO₃換算)，pHは7.6であった。

希釈水の定期的な水質測定結果は付属資料-1に示した。

3.3 石英砂への被験物質の吸着

被験物質を超音波処理によりアセトン(試薬特級，純度 99.5 %以上[関東化学株式会社

社])に溶解させ、被験物質原液及び溶液(6,400~200 mg/l)を調製した。これらの被験物質原液及び溶液を、予めガラス製ビーカーに4連分まとめて秤量した石英砂(Fine granular washed and calcined GR for analysis[メルク社])50 gにマイクロシリンジを用いて繰り返し添加した。添加後は直ちにステンレス製薬さじで混合し、被験物質を石英砂に吸着させた。その後、ドラフト内で一晩風乾し、アセトンを蒸発させて除去した。

また、被験物質添加に使用した量と同量のアセトン5.0 mlを石英砂50 gに添加し、試験濃度区と同様の操作を行ったものを操作対照区の石英砂として使用した。

なお、被験物質は純度が100.0%と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液及び溶液は用時調製したものを使用した。

3.4 人工底質の調製

ピートモスsp.(独立行政法人国立環境研究所より供与)280 gを希釈水4.0 l中で2時間かくはんした後、炭酸カルシウム(試薬特級、純度99.5%以上[関東化学株式会社])を用いてpHを 5.5 ± 0.5 に調整し、48時間かくはんした。かくはん後、pHを 6.0 ± 0.5 に再調整した。その後、遠心分離(2000 r/min, 3 min)により得た沈殿を乾燥重量として4 g秤量し、カオリン(生化学用[和光純薬工業株式会社])16 gとよく混合した。さらに石英砂を総量で60g(3.3で調製した石英砂10 gを含む)及び植物粉末0.5 gを添加し、よく混合した後、底質表面を平らに慣らした。その後、予め 24 ± 1 に温度調節した希釈水を底質の高さに対して4倍量の高さまで添加し、微弱な通気を行いながら48時間安定化を行った。人工底質の水分含量は33.8%、総湿重量は120.6 g、乾燥重量は79.8 gであった。

なお、人工底質の組成は、付属資料-2に示した。

3.5 試験容器及び恒温室等

- 1) 試験容器：500 ml容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 7.8 cm×高さ 15 cm)を用いた。試験容器には羽化した成虫の脱出防止及び上層水の蒸発防止を目的としてアクリル製のふた(ふたのサイズ；内径 6.8 cm×高さ 5 cm)をした。
- 2) 恒温室：21.84R-5510[日立冷熱株式会社]
- 3) 水温計：AP-210[安立計器株式会社]
- 4) 溶存酸素計：D0-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 5) pH計：HM-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 6) 塩素比色計：OT-型[理研光学株式会社]
- 7) 実体顕微鏡：SZ-40[オリンパス株式会社]
- 8) アンモニウムテストキット：パックテスト アンモニウム(アンモニウム態窒素) KR-NH₄[共立化学研究所]

3.6 試験濃度の設定

独立行政法人国立環境研究所による予備試験において、40 mg/kgの濃度区では羽化が5～25 %阻害され、10 mg/kgの濃度区では羽化がほとんど阻害されなかったが羽化の遅延が認められたことに基づき、本試験では、80 mg/kg以下の濃度を公比1.8で7濃度区(2.5, 4.5, 8.0, 14, 25, 45及び80 mg/l)を設定した。

なお、本試験1回目において、操作対照区における羽化率が70 %を超えなかったため再試験(本試験2回目)を実施したが、底質表面に微生物の集落が形成され、試験生物が死亡したため、再試験2回目(本試験3回目)を実施した。

3.7 試験底質/水系中の被験物質濃度の分析

人工底質、間隙水及び上層水中の被験物質濃度の分析は、高速液体クロマトグラフ-質量分析計を用いて、暴露開始時及び暴露終了時(28日後)の最高試験濃度区及び最低試験濃度区について行った。暴露開始時及び終了時共に、分析用に別途調製した容器から人工底質約120 g(間隙水を含む)及び上層水約100 mlを採取して分析用試料とした。ただし、被験物質濃度の分析は本試験1回目のみ行った。

また、分析方法は付属資料-3に示した。

3.8 試験操作

上層水の水温等を測定後、パストールピペットを用いて供試生物を投入し、その時点暴露開始時とした。なお、暴露開始から1日後まで通気を停止し、2日後から通気を開始し、その後試験期間を通じて通気を行った。試験期間中蒸発により喪失した水分はイオン交換水を補給し、規定の水分量を保持した。

・ 供試生物の観察

[幼虫]底質からの脱出及び異常遊泳等が認められた場合は異常個体とし、記録を行った。
[成虫]羽化した成虫に関しては雌雄の識別を行い記録し、脱皮殻の除去を行った。

・ 水質測定

水温、溶存酸素濃度、pH及びアンモニア濃度は、全試験区各1試験容器の上層水について週3回測定した。また、暴露開始時及び終了時に硬度を測定した。

なお、暴露期間中の上層水についてはその状態(外観等)を記録した。

・ 巣管の観察

暴露期間中、毎日巣管形成の有無を観察した。

4 結果の算出

4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は設定値とした。

4.2 半数羽化阻害濃度(EC₅₀)の算出

本試験では、4.5～25 mg/kg濃度区において阻害率の逆転が認められたため、作図法(Doudoroff法)により、片対数紙の対数軸に試験濃度を、均等軸に羽化個体数を対照区の羽化個体数で補正した相対羽化率(%)をとり、測定された阻害率が50 %より上の点と下の点で最も50 %に近いものを選び、この両点を直線で結び50 %の線と交わる点の濃度をEC₅₀値とした。

なお、参考値として各濃度区における羽化個体数を対照区の羽化個体数で補正した相対羽化率(%)を算出し、Probit法により半数羽化阻害濃度(EC₅₀)を算出した。それらの95 %信頼区間も算出した。また、濃度 - 羽化阻害率のグラフを記載した。

4.3 平均生長時間

各試験区の平均生長時間は次の式により求めた。

$$X = \frac{f_i x_i}{n_e}$$

f_i : $i-1 \sim i$ 日に羽化した個体数

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

n_e : 1容器当たりの羽化個体数

5 結果及び考察

5.1 試験底質/水系中の被験物質濃度

参考値として本試験1回目の暴露開始時及び終了時(28日後)に最低試験濃度区及び最高試験濃度区の人工底質、間隙水及び上層水中の被験物質濃度を測定し、その結果をTable 1に示した。暴露開始時の間隙水については、採取量が少なく分析不能であった。

暴露開始時の人工底質中の測定濃度は、2.5 mg/kgで1.1 mg/kg、80 mg/kgで58 mg/kgであり、設定濃度に対する割合は44 %及び73 %であった。また、暴露終了時の測定濃度は、2.5 mg/kgで0.88 mg/kg、80 mg/kgで51 mg/kgであり、設定濃度に対する割合は35 %及び64 %であった。原因は不明であるが、全ての測定濃度は設定濃度よりも20 %以上低い値を示した。

なお、本試験では半数羽化阻害濃度及び平均生長速度は設定値を基に示した。

5.2 上層水及び幼虫の状態

暴露開始時の上層水は無色透明であった。暴露開始6日以降、操作対照区及び全ての濃度区で白濁が認められ、一部の容器では13日以降から徐々に濁りが消え、20日以降から再び暴露開始時と同様にやや褐色味を帯びた透明を呈したが、一部の容器では暴露終了時まで白濁したままの状態が認められ、高濃度区になるにつれ、白濁したままの容器の割合が増加した。

なお、暴露期間中に80 mg/kg区の一部(2容器)で幼虫の底質からの脱出が観察された。

5.3 半数羽化阻害濃度 (EC₅₀)

各試験区における羽化個体数，羽化率(%)及び対照区の羽化個体数で補正した後の相対羽化阻害率をTable 2に，半数羽化阻害濃度 (EC₅₀)をTable 3に示した。また，各試験区における試験生物の羽化個体数及び羽化失敗個体数をTable 4に，濃度 - 羽化阻害率のグラフをFigure 1に示した。

暴露終了時の各濃度区の相対羽化阻害率は2.5 mg/kgで14.5 %，4.5 mg/kgで34.2 %，8.0 mg/kgで27.6 %，14 mg/kgで50.0 %，25 mg/kgで27.6 %，45 mg/kgで53.9 %及び80 mg/kgで100 %であった。

以上のことから，以下の結果を得た。

41 mg/kg [Doudoroff法により算出した。]

参考値：46 mg/kg* [Probit法により算出した。]

* 本試験結果からは，95 %信頼区間が18～570,000 mg/kgと適切な95 %信頼区間を求めることができなかつたため，参考値とした。

5.4 平均生長時間

各濃度区における平均生長時間をTable 5に示した。

各濃度区の平均生長時間は対照区で0.058，2.5 mg/kgで0.061，4.5 mg/kgで0.065，8.0 mg/kgで0.066，14 mg/kgで0.059，25 mg/kgで0.062及び45 mg/kgで0.059であった。なお，80 mg/kg区においては羽化が認められなかつたため算出できなかった。

5.5 上層水の水温，溶存酸素濃度，pH，硬度及びアンモニア濃度

上層水の水温をTable 6，溶存酸素濃度をTable 7，pHをTable 8，硬度をTable 9，アンモニア濃度をTable 10に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は24.2～24.9，溶存酸素濃度は6.0～7.8 mg/l，pHは7.4～8.6，硬度は70～165 mg/l (CaCO₃換算)及びアンモニア濃度は< 0.2～10 mg/lであり，水温は24±1，溶存酸素濃度は飽和溶存酸素値の60 %以上，pHは6.0～9.0，硬度は250 mg/l以下の範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.6 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の羽化率が95 % (70 %以上)であり，対照区における全ての羽化が暴露開始から13～23日後に観察されたため，本試験の成立が確認された。

5.7 テストガイドラインに関する疑問点，改善・改変すべき点など ・ 餌料の添加方法に関して

植物粉末はそれ自体が餌料となるのに加え、底質及び上層水中の微生物の繁殖に必要な有機物源となり、幼生への継続的な餌料の供給が期待できる。しかし、被験物質が微生物の繁殖を阻害する物質であった場合、低濃度区と高濃度区で微生物の存在量が異なり、幼生への給餌量に差を生じる可能性が考えられる。また、本試験2回目において底質表面全体に微生物の集落が形成され、物理的な阻害により試験生物が死亡していることが観察された。さらに、微生物の急激な繁殖は上層水中の溶存酸素濃度の低下、アンモニア・亜硝酸濃度の上昇を引き起こし、程度によっては試験生物の成長に影響を与えることも考えられる。

これらのことから植物粉末による給餌は、被験物質の特性、人工底質への添加量ならびにインキュベーション期間を十分に考慮する必要がある、この点についてさらに検討が必要と考えられた。

・同一濃度区における容器間の羽化数のバラツキについて

今回の試験において14 mg/kg区において羽化率に3倍以上の開きが認められた。この羽化率は前後の濃度区の羽化率から異常値であると考えられたが、水質等の測定結果からはその明確な要因を解明することが出来なかった。また、その他の試験区においても2倍近い羽化率の開きが認められる事から、今後、NOECの算出を行う上で問題があると考えられた。

この羽化数のバラツキの原因が生物としての特性にあるのか、その他の要因にあるのかを解明する必要があるものと考えられた。

・羽化個体の雌雄比について

今回の試験において羽化した全個体の雌雄比はほぼ1:1の割合となったが、試験容器間、濃度区間においてはバラツキが認められた。試験容器間では最大5~6倍程度の開きが認められた。濃度区間におけるバラツキは濃度依存的なものではなく、ランダムなものであったことから、試験容器間のバラツキに起因するものであると推測された。

雌雄で感受性差がないことを確認した上で全体の羽化個体数から結果を算出するのに対し、このバラツキが問題になる場合が起こりうるものが危惧された。

・被験物質濃度の分析及び実測濃度の算出について

暴露開始時の被験物質濃度を測定する際に、分析に必要な量の間隙水を得ることができなかった。間隙水と底質を分離する際に底質の一部が間隙水に混入する場合もあり、間隙水中の被験物質濃度を測定する際の手技、手法について十分な検討が必要だと考えられた。

底質中の被験物質濃度の分析において、暴露開始時から測定濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ を外れた値を示した。この要因として、石英砂への被験物質の吸着操作時のロス、安定化期間中の被験物質の水系への移行、揮発及び加水分解等が考えられた。また、本分析方法は、本試験での分析に関する操作上の問題点などを調べることを主な目的として開

発した簡便な方法であったことから、測定誤差が大きく、十分な結果が得られていない可能性も考えられた。

分析結果から被験物質の水系への移行は明らかであった。

実測濃度を用いて結果を算出する場合、水系の被験物質を試験生物への暴露量として含めるべきか否かの判断が困難であった。

実際に試験を行う際の実測濃度の算出方法について検討が必要であると考えられた。

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Water-Sediment Systems

Nominal Concentration (mg/kg)	Measured Concentration			
	Sediment (mg/kg)	Pore Water (mg/l)	Overlying Water (mg/l)	
2.5	0 day	1.1	-	0.023
	28 days	0.88	0.024	0.020
	Mean* Measured Conc. (Percent of Nominal)	0.99 (40)	-	-
80	0 day	58	-	1.9
	28 days	51	5.8	1.9
	Mean* Measured Conc. (Percent of Nominal)	54 (68)	-	-

* : Areal Mean

Table 2. The Total Number of Fully Emerged Male and Female midges

Nominal Concentration (mg/kg)	The Number of Individuals Emerged (Emergence rate[%])			Mortality Corrected by Control (%)
	Male	Female	Total	
Control	38	38	76(95)	-
2.5	29	36	65(81)	14.5
4.5	30	20	50(63)	34.2
8.0	30	25	55(69)	27.6
14	17	21	38(48)	50.0
25	31	24	55(69)	27.6
45	14	21	35(44)	53.9
80	0	0	0(0)	100

Table 3. Calculated EC₅₀ Values

Exposure Period	EC ₅₀ (mg/kg)	95-Percent Confidence Limits(mg/kg)	Statistical Method
28 day	41	-	Doudoroff
	(46)	(18 ~ 570,000)	(Probit)

Table 4-1 . Number of Emerged Male and Female Midges per Vessel and per Day

Nominal Concentration (mg/kg)	Vessel No.	Days																Emerged	Percent Emergence	
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			28
Control	-1	M	0	0	2	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	95
		F	0	0	0	0	1	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	10	
	-2	M	0	3	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	95
		F	0	0	0	1	0	2	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	8	
	-3	M	0	3	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	100
		F	0	0	1	1	2	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	11	
	-4	M	0	0	1	0	1	3	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	9	90
		F	0	0	0	0	1	0	0	5	1	1	0	1	0	0	0	0	9	
2.5	-1	M	0	2	4	1	1	0	0	0	0 ⁽¹⁾	0	1	1	0	0	0	0	10	100
		F	0	0	0	0	1	3	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	10	
	-2	M	0	2	2	2 ⁽¹⁾	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	75
		F	0	0	0	0	2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8	
	-3	M	0	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	80
		F	0	0	1	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	
	-4	M	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	70
		F	0	0	1	4	2	1 ⁽¹⁾	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
4.5	-1	M	0	2	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	85
		F	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
	-2	M	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6	60
		F	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	-3	M	2	5 ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	65
		F	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	-4	M	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	40
		F	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
8.0	-1	M	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50
		F	0	0	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
	-2	M	0	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	80
		F	0	0	1	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	
	-3	M	1	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	65
		F	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
	-4	M	0	5	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	80
		F	0	0	0	1	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	

M : Male , F : Female

() : Number of Pupae which Failed to Emerge per Vessel and per Day.

Table 4-2. Number of Emerged Male and Female Midges per Vessel and per Day

Nominal Concentration (mg/kg)	Vessel No.	Days																Emerged	Percent Emergence	
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			28
14	-1	M	0	1 ⁽¹⁾	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	60
		F	0	0	0	1	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
	-2	M	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20
		F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	-3	M	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	35
		F	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	
	-4	M	0	1	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	75
		F	0	0	0	0	0	1	1	2	4	1	0	0	0	0	0	0	9	
25	-1	M	0	0	1	4	2	0 ⁽¹⁾	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	70
		F	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	0	6	
	-2	M	0	0	7	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	70
		F	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	-3	M	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	70
		F	0	0	1	0	1	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
	-4	M	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	65
		F	0	0	0	1	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
45	-1	M	0	1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	60
		F	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
	-2	M	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	40
		F	0	0	0	0	1	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	-3	M	0	0 ⁽¹⁾	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	35
		F	0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
	-4	M	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	40
		F	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	
80	-1	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-3	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-4	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

M : Male , F : Female

() : Number of Pupae which Failed to Emerge per Vessel and per Day.

Table 5. Mean Development Rate of Fully Emerged Midges per Replicate

Nominal Concentration (mg/kg)	Vessel No.	Development Rate(unit : 1/day)		
		Male	Female	Total
Control	-1	0.062	0.051	0.056
	-2	0.068	0.053	0.062
	-3	0.069	0.057	0.063
	-4	0.056	0.051	0.053
	average	0.064	0.053	0.058
2.5	-1	0.064	0.054	0.059
	-2	0.068	0.056	0.062
	-3	0.066	0.061	0.064
	-4	0.063	0.061	0.061
	average	0.065	0.058	0.061
4.5	-1	0.069	0.059	0.067
	-2	0.061	0.057	0.059
	-3	0.076	0.061	0.069
	-4	0.071	0.060	0.064
	average	0.069	0.059	0.065
8.0	-1	0.068	0.065	0.066
	-2	0.070	0.059	0.065
	-3	0.072	0.061	0.069
	-4	0.071	0.057	0.064
	average	0.070	0.060	0.066
14	-1	0.069	0.058	0.062
	-2	0.061	0.054	0.059
	-3	0.062	0.054	0.058
	-4	0.063	0.051	0.055
	average	0.064	0.054	0.059
25	-1	0.062	0.046	0.055
	-2	0.067	0.059	0.066
	-3	0.070	0.058	0.062
	-4	0.073	0.058	0.065
	average	0.068	0.055	0.062
45	-1	0.067	0.058	0.063
	-2	0.061	0.056	0.057
	-3	0.069	0.057	0.059
	-4	0.062	0.055	0.059
	average	0.065	0.056	0.059
80	-1	-	-	-
	-2	-	-	-
	-3	-	-	-
	-4	-	-	-
	average	-	-	-

- : Not Calculated Because the Emergence to Adults were not observed.

Table 6 . Temperature

Nominal Concentration (mg/kg)	Temperature ()												
	Days												
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Control	24.5	24.6	24.6	24.6	24.4	24.6	24.7	24.8	24.8	24.6	24.7	24.7	24.7
2.5	24.6	24.5	24.5	24.5	24.4	24.4	24.5	24.4	24.4	24.3	24.6	24.5	24.5
4.5	24.2	24.7	24.8	24.6	24.6	24.8	24.7	24.7	24.7	24.7	24.8	24.7	24.8
8.0	24.4	24.5	24.5	24.5	24.4	24.4	24.5	24.4	24.5	24.4	24.5	24.5	24.5
14	24.4	24.7	24.8	24.8	24.6	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.6	24.7
25	24.5	24.4	24.5	24.5	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4	24.5	24.5	24.4	24.6
45	24.4	24.8	24.9	24.9	24.7	24.8	24.8	24.8	24.9	24.8	24.9	24.8	24.8
80	24.5	24.5	24.6	24.5	24.3	24.6	24.5	24.3	24.5	24.5	24.6	24.6	24.7

Table 7 . Dissolved Oxygen Concentration

Nominal Concentration (mg/kg)	Dissolved Oxygen Concentration(mg/l)												
	Days												
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Control	6.1	7.5	6.4	7.3	7.6	6.9	7.4	7.3	7.3	7.2	7.3	7.3	7.5
2.5	6.0	7.2	6.5	7.1	7.5	7.3	7.3	7.2	7.0	7.6	7.4	7.4	7.5
4.5	6.0	6.7	6.7	7.5	7.4	6.9	6.5	7.3	7.1	7.3	7.4	7.3	7.4
8.0	6.1	6.9	6.0	7.4	7.6	7.0	6.8	7.2	7.1	7.3	7.2	7.4	7.5
14	6.1	6.4	6.6	7.3	7.7	7.2	7.4	7.1	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4
25	6.2	6.4	6.4	7.8	7.7	7.4	7.0	7.2	7.3	7.4	7.4	7.3	7.5
45	6.2	6.9	6.6	7.6	7.6	7.1	7.1	7.4	7.2	7.4	7.1	7.3	7.6
80	6.3	6.8	6.9	7.5	7.7	7.6	7.4	7.5	7.2	7.1	7.2	7.4	7.4

Table 8 . pH Values

Nominal Concentration (mg/kg)	pH												
	Days												
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Control	7.6	7.7	7.9	8.1	8.3	8.2	8.2	8.3	8.4	8.4	8.4	8.3	8.6
2.5	7.6	7.8	8.0	8.2	8.3	8.3	8.2	8.4	8.5	8.5	8.5	8.4	8.6
4.5	7.4	7.8	7.9	8.3	8.1	8.2	8.0	8.4	8.4	8.4	8.6	8.3	8.6
8.0	7.4	7.8	7.8	8.3	8.3	8.0	8.0	8.2	8.5	8.4	8.4	8.4	8.5
14	7.4	7.7	8.1	8.2	8.4	8.4	8.1	8.3	8.3	8.5	8.5	8.4	8.5
25	7.4	7.9	8.0	8.4	8.4	8.3	8.2	8.3	8.3	8.5	8.4	8.2	8.5
45	7.4	7.8	8.2	8.3	8.3	8.0	8.2	8.4	8.5	8.5	8.4	8.3	8.5
80	7.6	8.0	8.0	8.3	8.5	8.3	8.2	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.4

Table 9 . Total Hardness(as CaCO₃)

Nominal Concentration (mg/kg)	Total Hardness(as CaCO ₃ ,mg/l)	
	Days	
	0	28
Control	70	165

Table 10 . Ammonia

Nominal Concentration (mg/kg)	Ammonia (as NH ₄ ⁺ ,mg/l)												
	Days												
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Control	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	4.0	1.6	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2.5	2.0	2.0	0.5	0.5	8.0	8.0	0.2	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
4.5	1.0	1.0	1.0	4.0	8.0	8.0	0.8	0.2	<0.2	10	<0.2	<0.2	<0.2
8.0	2.0	2.0	1.6	8.0	8.0	8.0	1.6	0.2	10	0.4	<0.2	<0.2	<0.2
14	2.0	2.0	5.0	1.6	8.0	8.0	0.2	0.2	0.4	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
25	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	8.0	0.2	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
45	2.0	2.0	2.0	1.6	8.0	4.0	0.2	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
80	2.0	2.0	1.0	1.6	4.0	0.2	0.2	0.2	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2

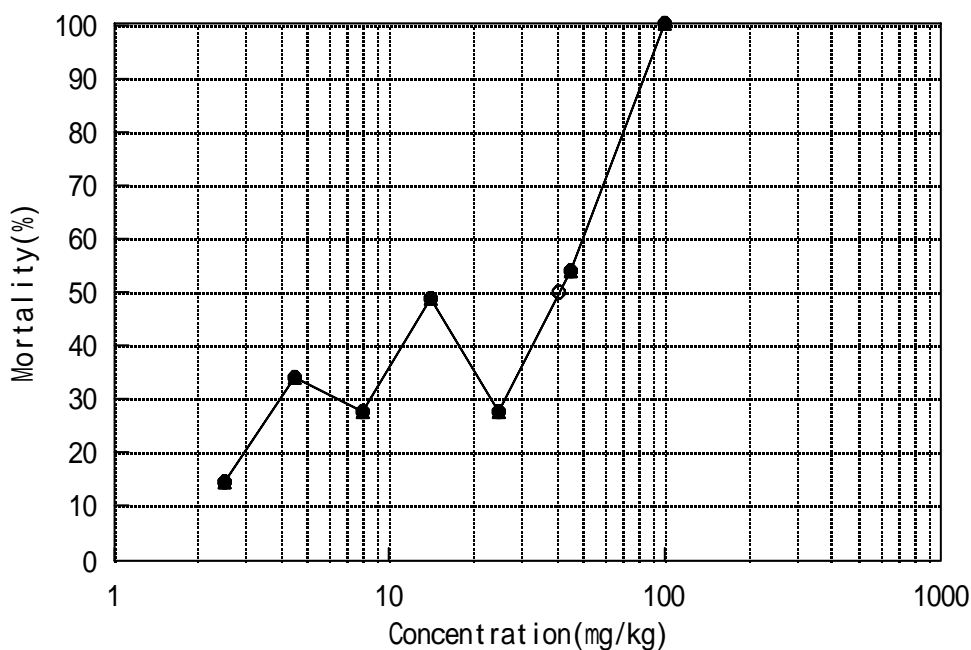


Figure 1. Concentration-Response Curve