

環境省殿

試 験 報 告 書

サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号:NMMP/E00/3010)

平成13年12月1日作成

株式会社 東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境省

表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/3010

上記試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

平成 13 年 12 月 07 日

運営管理者

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境省

表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/3010

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	平成 13 年 6 月 7 日	平成 13 年 6 月 7 日
試験報告書監査	平成 13 年 11 月 15 日	平成 13 年 11 月 15 日

平成 13 年 12 月 7 日

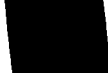









信頼性保証業務担当者

試験実施概要

1. 表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的 : サリチル酸について、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を 21 日間行い、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)に準拠して実施した。
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一丁目2-2
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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者
名称 : 株式会社 東レリサーチセンター
所在地 : (〒103-0022) 東京都中央区日本橋室町3-1-8 都ビル内
7. 試験施設
名称 : 株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地 : (〒455-8502) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者:

試験責任者			(平成 13 年 12 月 7 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)

9. 試験期間: 試験開始日 平成 12 年 12 月 12 日

 暴露期間 平成 13 年 6 月 7 日 ～ 平成 13 年 6 月 28 日

 試験終了日 平成 13 年 12 月 7 日

10. 保管:

~~試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社~~
~~東リリサーチセンター名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者~~
~~と協議のうえ決定する。~~ 訂正

Ⅱ. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
P.5 (下から4行)	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設あるいは当社研究部の査察・監査のもとに外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズに保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。	2002 年 7 月	今後、当研究部試資料保管施設の保管容量が不足するため、外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズを利用する。

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、保管方法および保管条件下での安定性	9
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
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	11
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	13
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出	13
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	13
5 結果および考察	14
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	14
5.2 試験液中の被験物質濃度	14
5.3 ミジンコの観察結果	14
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	15
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)	15
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	15
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および全硬度	15
Table 1-1～11	16～29
Figure 1,2	20,23
付属資料－1 希釈水 (M4 調製水)	30
付属資料－2 試験液の分析方法	32
付属資料－3 ミジンコの観察結果	40

要 旨

試験委託者

環境省

表 題サリチル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

NMMP/E00/3010

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 : サリチル酸
- 2) 暴露方法 : 半止水式(週3回、試験液の全量を交換)
- 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 : 対照区、3.70mg/L、6.67mg/L、12.0mg/L、21.6mg/L、38.9mg/L および
70.0mg/L(公比1.8、設定濃度)
- 6) 試験液量 : 1容器(連)につき 80 mL
- 7) 連数 : 10 容器(連)／濃度区
- 8) 供試生物数 : 10 頭／濃度区(1連につき1頭)
- 9) 試験水温 : 20±1℃
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明／8 時間暗
- 11) 被験物質の分析 : HPLC法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

実測濃度が設定濃度の±20%を外れたので結果の算出には実測濃度の時間加重平均値を用いた。

2) 21 日間の親ミジンコの半数 致死濃度 (LC50)

= 62.6mg/L (95%信頼区間 : 23.5mg/L～>64.6mg/L)

3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (ErC50)

= 62.9mg/L (95%信頼区間 : 60.5mg/L～65.5mg/L)

4) 21 日間の最大無作用濃度 (NOECr) = 33.7mg/L

5) 21 日間の最小作用濃度 (LOECr) = 64.6mg/L

(上記濃度は、実測濃度の時間加重平均値に基づく値である)

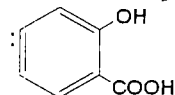
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : サリチル酸

別名 : 2-ヒドロキシ安息香酸、CAS:69-72-7

構造式



分子式 : $C_7H_6O_3$

分子量 : 138.12

融点 : 158°C

沸点 : $211^{\circ}\text{C}/20\text{mmHg}$

水への溶解度 : $2240\text{mg/L}(25^{\circ}\text{C})$

オクタノール／水 分配係数(logP): 2.26

pKa : 2.97

蒸気圧 : $8.2\text{E-}5\text{ mmHg}(25^{\circ}\text{C})$

[上記の数値は、次のデータベースから引用した]

TOXNET : National Library of Medicine (Toxicology Data Network)

ICSC : International Chemical Safety Cards

SRC : SRC PhysProp Database (Syracuse Research Corporation)

1.2 供試試料

純度 : 99.8%

ロット番号 : GI01

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量 : $25\text{g} \times 4\text{本}$

入手日 : 平成12年10月16日

外観 : 白色針状結晶

1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は試料冷蔵保管庫で光を遮断して保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定および分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定・分析したスペクトルおよびクロマトグラムと比較した結果、変化はなかった。従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験には生後24時間以内のオオミジンコ(*Daphnia magna*)の幼体を用いた。

本種は、平成 7年11月15日国立環境研究所より入手したものを、当研究部において継代飼育しているものである。また、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(EiC50)は 0.90 mg/Lであった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別して、別に用意したビーカーに移し、翌日に産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体(平成13年5月15日生まれ)を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら、1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。3週目に入り暴露開始前日に、その前日間の死亡率が0.0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)産出された幼体を試験に用いた(平成13年6月7日暴露開始)。

飼育水 : 希釈水 (3.2参照)

飼育密度 : 20～50 頭/L 飼育水 (但し、成熟個体の場合は、25頭以下/Lとした)

水温 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

照明 : 室内光、16時間明/8時間暗

餌 : *Chlorella vulgaris*

(藻類培養液を遠心操作により、人工軟水*に置換して給餌した)

* 蒸留水 1L 当たり、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26.1mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.7mg、 K_2SO_4 1.1 mg、 NaHCO_3 25.0mg を溶解して調製する。

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) 暴露方法 : 暴露は半止水式で行い、1週間に3回、試験液を全量交換した。

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) 試験水温 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗

- 8) 餌 : *Chlorella vulgaris* (飼育順化と同じ)
 9) 給餌量 : ミジンコ1頭当たり 0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日

3.2 希釈水

OECD改訂ガイドライン No.211オオミジンコ繁殖阻害試験－1998年9月採択に記載してある調整水を用いた。希釈水の全硬度は254mg/L(CaCO₃換算)、pHは7.4であった。

[付属資料-1 (p.30)]

3.3 試験容器および恒温槽等

- 試験容器 : 100mL 容、ガラス容器
 恒温槽 : 恒温水槽および水循環装置(ヤマト科学 クールライン CL100)
 水温計 : pH計内蔵温度計(堀場製作所 カスタニー LAB pH メーター F-22)
 pH計 : 堀場製作所 カスタニー LAB pH メーター F-22
 溶存酸素計 : 堀場製作所 DO メーター OM-14
 電気伝導率計 : 全硬度測定(東亜電波 ポータブル電気伝導率計 CM-14P)

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(48hr-EiC50 値= 76.8mg/L)付近から、濃度公比 1.8で6段階設定した。各濃度は以下のとおりである。

対照区、3.70mg/L、6.67mg/L、12.0mg/L、21.6mg/L、38.9mg/L および70.0mg/L

3.5 試験液の調製

- 1) 試験開始前に調製した被験物質 3000mg/L原液を換水毎に希釈水に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 2) 希釈水のための対照区を設けた。
- 3) 1濃度区につき10個の試験容器を用意し、各試験容器に試験液を80mLずつ入れた。
- 4) 試験液の状態(外観等)を記録した。無色透明で沈殿等は見られなかった。

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(調製時および換水前で1回)、即ち試験開始時(0日目)、6日目、11日目および18日目の試験液調製時とそれぞれの2日後(換水前)に各ビーカーより試験液 1.5mL を採取し、HPLC分析により被験物質濃度を分析した。試験液の分析に際しては、測定日毎に標準溶液(濃度 2.0mg/L)の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

詳細は付属資料-2(p.32)に示した。

3.7 試験操作

試験液の水溫、溶存酸素濃度(D.O.)、pHおよび全硬度を測定後、先端を太くしたピペッター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、ピペッター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、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 : 水溫、溶存酸素濃度(D.O.)、pHおよび全硬度を、全濃度区(但し、各1試験容器)について、暴露期間中に3回(調製時および換水前で1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)から、Probit法により、21日間暴露の半数致死濃度(LC50)およびその95%信頼限界を算出した。

4.2 50%繁殖阻害濃度(ErC50)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)を用いて、Logit法により、21日間暴露の50%繁殖阻害濃度(ErC50)およびその95%信頼区間を算出した。但し、供試個体数に対照区の平均累積産仔数を、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。

4.3 最大無作用濃度(NOECr)および最小作用濃度(LOECr)

各試験容器毎の21日間の生存親1頭当たりの累積産仔数(生存幼体)を算出した。対照区と各濃度区について、Bartlettの等分散検定、一元配置分散分析およびDunnettの多重比較検定を行った。

対照区と有意差の認められない最高濃度(最大無作用濃度: NOECr)および有意差の認められる最低濃度(最小作用濃度: LOECr)を決定した。

統計計算には吉岡義正 大分大学教育学部教授により生態影響試験のEC50, LC50, NOECを計算するために開発されたプログラム[EcoTox-Statics(Version 1.1)]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

暴露期間中に試験液濃度を8回測定した内、設定濃度 3.70mg/L の最低濃度区で3回(いずれも old)が定量限界(0.004mg/L)以下であった。この濃度区は試験結果の計算に用いなかった。同様に、設定濃度 6.67mg/L の濃度区で2回、設定濃度 12.0mg/L の濃度区で1回(いずれも old)が定量限界(0.004mg/L)以下であったが、これらは測定された4回もしくは6回の測定値を時間加重平均して、試験結果の計算に用いた。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時(0日目)、6日目、11日目および18日目の試験液調製時の被験物質濃度は 3.53～72.0 mg/L(設定濃度3.70～70.0mg/L)であり、設定濃度に対する割合は95.4～107.5%であった。また、それらの2日後、換水前の濃度は0.08～68.6mg/L であり、設定濃度に対する割合は1.1～98.0%であった。

[Table 1-1(p.16,17),Table 1-2(p.18),付属資料-2(p.32)]

実測濃度が設定濃度の±20%を外れたので結果の算出には実測濃度の時間加重平均値を用いた。

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

対照区での親ミジンコの死亡率は、暴露終了時で0%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

濃度区における暴露終了時の親ミジンコの死亡は、最低濃度区(<2.11mg/L)で1頭、死亡率は10%であった。最高濃度区(64.6 mg/L)では5頭が死亡し、死亡率は50%であった。

[Table 2-1,2-2(p.19),Figure 1(p.20)]

初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始7～10日後であった。最低濃度区(<2.11mg/L)では、親ミジンコの初産日は暴露開始7～11日であり、最高濃度区(64.6mg/L)では、10日～11日であった。

[Table 3(p.21)]

平均累積産仔数

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191.1頭であり、試験成立条件である60頭以上の基準を満たした。

濃度区の 21 日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は最低濃度区(<2.11mg/L)では、185.4頭、最高濃度区(64.6mg/L)では、86.4頭であった。

[Table 4(p.22),Figure 2(p.23),付属資料-3(p.40)]

休眠卵の発生等

対照区、濃度区において、休眠卵等は全く生じなかった。

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)は62.6mg/L であり、その 95%信頼区間は 23.5～64.6mg/L であった。

[Table 5 (p.24)]

5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

21 日間暴露の 50% 繁殖阻害濃度 (ErC50)は62.9mg/L であり、その 95%信頼区間は60.5～65.5mg/L であった。

[Table 6 (p.24)]

5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr)および最小作用濃度 (LOECr)

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす 21 日間の最大無作用濃度 (NOECr)は33.7mg/L であり、最小作用濃度 (LOECr)は 64.6mg/L であった。

5.99mg/L の濃度区における平均累積産仔数が対照区と比較して有意な差が認められたが対照区よりも産仔数が多いためであり、阻害ではなかった。

[Table 7 (p.25)]

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pHおよび全硬度

21 日間の暴露期間中の水温は19.8～20.6℃であり、設定範囲(20℃±1℃)内であった。

溶存酸素濃度は6.1～9.0mg/L であり、全ての濃度区で飽和溶存酸素濃度の 60%以上が維持された(20.0℃の飽和溶存酸素濃度:8.84mg/L)。

pHは6.9～7.6であり、変動は 1.5 以内であった。

全硬度は247～257mg/L(CaCO₃ 換算)であり、設定範囲(140mg 以上/L(CaCO₃ 換算))内であった。

[Table 8(p.26),Table 9(p.27),Table 10(p.28),Table 11(p.29)]

以上のことから、水温、溶存酸素濃度、pHおよび全硬度についてはミジンコの生育条件として適切な範囲であったと思われる。

以 上

Table 1-1 Measured Concentrations of Salicylic acid during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	0 day new	2 day old
Control	<0.004	<0.004	—	—
3.70	3.56	1.12	96.2	30.3
6.67	6.51	3.72	97.6	55.8
12.0	11.9	9.54	99.2	79.5
21.6	21.4	19.8	99.1	91.7
38.9	38.5	37.0	99.0	95.1
70.0	69.1	68.6	98.7	98.0

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	6 day new	8 day old	6 day new	8 day old
Control	<0.004	<0.004	—	—
3.70	3.53	<0.004	95.4	—
6.67	6.54	<0.004	98.1	—
12.0	11.6	1.16	96.7	9.7
21.6	21.1	10.0	97.7	46.3
38.9	38.4	27.8	98.7	71.5
70.0	67.5	56.4	96.4	80.6

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

Table 1-1 Continued

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	11 day new	13 day old	11 day new	13 day old
Control	<0.004	<0.004	—	—
3.70	3.8	<0.004	102.7	—
6.67	6.9	0.08	103.4	1.2
12.0	12.9	0.13	107.5	1.1
21.6	22.3	11.0	103.2	50.9
38.9	40.7	25.2	104.6	64.8
70.0	72.0	59.8	102.9	85.4

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	18 day new	20 day old	18 day new	20 day old
Control	<0.004	<0.004	—	—
3.70	3.66	<0.004	98.9	—
6.67	6.85	<0.004	102.7	—
12.0	11.8	<0.004	98.3	—
21.6	21.6	9.18	100.0	42.5
38.9	39.3	25.9	101.0	66.6
70.0	70.1	54.5	100.1	77.9

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

Table 1-2 Time-weighted Means of Measured Concentrations of Salicylic acid during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Time-weighted Mean (mg/L)	Percent of Nominal (%)
Control	—	—
3.70	<2.11	—
6.67	3.25	48.7
12.0	5.99	49.9
21.6	16.5	76.4
38.9	33.7	86.6
70.0	64.6	92.2

$$\text{Time-weighted Mean} = \frac{\text{Total Area}}{\text{Total Days}}$$

$$\text{Area} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{Days}$$

Conc0 is the measured concentration at the start of each renewal period.

Conc1 is the measured concentration at the end of each renewal period.

Days is the number of days in the renewal period.

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

Measured Concentration (mg/L)	Days																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<2.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
3.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
16.5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3
33.7	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	4	4	4	4
64.6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	4	5	5	5

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

Measured Concentration (mg/L)	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
<2.11	0	0	0	0	0	10
3.25	0	0	0	0	0	10
5.99	0	0	0	0	10	20
16.5	0	0	10	10	10	30
33.7	0	0	0	10	20	40
64.6	0	0	0	10	20	50

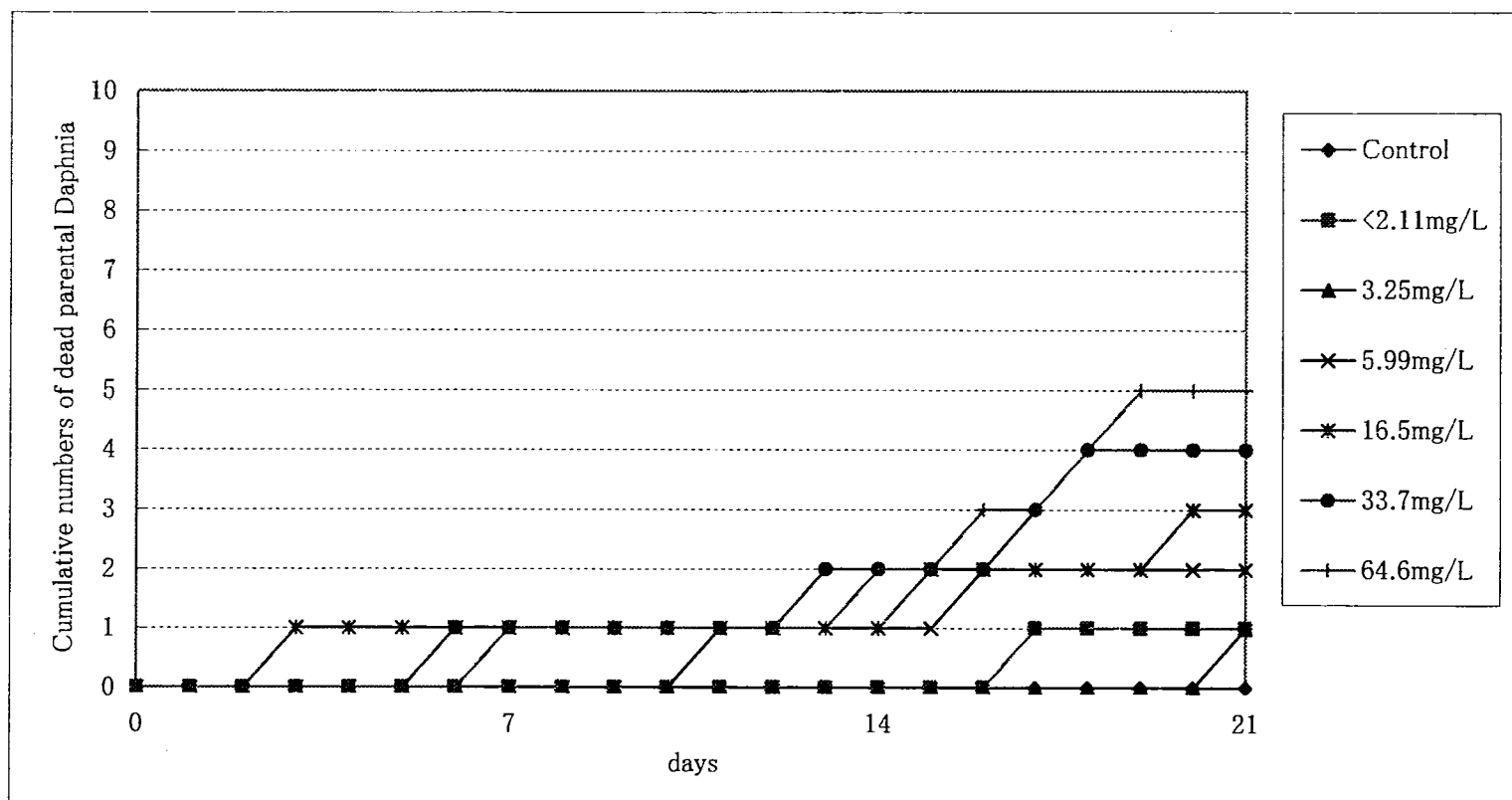
Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Control	Measured Concentration (mg/L)					
		<2.11	3.25	5.99	16.5	33.7	64.6
1	10	7	8	8	–	8	10
2	10	8	8	8	8	–	10
3	7	11	7	10	8	8	11
4	8	8	8	9	9	–	–
5	9	8	8	8	10	9	–
6	10	8	10	8	–	9	10
7	8	10	8	8	8	9	–
8	8	–	10	8	8	8	10
9	8	8	8	–	8	–	–
10	8	8	–	–	–	–	–
Mean	8.6	8.4	8.3	8.4	8.4	8.5	10.2

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ($\Sigma F1/P$)

Measured Concentration (mg/L)	Days																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	6.2	9.1	40.2	40.2	45.4	81.4	93.0	98.2	128.4	143.5	148.9	175.5	191.0	191.1
<2.11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	8.7	8.7	38.1	46.9	46.9	77.4	88.4	88.4	113.4	138.1	138.1	149.9	181.1	185.4
3.25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	8.0	8.0	48.2	48.2	48.2	99.8	101.2	101.2	150.2	156.9	156.9	201.2	206.4	206.4
5.99	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	10.4	44.3	44.3	53.9	97.0	97.0	105.5	153.0	153.1	159.1	204.1	204.1	210.9
16.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	8.7	38.0	38.0	44.0	84.7	84.7	91.9	142.6	142.6	151.0	195.4	195.4	203.9
33.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	12.8	33.3	33.3	60.8	87.3	87.3	112.8	129.3	137.0	162.8	178.3	187.3	206.7
64.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.8	20.6	20.6	58.2	61.8	61.8	61.8	73.8	73.8	79.6	86.4	86.4

Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ($\Sigma F1/P$) during 21 days

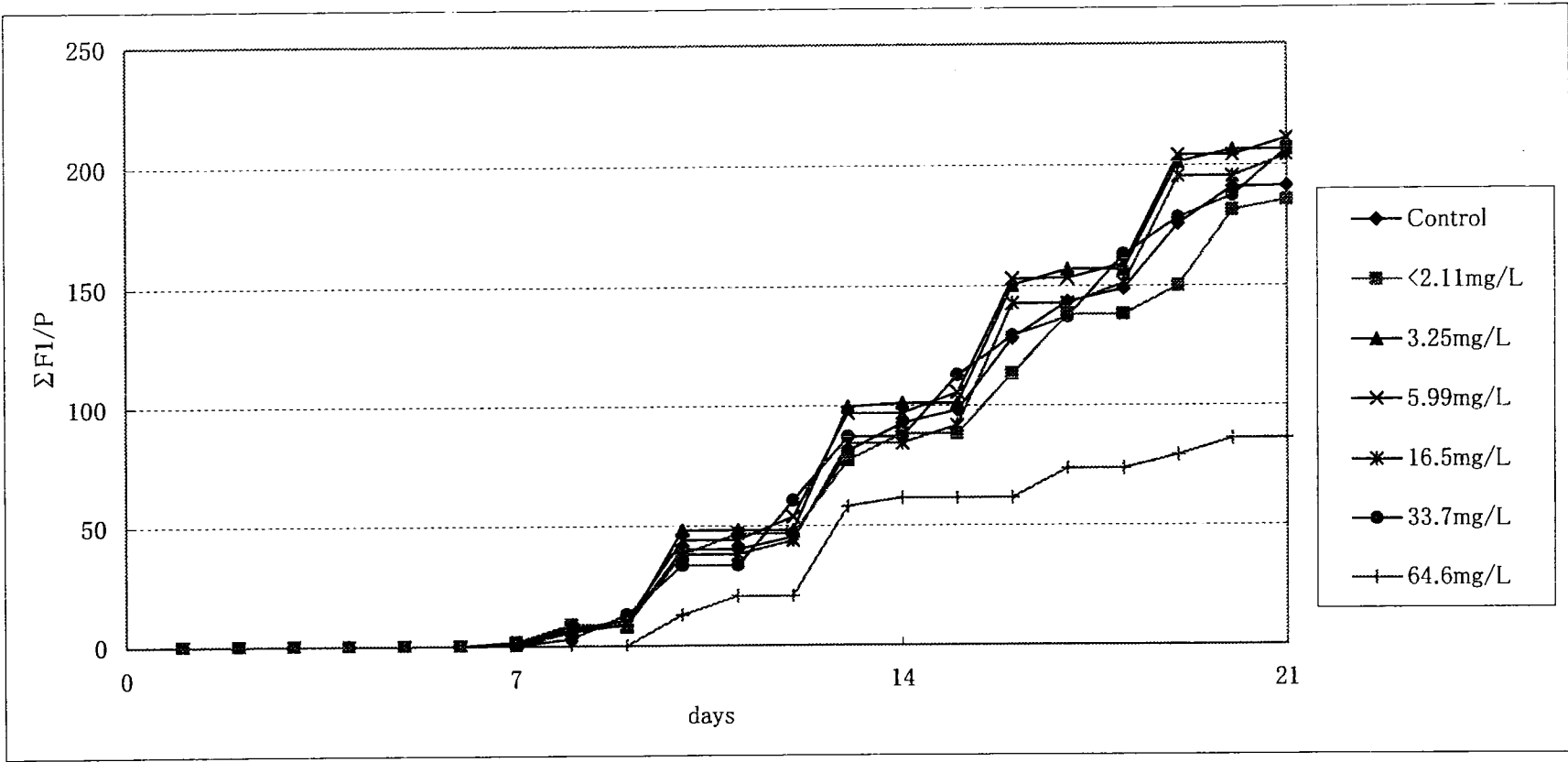


Table 5 Calculated LC50 Value for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	62.6	23.5 ~ >64.6	Probit

Table 6 Calculated ErC50 Value for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	62.9	60.5 ~ 65.5	Logit

Table 7 Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days

Vessel No.	Control	Measured Concentration (mg/L)					
		<2.11	3.25	5.99	16.5	33.7	64.6
1	149	227	217	224	—	209	92
2	171	206	216	202	189	—	60
3	206	193	214	195	218	207	78
4	200	201	220	232	315	—	—
5	188	195	218	217	64	233	—
6	195	217	186	201	—	213	107
7	190	77	220	206	207	202	—
8	203	—	169	210	217	176	95
9	211	144	198	—	217	—	—
10	198	209	—	—	—	—	—
Mean	191.1	185.4	206.4	210.9	203.9	206.7	86.4
S.D.	18.53	46.86	18.21	12.59	73.81	18.45	18.01
Inhibition rate(%)		3.0	-8.0	-10.3	-6.7	-8.1	54.8
Significant difference*1				*			**

— : Were not calculated because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

*1 : Indicates a significant difference by Dunnet multiple comparison procedure, Two-sided test.

* : Indicates a significant difference($\alpha=0.05$) from the control.

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

Table 8 Temperature Values during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Temperature(°C)					
	0 day new	2 day old	6 day new	8 day old	13 day new	15 day old
Control	20.0	20.5	20.3	20.6	20.4	20.1
<2.11	20.0	20.5	20.0	20.3	20.4	20.0
3.25	20.0	20.4	19.9	20.1	20.4	20.0
5.99	20.1	20.4	19.8	20.0	20.4	20.0
16.5	20.1	20.3	19.9	20.0	20.3	20.0
33.7	20.2	20.3	19.8	19.9	20.3	20.0
64.6	20.2	20.3	19.8	19.9	20.1	19.8

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)					
	0 day new	2 day old	6 day new	8 day old	13 day new	15 day old
Control	8.4	8.3	9.0	8.8	8.9	8.4
<2.11	8.5	8.4	8.6	8.3	8.9	8.0
3.25	8.4	8.2	8.7	7.7	8.8	7.7
5.99	8.2	8.2	8.6	6.1	8.6	7.1
16.5	8.3	8.0	8.7	6.5	8.9	7.1
33.7	8.5	7.8	8.6	6.7	9.0	7.3
64.6	8.5	7.8	8.7	6.4	8.9	7.1

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

Table 10 pH during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	pH					
	0 day new	2 day old	6 day new	8 day old	13 day new	15 day old
Control	7.4	7.4	7.6	7.6	7.2	7.4
<2.11	7.4	7.5	7.6	7.5	7.2	7.4
3.25	7.4	7.5	7.5	7.5	7.3	7.4
5.99	7.4	7.5	7.4	7.4	7.3	7.4
16.5	7.3	7.5	7.4	7.3	7.1	7.3
33.7	7.2	7.5	7.3	7.2	7.1	7.3
64.6	7.0	7.4	7.1	7.2	6.9	7.2

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

Table 11 Total Hardness(as CaCO_3) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness(as CaCO_3 ,mg/L)					
	0 day new	2 day old	6 day new	8 day old	13 day new	15 day old
Control	254	255	252	252	249	253
<2.11	255	255	254	256	254	257
3.25	255	254	254	256	253	256
5.99	254	253	253	255	253	255
16.5	252	252	253	255	252	255
33.7	251	251	250	254	251	253
64.6	247	248	248	250	247	249

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure

付 属 資 料 - 1

希釈水(M4 調製水)

(全 1 頁)

Appendix 1 M4 medium

Salts and Vitamines	Concentration (mg/L)
H_3BO_3	2.860
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.361
LiCl	0.306
RbCl	0.071
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152
NaBr	0.016
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.063
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.017
ZnCl_2	0.013
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.010
KI	0.00325
Na_2SeO_3	0.00219
NH_4VO_3	0.00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.996
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.8
NaHCO_3	64.8
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine(V.B ₁₂)	0.001
D(+)Biotin(V.H)	0.00075
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0

付 属 資 料 - 2

試験液の分析方法

(全 7 頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験容器より試験液1.0～2.0mL をバイアル瓶に採取する。

試験液の濃度が 2.0mg/L を越える場合は、蒸留水で 2.0mg/L 以内に希釈する。

HPLCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : Mightysil RP-18 、2.0mm ϕ \times 100mm

カラム温度 : 40℃

検出波長 : 306nm

注入量 : 20 μ L

移動相 : 10%酢酸／アセトニトリル＝75／25

流量 : 0.2mL/min

3 検量線

標準原液を希釈して、定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。

[Figure 1(p.34)]

測定日毎に標準溶液(1ポイント)の測定を行い、この検量線により定量した。

4 添加回収試験

希釈水に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

サリチル酸 1.0mg/L 標準液の回収率は101.7%であった。

5 クロマトグラム

代表的ないくつかのクロマトグラムを示した。

[Figure 2(p.35～p.39)]

Appendix 2

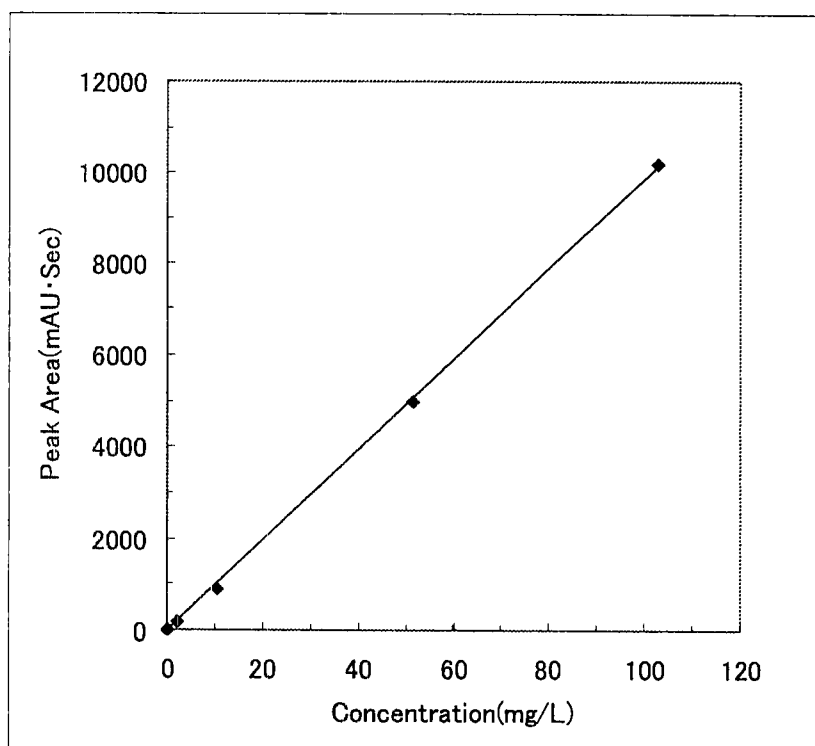
Figure 1 Calibration Curve of Salicylic acid by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.01	1.645
2	0.05	5.700
3	0.10	11.320
4	1.00	120.517
5	2.00	240.004

$$X(\text{Concentration}) = Y(\text{Peak Area}) / 120.089$$

$$r^2 = 1.0000$$

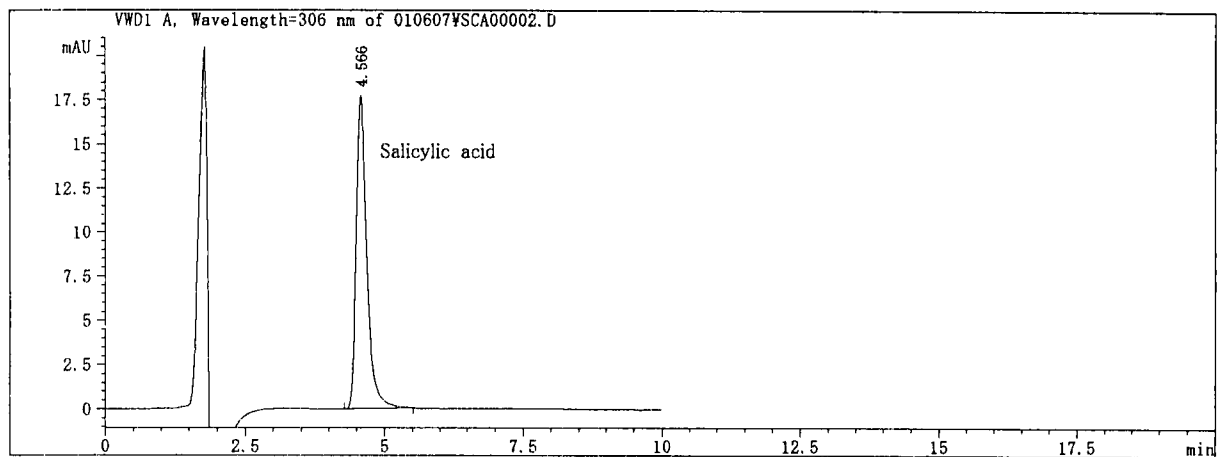
r^2 :coefficient of correlation



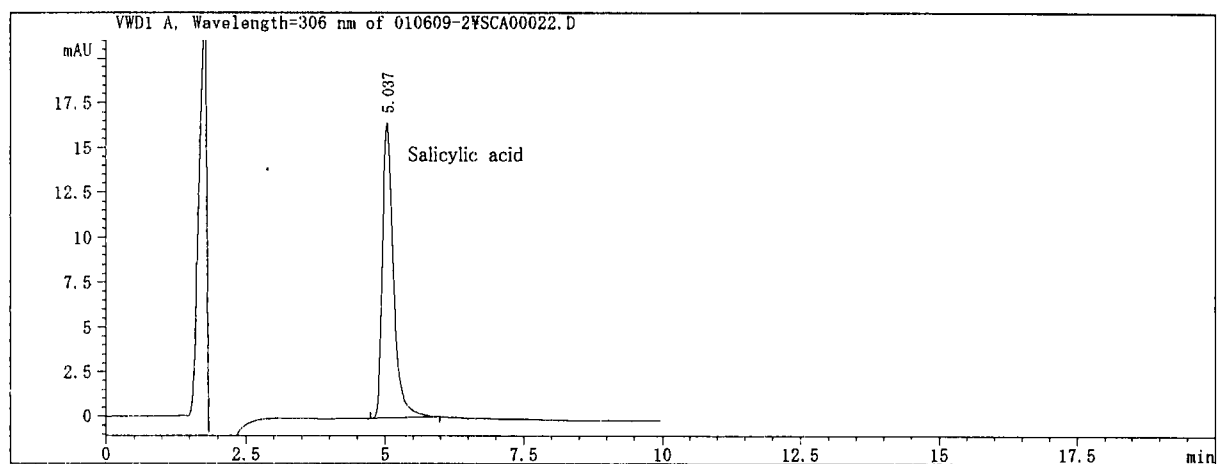
Appendix 2

Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 2.0 mg/L Day 0



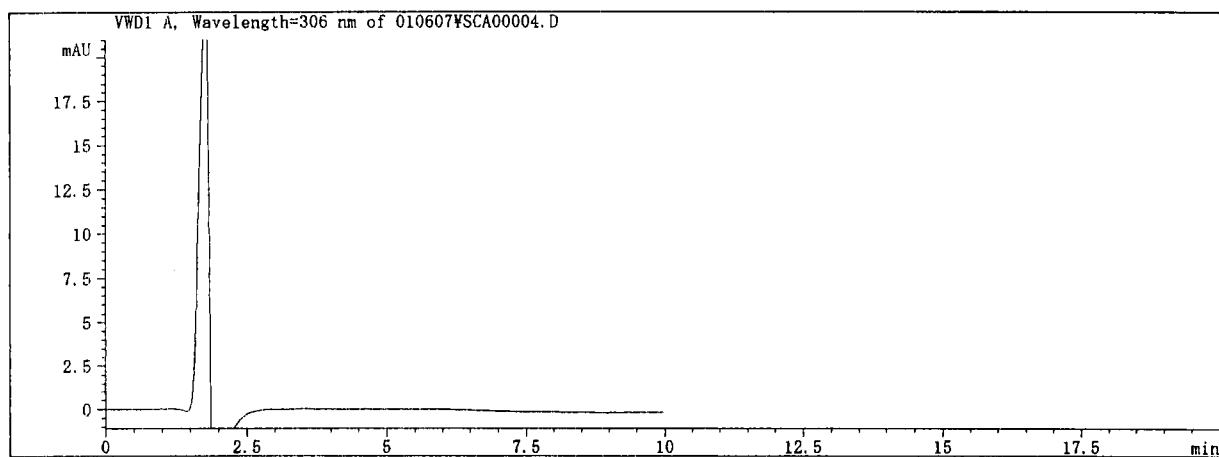
(2) Standard 2.0 mg/L Day 2



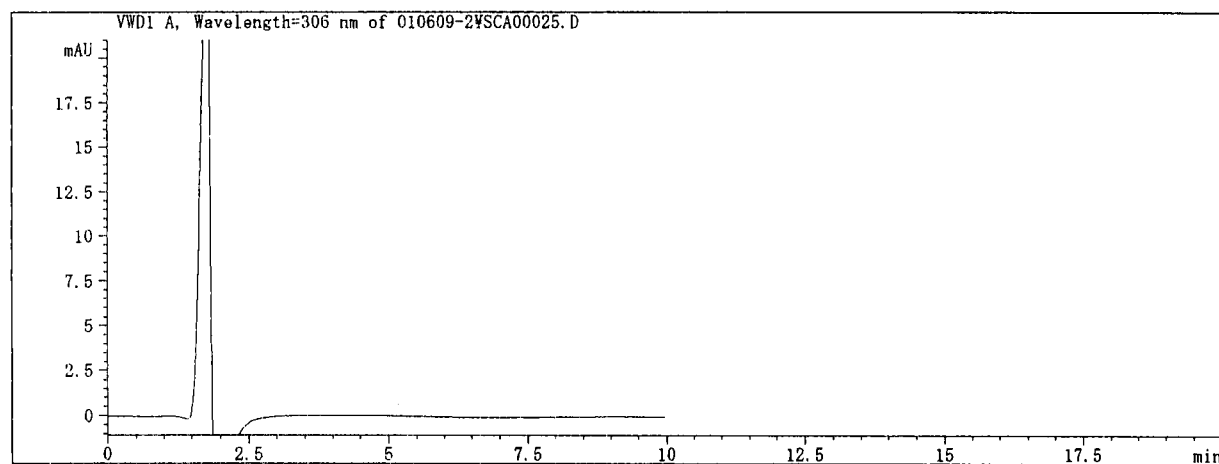
Appendix 2

Figure 2 Continued

(3) Control ; Day 0 (new)



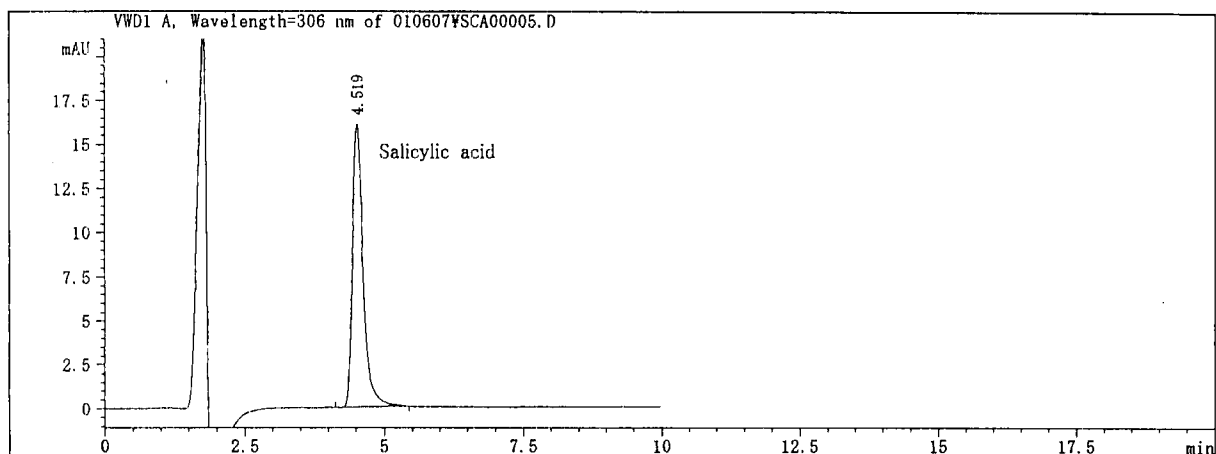
(4) Control ; Day 2 (old)



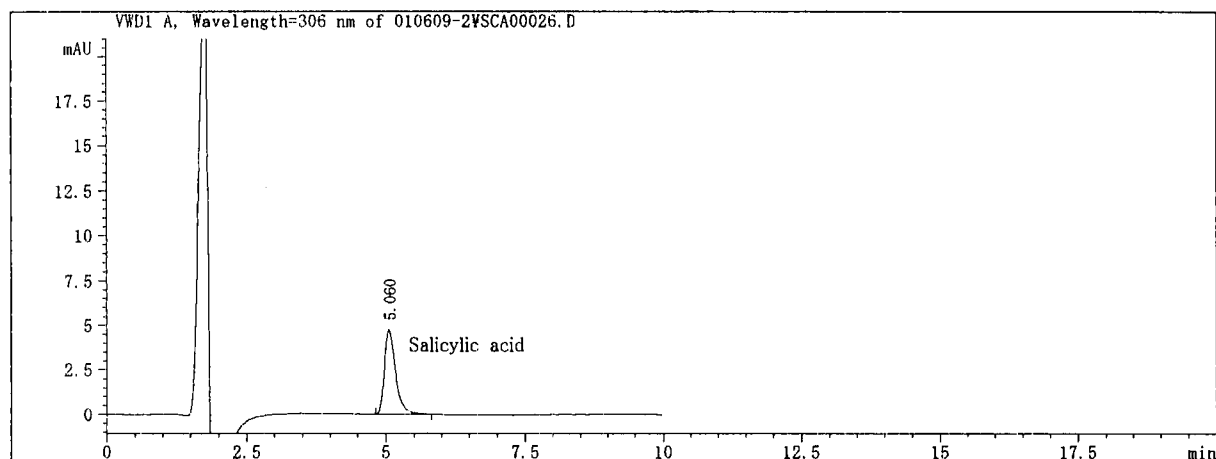
Appendix 2

Figure 2 Continued

(5) 3.70 mg/L nominal; Day 0 (new)



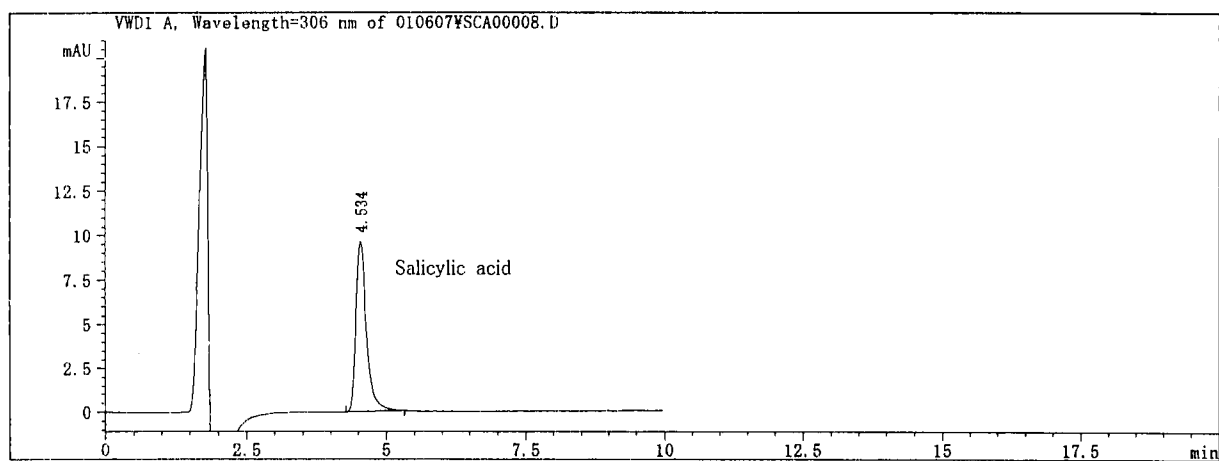
(6) 3.70 mg/L nominal; Day 2 (old)



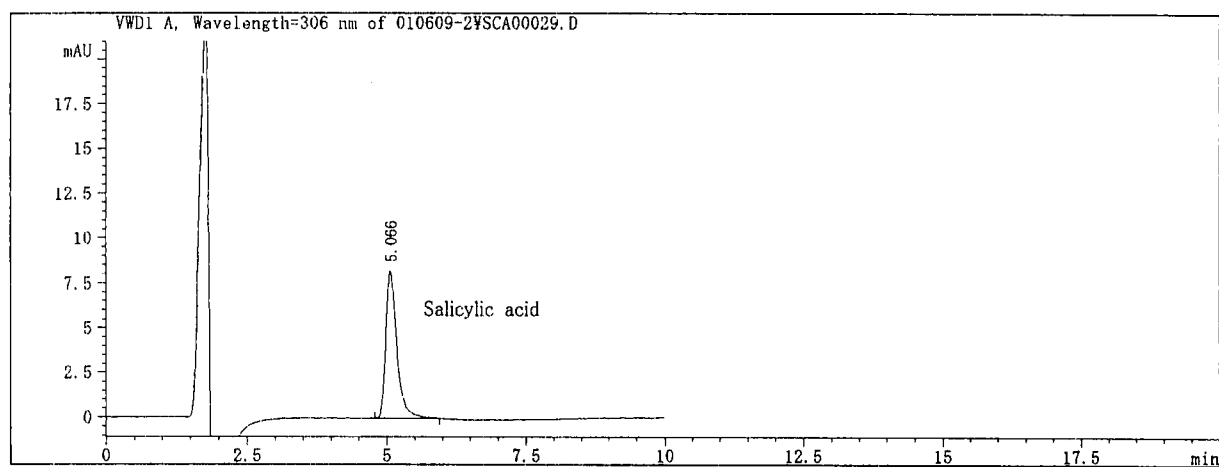
Appendix 2

Figure 2 Continued

(7) 21.6 mg/L nominal; Day 0 (new)



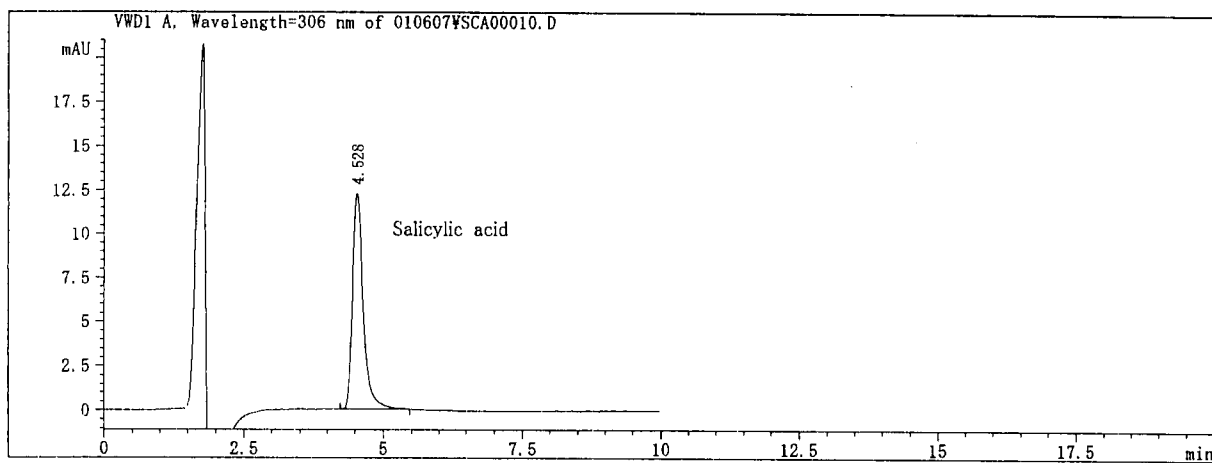
(8) 21.6 mg/L nominal; Day 2 (old)



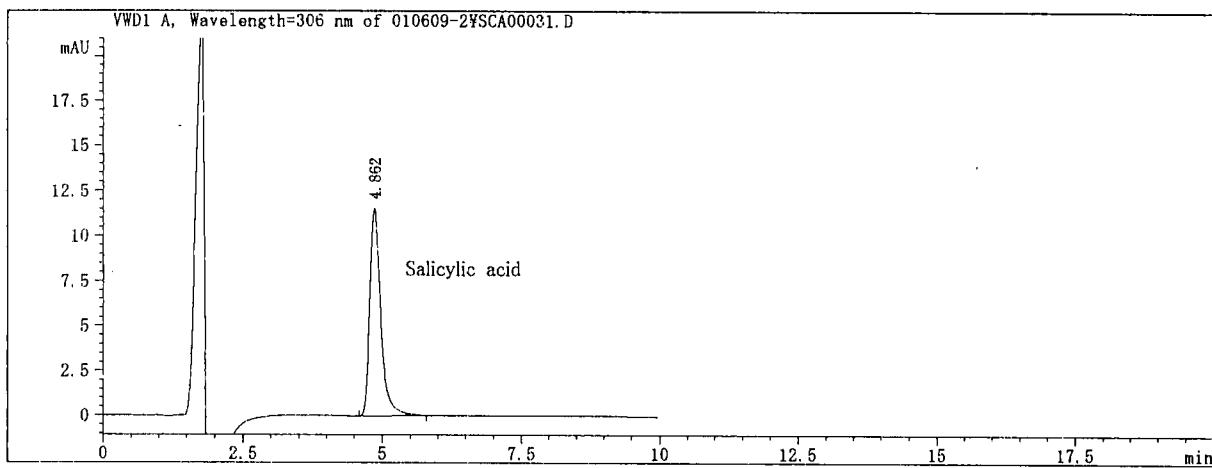
Appendix 2

Figure 2 Continued

(9) 70.0 mg/L nominal; Day 0 (new)



(10) 70.0 mg/L nominal; Day 2 (old)



付 属 資 料 - 3

ミジンコの観察結果
(全7頁)

Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)
 (Chemical Conc.: 0.0 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total				
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28					
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d					
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	0	0	13	0	0	40	0	0	50	0	0	46	0	0	--				
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	53	53	53	103	103	103	149	149	149	149				
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	0	0	30	0	0	51	0	0	49	0	0	41	0	0	--				
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	30	30	30	81	81	81	130	130	130	171	171	171	171				
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	10	0	0	37	0	0	53	0	0	57	0	0	49	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	10	10	10	47	47	47	100	100	100	157	157	157	206	206	206	206			
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	0	7	0	33	0	0	0	59	0	0	53	0	0	48	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	40	40	40	40	99	99	99	152	152	152	200	200	200			
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	0	29	0	0	52	0	0	52	0	0	54	0	0	1	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	29	29	29	81	81	81	133	133	133	187	187	187	188	188			
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	0	0	38	0	0	55	0	0	50	0	0	52	0	0	--				
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	38	38	38	93	93	93	143	143	143	195	195	195	195				
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	0	11	0	37	0	0	49	0	0	45	1	0	47	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	48	48	48	97	97	97	142	143	143	190	190	190	190			
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	0	11	0	41	0	0	63	0	0	0	43	0	0	45	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	52	52	52	115	115	115	115	158	158	158	203	203	203			
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	0	12	0	39	0	0	49	0	0	51	0	0	31	29	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	51	51	51	100	100	100	151	151	151	182	211	211	211			
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	0	11	0	43	0	0	0	57	0	0	54	0	0	33	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	54	54	54	54	111	111	111	165	165	165	198	198	198			
The time (days) to first brood:			1;		10 days,			2;		10 days,			3;		7 days,			4;		8 days,			5;		9 days,		
			6;		10 days,			7;		8 days,			8;		8 days,			9;		8 days,			10;		8 days,		

Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)

(Chemical Conc.: <2.11 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
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	15	0	0	41	0	0	57	0	0	64	0	0	50	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	15	15	15	56	56	56	113	113	113	177	177	177	227	227	227	227
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	45	0	0	47	0	0	22	25	0	0	58	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	54	54	54	101	101	101	123	148	148	148	206	206	206
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	0	0	0	38	0	0	51	0	0	51	0	0	53	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	38	38	89	89	89	140	140	140	193	193	193
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	15	0	40	0	0	0	48	0	0	52	0	0	46	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	55	55	55	55	103	103	103	155	155	155	201	201	201
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	8	0	45	0	0	50	0	0	0	47	0	0	45	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	53	53	53	103	103	103	103	150	150	150	195	195	195
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	11	0	38	0	0	56	0	0	49	0	0	9	54	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	11	11	49	49	49	105	105	105	154	154	154	163	217	217	217
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	0	0	14	0	0	14	0	0	24	0	0	0	25	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	28	28	28	52	52	52	52	77	77	77
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	38	0	0	0	49	0	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	63	63	63	63	112	112	--	--	--	--	--
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	12	0	5	41	0	0	0	0	0	47	0	0	0	39	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	17	58	58	58	58	58	58	105	105	105	105	144	144
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	8	0	37	0	0	51	0	0	66	0	0	47	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	45	45	45	96	96	96	162	162	162	209	209	209	209
The time (days) to first brood:			1;	7 days,			2;	8 days,			3;	11 days,			4;	8 days,			5;	8 days,			
			6;	8 days,			7;	10 days,			8;	- days,			9;	8 days,			10;	8 days,			

Appendix 3-3 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)
 (Chemical Conc.: 3.25 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total			
			6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28				
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d				
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	8	0	40	0	0	53	0	0	63	0	0	53	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	48	48	48	101	101	101	164	164	164	217	217	217	217			
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	12	0	49	0	0	36	13	0	0	59	0	0	47	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	61	61	61	97	110	110	110	169	169	169	216	216	216			
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	13	0	0	38	0	0	63	0	0	54	0	0	46	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	51	51	51	114	114	114	168	168	168	214	214	214	214			
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	46	0	0	55	0	0	58	0	0	50	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	57	57	57	112	112	112	170	170	170	220	220	220	220			
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	7	0	45	0	0	53	0	0	57	1	0	55	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	52	52	52	105	105	105	162	163	163	218	218	218	218			
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	0	38	0	0	54	0	0	48	0	0	46	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	38	38	92	92	92	140	140	140	186	186	186	186			
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	10	0	44	0	0	48	0	0	62	0	0	56	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	54	54	54	102	102	102	164	164	164	220	220	220	220			
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	52	0	0	48	0	0	46	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	75	75	75	123	123	123	169	169	169	169			
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	11	0	39	0	0	50	0	0	51	0	0	47	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	50	50	50	100	100	100	151	151	151	198	198	198	198			
10	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	13	0	0	33	0	0	51	0	0	43	0	0	45	0	0	--			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	46	46	46	97	97	97	140	140	140	185	185	185	--			
The time (days) to first brood:			1;		8 days,			2;		8 days,			3;		7 days,			4;		8 days,			5;		8 days,		
			6;		10 days,			7;		8 days,			8;		10 days,			9;		8 days,			10;		- days,		

Appendix 3-4 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)

(Chemical Conc.: 5.99 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																				Total		
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27		6/28	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d		
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	7	0	39	0	0	58	0	0	62	0	0	58	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	46	46	46	104	104	104	166	166	166	224	224	224	224
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	12	0	36	0	0	53	0	0	57	1	0	43	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	48	48	48	101	101	101	158	159	159	202	202	202	202
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	0	26	33	0	15	39	0	0	48	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	34	60	93	93	108	147	147	147	195	195	195	195
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	26	0	0	51	0	0	53	0	0	48	0	0	54	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	26	26	26	77	77	77	130	130	130	178	178	178	232	232
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	11	0	43	0	0	54	0	0	57	0	0	52	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	54	54	54	108	108	108	165	165	165	217	217	217	217
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	8	0	39	0	0	46	0	0	56	0	0	52	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	47	47	47	93	93	93	149	149	149	201	201	201	201
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	9	0	39	0	0	50	0	0	56	0	0	52	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	48	48	48	98	98	98	154	154	154	206	206	206	206
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	41	0	0	51	0	0	53	0	0	55	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	51	51	51	102	102	102	155	155	155	210	210	210	210
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	47	0	0	40	0	0	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	59	59	59	99	99	99	--	--	--	--	--	--
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
The time (days) to first brood:			1;	8 days,		2;	8 days,		3;	10 days,		4;	9 days,		5;	8 days,								
			6;	8 days,		7;	8 days,		8;	8 days,		9;	- days,		10;	- days,								

Appendix 3-5 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)
 (Chemical Conc.: 16.5 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep.	Counts	Time																				Total	
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27		6/28
No.		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	53	0	0	62	0	0	51	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	69	69	69	131	131	131	182	182	182	--
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	0	8	0	39	0	0	42	0	0	50	0	0	50	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	47	47	47	89	89	89	139	139	139	189	189	189
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	0	8	0	40	0	0	57	0	0	56	0	0	57	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	48	48	48	105	105	105	161	161	161	218	218	218
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	0	0	22	0	0	42	29	0	50	54	0	59	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	64	93	93	143	197	197	256	256	256	315
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	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	54	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	64	64	64	64
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	42	0	19	30	0	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	7	7	7	7	49	49	68	98	98	--	--	--	--	--	--
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	0	7	0	38	0	0	52	0	0	64	0	0	46	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	45	45	45	97	97	97	161	161	161	207	207	207
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	0	7	0	42	0	0	52	0	0	63	0	0	53	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	49	49	49	101	101	101	164	164	164	217	217	217
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	0	9	0	36	0	0	53	0	0	68	0	0	51	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	45	45	45	98	98	98	166	166	166	217	217	217
10	P generation	Live	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
The time (days) to first brood:			1;	- days,			2;	8 days,			3;	8 days,			4;	9 days,			5;	10 days,			
			6;	- days,			7;	8 days,			8;	8 days,			9;	8 days,			10;	- days,			

Appendix 3-6 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)
 (Chemical Conc.: 33.7 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
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	7	0	45	0	0	57	0	0	0	46	0	0	54	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	7	7	52	52	52	109	109	109	109	155	155	155	209	209	209
2	P generation	Live	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
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	5	0	38	0	0	54	0	0	60	0	0	50	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	5	5	43	43	43	97	97	97	157	157	157	207	207	207	207
4	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	0	23	0	0	47	0	0	46	0	0	17	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	70	70	70	116	116	116	133	--	--	--	--
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	17	0	0	55	0	0	55	0	0	48	0	0	58	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	72	72	72	127	127	127	175	175	175	233	233
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	0	20	0	0	53	0	0	48	0	0	50	0	0	42	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	73	73	73	121	121	121	171	171	171	213	213
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	0	22	0	0	57	0	0	50	0	0	57	0	0	16	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	79	79	79	129	129	129	186	186	186	202	202
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	6	0	40	0	0	48	0	0	39	0	0	43	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	6	6	46	46	46	94	94	94	133	133	133	176	176	176	176
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	36	36	36	36	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	47	0	0	56	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	67	67	67	123	--	--	--	--	--
The time (days) to first brood:			1;	8 days,			2;	- days,			3;	8 days,			4;	- days,			5;	9 days,			
			6;	9 days,			7;	9 days,			8;	8 days,			9;	- days,			10;	- days,			

Appendix 3-7 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: Salicylic acid)
 (Chemical Conc.: 64.6 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
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	0	0	20	0	0	43	0	0	0	0	0	29	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	63	63	63	63	63	63	92	92	92	92
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	0	0	4	12	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	16	16	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
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	0	0	0	23	0	0	18	0	0	37	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	41	41	41	78	78	78	78	78	78
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	--	--	--	--	--	--	--	--
5	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	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
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	0	0	32	0	0	50	0	0	0	0	0	0	25	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	32	32	32	82	82	82	82	82	82	82	107	107	107
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	45	0	0	0	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	59	59	59	59	--	--	--	--	--	--
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	0	0	8	4	0	51	0	0	0	23	0	0	9	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	12	12	63	63	63	63	86	86	86	95	95	95
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	43	0	0	20	0	0	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	27	27	70	70	70	90	90	90	--	--	--
10	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	0	0	13	0	0	44	0	0	15	0	0	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	57	57	57	72	72	72	--	--	--	--
The time (days) to first brood:			1;	10 days,		2;	10 days,		3;	11 days,		4;	- days,		5;	- days,		6;	10 days,		7;	- days,	
			6;	10 days,		7;	- days,		8;	10 days,		9;	- days,		10;	- days,							