

環境庁殿

試 験 報 告 書

メルカプト酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号 : NMMP / E 9 8 / 3 0 2 0)

平成 1 1 年 8 月 2 5 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：環境庁

表題：メルカプト酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号：NMMP/E98/3020

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成11年8月25日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

[Redacted Stamp]

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：環境庁

表題：メルカプト酢酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号：NMMP/E98/3020

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 11 年 6 月 9 日	平成 11 年 6 月 9 日
試験報告書監査	平成 11 年 8 月 10 日	平成 11 年 8 月 10 日

平成 11 年 8 月 25 日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

試験実施概要

1. 表題 : メルカプト酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的 : メルカプト酢酸について、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. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年 4 月採択) の改訂版であるガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」 (1997 年 4 月提案) に準拠して実施した。
4. 適用 G L P : 本試験は環境庁の G L P 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 1-2-2
委託責任者 : 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 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	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 25 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 23 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 23 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 20 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 20 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 23 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 20 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 20 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 11 年 8 月 20 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 10 年 12 月 18 日

暴露期間 平成 11 年 5 月 19 日 ～ 平成 11 年 6 月 9 日

試験終了日 平成 11 年 8 月 25 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。

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

環境庁

表 題

メルカプト酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

NMMP/E 9 8 / 3 0 2 0

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年4月採択) の改訂版であるガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」 (1997年4月提案) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : メルカプト酢酸
- 2) 暴露方法 : 半止水式 (毎日1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、5.4mg/L、8.6mg/L、13.7mg/L、21.9mg/L および35.0mg/L
(公比1.6、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)

$$= 5.7\text{mg/L (95\%信頼区間 : } 3.4\text{mg/L} \sim 11.2\text{mg/L)}$$

3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (ErC50)

$$= 4.1\text{mg/L (95\%信頼区間 : } 3.6\text{mg/L} \sim 4.8\text{mg/L)}$$

4) 21 日間の最大無作用濃度 (NOECr) = 2.7mg/L

5) 21 日間の最小作用濃度 (LOECr) = 6.5mg/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 : メルカプト酢酸
(別名 チオグリコール酸、識別符号 AM 、CAS No. 68-11-1)

構造式 :
$$\text{HSCH}_2\text{COOH}$$

分子式 : $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$
分子量 : 92.12
融点 : -16.5°C
沸点 : $120^\circ\text{C}/20\text{mmHg}$
比重 : 1.325 (20°C)
水への溶解度 : $>100\text{mg/mL}$
蒸気圧 : 15mmHg (108°C)

[上記の数値は webkis-plus、ECDIN、NTP の各データベースから引用した]
webkis-plus:神奈川県化学物質データベース ECDIN:Environmental Chemicals
Data Information Network NTP:National Toxicology Program

1.2 供試試料

純度 : 90.0%以上
ロット番号 : ACL3918
供給者 : XXXXXXXXXX
供給量 : $25\text{mL} \times 5\text{本}$
入手日 : 平成10年11月11日
外観 : 無色透明液体

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

被験物質は光を遮断した試料保管庫(冷蔵庫)に $1\sim 8^\circ\text{C}$ で保管した。

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高速液体クロマトグラフ分析を行い、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。試験終了後にも同様に測定・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、不純物が増加し、7ヶ月間で純度が約13%減少した。従って、被験物質は当研究部の試料保管庫で保管中に少し変化したと判断された。

メルカプト酢酸は空気酸化されることが知られており、密栓して冷蔵庫に保管していた

が、サンプル採取時に空気に触れ徐々に酸化されたものと推定される。一方、試験においてもメルカプト酢酸が水中の溶存酸素で酸化され、高速液体クロマトグラフ分析における保持時間から保管中に生成した不純物と同種と考えられる酸化物（不純物）が生成し、かつその量は保管中の変化より大きい。従って、設定値ではなく実測値により算出した試験結果に保管中の純度変化が与える影響は少ないと考えられる。

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11年4月20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29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11年5月19日暴露開始)。

飼育水 : 希釈水 (3.2参照)

飼育密度 : 20~40 頭/L 飼育水 (但し、成熟個体の場合は、20頭以下/Lとした)

水温 : 20±1℃

照明 : 室内光、16時間明(1200 lux以下)/8時間暗

餌 : *Chlorella regularis*

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、24時間に1回、試験液を全量交換した。

2) 暴露期間 : 21日間

3) 試験液量 : 1 容器 (連) につき 80 mL

4) 連数 : 10容器 (連) /濃度区

- 5) 供試生物数：10頭／濃度区（1連につき1頭）
- 6) 試験水温：20±1℃
- 7) 照明：室内光、16時間明(1200lux以下)／8時間暗
- 8) 餌：*Chlorella regularis*
- 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の付表 (ANNEX 2) に記載してある Elendt M4を用いた。
希釈水の全硬度は233mg/L(CaCO₃換算)、pHは8.2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= 35.8mg/L)から、
それ以下の濃度を公比 1.6で5段階設定した。各濃度は以下のとおりである。

対照区、5.4mg/L、8.6mg/L、13.7mg/L、21.9mg/Lおよび35.0mg/L

3.5 試験液の調製

- 1) 試験開始前に調製した被験物質 1000mg/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) 希釈水のみを対照区を設けた。
- 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）を観察し、無色透明で沈殿等のないことを確認した。

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）、7日目および14日目の試験液調製時とそれぞれの1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 10.0mg/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

試験液の水温、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 : 水温、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

試験液濃度の時間加重平均値が求められなかった濃度区(設定濃度5.5mg/L)を除いた残り4水準の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

試験液濃度の時間加重平均値が求められなかった濃度区(設定濃度 5.5mg/L)を除いた残り4水準の濃度区での生存親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、試験液濃度の時間加重平均値が求められなかった濃度区(設定濃度5.5mg/L)を除いた残り4水準の濃度区を統計計算に用いた。

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。

21日間の生存親が無くなった濃度区は明らかに作用があったとした。

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

なし。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時(0日目)、7日目および14日目の試験液調製時の被験物質濃度は4.1~33.8mg/L(設定濃度5.4~35.0mg/L)であり、設定濃度に対する割合は69.5~96.6%であった。また、それらの1日後、換水前の濃度は<0.06~18.4mg/Lであり、設定濃度に対する割合は<0.8~52.5%であった。

[Table 1-1(p. 15, 16), Table 1-2(p. 17), 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10%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

濃度区では被験物質濃度が高くなるに従って暴露終了時の親ミジンコの死亡数、死亡率が上昇し、1.7mg/Lの濃度区では親ミジンコの死亡率は、30%、最高濃度区(24.2mg/L)では、100%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10~11日後であった。1.7mg/Lの濃度区では、親ミジンコの初産日は暴露開始10~14日であり、最高濃度区(24.2mg/L)では、親ミジンコの産仔は見られなかった。

[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67.8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(1.7mg/L)では、74.4頭、最高濃度区(24.2mg/L)では、21日間暴露で親ミジンコが全て死亡した。

[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5.7mg/Lであり、その95%信頼区間は3.4～11.2mg/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4.1mg/Lであり、その95%信頼区間は3.6～4.8mg/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2.7mg/Lであり、最小作用濃度 (LOECr) は6.5mg/Lであった。 [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20.1～20.9℃であり、設定範囲(20℃±1℃)内であった。

溶存酸素濃度は7.2～8.6mg/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6.6～8.2であり、被験物質濃度の増加と共にpHが低下した。暴露試験期間中のpH変動は、1.5以内であった。

全硬度は221～242mg/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 2-Mercaptoacetic 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	1 day old	0 day new	1 day old
Control	<0.06	<0.06	–	–
5.4	4.65	<0.06	86.1	<1.1
8.6	6.12	0.07	71.2	0.8
13.7	9.56	0.24	69.8	1.8
21.9	18.37	0.78	83.9	3.6
35.0	33.80	18.38	96.6	52.5

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	7 day new	8 day old	7 day new	8 day old
Control	<0.06	<0.06	–	–
5.4	4.12	0.14	76.3	2.6
8.6	6.01	0.18	69.9	2.1
13.7	9.52	0.26	69.5	1.9
21.9	17.61	0.31	80.4	1.4
35.0	31.85	16.10	91.0	46.0

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 1-1 Continued

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	14 day new	15 day old	14 day new	15 day old
Control	<0.06	<0.06	—	—
5.4	4.91	0.13	90.9	2.4
8.6	7.30	0.27	84.9	3.1
13.7	11.29	0.26	82.4	1.9
21.9	18.67	4.14	85.3	18.9
35.0	33.68	16.50	96.2	47.1

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 1-2 Time-weighted Means of Measured Concentrations of 2-Mercaptoacetic 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	—	—
5.4	<1.2	<22.2
8.6	1.7	19.8
13.7	2.7	19.7
21.9	6.5	29.7
35.0	24.2	69.1

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

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

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		Days																					
(mg/L)		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	1
<1.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.7		0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
2.7		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
6.5		0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4
24.2		0	1	1	2	2	2	3	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	9	9	9	10

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

Measured Concentration		Days					
(mg/L)		1	2	4	7	14	21
Control		0	0	0	0	0	10
<1.2		0	0	0	0	0	0
1.7		0	0	0	10	20	30
2.7		0	0	0	0	0	10
6.5		0	0	0	20	30	40
24.2		10	10	20	50	60	100

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

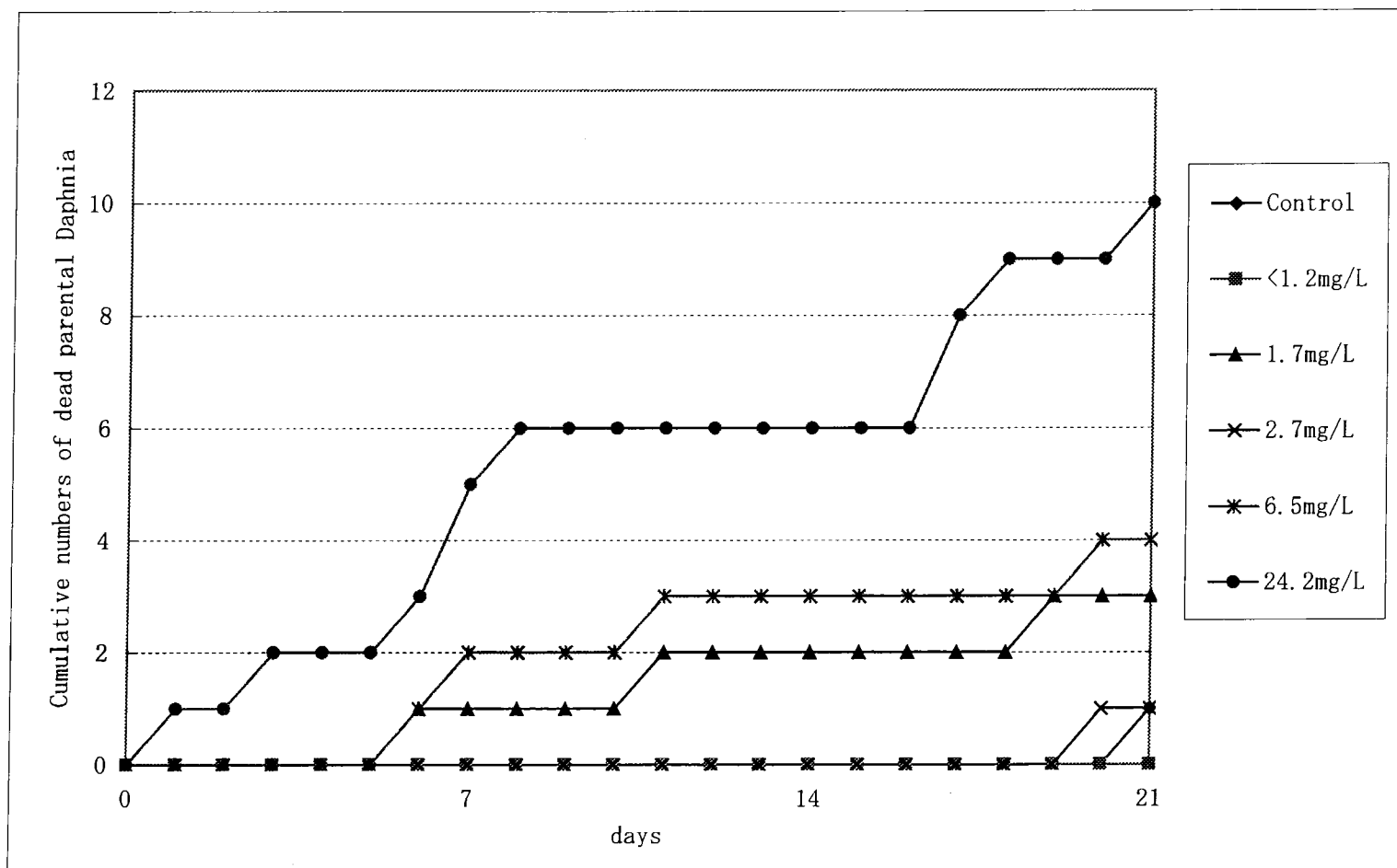


Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Control	Measured concentration (mg/L)				
		<1.2	1.7	2.7	6.5	24.2
1	–	11	–	7	10	–
2	10	11	11	11	8	–
3	11	10	10	11	–	–
4	11	11	10	10	8	–
5	11	13	–	10	–	–
6	11	14	–	10	–	–
7	11	19	11	15	10	–
8	11	>21	14	–	–	–
9	10	10	11	11	14	–
10	10	11	10	11	8	–
Mean	10.7	>13	11.0	10.7	9.7	–

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	0.0	0.0	0.0	3.2	12.4	12.4	15.0	29.4	31.7	40.2	51.8	54.0	67.4	67.8	67.8
<1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	6.3	7.5	12.7	22.2	22.2	27.6	38.9	38.9	48.1	59.5	60.4
1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	9.4	12.6	16.9	25.6	25.6	37.9	46.0	46.1	64.7	74.4	74.4
2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	5.3	11.0	11.8	20.0	25.9	27.0	32.0	38.1	38.1	40.6	42.1	42.1
6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0	10.5	12.3	12.3	12.3	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	18.5	18.5	18.5
24.2	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a	—a

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

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

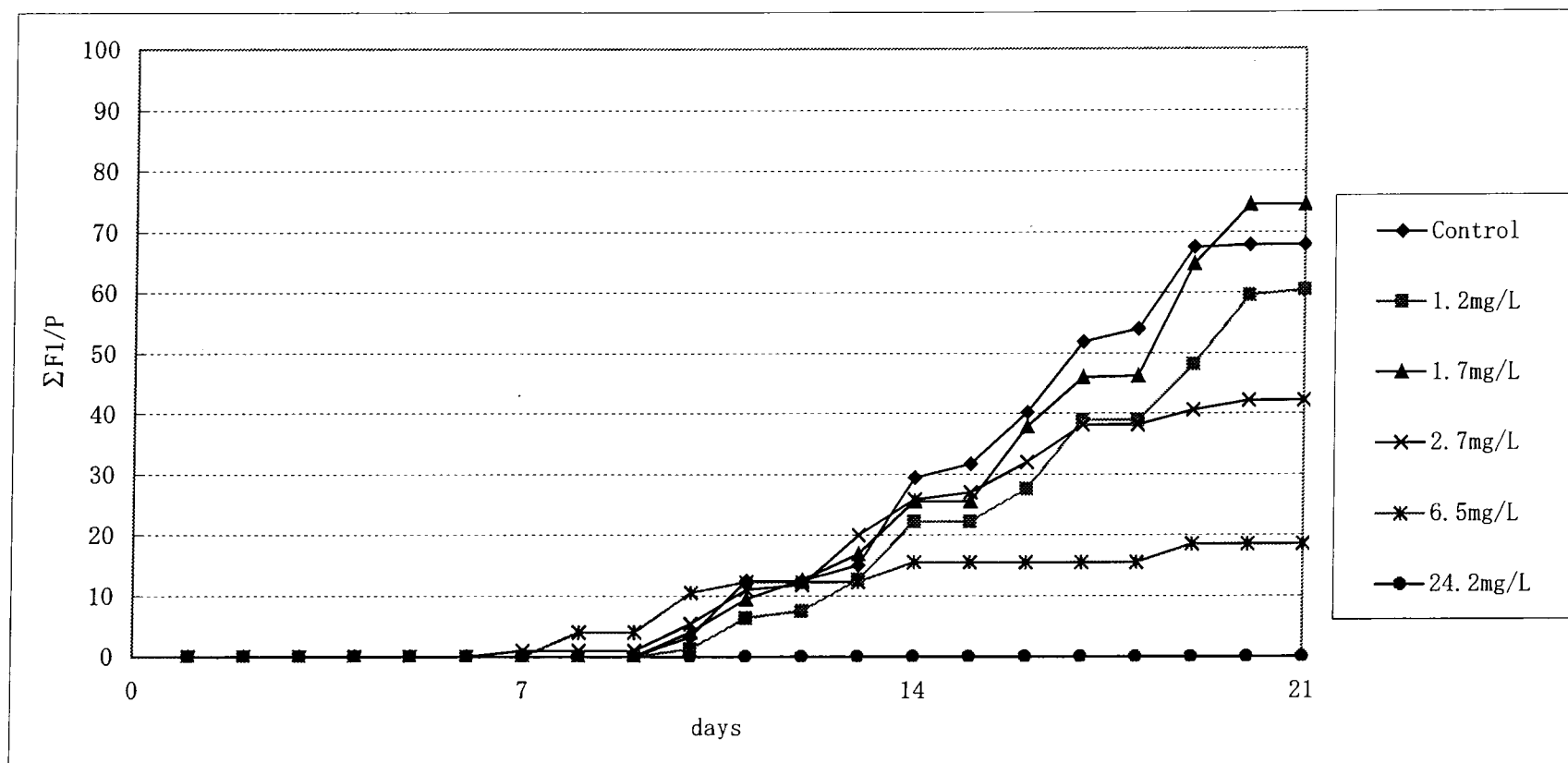


Table 5 Calculated LC50 Value for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	5.7	3.4 ~ 11.2	Probit

Table 6 Calculated ErC50 Value for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	4.1	3.6 ~ 4.8	Logit

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

Vessel No.	Control	Measured Concentration (mg/L)				
		1.2	1.7	2.7	6.5	24.2
1	—	95	—	35	38	—
2	45	95	85	44	20	—
3	93	38	87	51	—	—
4	47	68	65	48	18	—
5	65	99	—	11	—	—
6	78	28	—	41	—	—
7	79	26	116	10	15	—
8	100	0	34	—	—	—
9	50	63	94	57	5	—
10	53	92	40	82	15	—
Mean	67.8	60.4	74.4	42.1	18.5	—
S.D.	20.61	35.48	29.69	22.31	10.86	—
Inhibition rate(%)		10.9	-9.7	37.9	72.7	—
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.

*** : Could not be calculated because more than 7 parental *Daphnia* were dead after 21 days testing period.

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

Measured Concentration (mg/L)	Temperature(°C)					
	0 day new	1 day old	7 day new	8 day old	14 day new	15 day old
Control	20.6	20.3	20.7	20.3	20.6	20.9
1.2	20.5	20.2	20.4	20.4	20.7	20.7
1.7	20.5	20.1	20.4	20.4	20.7	20.7
2.7	20.5	20.1	20.4	20.4	20.7	20.7
6.5	20.5	20.2	20.3	20.4	20.8	20.7
24.2	20.4	20.2	20.3	20.4	20.7	20.7

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours 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	1 day old	7 day new	8 day old	14 day new	15 day old
Control	8.5	8.1	8.0	7.9	8.5	7.3
1.2	8.3	8.1	8.2	8.0	8.6	7.2
1.7	8.3	8.1	8.2	7.9	8.4	7.7
2.7	8.2	8.2	8.2	7.5	8.5	7.6
6.5	8.3	8.0	8.4	7.6	8.4	7.5
24.2	8.3	8.1	8.3	8.1	8.5	7.5

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

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

Measured Concentration (mg/L)	pH					
	0 day new	1 day old	7 day new	8 day old	14 day new	15 day old
Control	8.2	7.5	7.5	7.5	8.0	7.5
1.2	7.8	7.6	7.6	7.5	7.8	7.4
1.7	7.6	7.6	7.4	7.5	7.7	7.4
2.7	7.3	7.6	7.2	7.5	7.4	7.4
6.5	7.2	7.5	7.0	7.5	7.1	7.4
24.2	6.8	7.5	6.6	7.5	6.9	7.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 11 Total Hardness(as CaCO₃) 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	1 day old	7 day new	8 day old	14 day new	15 day old
Control	233	226	233	233	237	233
1.2	235	226	236	233	241	232
1.7	235	226	236	232	242	231
2.7	234	225	236	231	241	230
6.5	232	224	234	229	239	229
24.2	230	221	232	227	236	225

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours 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 1.0～2.0 mL をバイアル瓶に採取する。

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 : C18 5 μ m 、 4.6mm ϕ \times 150mm

カラム温度 : 40°C

注入量 : 100 μ L

移動相 : 5mM リン酸 / アセトニトリル = 95 / 5

流 速 : 1.0mL / min

検出波長 : 220nm

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。

メルカプト酢酸 50.0mg/L 標準液の回収率は101.3%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

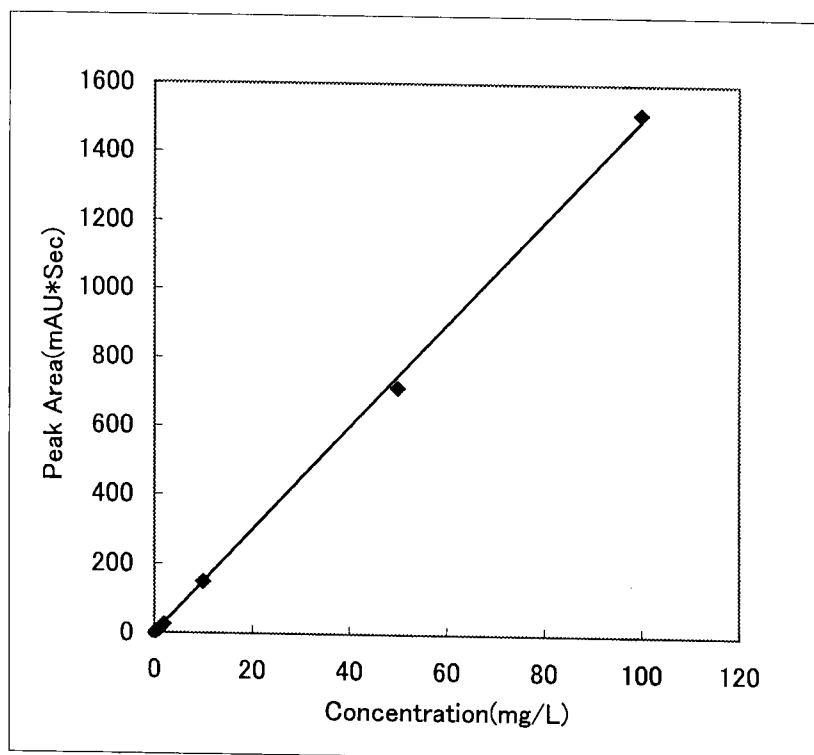
Figure 1 Calibration Curve of 2-Mercaptoacetic acid by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU*Sec)
1	1.0	10.829
2	2.0	25.715
3	10.0	149.698
4	50.0	712.586
5	100.0	1516.068

$$X (\text{Concentration}) = Y (\text{Peak Area}) / 14.9778$$

$$r^2 = 0.9994$$

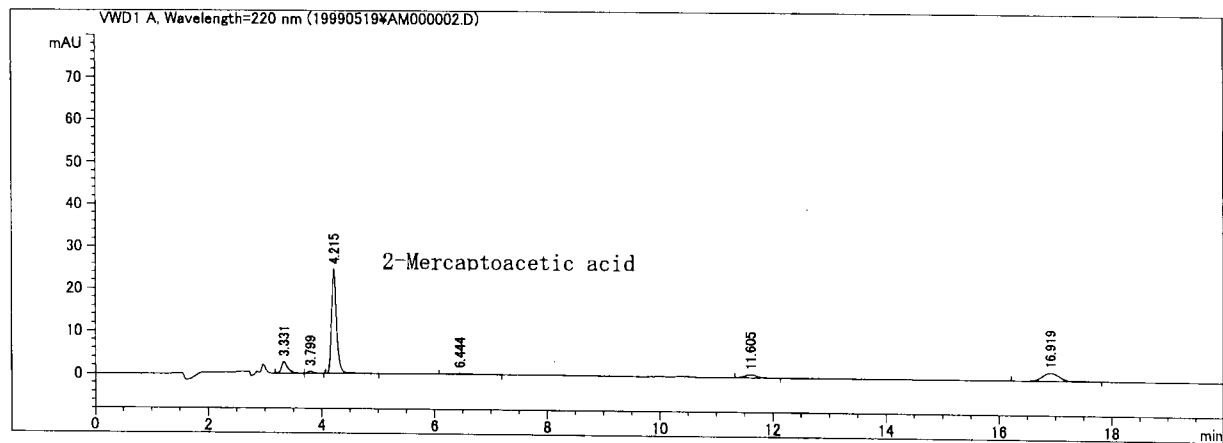
r^2 : coefficient of correlation



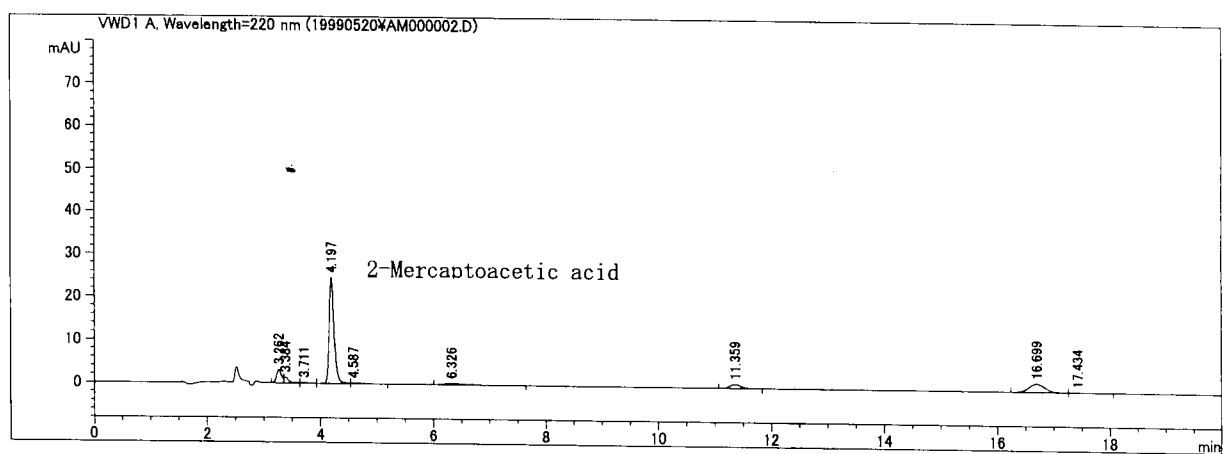
Appendix 2

Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 10.0mg/L Day 0



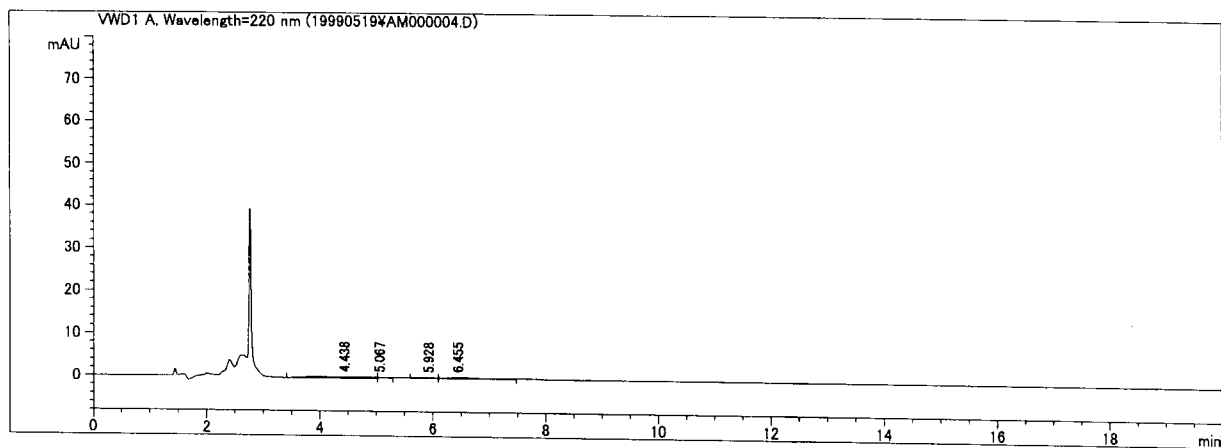
(2) Standard 10.0 mg/L Day 1



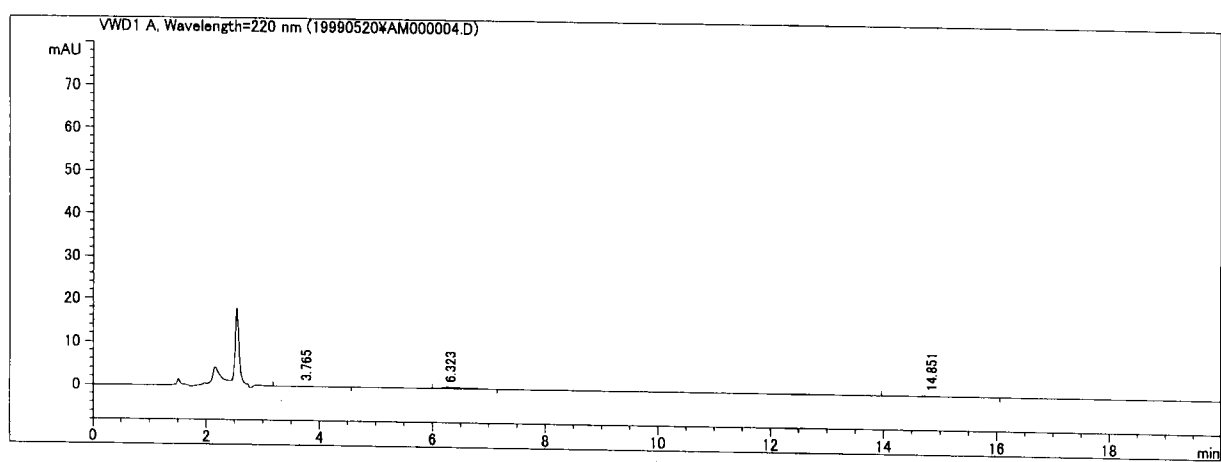
Appendix 2

Figure 2 Continued

(3) Control ; Day 0 (new)



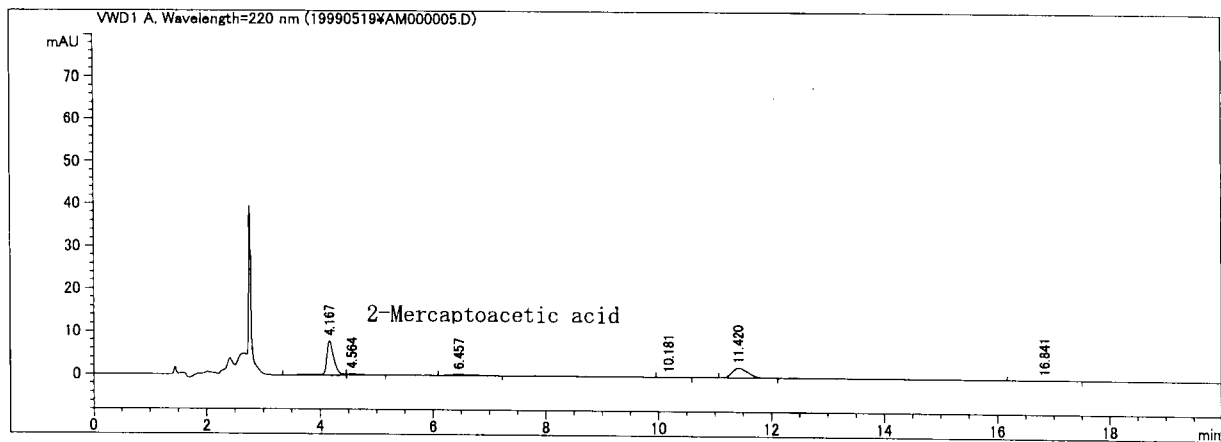
(4) Control ; Day 1 (old)



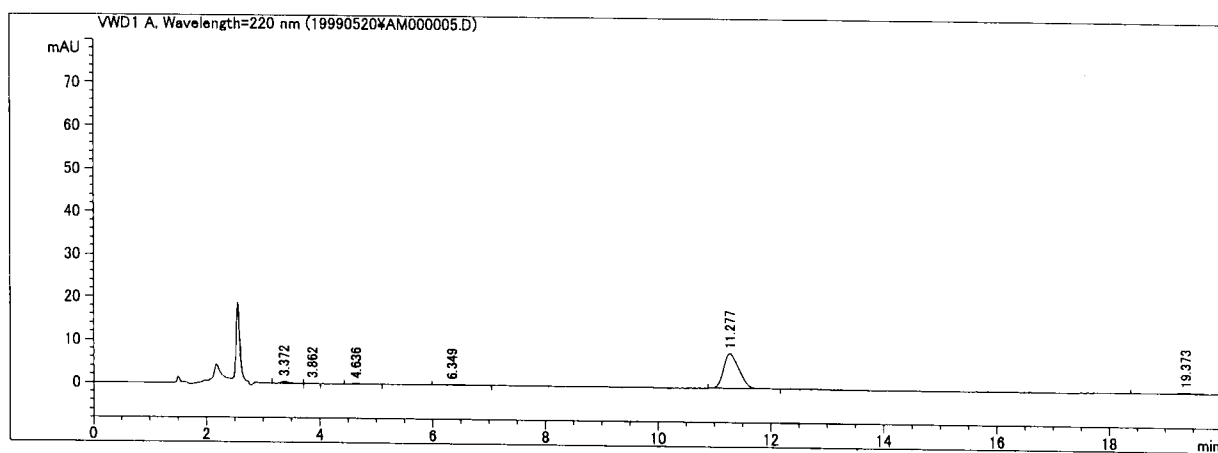
Appendix 2

Figure 2 Continued

(5) 5.4mg/L Nominal; Day 0 (new)



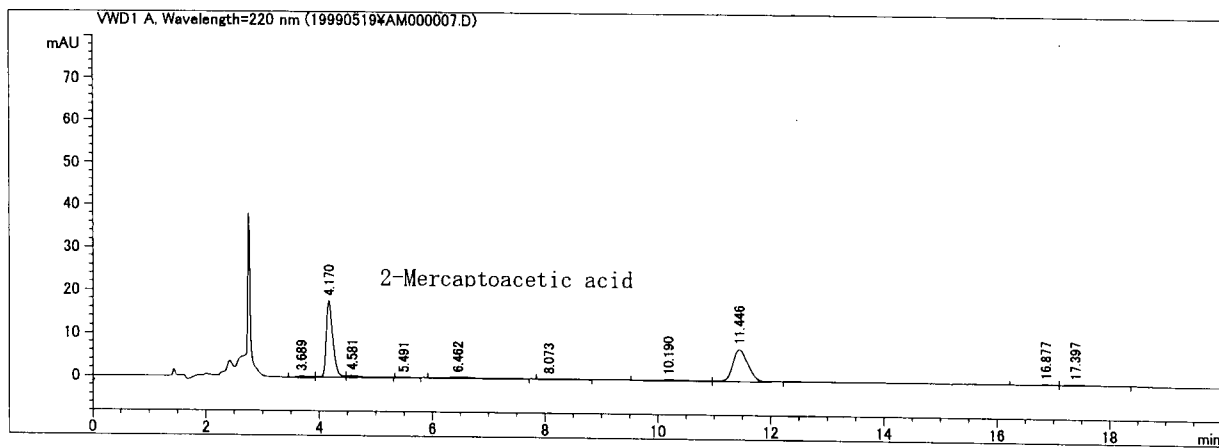
(6) 5.4mg/L Nominal; Day 1 (old)



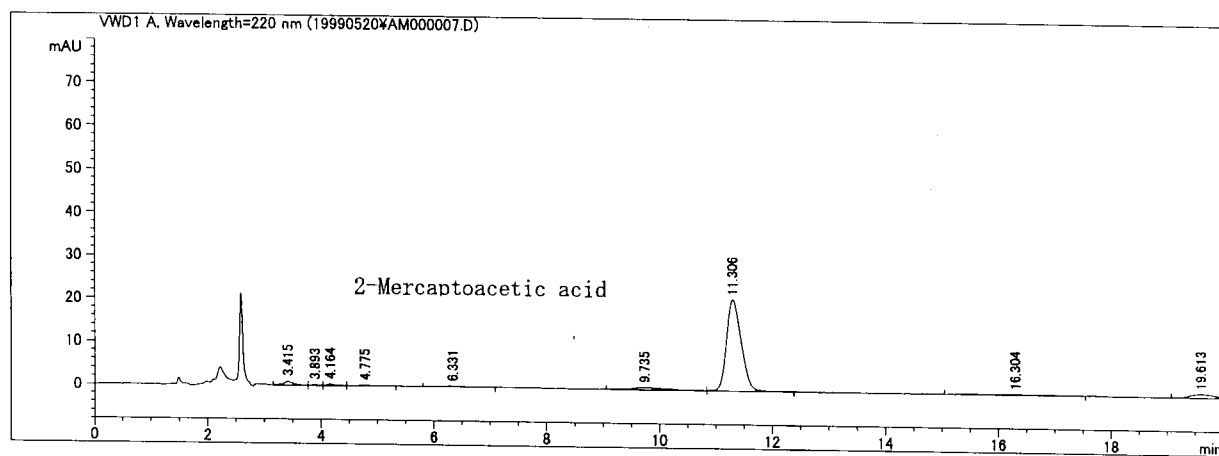
Appendix 2

Figure 2 Continued

(7) 13.7mg/L Nominal; Day 0 (new)



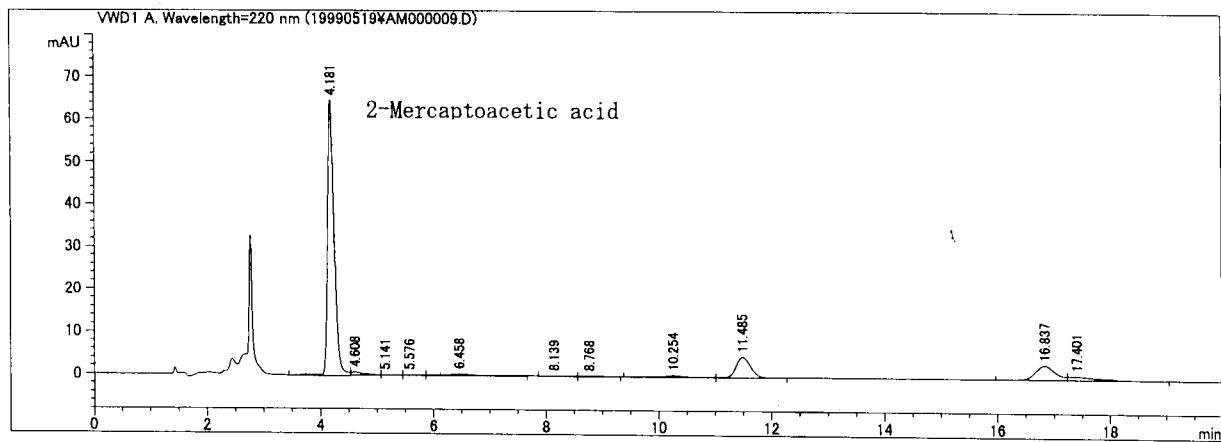
(8) 13.7mg/L Nominal; Day 1 (old)



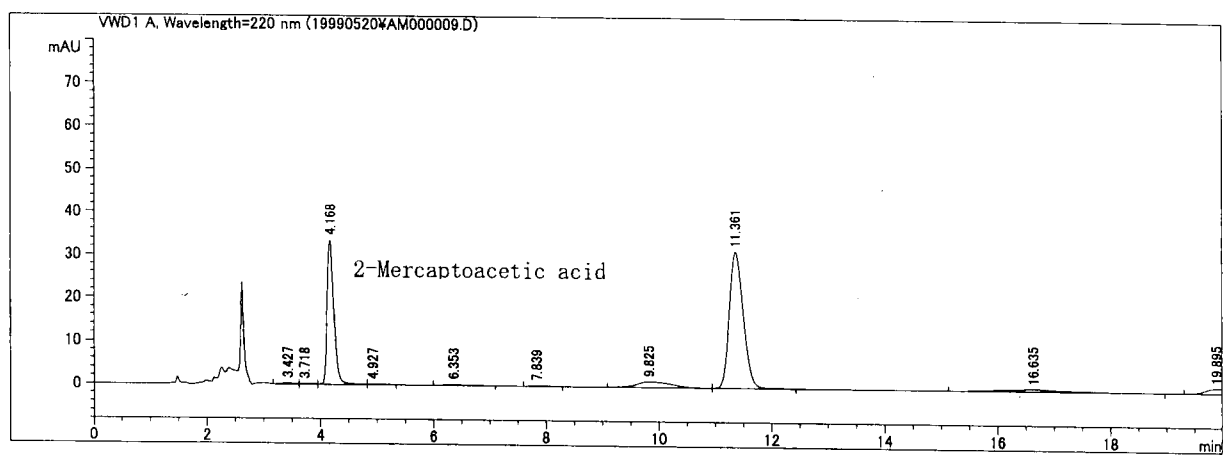
Appendix 2

Figure 2 Continued

(9) 35.0mg/L Nominal; Day 0 (new)



(10) 35.0mg/L Nominal; Day 1 (old)



付 属 資 料 - 3

ミジンコの観察結果
(全 6 頁)

Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

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

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		5/20	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	
		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	0	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	29	0	25	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	39	39	64	64	—
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	9	0	0	0	19	0	0	17	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	9	28	28	28	45	45	45	45	45	45
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	12	0	0	18	20	0	27	0	13	3	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	30	50	50	77	77	90	93	93	93
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	0	15	0	0	20	0	0	0	0	12	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	35	35	35	35	35	47	47	47	47
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	13	0	0	11	0	25	0	0	16	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	24	24	49	49	49	65	65	65	65
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	0	14	0	0	16	0	3	23	0	22	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	30	30	33	56	56	78	78	78	78
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	0	13	0	0	19	0	25	0	2	20	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	32	32	57	57	59	79	79	79	79
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	0	16	0	0	16	0	0	27	18	23	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	32	32	32	59	77	100	100	100	100
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	0	8	0	0	22	11	0	4	0	0	5	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	30	41	41	45	45	45	50	50	50	50
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	0	12	0	0	1	0	0	20	10	0	10	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	13	13	13	33	43	43	53	53	53	53
The time (days) to first brood:			1:	— days,			2:	10 days,			3:	11 days,			4:	11 days,			5:	11 days,			
			6:	11 days,			7:	11 days,			8:	11 days,			9:	10 days,			10:	10 days,			

Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

(Chemical Conc. : 1.2 mg/L, Dispersant conc. : 0.0 mg/L)

		Time																					Total
Rep.	Counts	5/20	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	
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	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	16	0	0	33	0	0	34	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	28	28	28	61	61	61	95	95	95
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	0	9	0	0	19	0	0	31	0	0	36	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	28	28	28	59	59	59	95	95	95
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	11	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
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	0	11	0	0	15	0	0	18	0	6	18	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	26	26	26	44	44	50	68	68	68
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	0	0	22	0	0	32	0	0	45	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	54	54	54	99	99	99	99
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	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	28	28	28	28	28	28	28	28
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	9	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	26	26
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	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	2	0	12	3	0	0	22	0	0	24	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	14	17	17	17	39	39	39	63	63	63	63
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	0	0	18	0	0	17	0	0	31	0	0	26	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	35	35	35	66	66	66	92	92	92
The time (days) to first brood:			1:	11 days,			2:	11 days,			3:	10 days,			4:	11 days,			5:	13 days,			
			6:	14 days,			7:	19 days,			8:	>21 days,			9:	10 days,			10:	11 days,			

Appendix 3-3 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

(Chemical Conc.: 1.7 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		5/20 1d	5/21 2d	5/22 3d	5/23 4d	5/24 5d	5/25 6d	5/26 7d	5/27 8d	5/28 9d	5/29 10d	5/30 11d	5/31 12d	6/1 13d	6/2 14d	6/3 15d	6/4 16d	6/5 17d	6/6 18d	6/7 19d	6/8 20d	6/9 21d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
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	0	16	0	0	14	0	0	27	0	0	28	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	30	30	30	57	57	57	85	85	85
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	14	0	14	14	0	0	19	0	0	26	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	28	42	42	42	61	61	61	87	87	87	87
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	11	0	0	0	0	0	22	0	0	32	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	11	33	33	33	65	65	65	65
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	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	0	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	8	9	0	15	0	0	19	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	12	21	21	36	36	36	55	--	--	--
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	0	15	8	10	18	0	28	0	0	36	1	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	23	33	51	51	79	79	79	115	116	116	116
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	0	0	0	0	11	0	0	0	0	23	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	34	34	34	34
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	0	0	7	0	0	18	0	0	30	0	0	39	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	25	25	25	55	55	55	94	94	94
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	0	3	0	0	6	0	0	17	0	1	13	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	9	9	9	26	26	27	40	40	40	40
The time (days) to first brood:			1:	- days,			2:	11 days,			3:	10 days,			4:	10 days,			5:	- days,			
			6:	- days,			7:	11 days,			8:	14 days,			9:	11 days,			10:	10 days,			

Appendix 3-4 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

(Chemical Conc.: 2.7 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		5/20	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	
		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	9	0	0	9	0	7	9	0	0	1	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	9	9	9	18	18	25	34	34	34	35	35	35	35	35	35
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	0	14	0	8	0	0	0	0	0	22	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	22	22	22	22	22	22	44	44	44	44
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	4	0	0	24	0	0	23	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	28	28	28	51	51	51	51	51	51
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	17	0	0	21	0	0	10	0	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	38	38	38	48	48	48	48	48	48	48
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	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
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	2	12	0	23	4	0	0	0	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	14	14	37	41	41	41	41	41	41	41	41	41
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	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
8	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	14	0	0	24	0	0	4	0	0	0	0	—	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	38	38	38	42	42	42	42	42	—	—
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	0	0	10	0	13	0	0	34	0	0	0	0	—	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	23	23	23	57	57	57	57	57	57	57
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	0	0	11	0	0	25	0	0	32	0	0	14	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	36	36	36	68	68	68	82	82	82
The time (days) to first brood:			1:	7 days,			2:	11 days,			3:	11 days,			4:	10 days,			5:	10 days,			
				6:	10 days,			7:	15 days,			8:	- days,			9:	11 days,			10:	11 days,		

Appendix 3-5 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

(Chemical Conc.: 6.5 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		5/20 1d	5/21 2d	5/22 3d	5/23 4d	5/24 5d	5/25 6d	5/26 7d	5/27 8d	5/28 9d	5/29 10d	5/30 11d	5/31 12d	6/1 13d	6/2 14d	6/3 15d	6/4 16d	6/5 17d	6/6 18d	6/7 19d	6/8 20d	6/9 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	11	0	0	0	9	0	0	0	0	18	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	20	20	20	20	20	38	38	38	38
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	8	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	8	8	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
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	5	0	1	7	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	5	5	6	13	13	13	18	18	18	18	18	18	18	18	18
5	P generation	Live	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
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	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
8	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	5	3	0	18	4	0	0	0	0	0	0	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	8	26	30	30	30	30	30	30	30	--	--
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	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
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	11	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	11	11	11	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
The time (days) to first brood:			1:	10 days,			2:	8 days,			3:	- days,			4:	8 days,			5:	- days,			
			6:	- days,			7:	10 days,			8:	- days,			9:	14 days,			10:	8 days,			

Appendix 3-6 Result of Reproduction Test

(Test Chemical: 2-Mercaptoacetic acid)

(Chemical Conc.: 24.2 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L)

			Time																								
Rep.	Counts		5/20	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	Total			
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	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
3	P generation	Live	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
4	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	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
5	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	0	---	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	0	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---			
8	P generation	Live	1	1	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	F1 generation	Live	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
9	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	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---			
The time (days) to first brood:			1:	-				2:	-				3:	-				4:	-				5:	-			
			6:	-				7:	-				8:	-				9:	-				10:	-			