

最 終 報 告 書

クロロジフルオロメタン（被験物質番号 K-905）の微生物による分解度試験

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 試験期間	3
7. 試験関係者	3
8. 最終報告書の承認	3
9. 被 験 物 質	4
10. 分解度試験の実施	5
11. 試験結果	12
12. 考 察	13
13. 試資料の保管	16
14. 備 考	16
15. 表及び図の内容	17
付 表	
付 図	

要 約

1. 試験の表題

クロロジフルオロメタン（被験物質番号 K-905）の微生物による分解度試験

2. 分解度試験

OECD化学品テストガイドライン 301D Closed Bottle試験に準ずる。

2.1 試験条件

- (1) 被験物質濃度 1.69及び4.18 mg/l
- (2) 活性汚泥濃度 1滴/l
- (3) 試験液量 125 ml
- (4) 試験液培養温度 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- (5) 試験液培養期間 28日間

2.2 測定及び分析

生物化学的酸素要求量（BOD）の測定

3. 試験結果

	被験物質濃度	
	1.69 mg/l	4.18 mg/l
BODによる分解度	0%	0%

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下で安定であることを確認した。

最 終 報 告 書

試験番号 20905

1. 表 題 クロロジフルオロメタン（被験物質番号 K-905）の微生物による分解度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
住 所 （〒100）東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 試験施設 名 称 財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所
住 所 （〒830）福岡県久留米市中央町19-14
TEL （0942）34-1500
運営管理者 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 被験物質K-905の微生物による分解性の程度について知見を得る。
5. 試験方法 OECD化学品テストガイドライン 301D Closed Bottle試験に準ずる。

6. 試験期間

- (1) 試験開始日 平成元年12月 1日
- (2) 試験実施期間
試験液培養開始日 平成 2年 3月28日
試験液培養終了日 平成 2年 4月25日
- (3) 試験終了日 平成 2年 6月20日

7. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

試資料管理部門責任者

最終報告書作成者

平成 2年 6月20日

8. 最終報告書の承認

試験責任者

平成 2年 6月20日
氏名 _____

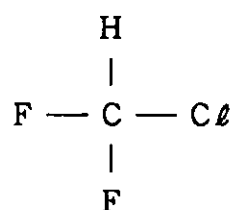
9. 被 験 物 質

本報告書において被験物質K-905は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

9.1 名 称 クロロジフルオロメタン

9.2 構造式等

構造式



分子式 CHClF_2

分子量 86.47

9.3 純 度^{*1} 99.9mol% (ℓ)

*1 XXXXXXXXXX 添付資料による。

9.4 入手先、商品名及びロット番号

- (1) 入 手 先 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- (2) 商 品 名 XXXXXXXXXX
- (3) ロット番号 E90・0643・00

9.5 同 定

赤外吸収スペクトル (図-7 参照) 及び質量スペクトル (図-8 参照) により構造を確認した。

9.6 保管条件及び保管条件下での安定性

- (1) 保管条件 冷暗所
- (2) 安定性確認 試験液培養開始前及び培養終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、両スペクトルが一致することから、保管条件下で安定であることを確認した（図-7 参照）。

10. 分解度試験の実施

10.1 試験の準備

(1) 植種源

採取汚泥	都市下水処理場返送汚泥
採取場所	福岡県久留米市津福下水処理場
採取日	平成 2 年 3 月 28 日
採取日の天候	雨
植種源の調製	上記汚泥をろ紙（No.2）でろ過し、初めの 200 ml を廃棄した。ろ液の残りを曝気して植種源とした。
植種源生菌数	2.0×10^5 個/ml

(2) 無機栄養塩溶液の調製

精製水 1 ℓ に対し、Closed Bottle 試験で定められた溶液 1, 2, 3 及び 4 各 1 ml の割合で添加した。

(3) 植種源を含む無機栄養塩溶液の調製

10.1 (2) で調製した無機栄養塩溶液 1 ℓ 中に先の鋭ったピペットで植種源を 1 滴加えた。

(4) 基準物質

ドデシル硫酸ナトリウムを用いた。

(5) 試験容器

125 ml 容バイアルビンを用いた。

10.2 被験物質添加溶液の調製及び濃度測定

被験物質は室温で気体のため、下記のように被験物質添加溶液を調製し、濃度測定を行い、添加に供した。

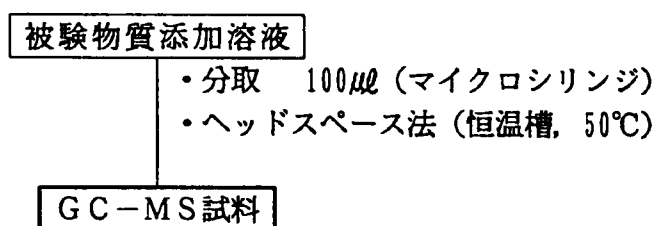
(1) 被験物質添加溶液の調製

真空捕集びんに精製水を入れ、20℃に保つ。アスピレーターで減圧にした後、被験物質を系全体に満たして大気圧と等しくし、被験物質添加溶液を調製した。

(2) 被験物質添加溶液の濃度測定

(1) で調製した被験物質添加溶液 100 μ l を下記のフロースキームに従って前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) 試料 50 μ l を (a) の定量分析条件に基づき、GC-MS により被験物質分析を行った (表-3、図-2 参照)。この結果、被験物質溶液は 3.16 g/l であった。

フロースキーム



(a) 分析機器の定量条件

機 器		ガスクロマトグラフー質量分析計
ガスクロマトグラフ条件		
カラム	担体	1 m×3 mmφ ガラス製 n-オクタン/ポラシルC 100~120 mesh
カラム温度		70℃
試料導入部温度		150℃
キャリアガス		ヘリウム
流量		40 ml/min
注 入 量		50 μl
質量分析計条件		
イオン化電圧		70 eV
セパレーター温度		280℃
イオン源温度		250℃
測定 m/z		51

(b) 検量線の作成

気体状態の被験物質0.25ml [$0.25\text{ml} \times 3.592\text{g/cm}^3$ (蒸気密度) $\times 10^{-3}$
= 0.898mg]、0.5ml (1.795mg)、1.0ml (3.592mg) を真空捕集びん
(1.001ℓ、1.011ℓ、1.005ℓ) に注入して、0.897mg/ℓ、1.776mg/ℓ、
3.572mg/ℓの定濃度ガスを調製した。この定濃度ガスを前記の定量条件に
従ってGC-MSにより分析を行い(ピーク面積に基づき)、検量線を
作成した(図-3参照)。

10.3 試験液の調製

試験液は下記の方法で調製した。

これらの試験液について、10.4の条件で培養を行った。

(1) (無機栄養塩)系

試験容器に無機栄養塩溶液を入れた。

(2) (汚泥ブランク)系

試験容器に植種源を含む無機栄養塩溶液を入れた。

(3) (水+被験物質)系

試験容器に精製水を入れ、10.2で調製した被験物質添加溶液 (3.16 g/l) を80及び 200 μ l添加した (設定被験物質濃度 2 及び 5 mg/l)。

(4) (汚泥+被験物質)系

試験容器に植種源を含む無機栄養塩溶液を入れ、10.2で調製した被験物質添加溶液 (3.16 g/l) を80及び 200 μ l添加した (設定被験物質濃度 2 及び 5 mg/l)。

(5) (汚泥+基準物質)系

試験容器に植種源を含む無機栄養塩溶液を入れ、ドデシル硫酸ナトリウムを2.00 mg/lになるように添加した。

10.4 環境条件

試験液培養装置	インキュベーター
試験液培養温度	20 \pm 1 $^{\circ}$ C
試験液培養期間	28日間
試験液培養方法	暗所に密栓状態で静置

10.5 試験液の測定

(無機栄養塩)系、(汚泥ブランク)系、(汚泥+被験物質)系及び(汚泥+基準物質)系の各試験液について、溶存酸素(DO)を測定し、また、他に準備しておいた(汚泥ブランク)系、(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系については、被験物質を分析した。

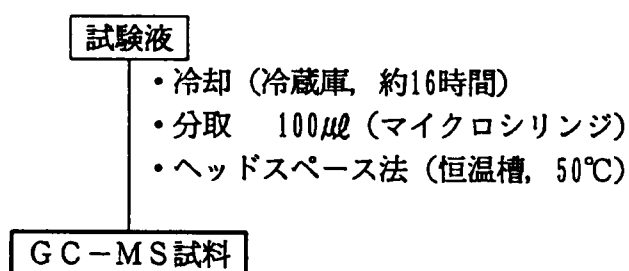
(1) 溶存酸素の測定

0, 5, 15及び28日後にインキュベーターから試験容器を取出し、JIS K 0102-1985 の32.1ウィンクラー・アジ化ナトリウム変法により、溶存酸素を測定した(表-2参照)。

(2) ガスクロマトグラフィー質量分析法による被験物質の分析

開始時に(汚泥ブランク)系、(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の各試験液について下記のフロースキームに従って前処理操作を行い、GC-MS試料を(a)の定量分析条件に基づき、GC-MSにより被験物質分析を行った。

フロースキーム



GC-MS 試料中の被験物質の濃度はデータ処理装置で得られた標準 0.557ng のピーク面積と GC-MS 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（表-4, 5、図-4, 5 参照）。

被験物質の測定限界は、マスフラグメントグラムのノイズレベルを 900（ピーク面積）とし、検量線より 0.03ng とした。

(a) 分析機器の定量条件

機 器	ガスクロマトグラフ-質量分析計
<u>ガスクロマトグラフ条件</u>	
カラム	1m×3mmφ ガラス製
担体	n-オクタン/ポラシルC
	100~120 mesh
カラム温度	70℃
試料導入部温度	150℃
キャリアーガス	ヘリウム
流量	40ml/min
注入量	0.25ml
<u>質量分析計条件</u>	
イオン化電圧	70eV
セパレーター温度	280℃
イオン源温度	250℃
測定 m/z	51

(b) 検量線の作成

気体状態の被験物質 1.3ml [$1.3\text{ml} \times 3.592\text{g/cm}^3$ (蒸気密度) $\times 10^{-3}$ = 4.670mg] を真空捕集びん (1.004ℓ) に注入して、4.651mg/ℓ の定濃度ガスを調製した。この定濃度ガスを 2ml 分取し、真空捕集びん (1.004ℓ) に注入して、9.283μg/ℓ の定濃度ガスを調製した。この定濃度ガス 0.03、0.06、0.12ml を前記の定量条件に従って GC-MS により分析を行い、被験物質絶対量として 0.278、0.557 及び 1.114ng とピーク面積に基づき、検量線を作成した（図-6 参照）。

10.6 分解度の算出

被験物質の分解度は下記の式に基づき算出した。

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD}_x}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD_x : x日後の（汚泥＋被験物質）系の生物化学的酸素要求量
（測定値）（mg）

TOD^{*2} : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的
酸素要求量（計算値）（mg）

*2 純度100%として計算した。

10.7 数値の取扱い

数値を平均する場合、平均は算術平均とした。数値の丸め方は JIS Z 8401-1961に従った。

11. 試験結果

11.1 開始時の被験物質濃度

被験物質は揮発性が大きく、試験開始時の被験物質濃度を設定値どおりに設定することが困難であったため、（水＋被験物質）系及び（汚泥＋被験物質）系の各試験液についてガスクロマトグラフー質量分析法により、開始時の被験物質濃度を測定した（表－４、図－４参照）。結果は下記のとおりであり、BODによる分解度の算出の基礎とした。

(1) 設定 2 mg/l

単位：mg/l

	被 験 物 質 濃 度	平均被験物質濃度
水＋被験物質-1	2.03	1.99
水＋被験物質-2	1.94	
汚泥＋被験物質-1	1.64	1.69
汚泥＋被験物質-2	1.75	

(2) 設定 5 mg/l

単位：mg/l

	被 験 物 質 濃 度	平均被験物質濃度
水＋被験物質-1	4.56	4.38
水＋被験物質-2	4.20	
汚泥＋被験物質-1	4.36	4.18
汚泥＋被験物質-2	4.00	

11.2 分 解 度

BODによる分解度は下表のとおりであった。

	被験物質濃度 (mg/l)	5日後	15日後	28日後
分解度 (%)	1.69	47	5	0
	4.18	7	0	0

11.3 試験条件の確認

BODから求めたドデシル硫酸ナトリウムの28日後の分解度は77%であることから、本試験の試験条件が有効であることを確認した。

12. 考 察

12.1 被験物質の残留率

28日後に被験物質の残留率を測定した（表－5、図－5参照）。結果は下記のとおりであった。

(1) 設定2 mg/ℓ（実測1.69mg/ℓ）

	残留率 (%)	平均残留率 (%)
水＋被験物質-1	115	115
水＋被験物質-2	113	
汚泥＋被験物質-1	116	116
汚泥＋被験物質-2	115	

(2) 設定5 mg/ℓ（実測4.18mg/ℓ）

	残留率 (%)	平均残留率 (%)
水＋被験物質-1	110	112
水＋被験物質-2	112	
汚泥＋被験物質-1	100	99
汚泥＋被験物質-2	98	

12.2 被験物質の揮発性について

被験物質は揮発性が予想されるので、揮発性物質用培養びんによる保持試験を実施して試験液中の被験物質の保持率を測定した。その結果を表－Aに示す。

表－A 保持試験結果

容 器	保持量 (mg)	保持率 (%)	平均保持率 (%)
揮発性物質用培養びん-1	8.3	27	28
揮発性物質用培養びん-2	8.6	29	

以上の結果、揮発性物質用培養びんを用いても試験液中の被験物質の保持は低く、被験物質は揮発したと考えられる。

よって、被験物質の閉鎖系酸素消費量測定装置による分解度試験の実施は不適当と判断して、OECD化学品テストガイドライン 301D Closed Bottle法による分解度試験を実施した。
なお、保持試験の条件は次のとおりである。

(1) 試験条件

被験物質濃度	100 mg/ℓ
試験液量	300 ml
試験温度	25±1℃
試験期間	28日間

(2) 被験物質の分析

ガスクロマトグラフー質量分析法（GC－MS）による被験物質の分析
GC－MS条件は 10.5 (2) に準じた。

12.3 1.69mg/ℓ濃度区における5日目の分解度について

BOD滴定値と溶存酸素量(DO)値を以下に示した。

単位 (ml)

濃度区	滴 定 値 (靑ブランク引き)		溶存酸素量 (DO)	
	1.69mg/ℓ	4.18mg/ℓ	1.69mg/ℓ	4.18mg/ℓ
5日目	0.225	0.075	8.82	9.06
15日目	0.085	0	8.82	9.06
28日目	0	0	8.72	8.74

この表より、滴定値は経時的、かつ、濃度区間の比較においても差がみられなかった。5日目の2濃度区の滴定値の差が0.15mlであるが、BODに換算した場合、0.2mgO₂/ℓの差となる。1.69mg/ℓの濃度の場合、TOD(酸素要求量)が0.78mg/ℓと低いため、この値(0.2mgO₂/ℓ)が分解度を算出する上で大きく影響し、誤差を生じたものと考えられる。

13. 試資料の保管

13.1 被験物質

保管用被験物質約5gを保管用容器に入れ密栓後、「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」（以下「試験施設基準」という。）第32条に定める期間、当試験所試料保管室に保管する。

13.2 生データ、資料等

試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ、調査表、資料等は最終報告書と共に、「試験施設基準」第32条に定める期間、当試験所資料保管室に保管する。

14. 備 考

14.1 試験に使用した機器、特殊器具及び試薬

機器

インキュベーター	:	サンヨー電気製	型 MIR-550
ガスクロマトグラフィー質量分析計	:	島津製作所製	型 GCMS-QP1000

特殊器具

バイアルビン (125 ml)	:	ガスクロ工業製
真空捕集びん (100 ml)	:	草野科学器械製
真空捕集びん (1 l)	:	ガスクロ工業製

試薬

精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
ドデシル硫酸ナトリウム	:	東京化成工業製	試薬特級 ロット番号AZ01
アジ化ナトリウム	:	片山化学工業製	公害分析用
よう化カリウム	:	片山化学工業製	試薬特級
水酸化カリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
硫酸マンガン	:	和光純薬工業製	試薬特級
硫酸	:	和光純薬工業製	試薬特級

図-1 分解度曲線 (分解度 VS 培養期間)

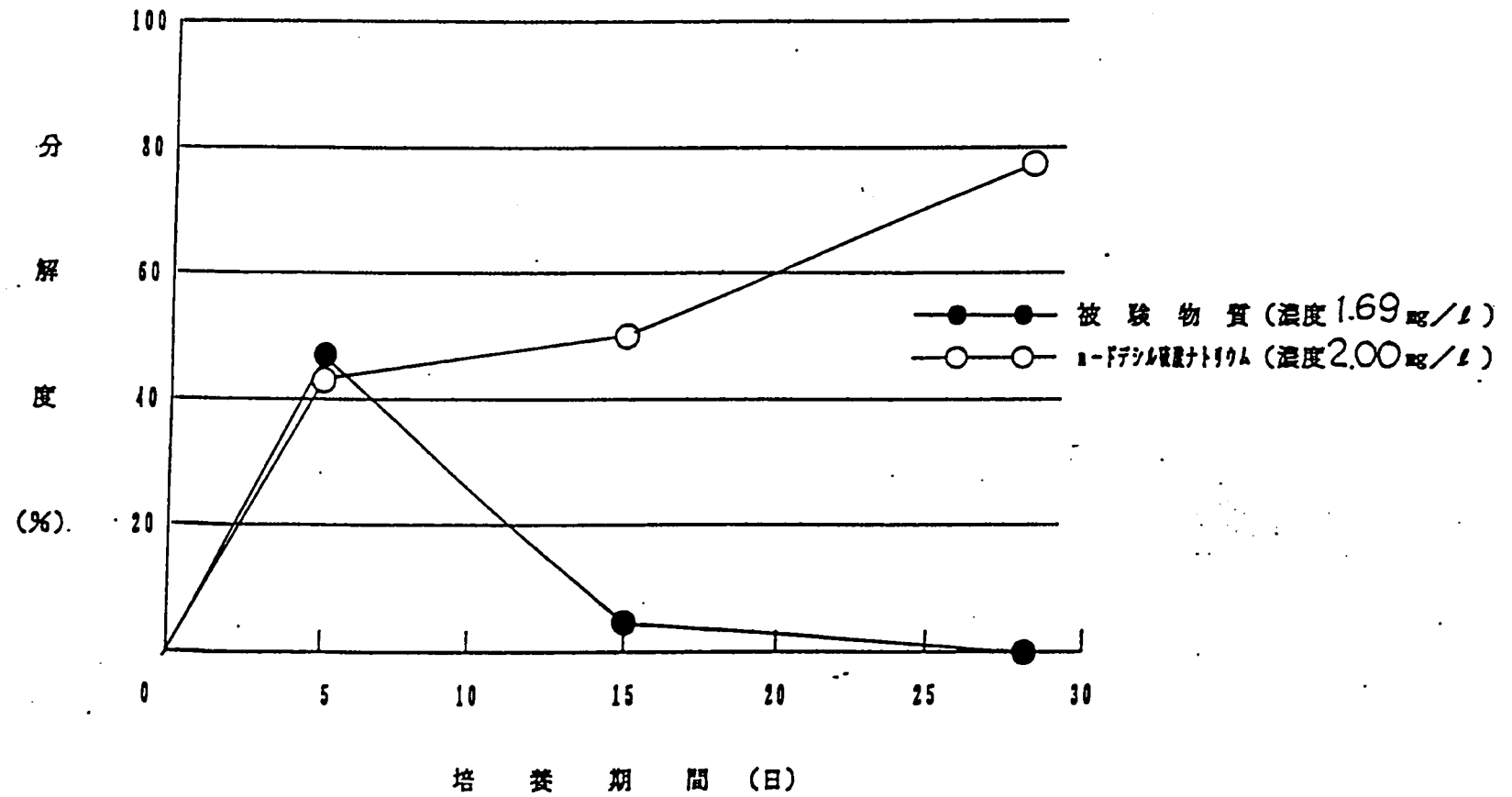


図-1 分解度曲線 (分解度 VS 培養期間)

