

最 終 報 告 書

クロトンアルデヒド（被験物質番号 K-538）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九州試験所

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. 最終報告書作成日	3
9. 最終報告書の承認	3
10. 被験物質	4
11. 活性汚泥の調製	6
12. 分解度試験の実施	7
13. 試験結果	12
14. 考 察	13
15. 試資料の保管	16
16. 備 考	16
17. 表及び図の内容	17
付 表	
付 図	
参考資料	

要 約

1. 試験の表題 クロトンアルデヒド（被験物質番号 K-538）の微生物による分解度試験

2. 分解度試験

2.1 試験条件

- (1) 被験物質濃度 100 mg/l
- (2) 活性汚泥濃度 30 mg/l (懸濁物質濃度として)
- (3) 試験液量 300 ml
- (4) 試験液培養温度 25 ± 1 °C
- (5) 試験液培養期間 28 日間

2.2 測定及び分析

- (1) 全有機炭素計 (TOC) による溶存有機炭素の分析
- (2) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による被験物質及び変化物 (クロトン酸) の分析

3. 試験結果

- (1) T O C 法 による 分解 度 89%, 39%, (83%), (80%)
- (2) H P L C 法 による 分解 度 100%, 100%, (100%), (100%)
- (3) H P L C 法 による 変化 物 の 生成 率 0%, 42%, (0%), (0%)

() 内の数値は培養開始1日後、pHを7.0に調整した結果を示す。

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 20538

1. 表 題 クロトンアルデヒド(被験物質番号 K-538)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九州試験所
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-538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 「新規化学物質に係る試験の方法について」(環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号 昭和49年7月13日)に規定する〈微生物等による化学物質の分解度試験〉に準ずる。

6. 試験期間

(1) 試験開始日 昭和61年10月20日

(2) 試験実施期間

活性汚泥使用開始日 昭和61年 8月21日

試験液培養開始日 昭和61年10月22日

試験液培養終了日 昭和61年11月19日

(3) 試験終了日 昭和62年12月16日

7. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

活性汚泥管理責任者

試資料管理責任者

8. 最終報告書作成日

昭和62年12月16日

作成者 _____

9. 最終報告書の承認

昭和62年12月16日

試験責任者

氏名 _____

10. 被験物質

本報告書において被験物質K-538は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 クロトンアルデヒド

10.2 構造式等

構造式 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCHO}$

分子式 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$

分子量 70.09

10.3 純 度^{*1} 99.8%

*1 添付資料による。

10.4 入手先及びロット番号

(1) 入 手 先 [REDACTED] ([REDACTED] 試薬)

(2) ロット番号 AU01

10.5 同 定

に記載の赤外吸収スペクトルと当試験所の当該測定スペクトルとが一致することを確認した。

10.6 物理化学的性状

外 観 無色透明液体

融 点^{*2} -76.5℃

沸 点^{*2} 104.0℃

比 重^{*1} d_{20}^{20} 0.8532

溶解性 水 100 g/ℓ以上

ヘキサン 100 g/ℓ以上

クロロホルム 100 g/ℓ以上

酢酸エチル 100 g/ℓ以上

メタノール 100 g/ℓ以上

分配係数 (n-オクタノール/水)

$\log Pow = 0.22$ (参考資料-1 参照)

赤外吸収スペクトル (図-6 参照)

質量スペクトル (図-7 参照)

核磁気共鳴スペクトル (図-8 参照)

紫外吸収スペクトル (図-9 参照)

*1 添付資料による。

*2 (10th Ed.)による。

10.7 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た結果(図-6 参照)、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した。

11. 活性汚泥の調製

11.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 下記の全国10ヵ所から採集した。

伏古川処理場（北海道札幌市）	深芝処理場（茨城県鹿島郡）
中浜処理場（大阪府大阪市）	落合処理場（東京都新宿区）
北上川（宮城県石巻市）	信濃川（新潟県西蒲原郡）
吉野川（徳島県徳島市）	琵琶湖（滋賀県大津市）
広島湾（広島県広島市）	洞海湾（福岡県北九州市）

(2) 時 期 昭和61年 9月

11.2 採集方法

(1) 都 市 下 水 下水処理場の返送汚泥

(2) 河川、湖沼及び海 表層水及び大気と接触している波打際の表土

11.3 新旧汚泥の混合

上記で採集してきた各地の汚泥のろ液をそれぞれ 500ml と、それまで試験に供していた旧活性汚泥のろ液 5ℓ とを混合して 10ℓ とし、pH を 7 ± 1 に調整して培養槽でばっ気^{*3}した。

*3 ばっ気

屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

11.4 培 養

培養槽へのばっ気を約30分間止めた後、全量の約 1/3 量の上澄液を除去し、これと等量の 0.1% 合成下水^{*4}を加えて再びばっ気した。この操作を毎日 1 回繰り返し、培養して活性汚泥とした。培養温度は $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ とした。

*4 0.1% 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸一カリウムをそれぞれ 0.1(W/V) % になるように脱塩素水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7 ± 1 に調整したものをを用いた。

11.5 管理及び使用

培養中、上澄液の外観及び活性汚泥の生成状態を観察するとともに、活性汚泥の沈殿性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し記録した。活性汚泥の生物相は適宜光学顕微鏡を用いて観察し、異常のないことを確認した上で試験に供した。

12. 分解度試験の実施

12.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 JIS K 0102-1985 の14.1に準じて行った。

測定実施日 昭和61年10月20日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は6900mg/lであった。

(2) 基礎培養基の調製

JIS K 0102-1985 の21. で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ3mlに精製水（高杉製薬製 日本薬局方）を加えて1ℓとする割合で混合し、pHを7.0に調整した。

12.2 試験液の調製

試験容器を7個用意し、試験液を下記の方法で調製した。

これらの試験液について、12.3の条件で培養を行った。

(1) 被験物質の添加

(a) (水+被験物質)系(2個)

試験容器に精製水 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるように添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(4個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるように添加した。

(2) 活性汚泥の接種

(b) 及び汚泥ブランク系(試験容器に基礎培養基のみ 300mlを入れたもの 1個)の試験容器に11.の条件で調製した活性汚泥を懸濁物質濃度として 30mg/lになるように接種した。なお、(b)のうち2個は接種1日後、pHを 7.0に調整した。

12.3 試験液培養装置及び環境条件

(1) 試験液培養装置

試験容器	300ml用培養ビン
攪拌方法	マグネチックスターラーによる回転攪拌

(2) 環境条件

試験液培養温度	25±1℃
試験液培養期間	28日間
実施場所	環境調節室

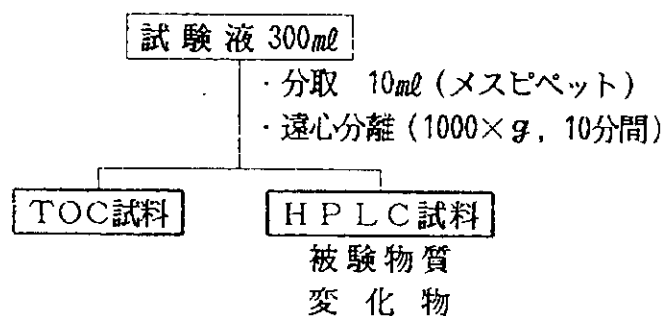
12.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素、被験物質及び変化物（クロトン酸）を分析した。

(1) 試験液の前処理

試験液培養期間終了後、（水＋被験物質）系、（汚泥＋被験物質）系及び汚泥ブランク系の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、溶存有機炭素を分析するための全有機炭素計（TOC）試料とし、被験物質及び変化物を分析するための高速液体クロマトグラフ（HPLC）試料とした。

フロースキーム



(2) 全有機炭素計による溶存有機炭素の分析

前処理を行って得られたTOC試料について下記定量条件に基づき溶存有機炭素を分析した。

試験液の溶存有機炭素は記録紙上から得られたTOC標準溶液80.0mgC/lのピーク高さとTOC試料のピーク高さとを比較し、比例計算して求めた（表-1、図-1参照）。なお、TOC標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解して調製した。

ピーク高さの測定限界はノイズレベルを考慮して2mm（溶存有機炭素濃度1mgC/l）とした。

定量条件

機	器	島津製作所製	TOC-10B
T C 炉	温度	900	℃
流	量	200	ml/分

(3) 高速液体クロマトグラフによる被験物質及び変化物（クロトン酸）の分析

前処理を行って得られたHPLC試料について下記定量条件に基づき被験物質及び変化物を分析した。HPLC試料中の被験物質及び変化物の濃度はクロマトグラム上で得られた標準溶液 100mg/lのピーク高さとはHPLC試料のピーク高さとはを比較し、比例計算して求めた（表-2, 3、図-2, 3参照）。

ピーク高さの測定限界はノイズレベルを考慮して2mm（被験物質濃度 1.5mg/l及び変化物濃度 1.3mg/l）とした。

(a) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ		日本ウォーターズ社製 6000A
検出器		日本分光工業製 UVIDEC-Ⅲ
カラム		ERC-ODS-1151 5cm×6mmφ, ステンレス製
溶離液		メタノール/水(0.005mol/l臭化テトラ-n-ブチルアンモニウム、りん酸でpH 3に調整) (2/8 V/V)
測定波長		226 nm (図-9参照)

(b) 検量線の作成

被験物質 100.0mgを精製水に溶解し、100mlに定容して1000mg/lの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して25.0、50.0及び 100mg/lの標準溶液とした。この標準溶液を前記の定量条件に従ってHPLC分析を行い、それぞれのピーク高さとは濃度とはに基づき検量線を作成した（図-4参照）。また、クロトン酸についても同様に検量線を作成した（図-5参照）。

12.5 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、小数点以下1ケタ目を丸めて整数位で表示した。

(1) TOC法による分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{DOC}_B - \text{DOC}_A}{\text{DOC}_B} \times 100$$

DOC_A : (汚泥+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

DOC_B : (水+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

(2) HPLC法による分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100$$

S_A : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量
(測定値) (mg)

S_B : (水+被験物質)系における被験物質の残留量
(測定値) (mg)

12.6 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。

13. 試験結果

13.1 試験液の状況

培養期間中の試験液の状況は下記のとおりであった。

	試 験 液	状 況	p H
培養開始時	(水+被験物質)系	被験物質は水に溶解した。	① 5.5 ② 5.4
	(汚泥+被験物質)系	被験物質は水に溶解した。	① 7.0 ② 7.0 ③ 7.0(5.0) → 7.0 ④ 7.0(5.4) → 7.0
培養終了時	(水+被験物質)系	試験液は無色透明であった。	① 5.9 ② 5.5
	(汚泥+被験物質)系	試験液は無色透明であった。 汚泥の増殖が見られた。	① 6.1 ② 4.6 ③ 7.0 ④ 7.0

(汚泥+被験物質)系の③、④については培養開始1日後、pHを7.0に調整した。

()内の数値は、調整前のpHを示す。

13.2 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分 解 度 (%)				付 表
	①	②	③	④	
TOC法による結果	89	39	83	80	表-1
HPLC法による結果	100	100	100	100	表-2

14. 考 察

14.1 ソーダライムの影響

ソーダライムに対する安定性試験の結果、被験物質はソーダライムの存在下で残留率が低く、かつソーダライムが黄色に着色したことから、ソーダライムと反応するものと考えられる（下表参照）。このため、炭酸ガス吸収剤としてソーダライムを用いる閉鎖系酸素消費量測定装置によるBOD測定は不可能と判断し、DOC及びHPLC分析による直接定量法により分解度を算出した。

対ソーダライム安定性試験結果（28日間）

	DOC		H P L C	
	残留量 (mgC)	残留率 (%)	残留量 (mg)	残留率 (%)
（水＋被験物質）系-1 開放系ソーダライム	13.1	64	8.5	28
（水＋被験物質）系-2 開放系ソーダライム	9.6	47	3.4	11
（水＋被験物質）系-1 開放系	20.7	100	30.5	102
（水＋被験物質）系-2 開放系	20.8	101	29.2	97
（水＋被験物質）系-1 密閉系	20.2	98	28.7	96
（水＋被験物質）系-2 密閉系	20.2	98	28.7	96
理 論 値	20.6		30.0	

14.2 直接定量法による分解度試験結果（DOC及びHPLC分析による）

(1) 被験物質の変化

培養開始1日後、（水＋被験物質）系においてpH変化はなかったが、（汚泥＋被験物質）系においてはpHの著しい低下がみられた。基礎培養基のみに被験物質を添加した場合は、pH変化がなかったことから、被験物質は汚泥により酸化され、次式のようにクロトン酸（官報公示整理番号 2-963）を生成したものと考えられる。



28日後の分析結果を次表に示す。

28日後分析結果

単位：％

	pH			DOC 残留率	HPLC		
	0日	1日	28日		被験物質 残 留 率 (A)	クロトン 酸生成率 (B)	(A)+(B)
(水＋被験物質)-1	5.5	5.5	5.9	100	102	0	102
(水＋被験物質)-2	5.4	5.4	5.5	101	97	0	97
① (汚泥＋被験物質)-1	7.0	6.1	6.1	11	0	0	0
② (汚泥＋被験物質)-2	7.0	5.5	4.6	61	0	42	42
③ (汚泥＋被験物質)-3 ^{*4}	7.0	5.0 (7.0)	7.0	17	0	0	0
④ (汚泥＋被験物質)-4 ^{*4}	7.0	5.4 (7.0)	7.0	20	0	0	0

*4 培養開始1日後、pHを7.0に調整

(2) pHによる影響

28日後の分析結果より、培養開始1日後にpHを調整した系(③, ④)では2点とも被験物質及びクロトン酸は検出されず、DOCからも80%以上の分解度を示した。一方、pH調整をしなかった系(①, ②)では1点(②)においてクロトン酸が検出され、結果にばらつきがみられた。このことは、生成したクロトン酸によりpHが下がり、污泥の活性に影響を与えたためと考えられる。

(3) クロトン酸の生分解性について

生成したクロトン酸について、閉鎖系酸素消費量測定装置を用い、微生物による分解度試験を行った結果、クロトン酸は生分解された。結果を次表に示す(参考資料-2参照)。

28日後の分解度		単位: %	
	B O D	D O C	HPLC
(污泥+被験物質)-1	88	92	100
(污泥+被験物質)-2	75	95	100
(污泥+被験物質)-3	83	92	100

(4) まとめ

以上のことから、被験物質は(污泥+被験物質)系でクロトン酸に変化するが、pHを中性付近に調整し、污泥の活性を維持することにより、生成したクロトン酸は生分解されるものと考えられる。

15. 試資料の保管

15.1 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及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4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。

15.2 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、試験計画書、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。

16. 備考

16.1 試験に使用した機器及び装置

全有機炭素計	:	9頁参照
高速液体クロマトグラフ	:	10頁参照
天びん	:	Sartorius社製 2007 MP6
pH計	:	東亜電波工業製 HM-20E
紫外可視分光光度計	:	日立製作所製 200-20

16.2 分析に使用した試薬

フタル酸水素カリウム	:	和光純薬工業製 試薬特級
メタノール	:	和光純薬工業製 HPLC用
精製水	:	高杉製薬製 日本薬局方
臭化テトラ－n－ブチルアンモニウム	:	半井化学薬品製
りん酸	:	和光純薬工業製 試薬特級
クロトン酸	:	東京化成工業製 試薬特級