

最終報告書

ギ酸（被験物質番号 K-1099）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

陳 述 書

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

試験委託者 通商産業省

試験の表題 ギ酸（被験物質番号 K-1099）の微生物による分解度試験

試験番号 21099

上記試験は、「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ついて」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「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」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成 5 年 6 月 10 日

運営管理者 

信頼性保証書

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

試験委託者 通商産業省

試験の表題 ギ酸（被験物質番号 K-1099）の微生物による分解度試験

試験番号 21099

上記試験は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の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った日付並びに運営管理者及び試験責任者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察日	報告日（運営管理者）	報告日（試験責任者）
平成 5年 3月 2日	平成 5年 3月 2日	平成 5年 3月 2日
平成 5年 3月 3日	平成 5年 3月 3日	平成 5年 3月 3日
平成 5年 3月10日	平成 5年 3月18日	平成 5年 3月18日
平成 5年 3月17日	平成 5年 3月18日	平成 5年 3月18日
平成 5年 6月10日	平成 5年 6月10日	平成 5年 6月10日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び標準操作手順に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

平成 5年 6月10日
信頼性保証業務担当者

平成 5年 6月10日
信頼性保証業務担当者

平成 5年 6月10日
信頼性保証部門責任者

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. 優良試験所基準への適合	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書作成日	3
10. 最終報告書の承認	3
11. 被験物質	4
12. 活性汚泥の調製	5
13. 分解度試験の実施	7
14. 試験条件の確認	13
15. 試験結果	13
16. 試資料の保管	15
17. 備 考	16
18. 表及び図の内容	17

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

ギ酸（被験物質番号 K-1099）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 14日間

2.2 測定及び分析

- (1) 閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素要求量（BOD）の測定
- (2) 全有機炭素分析法（TOC）による溶存有機炭素の分析
- (3) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による被験物質の分析

3. 試験結果

- (1) BODによる分解度 108%, 113%, 110%
- (2) TOCによる分解度 100%, 100%, 100%
- (3) HPLCによる分解度 100%, 100%, 100%

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。

7. 試験期間

- (1) 試験開始日 平成 5年 3月 2日
(2) 試験液培養開始日 平成 5年 3月 3日
(3) 試験液培養終了日 平成 5年 3月 17日
(4) 試験終了日 平成 5年 5月 26日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

活性汚泥管理責任者

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書作成日

平成 5年 5月 26日
作成者 _____

10. 最終報告書の承認

試験責任者

平成 5年 5月 26日
氏名 _____

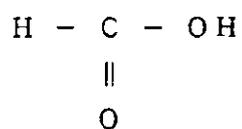
11. 被験物質

本報告書においてK-1099は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 ギ酸

11.2 構造式等

構造式



分子式 CH_2O_2

分子量 46.03

11.3 純 度^{*1} 98.9%

11.4 入手先、等級及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先

(2) 等 級

(3) ロット番号 TWG3753

*1 入手先添付資料による。

11.5 被験物質の確認

に記載の赤外吸収スペクトルと当研究所の当該測定スペクトルとが一致することを確認した（図-5参照）。また、質量スペクトル（図-6参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図-7参照）についても測定を行い、構造を確認した。

11.6 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-5参照）。

12. 活性汚泥の調製

12.1 汚泥の採集場所及び時期

- (1) 場 所 以下の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 平成 4年12月

12.2 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

12.3 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 7.0 ± 1.0 に調整して培養槽でばっ気^{*2}した。

*2 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。

12.4 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た。

これと等量の脱塩素水を加えて再びばっ気し、上澄交換液部の濃度が 0.1% になるように合成下水^{*3}を加えた。この操作を毎日 1 回繰り返して、培養して活性汚泥とした。培養温度は 25 ± 2 °C とした。

*3 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 5 (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 7.0 ± 1.0 に調整したものを用いた。

12.5 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、活性汚泥の沈でん性、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。

12.6 活性汚泥の活性度の点検及び使用開始日

(1) 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて活性汚泥使用開始前に活性度を点検した。また、旧活性汚泥との関連性に留意した。

(2) 活性汚泥使用開始日 平成 5年 1月19日

13. 分解度試験の実施

13.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 「工場排水試験方法、懸濁物質」(JIS K 0102-1986 の 14.1) に準じて行った。

測定実施日 平成 5年 3月 1日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は5600mg/lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法、生物化学的酸素消費量」(JIS K 0102-1986 の 21.) で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ3mlに精製水を加えて1ℓとする割合で混合した。

(3) 基準物質

アニリン(昭和化学製 試薬特級 ロット番号 SC-2726)を用いた。

13.2 試験液の調製

試験容器を6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、13.3の条件で培養を行った。

(1) 被験物質及びアニリンの添加

(a) (水+被験物質)系 (1個, 試験容器①)

試験容器に精製水 297mlを入れ、被験物質が 100mg/lになるように 10g/lの被験物質水溶液を 3ml添加してpHを測定した。

(b) (汚泥+被験物質)系 (3個, 試験容器②③④)

試験容器に基礎培養基 297mlを入れ、被験物質が 100mg/lになるように 10g/lの被験物質水溶液を 3ml添加してpHを測定し、pHを 7.0±0.2に調整した。

(c) (汚泥+アニリン)系 (1個, 試験容器⑤)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、pHを 7.0に調整し、アニリンを 100mg/lになるようにマイクロシリンジで29.5μl (30mg)分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系 (1個, 試験容器⑥)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、pHを 7.0に調整した。

(2) 活性汚泥の接種

(b), (c) 及び (d) の試験液に12. 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。

13.3 試験液培養装置及び環境条件

(1) 試験液培養装置

閉鎖系酸素消費量測定装置 (大倉電気製 クーロメーター)
(旭計器工業製 データ処理装置)

試験容器 300ml用培養ビン

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, Na1 (和光純薬工業製 試薬一級)

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 °C
試験液培養期間	14日間
実施場所	511クーロ室

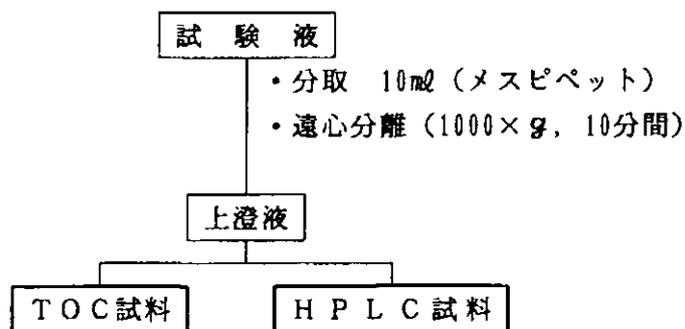
13.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素及び被験物質を分析した。なお、(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の試験液のpHを測定した。

13.4.1 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以下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(DOC)を分析するための全有機炭素分析法(TOC)試料とし、被験物質を分析するための高速液体クロマトグラフィー(HPLC)試料とした。

フロースキーム



13.4.2 定量分析

(1) 全有機炭素分析法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分析条件に基づきDOCを分析した。

試験液のDOC濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、全炭素(TC)標準溶液40.0mgC/l及び無機炭素(IC)標準溶液40.0mgC/lのピーク面積を測定してそれぞれの検量線を設定し、TOC試料のDOCを測定した(表-2参照)。なお、TC標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解し、IC標準溶液は炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムを精製水に溶解して調製した。

ピーク面積の検出下限は、ノイズレベルを考慮して350 digit(TC濃度1.4mgC/l, IC濃度1.4mgC/l)とした。

分析機器の定量条件

機	器	全有機炭素計
		島津製作所製 TOC-500
T C	炉 温 度	6 8 0 °C
I C	炉 温 度	1 5 0 °C
流	量	1 5 0 m l / m i n
注	入 量	1 0 μ
感	度	レンジ 3

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる被験物質の分析

前処理を行って得られたHPLC試料について下記の定量分析条件に基づき被験物質を分析した。HPLC試料中の被験物質の濃度はクロマトグラム上で得られた標準溶液 100mg/lのピーク面積とHPLC試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた(表-3、図-2参照)。

ピーク面積の検出下限は、ノイズレベルを考慮して 150 μ V \cdot sec (被験物質濃度 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	島津製作所製 LC-6A
	検出器	島津製作所製 SPD-6A
カ	ラム	Shodex Ionpak KC-811
		30cm \times 8mm ϕ ステンレス製
溶	離	液
流	量	0.1V/V%りん酸溶液
測	定	波
注	入	長
感	度	210nm(図-4参照)
	検出器	40 μ
	記録計	0.02ABU/FS
		ATTEN 2 ⁰

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

被験物質82 μ l(100mg)を分取し、精製水に溶解して1000mg/lの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して100mg/lの標準溶液とした。

(c) 検量線の作成

(b)の標準溶液調製法と同様にして25.0、50.0及び100mg/lの標準溶液を調製した。これらを(a)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成した(図-3参照)。

13.5 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で表示した。

(1) BODによる分解度

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

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

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素要求量
(測定値) (mg)

TOD^{*4} : 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)

*4 TODの算出は純度100%として計算した。

(2) TOCによる分解度

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

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

(3) HPLCによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_W - S_S}{S_W} \times 100$$

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

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

13.6 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 8202-1985 参考3規則Bに従った。

14. 試験条件の確認

BODから求めたアニリンの7日及び14日後の分解度はそれぞれ60%及び70%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（表-1、図-1参照）。

15. 試験結果

15.1 試験液の状況

試験液の状況は下記のとおりであった。

	試験液	状況	pH
培養開始時	(水 + 被験物質)系	被験物質は溶解した。	① 3.2
	(汚泥 + 被験物質)系	被験物質は溶解した。	② 3.6 → 7.0 ③ 3.6 → 7.0 ④ 3.5 → 7.0
培養終了時	(水 + 被験物質)系	変化は認められなかった。	① 3.2
	(汚泥 + 被験物質)系	汚泥の増殖が見られた。	② 9.2 ③ 9.1 ④ 9.3

15.2 試験液の分析結果

14日後の分析結果は下記のとおりであった。

	(水+被験物質)系	(汚泥+被験物質)系				理論量 (mg)	付 表	付 図
		①	②	③	④			
B O D	(mg)	1.1	11.3	11.9	11.6	10.5	表-1	図-1
D O C 残留	(mg)	8.1	0.0	0.0	0.0	7.8	表-2	/
	*5 (%)	104	0	0	0			
被験物質残留 (H P L C)	(mg)	31.2	0.0	0.0	0.0	30.0	表-3	図-2
	*5 (%)	104	0	0	0			

*5 残留率 (%) は以下の式に基づき算出し、小数点以下1ケタを丸めて整数で表示した。

$$\text{残留率 (\%)} = \frac{\text{残留量 (mg)}}{\text{理論量 (mg)}} \times 100$$

15.3 分解度試験結果

14日後の分解度は下記のとおりであった。

	分 解 度 (%)			付 表
	②	③	④	
B O D による結果	108	113	110	表-1
T O C による結果	100	100	100	表-2
H P L C による結果	100	100	100	表-3

15.4 考 察

本試験のTOC測定において、(汚泥+被験物質)系の試験液中に、12~13mgC/lの無機炭素(IC)が測定された(表-2-3参照)。

このICは、被験物質の分解に伴って試験液のpHがアルカリ側に傾いたため試験液中に残留したと考えられる。

なお、IC残留率[全炭素濃度に対するIC百分率(%)]は下記のとおりであった。

	(汚泥+被験物質)系		
	②	③	④
IC残留率(%)	46	51	48

16. 試資料の保管

16.1 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、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所試料保管室に保管する。

16.2 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、指示書、調査表、資料等は最終報告書と共に、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所資料保管室に保管する。

17. 備 考

17.1 試験に使用した主要な装置・機器

閉鎖系酸素消費量測定装置	:	8頁参照
全有機炭素計	:	10頁参照
高速液体クロマトグラフ	:	11頁参照
天 び ん	:	Sartorius社製 2007 MP6
p H 計	:	東亜電波工業製 HM-50S
紫外可視分光光度計	:	日立製作所製 150-20

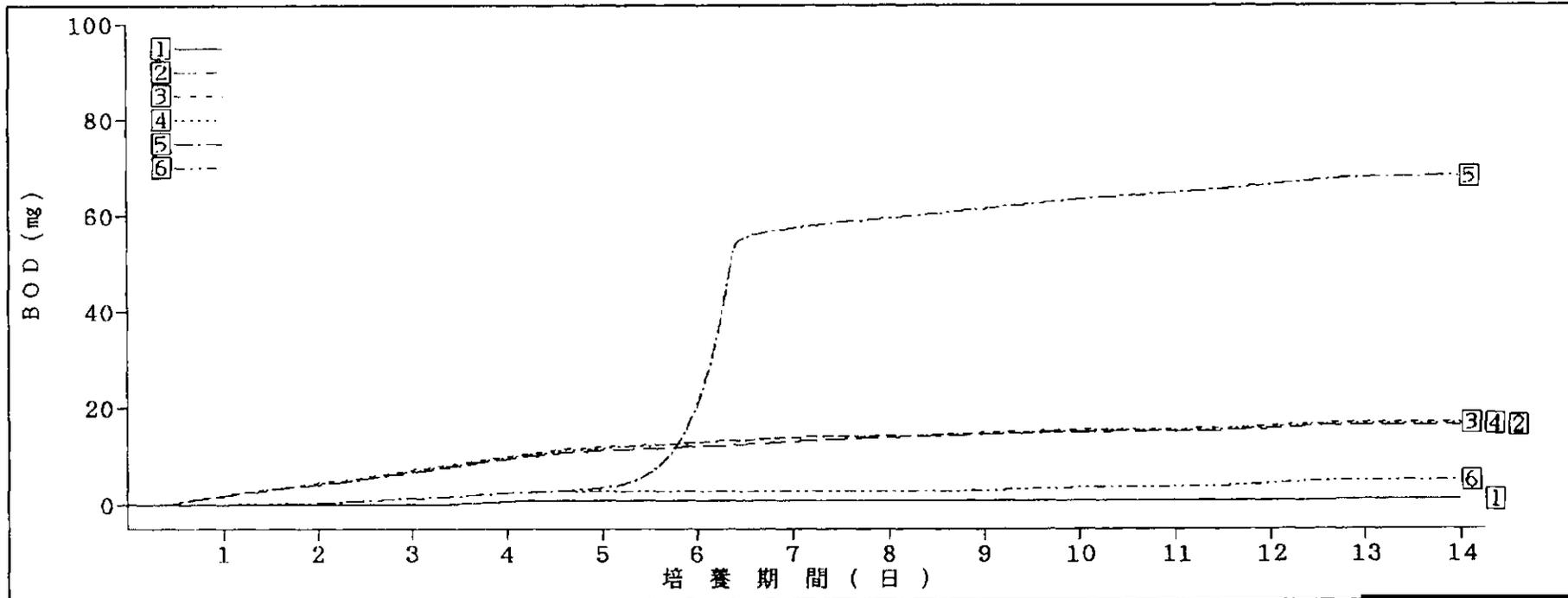
17.2 試験に使用した試薬

フタル酸水素カリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
炭酸水素ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
炭酸ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
りん酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方

図-1 BODチャート

試験番号: 21099 (被験物質: K-1099)
 装置番号: CM-11
 試験条件: 本試験 標準条件
 被験物質濃度: 100 (mg/l)
 活性汚泥濃度: 30 (mg/l)
 培養温度: 25 ± 1°C
 培養期間: 14日 (3/3~3/17, 1993)
 備考:

試料名	BOD (mg)			
	7日	14日		
① 水 + 被験物質	1.0	1.1		
② 汚泥 + 被験物質	13.0	16.4		
③ 汚泥 + 被験物質	13.9	17.0		
④ 汚泥 + 被験物質	13.9	16.7		
⑤ 汚泥 + アニリン	57.5	68.3		
⑥ 基礎呼吸	2.9	5.1		



平成5年3月17日 氏名 [REDACTED]