

最終報告書

DL-メチオニン（被験物質番号 K-1823）の微生物による分解度試験

（試験番号：205148）

2008年3月6日

財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に電子化したものです。

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

2008年3月6日

試験責任者



最終報告書

DL-メチオニン（被験物質番号 K-1823）の微生物による分解度試験

（試験番号：205148）

2008年3月6日

財団法人化学物質評価研究機構

水産部環境課

陳 述 書

財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 DL-メチオニン (被験物質番号 K-1823) の微生物による分解度試験

試験番号 205148

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」 (平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号) に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2008 年 3 月 6 日

試 験 責 任 者



信 頼 性 保 証 書

財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 DL-メチオニン（被験物質番号 K-1823）の微生物による分解度試験

試験番号 205148

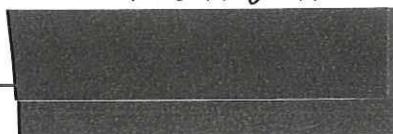
本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2007年10月22日	2007年10月22日
試験計画書	2007年10月23日	2007年10月23日
試験計画書の変更	2007年11月21日	2007年11月21日
培養開始時	2007年10月24日	2007年10月24日
中間時	2007年11月7日	2007年11月7日
培養終了時	2007年11月21日	2007年11月21日
	2007年11月22日	2007年11月26日
生データ、最終報告書草案	2008年3月3日	2008年3月3日
最終報告書	2008年3月6日	2008年3月6日

2008年3月6日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 GLP	1
試験日程	2
試験資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被験物質	4
2. 活性汚泥	6
3. 分解度試験の実施	8
4. 試験条件の確認	18
5. 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	18
6. 試験結果	18
7. 備 考	21

Tables

Table-1	Calculation table for percentage biodegradation by BOD
Table-2	Calculation table for percentage biodegradation by DOC
Table-3	Calculation table for percentage biodegradation of test item
Table-4	Calculation table for percentage production of ammonia nitrogen
Table-5	Calculation table for percentage production of nitrite nitrogen
Table-6	Calculation table for percentage production of nitrate nitrogen

Figures

Fig.1	Chart of BOD
Fig.2-1	Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (test item)
Fig.2-2	Calibration curve of test item
Fig.3-1	Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (ammonia nitrogen)
Fig.3-2	Calibration curve of ammonia nitrogen
Fig.4-1	Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (nitrite nitrogen)
Fig.4-2	Calibration curve of nitrite nitrogen
Fig.5-1	Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (nitrate nitrogen)
Fig.5-2	Calibration curve of nitrate nitrogen
Fig.6	Chromatograms of HPLC analysis for test solution (test item)
Fig.7	Chromatograms of HPLC analysis for test solution (ammonia nitrogen)
Fig.8	Chromatograms of HPLC analysis for test solution (nitrite nitrogen and nitrate nitrogen)
Fig.9	UV spectrum of test item
Fig.10	UV spectrum of sodium nitrite
Fig.11	UV spectrum of sodium nitrate
Fig.12-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig.12-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion
Fig.13	Mass spectrum of test item
Fig.14	NMR spectrum of test item

表 題	DL-メチオニン（被験物質番号 K-1823）の微生物による分解度試験
試験委託者	経済産業省 （〒100-8901）東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
試験施設	財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 （〒839-0801）福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	K-1823の微生物による分解性の程度について知見を得る。
試験法	本試験は以下の試験法に従って行った。 (1) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号）に規定する〈微生物等による化学物質の分解度試験〉 (2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める "Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I) (Guideline 301C, July 17, 1992)" ただし、一部試験法から逸脱した。なお、逸脱の内容については「4. 試験条件の確認」に記した。
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号）に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」 (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

要 約

試験の表題

DL-メチオニン（被験物質番号 K-1823）の微生物による分解度試験

試験条件

(1) 被験物質濃度	100mg/L
(2) 活性汚泥濃度	30mg/L（懸濁物質濃度として）
(3) 試験液量	300mL
(4) 試験液培養温度	25±1℃
(5) 試験液培養期間	28日間（遮光下）

分解度算出のための測定及び分析

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

その他の分析

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の定量分析

試験結果

(1) BOD分解度	72%,	79%,	92%	平均	81%
(2) DOC分解度	78%,	81%,	86%	平均	82%
(3) 被験物質分解度（HPLC）	84%,	89%,	95%	平均	89%

結 論

本試験条件下において、一部の被験物質は残留したが、大部分は微生物により分解された。

1. 被験物質

本報告書においてK-1823は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称

DL-メチオニン

1.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$

分子量 149.21

CAS番号 59-51-8

1.3 供給者、商品名、等級及びロット番号^{*1}

供給者	████████████████████
商品名	DL-メチオニン
等級	████████
ロット番号	████████

1.4 純 度^{*1}

被験物質	99.9% (HPLC)
不純物	残り0.1%は不明

被験物質は純度100%として取り扱った。

*1 供給者添付資料による。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig.12参照)、質量スペクトル (Fig.13参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig.14参照) により構造を確認した。

1.6 保管条件及び保管条件下での安定性確認

保管条件	冷暗所保存
安定性確認	実験開始前及び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、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 (Fig.12参照)。

2. 活性汚泥

2.1 活性汚泥の調製

本試験における活性汚泥は、以下のとおり調製したものを使用した。

(1) 採集場所

以下の全国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（茨城県神栖市）
中浜下水処理場（大阪府大阪市）	落合水再生センター（東京都新宿区）
北上川（宮城県石巻市）	信濃川（新潟県新潟市）
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) 採集方法

下水処理場	返送汚泥を採集
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を採集

(3) 採集時期

2007年 9月

(4) 調製方法

活性汚泥の均一性を保つため、上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液5Lと、約3ヶ月間培養した活性汚泥^{*2}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^{*3}した。

*2 上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液10Lを、次頁2.2に従って培養した活性汚泥。

*3 屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

2.2 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。これに脱塩素水道水を加え全量を10Lにして再びばっ気し（30分間以上）、添加した脱塩素水道水中での合成下水濃度が0.1%になるように50g/L合成下水*4を添加した。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 グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウムをそれぞれ50g/Lになるように精製水に溶解し、水酸化ナトリウムでpHを 7.0 ± 1.0 に調整した。

2.3 管理及び使用

活性汚泥の正常な状態を維持するため、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、管理基準（「新規化学物質等に係る試験の方法について」参照）の範囲内であることを確認した。この結果を生データとして保管した。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。また、合成下水を添加してから19時間後の活性汚泥を使用した。

2.4 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。

(2) 活性汚泥使用開始日

2007年10月16日

3. 分解度試験の実施

3.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

活性汚泥の添加量を決定するために、懸濁物質濃度を測定した。

測定方法 「工場排水試験方法，懸濁物質」（JIS K 0102-1998 の14.1）
に準じて行った。

測定実施日 2007年10月22日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3970mg/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 0102-1998 の 21.）に定められた組成の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とし、pHを7.0に調整した。

(3) 対照物質

試験の実施には汚泥が十分な活性度を有することを確認するため、対照物質としてアニリン（和光純薬工業製 試薬特級 ロット番号 TSR3919）を用いた。

3.2 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、3.3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])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に精製水297mL及び10.0g/Lの被験物質水溶液3mLを入れてpHを測定した。10.0g/Lの被験物質水溶液は、供試試料を電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して調製した。

(b) (汚泥+被験物質)系 (3個, 試験容器 [2] [3] [4])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基 [297mLから活性汚泥添加液量 (2.27mL) を差し引いた量] 及び10.0g/Lの被験物質水溶液3mLを入れてpHを測定した。10.0g/Lの被験物質水溶液は、供試試料を電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して調製した。

(c) (汚泥+アニリン)系 (1個, 試験容器 [6])

アニリンの濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.27mL) を差し引いた量] 及びアニリン29.5 μ L [添加量30mg = 29.5 μ L \times 1.022g/cm³ (密度)] を入れた。アニリンはマイクロシリンジで分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系 (1個, 試験容器 [5])

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.27mL) を差し引いた量] を入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b)、(c)及び(d)の試験液に2.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。

3.3 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

恒温槽及び測定ユニット 旭テクネイオン製

データ処理装置 旭テクネイオン製

試験容器

300mL用培養瓶（改良型培養瓶）

炭酸ガス吸収剤

ソーダライム, No.1

（和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用）

(2) 環境条件

試験液培養温度 25±1℃

試験液培養期間 28日間（遮光下）

攪拌方法 マグネチックスターラーによる回転攪拌

(3) 実施場所

機器室1A

3.4 観察、測定等

(1) 観察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した。また、装置の作動状況を適宜点検した。

(2) 生物化学的酸素消費量（BOD）の測定

培養期間中、試験液のBODの変化を連続的にデータ処理装置で自動記録して測定した。また、槽内温度は毎日測定記録した。

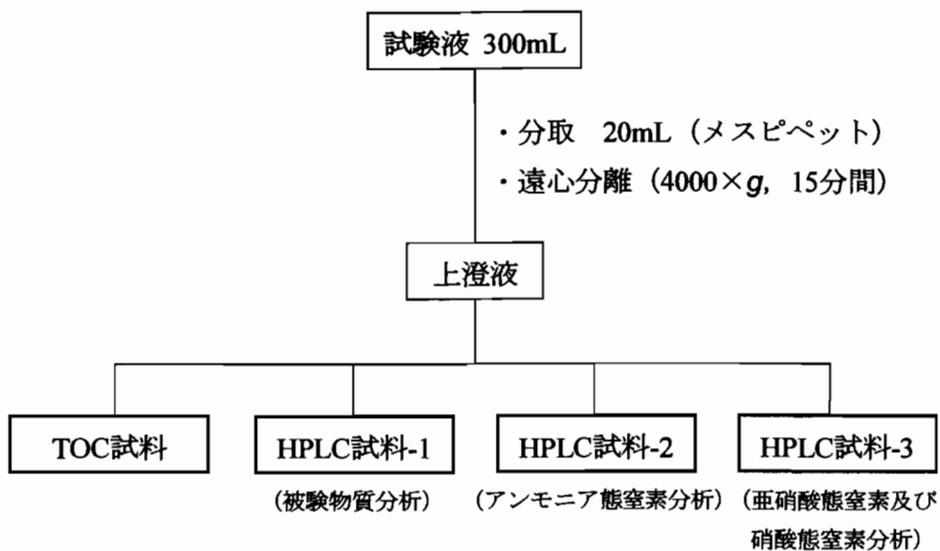
3.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中の溶存有機炭素、被験物質及び予備試験の結果生成が予想された変化物であるアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素について分析した。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。

3.5.1 試験液の前処理

(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)試料並びに被験物質、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素を分析するための高速液体クロマトグラフィー(HPLC)試料を調製した。

フロースキーム



3.5.2 定量分析

(1) 全有機炭素分析法による溶存有機炭素の定量分析

前処理を行って得られたTOC試料について、下記の定量条件に基づき溶存有機炭素（DOC）を分析した。

TOC試料中のDOC濃度は、TOC標準溶液80.0mgC/Lの二酸化炭素濃度とTOC試料の二酸化炭素濃度とを比較し比例計算して求めた（Table-2参照）。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。

定量下限濃度はDOC濃度1.0mgC/Lとした。

定量条件

機	器	全有機炭素測定装置 平沼産業製 TOC-2000
反	応	酸化チタン懸濁液 ^{*5}
注	入	400μL
量		

*5 平沼全有機炭素測定装置TOC-2000用反応液（平沼産業製）を使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる被験物質の定量分析

前処理を行って得られたHPLC試料-1について、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。HPLC試料-1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-1のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-3、Fig.6参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して $2800\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ (被験物質濃度 0.96mg/L) とした。

(a) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ 島津製作所製 LC-2010CHR (紫外可視分光検出器内蔵)
カ ラ ム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カ ラ ム 温 度	40℃
溶 離 液	A (55%) : メタノール B (45%) : 5mmol/Lドデシル硫酸ナトリウム/りん酸 (500/1 v/v)
流 量	0.2mL/min
測 定 波 長	210nm (Fig.9参照)
注 入 量	1 μL
検 出 器 出 力	2V/AU

(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。供試試料100mgを正確にはかりとり、精製水に溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。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)の標準溶液の調製と同様にして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 (Fig.2参照)。

(3) 高速液体クロマトグラフィーによるアンモニア態窒素の定量分析

前処理を行って得られたHPLC試料-2について、下記の定量条件に基づきアンモニア態窒素を分析した。HPLC試料-2中のアンモニア態窒素の濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液26.2mgN/Lのピーク高さとは比較し、比例計算して求めた (Table-4、Fig.7参照)。

ピーク高さの定量下限は、ノイズレベルを考慮して1600 μ V (アンモニア態窒素濃度0.26mgN/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	東ソー製 CCPS
電気伝導度検出器	東ソー製 CM-8020
カラムオープン デガッサー	東ソー製 CO-8020
カラム	イーアールシー製 ERC-3215
	TSKgel IC-Cation 1/2 HR (10cm \times 4.6mmI.D., 東ソー製)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
溶 離 液	水 ^{*6} /1mol/L硝酸 (1000/2 v/v)
流 量	0.5mL/min
注 入 量	5 μ L
検出器出力	100 μ S/V

*6 水道水を超純水装置システムで処理した水。

(b) 標準溶液の調製

分析試料中のアンモニア態窒素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。

塩化アンモニウム (和光純薬工業製 試薬特級) ^{*7}100mgを正確にはかりとり、精製水に溶解して262mgN/Lのアンモニア態窒素溶液を調製した。これを精製水で希釈して26.2mgN/Lの標準溶液とした。

*7 純度100%として取り扱った。

(c) 検量線の作成

(b)の標準溶液の調製と同様にして6.55、13.1及び26.2mgN/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高さとは濃度により検量線を作成した (Fig.3参照)。

(4) 高速液体クロマトグラフィーによる亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の定量分析

前処理を行って得られたHPLC試料-3について、下記の定量条件に基づき亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素を分析した。HPLC試料-3中の亜硝酸態窒素の濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液20.3mgN/Lのピーク面積とHPLC試料-3のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-5、Fig.8参照)。また、HPLC試料-3中の硝酸態窒素の濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液16.5mgN/Lのピーク面積とHPLC試料-3のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-6、Fig.8参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して $22000\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ (亜硝酸態窒素濃度 0.20mgN/L 、硝酸態窒素濃度 0.13mgN/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-10AD _{VP}
紫外可視分光検出器	島津製作所製 SPD-10AV _{VP}
カラムオープン	島津製作所製 CTO-10AC _{VP}
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10AD _{VP}
システムコントローラー	島津製作所製 SCL-10A _{VP}
デガッサー	島津製作所製 DGU-14AM
カ ラ ム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カ ラ ム 温 度	40℃
溶 離 液	A (5%) : アセトニトリル B (95%) : 水 ^{*6} / 0.5mol/Lりん酸テトラ- <i>n</i> -ブチル アンモニウム (100/1 v/v)
流 量	0.2mL/min
測 定 波 長	210nm (Fig.10, 11参照)
注 入 量	2 μ L
検 出 器 出 力	1V/AU

(b) 標準溶液の調製**① 亜硝酸態窒素**

分析試料中の亜硝酸態窒素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。

亜硝酸ナトリウム（和光純薬工業製 試薬特級）⁷100mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して203mgN/Lの亜硝酸態窒素溶液を調製した。これを精製水で希釈して20.3mgN/Lの標準溶液とした。

② 硝酸態窒素

分析試料中の硝酸態窒素濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行う。

硝酸ナトリウム（和光純薬工業製 試薬特級）⁷100mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、精製水に溶解して165mgN/Lの硝酸態窒素溶液を調製した。これを精製水で希釈して16.5mgN/Lの標準溶液とした。

(c) 検量線の作成**① 亜硝酸態窒素**

(b)①の標準溶液の調製と同様にして5.08、10.2及び20.3mgN/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（Fig.4参照）。

② 硝酸態窒素

(b)②の標準溶液の調製と同様にして4.12、8.24及び16.5mgN/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（Fig.5参照）。

3.6 分解度の算出法

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) BOD分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*8}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質) 系の生物化学的酸素消費量
(測定値) (mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素消費量
(測定値) (mg)

TOD^{*8} : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる
理論的酸素消費量 (計算値) (mg)

*8 窒素三態 (アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素) の分析結果から、窒素の残留形態はアンモニア (NH₃) として計算した (6.2 試験液の分析結果、Table-1参照)

(2) DOC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) 被験物質分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_w - S_s}{S_w} \times 100$$

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)

3.7 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。

4. 試験条件の確認

試験の有効性の基準値と本試験における値を下表に示す。表より、BOD分解度の最大値と最小値の差が20%となり、20%未満とはならず、一部逸脱することとなった。なお、20%以上の差が生じた要因については、「6.4(4) 試験法から一部逸脱した(BOD分解度に20%以上の差が生じた) 要因について」に記した。

		本試験における値	基準値	参照
分解度の最大値と最小値の差	BOD分解度	20%	20%未満	6.3項分解度
	DOC分解度	8%		
	被験物質分解度	11%		
アニリンのBOD分解度	7日後	70%	40%以上	Table-1 Fig.1
	14日後	74%	65%以上	
汚泥ブランク系のBOD値	28日後	12.3mg	18mg未満 (60mg/L未満)	Table-1 Fig.1

5. 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

当該要因はなかった。

6. 試験結果

6.1 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。 試験液は無色であった。	[1] 5.7
	(汚泥 + 被験物質)系	被験物質は溶解した。 試験液は無色であった。	[2] 7.0 [3] 7.0 [4] 7.0
培養終了時	(水 + 被験物質)系	不溶物は認められなかった。 試験液は無色であった。	[1] 6.4
	(汚泥 + 被験物質)系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖が認められた。 試験液は無色であった。	[2] 5.1 [3] 4.8 [4] 4.8

6.2 試験液の分析結果

28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	Table	Fig.
		[1]	[2]	[3]	[4]				
BOD ^{*9}	mg	2.2	32.3	35.4	41.5	45.0	1	1	
DOC残留量及び残留率 ^{*9}	mgC	12.0	2.7	2.3	1.6	12.1	2	-	
	%	99	22	19	13	-			
被験物質残留量及び残留率 (HPLC)	mg	29.6	4.8	3.4	1.6	30.0	3	6	
	%①	99	16	11	5	-			
アンモニア態窒素生成量及び生成率 (HPLC) ^{*9}	mgN	0	2.4	2.8	3.0	2.8	4	7	
	%②	0	85	101	109	-			
亜硝酸態窒素生成量及び生成率 (HPLC) ^{*9}	mgN	0	0	0	0	2.8	5	8	
	%③	0	0	0	0	-			
硝酸態窒素生成量及び生成率 (HPLC)	mgN	0	0	0	0	2.8	6	8	
	%④	0	0	0	0	-			
窒素の物質収支 (①+②+③+④)	%	99	101	112	114	-	-	-	

*9 (汚泥+被験物質)系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示した。

6.3 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

		(汚泥+被験物質)系				Table
		[2]	[3]	[4]	平均	
BOD分解度	%	72	79	92	81	1
DOC分解度	%	78	81	86	82	2
被験物質分解度 (HPLC)	%	84	89	95	89	3

6.4 考 察

(1) (水+被験物質)系について

機器分析の結果、被験物質及びDOCはほぼ理論量検出されており、被験物質分析のHPLCクロマトグラム上に変化物ピークは検出されなかった (Fig.6参照)。従って、被験物質は培養期間中、安定に存在し、変化しなかったと考えられる。

(2) (汚泥+被験物質)系について

BOD分解度は72~92%であったが、実験終了日の時点においてもBOD値の緩やかな上昇傾向が確認された (Fig.1参照)。また、DOC残留率は13~22%、被験物質残留率は5~16%であり、被験物質分析のHPLCクロマトグラム上に変化物ピークは検出されなかった (Fig.6参照)。

以上の結果から、大部分の被験物質は分解されたものの、若干量の被験物質が残留したと考えられる。しかし、28日後のBOD曲線が緩やかな上昇傾向であったことを考慮すると、最終的に被験物質は完全分解に至ると考えられる。

(3) 窒素の残留形態について

窒素の残留形態がTODに影響する可能性が考えられたため、窒素三態 (アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素) の分析を実施した。その結果、(汚泥+被験物質)系において、アンモニア態窒素が理論量の85~109%検出され、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素は検出されなかった。この結果から、窒素の残留形態をアンモニア (NH₃) としてTODの算出を行った (3.6(1)及びTable-1参照)。なお、汚泥ブランク系において、亜硝酸態窒素が検出された (Fig.8参照)。この原因は、基礎培養基に含まれるアンモニアが、一部硝化したためと考えられる。

(4) 試験法から一部逸脱した (BOD分解度に20%以上の差が生じた) 要因について

BOD分解度の最大差が20%以上 (20%) となり、試験法から一部逸脱することとなった原因として以下のことが考えられる。

(汚泥+被験物質)系の試験液の中でBOD分解度が最大値を示した試験液 [4] において、14日以降のBOD曲線の上昇が、他の2点 (試験液 [2] 及び試験液 [3]) と異なる傾向が認められた (Fig.1参照)。このことから、被験物質の生分解に関与する微生物の活性が試験液間でばらついたと考えられ、その結果としてBOD分解度に20%以上の差が生じたと推測される。なお、活性汚泥は多様な微生物から成る小さなフロックが浮遊する不均一な懸濁液である。従って、同じ体積の活性汚泥を添加しても、実際に添加される微生物の数や種類は僅かではあるが異なる。そのため、被験物質の種類によっては試験液間で分解の速さが異なることが考えられる。

6.5 結 論

本試験条件下において、一部の被験物質は残留したが、大部分は微生物により分解された。

7. 備 考

7.1 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	:	10頁参照	
全有機炭素測定装置	:	12頁参照	
高速液体クロマトグラフ	:	13, 14, 15頁参照	
紫外可視分光光度計	:	日本分光製	V-660
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	IRPrestige-21
液体クロマトグラフー質量分析計	:	Waters製	ZQ2000
		Waters製	Alliance2695
		島津製作所製	LC-10AD
フーリエ変換核磁気共鳴装置	:	日本電子製	JNM-MY60FT
天びん	:	ザルトリウス製	ME235P
pH計	:	東亜電波工業製	HM-50G
遠心分離機	:	久保田製作所製	5922

7.2 分析に使用した試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
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
フタル酸水素カリウム	:	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
1mol/L硝酸	:	和光純薬工業製	容量分析用
0.5mol/Lりん酸テトラ- <i>n</i> -ブチルアンモニウム			
	:	東京化成工業製	イオンペア試薬
ドデシル硫酸ナトリウム	:	東京化成工業製	イオンペア試薬
塩化アンモニウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
亜硝酸ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
硝酸ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級

Study No. 205148 (Test item K-1823)

Cultivating conditions:

Concentration

Test item 100 (mg/L)

Reference item (aniline) 100 (mg/L)

Activated sludge 30 (mg/L)

Temperature 25 ± 1 °C

Duration 28 days (Oct.24,2007 - Nov.21,2007)

Note: —

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	2.0	2.2	2.2	2.2
[2]	Sludge + test item	26.5	38.9	41.8	44.6
[3]	Sludge + test item	18.6	38.5	43.0	47.7
[4]	Sludge + test item	17.9	39.5	50.2	53.8
[5]	Control blank [B]	4.4	9.0	11.0	12.3
[6]	Sludge + aniline	67.2	75.8	76.2	76.9

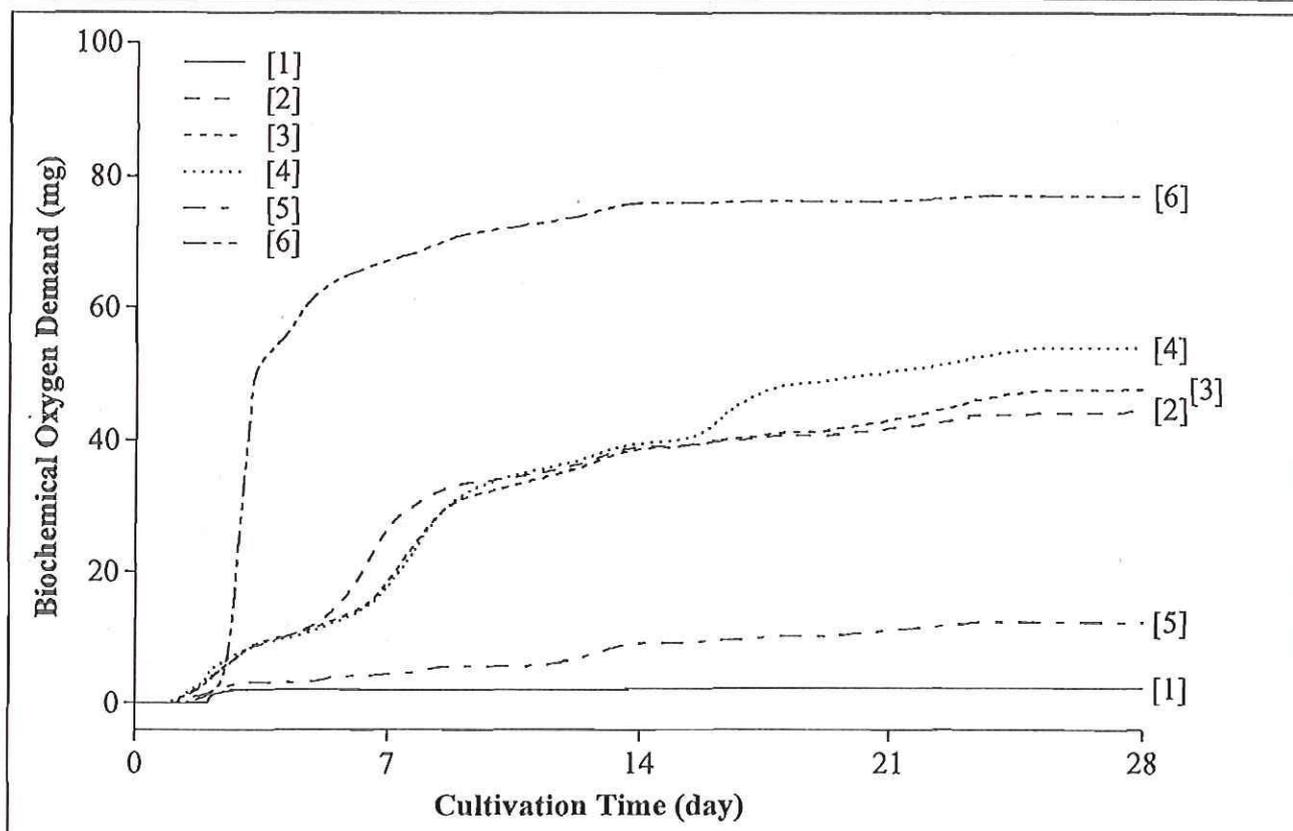


Fig. 1 Chart of BOD.

Nov.21,2007 Name XXXXXXXXXX