

最 終 報 告 書

尿素（被験物質番号 K-1132）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 尿素（被験物質番号 K-1132）の微生物による分解度試験

試験番号 21132

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4月6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 尿素（被験物質番号 K-1132）の微生物による分解度試験

試験番号 21132

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 4年12月15日	平成 4年12月15日	平成 4年12月15日
平成 5年 1月19日	平成 5年 1月20日	平成 5年 1月20日
平成 5年 2月 2日	平成 5年 2月19日	平成 5年 2月22日
平成 5年 2月16日	平成 5年 2月19日	平成 5年 2月22日
平成 5年 2月17日	平成 5年 2月19日	平成 5年 2月22日
平成 5年 2月18日	平成 5年 2月19日	平成 5年 2月22日
平成 5年 4月 6日	平成 5年 4月 6日	平成 5年 4月 6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 4 月 6 日
信頼性保証業務担当者

平成 5 年 4 月 6 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	15
15. 試験結果	15
16. 試資料の保管	19
17. 備 考	20
18. 表及び図の内容	21
付 表	
付 図	

要 約

1. 試験の表題

尿素（被験物質番号 K-1132）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 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- (5) 試験液培養期間 28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 | 0%, | 0%, | 0% |
| (2) TOCによる分解度 | 61%, | 45%, | 56% |
| (3) HPLCによる分解度 | 59%, | 45%, | 58% |

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 4年12月15日
- (2) 試験液培養開始日 平成 5年 1月19日
- (3) 試験液培養終了日 平成 5年 2月16日
- (4) 試験終了日 平成 5年 3月24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 3月24日
作成者

10. 最終報告書の承認

試験責任者

平成 5年 3月24日
氏名

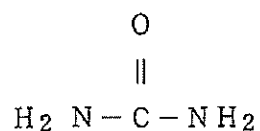
11. 被 験 物 質

本報告書において被験物質K-1132は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 尿素

11.2 構造式等

構造式




分子式 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$

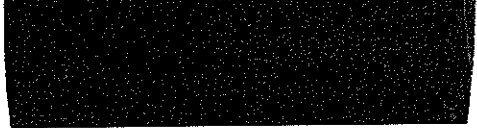
分子量 60.06

11.3 純 度^{*1} 99.0%以上

*1  資料による。

11.4 入手先及びロット番号

(1) 入 手 先 

(2) ロット番号 

11.5 被験物質の確認

ALDRICH LIBRARY 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－7 参照）。また、質量スペクトル（図－8 参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図－9 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－7 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）

中浜処理場（大阪府大阪市）

北上川（宮城県石巻市）

吉野川（徳島県徳島市）

広島湾（広島県広島市）

深芝処理場（茨城県鹿島郡）

落合処理場（東京都新宿区）

信濃川（新潟県西蒲原郡）

琵琶湖（滋賀県大津市）

洞海湾（福岡県北九州市）

(2) 時 期 平成 4 年 1 2 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、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。

*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)

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

(b) (汚泥+被験物質)系(3個)

試験容器に基礎培養基 297mLを入れ、被験物質を 100mg/Lになるように 10g/Lの被験物質溶液を3mL添加してpHを測定した。

(c) (汚泥+アニリン)系(1個)

試験容器に基礎培養基 300mLを入れ、アニリンを 100mg/Lになるようにマイクロシリンジで29.5μL(添加量30mg)分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系(1個)

試験容器に基礎培養基 300mLを入れた。

(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(クーロメーター, 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, NaOH

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 28日間

実施場所 511クーロ室

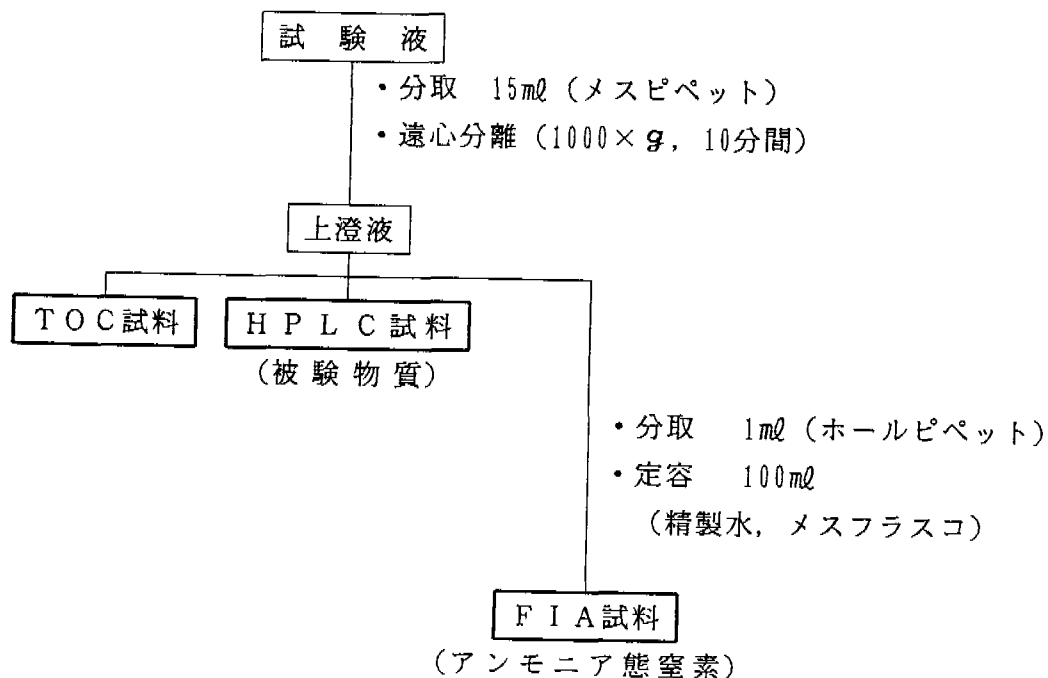
13.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素、被験物質及びアンモニア態窒素を分析した。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、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、アンモニア態窒素を分析するためのフローインジェクション分析法（FIA）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（DOC）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溶存有機炭素を分析した。

試験液の溶存有機炭素濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、TOC標準溶液40.0mgC/ℓ及び無機炭素（IC）標準溶液20.0mgC/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試料の全炭素（TC）及びICを測定して求めた（表－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、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。

TC及びICの検出下限は、データ処理装置の最小ピーク条件より350 digit（ピーク面積）とし、炭素濃度1.4mgC/ℓとした。

分析機器の定量条件

機	器	全有機炭素計
T C 炉	温 度	6 8 0℃
I C 炉	温 度	1 5 0℃
流	量	1 5 0 ml/min
注 入	量	1 0 μℓ
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データ処理装置上で得られた標準溶液 120mg/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)。

被験物質の検出下限は、データ処理装置のノイズレベルを $100 \mu V \cdot sec$ (ピーク面積) とし、1.4mg/lとした。

(a) 分析機器の定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフ
カ	ラム	L-column ODS
		25cm×4.6mmφ ステンレス製
溶	離	5 mmol/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液
流	量	1.0 ml/min
測	定	波 長
		200 nm (図-6 参照)
注	入	量
		40 μl
感	度	
	検 出 器	0.08 ABU/FS
	記 録 計	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 100mgを精密にひょう量し、精製水に溶解して 100mlに定容し、1000mg/lの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して 120mg/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30.0、60.0及び 120mg/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データ処理装置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)。

(3) フローインジェクション分析法によるアンモニア態窒素の分析

前処理を行って得られた F I A 試料について下記定量分析条件に基づきアンモニア態窒素を分析した。F I A 試料中のアンモニア態窒素の濃度はデータ処理装置上で得られた標準溶液 $0.4\text{mgN}/\ell$ のピーク面積と F I A 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（表-4、図-4 参照）。

アンモニア態窒素の検出下限は、データ処理装置のノイズレベルを $6000\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ （ピーク面積）とし、 $0.003\text{mgN}/\ell$ とした。

(a) 分析機器の定量条件

機	器	フローインジェクションアナライザー
エアーバス温度		60°C
ウォーターバス温度		30°C
オープン温度		30°C
流	量	ポンプ1 $1.6\text{ml}/\text{min}$ ポンプ2 $1.6\text{ml}/\text{min}$
パ	ー	ジ
インジェクト		30 秒
インターバル		2 分 10 秒
波	長	640nm
感	度	
検	出	レンジ $0.1\text{ABU}/\text{FS}$
記	録	計
		ATTEN 32

(b) 反応試薬の調製

①水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム10g及び次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素10%）10mlを分取し、精製水に溶解して1ℓにした。

②フェノール、ニトロプルシドナトリウム溶液

フェノール10g及びニトロプルシドナトリウム 0.5gを精製水に溶解して1ℓにした。

①及び②の試薬をポンプ2、精製水をポンプ1により送液した。

(c) 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38.2mgを精密にひょう量し、精製水に溶解して200mgN/ℓの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して0.4mgN/ℓの標準溶液とした。

(d) 検量線の作成

(c)の標準溶液調製法と同様にして0.1、0.2及び0.4mgN/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データ処理装置上のピーク面積と濃度により検量線を作成した（図-5参照）。

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) (mg C)

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) (mg C)

(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 8401-1961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54%及び69%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	p H
培養開始時	（水＋被験物質）系	被験物質は溶解した。	④ 5.9
	（汚泥＋被験物質）系	被験物質は溶解した。	① 7.0 ② 7.0 ③ 7.0
培養終了時	（水＋被験物質）系	変化は認められなかった。	④ 6.5
	（汚泥＋被験物質）系	汚泥の増殖が認められた。	① 9.1 ② 8.8 ③ 9.0

15.2 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 (mg)	付 表	付 図
		④	①	②	③			
B O D	(mg)	2.4	0.0	0.0	0.0	55.8	表－1	図－1
D O C 残留	(mg)	6.2	2.4	3.4	2.7	6.0	表－2	
	*5 (%)	103	40	57	45			
被験物質残留 (H P L C)	(mg)	31.0	12.6	17.1	13.1	30.0	表－3	図－2
	*5 (%)	103	42	57	44			
アンモニア態 窒素生成 (F I A)	(mgN)	0.0	8.5	6.7	8.6	14.0 (mgN)	表－4	図－4
	*5 (%)	0	61	48	61			

*5 残留率（％）及び生成率（％）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。

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

$$\text{生成率（％）} = \frac{\text{生成量（mgN）}}{\text{理論量（mgN）}} \times 100$$

15.3 分解度試験結果

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	
B O D による結果	0	0	0	表-1
T O C による結果	61	45	56	表-2
H P L C による結果	59	45	58	表-3

15.4 考 察

分解性の評価について

(1) 被験物質の理論酸素要求量 (TOD) と BOD による分解度の評価について

被験物質の理論酸素要求量 (TOD) は、培養終了時の窒素の形態をアンモニアとしたとき 0 mg、亜硝酸としたとき 55.8 mg となる^{*6}。

本試験の直接分析の結果、(汚泥+被験物質)系において、理論量に対し、48~61%のアンモニア態窒素が生成していた。この結果より TOD が 0 mg となるため、BOD の結果からは被験物質の分解度は評価できない。

(2) 被験物質の直接分析による分解度の評価について

直接分析による結果は下記のとおりであった。

単位：%

	① 被 験 物 質 残 留 率	② ア ン モ ニ ア 態 窒 素 生 成 率	①+②	試験溶液中 に残留して いた無機 炭素 (CO ₂)
① (汚泥+被験物質)	42	61	103	28
② (汚泥+被験物質)	57	48	105	20
③ (汚泥+被験物質)	44	61	105	28

- ① (汚泥+被験物質)系の被験物質の残留率が42~57%であった。
- ② その被験物質の減少分に伴うアンモニア態窒素の生成が認められた。
- ③ また、無機炭素 (IC) が20~28%測定された。

以上のことより、被験物質は一部生分解されていると判断できる。

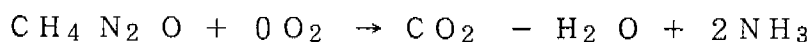
被験物質の TOD が 0 mg のため BOD の結果では分解度が評価できないが、直接分析の結果より被験物質は一部生分解されていると判断できる。

$$*6 \quad \text{TOD} = 30.0\text{mg} \times 1.86 = 55.8\text{mg}$$



$$3.5\text{O}_2 / \text{CH}_4\text{N}_2\text{O} = 112.00 / 60.06 = 1.86$$

$$\text{TOD}(\text{NH}_3) = 30.0\text{mg} \times 0.00 = 0.00\text{mg}$$

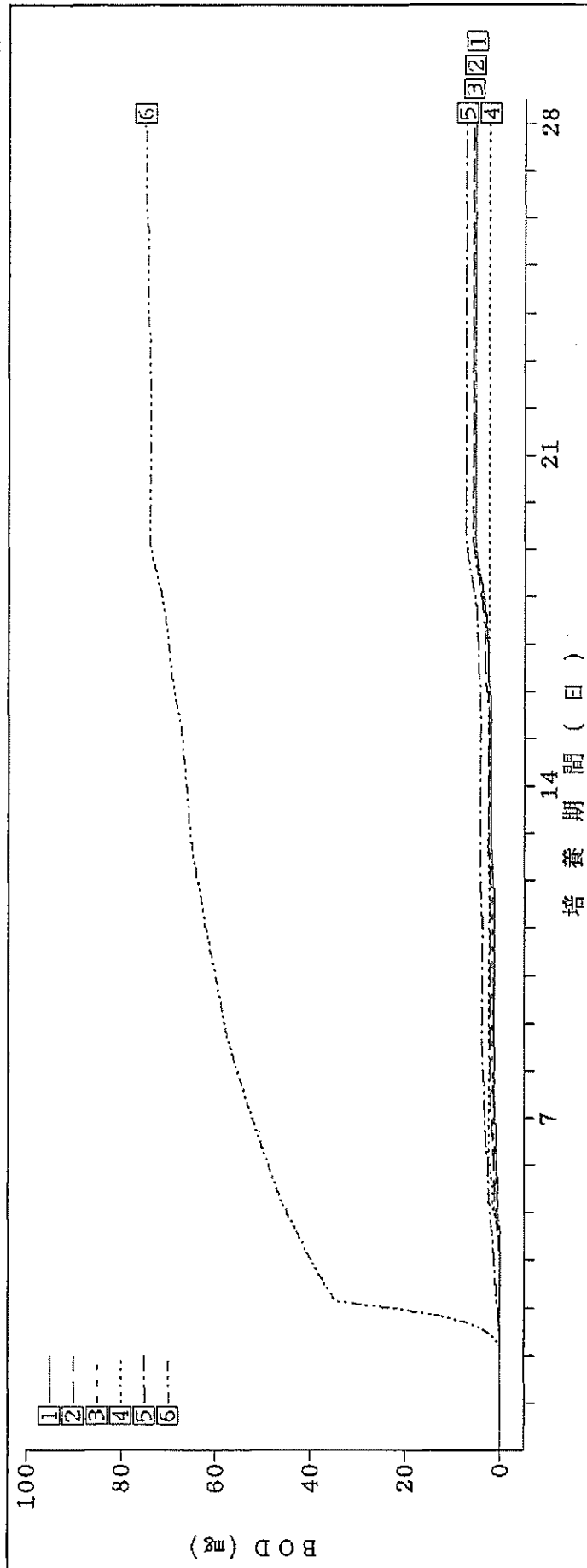


$$0\text{O}_2 / \text{CH}_4\text{N}_2\text{O} = 0.00 / 60.06 = 0.00$$

図-1 BODチャート

試験番号: 21132 (被験物質: K-1132)
 装置番号: CM-8
 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: 28日(1/19~2/16, 1993)
 備考:

試料名	BOD (mg)			
	7日	14日	21日	28日
① 汚泥+被験物質	1.1	2.0	5.4	5.4
② 汚泥+被験物質	1.8	2.6	5.8	5.8
③ 汚泥+被験物質	1.4	2.4	5.9	5.9
④ 水+被験物質	2.4	2.4	2.4	2.4
⑤ 基礎呼吸	3.3	4.3	7.3	7.3
⑥ 汚泥+アニリン	52.3	66.3	74.2	75.3



平成5年2月16日

氏名