

最 終 報 告 書

エチレンオキシド（被験物質番号 K-881）の微生物による分解度試験

財団法人 化学工業技術協会
化学工業技術協会 化学工業技術研究所

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

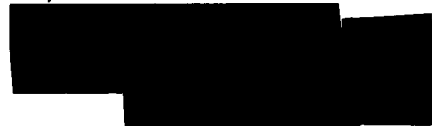
● 試験の表題 エチレンオキシド（被験物質番号 K-881）の微生物による分解度試験

試験番号 20881

● 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 7 年 9 月 29 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 エチレンオキシド（被験物質番号 K-881）の微生物による
分解度試験

試験番号 20881

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 7年 5月26日	平成 7年 5月26日	平成 7年 5月26日
平成 7年 5月30日	平成 7年 5月31日	平成 7年 5月31日
平成 7年 6月13日	平成 7年 6月28日	平成 7年 6月28日
平成 7年 6月27日	平成 7年 6月28日	平成 7年 6月28日
平成 7年 6月28日	平成 7年 6月28日	平成 7年 6月28日
平成 7年 9月29日	平成 7年 9月29日	平成 7年 9月29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 7年 9月29日
信頼性保証業務責任者



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	6
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
17. 試資料の保管	18
18. 備 考	19
19. 表及び図の内容	19

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

エチレンオキシド（被験物質番号 K-881）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) ガスクロマトグラフィー（GC）による被験物質の分析

3. 試験結果

- (1) BOD による分解度 98%, 107%, 115% 平均 107%
- (2) TOC による分解度 96%, 96%, 97% 平均 96%
- (3) GC による分解度 100%, 100%, 100% 平均 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。

最 終 報 告 書

試験番号 20881

1. 表 題 エチレンオキシド（被験物質番号 K-881）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 K-881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〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」(July 17, 1992)に定める "Ready Biodegradability : 301C, Modified MITI Test (I)"に準拠した。
6. 優良試験所基準への適合 「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」（以下「GLP基準」という。）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に適合して行った。

7. 試験期間

(1) 試験開始日 平成 7年 5月26日

(2) 試験液培養開始日 平成 7年 5月30日

(3) 試験液培養終了日 平成 7年 6月27日

(4) 試験終了日 平成 7年 7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

試資料管理部門責任者

9. 最終報告書作成日

平成 7年 7月24日

作成者 _____

10. 最終報告書の承認

平成 7年 7月24日

試験責任者

氏名

11. 被 験 物 質

本報告書においてK-881は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 エチレンオキシド

11.2 構造式等

構造式



分子式 C_2H_4O

分子量 44.05

11.3 純 度^{*1} 99.9%

11.4 入手先、商品名、等級及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) 等 級

(4) ロット番号 A21

*1 入手先添付資料による。

11.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 6 参照)、質量スペクトル (Fig. 7 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 8 参照) により構造を確認した。

11.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷蔵保存

(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、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. 6 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 平成 7 年 3 月

12.2 採集方法

(1) 都 市 下 水 ド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 ± 2 ℃とした。

*3 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸二水素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 7 年 4 月 18 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 0102-1993 の 14.1）に準じて行った。

測定実施日 平成 7 年 5 月 29 日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は5100mg/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 0102-1993 の 21.）で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ3 mLに精製水（高杉製薬製 日本薬局方）を加えて1 Lとする割合で混合し、pHを7.0に調整した。

(3) 基準物質

アニリン（昭和化学製 試薬特級 ロット番号 SE 31230）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③)

試験容器に精製水297mLを入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるように10g/Lの被験物質水溶液を3mL添加した。10g/Lの被験物質水溶液は、被験物質をマイクロシリンジで分取し、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④⑤⑥)

試験容器に基礎培養基(297mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるように10g/Lの被験物質水溶液を3mL添加した。10g/Lの被験物質水溶液は、被験物質をマイクロシリンジで分取し、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①)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、アニリン濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで29.5 μ L[添加量30mg=29.5 μ L \times 1.022g/cm³(密度)]分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系(1個, 試験容器②)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))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（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 300 mL用培養瓶（揮発性物質用改良型）

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム，Na₂O

（和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用）

撹拌方法 マグネチックスターラーによる回転撹拌

(2) 環境条件

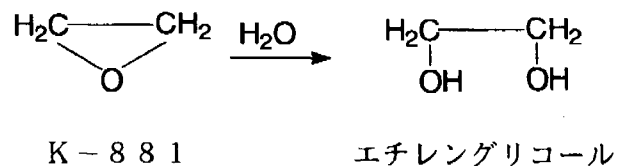
試験液培養温度 25 ± 1 °C

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

被験物質は、試験液水中で次のように加水分解すると予想された。

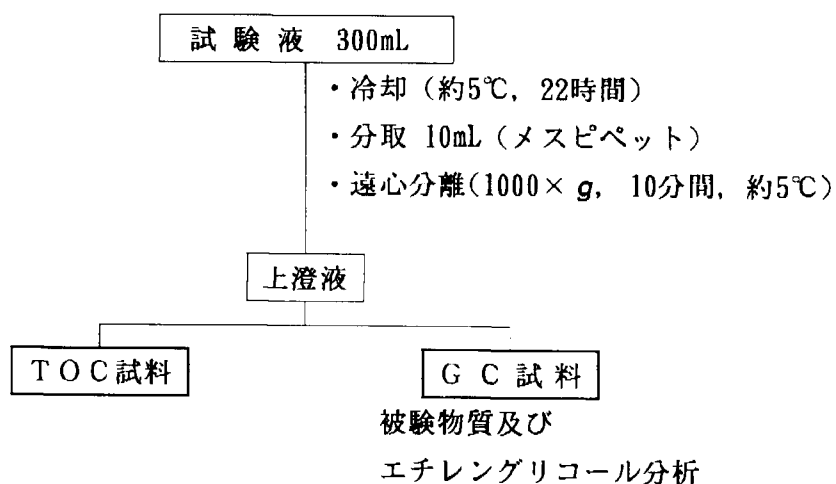


培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素、被験物質及び予備試験の結果予想される変化物（エチレングリコール）について分析した。

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、被験物質及びエチレングリコールを分析するためのガスクロマトグラフィー（GC）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T O C試料について、下記の定量条件に基づきD O Cを分析した。

試験液のD O C濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、T O C標準溶液80.0mgC/Lのピーク面積を測定して検量線を設定し、T O C試料のD O Cを測定して求めた（Table- 2 参照）。なお、T O C標準溶液はフタル酸水素カリウム（和光純薬工業製 試薬特級）を精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度はD O C濃度1.0mgC/Lとした。

定量条件

機	器	全有機炭素計
		島津製作所製 T O C - 5 0 0 0
T C 炉 温 度		6 8 0 ℃
流 量		1 5 0 mL/min
注 入 量		3 3 μL
感 度		レンジ 5

(2) ガスクロマトグラフィーによる被験物質及びエチレングリコールの分析

前処理を行って得られたGC試料について、下記の定量条件に基づき被験物質及びエチレングリコールを分析した。GC試料中の被験物質及びエチレングリコールの濃度はクロマトグラム上で得られたそれぞれの標準溶液101mg/L及び200mg/Lのピーク面積とGC試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（Table-3, 4、Fig. 3, 5参照）。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮してそれぞれ、300 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ （被験物質濃度0.95mg/L）、500 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ （エチレングリコール濃度1.8mg/L）とした。

(a) 定量条件

機	器	ガスクロマトグラフ	
		島津製作所製 GC-9A	
検	出	水素炎イオン化検出器 (FID)	
カ	ラ	20m \times 1.2mm ϕ ガラス製	
	液	G-300 膜厚 2.0 μm	
カ	ラ	被験物質分析	90 $^{\circ}\text{C}$
ム	温	エチレングリコール分析	175 $^{\circ}\text{C}$
度			
試	料	被験物質分析	150 $^{\circ}\text{C}$
導	入	エチレングリコール分析	210 $^{\circ}\text{C}$
部	温		
度			
キ	ャ	ヘリウム	20 mL/min
ャ	リ		
ー	ガ		
ス			
水	素	0.5 kg/cm ²	
空	気	0.7 kg/cm ²	
注	入	1.0 μL	
量			
感	度		
	検	レンジ	10 ¹
	出		
	器		
	記	レンジ	被験物質分析 15 mV
	録		
	計		エチレングリコール分析 10 mV

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質及びエチレングリコール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。

①被験物質

被験物質 $57\mu\text{L}$ [$50.3\text{mg}=57\mu\text{L}\times 0.882\text{g}/\text{cm}^3$ (密度)] 分取し、精製水に溶解して $1010\text{mg}/\text{L}$ の被験物質溶液を調製した。これを精製水で希釈して $101\text{mg}/\text{L}$ の標準溶液とした。

②エチレングリコール

エチレングリコール (和光純薬工業製 試薬特級) 100mg を正確にはかりとり、精製水に溶解して $1000\text{mg}/\text{L}$ の被験物質溶液を調製した。これを精製水で希釈して $200\text{mg}/\text{L}$ の標準溶液とした。

(c) 検量線の作成

①被験物質

(b)①の標準溶液の調製と同様にして 25.1 、 50.3 及び $101\text{mg}/\text{L}$ 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)。

②エチレングリコール

(b)②の標準溶液の調製と同様にして 50.0 、 100 及び $200\text{mg}/\text{L}$ 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)。

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位で表示した。

(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 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 : 溶存有機炭素の理論量
(計算値) (mgC)

(3) GCによる分解度^{*5}

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

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 : 被験物質の添加量 (mg)

*5 GCによる分解度の算出は、13.4.2での分析においてピーク面積が定量下限を越えなかったため、残留量を0として計算した。

13.6 数値の取扱い

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 71% 及び 85% 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 (Table- 1、Fig. 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
培養開始時	(水 + 被験物質) 系	被験物質は溶解した。
	(汚泥 + 被験物質) 系	被験物質は溶解した。
培養終了時	(水 + 被験物質) 系	不溶物は見られなかった。
	(汚泥 + 被験物質) 系	汚泥以外の不溶物は見られなかった。 汚泥の増殖は目視では確認できなかった。

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	付 表	付 図
		[3]	[4]	[5]	[6]			
B O D ^{*6}	mg	0.8	53.6	58.2	62.9	54.6	Table-1	Fig. 1
DOC残留量 及び残留率	mgC	13.6	0.6	0.5	0.4	16.4	Table-2	—
	% ^{*7}	83	4	3	3	—		
被験物質残留 量及び残留率 (GC)	mg	4.0	0.0	0.0	0.0	30	Table-3	Fig. 4
	% ^{*7}	13	0	0	0	—		
エチレングリコール 生成量及び生成率 (GC)	mg	30.9	0.0	0.0	0.0	42.3	Table-4	Fig. 5
	% ^{*7}	73	0	0	0	—		

*6 (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。

*7 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。

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

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

15.3 分解度

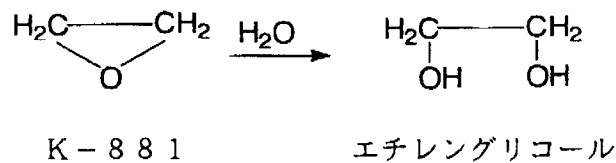
28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分解度 (%)				付 表
	④	⑤	⑥	平 均	
BODによる結果	98	107	115	107	Table-1
TOCによる結果	96	96	97	96	Table-2
GCによる結果	100	100	100	100	Table-3

15.4 考 察

(1) 被験物質の加水分解について

被験物質は加水分解し、エチレングリコール (K-883, 2-0230, S63.7.25 (138) 良分解) を生成することが予想されたので、加水分解試験を下記の条件で行った。

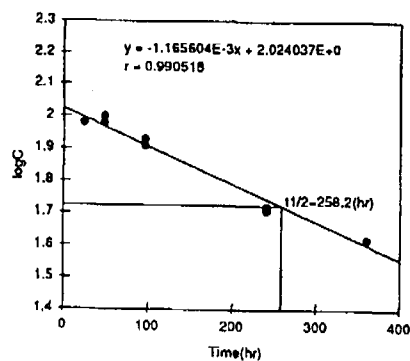


その結果、試験液中における被験物質濃度の対数値 ($\log C$) を時間 (t) に対してプロットし、回帰式及び被験物質の半減期を求めた (下図参照)。

回帰式は、 $\log C = -1.1656 \times 10^{-3} t + 2.0240$ (相関係数 $r = 0.9905$) となり、半減期は258.2時間 (10.8日間) であった。

(a) 試験条件

試験濃度 100 mg/L
 試験温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$
 連 数 $n = 2$



被験物質濃度 (C) の対数と時間 (t) のプロット図

(2) (水+被験物質)系の収支について

本試験において、(水+被験物質)系の試験液中の被験物質の残留率13%、エチレングリコールの生成率73%で、合わせて86%であった。

収支が不足した原因として、被験物質は沸点が12.5℃(化学大事典(共立出版)による)と低く揮散する事が予想されたので、気相のない密閉系において下記の条件で保持試験を行った。

その結果、被験物質残留率11%、エチレングリール生成率87%で合わせて98%の収支が得られた。よって、本試験における収支の不足は揮散によるものと推測される。

(a) 試験条件

試験濃度	1 0 0 mg/L
試験温度	2 5 ± 1 °C
試験期間	2 8 日間
連 数	n = 1

16. 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。

17. 試資料の保管

17.1 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。

17.2 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、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。

18. 備 考

18.1 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	:	9頁参照
全有機炭素計	:	11頁参照
ガスクロマトグラフ	:	12頁参照
電子分析天びん	:	Sartorius社製 2007 MP6
p H 計	:	東亜電波工業製 HM-50S
遠心分離機	:	トミー精工製 CST 060LF

18.2 分析に使用した試薬

精製水	:	高杉製薬製
-----	---	-------

19. 表及び図の内容

表の内容

Table-1	BODによる分解度計算表
Table-2	TOCによる分解度計算表
Table-3	GCによる分解度計算表（被験物質）
Table-4	GCによる生成率計算表（エチレングリコール）

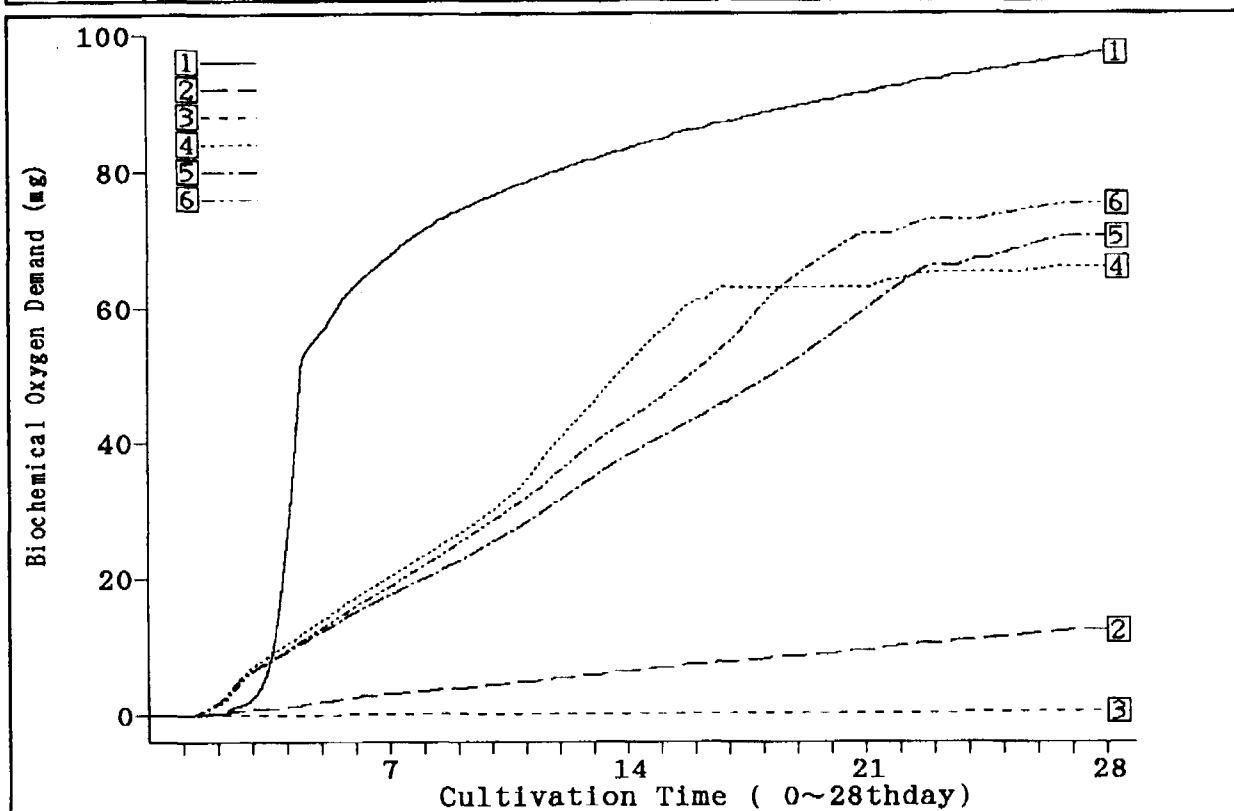
図の内容

Fig. 1	BODチャート
Fig. 2	検量線用GCチャート及び検量線（被験物質）
Fig. 3	GCチャート（被験物質）
Fig. 4	検量線用GCチャート及び検量線（エチレングリコール）
Fig. 5	GCチャート（エチレングリコール）
Fig. 6-1	試験液培養開始前の被験物質の赤外吸収スペクトル
Fig. 6-2	試験液培養終了後の被験物質の赤外吸収スペクトル
Fig. 7	被験物質の質量スペクトル
Fig. 8	被験物質の核磁気共鳴スペクトル

Fig.1 Chart of BOD

Test No. 20881 (Test substance K-881)
 Apparatus No. CM-25
 Cultivating conditions:
 Concentration
 Test substance 100 (mg/l)
 Reference substance(aniline) .. 100 (mg/l)
 Activated sludge 30 (mg/l)
 Temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$
 Duration 28days(May.30~Jun.27,1995)
 Note: Regular condition Regular test

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Sludge + Aniline	67.6	83.2	91.4	97.4
②	Control blank [B]	3.2	6.6	9.7	12.5
③	Water + Test substance	0.2	0.2	0.4	0.8
④	Sludge + Test substance	20.3	51.5	63.2	66.1
⑤	Sludge + Test substance	17.6	38.0	59.5	70.7
⑥	Sludge + Test substance	18.9	43.2	71.0	75.4



1995.06.27 Name XXXXXXXXXX