

最終報告書

トリアルキル（又はアルケニル，C = 1 ~ 4）フェノール [6-tert-ブチル-2,4-キシレノール（被験物質番号 K-1228）にて試験実施] 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 化学工業研究所

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 トリアルキル（又はアルケニル，C=1～4）フェノール〔6-tert-ブチル-2，4-キシレノール（被験物質番号K-1228）にて試験実施〕の微生物による分解度試験

試験番号 21228

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 2 月 22 日

運営管理者



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 トリアルキル（又はアルケニル，C = 1～4）フェノール [6-tert-ブチル-2, 4-キシレノール（被験物質番号 K-1228）にて試験実施] の微生物による分解度試験

試験番号 21228

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。

なお、本陳述書は最終報告書の訂正のため、平成 7年 2月22日発行の陳述書に追加発行したものです。

平成 7年 4月 20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 トリアルキル（又はアルケニル，C=1～4）フェノール [6-tert-ブチル-2,4-キシレノール（被験物質番号 K-1228）にて試験実施] の微生物による分解度試験

試験番号 21228

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 6年12月22日	平成 6年12月22日	平成 6年12月22日
平成 6年12月27日	平成 6年12月27日	平成 6年12月27日
平成 7年 1月10日	平成 7年 1月26日	平成 7年 1月26日
平成 7年 1月24日	平成 7年 1月26日	平成 7年 1月26日
平成 7年 1月25日	平成 7年 1月26日	平成 7年 1月26日
平成 7年 1月26日	平成 7年 1月26日	平成 7年 1月26日
平成 7年 2月22日	平成 7年 2月22日	平成 7年 2月22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 2月22日

信頼性保証業務責任者



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 トリアルキル（又はアルケニル，C=1～4）フェノール [6-tert-ブチル-2,4-キシレノール（被験物質番号 K-1228）にて試験実施] の微生物による分解度試験

試験番号 21228

上記試験の最終報告書の訂正箇所について監査を実施し、当該箇所には問題がないことを確認しました。監査の結果については、下記の通り運営管理者及び試験責任者に報告しました。

監 査 日	報告日（運営管理者）	報告日（試験責任者）
平成 7年 4月18日	平成 7年 4月20日	平成 7年 4月20日

本信頼性保証書は平成 7年 2月22日 発行の信頼性保証書に追加発行したものです。

平成 7年 4月20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	6
13. 分解度試験の実施	7
14. 試験条件の確認	14
15. 試験結果	14
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	17
17. 試資料の保管	17
18. 備 考	17
19. 表及び図の内容	18
付表及び付図	

要 約

1. 試験の表題

トリアルキル（又はアルケニル，C = 1～4）フェノール [6-tert-ブチル-2, 4-キシレノール（被験物質番号K-1228）にて試験実施] 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) 閉鎖系酸素消費量測定装置による生物学的酸素要求量（BOD）の測定
- (2) 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 | 4 %, | 3 %, | 5 % | 平均 | 4 % |
| (2) GCによる分解度 | 0 %, | 4 %, | 0 % | 平均 | 1 % |

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 21228

1. 表 題 トリアルキル（又はアルケニル，C = 1～4）フェノール [6-tert-ブチル-2, 4-キシレノール（被験物質番号 K-1228）にて試験実施] 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-1228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 6年12月22日
(2) 試験液培養開始日 平成 6年12月27日
(3) 試験液培養終了日 平成 7年 1月24日
(4) 試験終了日 平成 7年 2月15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 7年 2月15日

作成者 _____

10. 最終報告書の承認

平成 7年 2月15日

試験責任者

氏名 _____

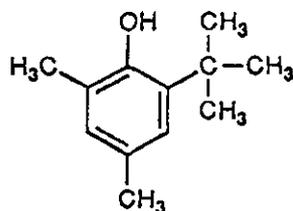
11. 被験物質

本報告書においてK-1228は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 6-tert-ブチル-2,4-キシレノール

11.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{15}H_{18}O$

分子量 178.27

11.3 純 度^{*1} 98%以上

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 FGC01

*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 6年 9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 ± 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 6年10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 6年12月26日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3700mg/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。

(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⑥)

試験容器に精製水300mLを入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで32.0 μ L [添加量30.7mg=32.0 μ L \times 0.959g/cm³(密度)]分取して添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(3個, 試験容器② ③ ④)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで32.0 μ L [添加量30.7mg=32.0 μ L \times 0.959g/cm³(密度)]分取して添加した。

(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-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①)

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, No. 1
	(和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用)
撈拌方法	マグネチックスターラーによる回転撈拌

(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

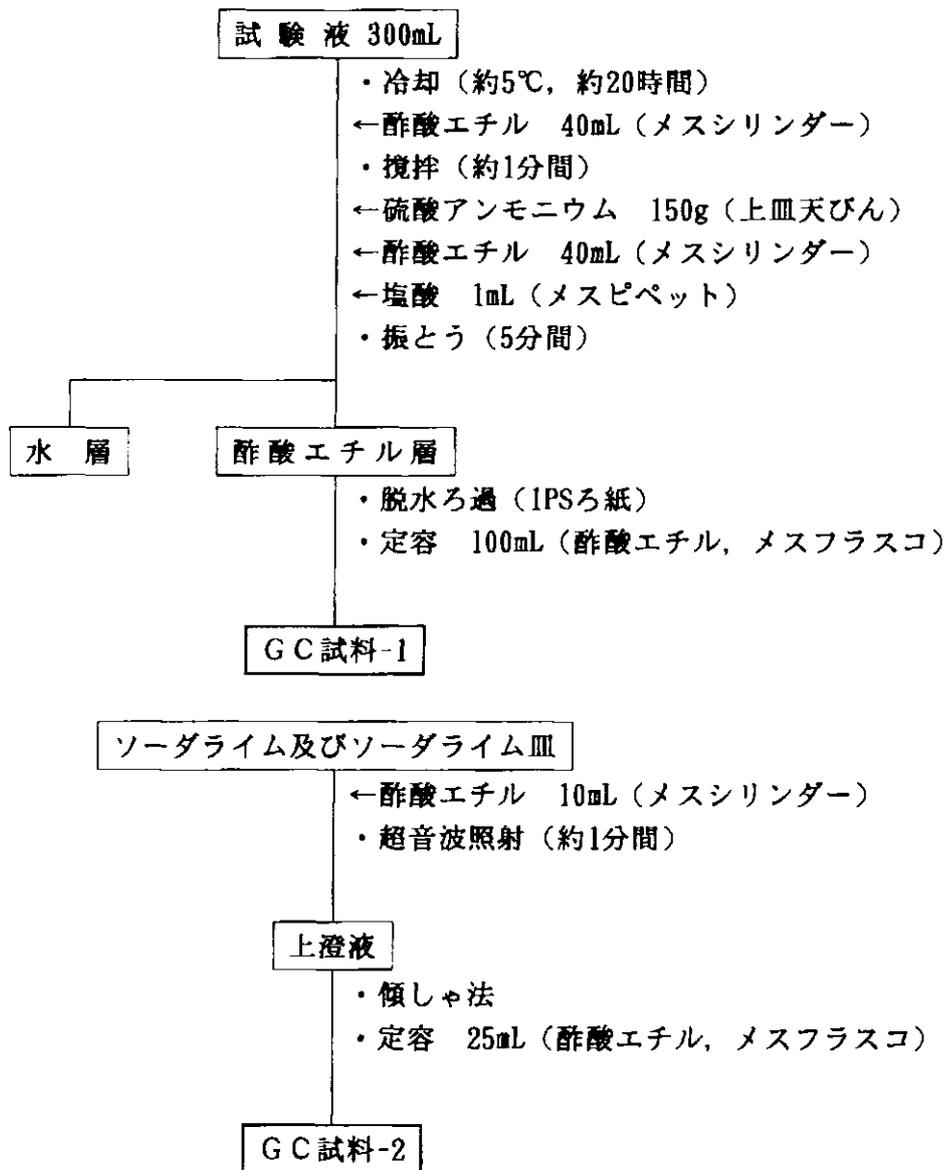
13.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中、ソーダライム及びソーダライム皿中に残留している被験物質について分析した。

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、ソーダライム及びソーダライム皿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、被験物質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

ガス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GC試料について、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。GC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400mg/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. 4, 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 $500 \mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度4.4mg/L) とした。

(1) 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 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カ ラ ム	20m×1.2mmφ ガラス製
液 相	G-100 膜厚 1.0μm
カ ラ ム 温 度	170℃
試料導入部温度	230℃
キャリアーガス	ヘリウム 20mL/min
水 素	0.5kg/cm ²
空 気	0.5kg/cm ²
注 入 量	2μL
感 度	
検 出 器	レンジ 10 ²
記 録 計	レンジ 14mV

(2) 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を正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して400mg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして100、200及び400mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)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)。

13.4.3 回収試験及びブランク試験

前述した前処理における試験液からの被験物質の回収率を求めるため、13.2に準じて調製した(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の試験液について13.4.1及び13.4.2に従い、回収試験を行った。また、13.2に準じて調製した汚泥ブランク系の試験液について回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験については各2点、ブランク試験については1点測定した。この結果、ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記のとおりであり、平均回収率を試験液中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした (Table-2、Fig. 3 参照)。

(水 + 被験物質)系回収率	97.8%,	97.9%	平均	97.9%
(汚泥 + 被験物質)系回収率	98.5%,	98.4%	平均	98.5%

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** : 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) GC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68%及び97%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	不溶物が認められた。
	(汚泥 + 被験物質)系	汚泥以外の不溶物が認められた。
培養終了時	(水 + 被験物質)系	不溶物は認められなかった。
	(汚泥 + 被験物質)系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖は認められなかった。

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
		⑥	②	③	④			
B O D	mg	2.6	3.4	2.9	4.2	88.1	Table-1	Fig. 1
被験物質残留量及び残留率 (試験液) (GC)	mg	26.0	26.8	24.9	26.9	30.7	Table-3	Fig. 4
	%	85	87	81	88	—		
被験物質残留量及び残留率 (ソーダライム及び ソーダライムⅢ) (GC)	mg	0.7	0.5	0.5	0.5	30.7	Table-4	Fig. 5
	%	2	2	2	2	—		

*5 (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 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

28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	平 均	
BODによる結果	4	3	5	4	Table-1
GCによる結果	0	4	0	1	Table-3

15.4 考 察

本試験結果より、GC分析による被験物質の残留は、(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系共に81~88%であった。そこでソーダライム及びソーダライム皿を分析した結果、2%の被験物質残留が認められた。

また、試験液及びライム皿分析のクロマトグラム上に、K-1228換算で約5%の変化物ピークが検出された。変化物ピークの同定をGC-MSにより検討したが、絶対量が少ないために構造推定は困難であった。

pH 4, 7及び9での被験物質の安定性を調べたところ、pH 9において被験物質の減少が認められた。そこで、酸素を除いた系で安定性を調べたところ、被験物質は安定であった。

被験物質と同様の構造を有する2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール〔官報公示整理番号 3-0540, K-80, 第41回判定部会 難分解〕は、アルカリ触媒で自動酸化する反応機構が知られている(文献名:新実験化学講座 15巻 酸化と還元 [I-1] 1978, P473 (丸善))。

以上の結果より、被験物質は揮散性を有するため、ソーダライム中に一部移動し、アルカリ存在化で酸化したと推測される。

また、被験物質の生分解性に関しては、本試験結果より、微生物による分解性は認められなかった。

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
ガスクロマトグラフ : 11頁参照
電子分析天びん : Sartorius社製 2007 MP6

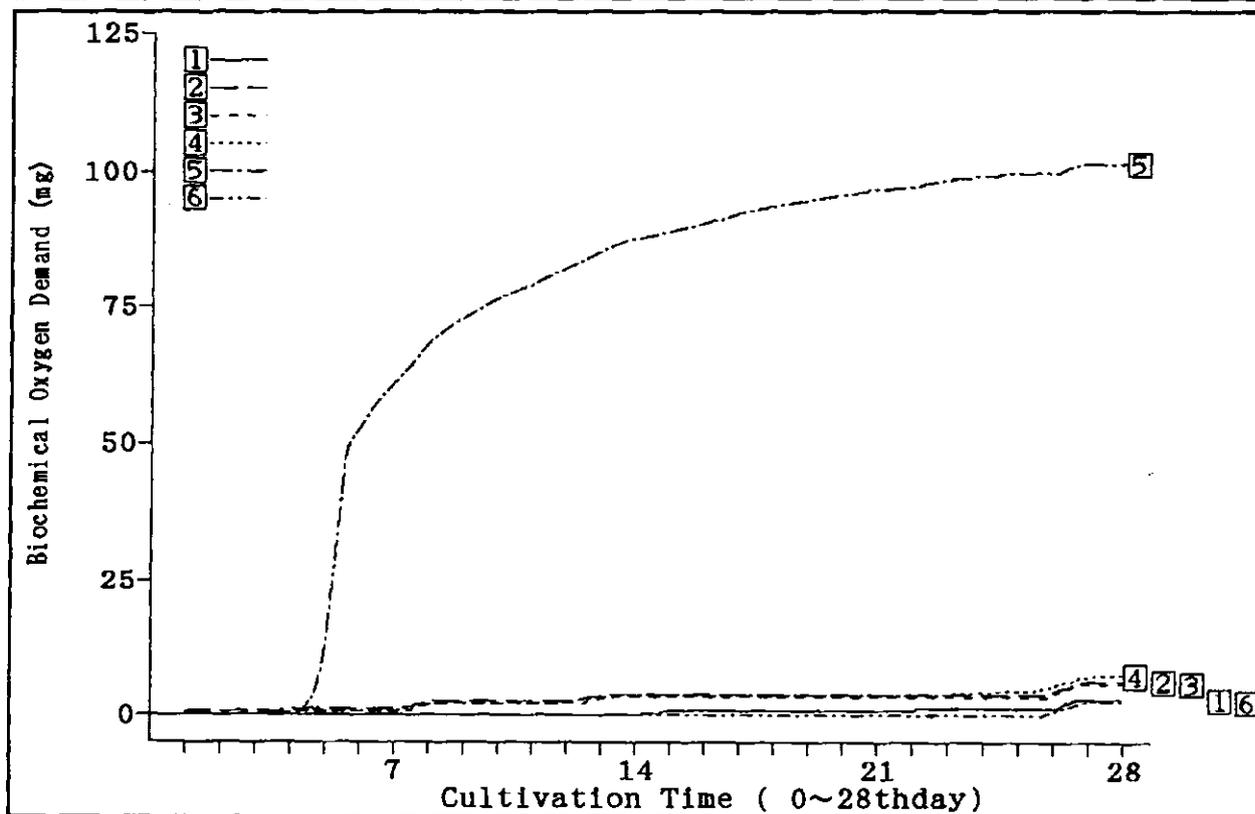
18.2 分析に使用した試薬

酢酸エチル : 関東化学製 試薬一級
硫酸アンモニウム : ナカライテスク製
塩酸 : 関東化学製 試薬特級

Fig.1 Chart of BOD

Test No.	21228	(Test substance	K-1228)
Apparatus	No. CM-6			
Cultivating conditions:				
Concentration				
Test substance	100	(mg/ℓ)		
Reference substance(aniline)	100	(mg/ℓ)		
Activated sludge	30	(mg/ℓ)		
Temperature	25 ± 1° C			
Duration	28days(Dec.27~Jan.24,1995)			
Note: Regular test Regular condition				

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Control blank [B]	0.0	0.0	0.9	3.1
②	Sludge + Test substance	1.2	3.8	3.8	6.5
③	Sludge + Test substance	0.8	3.4	3.4	6.0
④	Sludge + Test substance	0.7	3.7	3.7	7.3
⑤	Sludge + Aniline	61.2	87.7	96.7	101.5
⑥	Water + Test substance	0.0	0.0	0.0	2.6



1995.01.24 Name XXXXXXXXXX