

最 終 報 告 書

アミノ酢酸（被験物質番号 K-1163）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

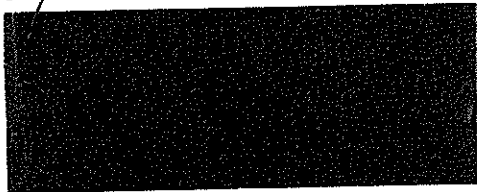
試験の表題 アミノ酢酸（被験物質番号 K-1163）の微生物による分解度試験

試験番号 21163

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9日

運営管理者



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	19
15. 試験結果	19
16. 試資料の保管	22
17. 備 考	22
18. 表及び図の内容	24
付 表	
付 図	

最終報告書

試験番号 21163

- | | |
|----------------|---|
| 1. 表 題 | アミノ酢酸（被験物質番号 K-1163）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 | 被験物質K-1163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）に規定するく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」（May 12, 1981）に定める'301C, Ready Biodegradability : 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」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 4年11月25日

(2) 試験液培養開始日 平成 5年 2月18日

(3) 試験液培養終了日 平成 5年 3月 4日

(4) 試験終了日 平成 5年 3月23日

8. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

[REDACTED]

活性汚泥管理責任者

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9. 最終報告書作成日

平成 5年 3月23日

作成者 [REDACTED]

10. 最終報告書の承認

平成 5年 3月23日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

11. 被 験 物 質

本報告書において被験物質K-1163は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 アミノ酢酸

11.2 構造式等

構造式 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$

分子式 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$

分子量 75.07

11.3 純 度^{*1} 99.0%以上

*1  資料による。

11.4 入手先、商品名、等級及びロット番号

- (1) 入 手 先
- (2) 商 品 名
- (3) 等 級
- (4) 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-11参照）。また、質量スペクトル（図-12参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図-13参照）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-11参照）。

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

12.5 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」の懸濁物質 (JIS K 0102-1986 の 14.1) に準じて行った。

測定実施日 平成 5年 2月15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」の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、pHを7.0に調整した。

(3) 基準物質

アニリンを用いた。

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, Na1

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℃

試験液培養期間 14日間

実施場所 511クーロ室

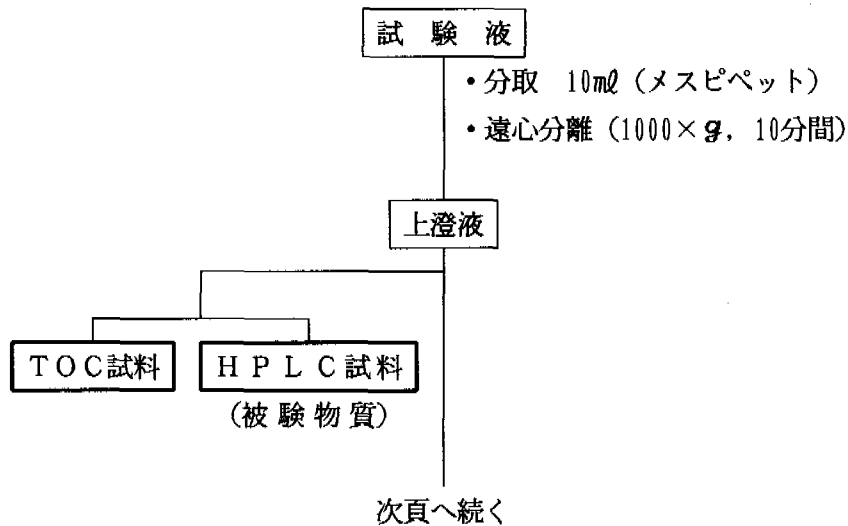
13.4 試験液の分析

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。また、(汚泥+被験物質)系及び汚泥ブランク系の試験液について、試験液中に残留しているアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素を分析した。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。また、(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、アンモニア態窒素及び亜硝酸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、硝酸態窒素を分析するための紫外可視分光光度法(UV-VIS)試料とした。

フロースキーム



前頁より続く

[(汚泥+被験物質) 系及び汚泥ブランク系]

- 分取 1ml
(ホールピペット)
- 定容 10ml
(精製水, メスフラスコ)
- 分取 1ml
(ホールピペット)
- 定容 10ml
(精製水, メスフラスコ)

F I A 試料

(アンモニア態窒素及び
亜硝酸態窒素)

- 分取 2.5ml (ホールピペット)
- ← サリチル酸ナトリウム・
水酸化ナトリウム溶液^{*4} 1ml
(ホールピペット)
- ← 20g/l塩化ナトリウム溶液 1ml
(ホールピペット)
- ← 1g/lスルファミン酸アンモニウム
溶液 1ml (ホールピペット)
- 乾固 (水浴上にて蒸発乾固)
- ← 硫酸 2ml (ホールピペット)
- 放置 (10分間, 時々振り混ぜる)
- ← 精製水 10ml (ホールピペット)
- 冷却
- ← 400g/l水酸化ナトリウム溶液
10ml (ホールピペット)
- 定容 25ml (精製水, メスフラスコ)

U V - V I S 試料

(硝酸態窒素)

*4 サリチル酸ナトリウム 1g を 0.4g/l水酸化ナトリウム溶液に溶解して 100ml
に定容。

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80.0mgC/ℓのピーク面積を測定して検量線を設定し、TOC試料のDOC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て調製した。

溶存有機炭素の検出下限は、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、1.5mgC/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℃
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）。

被験物質の検出下限は、クロマトグラムのノイズレベルを $2000\mu V \cdot sec$ （ピーク面積）とし、3.1mg/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	CAPCELL PAK C ₁₈ 15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	5 mmol/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム含有 りん酸二水素カリウム溶液 ^{*5}
流 量	1.0 ml/min
測 定 波 長	210 nm (図-10参照)
注 入 量	50 μl
感 度	
検 出 器	0.02 ABU/FS
記 録 計	ATTEN 2 ³

*5 5 mmol/l りん酸二水素カリウム溶液をりん酸 (1+10) でpH 2.0に調整。

(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）。

(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クロマトグラム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、クロマトグラムのノイズレベルを $13000\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ （ピーク面積）とし、 $0.008\text{mgN}/\ell$ 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	30秒
イ	ン	25秒
イ	ン	2分10秒
波	長	640nm
感	度	
検	出	レンジ $0.1\text{ABU}/\text{FS}$
記	録	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-
5参照）。

(4) フローインジェクション分析法による亜硝酸態窒素の分析

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亜硝酸態窒素を分析した。F I A試料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 0.4mgN/ℓ 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-5、図-6参照）。

亜硝酸態窒素の検出下限は、クロマトグラムのノイズレベルを 33000 μ V \cdot sec（ピーク面積）とし、0.008mgN/ℓ 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℃
ウォーターバス温度	30℃
オープン温度	30℃
流 量	ポンプ1 2.0ml/min ポンプ2 2.0ml/min
パ ー ジ	30秒
インジェクト	10秒
インターバル	2分30秒
波 長	540nm
感 度	
検 出 器	レンジ 0.1ABU/FS
記 録 計	ATTEN 64

(b) 反応試薬の調製

①スルファニルアミド溶液

スルファニルアミド10gを塩酸(1+1) 約 300mLに加え、約10分間攪拌後、精製水で1ℓにし、さらに超音波照射を約10分間行った。

②N-(1-ナフチル) エチレンジアミン溶液

N-(1-ナフチル) エチレンジアミン 0.5gを精製水に溶解して1ℓに定容した。

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49.3mg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-7参照)。

(5) 紫外可視分光光度法による硝酸態窒素の分析

前処理を行って得られたUV-VIS試料について下記定量分析条件に基づき硝酸態窒素を分析した。UV-VIS試料中の硝酸態窒素の濃度はデータ処理装置で得られた標準溶液0.4mgN/ℓの吸光度とUV-VIS試料の吸光度とを比較し、比例計算して求めた(表-6、図-8参照)。

硝酸態窒素の検出下限は、ノイズレベルを0.030Abs(吸光度)とし、0.01mgN/ℓとした。

(a) 分析機器の定量条件

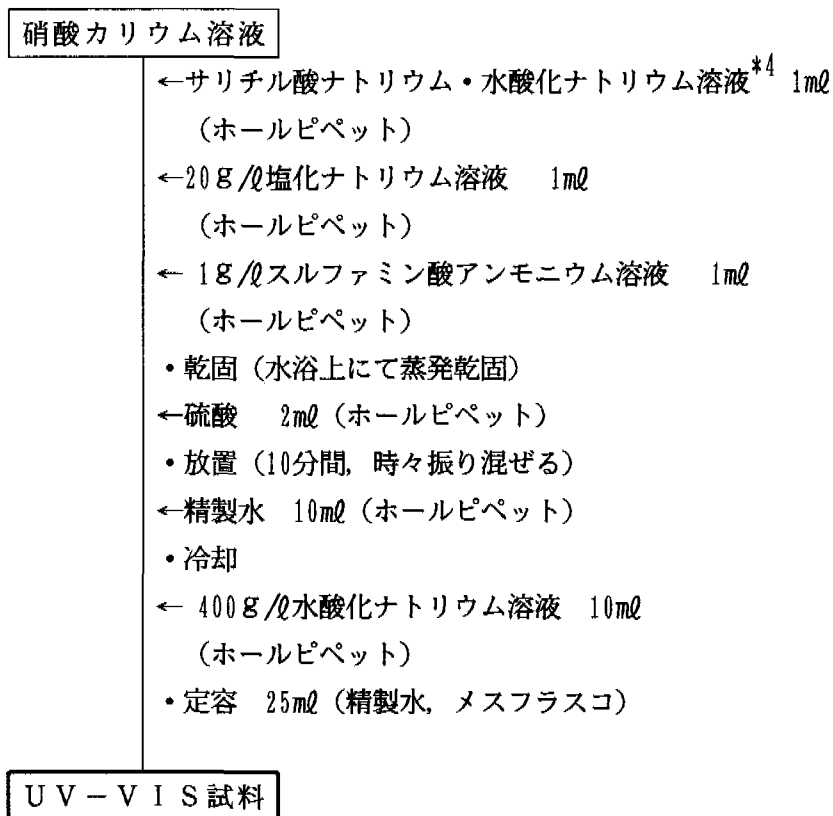
機	器	紫外可視分光光度計
対	照	精製水
セ	ル	30mm×10mm
波	長	410nm

(b) 標準溶液の調製

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った。

硝酸カリウム18.0mgを精密にひょう量し、精製水に溶解して250mgN/ℓの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して10.0mgN/ℓの標準溶液を調製した。この硝酸カリウム溶液を1ml分取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、0.4mgN/ℓの標準溶液とした。

フロースキーム



(c) 検量線の作成

(b) 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スペクトル上の吸光度と濃度により検量線を作成した(図-9参照)。

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^{*6} : 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)

*6 TODの算出は純度100%として計算した。

Nの形態は、NH₃ , NO₂ 及びNO₃ の生成率から算出した。

(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 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57%及び78%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 6.6
	（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 8.0
	（汚泥 + 被験物質）系	汚泥の増殖が認められた。	① 8.7 ② 6.6 ③ 6.4

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
		④	①	②	③			
B O D	(mg)	1.8	16.8	27.7	28.0	①22.1 ②35.6 ③34.3	表-1	図-1
D O C 残留	(mg)	9.8	0.4	0.1	0.0	9.6	表-2	
	*7 (%)	102	4	1	0			
被験物質残留 (HPLC)	(mg)	30.1	0.0	0.0	0.0	30.0	表-3	図-2
	*7 (%)	100	0	0	0			
アンモニア態窒素生成 (F I A)	(mgN)		5.8	2.4	2.5	5.6 (mgN)	表-4	図-4
	*7 (%)		104	43	45			
亜硝酸態窒素生成 (F I A)	(mgN)		0.3	3.4	3.2	5.6 (mgN)	表-5	図-6
	*7 (%)		5	61	57			
硝酸態窒素生成 (UV-VIS)	(mgN)		0	0.2	0.2	5.6 (mgN)	表-6	図-8
	*7 (%)		0	4	4			

*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。

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

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

15.3 分解度試験結果

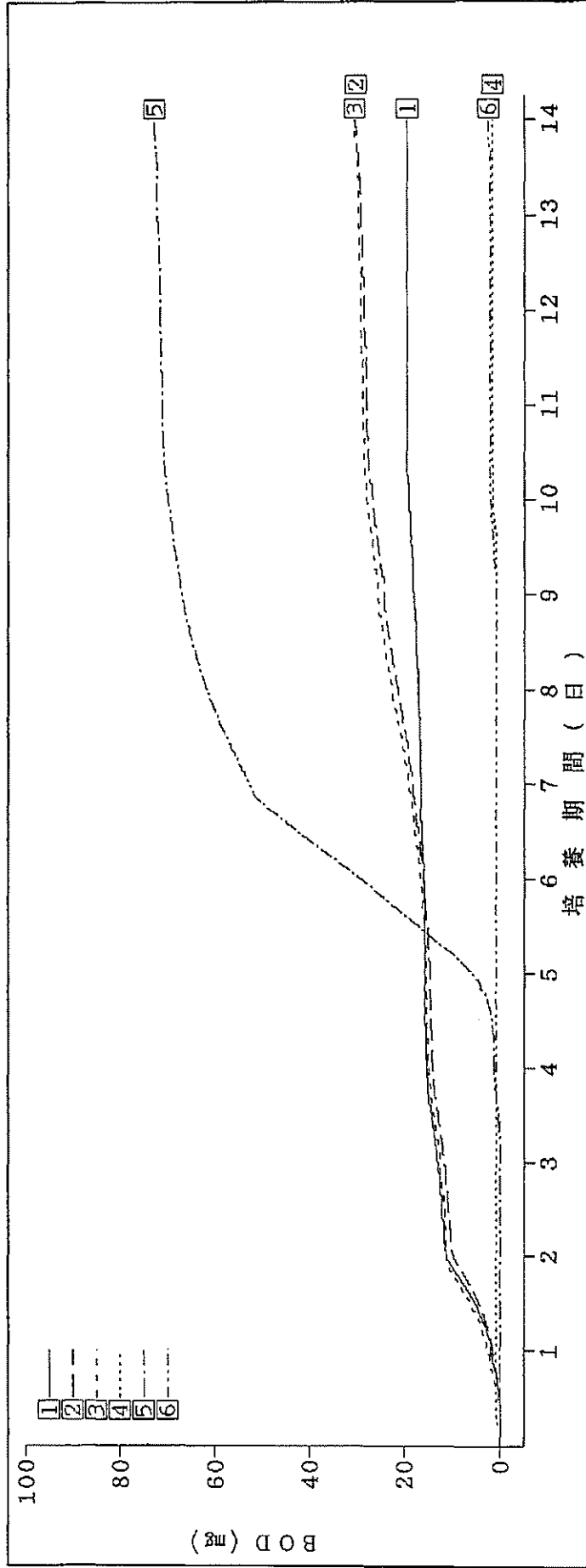
14日後の分解度は下記のとおりであった。

	分 解 度 (%)			付 表
	①	②	③	
B O D による結果	76	78	82	表-1
T O C による結果	96	99	100	表-2
H P L C による結果	100	100	100	表-3

図-1 BODチャート

試験番号:	21163 (被験物質: K-1163)
装置番号:	CM-6
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(2/18~3/4, 1993)
備考:	

試料名	BOD (mg)	
	7日	14日
① 汚泥+被験物質	16.5	19.4
② 汚泥+被験物質	18.2	30.3
③ 汚泥+被験物質	19.0	30.6
④ 水+被験物質	1.0	1.8
⑤ 汚泥+アニン	52.9	73.1
⑥ 基礎呼吸	1.0	2.6



平成5年3月4日 氏名