

＜微生物等による化学物質の分解度試験＞

I：微生物による化学物質の分解度試験（301C 相当）

I－I 適用範囲

ここでは、微生物等による化学物質の分解度試験の標準となるべき方法について規定する。

I－II 用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

I－III 活性汚泥の調製

1 汚泥採集場所

全国的な地域分布を考慮の上、多種類の化学物質が消費、廃棄されるとみられる場所を中心に全国十カ所以上とする。

2 汚泥採集回数

年間 4～6 回とする。

3 汚泥採集方法

3－1 都市下水 下水処理場の返送汚泥 1L

3－2 河川、湖沼又は海 表層水 1L 及び大気と接触している波打際の表土 1L

4 調製

各所から集めた汚泥を一つの容器内で混合かくはんして静置したのち浮んだ異物を除去し、上澄液を No.2 ろ紙を用いてろ過する。ろ液の pH を水酸化ナトリウム又はりん酸で 7.0 ± 1.0 に調整し、培養槽に移してばっ気する。

5 培養

4 によって得られた液のばっ気を約 30 分間止めたのち、全量の約 3 分の 1 量の上澄液を除去し、これと等量の 0.1% 合成下水^(注 1)を加えて再びばっ気する。この操作を毎日 1 回繰り返す。培養温度は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とする。

(注 1) 0.1% 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸二水素一カリウムおのおの 1 g を水 1L 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

6 管理

培養段階での管理は、次の項目を点検し、所要の調製を行う。

6－1 上澄液の外観 活性汚泥の上澄液は透明であること。

6－2 活性汚泥の沈でん性 フロックが大きく、沈でん性がすぐれていること。

6－3 活性汚泥の生成状態 フロックの増加が認められない場合には 0.1% 合成下水の添加量又は添加回数を増やすこと。

6－4 pH 上澄液の pH は、 7.0 ± 1.0 であること。

6-5 温度 活性汚泥の培養温度は、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ であること。

6-6 通気量 上澄液と合成下水を交換する時点において、培養槽内の液中溶存酸素濃度が少なくとも 5mg/L 以上となるように十分通気すること。

6-7 活性汚泥の生物相 活性汚泥を顕微鏡（100～400 倍）で観察したとき、雲状のフロックとともに種々の原生動物が多数見られること。

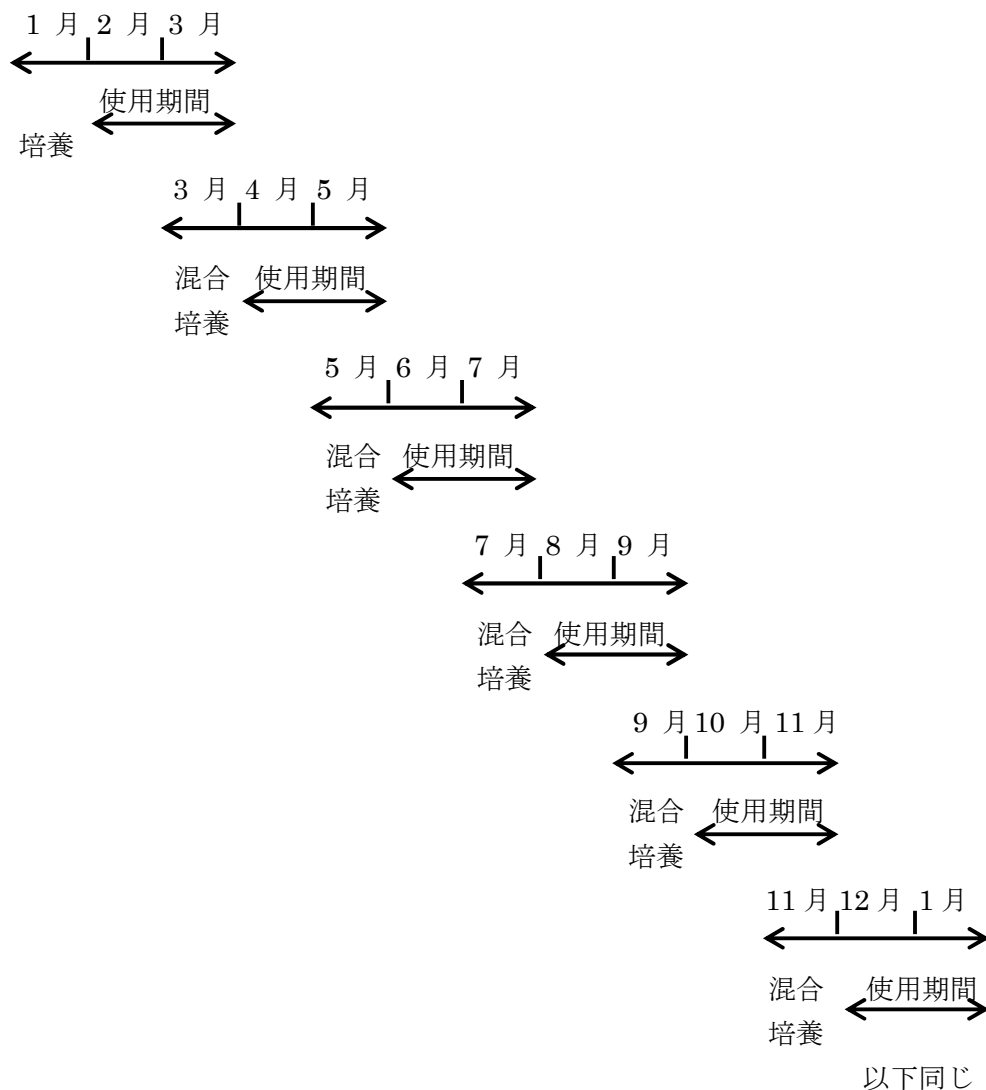
7 新旧活性汚泥の混合

新旧活性汚泥の均一性を保つため、現に試験に供している活性汚泥の上澄液のろ液と新たに採集してきた汚泥の上澄液のろ液との等量を混合し、培養する。

8 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて少なくとも 3 ヶ月に 1 回定期的に活性度を点検する。試験法は I-IV に準ずる。特に、新旧活性汚泥を混合したときは、旧活性汚泥との関連性に留意する。

[活性汚泥の調製と使用期間の例（年間 6 回採集の場合）]



I－IV 試験方法

1 分解度試験装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

JIS K0102-2008 の 21 で定められた組成の A 液、B 液、C 液及び D 液それぞれ 3 ml に水を加えて 1L とする。

3 被験物質の添加及び試験の準備

次の試験容器（各 300ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。なお、被験物質が水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎したものをうい、溶媒や乳化剤は使用しない。

3－1 水に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3－2 基礎培養基に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 3 個

3－3 基礎培養基にアニリンが 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3－4 基礎培養基のみを入れた試験容器 1 個

4 活性汚泥の接種

3－2、3－3 及び 3－4 の試験容器に JIS K0102-2008 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30mg/L になるように活性汚泥を接種する。ただし、3－2 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.0 に調整する。なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 18～24 時間後のものを使用する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で十分かきまぜながら一定期間^(注2) 培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。また、試験液の pH を測定する。
(注2) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6－1 試験条件の確認

試験終了時の被験物質の分解度の最大値と最小値の差が 20%未満であり、酸素消費量から求めた I－IV の 3－3 のアニリンの分解度が 7 日後に 40%を超えかつ 14 日後に 65%を超えときは、この試験は有効とする。

6－2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD} \text{ (注3)}} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量（測定値）(mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量（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消費量（計算値）（mg）

（注 3）窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6－3 直接定量^{（注 4）} から分解度（%）を算出する方法

$$\text{分解度（\%）} = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100$$

S_A ：分解度試験終了後の被験物質の残留量（測定値）（mg）

S_B ：水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量（測定値）（mg）

（注 4）直接定量による化学分析法

① 全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適当量分取し、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過（0.45 μ m）し、その上澄液又はろ液から適当量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

② その他の分析計を用いる場合

試験容器内の内容物を被験物質等に適した溶剤により抽出、濃縮等適切な前処理を行った後分析機器等による定量分析を行う。この場合、原則として JIS に規定された分析法通則（ガスクロマトグラフ分析法、吸光光度分析法、質量分析法、原子吸光分析法等）に従い分析を行う。

I－V 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

Ⅱ：微生物による化学物質の分解度試験（301F 相当）

Ⅱ－Ⅰ 適用範囲

ここでは、微生物等による化学物質の分解度試験の標準となるべき方法について規定する。

Ⅱ－Ⅱ 用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

Ⅱ－Ⅲ 植種源（微生物源）

地方自治体が管轄する主として家庭排水を処理する下水処理場の好氣的反応槽（出口付近）の活性汚泥又は返送汚泥を用いる。下水処理場より汚泥を採取後、必要に応じてふるい等を用いて大きな粒子を除去し、試験に使用するまで好氣的条件を維持する。採取当日に汚泥を使用しない場合は、約 22℃で好氣的条件を維持し、採取後 7 日間使用してよい。なお、被験物質、基準物質（アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム）及びその他の化学物質を用いてじゅん化してはならない。

Ⅱ－Ⅳ 試験方法

1 分解度試験装置

酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

以下に示したA液、B液、C液及びD液を調製する。A液 10 mL、B液 1 mL、C液 1 mL 及びD液 1 mL に水を加えて 1 L とし、これを基礎培養基とする。

A液：

りん酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 8.50 g

りん酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 21.75 g

りん酸水素二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33.40 g

又はリン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 67.21 g

塩化アンモニウム (NH_4Cl) 0.50 g

上記を水に溶解させ 1 L とする。また、pH を 7.4 に調整する。

B液（JIS K0102-2013 の 21 で定められたC液に相当）：

塩化カルシウム (CaCl_2) 27.50g

又は塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36.40 g

上記を水に溶解させ 1 L とする。

C液（JIS K0102-2013 の 21 で定められたB液に相当）：

硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g

上記を水に溶解させ 1 L とする。

D液（JIS K0102-2013 の 21 で定められたD液に相当）：

塩化鉄 (III) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

上記を水に溶解させ 1 L とする。なお、本液は使用する直前に調製する。

3 被験物質の添加及び試験の準備

3-1～3-3の試験容器（例：各 300 ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。被験物質が固体で水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎等を実施したものをを用いる。

必要に応じて3-4～3-9の試験容器を追加してよい。微生物への阻害性がある被験物質については、微生物への阻害を低減する目的で低濃度での分解性を評価する3-5及び3-6を追加してよいが、その妥当性（被験物質に微生物への阻害性があること等）を示すこと。また、難水溶性物質については、試験液中における被験物質と微生物の接触を改善する目的で補助物質（溶媒、乳化剤又は担体）を使用した3-7～3-9を追加してよいが、その妥当性（補助物質に生分解性や微生物への阻害性がないこと等）を示すこと。

- 3-1 基礎培養基に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3-2 基礎培養基に基準物質（アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム）が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3-3 基礎培養基のみを入れた試験容器 2 個

<非生物的影響を確認する場合>

- 3-4 精製水に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 任意の個数

<微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合>

- 3-5 基礎培養基に被験物質が 30 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3-6 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び基準物質（100 mg/L となる量）を添加したものを入れた試験容器 任意の個数

<難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合>

- 3-7 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3-8 基礎培養基に基準物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3-9 基礎培養基に補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 2 個

4 植種源の接種

3-1～3-3の試験容器に JIS K0102-2013 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30 mg/L となるように植種源を接種する。ただし、3-1については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

試験容器を追加する場合は3-5～3-9にも同様に植種源を接種する。ただし、3-5～3-9については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで $22 \pm 1^\circ\text{C}$ で十分かくはんしながら一定期間^(注5) 培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物

質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。また、試験液の pH を測定する。

(注 5) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6-1 試験条件の確認

試験終了時において、Ⅱ-Ⅳの 3-1 の分解度の最大値と最小値の差が 20%未満、Ⅱ-Ⅳの 3-3 の酸素消費量が 60 mg/L 以下、さらに酸素消費量から求めたⅡ-Ⅳの 3-2 の基準物質の分解度が 14 日後までに 60%に達するときは、この試験は有効とする。

6-2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{BOD} - \text{B}) / \text{TOD}^{(\text{注 6})} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量（測定値）(mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量（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消費量（計算値）(mg)

(注 6) 窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6-3 直接定量^(注 7) から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{B} - \text{A}) / \text{B} \times 100$$

A：分解度試験終了後の被験物質の残留量（測定値）(mg)

B：被験物質の添加量（理論値）(mg)

(注 7) 直接定量による化学分析法

① 全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適当量分取し、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過 (0.45 μm) し、その上澄液又はろ液から適当量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

② その他の分析計を用いる場合

試験容器内の内容物を被験物質等に適した溶剤により抽出、濃縮等適切な前処理を行った後分析機器等による定量分析を行う。この場合、原則として JIS に規定された分析法通則（ガスクロマトグラフ分析法、吸光光度分析法、質量分析法、原子吸光分析法等）に従い分析を行う。

6-4 備考

Ⅱ-Ⅳの 6-2 において酸素消費量から分解度を算出する際、必要に応じて 10%に達した時から 10 日間 (10-d window) 以内に 60%に達するか否かを確認してもよい。

Ⅱ-V 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。