

계면활성제의 생분해도 측정방법

(주) 럭키 생활건강연구소

선임연구원 이 민 호

목 차

1. Risk assessment
2. 생분해의 정의
3. 일차적 생분해 실험법
4. 최종적 생분해 실험법
5. 기 타

계면활성제의 생분해도 측정방법

1. Risk assessment

화학물질의 환경안전성은 i) 화학물질이 자연환경에 방출된 후의 운명(fate)을 조사하는 생분해도 측정, ii) 생태계 생물에게 미치는 영향을 조사하는 환경독성 측정 등의 2가지 기준에 의해 평가된다. 즉 생분해도 및 생물군집에 미치는 영향(환경독성)에 대한 정보는 그 물질이 환경에 방출되어도 생태계에 영향을 미치지 않는 수용가능수준(acceptable level)을 결정하는데 있어 중요한 판단기준이 될 수 있다. 이와 같이 화학물질이 환경에 대해 무해한 농도, 즉 특별한 독성을 나타내지 않는 농도(PNEC; Predicted No Effect Concentration)는 연간 총생산량, 사용량, 사용패턴 그리고 생분해도를 근거로 산출되는 잔류가능농도(PEC; Predicted Environmental Concentration)와의 비교로 그 화학물질이 환경에 미치는 영향을 평가하는 지표로 사용된다. 즉 화학물질의 PEC/PNEC가 1보다 작을 경우 이 물질은 환경에 대하여 안전한 것으로 간주된다.

Elements of the environmental safety assessment of chemicals

	Substance-inherent properties		"Ambient conditions"
	Environmental fate	Environmental effects	
Criteria	<ul style="list-style-type: none"> - Biodegradation - other factors eg., - elimination - abiotic degradation - mobility - bioaccumulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Ecotoxicity - other effects: eg., metal remobilization eutrophication 	eg., - usage quantities - usage pattern - sewage treatment - dilution factors
Assessment	Comparison of Exposure : (Predicted) Environmental Concentration(PEC) Effect data : Predicted No Effect Concentration(PNEC)		
Evaluation	No hazard : PEC < PNEC		

이와같은 화학물질의 환경안전성 평가를 risk assessment라 한다. Risk assessment는 Fig. 1과 같은 3단계로 구성되어 있으며, 하위에서 상위단계로 갈수록 이용되는 환경자료가 복잡해지는 반면 실제 환경과 유사해지게 된다.

- 1단계 (Screening phase) : 이미 많은 연구가 진행된 몇가지 화학물질들을 대상으로 간단한 생분해도 결과 및 급성환경독성 결과만을 이용하여 환경에 미치는 영향 파악함
- 2단계 (Confirmatory phase) : 하수처리장이나 실제 환경을 모델링한 실험실적 장치를 이용하여 생분해도 및 독성을 측정함
- 3단계 (Investigative phase) : 환경안전성의 평가에 가장 적절한 방법으로 실제 환경에서 화학물질의 운명(fate)을 평가. 그러나 이 방법은 모든 화학물질에 적용되어야 할 필요는 없으며, 우선 무엇보다 정확하고 신뢰할 수 있을 정도의 양적자료를 축적하는 것이 중요함

이러한 Risk assessment에서 특정화학물질의 PEC는 그 물질의 총생산량, 사용량, 그리고 생분해도를 고려하여 수학적으로 계산하거나 또는 실제 자연환경상에서의 측정을 통하여 구하게 된다. 그러나 어떠한 경우든지 미생물에 의한 생분해도의 평가는 최종적 계산치를 좌우하는 큰 요인으로 작용하게 된다.

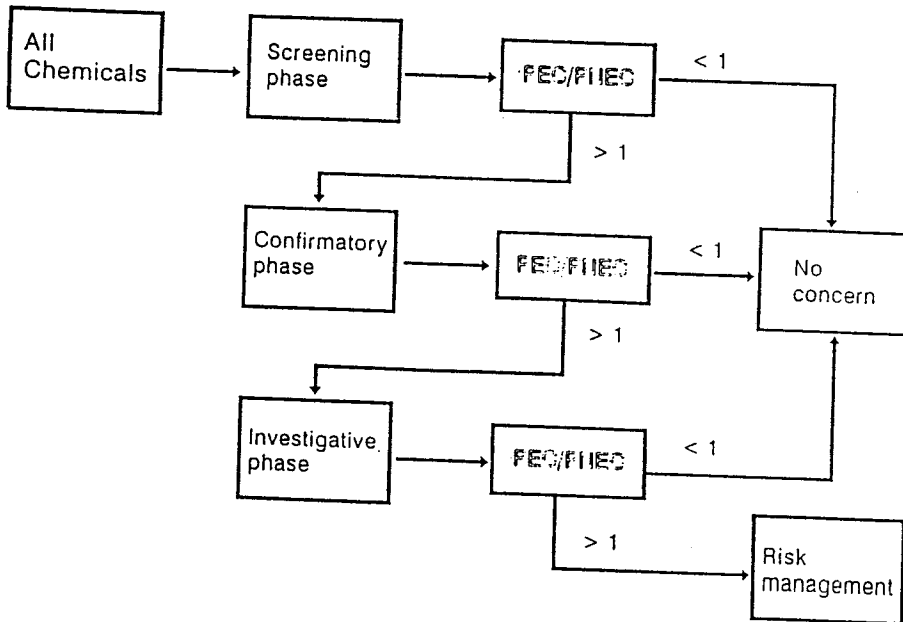


Fig. 1. Stepwise approach for environmental hazard/risk assessment

2. 생분해 (Biodegradation)의 정의

생분해란 유기물질이 미생물에 의해 분해되어 미생물의 세포물질로 전환되거나 에너지원으로 이용되어 이산화탄소(CO₂)와 물(H₂O)로 분해되는 것을 말한다.

생분해는 그 분해정도에 따라 다음과 같이 3 단계로 나뉘어 정의 된다 (Water Pollution Control Federation, 1967).

- 1) 일차적 (기능적) 생분해 (Primary biodegradation) : 유기물질이 가지고 있는 특성을 잃어버릴 정도 혹은 그 유기물질을 분석하는 특정 방법으로 분석되지 않을 정도의 분해.
- 2) 환경이 수용할 수 있을 정도의 생분해 (Environmentally acceptable biodegradation): 유기물질이 환경에 좋지 않은 성질을 잃어 버릴 정도의 분해. 실질적으로 1)과 2)는 일치하는 경우가 많다.
- 3) 최종적 생분해 (Ultimate biodegradation) : 유기물질이 이산화탄소와 물 및 무기염으로 완전 분해되거나 미생물의 세포물질로 전환되는 것.

이처럼 생분해 현상을 나누어 생각하면, 어떤 내용의 분해도를 평가하느냐에 따라 이용하는 생분해 실험방법 특히 정량방법이 달라지게 된다.

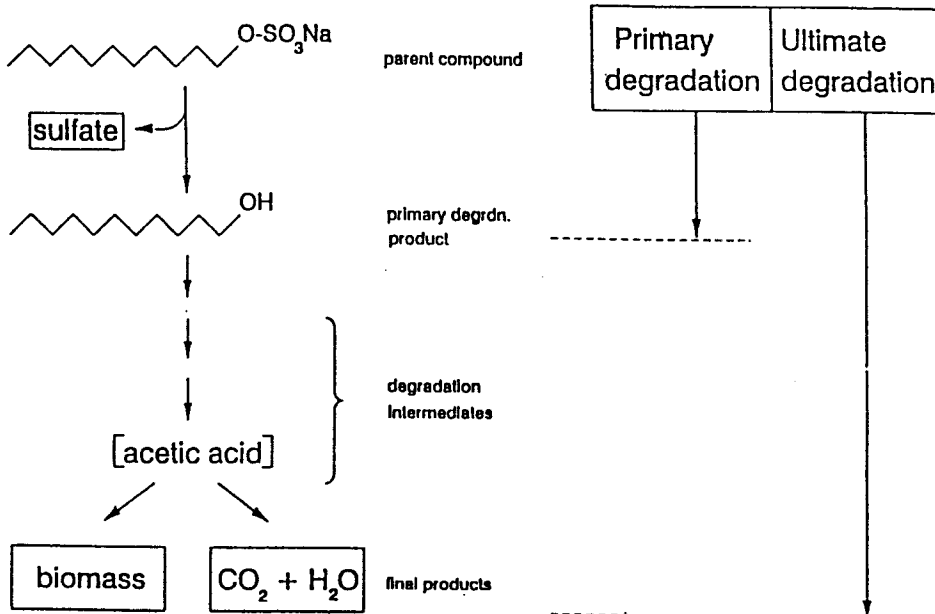


Fig. 2. Terms of biodegradability evaluation (example: fatty alcohol sulfate)

음이온 계면활성제중 가장 널리 사용되고 있는 LAS와 AS의 생분해 경로는 아래와 같다.

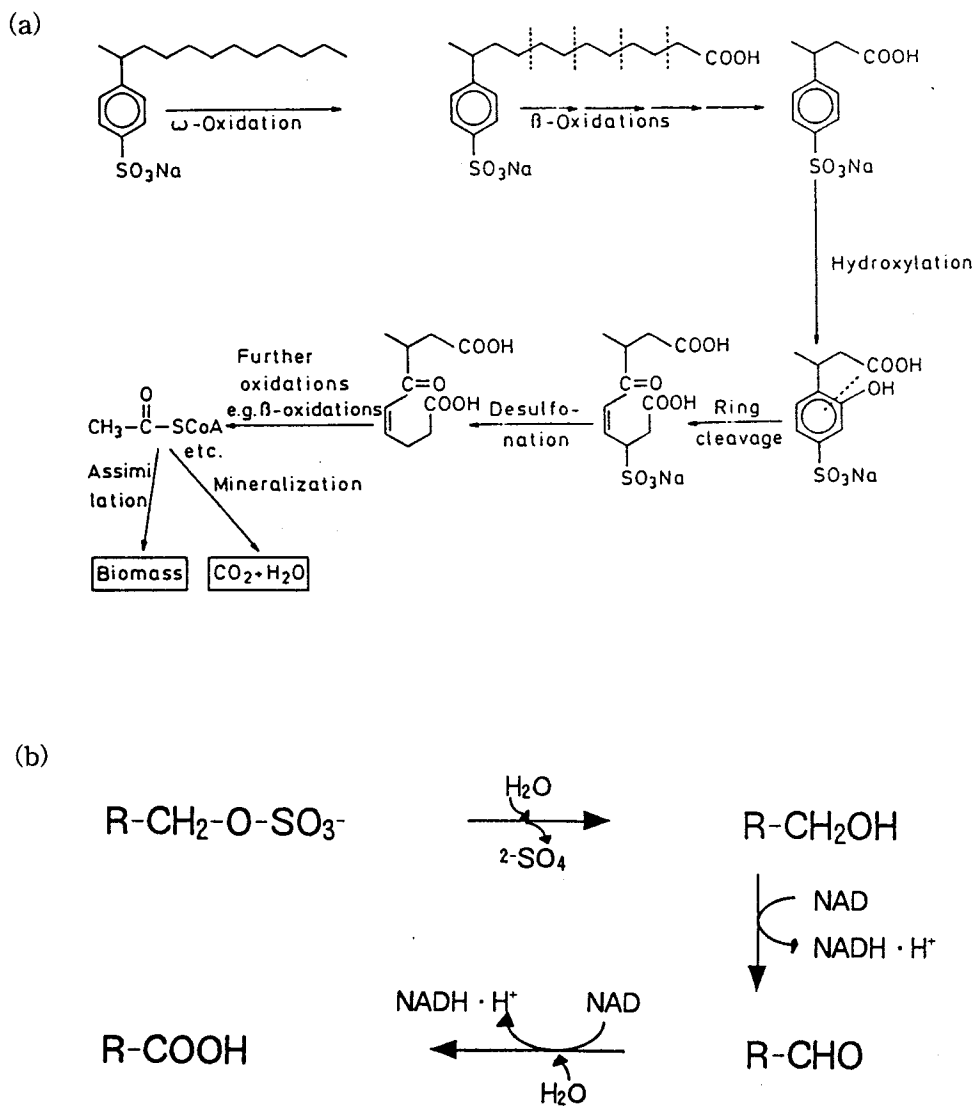


Fig. 3. Main biodegradation pathways of LAS (a) and AS (b).

3. 계면활성제의 일차적 생분해 실험법

세계각국에서는 1960년대부터 계면활성제의 생분해 공정실험법을 채택하여 세제 등에 의한 환경오염을 규제하고 있다. 미국의 경우 1964년 진탕배양법과 반연속식 활성오니법을 ASTM¹ presumptive test 와 confirming test 법으로 채택하였으며, 일본의 경우 1967년 진탕배양법을 JIS² 규격으로 채택하였다. 우리나라에서도 1974년 진탕배양법을 KS³규격으로 채택하여 세제등의 생분해 실험에 이용하고 있다. 반면 유럽의 주요 국가들을 중심으로 공통적으로 사용되고 있는 OECD⁴ 생분해 실험법에서는 진탕배양법 (이 실험법은 ASTM, JIS 및 KS의 진탕배양법과 약간의 차이가 있어 앞으로 ASTM, JIS, KS 의 진탕배양법은 진탕배양법 A, OECD 의 진탕배양법은 진탕배양법 B로 표기 하겠슴) 과 연속식활성오니법을 OECD screening test 와 confirmatory test 로 각각 채택하여 계면활성제의 생분해도를 평가하고 있다.

KS, JIS	ASTM	OECD
진탕배양법 A - 90% 이상 : 합 격 - 90% 미만 : 불합격	1) Presumptive test (진탕배양법 A) - 90% 이상 : 합 격 - 80-90% : Confirming test 실시 - 80% 미만 : 불합격 2) Confirming test (반연속식활성오니법) - 90% 이상 : 합 격 - 90% 미만 : 불합격	1) Screening test (진탕배양법 B) - 80% 이상 : 합격 2) Confirmatory test (연속식활성오니법) - 80% 이상 : 합격

1. ASTM : American Society for Testing and Materials
2. JIS : Japanese Industrial Standards
3. KS : Korean Industrial Standards
4. OECD : Organization for Economic Co-operation and Development

3.1 KS, JIS의 생분해 실험법

한국과 일본에서 계면활성제의 생분해 공정법으로 사용하고 있는 실험법은 진탕 배양법 A (shake flask test A) 이다. 이 실험법은 무기영양염과 효모추출물 (yeast extract)을 함유한 배지에 계면활성제를 30mg/l 넣고 2회 순화배양시킨 활성오니 (activated sludge)를 접종한 후 25 °C에서 8 일간 진탕배양하며 계면활성제가 생분해되는 정도를 조사하는 것이다.

실험기간동안 감소하는 계면활성제의 양은 음이온 계면활성제의 경우 methylene blue active substances (MBAS) 법으로, 그리고 비이온 계면활성제의 경우 cobalt thiocyanate active substances (CTAS) 법으로 평가한다. 이 실험방법에 의해 계면활성제의 생분해도가 7, 8일 평균 90% 이상일 경우 이 계면활성제(또는 세제)는 사용할 수 있다

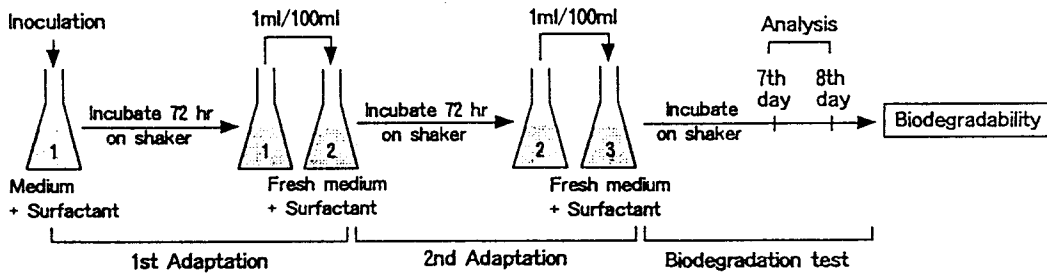


Fig. 4. The illustrating drawing of shake flask culture test A.

MBAS법은 음이온계면활성제의 sulfate와 sulfonate가 cationic dye 인 methylene blue 와 반응하여 형성한 수불용성 물질을 chloroform 으로 추출하여 흡광도를 측정하여 정량하는 방법이며, CTAS법은 비이온계면활성제의 polyoxyethylene chain 이 cobalt thiocyanate 와 반응하여 형성한 물질을 benzene으로 추출하여 흡광도로 정량하는 방법으로 이중 MBAS법은 환경 모니터링에도 사용된다.

활성오니는 각종 미생물 (세균, 효모, 사상균, 조류등), 원생생물 등으로 이루어진 50~100 μ m floc으로 유기물을 흡착, 분해시키는 기능이 우수한 특성을 갖는다. 이중

일반적으로 유기물질의 분해를 담당하는 것은 종속영양세균으로 그 수는 폭기조에서 $10^7 \sim 10^9$ CFU/ml 에 달하고 Gram negative rod 균들 (*Pseudomonas*, *Acaligenes*, *Flavobacterium* 등) 이 우점하고 있는 것으로 알려져 있다. Bacteria 이외의 원생생물등의 생명체들은 활성오니의 상태를 확인하는데 유용하게 이용되고 있으나 유기물질의 생분해에는 절대적인 역할을 하지 않는 것으로 알려져 있다.

3.2 ASTM 의 생분해 실험법

미국 ASTM의 생분해 실험법은 ASTM presumptive test 와 confirming test로 구성되어 있다. ASTM presumptive test는 한국의 KS, 일본의 JIS와 동일한 진탕배양법 A이며 음이온 계면활성제의 정량 역시 MBAS법으로 실시한다. 이 실험법에서 7, 8일차 계면활성제의 생분해도 평균값이 90% 이상일 경우 합격이며, 80-90%일 경우 confirming test를 실시하여야 하며, 80% 미만일 경우 불합격인 것으로 판정한다. Presumptive test 에서 생분해도가 80-90%인 시료를 대상으로 실시하는 반연속식활성오니법 (semicontinuous activated sludge test)은 하수처리장을 실험실적으로 간단하게 모델링한 것이다. 하수처리장의 활성오니를 폭기조에 넣고 합성하수 및 실험물질(계면활성제)를 첨가하여 23 시간동안 폭기 (aeration) 시킨다. 폭기후 1 시간동안 정체시켜 활성오니를 침전시킨 후 상등액을 제거하고 여기에 계면활성제가 포함된 새 합성하수를 첨가하여 앞의 과정을 반복한다. 이 실험법에 의한 계면활성제의 생분해도는 제거한 상등액중에 포함된 계면활성제의 농도를 MBAS법으로 측정하여 결정한다.

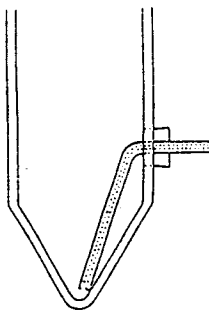


Fig. 5. Semicontinuous activated sludge aeration chamber

3.3 OECD 생분해 실험법

OECD의 계면활성제 생분해 실험법은 OECD screening test B와 OECD confirmatory test 의 두가지로 구성되어 있다. OECD screening test B는 한국과 미국, 그리고 일본에서 사용하고 있는 진탕배양법 A와는 약간 다른 방법이다. 이 실험법은 무기영양염에 계면활성제를 유일한 탄소원으로 5mg/l 첨가한 후 하수처리장의 2차 방류수를 미생물원으로 접종하며 25 °C에서 진탕배양하여 계면활성제의 생분해성을 조사한다. 실험기간(19일이내)동안 감소하는 계면활성제의 양은 음이온 계면활성제의 경우 MBAS법으로, 비이온 계면활성제의 경우 bismuth active substances (BiAS)방법으로 측정한다.

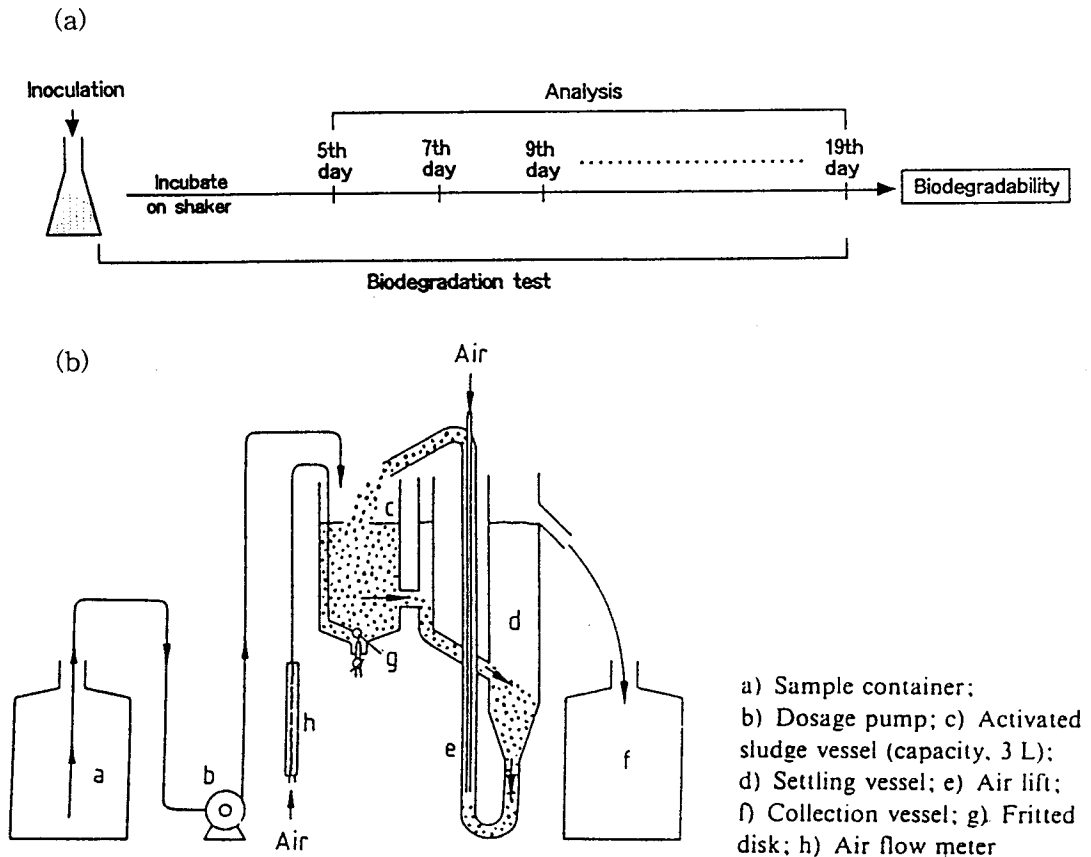


Fig. 6. The illustrating drawing of shake culture test B (a) and experimental arrangement for the OECD confirmatory test (b)

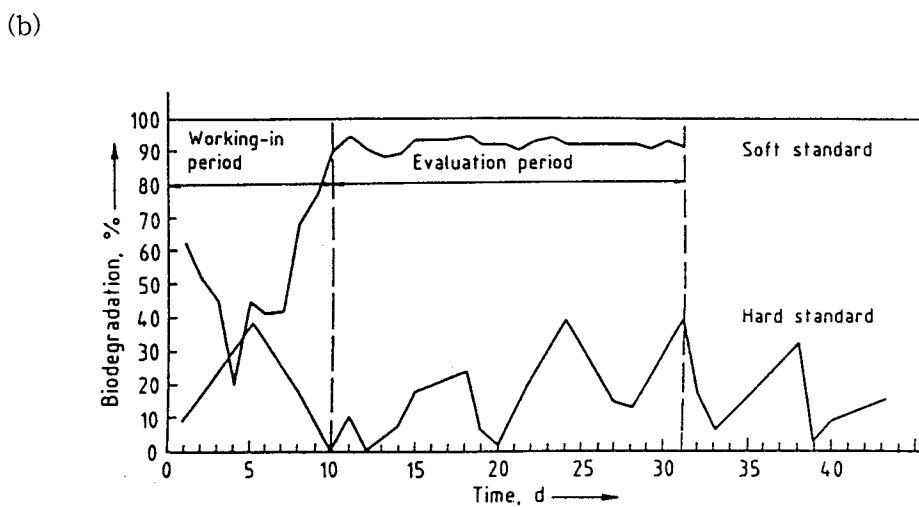
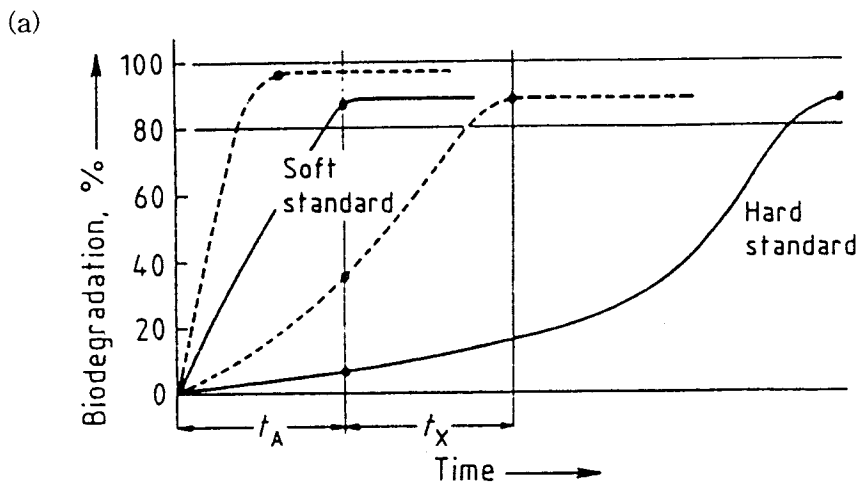


Fig. 7. Biodegradability evaluation in the OECD screening test (a) and in the OECD confirmatory test (b)

4. 최종 생분해 실험법

OECD와 EEC(European Economic Community) 등에서 계면활성제와 신규 화학물질의 생분해성을 조사하기 위해 규정한 평가기준 및 방법은 아래와 같다.

Legal basis	Chemicals concerned	Test criteria	Test methods	
			Screening test	Simulation test
<ul style="list-style-type: none"> - EEC directives - National laws 	anionic & nonionic surfactants	<p style="text-align: center;">Primary biodegradation</p> <ul style="list-style-type: none"> - MBAS removal - BiAS removal 	OECD screening test	OECD confirmatory test
<ul style="list-style-type: none"> - EEC directives - National laws 	all "new" chemicals	<p style="text-align: center;">Ultimate biodegradation</p> <ul style="list-style-type: none"> - DOC removal - BOD/COD - CO₂ formation 	<p>OECD tests for "ready biodegradability"</p> <ul style="list-style-type: none"> - Closed bottle test (≥60%) - Modif. OECD screening (≥70%) - CO₂ Evolution (≥60%) 	Coupled units test

EEC와 OECD에서는 새로운 모든 화학물질들의 생분해성은 우선 비교적 간단하고 경제적인 방법인 preliminary screening 법으로 일차 평가한 후, 필요한 경우 더 많은 비용과 시간을 투자하여 정밀한 평가를 실시하도록 단계적 평가체계를 규정하고 있다. 이 평가 체계는 ready biodegradability, inherent biodegradability, 그리고 simulation test 로 이루어 진다.

4.1 Tests for ready biodegradability

이 실험법들은 실험물질의 농도가 비교적 높고, 실험시료에 대한 미생물의 적응 시간이 짧으며, 실험물질 이외에 미생물이 이용할 어떠한 유기물을 첨가하지 않는다는 점에서 매우 엄격한 조건의 실험법이다. 이러한 실험 조건에서 28일 이내에 일정 수준 (10일 이내에 최소한 10% 이상 분해되고, BOD/COD, CO₂ 발생정도가 60% 이상, DOC 감소는 70% 이상) 분해되는 물질은 자연환경에서 빠르고 완전하게 분해되는("readily biodegradable") 물질인 것으로 평가한다.

"ready biodegradability"를 평가하는 실험법들은 다음과 같다.

Test Method	Duration	Determinant	Rank	
Closed Bottle	28days	O ₂ uptake	Most stringent †	
Modified MITI	28days	O ₂ uptake/DOC		
Modified OECD Screening	28days	DOC/Specific analysis		
Manometric Respirometry	28days	O ₂ uptake(DOC, Specific analysis)		
Modified AFNOR	28days	DOC/Specific analysis		Least Stringent ‡
Modified STURM	28days	CO ₂ /DOC/Specific analysis		

† Test conditions less favourable to degradation of test substance

‡ Test conditions more favourable to degradation of test substance

4.2 Tests for inherent biodegradability test

이 실험법들은 시료를 장시간 미생물에 노출 시키는 것으로 ready biodegradability 평가법 들보다 시험물질이 분해되기 좋은 실험조건의 실험이며, 여기서 실험물질이 일정수준 이상의 분해도를 보일 경우 이 물질은 "inherently biodegradable"한 물질인 것으로 평가한다. 그러나 이것은 화학물질이 생분해되기

좋은 실험조건에서의 실험결과이기 때문에 여기서 “inherently biodegradable” 하다고 평가된 화학물질이 자연환경에서 쉽게 분해된다고 단정지을 수는 없다.

Method	Determinant	Rank
Zahn-Wellens	DOC/Specific analysis	Stringent
Semi-continuous Activated Sludge	DOC/Specific analysis	Less stringent than Zahn-Wellens

4.3 Simulation Tests for biodegradability

이 실험법들은 어떤 특정 환경조건에서의 생분해성을 평가하기 위해 이를 실험실적으로 모델링한 것으로, 현재까지 EEC에서 인정한 것으로는 하수처리장을 모델링한 activated sludge simulation test가 있다.

5. 기타 생분해 실험법

5.1 River die-away 실험법

이 실험법은 실험 당일 채수한 하천수에 시료를 용해시키고, 항온에서 정치배양하며 일정시간마다 그 분해도를 측정하는 방법이다. 즉, 미생물원으로는 하천수중에 존재하는 미생물만을 이용하며, 별도의 미생물원을 첨가하거나 영양염류를 첨가하지 않는 것으로, 자연수를 이용한 시료의 생분해 평가방법으로 오랫동안 사용되어 왔다. 그러나 이 실험법은 실험기간이 길고, 하천수의 수질이 채수할 때마다 달라 실험결과의 재현성이 떨어진다는 문제점 등으로 인해 세계 각국의 공정법으로는 활용되지 못하고 있다.

5.2 혐기성 생분해 실험법

자연환경에 방출된 유기물들은 호기성 미생물들에 의해서 대부분 분해된다. 그러나 자연환경에는 강이나 호수의 저니(sediment), 하수처리장의 소화조(digester)와 같은 혐기성 상태가 존재하며, 따라서 혐기성 생분해 역시 화학물질의 환경영향 평가에 중요한 위치를 차지하게 된다.

현재 국제적으로 공인된 혐기성 생분해 실험법으로는 밀폐된 배양용기에 혐기성 소화오니와 시료를 배양하여 발생된 gas(CH_4 , CO_2)압과 배양액내에 존재하는 CO_2 의 양을 측정하여 생분해도를 평가하는 ECETOC (European Chemical Industry and Toxicology Center)의 방법이 있으며, 이 실험법은 1991년 ISO에 의해서도 채택되었다.

참 고 문 헌

1. ASTM, 1982, Standard test method for biodegradability of alkylbenzene sulfonates. American Society for Testing and Materials.
2. Council Directive of 31.03.1982 on the app. of the laws of the Member States relating to methods of testing the biodegradability of nonionic surfactants amending Directive 73/404/EEC (82/242/EEC), Official Journal of the European Communities, No L109/1
3. Council Directive of 31.03.1982 amending Directive 73/405/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to methods of testing the biodegradability of anionic surfactants (82/243/EEC), Official Journal of the European Communities, No. L 109/18
4. JIS, 1990, Testing method for biodegradability of synthetic detergent. Japanese Industrial Standards.
5. KS, 1992, Testing method for biodegradability of synthetic detergent. Korean Industrial Standards.
6. OECD, 1971, Pollution by detergents. Determination of the biodegradability of anionic surface active agents. Organization for Economic Co-operation and Development.
7. OECD, 1981, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 3: Degradation and Accumulation.
8. EEC, 1984, Official Journal of the European Communities, No L251
9. Swisher, 1987, Surfactant biodegradation. In Surfactant Science Series Vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York