

화학물질의 생분해성 측정을 위한 OECD 시험법의 평가

김하강 · 김 군 · 김용화 · 이영하¹

(한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성팀, ¹충남대학교 미생물학과)

적 요 - 본 연구에서는 현재 국내에서 사용되고 있는 이분해성 미생물 분해성 시험방법의 문제점을 제시하고 이를 해결하거나 보완할 수 있는 방법을 제안하고자, OECD 지침서에 등재된 6가지 이분해성 시험방법 중 시험물질의 선정에 제한이 없는 MITI(I), manometric respirometry, closed bottle test에 대하여 8개 화학물질을 대상으로 비교시험 하였다. 현재 국내에서는 MITI(I)법을 사용하고 있는데 이 방법은 접종미생물의 준비과정과 배양유지에 많은 시간과 비용을 요구하며, 배양과정을 통해 미생물의 종이 단순화되는 단점을 지니고 있다. 접종 미생물의 채취와 화학물질의 선택에 제한이 없는 새로운 방법으로는 manometric respirometry법을 들 수가 있는데, 시험방법의 용이성과 경제성, 재현성 등을 모두 고려할 때 가장 적합한 방법이라고 사료된다.

서 론

환경 중으로 유입되는 유해 화학물질은 여러 경로를 통하여 수계 환경으로 유입되고 유입된 화학물질은 광분해, 가수분해, 미생물분해 등 물리화학적 또는 생물학적 과정을 통해 분해된다. 이 중 미생물 분해(microbial degradation, biodegradation)는 유기 화학물질을 무기물과 이산화탄소로 완전분해(mineralization) 할 수 있으므로 자연계에서 매우 중요한 제거기작(removal mechanism)으로 알려져 있다. 그러나, 미생물 분해성 시험은 온도, pH, 용존산소, 풍량, 영양염류 등의 여러 변수를 조절할 수 없고 다른 물리화학적 기작에 의한 영향과 미생물 분해에 의한 기작을 구분하기 힘들 뿐 아니라 비용이 매우 높기 때문에 야외시험(field test)에 적용하기 어렵다. 따라서 실험실적 모의 환경계(microcosm, model ecosystem)를 이용하여 화학물질의 동태를 예측하게 되는데, 이를 좀더 단순화시킨 것이 활성오니에 의한 농축 및 분해성 시험이다(환경농학 편집위원회, 1991).

미생물에 의한 유해 화학물질의 분해성 시험방법은 호기적 조건에서의 분해를 주로 다루고 있는 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 지침서에 잘 나타나 있는데(OECD 1993, 1995), 실험실 조건에서 쉽고 빠르게 수행가능 하도록 screening 방법으로 개발된 6개의 이분해성 시험방법(ready

biodegradability test)이 제시되고 있다. 현재 국내에 유통되고 있는 화학물질의 수는 약 35,000여 종으로 이들 모든 화합물을 대상으로 하는 시험이 요구되고 있지만 시험기간이 오래 걸리고, 시험비용이 많이 소요되는 반면 화학물질의 life-cycle은 짧아지고 있는 추세이므로 사실상 모든 화학물질에 대한 시험은 불가능한 상황이다. 따라서, 빠른 시간 안에 화학물질의 분해성을 평가할 수 있는 screening 방법이 매우 필수적이라고 하겠다. 현재 국립환경연구원고시 제 1997-9호 "화학물질유해성시험연구기관의 지정 등에 관한 규정"중 "미생물분해시험"에서는 OECD 지침서의 이분해성 시험방법중 하나인 MITI(I) test를 제시하고 있는데, MITI(I) test가 지정되기까지 다른 시험방법과의 비교연구가 수행된 바 없으며, 또한 이 시험방법은 접종균의 배양과정과 시험물질의 처리방법 등에 문제점이 있는 것으로 지적되고 있다(Watson 1993; Yakabe and Tadokoro 1993; 한국화학연구소 1996).

본 연구에서는 OECD 지침서에 제시된 이분해성 미생물 분해시험 방법 중, 시험물질의 적용범위에 제한이 없는 MITI(I) test, manometric respirometry test, closed bottle test를 대상으로 이들 측정법의 효율성을 비교, 검토하여 보다 용이한 미생물 분해시험법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험방법

MITI(I) test를 위해서는 접종균 대조구 (inoculum blank) 1개, 시험물질구 3개, 대조물질구 1개, 대조구 1개의 500 ml 시험병 6개를 BOD meter (2173B, Hach, U.S.A.)에 장치하여 BOD incubator에 넣고 28일간 교반하였으며, 접종균은 10 ml/bottle 농도로 처리하였으며, 이때 cell 수는 10^7 cfu/ml이었다 (한국화학연구소 1996). 미생물의 대사에 의해 생성되는 이산화탄소는 시험병 윗부분에 lithium hydroxide를 넣은 고무캡에서 흡수되도록 하였으며, 소모되는 산소량은 BOD meter의 눈금으로 1일 1회 측정하였고, 시험용액은 150 ml이었다.

Manometric respirometry test는 MITI(I)법과 같은 BOD meter를 그대로 이용하되 접종균은 하수처리장 최종방류수를 5~7일간 시험온도에서 폭기시켜 완전히 starvation한 후 100 ml · L⁻¹ 농도로 사용하였다. 시험물질은 MITI(I)과 manometric respirometry법 공히 100 ppm을 처리하였으며 시험용액은 200 ml을 이용하였다.

Closed bottle test는 접종균의 처리량과 시험물질 처리량을 결정하기 위해 접종량과 시험물질 처리량에 따른 대조균의 용존산소 농도변화를 시험한 후, OECD 지침서 기준을 만족하도록 시험물질의 처리량은 1, 3, 5 ppm의 세 농도로 나누어 시행하였으며, 미생물 접종량은 3 ml · L⁻¹이었다. 각 농도에 대한 독성대조군 (toxicity control)도 함께 장치하여 각 병마다 기포가 전혀 없이 마개를 막은 후 교반하였다. 수용성이 낮은 시험물질의 처리는 유기용매에 녹여 병에 처리한 후 유기용매를 질소가스로 전부 날려보냈다.

모든 시험에 사용된 무기영양배지는 용액 A (KH₂PO₄ 8.5 g, K₂HPO₄ 21.75 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 67 g, NH₄Cl 0.5 g), 용액 B (MgSO₄ · 7H₂O 22.5 g), 용액 C (CaCl₂ 27.5 g), 용액 D (FeCl₃ · 6H₂O 0.25 g)를 각각 탈이온수 1L에 녹인 후 냉장보관 하였다가 사용하였다. 단 MITI(I) test에서 사용된 용액 A의 Na₂HPO₄ · 12H₂O와 NH₄Cl의 농도는 각각 44.6 g 및 1.7 g이었다 (Gerike & Fisher 1979, 1981).

2. 시험물질의 선정

각 시험법의 비교에 사용한 시험물질은 휘발성과 수용해도를 기준으로 나누었다. 보통 수계환경에서의 수용해도는 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$인 것을 수용해도가 낮다고 하며, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$인 것을 매우 낮다고 정의한다 (ECETOC: European centre for ecotoxicology and toxicology of

chemicals 1996). 그리고, 헨리상수가 $>0.1 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 일 때 휘발성이라고 정의한다 (ECETOC 1996). 그러나, 본 실험에서는 시험에 사용한 Hach사의 2173B형 BOD meter에서 육안으로 인식할 수 있는 BOD 눈금변화의 최소치가 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이고 이는 시험물질의 분해율을 약 10% 가량 변화시킬 수 있으므로, MITI(I) test 시험병 내에서 처리한 시험물질 100 ppm이 모두 휘발되었을 때 분해율에 10% 이상의 영향을 미치는 압력을 지닌 화학물질을 휘발성으로 판단하였으며, 이러한 화학물질로 dichloromethane, ethanol, ethyl acetate를 선정하였다. 시험물질 100 ppm이 모두 녹을 수 있는 것을 수용성 물질로 정의하여 acetonitrile, metolachlor, phenol을 선정하였으며, 물에 불용성인 것으로는 naphthalene, fenitrothion을 선정하였다 (Kanazawa 1987; Blok *et al.* 1985; Larson 1983).

결과 및 고찰

OECD 지침서에 제시된 이분해성 미생물분해 시험방법 6가지를 시험조건과 분석방법의 용이성, 적용가능한 화학물질의 범위를 중심으로 비교해 볼 때, 시험온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.0을 요구하는 MITI(I) test를 제외하고는 모든 시험법의 시험온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.4 ± 0.2 로 동일하였다. 그러나 분석방법의 용이성 면에서 CO₂ evolution test는 발생하는 CO₂를 포집하여 측정해야 하므로 적정 가능한 수준의 CO₂가 발생할 수 있을만큼의 시험용액을 많이 필요로 할 뿐 아니라, 시험기간동안 지속적인 aeration이 요구되는 등 시험과정이 매우 번거로운 것으로 평가되었다. 또한 화학물질의 적용범위와 관련하여 manometric respirometry test와 closed bottle test, MITI(I) test가 휘발성, 불용성, 흡착성 등의 물리적 성질에 관계없이 모든 화학물질에 적용 가능하였으나, DOC die-away test와 Modified OECD test는 물에 잘 녹지 않거나 휘발성이 있는 화학물질에는 적용이 불가능하여 시험물질의 선택에 제약을 받는 것으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 이분해성 미생물분해 시험방법 중 MITI(I), manometric respirometry, Closed bottle법을 대상으로 이들 시험법의 효율성 비교를 위하여 선정한 8개의 화학물질에 대한 미생물 분해시험을 수행한 결과, 세가지 시험법 모두에서 휘발성 시험물질 중 dichloromethane, 수용성 시험물질 중 농약류인 metolachlor, 불용성 시험물질 중 농약류인 fenitrothion이 미생물에 의해 쉽게 분해되지 않는 것으로 나타났으며, 나머지 생분해성 화학물질에 대해서는 manometric respirometry test에서의 분해율이 MITI(I)법의 평균 분해율보다

Table 1. Degradation rates of test chemicals by each test methods

chemicals	degradation (%)		manometric respirometry	closed bottle		
	MITI(I) mixed	MITI(I) single		1 ppm	3 ppm	5 ppm
Dichloromethane	-	3.6	-	-	-	-
Ethanol	57.0	58.0	93.6	72.2	71.2	73.4
Ethyl acetate	51.4	67.0	97.7	81.7	81.7	69.9
Acetonitrile	58.1(29.1)	50.7(27.2)	57.7(28.9)	170.0(71.9)	152.9(76.4)	108.4(54.2)
Metolachlor	-	-	-	12.0(10.8)	3.2(2.9)	1.9(0.9)
Phenol	64.2	59.0	94.2	90.0	100.8	72.5
Naphthalene	64.4	63.6	89.6	26.8	17.2	50.4
Fenitrothion	-	-	-	-	-	-

*: Data in parenthesis were calculated based on the ThOD (Theoretical Oxygen Demand) by assuming the involvement of nitrification in the degradation process.

Table 2. Degradation rates of aniline

days	Degradation rate (%)			
	MITI(I)		respirometry manometric	bottle closed
	Mixed ¹	Single ²		
7	67.5±8.6 (52.5±6.7)*	65.2±5.6 (50.7±4.4)	78.7±7.2 (61.2±5.5)	76.8±8.3 (59.8±6.4)
14	73.6±7.6 (57.3±5.9)	68.8±4.3 (53.5±3.3)	97.5±9.4 (75.9±7.3)	84.4±8.8 (65.7±6.8)
28	70.2±12.0 (54.6±9.3)	64.2±3.6 (49.8±3.1)	95.3±8.9 (74.1±6.9)	107.8±7.8 (83.9±6.1)

¹ mixed culture inoculum from 15 sites

² cultured inoculum from 1 site

* Data in parenthesis were calculated based on the ThOD (Theoretical Oxygen Demand) by assuming the involvement of nitrification in the degradation process.

Table 3. Correlation of BOD concentration of control with volume of inoculum

viable cell number (10 ⁷ cfu/ml)	dry weight (mg)	volume of inoculum (ml)	BOD concentration (ppm)
8.84	7.44	30	190
8.84	9.03	25	120
1.8	3.24	42	295
9.13	6.42	21	125
1.18	7.07	13	75
9.13	17.05	8	10
1.8	3.78	36	165
1.8	2.75	82	445
4.8	2.08	65	370
0.71	7.1	32	215
0.71	5.95	38	280
0.16	8.81	25	155

25.8%, closed bottle법 보다는 12.3% 정도 높은 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 세 가지 시험법 모두 미생물에 의한 분해가 쉽게 일어나는 것과 그렇지 않은 것을 screening 하는데 있어서 같은 결과를 보여줌으로써 생분해성을 판단하기 위한 결과 도출에는 어느 시험법을 사용하여도 무방한 것으로 판단되었다. 또한 대조물질로 사용한 aniline의 분해율은 MITI(I) test가 다른 두 시험법에 비해 약 10% 가량 낮은 분해율을 보였으나, 세가지 시험법 모두 OECD 지침서에서 제시하는 기준(7일차 45%, 14일차 60% 이상의 분해율)을 모두 만족하는 것으로 나타났다(Table 2).

OECD 지침서의 이분해성 미생물 분해시험법에서는 사용되는 미생물원을 하수, 방류수, 활성오니, 토양, 진흙, 강, 호소, 폐수처리장 등 여러 곳 중의 하나로 지정하고 있으나 유일하게 MITI(I) test에서만 최소 10곳에서 채취·혼합하여 30일 이상 1일 1회 배양액의 1/3을 0.1% 합성배지(peptone 1g, KH₂PO₄ 1g, glucose 1g, DW 1L)

로 교환해 주는 배양과정을 거쳐 사용하도록 지정하고 있다(OECD, 1993). 그러나, 1일 1회의 배양액 교환에 시간과 경비소요가 크므로 비경제적일 뿐 아니라 일정 배지만을 공급하므로 배양과정 동안 미생물종이 단순화될 우려가 있다(Watson, 1993). 실제 본 실험에서도 하수처리장 한 곳에서 채취·배양한 미생물과 15곳에서 채취·배양한 미생물을 접종균으로 이용하여 MITI(I) test에 적용하여 본 결과 시험물질의 분해율은 0.97, 대조물질의 분해율은 1.0의 상관관계를 나타내 두 접종균 간 분해율의 차이가 나타나지 않았다(Table 1, 2). 또한 혼합지역과 단일지역에서 채취한 시료를 MITI(I) 방법에 준하여 30일간 계대배양하고 평판배지에서의 콜로니 다양성을 비교하였을 때 두 시료 모두 초기에 비하여 콜로니의 단순화가 나타났으며(Fig. 1), 최종적으로 존재하는 우점 미생물들의 동정 결과 이들은 proteobacteria의 gamma group에 속하는 *Enterobacteriaceae*인 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 다양한 화학물질의

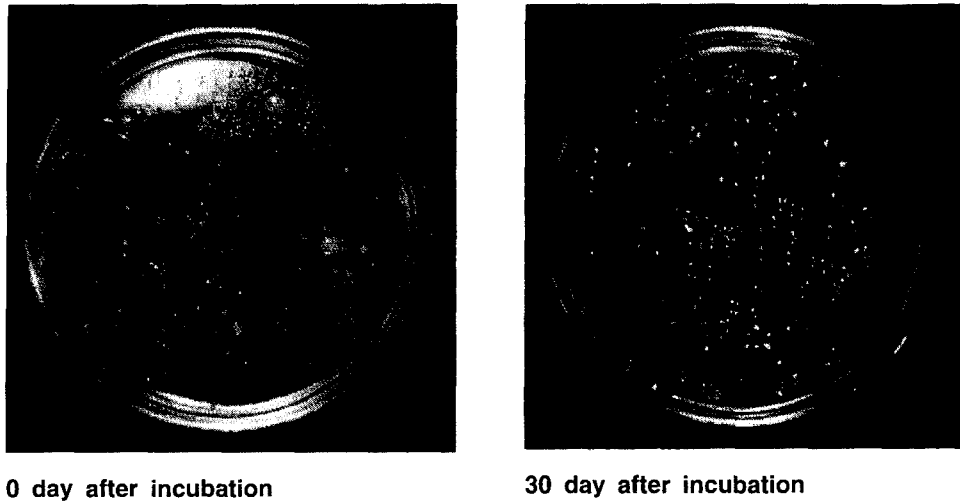


Fig. 1. Morphological simplification of MITI(I) inoculum by incubation

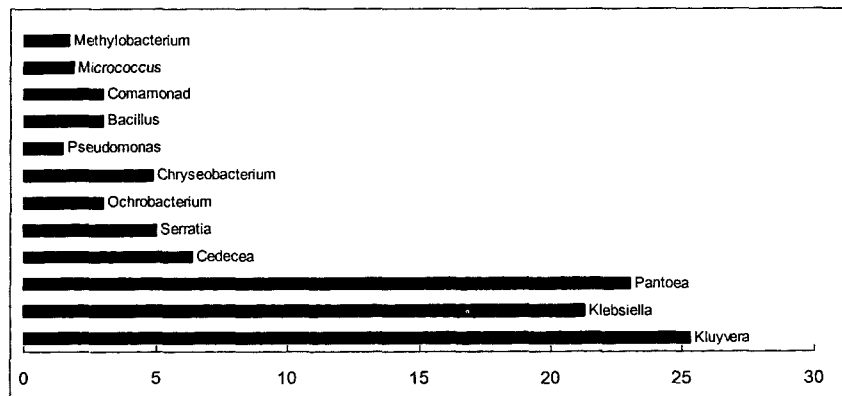


Fig. 2. Percentage of predominant genera in MITI(I) inoculum.

생분해 시험을 위하여서는 서로 다른 기능을 갖는 다양한 미생물이 접종균으로 공급될 필요가 있다는 전제하에 여러 지역에서 채취한 시료를 미생물원으로 지정하여 일정배지로 배양을 하고 있는 MITI(I) test의 문제점을 보여준다.

사용하는 접종균의 준비과정과 접종균의 균질성 유지 문제 이외에도 MITI(I) test는 여러 문제점을 지니고 있는 것으로 평가되었다. 먼저 현재의 MITI(I) test에서는 미생물을 접종할 때 건중량에 근거하여 접종하도록 되어 있는데, 배양상태에 따라 건중량이 다를 뿐 아니라 경우에 따라서는 대조구의 BOD 농도가 60 ppm 이하이어야 한다는 OECD 지침서에서 지정한 조건을 만족하지 못할 경우가 많아 시험결과와 재현성이 부족하였다. (Table 3). 또한 MITI(I) test에서는 불용성 시험물질의 처리시 유기용매나 분산제(emulsifying agent), 유화제(surfactant)의 사용을 금하고 시험용액에 직접 첨가할

것을 권고하고 있다. 그러나 이러한 방법은 처리하는 시험물질의 입자크기에 따라 분해율이 다를 수 있으므로 (Yakabe and Tadokoro, 1993) 시험물질의 균질화(homogenization) 또는 시험기간동안 교반과 같은 물리적 처리를 하는데 있어 각별한 주의를 필요로 한다. 또한, 수계환경에는 유화제나 계면활성제 같은 것들이 존재할 가능성이 높기 때문에 시험조건이 실제의 수계환경 상황을 반영하지 못하는 단점을 갖는다.

현재 우리 나라에서는 MITI(I) test가 채택되어 사용되고 있는데 시험방법의 용이성과 경제성을 고려할 때, MITI(I)법은 접종 미생물 채취와 배양유지 과정에 많은 시간과 비용이 필요하므로 개선의 여지가 많은 평가방법이라 사료된다. 이에 반하여 manometric respirometry와 closed bottle 법의 접종균은 채취지역과 장소의 수에 관계없이 한곳에서 채취하여 5~7일간 시험온도에서 폭기시켜 사용하므로 MITI(I)법에 비해 비교적 용이하였

다. 또한 closed bottle법은 처리한 시험병이 용존산소를 측정하는 날짜수만큼 필요하므로 시험장치에 수반되는 시험병이 다른 두 시험에 비해 10배 가량 많은 60~80 개에 달하며, 이들을 모두 교반해야 하는 교반기가 필요하다. 또 수용성이 낮은 시험물질의 처리시 유기용매를 다 날려보내고 무기영양배지를 넣을 때, 시험물질이 다시 병의 윗 부분으로 떠올라 각 시험병마다 균질한 농도로 시험물질을 처리하기 어려운 단점이 있었다. 한편 시험의 재현성면에서 MITI(I)법은 배양한지 3개월이 지나기 시작하면 대조물질의 분해율이 OECD 지침서의 기준을 만족하지 못하는 경우가 있었으며, 배양기간에 따라 대조물질의 분해율에도 차이를 나타냈다. 반면, manometric respirometry법이나 closed bottle법은 하수 처리장 방류수를 채취하여 완전히 starvation 시킨 후 사용하므로 대조물질의 분해율이 일정 수준으로 항상 유지되었다.

따라서 효율성, 용이성, 재현성 등의 관점에서 각 평가 방법의 장단점을 비교해 볼 때 OECD 지침서에 제시된 이분해성 시험방법 중 화학물질의 선택에 제한이 없고 미생물의 배양유지 과정이나 분해정도를 분석하는 과정이 비교적 용이한 방법으로는 manometric respirometry법이 가장 적절할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 환경농학회 편집위원회 (1991) 환경농학. 한국환경농학회. pp. 211-261.
- 한국화학연구소 (1996) 유해화학물질의 안전성평가 및 관리기술, 환경위해성 평가 및 관리기술 2단계 1차년도 연차보고서. 환경부.
- Blok J, A de Morsier, P Gerike, L Reynolds & H Wellens (1985) Harmonisation of ready biodegradability tests. *Chemosphere*. **14** : 1805-1820.
- European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals (1996) Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Technical report. No. 20.
- Gerike P & WK Fisher (1979) A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **3** : 159-173.
- Gerike P & WK Fisher (1981) A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests: Additional results and conclusions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **5** : 45-55.
- Kanazawa J (1987) Biodegradability of pesticides in water by microbes in activated sludge, soil and sediment. *Environ. Monit. Assess.* **9** : 57-70.
- Larson RJ (1983) Comparison of biodegradation rates in laboratory screening studies with rates in natural waters. *Residue Reviews*. **85** : 159-171.
- Mcallister KA, H Lee & JT Trevors (1996) Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*. **7** : 1-40.
- Meharg AA, GR Dennis & JWG Cairney (1997) Biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by ectomycorrhizal basidiomycetes. *Chemosphere*. **35** : 513-521.
- Mulbry WM, PL Del Valle & JS Karns (1996) Biodegradation of the organophosphate insecticide coumaphos in highly contaminated soils and liquid wastes. *Pestic. Sci.* **48** : 149-155.
- OECD (1993) OECD guidelines for the testing of chemicals
- OECD (1995) Detailed review paper on biodegradability testing.
- Shen J & R Bartha (1996) Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation tests. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1428-1430.
- Urano K & Z Kato (1986) A method to classify biodegradabilities of organic compounds. *J. Hazard. Materials*. **13** : 135-145.
- Vanishnav DD & ET Korthals (1991) Determination of chemical biodegradation by direct and indirect methods. *J. Ind. microbiol.* **8** : 209-212.
- Waggy GT, RA Conway, JL Hansen & RL Blessing (1994) Comparison of 20-d BOD and OECD closed-bottle biodegradation tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **13** : 1277-1280.
- Waggy GT, AC Richard, LH James & LB Ronald (1994) Comparison of 20-d BOD and OECD closed-bottle biodegradation tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **13** : 1277-1280.
- Watson HM (1993) A comparison of the effects of two methods of acclimation on aerobic biodegradability. *Environ. Toxicol. Chem.* **12** : 2023-2030.
- Yakabe Y & H Tadokoro (1993) Assessment of biodegradability of polycaprolactone by MITI test method. *Chemosphere*. **27** : 2169-2176.

Evaluation of the OECD Biodegradability Tests for Chemicals

Ha-Kang Kim, Kyun Kim, Yong-Hwa Kim and Young-Ha Rhee¹

(Environmental Toxicology Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-343 and ¹Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

Abstract - The efficiency of the OECD MITI(I) test which is designated as a standard method for measuring the biodegradability of chemicals by the Korean Ministry of Environment was evaluated and compared with those of two other OECD ready biodegradability tests : the manometric respirometry test and the closed bottle test. All the tests were applicable to a wide variety of organic chemicals and there were no significant differences in biodegradation rates of eight test chemicals and a reference chemical with three methods. However, the MITI(I) test had unnecessary expense and complexity in preparation of a mixed inoculum. Decrease in bacterial diversity during pre-conditioning of the inoculum for 1 month was observed and therefore the mixed inoculum did not ensure the presence of a variety of species in the test. Based on the simplicity, cost-effectiveness and reproducibility of the test procedure, it is considered that the manometric respirometry test is the most adequate method which can replace the MITI(I) test method. [MITI(I) test, Manometric respirometry test, Closed bottle test].