

비이온 계면활성제의 화학구조에 따른 *Closterium ehrenbergii* 대한 생태독성

김 상 길, Matsui Saburo¹, 박 희 경²

현대환경연구소 환경경영실
¹일본 경도대학 공학부 환경질연구센터
²한국과학기술원 토목공학과 환경관리연구실

Ecotoxicity of Nonionic Surfactants based on its Chemical Structure for *Closterium ehrenbergii*

Sang-Gil Kim, Saburo Matsui¹ and Heekyong Park²

Environmental Management Division, Hyundai Institute of Eco-Management,
140-2, Kye, Chongno, Seoul 110-793, Korea

¹Research Center for Environmental Quality Control, Kyoto University, Shiga, Japan

²Department of Civil engineering, Korea Advance Institute of Science and Technology,
Kusong Yusong Taejon, Korea

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the ecotoxicity to *Closterium ehrenbergii* using Nonionic surfactants based on its chemical structure. Nonionic surfactants ecotoxicity tended to increase with decreasing the number of ethylene oxide units. The *Closterium ehrenbergii* test was good in sensitivity and agreement with other published results. The use of *Closterium ehrenbergii* test offers promising potential for ecotoxicological applications.

서 론

일본의 주요 도시하수처리장에서 방류되는 음이온 계면활성제 평균농도는 0.13 mg/로 보고되고 있다.¹⁾ 더구나 하수관거가 보급되어 있지 않은 지역의 경우, 사용되어진 합성세제의 대부분은 미처리 상태로 지역하천으로 유입되고 있다. 현재에도 성능과 기능을 높이기 위한 새로운 계면활성제의 개발들이 진행되고 있으며, 계면활성제의 분자설계를 할 때 환경에 친화적인 관능기 또는 화학구조를 추천하여 환경에 대해 악영향이 적고, 생분해성이 좋은 물질을 개발하여야 할 것이다. 세탁용 중성세제와 세탁비누에 대한 *Closterium ehren-*

*bergii*의 무성 및 유성생식에 대한 증식, 치사효과 및 형태학적 영향 등의 보고는 있다.²⁾ 그러나, 상업용 세제의 원료인 계면활성제에 대한 *Closterium ehrenbergii*의 생태독성연구는 보고된 바가 없다. 본 연구는 ethylene oxide 부가형의 비이온형과 음이온형 계면활성제의 화학구조가 *Closterium ehrenbergii*의 생식에 미치는 생태독성의 파악을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

담수산이며 접합 녹조류인 *Closterium ehrenbergii*를 사용하였다. 이 조류는 영양세포의 단계에서

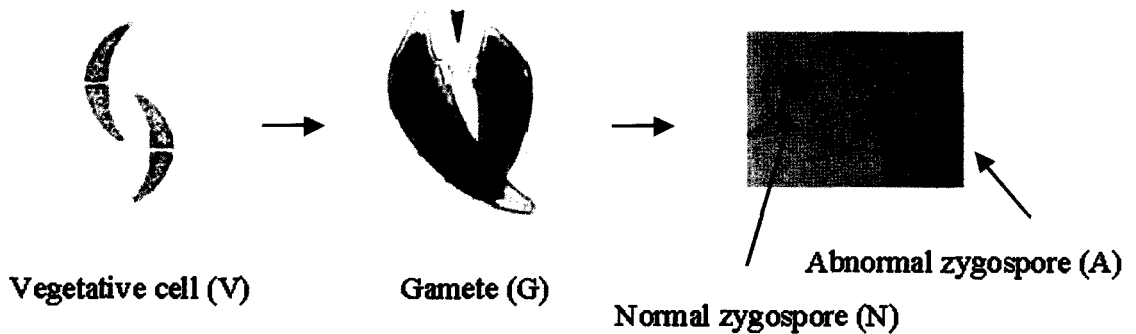


Fig. 1. Four cells types of *Closterium ehrenbergii* in sexual reproduction.

단세포이며, 약 250~300 micron 크기로 OECD의 조류시험 종 (*Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*)보다 세포의 독성발현을 관찰하기가 쉽다. 또한 형태상으로 구분되지 않으나, heterothalic strain으로 무성 및 유성생식을 한다.

특히, 유성생식과정에서는 영양세포, 배우자세포,

정상접합자, 비정상접합자와 같이 다양한 형태의 세포가 관측 가능하다 (Fig. 1).

실험에서는 A1 (M-16-4a)과 A2 (M-16-4b) strain을 사용하였으며, 무성생식은 초산형 질소가 있는 C배지를, 유성생식에는 질소분을 배제한 MIH배지를 사용하였다.

증식량 (A: area), 정상접합자의 형성비 (Y: yield), 무/유성생식영향비 (AGZI 50)의 새로운 지표를 사용하였고, 계면활성제는 일본 Surfactants공업주식회사에서 입수하였다.

	unit : mg/L	
	C medium	MIH medium
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	150	-
KNO ₃	100	-
β-Na ₂ glycero-PO ₄ ·5H ₂ O	50	50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40	40
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	100
Vitamine B ₁₂	0.0001	0.0001
Biotin	0.0001	0.0001
Thiamine HCl	0.01	0.01
Tris	500	-
HEPES	-	400
PIV Metals ¹⁾	3 mL	3 mL
pH	7.5	7.5

¹⁾ Na₂EDTA : 1,500 mg, FeCl₃·6H₂O : 194 mg, MnCl₂·H₂O : 82 mg, ZnCl₂ : 10 mg, CoCl₂·H₂O : 4 mg, Na₂MoO₄ : 8 mg, up to DW 1,000 mL

1. 실험방법

실험에 사용하기 위해 *Closterium ehrenbergii*의 A1 (M-16-4a)과 A2 (M-16-4b) strain을 C배지에 25±2°C, 2000~2400 Lux, 16/8시간의 명암조건에서 17~23 days간 배양한 세포를 사용하였다. 대수 증식기의 마지막에 다다른 세포들이 유성생식의 접합자 형성이 빨리 되었으며, 이는 독성시험에 영향이 없을 것으로 판단되었다. 무성저해시험은 세포배양 plate (Linbro 24wells)에 2C배지, 시험수, 멸균수, 세포용액 (5~10 cells/10 μL)을 넣어 96시간 배양하면서 24시간단위로 세포수, 세포의 형태, 색깔을 계측하였다. 유성저해시험은 세포배양plate

Table 2. Characteristics of tested surfactants

Surfactants	Chemical structure	EO*	Ionic type	Surfact type
S-1 Polyethoxylate oleate sorbitan	CnEO ₁₀	10	Nonionic	Alcohol ethoxylated surfactant (AE)
S-2 Polyethoxylate oleate glyceryl	CnEO ₁₅	15	Nonionic	Alcohol ethoxylated surfactant (AE)
S-3 Polyethoxylate castoroil	CnEO ₂₀	20	Nonionic	Alcohol ethoxylated surfactant (AE)
S-4 Sodium dodecyl sulfate	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na	-	Anionic	Alkyl surfated surfactant (AS)

* ethylene oxide units per mole of alcohol

(Linbro 24wells)에 MIH배지, 시험수, 멸균수, A1과 A2세포용액 (40~50 cells/10 μ L)을 넣어, 이를 27 \pm 2°C, 3000~3500 Lux, 16/8시간의 명암조건에서 96시간 배양 후 각 wells의 정상접합자, 이상접합자, 배우자세포, 영양세포를 실체현미경을 이용해 계측하였다. 또한 본 실험에 있어서 유기용매를 사용하지 않았으므로 플라스틱에서 용출되는 가소제의 영향은 없을 것으로 본다.

2. 계측 기준과 생태독성평가

본 연구에서는 영양세포의 계측에서 실험자에 의한 오차를 최소화하고 재현성을 높이기 위해 세포형태와 세포색에 따라 계측기준을 설정하였다. 그리고 독성평가의 지표는 무성과 유성시험에서 증식량과 정상접합자 형성비를 각시험의 parameter로 하였다. 무성저해시험의 평가방법은 전시험 기간중의 총 증식량을 평가하기 위해 OECD의 조류증식 저해 시험법³⁾에 따라 증식량을 면적으로 구하였다. 유성저해시험의 평가방법은 자동동수의 영양세포를 계면활성제에 노출시켜, 정상접합자, 이상접합자, 배우자세포 그리고 영양세포를 계측하였다. 여기서 정상접합자 형성비와 정상접합자형성저해율을 구하였다. 변이원성 물질과 환경생물질에서는 무성과 유성시험간에 저해농도의 차이가 있음을 보고⁴⁾하고 있다. *Closterium ehrenbergii*의 경우 증식속도가 1회/일 정도여서 다수의 세포수를 전제로하고 있는 Probit 이론의 적용에 무리가 있으며, 무성 및 유성의 50% 증식저해농도는 시험농도를 대수 축에 두고 저해량이 50%에 가장 가까운 상하 2개의 농도치를 직선으로 연결, 증식저해율 50% 선과의 교점에 상당하는 시험농도를 구하여 EC50으로 하였다.

결 과

*Closterium ehrenbergii*의 생태독성실험에서는 사용한 시험물질의 독성강도와 농도에 따라 생식 촉진, 생식저해, 치사효과 등의 결과가 나타난다. 본 연구에서는 음이온형과 비이온형 계면활성제의 독성을 무성생식과정을 이용한 무성시험에서의 증식량과 OECD의 조류시험 중 (*Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*)에서는 파악할 수 없는 *Closterium ehren-*

bergii 유성생식과정에서의 정상접합자 형성비로 사용하여 *Closterium ehrenbergii* 생식과정의 생태독성을 평가 하였다.

1. 증식치 (Growth value), 정상접합자 형성비 (Y)

*Closterium ehrenbergii*의 영양세포는 저배율 실체현미경으로 간단히 계측이 가능하므로 세포수를 증식치로 하였다. 비이온과 음이온 계면활성제의 증식치 결과는 Table 3과 같다. 96시간 경과 후 대조군의 증식치는 11~14를 보이나, 비이온 계면활성제 (S-1, S-2, S-3)의 경우 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L의 각기농도에서 S-1은 약 10.9, 8.5, 8.6, 및 0이고, S-2는 11.2, 12.8, 6.6, 5.8, 0이며, S-3는 11.3, 12.6, 11.9, 8.7, 0이었다. 이에 반해 음이온 계면활성제 (S-4) 경우농도별로 12.6, 0, 0, 0, 0을 보였다. 증식치curve에서 적산면적을 계산해 증식저해를 구하였으며 정상접합자 형성저해는 정상 접합자, 비정상접합자, 배우자세포, 영양세포를 계측하여 김 (1998)의 방법을 사용하였다.⁵⁾ Table 3에서와 같이 96시간 경과 후 대조군의 정상접합자 형성비는 0.7~0.8이지만, 비이온 계면활성제 (S-1, S-2, S-3)의 경우 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L의 각기농도에서 S-1은 약 0.6, 0.3, 0.3, 0, 0이고, S-2는 0.7, 0.6, 0, 0, 0이며, S-3는 0.6, 0.5, 0, 0, 0이었다. 이에 반해 음이온 계면활성제 (S-4) 경우 농도별로 0.4, 0, 0, 0, 0을 보였다.

2. 증식저해 (IA), 정상접합자 형성저해 (IY)

증식저해 (IA)와 정상접합자 형성저해 (IY)는 대조군의 증식과 정상접합자 형성비와 비교하여 김 (1998)의 방법에 따라 구했으며, 결과는 Table 3과 같다. *Closterium ehrenbergii*의 algicidal 농도는 비이온 계면활성제 (S-1, S-2, S-3)의 경우 100 mg/L 이상이고, 음이온 계면활성제 (S-4)는 0.1 mg/L 이상이었다.

논 의

1. 계면활성제의 화학구조와 *Closterium ehrenbergii*에 대한 생태독성평가

계면활성제의 화학구조와 수생생물에 대한 독성관계를 평가할 때 양이온, 음이온, 비이온형 계면활성제의 독성은 흡착성과 소수성에 의존하고

Table 3. Growth value, Growth (A), Inhibition of growth (IA), Normal zygospore ratio (IY) for surfactants

Conc. (mg/L)	Growth value	GI test			ZI test		
		A	IA (%)	SD*	Y	IY (%)	SD*
S-1 Polyethoxylate oleate sorbitan							
Control	11.3	395.3	-	-	0.8	-	-
0.0001	11.1	381.7	3.4	13.9	0.7	17.2	7.9
0.001	14.1	458.2	-15.9	20.0	0.7	17.2	3.3
0.01	10.9	383.9	2.9	14.3	0.6	24.7	17.2
0.1	8.5	314.4	20.5	37.0	0.3	57.3	4.7
1	8.6	303.8	23.1	6.5	0.3	58.2	5.4
10	2.5	94.5	76.1	4.2	0	100	0
100	0	-20.0	105.0	5.3	0	100	0
S-2 Polyethoxylate oleate glyceryl							
Control	13.3	431.4	-	-	0.8	-	-
0.0001	12.9	419.0	2.9	8.6	0.7	9.8	5.7
0.001	13.6	437.3	-1.4	25.2	0.8	-3.0	6.4
0.01	11.2	373.8	13.4	8.2	0.7	12.0	8.2
0.1	12.8	414.5	3.9	13.7	0.6	25.9	12.6
1	6.6	240.3	44.3	4.5	0	100	0
10	5.8	221.7	48.6	8.0	0	100	0
100	0	-29.4	106.8	1.1	0	100	0
S-3 Polyethoxylate castor oil							
Control	12.8	402.1	-	-	0.7	-	-
0.0001	13.4	453.6	-12.8	6.9	0.8	-11.5	7.8
0.001	12.6	421.9	-4.9	8.5	0.7	2.7	14.7
0.01	11.3	349.6	13.1	8.1	0.6	10.3	7.0
0.1	12.6	391.2	2.7	5.9	0.5	27.7	13.3
1	11.9	354.0	12.0	4.5	0	100	0
10	8.7	287.9	28.4	14.5	0	100	0
100	0	-29.0	100	1.1	0	100	0
S-4 Sodium dodecyl sulfate							
Control	13.8	434.1	-	-	0.7	-	-
0.001	10.6	350.7	19.2	14.9	0.7	0.2	5.8
0.001	12.6	394.4	9.2	12.2	0.6	15.7	40.3
0.01	12.6	395.5	8.9	0.7	0.4	36.6	25.2
0.1	0	-72.0	100	0	0	97.4	2.9
1	0	-72.0	100	0	0	100	0
10	0	-72.0	100	0	0	100	0
100	0	-72.0	100	0	0	100	0

GI test : Growth Inhibition test, ZI test : Zygospore Inhibition test, Conc. (mg/L) : Initial exposure concentration, *SD : standard deviation, A : Areas of growth value curve from the beginning of GI test to 96 hours, IA (%) : Inhibition of growth from the beginning of GI test to 96 hours, Y : Normal zygospore ratio from the beginning of ZI test to 96 hours, IY (%) : Inhibition of normal zygospore from the beginning of ZI test to 96 hours

있다고 알려져 있다. 그리고 물고기, 물벼룩 등의 수생생물에 대한 계면활성제의 독성보고⁶⁾⁻⁸⁾와 비교하면 독성의 강도는 양이온 > 음이온 > 비이온 순서이다. 물고기 (minnow)와 물벼룩 (*daphnia magna*)에 대한 급성독성과 계면활성제의 구조활성

연구에서 ethylene oxide 부가형의 비이온형 계면활성제의 독성강도는 ethylene oxide의 부가 units 수에 반비례 한다는 보고^{7), 9)-10)}들이 있으며, ethylene oxide의 부가 units 수가 증대하면 친수성이 크지만, 흡착성은 그 친수성의 증대 (즉 소수성의

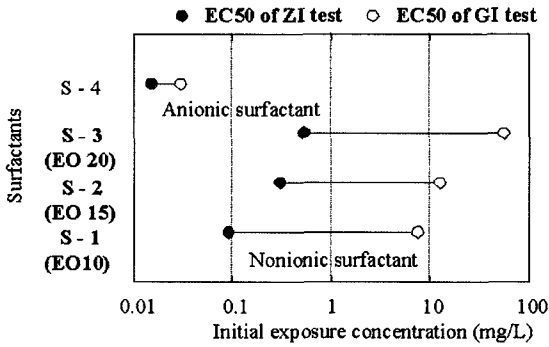


Fig. 2. Comparison of the EC 50 of nonionic (S-1, S-2 and S-3) and anionic (S-4) surfactants.

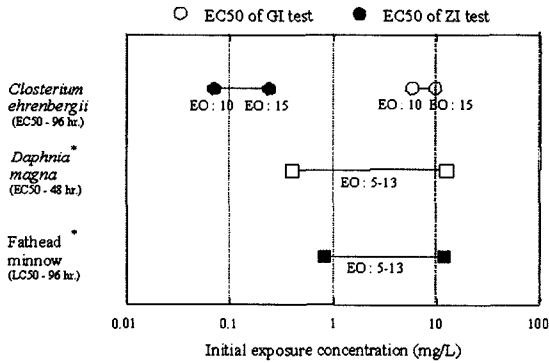


Fig. 3. Comparison of the ecotoxicity of nonionic surfactants to *Closterium ehrenbergii*, *Daphnia magna* and Fathead minnow.

저하)와 더불어 감소한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 무성 및 유성실험에서 S-1>S-2>S-3 순서로 ethylene oxide의 부가 units 수가 20까지 증가함에 따라 *Closterium ehrenbergii*에 대하여 생식저해강도가 저하되었다 (Fig. 2). 또한, 음이온형이 비이온형보다 강한 독성을 나타내었다.

이러한 결과에서 비이온형 계면활성제의 경우 친수기인 ethylene oxide의 부가 units 수의 증대가 소수성의 저하 즉 흡착성의 감소를 유발시켜 *Closterium ehrenbergii*에 대한 독성을 약하게 하였다 고 추정된다.

2. 생태독성과의 비교

Wong (1997)은 ethylene oxide의 부가 units 수가 5-12 (EO : 5-12)의 비이온형 계면활성제를 사용

하여 물고기 (minnow)와 물벼룩 (*daphnia magna*)의 급성독성을 보고하고 있다. 본 연구의 ethylene oxide의 부가 units 수가 10, 15 (EO : 10, EO : 15)의 무성, 유성EC50와 비교하면 *Closterium ehrenbergii*에 의한 실험이 ethylene oxide의 부가 Units 수가 کم에도 불구하고 보다 예민한 감도를 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 결과에서 다른 생태독성시험에서 검출되기 어려운 낮은 농도, 치사의 독성을 보이지 않는 미량오염물질들을 대상으로 *Closterium ehrenbergii*의 생태독성 시험법 적용 가능성을 확인하였다.

결론

친수기와 소수기의 화학구조가 같은 그룹의 비이온형 계면활성제에 대해서는 HLB (Hydrophilic-Lipophile Balance : 친수성-소수성 분자량 비)가 커질수록 독성이 저하되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 소수기 혹은 친수기의 화학구조가 다른 계면활성제를 다룰 경우 화학구조와 독성간의 상관은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 Ethylene oxide 부가의 비이온형 계면활성제와 음이온형 계면활성제의 생태독성을 화학구조의 관점에서 평가하였다. *Closterium ehrenbergii*에 의한 무성 및 유성시험에서 계면활성제의 이온형에 따른 흡착으로 인한 독성 그리고 비이온형 계면활성제 경우 친수기의 units 수의 증대에 따라 독성이 감소하는 경향을 확인 하였으며, 시험의 감도 면에서 *Closterium ehrenbergii*에 의한 무성 및 유성시험이 OECD의 조류시험을 보완, 대체할 수 있는 시험법으로 기대가 된다.

참고 문헌

1. Japan association of detergent and soap. The quality of municipal wastewater treatment plant effluent : the treatment and quality of effluent. 1991; 16: 11-35.
2. Hamada, J., E. Endo, N. Nishio, J. Wakabayashi, E. Sugahara and M. Imaizumi Toxicity of detergent to *Closterium ehrenbergii*. The 4 Annual Congress of Research Institute of Environmental Technology. 1998; 54-58. Proceeding.
3. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Alga growth inhibition test. No. 201. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. 1993.

4. Hamada J., S-G. Kim and S. Matsui. Morphological and lethal effects of mitomycin C, N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine, Benzo(a)pyrene and 4-Nitroquinoline 1-oxide on a large unicellular indicator organism, *Closterium ehrenbergii* (green alga). *Wat. Sci. Tech.* 1996; 33(6): 305-312.
5. Kim S-G., S. Matsui and J. Hamada. Toxicity test of anionic and nonionic surfactants to *Closterium ehrenbergii* by new indexes. *Environmental Conservation Engineering.* 1998; 27: 274-281.
6. Yoshimura, K. Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactant. *J. Amr. Oil Chem. Soc.* 1986; 63: 1590-1596.
7. Wong, D.C. L., P.B. Dorn and E.Y. Chai. Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 1997; 16: 1970-1976.
8. Versteeg, D.J., D.T. Stanton, M.A. Pence and C. Cowan. Effects of surfactants on the rotifer, brachionus calyciflorus, in a chronic toxicity test and in the development of QSARs. *Environ. Toxicol. Chem.* 1997; 16: 1051-1058.
9. Roberts, D.W. QSAR issues in aquatic toxicity of surfactants. *Sci. Total Environ.* 1991; 109/110: 557-568.
10. Rosen, M. J. *Surfactants and interfacial phenomena.* John Wiley and Sons. New York. USA.
11. Kimerle, R.A. Aquatic and terrestrial ecotoxicology of linear alkylbenzene sulfonate. *Surfactants Detergents.* 1989; 26: 169-176.
12. McAvoy, D.C., S.D. Dyer, N.J. Fendinger, D.L. Lawrence and W.M. Begley. Removal of alcohol ethoxylates, alkyl ethoxylate sulfates, and linear alkylbenzene sulfonates in wastewater treatment. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998; 17: 1705-1711.