

비이온계 계면활성제의 독성 평가 및 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) 생분해에 미치는 영향

박종섭 · 김인수 · 최희철

광주과학기술원 환경공학과

(2000년 6월 13일 접수, 2000년 9월 22일 채택)

Toxicity Estimation of Nonionic Surfactants and Their Effect on the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

Jong-Sup Park · In S. Kim · Heechul Choi

Department of Environmental Science & Engineering, Kwangju Institute of Science & Technology

ABSTRACT

Toxicity estimation of three nonionic surfactants (Brij 30, Tween 80, Triton X-100) and their effect on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aqueous phase and soil slurry phase were investigated. Brij 30 was found to be the most biodegradable among the surfactants tested, and showed no substrate inhibition up to a concentration of 1.5 g/L. It was definitely utilized as a carbon source by the microorganisms. Naphthalene and phenanthrene in the aqueous phase were completely degraded by phenanthrene-acclimated cultures within 60 hours, but a substantial amount of naphthalene was lost due to the volatilization. The limiting step in the soil slurry bioremediation was bioavailability by the microorganisms in the sand slurry and mass transfer from a solid to aqueous phase in the clay slurry. TOC analysis revealed that most of substrates including surfactant in the reactor were degraded. pH transition indicated that phenanthrene was metabolized into intermediates containing acid function.

Key Words : Toxic Estimation, Nonionic Surfactants, PAHs, Bioavailability

요약문

세 가지 비이온계 계면활성제(Brij 30, Tween 80, Triton X-100)의 독성 평가와 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)의 생분해에 미치는 영향을 조사하였다. 사용된 세 가지 계면활성제 중에서 Brij 30이 가장 생분해가 잘 되는 것으로 나타났으며, 1.5 g/L까지 아무런 기질 저해 효과가 나타나지 않았다. 이는 사용된 계면활성제가 미생물에 탄소원으로 이용된다는 것을 나타낸다. 수용액상에서 naphthalene과 phenanthrene은 60시간 안에 완전히 분해되었지만 naphthalene의 경우 상당량이 휘발에 의해 손실됨을 알 수 있었다. 슬러리상에서 제어단계는 모래 슬러리의 경우 미생물에 의한 생분해였고, 점토 슬러리의 경우는 흡착표면에서 수용액으로의 물질 전달이었다. TOC분석을 통해 계면활성제를 포함한 거의 모든 기질이 분해됨을 알 수 있었다. pH 변화는 phenanthrene이 산 작용기를 가지는 중간산물로 분해됨을 나타내었다.

주제어 : 독성 평가, 비이온계 계면활성제, PAHs, 생분해

1. 서론

토양은 생태학적인 관점에서 볼 때 오염물이 최종적으로 도달해서 머무는 저장소로서 지표수 및 지하수의 오염에 직접적인 영향을 미치며 동·식물에 유해한 영향을 주고 있다. 불량 매립지 및 유해 화합물의 무분별한 매립 및 유류저장소의 유출 등은 필연적으로 토양오염을 유발시키며 최근에 그 수치는 위험수준에 도달하고 있다. 특히, 유기화합물로 인한 오염이나 유류저장소의 유출로 인해 토양에 오염되는 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)는 인간과 다른 생물에게 암을 유발시키는 등 강한 독성을 갖는 물질로 알려져 있다 그러나, 토양에 오염된 PAHs는 낮은 용해도와 강한 흡착력 때문에 처리가 쉽지 않다. 계면활성제는 PAHs의 용해도를 향상시키므로^{1,2)} PAHs로 오염된 토양의 정화에 이용가능성이 크다고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 계면활성제가 미생물에 미치는 독성을 평가하고 PAHs의 생분해 등에 미치는 영향에 대해 조사하여 유류 등의 유기화합물에 오염된 토양 정화에 있어서 계면활성제의 활용방안을 모색하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시료 및 시약

Phenanthrene, naphthalene과 비이온계 계면활성제인 Brij 30은 Aldrich의 시약을 사용하였고, Tween 80과 Triton X-100은 Sigma사에서 reagent-grade 시약을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 모래와 점토는 유기물을 각각 0.57~1.2%와 0.1~0.5% 함유하였다. 사용한 PAH, 계면활성제 분자식과 분자량은 Table 1에 나타내었다. Acetonitrile은 HPLC-grade 시약을 사용하였으며 모든 시약 제조를 위해 초순수(ultrapure system, Barnsterd, USA)를 사용하였다.

2.2. Master Culture Reactor(MCR)

모든 생분해 실험은 master culture reactor (MCR)에서 phenanthrene에 순화된 mixed culture를 사용하였다. Culture는 약 6개월 동안 순화시켰으며 MCR은 부피 10L, HRT 20일을 가지는 semi-continuous type의 반응기였다. 매주 MCR culture의 상태를 알아보기 위해 total organic carbon(TOC), pH, MLSS, MLVSS 등을 측정하였고 모든 실험은 MCR이 steady-state상태에 있을 때 실시하였다.

Table 1. The chemical structure and molecular weight of the selected PAHs & surfactants

PAHs & surfactants		Molecular formula	Molecular weight
PAHs	Naphthalene	C ₁₀ H ₈	128.19
	Phenanthrene	C ₁₄ H ₁₀	178.24
Surfactants	Brij 30	C ₁₂ H ₂₅ (OCH ₂ CH ₂) ₄ OH	363
	Tween 80	C ₁₈ H ₃₇ S* ₆ (OC ₂ H ₄) ₂₀ OH	1309
	Triton X-100	C ₈ H ₁₇ C ₆ H ₄ (OC ₂ H ₄) ₁₀ OH	625

S*₆: a sorbitan ring C₆H₉O₅

2.3. 계면활성제의 생분해와 독성 실험

계면활성제의 생분해와 독성 실험은 respirometer(Challenge Environment Sys., Aer-200, USA)을 이용해 산소섭취량을 측정함으로써 행해졌다. 여러 범위의 각 계면활성제의 농도 (0.25, 0.5, 1, 1.5 g/L)를 nutrient/mineral/buffer(NMB) 용액과 함께 200 mL serum bottle안에 넣은 다음 master culture를 시종하였다. 반응 중에 발생하는 이산화탄소는 serum bottle 위 부분에 있는 50% KOH용액에 의해 흡수되도록 하였다. 계면활성제가 생분해되는 동안 미생물에 의해 흡수되는 산소량은 시간에 따라 자동적으로 monitoring 되었다.

2.4. 수용액 상에서의 PAHs의 생분해

다양한 농도의 계면활성제 (0.25, 0.5, 1, 2 g/L)와 다량의 PAHs를 넣은 다음 20°C, 48시간 동안 125 rpm에서 shaking시켰다. 0.2 µm filter paper를 사용하여 용해되지 않은 PAHs를 제거한 다음, 즉시 NMB용액과 순화된 culture를 넣어 휘발로 인한 PAHs의 손실을 막았다. 일정한 시간에 따라 sampling 하였고 각 sample은 다시 filtering한 다음 HPLC를 이용하여 남아있는 PAHs의 농도를 측정하였다. Naphthalene과 phenanthrene 분석을 위해 사용한 HPLC는 C18 NovaPak 컬럼을 사용했으며 용리액으로 acetonitrile과 초순수를 75:25로 섞어 사용하였다. 측정흡광도는 naphthalene의 경우 274 nm에서, phenanthrene의 경우는 254 nm를 사용하였다.

2.5. 토양 슬러리 상에서의 PAHs의 생분해

토양 슬러리 상에서의 PAHs 생분해 실험에서는 앞의 실험에서 가장 생분해가 잘 되고 미생물에 독성효과가 없는 것으로 나타난 Brij 30 1.0 g/L를 이용하였다. 토양에 인공적으로 phenanthrene를 흡착시키기 위해서 먼저 phenanthrene를 dichloromethane에 용해시킨 다음 토양에 붓고 후드에서 휘발시킨 다음 7일 동안 방치했다. 1 L 반응기에 phenanthrene을 흡착한 토양과 MNB 용액을 1:10(w/v)으로 넣고 MCR로부터 culture를 시종하였다. 반응기는 140 rpm의 속도로 shaking시키면서 일정한 시간 간격으로 sample을 취하였다. 취해진 sample은 모래의 경우 0.2 µm 멤브레인 필터를 사용해서 고액 분리하였고 점토의 경우 centrifuge 후에 필터로 분리하였다. 그 다음 액상중 phenanthrene을 HPLC를 사용하여 농도를 분석하였다. 토양에 흡착된 PAHs의 추출에는 sonication 방법인 EPA Method # 3550A를 사용하였다.³⁾ 추출 효율은 모래의 경우 79(±2.9)% 정도의 효율을 보였으며 점토의 경우 약 50(±3.5)% 정도의 효율을 보였다. 점토질 토양에서 추출 효율이 낮은 것은 점토의 유기물 함량 때문인 것으로 사료된다. Solid phase와 liquid phase의 phenanthrene 외에 슬러리 반응기에서 phenanthrene의 생분해 반응을 위해 DO(DO meter, YSU model), pH(pH meter, Fisher Scientific), TOC(TOC analyzer, Rosemount Inc.) 등을 분석하였다. 모든 실험은 두 번 이상 반복 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 계면활성제의 생분해와 독성 실험

일부 계면활성제 특히 양이온계 계면활성제의 경우, 미생물에 독성 효과가 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 비록 비이온계 계면활성제가 이온성 계면활성제보다는 독성을 덜 가진다고 알려져 있지만 고농도에서의 독성 효과를 알아보기 위해서 respirometer를 이용하여 실험하였다. Fig. 1은 Brij 30, Tween 80, Triton X-100을 유일한 탄소원으로 했을 때 PAH에 순화된 미생물에 의해서 소비되는 산소의 양을 나타낸 것이다. 세 가지 계면활성제 중에서 Brij 30이 미생물에 의해 가장 높은 산소섭취속도를 보였고 분해가 어려운 탄소원에서 적응하는데 걸리는 lag phase도 보이지 않았다. 따라서, 본 실험에서 사용한 세 가지 비이온계 계면활성제 중에서 Brij 30이 가장 생분해가 잘 되고 독성 효과도 전혀 보이지 않았다. Tween 80의 경우, 상당한 산소소비를 보이고 그 경향도 Brij 30과 비슷하지만 섭취속도는 Brij 30에 비해 약간 낮게 나타났다. 이는 Tween 80의 경우도 미생물에 어떠한 독성 효과를 보이지 않고 탄소원으로 쉽게 이용될 수 있지만 Brij 30에 비해서는 생분해속도가 느린 것으로 나타났다. 이처럼 Tween 80의 생분해속도가 Brij 30에 비해 낮게 나타난 것은 Tween 80의 평균 분자량이 1309 g/mol로 Brij 30의 363 g/mol에 비해 높기 때문인 것으로 사료된다. 이에 반해 Triton X-100의 경우 상당한 lag phase를 보였는데 이는 Triton X-100이 미생물에 inhibition 효과를 나타낸 것으로 해석할 수 있다. 미생물에 의한 분해 저해효과는 Triton X-100의 benzene ring을 포함하는 구조와 높은 분자량 때문인 것으로 사료된다. 이전 연구에서⁴⁾ 9.7의 낮은 HLB(Hydrophile-Lipophile Balance)⁵⁾ 값을 갖는 Brij 30의 경우 PAHs의 용해도에서 가장 높은 효율을 보였고 1:10(w/v)의 토양과 물의 슬러리 상태에서 phenanthrene을 흡착한 고체상으로부터 수용액상으로의 탈착실험에서도 가장 높은 효율을 보였기 때문에 본 연구에서 사용한 세 가지 비이온계 계면활성제 중에서 Brij 30이 slurry 상에서 토양에 흡착된 PAH를 처리하기에 가장 적

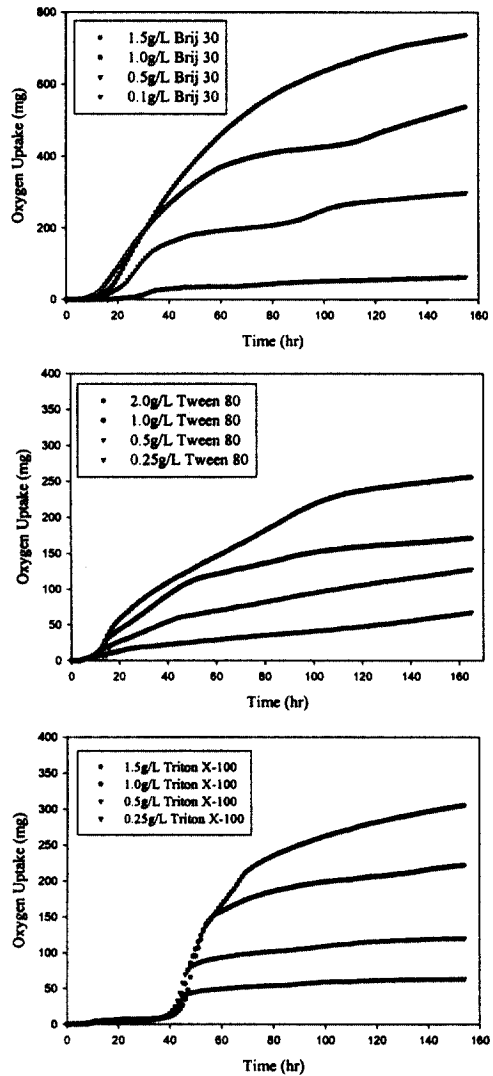


Fig. 1. Oxygen uptake of Brij 30, Tween 80, and Triton X-100 using respirometer.

합한 것으로 사료되었다.

3.2. 수용액 상에서의 PAHs의 생분해

수용액 상에서 행해진 naphthalene과 phenanthrene의 생분해 실험 결과를 Fig. 2~4에 나타내었다. 휘발이나 abiotic 분해에 의한 PAH의 손실을 측정하기 위하여 control 실험도 병행했는데 phenanthrene의 경우 비생물적 손실이 거의 없는데 반해 naphthalene의 경우 휘발로 인한 손실이 상당한

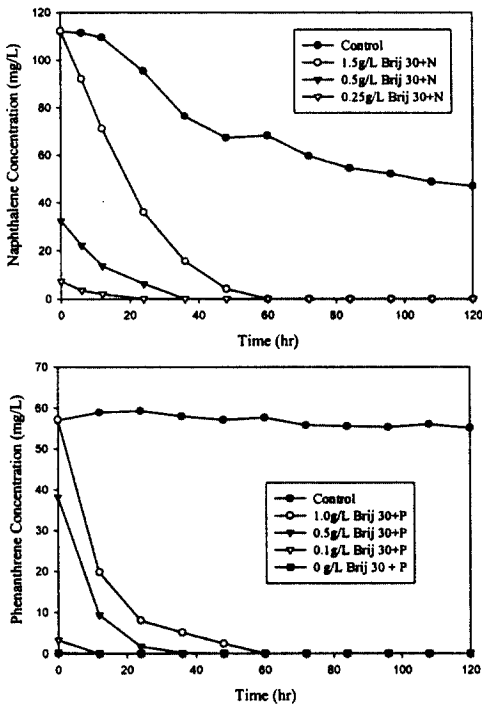


Fig. 2. Naphthalene and phenanthrene biodegradation in the aqueous phase using surfactants Brij 30.

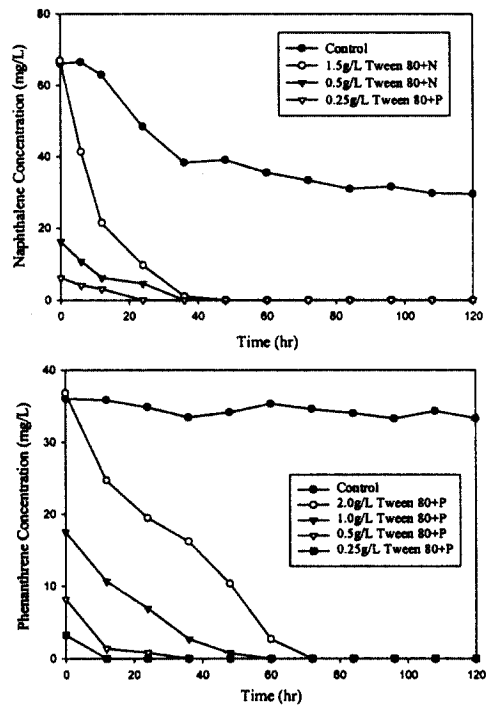


Fig. 3. Naphthalene and phenanthrene biodegradation in the aqueous phase using surfactants Tween 80.

것으로 나타났다. 따라서, naphthalene과 같은 휘발성이 강한 PAH를 처리할 경우 휘발되는 부분에 대한 처리도 필요한 것으로 사료된다. 수용액 상에서 각각의 계면활성제 농도에 녹을 수 있는 최대의 phenanthrene의 모든 양이 80 hrs 안에 모두 분해되었다. 특히, Brij 30의 경우 가장 높게 용해된 phenanthrene의 모든 양이 60 hrs 안에 모두 분해되었다. 이에 반해 Triton X-100의 경우 다른 계면활성제와 같은 phenanthrene 분해 경향을 보였지만 가장 느린 분해 속도를 보였다. 이같은 결과는 계면활성제의 독성 실험의 결과와도 일치한다. Fig. 4를 보면 처음 약 30 hrs 동안 상당히 낮은 분해율을 보였는데 이는 독성 실험에서도 약 40 hrs의 lag phase 시간과 비슷하다. 그 두 실험결과의 시간차이는 respirometer의 serum bottle 상층부분의 산소가 소비되는데 걸리는 시간이기 때문에 그 시간을 보정해 주면 거의 같다고 볼 수 있다. Phenanthrene으로 순화된 culture를 이용한 수용액상에서의 naphthalene의 생분해 실험에서도 60 hrs 안에 용해되어 있는 모든 naphthalene이 분해되었는데

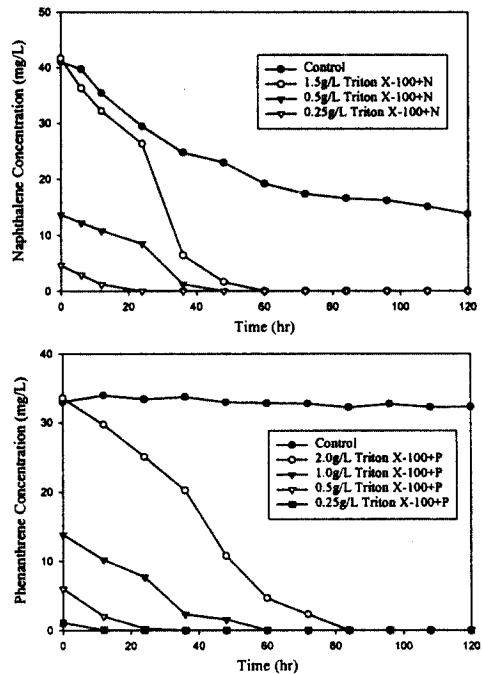


Fig. 4. Naphthalene and phenanthrene biodegradation in the aqueous phase using surfactants Triton X-100.

이는 phenanthrene에 순화된 미생물이 또한 naphthalene도 같은 효소를 이용하여 분해할 수 있음을 보여준다.

3.3. 토양 슬러리 상에서의 PAHs의 생분해

계면활성제의 독성 실험과 수용액 상에서의 분해 실험을 통해서 가장 높은 효율을 보였던 Brij 30을 사용하여 토양 슬러리 상에서 phenanthrene의 분해 실험을 하였다. Fig. 5는 토양 슬러리 반응기의 고체상과 액체상에서의 phenanthrene 농도변화를 나타낸 것이다. 모래 슬러리 반응기의 경우 액체상의 phenanthrene의 농도가 증가하는 처음 12 hrs 동안 고체상에서는 90% 정도의 phenanthrene이 탈착되었다. 이는 모래 슬러리 반응기의 경우 미생물에 의한 생분해가 전체 반응을 지배하고 있음을 보여준다. 반면에 점토 슬러리의 경우 액상에서의 phenanthrene농도가 반응시간동안 거의 측정되지 않았는데 이는 미생물에 의한 분해속도가 탈착속도보다 빨랐기 때문으로 추정된다. 따라서, 점토 슬러리 처리에서는 탈착이 전체 반응속도를 지배한다고 볼 수 있다. 점토 슬러리에서 탈착되는 속도가 낮은 것은 점토질 토양의 높은 유기물함량 때문으로 사료된다.⁶⁾ Phenanthrene 분해과정 중 생성된다고 밝혀진 1-hydroxy-2-naphthoic acid의 경우,⁷⁾ 오렌지색을 띠는데 실험한 슬러리 반응기에서 오렌지색이 강해졌다가 사라지는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 6은 반응 중의 TOC 변화를 나타낸 것으로 탄소원으로 phenanthrene, Brij 30뿐만 아니라 각각의 중간생성물도 포함된 것이다. 모래와 점토 슬러리 모두 비슷한 TOC 변화를 보였는데 처음 60 hrs 동안은 증가하다가 그 이후 급격히 감소하는 경향을 보였다. 처음에 TOC가 증가한 것은 UV promoted-K₂S₂O₈을 산화제로 사용하는 TOC analyzer가 구조적으로 매우 안정한 phenanthrene을 산화시키지 못했다가 미생물에 의해 중간생성물로 변화됨에 따라 측정할 수 있게 되었기 때문이다. 같은 양의 phenanthrene을 모래와 점토질 토양에 흡착시켰지만 점토 슬러리의 초기 TOC가 모래 슬러리에 비해 상대적으로 낮게 나타난 것은 점토질 토양의 유기물 함유량이 많아 용해된 계면활성제를 흡착했

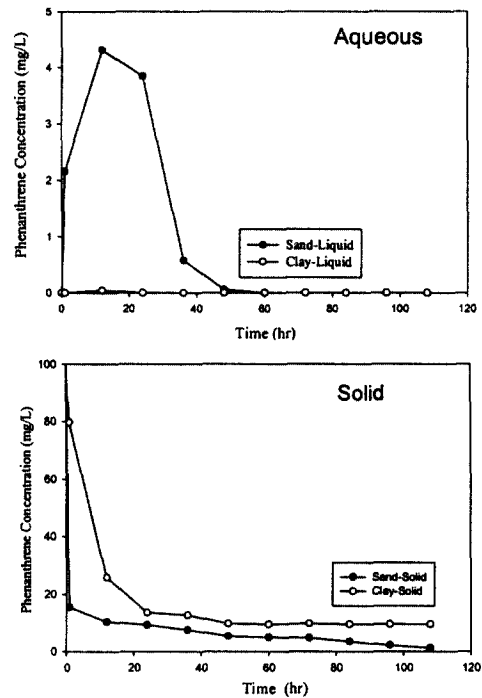


Fig. 5. Phenanthrene concentration in the aqueous and solid phase of the soil slurry reactor.

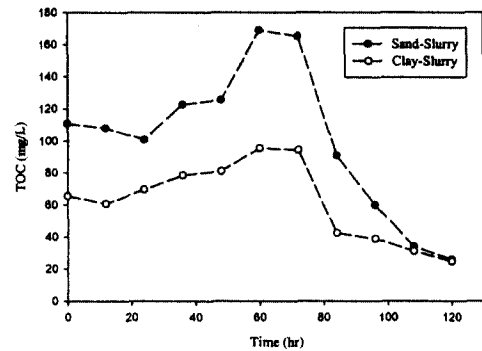


Fig. 6. The concentration of the total organic carbon versus time in soil slurry reactor.

기 때문이다. 14일 이후에 반응기는 미생물과 토양을 침전시켰을 때 완전 투명해짐을 관찰할 수 있었는데 Brij 30의 용액이 혼탁한 흰색 상태를 나타내는 것과 비교해보면 Brij 30이 완전 분해됨을 알 수 있었다. pH의 경우 반응동안 감소했다가 대부분의 유기물이 분해되었을 때 다시 처음 pH로 회복되었다. 이는 phenanthrene이 산작용기를 가지는 중간

생성물을 거쳐 분해되었다는 것을 나타낸다.

4. 결 론

실험 결과에 의하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 본 실험에 사용한 세 가지 계면활성제 중에서 Brij 30이 PAH에 순화된 미생물에 의한 respirometer 실험에서 가장 높은 산소소비속도를 보였고 lag phase가 거의 없었기 때문에 가장 생분해가 잘 되는 것으로 나타났다. 이에 반해 Triton X-100의 경우 낮은 산소소비속도와 긴 lag phase로 미생물에 inhibition 효과를 가지는 것으로 나타났는데 이는 Triton X-100의 높은 분자량과 benzene ring을 가지는 구조 때문인 것으로 사료된다.
- 2) 수용액 상에서 각각의 계면활성제 농도에 녹을 수 있는 최대의 naphthalene과 phenanthrene의 모든 양이 각각 60 hrs, 80 hrs 안에 모두 분해되었다. Control 실험에서 naphthalene의 경우 상당한 양의 휘발이 측정되었는데 따라서 실제 처리의 경우 휘발되는 부분에 대한 처리도 병행되어야 할 것으로 사료된다. Brij 30에서 PAH의 가장 높은 분해효율을 보였고 Triton X-100의 경우 respirometer 실험의 lag phase와 비슷한 시간동안 낮은 분해효율을 보였다.
- 3) 토양에 흡착된 phenanthrene을 처리하는 슬러리 실험에서 모래 슬러리의 경우 미생물에 의한 분해속도가 전체 반응속도를 지배하고, 점토 슬러리의 경우 토양으로부터 phenanthrene의 탈착이 전체 반응속도를 지배하는 것으로 나타났다. TOC 분석결과 PAH에 순화된 미생물은 phenanthrene 뿐만 아니라 계면활성제인 Brij 30까지 완전 분해하는 것으로 나타났다. 또한 pH와 반응기의 색을 통해서 phenanthrene이 산의 작용기를 가지는 중간 산물로 형성되었다가 분해되는 것을 알 수 있었다.

사용한 세 가지 계면활성제 중에서 Brij 30이 이

전 실험 결과에서는 가장 높은 용해도 효율과 토양에 흡착된 PAH의 탈착효율을 보였고 본 실험에서 가장 높은 생분해 효과를 보였기 때문에 slurry 상에서 토양에 흡착된 PAH를 처리하기에 가장 적합하다고 할 수 있다. 이러한 계면활성제를 이용한 토양 슬러리 반응은 지금까지의 실험결과를 통해서 고농도 PAH로 오염된 토양을 ex-situ 처리에 매우 효과적인 방법이라 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Aronstein, B. N. and Alexander, M., "Effect of a Non-ionic Surfactant added to the Soil Surface on the Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons within the Soil," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 386~390 (1993).
2. Bury, S. J. and Miller, C. A., "Effect of Micellar Solubilization on Biodegradation Rates of Hydrocarbons," *Environ. Sci. Technol.*, **27**(1), 104~110(1993).
3. EPA, Ultrasonic Extraction, SW846-Method#3550A(1994).
4. 박종섭, 최희철, 김인수, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs)의 용해도와 탈착에 미치는 비이온계 계면활성제의 영향," *대한환경공학회지*, **22**(8), 1525~1533(2000).
5. Rosen, M. J., *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 326~329(1989).
6. Laha, S. and Luthy, R. G., "Inhibition of Phenanthrene Mineralization by Nonionic Surfactants in Soil-Water Systems," *Environ. Sci. Technol.*, **25**(11), 1920~1930(1991).
7. Jahan, K., Ahmed, T., and Maier, W. J., "Factors Affecting the Nonionic Surfactant-Enhanced Biodegradation of Phenanthrene," *Water Environ. Res.*, **69**(3), 317~325(1997).