

제4장 분해성 및 농축성 시험분야

제1항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해되기 전후 용존 유기탄소량의 차이를 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성이고 물에 대한 용해도가 100 mg/L 이상 이어야 하며 시험물질의 탄소함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이 시험법은 제4장 제5항의 “미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(II)”과 유사하지만 더 많은 양의 미생물을 사용할 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 1 차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화되는 것

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도

(DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 '10 일 창'을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 10 mg/L ~ 40 mg/L 사이에서 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 공기를 공급하면서 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건 또는 산란광조건에서 28 일간 배양한다. 시험 기간 중 일정 시간 간격으로 용존유기탄소 분석을 실시하여 생분해도를 계산한다. 생분해도는 초기 용존유기탄소 농도에 대한 접종원 바탕시험군으로 보정한 감소율로 나타낸다. 또한 1차 생분해도는 배양의 처음과 끝에 모화합물(Parent compound)에 대한 화학분석으로 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 용존유기탄소 분석에 필요한 용량에 따라 250 mL ~ 2,000 mL의 삼각플라스크를 사용한다. 플라스크는 각 시험 전에 알코올성 염산 등으로 철저히 세척하고 헹군 후 건조시켜야 한다.

2.1.2 진탕기

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

2.1.5 용존산소 측정장비

2.1.6 원심분리기

2.1.7 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous)	27.50 g
또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌다이아민사아세트산나트륨염(EDTA Disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다.

기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용하여야 한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액 원액 A를 10 mL 취하여 800 mL 물에 섞은 후 원액 B, C, D를 각 1 mL씩 첨가하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질(Reference compound)

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N , Aniline), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$, Sodium acetate), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$, Sodium benzoate) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

물질의 용해도가 1 g/L를 초과하는 경우 시험물질이나 표준물질 1 g ~ 10 g을 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다. 또는 기초배양액에 직접 시험물질이나 표준물질을 첨가하고 완전히 용해되도록 조제한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 0.2 μm ~ 0.45 μm 막 여과장치를 사용하여 멸균 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 멸균제 + 시험물질 [흡착 대조군]

플라스크 8 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 접종원은 3.2항을 참고하여 플라스크 6을 제외한 모든 플라스크에 적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 8에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4로 조정한다.

2.7.4 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 2 L 플라스크에 800 mL 기초배양액 첨가
- 최종 혼합물 내 시험물질 농도가 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L이 되도록 시험물질 표준원액 첨가
- 적당량의 접종원 첨가
- 플라스크내 용액이 최종적으로 1 L가 되도록 기초배양액으로 채운다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid) 또는 ≤ 100 mL/L 2차 방류수

2.8.3 시험온도 : $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 방법 중 1개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성 상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 놓아두거나 $1,100 \times g$ 로 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬

러지를 기초배양액으로 세척한다. 부유물질 농도가 1 L 당 3 g ~ 5 g이 되도록 기초 배양액으로 농축된 슬러지를 희석시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과하거나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2. 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 8에 접종원을 소량씩 넣는다. 이때 접종원 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3. 생분해도 시험

3.3.1 시험에 필요한 설치를 모두 준비하고 진탕기에 넣기 전에 초기 용존유기탄소 농도 측정을 위해 각 플라스크에서 시료를 채취한다(주 1).

3.3.2 시료 채취를 마친 플라스크는 알루미늄 호일로 입구를 막고 진탕기에 넣어 주며, 암실, $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 공기를 공급한다.

3.3.3 시험기간 동안 정해진 시간 간격으로 각 플라스크로부터 두 번씩 시료의 용존

유기탄소 농도를 측정한다. 플라스크 1, 2(시험물질군)와 플라스크 3, 4(접종원 바탕시험군)의 용존유기탄소 농도를 동시에 측정해야 한다.

3.3.4 채취한 시료는 막여과장치로 여과한 후 초기의 20 mL 여과액은 버리고, 나머지 여과액의 용존유기탄소량을 분석한다. 단, 이 때 사용하는 용존유기탄소 분석기는 초기 용존유기탄소 농도의 10 % 이하 까지 정확하게 측정할 수 있어야 한다. 여과하거나 원심분리한 시료는 즉시 분석하거나 일정기간 보관 후 분석한다.

3.3.5 10 일 창에서 용존유기탄소 감소비율을 확인할 수 있도록 충분한 수의 시료를 채취한다. 시료 채취 후 바로 분석을 수행하는 경우에는 분석 결과에 따라 다음 시료 채취 시간을 결정한다.

3.3.6 시료 채취 후 바로 분석을 하지 않고 보관하는 경우, 시료채취는 매일 혹은 이틀에 한번 씩 채취한다. 시료의 보관은 2 °C ~ 4 °C에서 최대 48 시간 이내에 분석해야 하고 장기간 보관해야 하는 경우는 -18 °C 이하로 보관한다.

3.3.7 시료를 채취할 때 플라스크로부터 가능한 최소량을 채취하고 용존유기탄소 농도를 측정한다. 실험과정 중의 증발 손실을 보충하기 위해 시료 채취 전에 손실된 양만큼의 물을 첨가해 주고, 플라스크 벽면에 붙은 물질이 재용해 또는 재부유되도록 잘 섞어준다.

3.3.8 시험이 종료되고 분석을 실시할 경우, 상대적으로 적은 수의 측정값으로 생분해 곡선을 그리려면 맨 마지막 시료부터 분석한다. 만약 마지막 시료에서 생분해가 일어나지 않았다면 더 이상 분석할 필요는 없다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 3)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

모든 농도는 실험으로 측정된 값이다.

1.3 비생물 분해도(%) 산출법

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

$C_{s(0)}$: 0일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

$C_{s(t)}$: t일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

1.4 시험이 적합성 기준을 만족시켰다면 플라스크 1, 2의 평균을 이용하여 분해과정을 도표로 나타내고, 10 일 창을 표시한다. 정체기(Plateau), 시험종료 또는 10 일 창 마지막에서의 용존유기탄소 감소율을 기록한다.

1.5 시험물질의 화학분석자료가 있는 경우 1차 생분해도를 기록한다.

1.6 독성대조군(플라스크 8)의 총 용존유기탄소 분해율이 14 일 내에 35 % 미만이라면 시험물질이 미생물활성을 억제하는 물질이라고 추정할 수 있다(주 2). 이러한 시험은 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도의 시험물질을 처리하거나, 부유물질이 30 mg/L를 넘지 않는 수준에서 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하거나 혹은 두 조건을 모두 적용하여 시험을 다시 실시한다.

2. 시험의 적합성

2.1 정체가, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이는 20 % 미만이어야 한다.

2.2 표준물질의 용존유기탄소 감소에 의한 분해도는 14 일 이내에 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 비생물 분해도(%)

(5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도

(6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)

(7) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 3) 용존유기탄소 감소량 측정시험(DOC Die-away Test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내 부유물질 농도 : (mg/L)

5. 탄소 측정

- 사용된 탄소분석기 :

	플라스크 번호		n일 후의 DOC (mg/L)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질군	1	a ₁					
		a ₂					
		평균, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		평균, C _{b(t)}					
접종원 바탕시험군	3	c ₁					
		c ₂					
		평균, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		평균, C _{d(t)}					
	평균, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. 기초자료의 평가

플라스크 번호	결과 계산	n일 후의 분해도(%)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
평균*	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* D₁과 D₂ 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

7. 비생물 분해도(선택사항)

	기간 (일)	
	0	1
비생물 멸균 대조군의 DOC 농도(mg/L)	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S _b	
배양된 기초배양액	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

제2항 미생물분해시험(이분해성) : 이산화탄소 발생량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하는 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 발생하는 이산화탄소량을 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성 이어야 하며 시험물질 중 탄소 함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 이산화탄소량(ThCO_2 , Theoretical carbon dioxide)

시험물질이 완전하게 무기질화 될 때 생산될 수 있는 이론적으로 계산된 이산화탄소량. 이를 시험물질(mg) 당 발생된 이산화탄소량(mg)으로 표시

2.2 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, $0.45\ \mu\text{m}$ 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 $4,000 \times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.3 총유기탄소(TOC, Total organic carbon)

용액과 현탁액 속에 존재하는 유기탄소의 총량

2.4 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 이산화탄소량 또는 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThCO_2 ; 60 % 또는 DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을

만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L 사이의 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정용량의 기초배양액을 암조건에서 28 일간 이산화탄소가 없는 공기를 공급하며 배양한다. 이때 해당 시험물질의 미생물분해로 인해 생성된 이산화탄소를 측정하여 생분해도를 계산한다. 이산화탄소는 과량의 수산화바륨($\text{Ba}(\text{OH})_2$)이나 수산화나트륨(NaOH)으로 포집하고, 사용 후 남아 있는 수산화물을 적정하거나, 무기탄소를 측정하는 방법으로 측정한다. 생분해도(%)는 시험물질로부터 생성된 이산화탄소 양을 바탕시험군으로 보정한 이론적 이산화탄소량과의 비율로 표시한다. 또한 생분해도는 시험의 시작과 종료시 용존유기탄소 측정값을 이용하여 계산할 수도 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 바닥에 거의 닿는 포기관과 배출구가 설치되어 있는 2 L ~ 5 L 플라스크
- 2.1.2 자석 교반기(용해도가 낮은 화학 물질 적용시)
- 2.1.3 기체흡수 병
- 2.1.4 공기흐름 조절 및 측정 장치
- 2.1.5 이산화탄소 제거장치(20 % O_2 : 80 % N_2 비율의 혼합기체를 대신 이용할 수도 있다.)
- 2.1.6 이산화탄소를 측정하기 위한 장치(적정법 또는 무기탄소분석기)
- 2.1.7 pH 측정기
- 2.1.8 막 여과 장치(선택사항)
- 2.1.9 용존유기탄소 분석기(선택사항)

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

미생물분해시험 중 '용존유기탄소 감소량 측정시험(I)'(제4장 1항)의 기초배양액을 위한 원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.4 기초배양액 조제

미생물분해시험 중 '용존유기탄소 감소량 측정시험(I)'(제4장 1항)의 기초배양액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다. 난용성 물질의 경우 (주 1)을 참고한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균대조군]

(*멸균제 대신 $0.2\ \mu m \sim 0.45\ \mu m$ 막 여과장치를 사용하여 멸균하는 것도 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성대조군]

2.7.1 접종원은 3.2항을 참고하여 플라스크 6을 제외한 모든 플라스크에

적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 7에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 5 L 플라스크에 2,400 mL 기초배양액 첨가
- 적당량의 접종원 첨가(3.2항 참고)
- 위의 혼합물에 하룻밤 동안 이산화탄소가 없는 공기 공급
- 최종 혼합물(3 L)내 시험물질의 농도가 용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L가 되도록 시험물질 원액 첨가
- 이산화탄소가 없는 공기를 미리 공급한 기초배양액을 넣어 최종 혼합물을 3 L로 맞춤

2.7.4 발생하는 이산화탄소를 포집하기 위한 포집병 준비

- 수산화바륨을 사용하는 경우, 0.0125 M 수산화바륨 100 mL 병 3 개를 5 L 플라스크에 연속해서 연결
- 수산화나트륨을 사용하는 경우, 0.05 M 수산화나트륨 200 mL 병 2 개를 5 L 플라스크에 연속해서 연결

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid) 또는 ≤ 100 mL/L 2차 방류수

2.8.3 시험온도 : $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음과 같은 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성 상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 놓아두거나 1,100 ×g에서 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다. 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액으로 농축된 슬러지를 희석시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과하거나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 7 에 접종원을 적당량 넣는다. 이때 접종원 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 2.7항과 같은 방법으로 시험 플라스크를 준비한다.

3.3.2 이산화탄소가 포함되지 않은 공기를 30 mL/분 ~ 100 mL/분의 속도로 주입시킨다.

3.3.3 10 일 창 기간을 확인하기 위해 이산화탄소 분석은 처음 10 일간은 2 일이나 3 일에 한번 실시하고 그 후에는 28 일째 되는 날까지 적어도 5 일에 한번 분석한다.

3.3.4 수산화바륨을 이용하여 이산화탄소를 포집한 경우, 시험플라스크와 가장 가까운 수산화바륨 포집병의 흡수제를 분리하고 페놀프탈레인을 지시약으로 사용하여 0.05 M 염산으로 수산화물을 적정한다.

- 이산화탄소 분석을 위해 처음 제거한 흡수제 바로 다음 흡수제를 제거된 흡수제 자리로 이동 시키고 새롭게 조제한 흡수제를 시험 용기에 가장 먼 위치에 연결시킨다.

- 이와 같은 적정은 적어도 일주일에 한번 실시한다.

3.3.5 수산화나트륨을 흡수제로 사용한 경우, 주사기를 이용하여 시험 플라스크에 가장 가까운 흡수제로부터 수산화나트륨의 시료를 채취한다.

- 채취하는 시료의 양은 시험의 전 기간에 걸쳐 흡수제 양을 현저하게 변화시키지 않게 한다. 탄소 분석기로 채취한 시료의 이산화탄소양을 직접 분석한다.

- 이산화탄소가 두 번째 포집병까지 있을 경우의 보정을 위하여 시험 종료 시 두 번째 포집병의 이산화탄소양을 분석한다.

3.3.6 용존유기탄소나 특정 화학물질 분석이 필요할 경우 28 일째 되는 날 시료를 채취할 수도 있다.

- 1 mL의 진한 염산을 각 시험플라스크에 첨가하고 하루 동안 공기를 공급하여 이산화탄소를 빼낸다.

- 29 일차에 마지막으로 발생한 이산화탄소양 분석을 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는(주 4)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 수산화바륨(0.0125 M Ba(OH)₂)을 이용한 분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{생성된 CO}_2 \text{ 양 (mg) (주 2)}}{\text{ThCO}_2 \times \text{첨가된 시험물질 양 (mg)}} \times 100$$

ThCO₂ : 이론적 이산화탄소양

또는

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{생성된 CO}_2 \text{ 양 (mg) (주 2)}}{\text{시험에 첨가된 TOC (mg)} \times 3.67} \times 100$$

3.67 : 탄소에서 이산화탄소로 환산계수(44/12)

1.3 수산화나트륨(0.05 M NaOH)을 이용한 분해도(%) 산출 방법

$$\text{ThCO}_2(\%) = \frac{\text{시험물질군 IC(mg) - 바탕시험군의 IC (mg)}}{\text{시험물질로 첨가된 TOC (mg)}} \times 100$$

IC (Inorganic carbon) : 무기탄소의 양

1.4 용존유기탄소 감소량 측정시험(제4장 1항)에 제시된 식을 이용하여 용존유기탄소 감소에 의한 분해도(%)를 산출한다.

1.5 비생물 분해도(%) 산출 방법

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{\text{28일 후 비생물 멸균대조군에서 생성된 CO}_2 \text{ (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 이론적 이산화탄소량에 대해 25 % 또는 용존유기탄소에 대해 35 % 미만이라면, 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 3). 이러한 경우, 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 부유물질 30 mg/L 이하를 넘지 않는 더 높은 농도 수준의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험 한다.

2. 시험의 적합성

2.1 시험을 시작할 때 기초배양액 내 시험물질 현탁액의 무기탄소(IC) 함유량은 총 유기탄소의 5 % 미만 이어야 하고, 시험종료 시 접종원 바탕시험군의 총 이산화탄소 발생은 40 mg/L(배양액)를 초과하면 안된다. 만약 70 mg CO₂/L 보다 큰 값을 얻었다면 데이터와 실험 방법에 대한 정밀한 조사가 필요하다.

2.2 정체기, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.3 표준물질의 이론적 이산화탄소량 발생에 의한 분해도 또는 용존유기탄소 감소에 의한 분해도가 14 일 내에 각각 60 % 또는 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

- 3.5 시험조건 :
- (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
 - (2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등
 - (3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법
 - (4) 시험방법

- 3.6 시험결과 :
- (1) 도표로 산출된 형태의 자료
 - (2) 생분해도(%)
 - (3) 관찰된 억제현상
 - (4) 미생물 분해도
 - (5) 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) 이산화탄소량 계산방법(수산화바륨 사용 시)

$$\frac{0.05 \times (50 - \text{적정된 염산 양(mL)}) \times 44}{2} = 1.1 \times (50 - \text{적정된 염산 양(mL)})$$

0.05 : 염산의 농도(M)

50 : 수산화바륨을 적정하기 위한 염산의 양

44 : 이산화탄소의 분자량

2 : 수산화바륨을 적정하기 위한 염산의 몰(mol)비

ex) 접종원의 이산화탄소 발생에 대해 적정에 사용된 염산량이 48 mL이고, (접종원 + 시험물질)의 이산화탄소 발생에 대해 염산이 45 mL 사용되었을 경우 접종원에 의해 발생된 이산화탄소 = $1.1 \times (50 - 48) = 2.2 \text{ mg}$ (접종원 + 시험물질)에 의해 발생된 이산화탄소 = $1.1 \times (50 - 45) = 5.5 \text{ mg}$ 이므로 시험물질로부터 생성된 이산화탄소의 양은 3.3 mg 이다.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 4) 이산화탄소 발생량 측정시험(CO₂ Evolution test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액 농도 : (mg/L)

- 배양액 초기농도: (mg/L)

- 플라스크에 첨가된 총 탄소 : (mg C)

- 이론적 이산화탄소량 : (mg CO₂)

4. 접종원

- 출처 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물 내 부유물질 농도 : (mg/L)

5. 이산화탄소 생성과 분해도

- 방법 : 수산화바륨/수산화나트륨/기타

시간 (일)	생성된 CO ₂ (mg)					생성된 누적 CO ₂ (mg)		% ThCO ₂ $\frac{\text{누적 CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2}$		
	시험물질군		바탕시험군			시험 - 바탕시험 평균				
	플라스크 1	플라스크 2	플라스크 3	플라스크 4	평균	플라스크 1	플라스크 2	플라스크 1	플라스크 2	평균*
0										
n ₁										
n ₂										
n ₃										
n ₄										
28										

*

반복구간 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 탄소 분석(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시간(일)	시험물질군 (mg/L)	접종원 바탕시험군 (mg/L)
0	(C ₀)	(C _{bl(0)})
28(또는 배양종료)	(C _t)	(C _{bl(t)})

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

7. 비생물 분해도(선택사항)

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{\text{28일 후 비생물 멸균대조군 CO}_2 \text{ 생성 (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

제3항 미생물분해시험(이분해성) : MITI 수정시험 I

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 측정하기 위한 방법으로 반응기 내 산소흡수량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 난용성 물질의 경우 초음파 등을 이용하여 미세하게 분쇄하여 사용해야 하고, 용매나 유화제를 사용하지 않는다. 휘발성 물질의 경우 자동 호흡측정기 내 사각지대(Dead gas space)의 부피가 최소가 되도록 한다. 또한 시험물질의 이론적 산소요구량 계산을 위해서 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시되기도 함

2.2 생물화학적 산소요구량(BOD, Biochemical oxygen demand)

시험물질이 미생물에 의하여 대사될 때 소비되는 산소량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.4 1차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화하는 것

2.5 최종 생분해(Ultimate biodegradation)

화학물질이 미생물 분해작용을 통해 완전히 분해되어 이산화탄소, 물, 무기염류 및 새로운 미생물 세포로 전환되는 것

II. 시험

1. 원리

기초배양액에 시험물질을 교반하거나 현탁액 상태로 처리하여 시험물질에 적응되지 않은 미생물 접종원을 넣은 후, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인 암조건에서 밀폐식 호흡측정기를 이용하여 28 일간의 산소 흡수정도를 측정한다. 이때 발생한 이산화탄소는 소다석회에 의해 흡수되며, 생분해도는 이론적 산소요구량에 대한 대조군으로 보정한 산소흡수율로 나타낸다. 또한 배양을 시작하고 종료할 때 화학분석을 수행하여 1차 생분해도를 산출할 수도 있으며, 용존유기탄소 분석(주 1)을 통해 최종 생분해도를 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 이산화탄소 흡수제를 담을 수 있는 밀폐 가능한 300 mL 용량의 병 6 개로 구성된 자동 생물화학적 산소요구량 측정기 또는 호흡측정기
- 2.1.2 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온수조
- 2.1.3 용존산소 측정기
- 2.1.4 pH 측정기
- 2.1.5 액체크로마토그래피 등 시험물질 분석기기
- 2.1.6 탄소분석기(선택사항) 등

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액의 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 8.50 g

인산수소이칼륨(K_2HPO_4) 21.75 g

인산수소이나트륨·12수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 44.60 g

염화암모늄(NH_4Cl) 1.70 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous) 27.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D를 각 3 mL 씩 취하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한

다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험병의 준비

6 개의 시험병을 다음과 같이 준비한다.

시험병 1 : 물 + 시험물질(100 mg/L) [비생물적 대조군]

시험병 2, 3 및 4 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질(100 mg/L) [시험물질군]

시험병 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질(100 mg/L) [활성도 대조군(절차대조군)]

시험병 6 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

2.6.1 접종원은 3.2항을 참고하여 시험병 1 을 제외하고 소량씩 넣는다.

2.6.2 용해도가 낮은 시험물질은 무게 또는 부피기준으로 직접 첨가하며, 이때 용매나 유화제는 사용하지 않는다.

2.6.3 일정량의 이산화탄소 흡수제를 모든 시험병에 첨가하고 필요시 접종 전에 시험병 2, 3 및 4의 pH를 7로 조정한다.

2.7 시험조건

(1) 시험물질의 농도 : 100 mg/L

(2) 활성슬러지 농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid)

또는 약 10^7 cells/L ~ 10^8 cells/L

(3) 시험온도 : $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

(4) 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 채취

신선한 미생물 접종원 시료를 전국을 대상으로 하여 적어도 10 군데 이상의 장소에서 채취해야 하며, 주로 다양한 화학물질이 많이 사용되고 폐기되는 지역의

도시하수처리장, 산업폐수처리장, 강, 호수, 바다 등에서 채취한다.

3.1.2 채취횟수

연 4 회, 3 개월 간격(예; 3 월, 6 월, 9 월 및 12 월)으로 채취한다.

3.1.3 채취시료

(1) 도시하수 및 산업폐수처리장 : 슬러지 1 L

(2) 강, 호수, 바다 등 : 표층수 1 L, 공기와 접촉하는 물가의 표토 1 L

3.1.4 운반

채취한 접종원 시료를 용기에 넣고 공기를 공급하면서 운반한다.

3.1.5 접종원의 배양 및 슬러지의 활성화

여러 지역에서 채취해 온 접종원 시료들을 같은 용기에 섞고 부유물질을 제거한 후 놓아둔다. 상등액의 pH를 수산화나트륨 또는 인산을 이용하여 7 ± 1 로 조정한다. 후 여과한다.

여과된 상등액 적정량을 활성슬러지 배양조에 옮겨 약 23.5 시간 동안 공기를 공급하고, 그 후 30 분간 공기 공급을 중단한 후 전체 부피의 1/3 에 해당하는 상등액을 제거하고 같은 양의 0.1 % 합성배지(주 2)를 넣은 후 다시 공기를 공급한다. 배양기간 동안 0.1 %의 합성배지는 1 일 1 회 공급하며 배양온도는 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH는 7 ± 1 를 유지한다.

3.1.6. 접종원의 관리

배양단계에서 관리는 다음의 항목을 점검하여 필요한 조치를 한다.

3.1.6.1 상등액의 성상 : 상등액은 투명하여야 한다.

3.1.6.2 침전성 : 슬러지의 침전성이 뛰어나야 한다.

3.1.6.3 생성상태 : 미생물군집이 증가하지 않는 경우에는 0.1 % 합성배지의 첨가량 또는 첨가회수를 증가시킨다.

3.1.6.4 pH : 상등액의 pH는 7 ± 1 을 유지한다.

3.1.6.5 온도 : 배양온도는 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다.

3.1.6.6 공기공급량 : 배양액 중 용존산소농도가 5 mg/L 이상이 되도록 한다.

3.1.6.7 생물상 : 현미경(100 배율 ~ 400 배율)으로 관찰했을 때 원생동물이 발견되어야 한다.

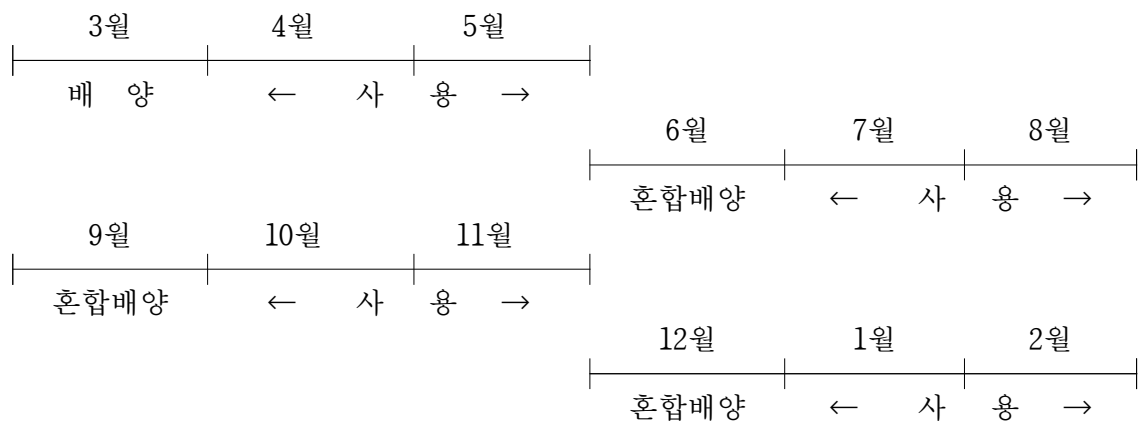
3.1.6.8 원생동물 측정 : 혈구판을 이용하여 대구획 (1 mm × 1 mm × 0.1 mm) 여덟 구역에 있는 원생동물의 수를 모두 더하여 8 로 나눈 후 그 값에 × 10,000을 하여 시료 1 mL당 들어 있는 원생동물을 계수한다.

3.1.6.9 생균수 측정 : 10^7 까지 단계적으로 희석한 적정 농도의 희석액을 45 °C 로 식힌 고체배지(Nutrient agar)에 주입하여 30 °C에서 48 시간 배양한 후 생균수를 측정하는 생균수 측정법(예, 평판배양법)으로 계수한다.

3.1.7 신·구접종원의 혼합

새로운 활성슬러지는 최소한 1 개월 배양할 때까지 접종원으로서 시험에 사용하지 않으며, 배양한지 4 개월 넘은 활성슬러지도 사용하지 않는다. 따라서 3 개월에 한번 씩 새로 접종원을 채취한다.

신·구접종원의 동일한 활성도를 유지하기 위하여 현재 시험에 사용하고 있는 활성슬러지 상등액을 여과한 여액과 새로 채취한 접종원 혼합물의 여과한 상등액을 같은 양씩 혼합하여 배양한다. 이때 접종원은 합성배지를 가한 후 18 시간 ~ 24 시간 이상 경과한 활성슬러지를 사용한다. 접종원의 준비 및 사용에 관한 예는 다음과 같다.



< 접종원의 사용기간 >

3.1.8. 접종원 활성도 점검

표준물질을 사용하여 적어도 3 개월마다 1 회씩 정기적으로 접종원으로 사용되는 활성슬러지의 활성도를 점검한다. 특히 신·구접종원을 혼합할 때는 접종원

의 활성도 점검이 필요하다.

3.2 접종

미생물 접종원으로 배양된 활성슬러지를 준비된 시험병 2 ~ 6 에 소량씩 넣는다. 이때 접종물의 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L가 되도록 한다.(세포수로 약 10^7 cells/L ~ 10^8 cells/L). 시험병 1 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것이므로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 생분해도 시험장치를 조립한 후 시험장치가 밀폐되었는지 확인한 후 교반기를 돌리기 시작하며, 암조건에서 산소흡수도를 측정하기 시작한다. 항온기를 이용하여 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 충분히 교반하면서 28 일간 배양한다.

3.3.2 하루에 1 회 산소흡수도, 온도, 교반기 작동정도, 시험병 내용물의 색변화 등을 확인한다. 시험종료 후 시험병 내 시험용액의 pH, 시험물질의 잔류량 및 가능한 경우 중간생성물 농도 등을 확인한다. 시험물질의 잔류량 측정은 시험물질에 적당한 용제로 추출 및 농축하고 적절한 분석기기를 이용하여 정량분석한다.

3.3.3 시험물질이 수용성인 경우 용존유기탄소를 이용하여 분해도를 산출할 수 있으며, 질소를 포함하는 물질인 경우 가능하다면 질산화에 소모된 산소량을 고려한다 (NO_2^- , NO_3^- 농도 측정)(주 1).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 4)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 생물화학적 산소요구량 측정에 의한 생분해도(%) 산출

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD}_{\text{sample}} - \text{BOD}_{\text{blank}}}{\text{ThOD}} \times 100$$

BOD_{sample} : 시료의 시험물질(또는 표준물질)의 BOD 측정값(mg)

BOD_{blank} : 접종원 바탕시험군의 BOD 측정값(mg)

ThOD : 이론적 산소요구량 계산 값(mg)(주 1)

ThOD는 질산화 여부를 고려하여 계산할 수 있다(주 1, 주 3).

1.3 화학분석에 의한 분해도(%) 산출

$$\text{분해도(\%)} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

S_a : 시험종료시 시험물질의 잔류량 측정값(mg/L)

S_b : 비생물적 대조군의 시험물질 잔류량 측정값(mg/L)

1.4 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 (%) 산출(선택사항)

$$\text{분해도(\%)} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

a : 비생물적 대조군의 DOC 측정값(mg/L)

b : 시험물질군의 DOC 측정값(mg/L)

c : 접종원 바탕시험군의 DOC 측정값(mg/L)

2. 시험결과의 적합성

2.1 시험병 6 (접종원 바탕시험군)의 산소흡수량은 일반적으로 20 mg O₂/L ~ 30 mg O₂/L이며, 28 일째에 60 mg O₂/L을 넘어서는 안된다.

2.2 pH 값이 6.0 ~ 8.5 범위를 벗어난 상태로 시험물질의 산소소모 정도가 60 % 미만이면 시험물질을 저농도로 하여 재시험한다.

2.3 시험 종료 시 반복구간 시험물질 분해도의 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.4 산소소비량으로부터 구한 표준물질(아닐린) 생분해도가 7 일 후에 40 % 또는 14 일 후에 65 %가 넘지 않는 경우, 접종원의 활성도에 문제가 있으므로 이 시험은 부적합한 것으로 간주하고 다시 수행한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리방법 및 농도 등

(3) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생물화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도

(5) 시험물질의 크로마토그램 또는 스펙트럼

(6) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) 0.1 % 합성배지 : 포도당, 펩톤 및 인산칼륨 각각 1 g을 물 1 L에 녹이고 수산

화나트륨을 이용하여 pH를 7.0 ± 1.0 으로 조절.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) MITI 수정시험 I 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험초기농도 : (mg/L)

- 이론적 산소요구량 : (mg O₂/L)

4. 접종원 :

- 접종원 채취 지역

- | | |
|----|-----|
| 1) | 6) |
| 2) | 7) |
| 3) | 8) |
| 4) | 9) |
| 5) | 10) |

- 합성배지로 배양된 활성슬러지 부유물질(SS) 농도 : (mg/L)

- 최종 시험액 L당 첨가한 활성슬러지 부피 : (ml)

- 최종 시험액의 활성슬러지 농도 : (mg/L)

5. 생분해도

- 사용된 호흡측정기기 :

	시간(일)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질 처리군 BOD값 시험병 2 시험병 3 시험병 4				
접종원 바탕시험군 BOD값				
생분해도(%): (BOD-B)/ThOD × 100 시험병 2 시험병 3 시험병 4 평균값*				

* 반복구간 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

6. 용존유기탄소 분석에 의한 분해도(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시험병	DOC				DOC 감소율(%)	평균
	측정값		보정값			
시험병 1	a				-	-
시험병 2	b1		b1-c			
시험병 3	b2		b2-c			
시험병 4	b3		b3-c			
시험병 6	c		-		-	-

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \frac{a - (b-c)}{a} \times 100$$

7. 화학분석에 의한 분해도

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
시험병 1	Sb	
시험병 2	Sa1	
시험병 3	Sa2	
시험병 4	Sa3	

$$\text{분해도}(\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

8. 시간 경과에 따른 생물화학적 산소요구량(BOD) 곡선

제4항 미생물분해시험(이분해성): 밀폐시험병을 이용한 용존산소 소모량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 소모되는 용존산소량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 이 방법은 이론적 산소요구량을 계산할 수 있도록 시험물질의 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이론적 산소요구량을 계산할 수 없다면 화학적 산소요구량도 사용 가능하나 불완전한 산화가 일어나면 오차가 커질 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며, 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 화학적 산소요구량(COD, Chemical oxygen demand)

고온의 산성 조건에서 중크롬산칼륨으로 시험물질을 산화시키는 동안 소모되는 산소의 양. COD는 물질 중에 산화될 수 있는 물질의 양에 대한 척도이며, 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 산소요구량 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThOD; 60 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하

며, 28 일이 지난 후 '10 일 창'을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성 물질이라 할 수 없음. 다만, 본 시험에서 10 일 창을 적용할 때 시험병이 과도하게 많이 필요한 경우, 14 일 창을 대신 적용할 수 있음.

II. 시험

1. 원리

시험물질(2 mg/L ~ 5 mg/L)을 함유하고 있는 기초배양액에 소량의 접종원을 첨가하고 시험병에 넣어 완전히 밀폐시킨 후, $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인 암조건에서 28 일간 배양한다. 생분해도는 배양기간 중 용존산소요구량에 대한 이론적 산소요구량 또는 화학적 산소요구량의 비율로 나타낸다. 생분해과정 중 미생물에 의해 흡수된 산소량은 접종원 바탕시험군으로 보정하여 계산해야 한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 250 mL ~ 300 mL 또는 100 mL ~ 125 mL 용량의 유리 마개가 있는 생물 화학적 산소요구량 시험병(BOD병)

2.1.2 암조건에서 일정한 온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온 수조

2.1.3 기초배양액 조제용 유리병(2 L ~ 5 L)

2.1.4 산소 전극과 측정기 또는 윙클러 적정(Winkler titration)을 위한 장비와 시약

2.1.5 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2)	27.50 g
또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌디아민사아세트산나트륨염(EDTA Disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다.

기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D 각 1 mL 씩 취하여 800 mL 물에 섞은 후 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

물질의 용해도가 1 g/L를 초과하는 경우 시험물질이나 표준물질 1 g ~ 10 g을 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다. 또는 기초배양액에 직접 시험물질이나 표준물질을 첨가하고 완전히 용해되도록 조제한다(주 1).

2.7 시험병의 준비

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험물질군]

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

시험병 6 개 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 적어도 20 분간 기초배양액에 다량의 공기를 공급한 후 시험 온도에서 20 시간 동안 공기공급 없이 놓아두었다가 용존산소 농도를 측정한다. 20 °C에서 용존산소 농도는 약 9 mg/L가 되어야 한다. 각 시험병에 기초배양액을 채울 때 기포가 생기지 않도록 해야 하며, 배양액 중 공기는 포화상태여야 한다.

2.7.2 시험기간 동안 최소한 두 번의 산소 소모량을 측정하도록 위와 같이 충분한 수의 시험병이 필요하며, 10 일 창을 확인하기 위해서는 2 배 정도의 시험병이 더 필요할 수 있다.

2.7.3 준비된 기초배양액을 큰 유리병에 1/3 정도 넣고 해당되는 유리병에는 시험물질의 최종농도가 10 mg/L가 초과하지 않도록 넣는다.

2.7.4 적용 가능한 시험물질의 가장 높은 농도는 시험물질의 이론적 산소요구량으로 계산할 수 있다.

- 분해도가 낮거나 이론적 산소요구량이 낮은 화학물질의 경우 5 mg/L ~ 10 mg/L 농도를 사용할 수 있다.

- 때에 따라 서로 다른 두 농도에서 병행시험을 수행할 수 있다

(예 : 2 mg/L 및 5 mg/L).

- 일반적으로 암모늄염 생성에 기초하여 이론적 산소요구량을 계산한다. 만약 질산화가 예상되거나 발생한다고 알려져 있다면, 질산염 생성에 기초하여 $\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$ 를

계산한다(주 2).

2.7.5 접종원(0.05 mL/L ~ 5 mL/L)을 넣고 공기가 공급된 기초배양액으로 용액의 용량을 맞춘다. 이때 적절히 섞일 수 있도록 유리병의 바닥에 닿는 호스를 이용(사이펀)하여 기초배양액을 첨가한다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 10 mg/L 이하

2.8.2 접종원 농도 : 0.05 mL/L ~ 5 mL/L

2.8.3 시험온도 : 22 °C ± 2 °C

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

일반적으로 생활하수처리 시설이나 연구실 단위의 2 차 방류수를 이용하며, 다른 방법으로는 지표수를 채취하여 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 그냥 놓아두거나 1,100 ×g에서 10 분 동안 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다.

- 농축된 활성슬러지에 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액을 첨가하고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

접종원을 준비된 시험병에 적당량(0.05 mL/L ~ 5 mL/L) 넣는다. 접종원의 최적의 양을 결정하기 위해 예비시험을 수행할 수 있다.

3.3 분해도 시험

3.3.1 앞에서 조제한 큰 유리병의 하부 1/4 지점에서 호스(사이펀 등)로 각각 조제된 용액이나 현탁액을 즉시 시험병의 개별 그룹에 분주하여 채워준다. 용해도가 낮은 물질 첨가시에는 큰 유리병을 계속 교반하면서 시험병을 채운다. 이때 기포를 제거하기 위해 부드럽게 두드려 준다.

3.3.2 잉클러(Winkler)법이나 전극법으로 0 시간 시료의 용존산소를 측정한다.

- 잉클러법에서 즉시 분석이 어려울 경우 첫 단계의 잉클러시약인 황산망간(II)(MnSO_4)과 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 밀폐시킨 시험병을 다음 단계 24

시간 전까지 10 °C ~ 20 °C의 암조건 하에서 보관한다.

- 나머지 반복구 시험병들도 공기방울이 생기지 않도록 밀폐한 후 20 °C 의 암조건에서 보관한다.

3.3.3 28 일 배양 기간 중 적어도 일주일에 한 번 정도의 간격으로 각 처리군별 최소 두 개의 시험병에서 용존산소 분석을 위한 시료를 채취한다. 이 시료로는 14 일 창감소비율을 평가해야 하고 이와는 별도로 매 3 일 ~ 4 일마다 채취하는 시료는 10 일 창을 확인할 수 있어야 한다. 이러한 경우 약 2 배 정도의 시료 병이 필요할 수 있다.

3.3.4 일반적으로 생분해도는 이론적 산소요구량을 계산하여 구한다. 질소함유 물질에 대해서는 질산화에 의한 산소섭취 보정이 필요하다. 질산화의 유무에 따라 질산화에 의한 이론적 산소요구량(ThODNO₃, ThODNH₄)를 적용하여 계산한다. 만약 질산화가 완전히 일어나지 않았다면 28 일 동안 아질산염과 질산염의 농도변화로 부터 소비된 산소량을 계산하여 보정한다(주 2)(주 3).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 6)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 이론적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})} \times 100$$

BOD : 시료의 생물화학적 산소요구량 mg(주 4)

ThOD : 이론적 산소요구량 mg(주 2)

1.3 화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})}{\text{COD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})} \times 100$$

COD : 시료의 화학적 산소요구량 mg(주 2)

- 1.4 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 ThOD에 대해 25 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 5). 이러한 경우 낮은 농도에서 시험하거나, 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험한다.

2. 시험결과의 적합성

- 2.1 28 일 후 접종원 바탕시험군의 산소소모는 1.5 mg 용존산소/L를 초과하면 안 된다.
- 2.2 시험기간 중 시험병 내의 잔류 산소의 농도는 0.5 mg/L 미만으로 내려가면 안 된다.
- 2.2 정체기, 시험 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에는 각 시험병 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.
- 2.3 표준물질의 이론적 산소요구량에 근거한 분해도는 14 일 내에 60 %까지 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간
- 3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
(2) 입수처, 입수일
(3) 순도(%), 불순물
(4) 분자량 및 물리화학적 성질
- 3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) 생물화학적 산소요구량 산출 방법

$$\text{BOD} = \frac{\text{시험물질 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)} - \text{접종원 바탕시험군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)}}{\text{mg 시험물질/L 시험병 용액}}$$

$$= \text{mg O}_2\text{/mg 시험물질}$$

주 5) OECD (1992). Test guideline 301. Ready biodegradability. Annex II.

주 6) 밀폐시험병을 이용한 용존산소 소모량 측정시험(Closed bottle test) 결과 작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

- 이론적 산소요구량 또는

화학적 산소요구량 : (mg O₂/mg 시험물질)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 용존산소 측정

- 측정방법 : 윙클러법/전극법

	시험병 번호		n일 후의 mg O ₂ /L			
			0	n ₁	n ₂	n _x
접종원 바탕시험군	1	c ₁				
	2	c ₂				
	평균	$m_b = (C_1 + C_2)/2$				
시험물질군	1	a ₁				
	2	a ₂				

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 질산화 보정

	배양시간(일)				
	0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
(i) 질산염 농도(mg N/L)					
(ii) 질산염 농도변화(mg N/L)	-				
(iii) 산소 등량(equivalent)(mg/L)	-				
(iv) 아질산염 농도(mg N/L)					
(v) 아질산염 농도변화(mg N/L)	-				
(vi) 산소 등량(mg/L)	-				
(iii+vi) 총 산소 등량	-				

7. 용존산소 소모량 : 분해도(%)

	n일 후의 DO 감소(mg/L)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
$(m_b - a_1)^{(1)}$				
$(m_b - a_2)^{(1)}$				
$\% Da_1 = \frac{(m_b - a_1)^{(1)}}{\text{시험물질(mg/L)} \times \text{ThOD}} \times 100$				
$\% Da_2 = \frac{(m_b - a_2)^{(1)}}{\text{시험물질(mg/L)} \times \text{ThOD}} \times 100$				
$\% D_{\text{평균}} = \frac{Da_1 + Da_2}{2}$				

⁽¹⁾ $m_{b(0)} = a_{1(0)} = a_{2(0)}$ 인 경우,

$m_{b(0)}$ = 0일째에 바탕대조군의 값

$a_{1(0)}$ = 시험병 1에서 0일째 시험물질군의 값

$a_{2(0)}$ = 시험병 2에서 0일째 시험물질군의 값

$m_{b(0)}$ 이 $a_{1(0)}$ 또는 $a_{2(0)}$ 와 같지 않은 경우,

$(a_{1(0)} - a_{1(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ 및 $(a_{2(0)} - a_{2(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ 를 이용하며

$m_{b(x)}$ = x일째에 바탕대조군의 평균값

$a_{1(x)}$ = 시험병 1에서 x일째 시험물질군의 값

$a_{2(x)}$ = 시험병 2에서 x일째 시험물질군의 값

8. 바탕대조군의 용존산소 소모량

바탕대조군에서 산소소모량[$(m_{b(0)} - m_{b(28)})$ mg/L]은 1.5 mg/L 미만이어야 한다.

상기 5항의 (iii + vi)로부터 질산화 보정을 적용한다.

제5항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(II)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해되기 전후 용존유기탄소량의 차이를 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성이고 물에 대한 용해도가 100 mg/L이어야 하며 시험물질의 탄소함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이 시험법은 “미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)” (제4장 제1항) 방법과 유사하지만 더 낮은 농도의 미생물을 사용한다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 1차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화하는 것

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질

이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 10 mg/L ~ 40 mg/L 사이에서 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 접종원(0.5 mL/L)을 넣고 22 °C ± 2 °C의 암조건에서 28 일간 공기를 공급하면서 배양한다. 시험기간 중 일정 시간 간격으로 용존유기탄소 분석을 실시하여 생분해도를 계산한다. 생분해도는 초기 용존유기탄소 농도에 대한 접종원 바탕시험군으로 보정한 감소율로 나타낸다. 또한 1차 생분해도는 배양의 시작과 끝에 모화합물에 대한 화학분석으로 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 용존유기탄소 분석에 필요한 용량에 따라 250 mL ~ 2,000 mL 의 삼각 플라스크를 사용한다. 플라스크는 각 시험 전에 알코올성 염산 등으로 철저히 세척하고 건조시켜야 한다.

2.1.2 진탕기

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

2.1.5 용존산소 측정장비

2.1.6 원심분리기

2.1.7 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2)	27.50 g
또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌다이아민사아세트산나트륨염(EDTA disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다. 기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액 원액 A를 10 mL 취하여 800 mL 물에 섞은 후 원액 B, C, D를 각 1 mL씩 첨가하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

본 시험법에서는 접종원을 단지 0.5 mL/L만 사용하기 때문에 기초배양액에 미량 원소와 성장인자를 보강해야 한다. 최종 기초배양액 1 L에 미량원소 용액(i) 과 비타민 용액(ii)을 각각 1 mL씩 넣어준다.

i) 미량원소 용액

황산망간·4수화물($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	39.9 mg
붕산(H_3BO_3)	57.2 mg
황산아연·7수화물($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	42.8 mg
칠몰리브덴산육암모늄($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)	34.7 mg
Fe-킬레이트($\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$)	100.0 mg

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

ii) 비타민 용액

효모 추출액	15.0 mg
--------	---------

- 효모 추출액을 물 100 mL에 용해시키고 0.2 μm 막여과를 통해 멸균한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질의 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 0.2 μm ~ 0.45 μm 막 여과장치를 사용한 멸균 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 멸균제 + 시험물질 [흡착 대조군]

플라스크 8 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 접종원은 3.2 항을 참고하여 플라스크 6 을 제외한 모든 플라스크에 적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 8에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4로 조정한다.

2.7.4 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 2 L 플라스크에 800 mL 기초배양액 첨가
- 최종 혼합물 내 시험물질(또는 표준물질)의 농도가 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L가 되도록 시험물질(또는 표준물질) 표준원액 첨가
- 배양액 1 L당 0.5 mL의 접종원 첨가
- 플라스크 내 용액이 최종적으로 1 L가 되도록 기초배양액으로 채운다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : 0.5 mL/L(기초배양액)

2.8.3 시험온도 : 22 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 \pm 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 접종원으로는 생활하수를 처리하는 시설이나 연구실 규모 단위장치의 2차 방류수에서 유래된 것을 이용한다. 채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.2 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시 까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 기초배양액 1 L 당 여과한 접종원 0.5 mL을 사용한다.

3.1.3 시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 8에 기초배양액 1 L 당 접종원을 0.5 mL 씩 접종한다. 플라스크 6은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 시험에 필요한 설치를 모두 마치고 진탕기에 넣기 전에 초기 용존유기탄소 농도 측정을 위해 각 플라스크에서 시료를 두 번씩 채취한다(주 1).

3.3.2 시료 채취를 마친 플라스크는 알루미늄 호일로 입구를 막고 진탕기에 넣어주며, 이때 암실에서 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 온도 하에 공기를 공급한다.

3.3.3 시험기간 동안 정해진 시간 간격으로 각 플라스크로부터 두 번씩 시료의 용존유기탄소 농도를 측정한다. 플라스크 1, 2(시험물질군)와 플라스크 3, 4(접종원 바탕시험군)의 용존유기탄소 농도를 동시에 측정해야 한다.

3.3.4 채취한 시료는 막여과장치로 여과한 후 초기의 20 mL 여과액은 버리고, 나머지 여과액을 10 % 이하의 탄소 농도를 정확하게 측정할 수 있는 용존유기탄소 분석기로 분석한다. 여과하거나 원심분리한 시료는 같은 날 분석하거나 일정기간 보관 후 분석한다.

3.3.5 10 일 창에서 용존유기탄소 감소비율을 확인할 수 있도록 충분한 수의 시료를 채취한다. 시료 채취 후 바로 분석을 수행하는 경우 분석 결과에 따라 다음 시료 채취 시간을 결정한다.

3.3.6 시료 채취 후 바로 분석을 하지 않고 보관하는 경우 시료채취는 매일 혹은

이틀에 한번 씩 채취한다. 시료의 보관은 2 ℃ ~ 4 ℃ 조건에서는 최대 48 시간 이내에 분석해야 하고 장기간 보관해야 하는 경우에는 -18 ℃ 이하로 보관한다.

3.3.7 시료를 채취할 때 플라스크로부터 최소량을 채취하고 용존유기탄소 농도를 측정한다. 실험과정 중의 증발 손실을 보충하기 위해 시료 채취 전에 필요량 만큼의 물을 첨가해 주고, 플라스크 벽면에 붙은 물질이 재용해 또는 재부유 되도록 잘 섞어준다.

3.3.8 시험 종료 후 분석을 실시할 때, 생분해 곡선을 그리기 위한 측정값이 상대적으로 적으면 마지막 시료부터 분석한다. 만약 마지막 시료에서 생분해가 일어나지 않았다면 더 이상 분석하지 않아도 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는(주 3)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

모든 농도는 실험으로 측정한 값이다.

1.3 비생물 분해도(%) 산출법

$$\text{비생물 분해도(}\%) = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

$C_{s(0)}$: 0일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

$C_{s(t)}$: t일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

1.4 시험이 적합성 기준을 만족시켰다면 플라스크 1, 2 의 평균을 이용하여 분해과정을 도표로 나타내고, 10 일 창를 표시한다. 정체기, 시험종료 또는 '10 일 창' 마지막에서의 용존유기탄소 감소율을 기록한다.

1.5 시험물질의 화학분석자료가 있는 경우 1 차 생분해도를 기록한다.

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 총 용존유기탄소 분해율이 14 일내에 35 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 2). 이러한 경우 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않을 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험한다.

2. 시험결과의 적합성

2.1 정체기, 시험 종료 또는 10 일 창 마지막 날에는 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.2 표준물질의 용존유기탄소 분해율은 14 일 내에 70 %까지 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

- (2) 입수처, 입수일
- (3) 순도(%), 불순물
- (4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 :

- (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
- (2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등
- (3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법
- (4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 :

- (1) 도표로 산출된 형태의 자료
- (2) 생분해도(%)
- (3) 관찰된 억제현상
- (4) 미생물 분해도
- (5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도
- (6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)
- (7) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 3) 용존유기탄소 감소량 측정시험(Ⅱ)(Modified OECD Screening Test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물 내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 탄소 분석

- 사용된 탄소분석기 :

	플라스크 번호		n일 후의 DOC (mg/L)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질군	1	a ₁					
		a ₂					
		평균, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		평균, C _{b(t)}					
접종원 바탕시험군	3	c ₁					
		c ₂					
		평균, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		평균, C _{d(t)}					
	평균, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. 기초자료의 평가

플라스크 번호	결과 계산	n일 후의 분해도(%)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
평균*	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* D₁ 과 D₂ 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

7. 비생물 분해도(선택사항)

	기간 (일)	
	0	1
비생물 멸균 대조군의 DOC 농도(mg/L)	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S _b	
배양된 기초배양액	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

제6항 미생물분해시험(이분해성) : 압력계를 이용한 산소 소모량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 압력계를 이용하여 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 소모되는 산소량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 이 방법은 이론적산소요구량을 계산할 수 있도록 시험물질의 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이론적 산소요구량을 계산할 수 없다면 화학적 산소요구량도 사용 가능하나 불완전한 산화가 일어나면 오차가 커질 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 화학적 산소요구량(COD, Chemical oxygen demand)

고온의 산성조건에서 중크롬산칼륨으로 시험 물질을 산화시키는 동안 소비되는 산소의 양. COD는 물질 중에 산화될 수 있는 물질의 양에 대한 척도를 나타내며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 산소요구량 또는 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThOD; 60 % 또는 DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우

해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

2.4 최종 생분해(Ultimate biodegradation)

화학물질이 미생물 분해작용을 통해 완전히 분해되어 이산화탄소, 물, 무기염류 및 새로운 미생물세포로 전환되는 것

II. 시험

1. 원리

알려진 농도(이론적 산소요구량으로 50 mg/L ~ 100 mg/L 범위의 시험물질 약 100 mg/L)의 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 접종원을 첨가시키고 플라스크에 넣어 밀폐시킨 후, 일정온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)로 28 일간 교반한다. 산소 소모량은 호흡측정기 플라스크의 일정 기체용적을 유지시키는 데 필요한 산소량(전기적 생성)을 측정하거나 측정장치의 부피 및 압력 변화로 측정한다. 시험 중 생성된 이산화탄소는 수산화칼륨이나 다른 흡착제를 사용하여 포집한다. 생분해도는 생분해과정 중 미생물에 의해 사용된 산소량을 접종원 바탕시험군으로 보정하여 계산하며, 이론적 산소요구량이나 화학적 산소요구량에 대한 비율로 나타낸다. 또한 선택사항으로 1차 생분해도는 배양의 시작과 종료 시에 모화합물에 대한 화학분석으로 계산할 수 있으며, 최종생분해는 용존유기탄소 분석에 의해 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 호흡량 측정기(Respirometer)

2.1.2 일정한 온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)를 유지 할 수 있는 온도 조절기

2.1.3 막여과장치(선택사항)

2.1.4 탄소분석기(선택사항)

2.1.5 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 기초배양액을 위한 원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.4 기초배양액 조제

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 기초배양액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질의 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다. 난용성 물질의 경우(주 1)을 참고한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 $0.2\ \mu m \sim 0.45\ \mu m$ 막 여과장치를 사용하여 멸균 가능)

(*비생물 멸균 대조군의 경우 일반적으로 시험물질은 이론적 산소요구량 $100\ mg/L$ 로 하여 멸균 후 첨가)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 질산화가 예상되지 않는 경우 암모늄염 생성에 기초하여 이론적 산소요구량을 계산한다. 만약 질산화가 예상되거나 발생한다고 알려져 있다면 질산염 생성에 기초하여 $\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$ 를 계산한다(주 2).

2.7.2 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4 ± 0.2 로 조정한다.

2.7.3 수산화칼륨, 소다석회 알갱이 또는 다른 흡수제를 이산화탄소 흡수 용기에 첨가한다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 100 mg/L (이론적 산소요구량 50 mg/L ~ 100 mg/L)

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : $\leq 30 \text{ mg/L}$ 부유물질(SS, suspended solid) 또는 $\leq 100 \text{ mL/L}$ 2차 방류수

2.8.3 시험온도 : $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하

고 놓아두거나 1,100 ×g에서 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다. 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액으로 농축된 슬러지를 부유시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 7 에 접종원을 소량씩 넣는다. 이때 접종원의 농도는 각각 부유물질로 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 분해도시험

3.3.1 시험온도로 맞춰진 상태에서 생분해도 시험장치를 조립한 후 시험장치가 밀폐되었는지 확인한 후 교반기를 돌리며 산소흡수도를 측정하기 시작한다. 자동 호흡측정기를 사용하는 경우 산소흡수도가 지속적으로 측정되나 자동이 아닌 경우 매일 측정값을 기록해야 한다.

3.3.2 측정된 값들로부터 산소흡수도를 계산한다. 배양 종료시에 플라스크내 용액의 pH를 측정한다.

3.3.3 필요한 경우 용존유기탄소 분석 또는 화학분석을 위해서 시험 시작과 종료시에 호흡측정기 플라스크로부터 시료를 채취하며, 처음 시료 채취시 플라스크에 남아 있는 시험물질 용량을 알고 있어야 한다(주 2).

3.3.4 일반적으로 생분해도는 이론적 산소요구량을 계산하여 구한다. 질소 함유 물질에 대해서는 질산화에 의한 산소섭취 보정이 필요하다. 질산화의 유무에 따라 질산화에 의한 이론적 산소요구량($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$, $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$)을 적용하여 계산한다. 만약 질산화가 완전하지 않다면 28 일 동안 아질산염과 질산염의 농도변화로부터 소비된 산소량을 계산하여 보정한다(주 2)(주 3).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 6)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 이론적산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}}{\text{ThOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}} \times 100$$

BOD : 시료의 생물화학적 산소요구량 mg(주 4)

ThOD : 이론적 산소요구량 mg(주 2)

1.3 화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}}{\text{COD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}} \times 100$$

COD : 시료의 화학적 산소요구량 mg(주 2)

1.4 화학분석에 의한 분해도를 산출하는 방법(선택사항)

$$\text{분해도}(\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

S_a : 시험종료시 시험물질의 잔류량 측정값(mg/L)

S_b : 비생물적 대조군의 시험물질 잔류량 측정값(mg/L)

1.5 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법(선택사항)

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 이론적 산소 요구량에 대해 25 % 또는 용존유기탄소에 대해 35 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 5). 이러한 경우, 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 부유물질 30 mg/L 이하를 넘지 않는 더 높은 농도 수준의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험 한다.

2. 시험결과의 적합성

2.1 시험병 6 (접종원 바탕시험군)의 산소흡수량은 일반적으로 20 mg O_2 /L ~ 30 mg O_2 /L이며, 28 일째에 60 mg O_2 /L을 넘어서는 안된다.

2.2 pH값이 6.0 ~ 8.5 범위를 벗어난 상태로 시험물질의 산소소모 정도가 60 % 미만이면 시험물질을 저농도로 하여 재시험한다.

2.3 정체기, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.4 표준물질의 이론적 산소요구량에 근거한 분해도 또는 용존유기탄소 감소에 의한 분해도가 14 일 내에 각각 60 % 또는 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 비생물 분해도

- (5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도
- (6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)
- (7) 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 3) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) 생물화학적 산소요구량(BOD)값 산출 방법

$$\text{BOD} = \frac{\text{시험물질군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)} - \text{접종원 바탕시험군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)}}{\text{mg 시험물질/L 시험병 용액}}$$
$$= \text{mg O}_2\text{/mg 시험물질}$$

주 5) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 6) 압력계를 이용한 산소 소모량 측정시험(Manometric Respirometry Test) 결과
작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도, C_0 : (mg/L)

- 시험 플라스크 용량, V : (mL)

- 이론적 산소요구량 또는
화학적 산소요구량 : (mg O_2 /mg 시험물질(NH_4 , NO_3))

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 생분해도

- 사용된 호흡측정기기 :

		시간(일)				
		n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n _x
시험물질군의 산소흡수량(mg)	a ₁ a ₂					
접종원 바탕시험군의 산소흡수량(mg)	b ₁ b ₂ b _m 평균					
보정된 산소흡수량(mg)	(a ₁ - b _m) (a ₂ - b _m)					
BOD (mg O ₂ /mg 시험물질)	(a ₁ - b _m)/C ₀ V (a ₂ - b _m)/C ₀ V					
분해도, D(%)	D _{1(a1)} D _{2(a2)} (BOD/ThOD) × 100 평균*					

* D₁ 과 D₂ 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주: 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 질산화 보정

	배양시간(일)		
	0	28	편차
(i) 질산염 농도(mg N/L)			(N)
(ii) 산소 등량($4.57 \times N \times V$) (mg)			
(iii) 아질산염 농도(mg N/L)			(N)
(iv) 산소 등량($3.43 \times N \times V$) (mg)			
(ii+iv) 총 산소 등량			

7. 탄소 분석(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시간(일)	시험물질군(mg/L)	접종원 바탕시험군(mg/L)
0	(C ₀)	(C _{bl(0)})
28(또는 배양종료)	(C _t)	(C _{bl(t)})

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S _b	
배양된 기초배양액	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

9. 비생물 분해도

a = 시험종료시 비생물 멸균 대조군에서의 O₂ 소모량(mg)

$$\text{시험물질 mg 당 O}_2 \text{ 소모량} = \frac{a}{C_0 V}$$

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{a}{C_0 V \times \text{ThOD}} \times 100$$

제7항 미생물분해시험(본질적 분해성) : MITI 수정시험 II

I. 개요

1. 목적

이 시험은 MITI 수정시험법(I)으로 낮은 분해성을 나타낸 화학물질의 본질적 생분해성을 평가하기 위하여, 생화학적 산소 요구량(BOD)을 측정하고 잔류 물질을 분석하는 데 목적이 있다.

이 시험은 증기압이 낮은 물질, 박테리아를 억제하지 않는 물질, 이산화탄소(CO_2) 흡착제와 접촉 및 반응하지 않는 물질에 적용 가능하다.

2. 정의

2.1 생물화학적 산소요구량(BOD, Biochemical oxygen demand)

시험물질이 미생물에 의하여 대사될 때 소비되는 산소량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 이론적 산소 요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 이론적으로 필요한 산소의 총량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

II. 시험

1. 원리

자동 폐쇄계 산소 소비량 측정 기구(BOD-meter)를 사용한다(주 1). 시험 물질은 시험물질에 적응되지 않은 미생물과 함께 시험관에 접종한다. 시험 기간 동안 생물화학적 산소 소비량은 BOD-meter를 이용해 지속적으로 측정한다. 생분해도는 BOD에 기초하여 용존 유기 탄소 농도, 잔류 화학물질 농도 측정과 같은 주기적인 화학 분석으로 계산한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 이산화탄소 흡수제를 담을 수 있는 밀폐 가능한 300 mL 용량의 병 6 개로 구성된 자동 생물화학적 산소요구량 측정기 또는 호흡측정기
- 2.1.2 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온수조
- 2.1.3 용존산소 측정기
- 2.1.4 pH 측정기
- 2.1.5 액체크로마토그래피 등 시험물질 분석기기
- 2.1.6 탄소분석기(선택사항) 등

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액의 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·12수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	44.60 g
염화암모늄(NH_4Cl)	1.70 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous)	27.50 g
--------------------------------------	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D를 각 3 mL 씩 취하고 물을 가하여 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

새로운 물질을 조사하는 경우에 표준물질은 유용할 수 있다. 접종원의 활성을 확인하기 위해서 표준물질 사용이 바람직하며, 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 또는 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$)이 사용된다. 만약 산소 소비량으로 계산한 아닐린의 분해도가 40 %(7 일 후), 65 %(14 일 후)를 초과하지 않은 경우 그 시험은 무효로 처리한다.

2.6 시험병의 준비

6 개의 시험병을 다음과 같이 준비한다.

시험병1 : 물 300 mL + 시험물질 9 mg [비생물적 대조군]

시험병2, 3, 4 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 30 mg(건조량) + 시험물질 9 mg [시험물질군]

시험병5 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 9 mg(건조량) + 표준물질 30 mg [활성도 대조군]

시험병6 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 30 mg(건조량) [바탕시험군]

2.7 시험조건

(1) 시험물질의 농도 : 30 mg/L

- (2) 활성슬러지 농도 : 100 mg/L
- (3) 시험온도 : 25 °C ± 2 °C
- (4) 시험기간 : 14 일 ~ 28 일
- (5) 암조건에서 수행한다. 온도와 배양용기 내용물의 색 변화를 매일 확인한다.
- (6) 교반기를 이용하여 강하게 교반한다.

2.8 시험물질

원하는 시험농도에서 시험물질이 물에 녹지 않는 경우, 시험 물질을 가능한 곱게 분쇄하여 사용해도 된다. 시험 물질이 휘발성인 경우, 증발을 막기 위해 시험 물질을 냉각시킨다.

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 채취

전국을 대상으로 하여 적어도 10 군데 이상의 장소에서 채취해야 하며, 주로 다양한 화학물질이 많이 사용되고 폐기되는 지역의 도시하수처리장(3 군데), 산업 폐수처리장(1 군데), 강(3 군데), 호수(1 군데), 바다(2 군데) 등에서 채취한다.

3.1.2 채취횟수

연 4 회, 3 개월 간격(3월, 6월, 9월 및 12월)으로 채취한다.

3.1.3 채취시료

- (1) 도시하수 : 활성슬러지 1 L
- (2) 강, 호수, 습지, 바다 : 표층수 1 L, 공기와 접촉하는 물가의 표토 1 L

3.1.4 운반

채취한 접종원 시료를 용기에 넣고 공기를 공급하면서 운반한다.

3.1.5 접종원의 배양 및 슬러지의 활성화

여러 지역에서 채취해 온 활성슬러지를 같은 용기에 섞고 부유물질을 제거한 후 놓아둔다. 상등액의 pH를 수산화나트륨 또는 인산을 이용하여 7.0 ± 1.0 로 조

정한 후 여과한다.

여과된 상등액 적정량을 활성슬러지 배양조에 옮겨 약 23.5 시간 동안 공기를 공급하고, 그 후 30 분간 공기 공급을 중단한 후 전체 부피의 1/3 에 해당하는 상등액을 제거하고 같은 양의 0.1 % 합성배지(주 2)를 넣은 후 다시 공기를 공급한다. 배양기간 동안 0.1 % 의 합성배지는 1 일 1회 공급하며 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH는 7 ± 1 를 유지한다.

3.1.6. 접종원의 관리

배양단계에서 관리는 다음의 항목을 점검하여 필요한 조치를 취한다.

3.1.6.1 상등액의 성상 : 상등액은 투명하여야 한다.

3.1.6.2 침전성 : 큰 덩어리의 활성슬러지는 침전성이 뛰어나야 한다.

3.1.6.3 생성상태 : 미생물군집이 증가하지 않는 경우에는 0.1 % 합성배지의 첨가량 또는 첨가회수를 증가시킨다.

3.1.6.4 pH : 상등액의 pH는 7 ± 1 을 유지한다.

3.1.6.5 온도 : 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다.

3.1.6.6 공기공급량 : 배양액 중 용존산소농도가 5 mg/L 이상이 되도록 한다.

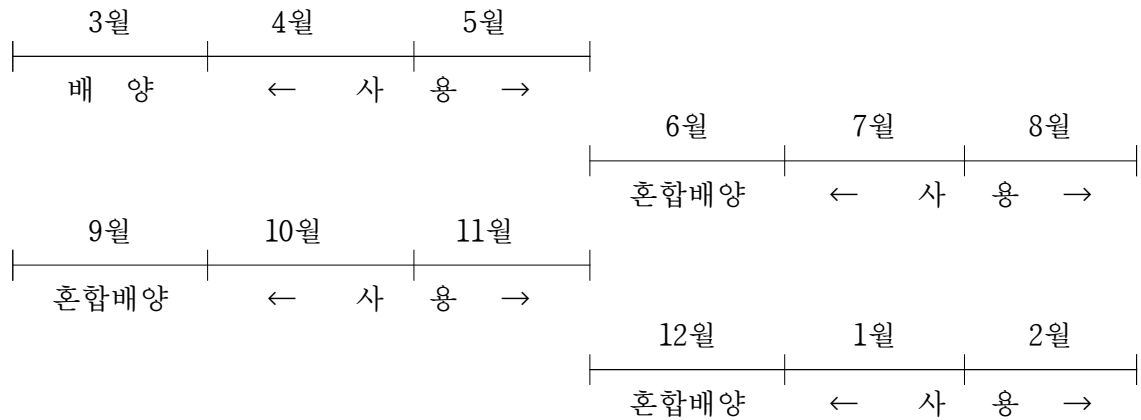
3.1.6.7 생물상 : 현미경(100 배율 ~ 400 배율)으로 관찰했을 때 구름모양의 미생물 군집과 함께 원생동물이 발견되어야 한다.

3.1.7 신·구접종원의 혼합

신·구접종원의 동일한 활성도를 유지하기 위하여 현재 시험에 사용 하고 있는 활성슬러지 상등액을 여과한 여액과 새로 채취한 접종원 혼합물의 여과한 상등액을 같은 양씩 혼합하여 배양한다.

3.1.8. 접종원 활성도 점검

표준물질을 사용하여 적어도 3 개월마다 1 회씩 정기적으로 접종원으로 사용되는 활성슬러지의 활성도를 점검한다. 특히 신·구접종원을 혼합할 때는 접종원의 활성도 점검이 필요하다. 접종원의 준비 및 사용에 관한 예는 다음과 같다.



< 접종균의 준비 및 사용기간에 관한 예 >

3.2 접종

다음 시험관들을 준비하고, 시험 온도에 맞춘다.

- (1) 시험 물질이 30 mg/L (W/V)이 되도록 기초 배양액을 넣은 시험관
- (2) 바탕시험을 위해, 기초 배양액만을 넣은 시험관
- (3) 시험 물질이 30 mg/L (W/V)이 되도록 물을 넣은 시험관
- (4) 아닐린 또는 다른 표준물질이 100 mg/L (W/V)이 되도록 기초 배양액을 넣은 시험관

부유물질(100 μ L/L V/V)의 농도(주 3)가 되도록 위의 시험관 (1), (2)에 접종한다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 BOD 곡선은 14 일 ~ 28 일 동안 자동화된 시설을 이용하여 연속적으로 얻은 자료를 통하여 구한다. 시험 14 일 ~ 28 일 후, 시험관의 pH, 잔류 물질, 중간체를 분석한다. 시험기간 동안 시험물질의 변화나, 압력 또는 시험관 벽에 의한 흡착 등으로 원 시험 물질의 손실은 없는지 분석하기 위해 활성슬러지가 없는 시험관의 시험물질도 분석한다.

3.3.2 시험 물질이 수용성인 경우, 총유기탄소의 잔류량 역시 측정한다. 총 유기탄소 분석기를 사용하는 경우, 시험관에서 시험 용액 10 mL를 취하여 5 분간

3000 ×g로 원심분리한다. 상등액 내의 총유기탄소 잔류량은 총유기탄소 분석기로 결정한다.

다른 분석기를 사용하는 경우, 시험 물질에 적합한 용매로 시험관의 총 내용물을 추출하여 농축과 같은 적절한 전처리 후, 분석기기(기체 크로마토그래피, 흡수 분석법, 질량 분석법, 원자 흡광 광도법 등)를 이용하여 시험 물질의 잔류량을 결정한다.

3.3.3 휘발성 물질인 경우, 증발을 막기 위해 BOD-meter의 온도 제어 수조는 10℃로 냉각되어야 하며, 이 온도는 최소 30 분간 유지되어야 한다. 이 후 분석과정 3.3.2 를 시작한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

1.1 생물화학적 산소요구량 측정에 의한 생분해도(%) 산출

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{ThOD}} \times 100 (\%)$$

BOD : BOD 곡선에서 측정된 시험 물질의 BOD

B : BOD 곡선에서 측정된 기초배양액의 BOD

ThOD : 시험물질이 완전히 산화되는데 필요한 이론적 산소요구량
계산 값(mg)

1.2 화학분석에 의한 분해도(%) 산출

$$\text{분해도(\%)} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 (\%)$$

Sa : 생분해시험 종료 후 시험물질의 잔류량 측정값(mg)

Sb : 두 개의 바탕시험 시험물질 잔류량 측정값(mg)

2. 시험결과의 적합성

- 2.1 표준 물질과의 비교를 위해, 시험 물질의 생분해성을 표준물질(아닐린)의 생분해성과 비교한 상대적인 분해도에 기초하여 분류한다. 이러한 시험 조건에서, 기초 산소 소비의 편차는 표준 시험 조건에서의 값보다 훨씬 크다.
- 2.2 산소소비량으로부터 구한 표준물질(아닐린) 생분해도가 7 일 후에 40 % 또는 14 일 후에 65 %가 넘지 않는 경우, 접종원의 활성도에 문제가 있으므로 이 시험은 부적합한 것으로 간주하고 다시 수행한다.

3. 결과의 평가

3.1 이론적 산소 요구량의 계산

원소	산화형
C	CO ₂
H	H ₂ O
N	NO ₂
S	SO ₂
X (halogen)	X

3.2 분석방법의 회수율

4. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 4.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 4.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 4.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간
- 4.4 시험대상물질
 - (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물
 - (4) 분자량 및 물리화학적 성질
- 4.5 시험조건

- (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
- (2) 활성슬러지 : 채취장소, 농도 등
- (3) 분석방법 : 전처리, 기구의 분석 조건, 분석의 회수율, 중간체 식별

4.6 시험결과

- (1) BOD 곡선 및 기계명
- (2) BOD (mg)
- (3) B (mg)
- (4) Sa, Sb (mg)
- (5) TOD (mg)
- (6) BOD에 의한 분해도, 화학적 분석에 의한 분해도
- (7) 분석을 위해 사용한 시험 물질의 크로마토그램 또는 스펙트럼

4.7 시험결과에 대한 고찰

- 주 1) OECD (1981). Test Guideline 302C. Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II). Annex 1.
- 주 2) 0.1 %의 합성배지 : 포도당, 펩톤 및 인산칼륨 각각 1 g을 물 1 L에 녹이고 수산화나트륨을 이용하여 pH를 7 ± 1 로 조절.
- 주 3) OECD (1981). Test Guideline 302C. Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II). Annex 2.

제8항 토양미생물 영향 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 토양 내 미생물의 미치는 영향을 평가하는데 목적이 있다. 화학물질에 노출된 토양미생물의 탄소 및 질소 변환능을 관찰함으로써 화학물질의 독성을 평가한다.

2. 정의

2.1 탄소변환(Carbon transformation)

미생물이 유기물질을 분해하여 최종적으로 이산화탄소를 생성하는 과정

2.2 질소변환(Nitrogen transformation)

질소가 포함된 유기물을 암모니아 생성 및 질산화 과정을 통하여 최종적으로 무기 질산염을 생성하는 미생물에 의한 분해과정

2.3 ECx(Effective concentration)

탄소변환 혹은 질소변환에 있어 x %의 저해효과를 나타내는 시험물질의 농도

2.4 EC₅₀(Medium effective concentration)

탄소변환 혹은 질소변환에 있어 50 %의 저해효과를 나타내는 시험물질의 농도

II. 시험

II-1. 질소 변환능 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

식물보호제, 비료, 삼림용화학물질 등의 농업용 화학물질인 경우에는 탄소 변환 시험과 질소 변환 시험을 모두 실시하여야 하나 비농업용 화학물질의 경우에는 질소 변환 시험만으로 충분하다. 그러나 비농업용 화학물질의 경우에도 질소 변환 시험에서 EC₅₀ 값이 상업적으로 판매되는 질산화저해제(예; Nitrapyrin)의

효과범위에 드는 경우, 더 많은 정보를 얻기 위해 탄소 변환 시험을 실시할 수도 있다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기 : 화학적 작용을 일으키지 않는 재료로 만들어 진 것을 사용하여야 하며 용적의 1/4 가량이 토양시료로 채워지도록 한다. 수분 손실을 최소화하면서 시험기간 동안 기체 교환이 잘 이루어지도록 하여야 하며(예; 시험용기를 구멍이 있는 폴리에틸렌 호일로 덮어둠) 휘발성 물질을 시험하는 경우, 밀폐가 가능하여 기체의 손실을 줄일 수 있는 용기를 사용하여야 한다.

1.2.2 교반장치 : 기계적 교반기 또는 이에 상응하는 장치

1.2.3 3,000 ×g의 원심분리기 또는 여과장치(질산이 포함되지 않은 여과지 사용)

1.2.4 질산염 분석을 위해 적합한 감도를 지닌 효과적인 분석기기

1.3 토양

1.3.1 토양 조건 : 모래함유량 50 % ~ 75 %, pH 5.5 ~ pH 7.5, 유기탄소함유량 0.5 % ~ 1.5 %인 단일 토양을 사용한다. 토양내의 미생물량을 측정하여야 하며 이때 미생물의 탄소량이 전체 유기탄소량의 1 % 이상이 되어야 한다. 이러한 조건의 토양은 시험물질의 흡착이 최소화되고 미생물 활용도가 최대가 되어 다른 토양에 대한 시험은 불필요하나, 시험물질이 정전기적 전하를 띠고 있거나 산성도 높은 삼림에 사용되는 등 특별한 상황이라면 가능한 범위에서 다른 토양을 이용한 추가실험을 수행할 것을 권장한다.

1.3.2 토양의 채취 : 토양은 다음과 같은 조건을 만족하는 곳에서 채취한다.

- (1) 장기적인 채취가 가능한 곳
- (2) 영구목초지, 연작곡물(옥수수 제외), 고밀도의 녹비를 가진 토양이 적당
- (3) 최소 1 년간 식물보호제를 살포하지 않은 곳, 또한 최소 6 개월간 유기질 비료를 살포하지 않은 곳, 최소 3 개월간 무기질 비료를 살포하지 않은 곳
- (4) 살균성 재제(예; Calcium cyanamide (CaNCN))가 사용되지 않은 곳

(5) 30 일 이상 장기간 가뭄이나 홍수가 있던 지역에서는 가뭄이나 홍수중또는 그 직후에는 토양 채취를 하지 않는다.

경작이 진행된 토양에서는 0 cm ~ 20 cm 깊이의 토양을 채취하고, 목초지나 녹지 혹은 최소 한번의 경작기간 이상 경작을 하지 않은 지역의 토양은 최대 25 cm 깊이까지 채취해도 된다.

1.3.3 토양의 운반 및 보관 : 토양시료는 최초 특성에 영향을 미치지 않는 용기 및 온도 조건에서 운반한다. 야외에서 채취한 토양을 바로 사용하는 것을 권장하며, 불가피하게 실험실에서 보관할때는 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 3 개월까지 보관할 수 있다. 토양의 보관은 공기가 통하게 하여 호기적 조건을 유지시켜야 한다. 만약 연간 3 개월 이상 얼어있는 지역에서 채취한 토양이라면 $-18^{\circ}\text{C} \sim -22^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다. 보관된 토양은 실험하기 전 미생물량을 측정하여야 하며, 그 탄소량이 전체 탄소량의 1 % 이상인 것을 확인하여야 한다.

1.3.4 시험토양의 취급 및 준비

(1) 보관한 토양을 사용할 경우, 본시험과 유사한 조건에서 2 일 ~ 28 일간 사전 배양한다.

(2) 체로 걸러 2 mm 이하의 입자만 사용하고, 수분함량은 증류수나 탈이온수를 이용하여 40 % ~ 60 %로 조절한다.

(3) 적당한 유기물(예; 알팔파 분말)을 이용하여 C/N비를 12 ~ 16으로 조정한다.

1.4 시험물질

1.4.1 물 혹은 모래(입자크기 : 0.1 mm ~ 0.5 mm)를 매개체로 이용한다. 모래를 이용할 경우 시험물질을 녹이거나 적절한 용매에 현탁한 후 모래에 피복하고, 용매를 모두 휘발시킨 다음 토양 kg 당 모래 10 g의 비율로 섞어 사용한다. 대조군은 시험군에 들어간 매개체를 같은 양 혼합하여 사용한다.

1.4.2 시험농도

(1) 농업용 화학물질 : 최소 2 개 농도군을 사용한다. 저농도는 경작지에서 실제로 사용되는 가장 높은 농도를, 고농도는 저농도의 배수가 되도록 한다. 토양에 직

접 사용되는 농업용 화학물질이나 토양에 도달하는 양을 예측할 수 있는 화학물질인 경우, 최대 예측환경농도의 5 배의 농도로 할 것을 권장한다. 한 경작기간 내에 여러번 사용되는 물질인 경우, 최대 예측환경농도에 사용 횟수를 곱하여 시험농도를 결정하며 이 때 최대 시험농도는 1 회 최대 시비율의 10 배를 넘지 않도록 한다.

(2) 비농업용 화학물질 : 일정한 공비로 5 개의 농도군을 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

체로 거른 토양에 식물가루와 시험물질을 첨가한 후 배양 0 일, 7 일, 14 일, 28 일 후에 질산염의 양을 측정하여 시험군과 대조군의 질산염 생성률을 비교한다. 비농업용 화학물질의 경우는 28 일 이후에 질산염 생성율을 측정하여 회귀분석 및 ECx 값(EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀)을 산출한다.

2.2 시험의 유효성

농업용 화학물질의 평가시 대조군과 시험군간의 질산염 생성율 차이가 25 % 이하일 때 토양의 질소변환능에 대한 장기간의 영향이 없다는 것으로 인정한다. 따라서 시험의 유효성을 위하여 대조군의 반복군간 변이도는 $\pm 15\%$ 이내 이어야 한다.

2.3 시험

2.3.1 농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 2 개 시험군, 비농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 5 개 시험군으로 하며 대조군 및 시험군 최소 3 반복군으로 시험한다.

2.3.2 토양시료의 배양은 대조군, 시험군별로 토양 전체를 배양하는 방법과 대조군, 시험군별 여러개의 크기로 나누어 각각 배양하는 방법이 있다. 하지만 휘발성 물질을 시험할 때에는 미리 토양을 분배한 후 배양하여야 한다.

2.3.3 모든 시험은 무기호흡 상태를 방지하기 위하여 상부 공간이 넉넉한 용기를 사용하여야 한다.

2.3.4 시험은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 어두운 곳에서 수행한다.

2.3.5 시험 기간동안 토양의 수분 함유율은 40 % ~ 60 % 범위에서 $\pm 5\%$ 이내로 유지되어야 한다. 이의 조정을 위하여 증류수나 이온제거수를 첨가할 수 있다.

2.3.6 시험은 최소 28 일 이상 수행하여야 한다. 농업용 화학물질 시험에서 28 일째 대조군과 시험군의 질산염 농도가 25 % 이상의 차이가 나는 경우, 그 차이가 25 % 이내로 줄어들 때 까지 혹은 100 일까지 시험을 계속한다. 비농업용 화학물질을 시험할 경우는 28 일째 시험을 종료하고 EC_x 값을 계산한다.

2.4 시료의 분석

2.4.1 농업용 화학물질을 시험할 때에는 0 일, 7 일, 14 일, 28 일째 시료를 분석한다. 이후 시험이 계속될 때에는 매 14 일 간격으로 측정을 계속한다.

2.4.2 비농업용 화학물질의 경우에는 시험개시일 및 28 일째 질산염 함유량을 측정한다. 필요할 경우 7 일째에 중간 측정을 할 수도 있다.

2.4.3 시료 건조중량당 5 mL의 추출용매(예; 0.1 M 염화칼륨)를 첨가한 후 150 rpm에서 60 분간 교반하고 원심분리한 후 상등액의 질산염 농도를 확인한다. 상등액은 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다.

II-2. 탄소 변환능 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

식물보호제, 비료, 삼림용화학물질 등의 농업용 화학물질인 경우에는 탄소 변환 시험과 질소 변환 시험을 모두 실시하여야 하나 비농업용 화학물질의 경우에는 질소 변환 시험만으로 충분하다. 그러나 비농업용 화학물질의 경우에도 질소 변환 시험에서 EC₅₀ 값이 상업적으로 판매되는 질산화저해제(예; Nitrpyrin)의 효과범위에 드는 경우, 더 많은 정보를 얻기 위해 탄소 변환 시험을 실시할 수

도 있다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기 : 화학적 작용을 일으키지 않는 재료로 만들어 진 것을 사용하여야 하며 용적의 1/4 가량이 토양시료로 채워지도록 한다. 수분 손실을 최소화하면서 시험기간 동안 기체 교환이 잘 이루어지도록 하여야 하며(예; 시험용기를 구멍이 있는 폴리에틸렌 호일로 덮어둠) 휘발성 물질을 시험하는 경우, 밀폐가 가능하여 기체의 손실을 줄일 수 있는 용기를 사용하여야 한다.

1.2.2 포도당 유도 호흡을 측정 : 이산화탄소 생산량이나 산소소비량을 측정하기 위한 배양시스템과 도구가 필요하다.

1.3 토양

1.3.1 토양 조건 : 모래함유량 50 % ~ 75 %, pH 5.5 ~ pH 7.5, 유기탄소함유량 0.5 % ~ 1.5 %인 단일 토양을 사용한다. 토양내의 미생물량을 측정하여야 하며 이때 미생물의 탄소량이 전체 유기탄소량의 1 % 이상이 되어야 한다. 이러한 조건의 토양은 시험물질의 흡착이 최소화되고 미생물 활용도가 최대가 되어 다른 토양에 대한 시험은 불필요하나, 시험물질이 정전기적 전하를 띠고 있거나 산성도 높은 삼림에 사용되는 등 특별한 상황에서는 다른 토양을 이용한 추가실험이 필요하다.

1.3.2 토양의 채취 : 토양은 다음과 같은 조건을 만족하는 곳에서 채취한다.

- (1) 장기적인 채취가 가능한 곳
- (2) 영구목초지, 연작곡물(옥수수는 제외), 고밀도의 녹비를 가진 토양이 적당
- (3) 최소 1 년간 식물보호제를 살포하지 않은 곳, 또한 최소 6 개월간 유기질 비료를 살포하지 않은 곳, 최소 3 개월간 무기질 비료를 살포하지 않은 곳
- (4) 살균성 재제(예; Calcium cyanamide (CaNCN))가 사용되지 않은 곳
- (5) 30 일 이상 장기간 가뭄이나 홍수가 있던 지역에서는 가뭄이나 홍수 중 또는 그 직후에는 토양 채취를 하지 않는다.

경작이 진행된 토양에서는 0 cm ~ 20 cm 깊이의 토양을 채취하고, 목초지나 녹지 혹은 최소 한번의 경작기간 이상 경작을 하지 않은 지역의 토양은 최대 25 cm 깊이까지 채취해도 된다.

1.3.3 토양의 운반 및 보관 : 토양시료는 최초 특성에 영향을 미치지 않는 용기 및 온도 조건에서 운반한다. 야외에서 채취한 토양을 바로 사용하는 것을 권장하며, 불가피하게 실험실에서 보관할 때는 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 3 개월까지 보관할 수 있다. 토양의 보관은 공기가 통하게 하여 호기적 조건을 유지시켜야 한다. 만약 연간 3 개월 이상 얼어있는 지역에서 채취한 토양이라면 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다. 보관된 토양은 실험하기 전 미생물량을 측정하여야 하며, 그 탄소량이 전체 탄소량의 1 % 이상인 것을 확인하여야 한다.

1.3.4 시험토양의 취급 및 준비

- (1) 보관한 토양을 사용할 경우, 본시험과 유사한 조건에서 2 일 ~ 28 일간 사전배양한다.
- (2) 체로 걸러 2 mm 이하의 입자만 사용하고, 수분함량은 증류수나 이온제거수를 이용하여 40 % ~ 60 %로 조절한다.
- (3) 호흡반응을 최대로 유도하기 위해 토양에 포도당을 충분히 첨가한다. 첨가량은 예비시험으로 결정할 수 있지만 유기탄소 0.5 % ~ 1.5 %를 포함한 사토의 경우, 건조토양 1 kg 당 2 g ~ 4 g의 포도당을 투여하면 충분하다.

1.4 시험물질

1.4.1 물 혹은 모래(입자크기 : 0.1 mm ~ 0.5 mm)를 매개체로 이용한다. 모래를 이용할 경우 시험물질을 녹이거나 적절한 용매에 현탁한 후 모래에 코팅하고, 용매를 모두 휘발시킨 다음 토양 kg 당 모래 10 g의 비율로 섞어 사용한다. 대조군은 시험군에 들어간 매개체를 같은 양 혼합하여 사용한다.

1.4.2 시험농도

- (1) 식물보호제 혹은 환경중 농도가 예상되는 물질 : 최소 2 개 농도군을 사용한다. 저농도는 경작지에서 실제로 사용되는 가장 높은 농도를, 고농도는 저농도의

배수가 되도록 한다. 토양에 직접 사용되는 농업용 화학물질이나 토양에 도달하는 양을 예측할 수 있는 화학물질인 경우, 최대 예측환경농도의 5 배의 농도로 할 것을 권장한다. 한 경작기간 내에 여러번 사용되는 물질인 경우, 최대 예측환경농도에 사용 횟수를 곱하여 시험농도를 결정하며 이 때 최대 시험농도는 1 회 최대 시비율의 10 배를 넘지 않도록 한다.

(2) 비농업용 화학물질 : 일정한 공비로 5 개의 농도군을 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

체로 거른 토양에 포도당과 시험물질을 첨가한 후 배양 0 일, 7 일, 14 일, 28 일 후에 포도당으로 인해 변한 호흡율을 12 시간 연속으로 측정하여 시험군과 대조군의 호흡율을 비교한다. 비농업용 화학물질의 경우는 28 일 이후에 호흡량의 변화를 측정하여 회귀분석 및 ECx 값(EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀)을 산출한다.

2.2 시험의 유효성

농업용 화학물질의 평가시 대조군과 시험군간의 이산화탄소 생성량 혹은 산소소모량의 차이가 25 % 이하일 때 토양의 탄산변환능에 대한 장기간의 영향이 없다는 것으로 인정한다. 따라서 시험의 유효성을 위하여 대조군의 반복군간 변이도는 $\pm 15\%$ 이내이어야 한다.

2.3 시험

2.3.1 농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 2 개 시험군, 비농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 5 개 시험군으로 하며 대조군 및 시험군 최소 3 반복군으로 시험한다.

2.3.2 토양시료의 배양은 대조군, 시험군별로 토양 전체를 배양하는 방법과 대조군, 시험군별 여러개의 크기로 나누어 각각 배양하는 방법이 있다. 하지만 휘발성 물질을 시험할 때에는 미리 토양을 분배한 후 배양하여야 한다.

2.3.3 모든 시험은 무기호흡 상태를 방지하기 위하여 상부 공간이 넉넉한 용기를 사용하여야 한다.

2.3.4 시험은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 어두운 곳에서 수행한다.

2.3.5 시험 기간동안 토양의 수분 함유율은 40 % ~ 60 % 범위에서 $\pm 5\%$ 이내로 유지되어야 한다. 이의 조정을 위하여 증류수나 이온제거수를 첨가할 수 있다.

2.3.6 시험은 최소 28 일 이상 수행하여야 한다. 농업용 화학물질 시험에서 28 일째 대조군과 시험군의 이산화탄소 생산량 혹은 산소소비량이 25 % 이상의 차이가 나는 경우, 그 차이가 25 % 이내로 줄어들때까지 혹은 100 일까지 시험을 계속한다. 비농업용 화학물질을 시험할 경우는 28 일째 시험을 종료하고 ECx 값을 계산한다.

2.4 시료의 분석

2.4.1 농업용 화학물질을 시험할 때에는 0 일, 7 일, 14 일, 28 일째 시료를 분석한다. 이후 시험이 계속될 때에는 매 14 일 간격으로 측정을 계속한다.

2.4.2 비농업용 화학물질의 경우에는 시험개시일 및 28 일째 포도당 유도 호흡율을 측정한다. 필요할 경우 7 일째에 중간 측정을 할 수도 있다.

2.4.3 포도당이 첨가된 토양을 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하면서 한 시간 혹은 두 시간 간격으로 12 시간 연속으로 호흡율을 측정한다. 가능한 한 포도당 투여 2 시간 내에 측정을 시작하여 12 시간동안 생산된 이산화탄소 총량 혹은 소비된 산소 총량을 측정하여 평균 호흡률을 계산한다.

III. 시험결과 및 보고

III-1. 질소 변환능 시험

1. 결과의 처리

농업용 화학물질의 경우는 각 반복군에서 생성된 질산염의 평균값으로부터 질산 변환율을 F-test 5 % 유의수준으로 처리하며 비농업용 화학물질을 시험한 경우에는 각 반복군에서 생성된 질산염의 양을 용량반응곡선으로 만들어 신뢰한계

95 %에서 ECx 값을 구한다. 질산염의 양은 토양건조중량 kg당 하루에 생산되는 mg(mg nitrate/kg dry weight soil/day)으로 표시한다.

한편 고농도의 질소를 포함한 시험물질은 질산염 생성농도에 큰 영향을 줄 수 있다. 이런 경우에는 적절한 대조군을 사용하여야 하며, 이 대조군에서 얻어진 결과 역시 ECx 계산에 포함하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 사용된 토양의 세부정보

- (1) 토양 채취지점의 지리적 정보(위도 및 경도)
- (2) 토양 채취지점의 이력(식생, 식물보호제 및 비료 처리 여부, 오염사고 여부 등)
- (3) 토양의 사용 형태(농경지, 삼림 등)
- (4) 채취 깊이(cm)
- (5) 모래, 미사, 점토 함유량(% 건조중량)
- (6) 토양의 pH(물에 타서 측정)
- (7) 유기탄소 함유량(% 건조중량)
- (8) 질소 함유량(% 건조중량)
- (9) 초기 질산염 농도(mg nitrate/kg 건조중량)
- (10) 양이온 교환능(mmol/kg)
- (11) 전체 유기탄소에 대한 미생물 함량(%)
- (12) 각 매개변수를 결정하는데 사용한 참고문헌
- (13) 토양시료의 채취 및 저장에 관련된 모든 정보
- (14) 사전배양을 실시한 경우, 그에 대한 상세한 정보

2.4 시험물질

- (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

- (2) 입수경위, 제조년월일
- (3) 구조식
- (4) 순도(식물보호제의 경우, 활성물질의 % 표시), 질소함유량
- (5) 물리적 특성 및 물리화학적 성상

2.5 기질

- (1) 기질의 공급처
- (2) 구성(예; 알팔파 가루)
- (3) 탄소 및 질소함량(% 건조중량)
- (4) 기질을 거른 체의 크기(mm)

2.6 시험조건

- (1) 토양에 첨가한 유기물에 대한 세부사항
- (2) 사용된 시험물질의 농도군의 수 및 농도 선정 근거
- (3) 시험물질을 토양에 사용한 방법에 대한 세부사항
- (4) 배양온도
- (5) 시험 개시시점 및 시험 기간 동안의 수분 함량
- (6) 토양배양 방법(전체를 한꺼번에 배양하였는지, 크기별로 나누어 배양하였는지의 여부)
- (7) 반복군의 수
- (8) 시료채취 시간
- (9) 토양에서 질산염 추출방법

2.7 시험결과

- (1) 질산염 분석에 사용한 장비와 분석절차
- (2) 질산염 측정치의 개별값 및 평균값을 정리한 표
- (3) 시험군 및 대조군의 반복실험 변화량
- (4) 계산에서 보정이 이루어진 경우 이에 대한 설명
- (5) 시료채취 시점별 질산염 생성 변이도. 95% 신뢰도에서 EC_{50} , 신뢰구간별 EC_{25} , EC_{10} . 용량반응곡선 그래프

- (6) 통계방법 및 결과 해석
- (8) 시험결과 해석에 도움을 줄 수 있는 모든 정보
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

III-2. 탄소 변환능 시험

1. 결과의 처리

농업용 화학물질의 경우는 각 반복군의 호흡률의 평균값을 표로 제시하고 적절한 통계적 방법(예; F-test 5 % 유의수준)으로 처리하며 비농업용 화학물질을 시험한 경우에는 각 반복군의 호흡률을 용량반응곡선으로 만들어 신뢰한계 95 %에서 EC_x 값을 구한다. 호흡률은 토양건조중량 kg당 1 시간에 생산되는 이산화탄소의 양(mg CO₂/kg dry weight soil/h) 혹은 토양건조중량 kg당 1 시간에 소비되는 산소의 양(mg O₂/kg dry weight soil/h)으로 표시한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 사용된 토양의 세부정보

- (1) 토양 채취지점의 지리적 정보(위도 및 경도)
- (2) 토양 채취지점의 이력(식생, 식물보호제 및 비료 처리 여부, 오염사고 여부 등)
- (3) 토양의 사용 형태(농경지, 삼림 등)
- (4) 채취 깊이(cm)
- (5) 모래, 미사, 점토 함유량(% 건조중량)
- (6) 토양의 pH(물에 타서 측정)
- (7) 유기탄소 함유량(% 건조중량)
- (8) 질소 함유량(% 건조중량)
- (9) 양이온 교환능(mmol/kg)

- (10) 전체 유기탄소에 대한 미생물 함량(%)
- (11) 각 매개변수를 결정하는데 사용한 참고문헌
- (12) 토양시료의 채취 및 저장에 관련된 모든 정보
- (13) 사전배양을 실시한 경우, 그에 대한 상세한 정보

2.4 시험물질

- (1) 화합물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
- (2) 입수경위, 제조년월일
- (3) 구조식
- (4) 순도(식물보호제의 경우, 활성물질의 % 표시), 질소함유량
- (5) 물리적 특성 및 물리화학적 성상

2.5 시험조건

- (1) 토양에 첨가한 유기물에 대한 세부사항
- (2) 사용된 시험물질의 농도군의 수 및 농도 선정 근거
- (3) 시험물질을 토양에 사용한 방법에 대한 세부사항
- (4) 배양온도
- (5) 시험 개시시점 및 시험 기간 동안의 수분 함량
- (6) 토양배양 방법(전체를 한꺼번에 배양하였는지, 크기별로 나누어 배양하였는지의 여부)
- (7) 반복군의 수
- (8) 시료채취 시간

2.6 시험결과

- (1) 호흡률 측정에 사용한 장비
- (2) 이산화탄소 생산량 혹은 산소 소모량의 개별값 및 평균값을 정리한 표
- (3) 시험군 및 대조군의 반복실험 변화량
- (4) 계산에서 보정이 이루어진 경우 이에 대한 설명
- (5) 시료채취 시점별 변화한 포도당 유도 호흡률(%). 95 % 신뢰도에서 EC_{50} , 신뢰 구간별 EC_{25} , EC_{10} . 용량반응곡선 그래프

- (6) 통계방법 및 결과 해석
- (8) 시험결과 해석에 도움을 줄 수 있는 모든 정보
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

제9항 생물농축성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 어류의 체내에 들어 왔을 때, 체내에 축적되는 정도를 측정하여 화학물질의 생물농축성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 생물농축(Bioconcentration)

물에 녹아 있는 화학물질이 직접 수서생물의 체내로 들어와서 체내에 남아 있는 것

2.2 생물농축계수(BCF, Bioconcentration factor)

생물농축이 평형상태에 도달한 상태에서 생물체내의 시험물질 농도를 물에서의 농도로 나눈 비율

2.3 흡수(Uptake)

시험물질이 흡입과 체표를 통해서 수서생물의 체내로 들어오는것

2.4 흡수단계(Uptake phase)

일정농도의 시험물질에 공시생물을 노출시키는 단계

2.5 배출(Depuration)

체내에 들어온 시험물질이 체외로 나가는 것

2.6 배출단계(Depuration phase)

흡수단계가 끝난 후, 공시생물을 시험물질이 없는 물에 옮겨 놓는 단계

2.7 평형상태(Steady state)

시험물질이 체내로 들어오는 양과 배출되는 양이 같게 되는 상태를 말 하며, 이 상태에서 측정한 공시생물 체내의 시험물질 평균농도를 물에서의 평균농도로 나누어 생물농축계수를 구함

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

시험에 사용하는 기구나 기기는 시험물질을 흡착하거나, 해로운 물질이 용출되는 재질이어서는 안된다. 수조는 유리로 된 충분한 크기의 것을 사용하고, 사용하는 관(Tubing)은 테프론, 유리, 스테인레스 스틸로 된 것을 사용하고, 플라스틱재질의 관은 최소화한다.

1.2 희석수

공시어의 사육에 적당한 양질의 천연수가 좋으며, 탈염소한 수도수도 사용할 수 있으나, 잔류염소의 농도에 유의하여야 한다. 수질은 시험기간 동안 일정해야 하며 시험 전에 pH, 경도, 알카리도, 고형물질량, TOC 등에 관한 자료를 검토해야 한다. 아울러 3 개월에 1 회씩은 중금속(구리, 납, 아연, 수은, 니켈), 주요 이온(Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄ 등), 농약 등에 관한 분석을 실시하고, 이러한 분석치에 연중 변화가 크지 않으면, 분석간격을 6 개월 또는 1 년으로 늘릴 수 있다. 고형물질(0.45 μm 이상)의 최대허용기준은 5 mg/L이고, TOC는 2 mg/L이다.

1.3 시험용액

시험물질은 희석수에 녹여 사용하며, 물에 잘 녹지 않는 물질은 시험물질 용액 (Stock solution) 조제시, 어류에 대한 독성이 낮은 유기용매와 분산제를 사용할

수 있다.

시험용액은 하루에 적어도 다섯 번 이상 교체되도록 유속을 조절해야 하며, 시험물 질용액과 희석수의 유량은 48 시간 마다 측정하여, 유량의 변화가 20 % 이내에 있도록 한다.

1.4 공시어

시험에 사용하는 어류는 아래의 종중에서 1 종을 선택하여 사용한다. 다른 종을 사용해도 되나, 이 경우는 선정이유를 밝혀야 한다.

어 종	시 험 적 온(℃)	크 기(cm)
잉어(<i>Cyprinus carpio</i> , common carp)	20 ~ 25	5.0 ± 3.0
송사리(<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	20 ~ 25	4.0 ± 1.0

시험에 사용하는 어류는 외형상 이상이 없고 질병이 없는 개체를 사용하며, 질병이 있는 경우는 치료하지 않고 폐기한다. 시험에 사용하는 개체는 크기가 일정한 것을 사용하고, 무게와 나이를 명시해야 하며 순화를 시작한지 48시간 후부터 치사어를 관찰하여 다음의 기준에 따라 처리한다.

- (1) 7 일 안에 치사율이 10 % 이상이면 전부를 폐기한다.
- (2) 치사율이 5 % ~ 10 %이면, 7 일간 더 사육한 후 판정한다.
- (3) 치사율이 5 % 이하이면 시험에 사용한다.

1.5 시험조건

- (1) 시험온도의 편차는 ± 2 ℃ 이내여야 한다.
- (2) 용존산소는 포화농도의 60 % 이상이 유지되어야 한다.
- (3) 흡수단계에서 시험물질의 농도는 20 % 이내에서 유지되어야 한다.
- (4) 공시어의 치사율 또는 이상어의 발생이 10 % 이내여야 한다.

2. 시험방법

2.1 원칙

물고기 체내에서 평형농도에 도달하는 시간은 한 가지 농도의 측정물질을 한 군의 시험물고기에 노출시켜 결정한다. 다음은 시험물질의 농도에 따른 생물농축 정도를 결정하고 마지막으로 체내에서의 배출속도를 측정한다.

2.2 예비사항

2.2.1 시험은 흡수단계와 배출단계로 나누어 한다.

흡수단계는 적어도 시험물질 두 가지 농도 이상의 시험물질과 대조군에서 시험하고, 시험기간은

(1) 연속적으로 다섯 시료에서 일정한 값을 보일 때까지(평형상태) 또는

(2) 28 일간 실시하나, 28 일 안에 평형상태에 도달하지 않으면 시험기간을 연장해야 하는데 최장 60 일을 넘지는 않는다.

2.2.2 흡수단계가 끝나면 배출단계를 시작한다. 만일 생물농축계수가 10 이하이면 배출단계의 시험을 생략할 수 있다.

2.2.3 흡수시험기간, 평형상태에 도달하는 시간은 방정식에 의하여 예측할 수 있다.

2.2.4 생물농축계수는 평형상태일 때 어체 내 시험물질의 평균농도를 수중평균농도로 나누어 구하나 흡수율상수와 배출율 상수의 비율로도 구할 수 있다.

2.2.5 생물농축계수는 어류의 전중(Total wet weight)에 대한 함수로 표현하며 소수성이 높은 물질의 경우($\log P_{ow} > 3$)는 지질함량에 대한 함수로 표현하여 보완할 수 있다.

2.3 노출환경

2.3.1 흡수시험 기간

흡수시험은 원칙적으로 28 일간 노출시키나, 연속적으로 다섯 시료에서 일정한 값을 보이는 평형상태에 이르면 종료시켜도 된다. 28 일 안에 평형상태에 도달

하지 않으면 시험기간을 연장해야 하는데, 최장 60 일은 넘기지 않는다. 흡수시험기간은 아래의 방정식에 의하여 예측할 수 있다.

- (1) 우선, 배출상수 k_2 (Depuration rate constant, day^{-1})를 다음식에 의해 구할 수 있다.

$$\log_{10}k_2 = -0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47(r^2=0.95)$$

- (2) 만일, 분배계수(P_{ow})값을 알지 못하면, 시험물질의 용해도(s)를 통하여 구할 수 있다.

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710(r^2=0.994)$$

$$\therefore s = \text{용해도 (moles/L)}$$

- (3) 위에서 구한 k_2 값을 이용하여 아래와 같이 예상흡수시간을 구할 수 있다.

$$t_{80} = 1.6/k_2, \quad t_{80} = \text{평형상태(Steady state)의 80 \%에 도달하는 시간}$$

$$t_{90} = 3.0/k_2, \quad t_{90} = \text{평형상태(Steady state)의 95 \%에 도달하는 시간}$$

- (4) 예상흡수기간과 시료채취일정의 예

예상시험기간	4 일 이하	4 일 ~ 14 일	5 일 ~ 21 일	21일 이상
시료채취일정	1 시간 6 시간 1 일	4 시간 1 일 3 일	1 일 3 일 7 일	1 일 3 일 7 일
흡수단계	2 일 3 일 4 일	7 일 10 일 12 일 14 일	10 일 14 일 18 일 22 일	10 일 14 일 21 일 28 일
배출단계	1 시간 6 시간 12 시간 1 일	1 일 2 일 4 일 6 일	1 일 3 일 7 일 10 일	1 일 3 일 7 일 14 일

2.3.2 배출시험기간

축적된 물질의 95 %가 배출될 때까지 하는데, 대체로 흡수시험기간의 반이면 충분하므로 14 일을 초과하지 않는다. 그러나 14 일 이내에 95 %가 배출되지 않는 경우는 축적농도의 90 %이상이 배출되면 완료한다.

2.3.3 공시어의 수 및 투여량

1 회 분석시 한 농도당 4 마리를 취한다. 시험용액 대 공시어 투여비율은 하루에 공급하는 물 1 L에 대하여 어류체중 0.1 g ~ 1.0 g의 비율이 추천된다. 적정 투여량은 시험물질의 농도 유지와 용존산소 농도를 감안하여 결정한다.

2.3.4 먹이공급

순화 및 시험기간 동안 시험어류가 건강하게 살 수 있도록 양질의 먹이를 공급한다. 매일 1 회 주며 과잉의 먹이와 배설물은 매일 제거하여 물을 맑은 상태로 유지한다.

2.3.5 광주기와 온도

광주기는 16 시간 조명과 8 시간 어둠으로 하며, 온도는 시험어종에 맞는 온도로 하고 온도편차는 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 내로 유지한다.

2.3.6 시험농도

적어도 2 농도에서 시험하며, 높은 농도는 급성독성값(96 시간 LC_{50})의 1/10 농도이하 수준이면서 검출한계농도의 10 배 이상은 되어야 한다. 낮은 농도는 높은 농도와 약 10 배의 차이가 있으면서 검출한계보다는 높은 농도에서 시험한다. 시험농도는 원칙적으로 시험물질의 수용성보다 낮아야 하나, 물에 녹이기 어려운 경우에는 유기용매와 분산제를 사용할 수 있으나, 그 농도는 0.1 mL/L를 초과하지 않아야 하며, 각 수조에 들어가는 양은 같게 한다.

2.3.7 대조군

시험물질 조제시, 유기용매와 분산제를 사용하지 않은 경우는 희석수만 들어있는 대조군을 두나, 유기용매와 분산제를 사용한 경우는 시험농도와 동일한 량의 유기용매와 분산제가 들어 있는 대조군을 둔다.

2.3.8 시험의 시작

노출장치의 구성이 완료되면 적어도 시험시작 48 시간 전에는 가동시켜 시험물질의 농도가 설정농도에 맞도록 하며, 시험물질의 농도를 분석하여 시험조건에 맞는지($\pm 20\%$) 확인하고, 시험농도가 맞지 않으면 시험물질용액, 희석수의 유량을 조절하여 시험조건을 만족시킨 후 시험을 시작해야 한다.

2.4 수질측정 항목 및 빈도

시험기간동안 용존산소농도, pH, 수온은 주 2 회 이상 측정하며, 기타 측정항목은 지속적인 측정치가 있어 수질상태가 일정하게 유지되고 있음을 증명할 수 있으면 생략하나, 지속적인 측정치가 없으면 앞에서 언급한 수질항목에 대한 분석을 하여 희석수로서 적합성을 검토하여야 한다.

2.5 시험물질 분석을 위한 시료채취와 분석

2.5.1 시료채취 일정

시험이 시작되면 어류를 투여하기 전에 시험수를 1 차 채취하고, 이후 1 주일 안에 최소 3 회 이상 시험수와 어류에 대한 시료를 채취하고, 그 다음은 주 1 회씩 시료를 채취한다(흡수단계). 28 일 동안 또는 평형상태에 도달할 때까지 시험을 계속하며, 28 일 안에 평형상태에 이르지 않으면 최장 60 일 동안 시험한다. 앞에서 설명한 이론적 시료채취일정의 예를 참고하여 시험물질의 수용성과 옥탄올/물 분배계수를 이용하여, 95 % 축적이 일어날 수 있는데 소요되는 노출 시간을 계산하여 시행한다. 배출단계에서는 최소 4 회 이상 시험수와 어류에 대한 시료를 채취한다.

배출시험은 흡수된 시험물질의 95 % 이상이 배출될 때까지 하나, 14 일을 초과하지 않는다. 그러나 14 일 이내에 95 % 이상이 배출되지 않는 경우는 축적농도의 90 % 이상이 배출되면 시험을 완료한다.

2.5.2 시료채취 및 조제

먹이를 주기 전에 채취한다. 물 시료는 수조의 가운데서 채취하며 3 반복으로 하고, 많은 양을 채취해야 하는 경우는 각 수조에서 유출되는 것을 취해도 된다. 어류는 한 농도당 최소 4 마리를 잡아내서 깨끗한 물에 씻고, 물기를 제거하고 죽인 후 무게를 단다. 시료채취 후 곧 분석을 해야 하지만, 4 시간 안에 분석을 하지 못하는 경우는 -10 ℃ 이하에서 보관하거나 추출하여 보관한다.

2.5.3 어류시료의 분석

어류에 축적된 시험물질의 농도는 각 개체별 생체중으로 나타내며, 이것이 어려

운 경우는 1 회에 채취한 시료 전체(Pooling)의 생체중으로 나타낼 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 계산법

흡수곡선을 그리고 평형상태에 도달한 것이 확인되면(5 개의 연속되는 점이 시간축과 평형, F검정, $p = 0.05$), 생물농축계수(BCF)를 아래의 식에서 구한다.

$$\text{생물농축계수(BCF)} = \frac{\text{평형상태에서의 어체내 시험물질 평균농도}(C_f)}{\text{평형상태에서의 물에서의 시험물질 평균농도}(C_w)}$$

시험이 종료될 때까지 평형상태에 도달하지 않으면, 최종분석치의 평균값 (어체 및 물)으로 위의 식에 의해 생물농축계수를 계산한다.

생물농축계수는 흡수율상수(k_1)와 배출율상수(k_2)의 비율로 계산할 수 도 있다.

1.2 결과의 해석

시험물질의 분석치가 검출한계와 비슷할 때는 결과를 해석할 때 주의를 해야 한다. 두 시험 농도에서 흡수/배출의 비율이 20 % 이상 차이가 있어서는 안 되며, 만일 있는 경우는 보고서에 언급하고 이유를 설명해야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

- (2) 입수처, 입수일
- (3) 순도 또는 불순물
- (4) 분자량 및 물리화학적 성질
- (5) 기타 필요한 사항

2.5 시험조건 : (1) 시험종 : 학명, 계통명, 입수처, 전처리 유무 및 방법, 순화, 체
중 및 체장 등

- (2) 시험온도
- (3) 노출방법, 조명방법, 광도, 광주기, 광특성
- (4) 수조의 수와 크기, 희석수 및 시험물질의 유량 및 교체 횟수,
반복수 시험물질농도, 흡수와 배출단계 기간, 물 및 어체의 시
료채취에 대한 사항 등
- (5) 시험물질용액 조제방법, 시험농도와 측정농도, 희석수 에 대한 사
항(처리 및 수질특성), 시험기간 동안의 수질 측정치(pH, 용존산
소, 온도 등), 먹이의 종류, 양, 빈도 등에 관한 사항
- (6) 분석방법

2.6 시험결과 : (1) 예비시험결과가 있으면 그 결과

- (2) 각 수조에서의 치사율 및 이상증상
- (3) 측정값 및 농축곡선
- (4) 각 시료채취시기별 물과 어체에서의 평균농도
- (5) 생물농축계수와 계산방법
- (6) 기타 시험과 관련하여 보고해야 할 사항

제10항 토양 내 호기성 및 혐기성 전환 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 토양 중에서 호기성 조건이나 혐기성 조건하에서 다른 형태의 물질로 전환되는 과정을 평가하는데 목적이 있으며, 그 평가내용은 대상시험물질의 전환률과 식물이나 토양유기체 등에 노출될 수도 있는 전환물질의 속성이나 형성되는 속도, 감소비율 등이다.

2. 정의

2.1 시험물질(Test substance)

모 화합물 또는 관련 전환물질 등 모든 물질

2.2 전환물질(Transformation products)

이산화탄소 및 결합잔류물(Bound residues) 내 산물을 포함한 시험 물질의 생물적 또는 비생물적 전환반응에서 생기는 모든 물질

2.3 결합잔류물(Bound residues)

"결합 잔류물"이란 토양, 식물 또는 동물 체내에 결합된 화합물을 나타내며, 추출 후에 모 물질 또는 그 대사물질(들)/전환 물질 형태로 매트릭스 내에 잔존하는 물질

2.4 호기성전환(Aerobic transformation)

산소분자가 존재 시 발생하는 반응

2.5 혐기성전환(Anaerobic transformation)

산소분자 부재 시 발생하는 반응

2.6 무기질화(Mineralisation)

유기 화합물이 호기성 조건에서 CO_2 와 H_2O 로, 혐기성 조건에서 CH_4 , CO_2 와 H_2O 로 완전히 분해되는 현상. 이 가이드라인에서는 ^{14}C 동위원소로 표지된 화합물을 사용하므로 무기질화는 표지된 ^{14}C 원자가 산화되며 적정량의 $^{14}\text{CO}_2$ 를 방출하는 광범위한 분해를 의미한다.

2.6 반감기(Half-life, $t_{0.5}$)

반감기, $t_{0.5}$ 는 토양에서의 전환을 1차 반응속도식(First-order kinetics)으로 설명할 수 있을 때 시험 물질의 50 %가 전환에 이르는 시간이며, 초기농도와는 무관.

2.7 50 %, 75 %, 90 % 소멸시간($\text{DT}(\text{Disappearance Time})_{50}$, DT_{75} , DT_{90})

시험 물질 농도가 초기농도와 비교하여 50 %, 75 %, 90 % 줄어드는데 소요되는 시간.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법 적용성

이 방법은 모든 화학물질(비표지 또는 방사성표지)에 적용 가능하며, 약한 휘발성, 비휘발성, 수용성 또는 비수용성 화합물에도 적용가능하다. 그러나 토양으로부터 휘발이 강한 화학물질(예, 훈증제, 유기 용제) 등은 적용이 불가하다.

1.2 시험물질 정보

^{14}C -표지화합물을 권장하지만 ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P 와 같은 다른 동위원소 물질도 사용 가능. 시험 물질 순도는 95 % 이상이어야 함.

토양 내 호기성 및 혐기성 전환에 관한 시험 실시 전에, 시험 물질에 대한 다음과 같은 정보의 확보가 필요.

- 1) 수용성
- 2) 유기용매에서의 용해도

- 3) 증기압 및 헨리(Henry) 상수
- 4) n-옥탄올/물 분배계수
- 5) 압조건에서의 안정성(가수분해)
- 6) 해리성 물질의 경우 해리상수(pKa) 값

1.3 시험토양

1.3.1 토양 선택

1.3.1.1 전환경로(Transformation pathway) 확인을 위한 시험의 경우 pH 5.5 ~ 8.0의 사양토(Sandy loam)이나 미사질 양토(Silty loam), 양토(Loam), 양질사토(Loamy sand) [FAO와 USDA 분류를 따름 ¹⁾] 토양을 사용, 유기탄소 양은 0.5 %¹⁾ ~ 2.5 %, 미생물 총량은 총 유기탄소의 최소 1 % 정도의 토양을 권장.

1.3.1.2 전환율(Transformation rate) 시험의 경우 추가로 토성이 다른 3종의 대표적 토양에서 시험을 수행하며, 유기탄소함량, pH, 점토 함량 및 미생물 총량이 다른 토양 선택.

1.3.1.3 시험 토양에 대해서는 토성(모래 %, 실트 %, 점토 %), pH, 양이온치환능력, 유기탄소, 겉보기밀도(Bulk density), 보습성(표 1 참조) 및 미생물 총량(호기성연구 전용) 등 토양의 특성을 규명. 미생물 총량은 기질-유도호흡(Substrate-induced respiration, SIR) 법이나 대체 방법을 사용하여 측정.

1.3.2 토양 수집, 취급 및 저장

1.3.2.1 토양시료 채취 현장에 대한 정보를 기재함. 즉 시료채취 지역의 정확한 위치, 작물 식재(Vegetation cover), 화학물질 처리 상황, 유기 및 무기 화학비료 처리, 생물재(Biological materials) 또는 기타 오염물질 등에 대한 정보를 기재. 지난 4 년간 시험 물질이나 그와 구조적으로 유사한 물질이 처리된 적이 있다면 그 토양은 사용해서는 안된다.

1.3.2.2 토양시료의 채취는 체질이 쉽도록 일정량의 토양수분 함량이 있는 토양을 채취한다(지표(a horizon) 또는 표토 20 cm 층). 논토양 이외의 다른 토양은 장기

1) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962)

간(> 30 일) 가뭄이나 결빙, 홍수 기간 중 직후는 시료 채취를 피해야 한다. 채취한 토양시료는 토양수분 함량 변화를 최소화하는 방법으로 이송해야 하고, 통풍이 잘 되는 압조건에 보관한다.

1.3.2.3 토양시료는 채취한 가능한 빠른 시간 내에 채질한다. 작은 돌, 식물 잔해 등은 2 mm 체에 거르기 전에 제거한다.

1.3.2.4 채취한 시료를 보관해서 사용하는 경우 토양 중 미생물의 활성을 유지하기 위하여 최대 3 개월 이내, $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건에서 보관해서 사용하는 것이 좋다.

1.3.2.5 준비된 토양은 시험에 사용하기 전에 시험에 영향을 줄 수 있는 종자 등을 제거하고, 미생물 대사가 정상적으로 될 수 있도록 시험전 사전 배양을 수행한다. 실제 시험의 온도 및 수분 조건에서 2 일에서 28 일 간 사전 배양하는 것이 적절하다. 시료보관 및 사전 배양 시간은 합쳐서 3 개월을 넘어서는 안된다. (최근 조사 결과에 따르면 온대 지역 토양은 눈에 띄는 미생물 활성 소실 없이 -20°C 에서 3 개월 이상 저장도 가능)

2. 품질기준(Quality Criteria)

2.1 회수율

회수율은 표지 화합물은 90 % ~ 110 %, 비표지 화합물은 70 % ~ 110 % 범위여야 함.

2.2 검출한계

시험 물질 및 전환물질의 분석법 검출한계(LOD)는 최소 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 또는 처리량의 1 % 이하여야 함. 정량한계를 제시해야 함

3. 시험방법

3.1 시험조건

3.1.1 시험 온도

전 시험동안 시험토양은 일정한 온도 (시험물질 사용 및 배출이 주로 일어나는 기후를 대표하는 온도) 및 압조건 하에서 배양하며, 온도는 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건을

권장. 온도는 반드시 모니터링 되어야 함

추운 기후에서 화학물질이 적용되거나 배출되는 경우 (예, 가을, 겨울 기간), 추가 시료가 낮은 온도(예 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)에서 배양되어야함

3.1.2 수분 함량

호기성 조건 하의 시험에서는 토양 수분 함량(pF)²⁾(표 2 참조)는 2.0 ~ 2.5로 유지함. 혐기성 및 논토양 조건에서는 물포화 상태이므로 토양수분 함량 조정이 필요하지 않음.

3.1.3 호기성 배양 조건

공기흐름식(Flow-through) 시스템 내에서는 간헐적 수세방식이나 지속적으로 가습공기를 공급하면서 호기성 조건을 유지. 생체(이산화탄소) 측정기(Biometer) 플라스크 사용시에는 확산에 의한 공기 교환으로 호기성 조건 유지.

3.1.4 멸균 호기성 조건

멸균한 시험물질(멸균 필터 통과)을 멸균 토양에 처리하고 3.1.3. 방법으로 가습 멸균 공기로 통기함. 논토양의 경우, 토양과 물을 멸균하고 3.1.6.의 방법으로 배양함.

3.1.5 혐기성 배양 조건

혐기성 조건을 유지하기 위해서 시험물질이 처리된 시험토양을 1 cm ~ 3 cm의 물층을 유지하면서 30 일 또는 반감기나 DT₅₀ 기간 동안 배양. 이 배양 시스템에 비활성 기체(예, 질소 또는 아르곤)를 지속적으로 주입하고, pH, 산소 농도 및 산화환원 전위를 측정함. 또한 휘발성 물질 포집을 위한 포집장치를 시험 시스템에 부착함. 생체(이산화탄소) 측정기(Biometer) 형태의 시스템은 확산에 의한 공기 유입을 차단함.

3.1.6 논토양 배양 조건

시험토양은 약 1 cm ~ 5 cm 물로 담수시킨 후 시험물질은 물층에 처리함. 토양 깊이는 최소 5 cm 이상이 적합하며, 배양시스템에 호기조건 상태의 공기를 통풍시킴. 물층에서의 pH, 산소 농도 및 산화환원 전위를 측정하고, 혐을 수행하

2) 물기둥 100 cm = 3 pF = 1 bar = 100 kPa

기 전 사전 배양은 최소 2 주 이상 필요함.

3.1.7 시험 기간

전환비율 및 경로 연구는 120 일 경과시에는 토양 미생물 활성 감소가 예상되므로 보통 120 일을 초과해서는 안됨. 시험 물질 감소와 주요 전환 산물 형성 및 감소 등에 정보가 필요할 경우 기간을 연장하여(예, 6 개월 또는 12 개월) 연구를 계속할 수 있으며, 시험 기간 중과 시험 종료 시점에서 생물중량을 측정하여 제시해야 함.

3.2 시험 물질 처리

3.2.1 각 배양 플라스크에 시험 물질을 처리한 토양 약 50 g ~ 200 g(건중량 기준)을 넣는다. 시험물질 처리시 유기용매를 사용할 경우 토양으로부터 유기용매를 완전히 제거하고 스파툴라(Spatula)를 사용하거나 플라스크를 흔들어서 토양을 완전히 혼합한다. 논토양 조건에서 연구를 시행하는 경우, 시험 물질 처리 후 토양과 물을 완전히 혼합해야 한다. 처리 토양 1 g 정도를 채취하여 시험물질의 균질성 분석에 사용한다.

3.2.2 시험물질 처리 비율은 사용자 지침서에서 권장한 작물 보호를 위한 최고 처리량에 상응하는 양을 처리하고, 포장에 처리하는 깊이(표토 10 cm 정도)와 유사한 깊이로 시험물질을 처리한다.

3.2.3 또 다른 방법으로는 1 kg ~ 2 kg의 토양을 배치(Batch)로 하여 시험물질을 처리한 후 적절한 혼합기로 혼합하고 200 g 정도의 소량을 배양 플라스크로 옮긴다. 이 중에서 토양 1 g 정도를 채취하여 시험물질의 균질성 분석에 사용한다. 이와 같은 방법은 시험물질을 토양에 좀 더 균질하게 처리 할 수 있어 권장되는 방법이다.

3.2.4 시험물질을 처리하지 않은 토양시료를 시험물질이 처리된 토양시료와 동일한 조건(호기성)에서 배양한다. 이 시료는 시험 중간 및 시험 종료 전 미생물량 측정에 사용된다.

3.2.5 시험물질을 유기용매에 녹여 토양에 처리할 경우 같은 유기용매량으로 처리된

토양시료(시험물질 미처리)를 시험물질이 처리된 토양시료와 동일한 조건(호기성)에서 배양한다. 이 시료는 유기용매가 미생물 총량에 미치는 영향을 보기 위한 것으로 시험 중간 및 시험 종료 전 미생물량 측정에 사용된다.

3.2.6 시험물질을 처리한 토양시료는 그림 1의 공기흐름 시스템에서 시험하거나 그림 2의 흡수 컬럼이 부착된 밀폐된 시스템에서 시험을 수행한다.

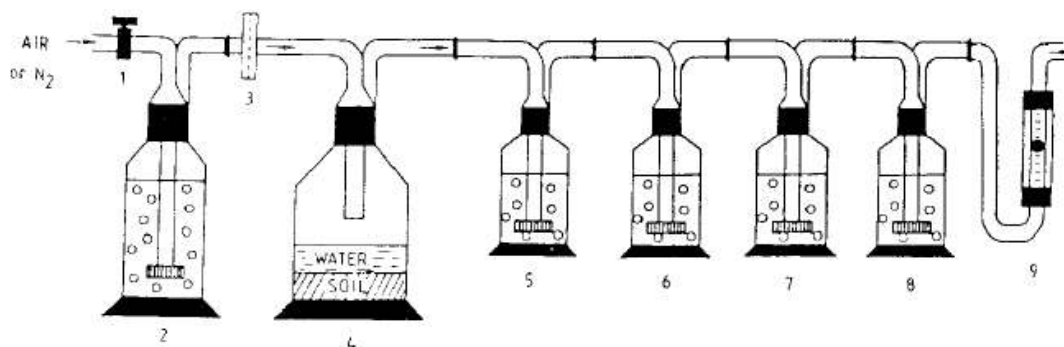


그림 1. 공기흐름식 시스템

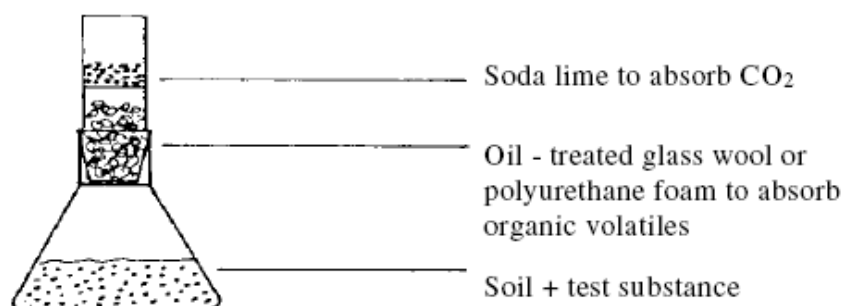


그림 2. 생체(이산화탄소) 측정기-플라스크 시스템

3.3 시료채취 및 농도측정

3.3.1 2 개의 배양 플라스크를 적절한 시간 간격으로 채취하고, 채취한 토양시료는 다른 극성을 가진 적합한 유기용매로 추출한 후 시험물질 또는 전환물질을 분석한다. 또한, 휘발성 물질을 분석하기 위하여 시험기간 중과 종료 시점에서 각 토양시료 배양 플라스크에 부착된 포집용액이나 고체 포집물질을 다양한 시간 간격(첫 달 동안 7 일 간격 그리고 한 달 후 14 일 간격)으로 채취하여 분석한다. 시

험물질 처리 후 바로 채취한 토양 시료(0-일 시료)를 제외하고 최소한 5 지점에서 시료 채취가 이루어져야 한다. 시료 채취 간격은 시험 물질 감소 패턴과 전환산물의 형성 및 감소 패턴을 확인 할 수 있는 시간(예, 0 일, 1 일, 3 일, 7 일; 2 주, 3 주; 1 개월, 2 개월, 3 개월 등)으로 결정해야 한다.

3.3.2 ^{14}C -표지 시험 물질을 사용할 경우, 비추출 방사능 물질은 연소시켜 정량해야 하며, 각 시료 채취 시간별 물질수지(Mass-balance)를 계산해야 한다.

3.3.3 혐기성 및 논토양 시험의 경우, 토양과 물층을 합하여 시험물질과 전환물질을 분석하거나 또는 추출 및 분석 전에 물층과 토양을 여과나 원심분리를 통하여 분리하여 각각에 대해 시험물질과 전환물질을 분석한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험물질, 전환물질, 휘발성 물질(%로만) 및 비추출량은 시험물질을 처리한 초기량의 %로 표시하고, 각 시료 채취 시간별로 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 토양(토양 건 중량 기반)으로 표시한다. 물질수지(Mass balance)는 각 시료채취 시간별로 초기 처리 농도에 대한 %로 표시한다. 주요 전환물질에 대해서는 반드시 규명(Identification) 해야 하며 전환물질의 농도도 시간별로 형성되는 양과 소멸되는 양에 대해 도식화해야 한다. 주요 전환물질은 시험기간 중 처리 농도의 $\geq 10\%$ 검출된 물질을 말한다.

1.2 전환율에 관한 시험이 여러 온도에서 실시되는 경우, 전환율은 아레니우스(Arrhenius) 식에 의해 실험 온도 범위 내에서 온도 함수로 기술되어야 한다.

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

$\ln A$ 와 B 는 $1/T$ 에 대한 $\ln k$ 의 선형회귀식으로 계산된 절편과 기울기로부터의 회귀상수이며, k 는 온도 T 에서의 속도 상수, T 는 켈빈(Kelvin) 온도이다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험수행기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 :

- 1) 일반명, 화학물질명, CAS 번호, 구조식(방사성표지 물질 사용 시 표지 위치 표시) 및 관련 물리화학적 성질
- 2) 시험 물질 순도, 불순물 함량
- 3) 동위원소 표지 화합물의 방사화학적 순도 및 특정활성도(Specific activity)
- 4) 참조 물질의 화학물질명 및 구조 (사용할 경우)

2.5 시험 토양 :

- 1) 토양채취 장소 명세
- 2) 토양시료 채취 일자 및 방법
- 3) pH, 유기탄소함량, 토성(모래 %, 실트 %, 점토 %), 양이온치환용량, 밀도, 수분 보유 특성 및 미생물량
- 4) 토양 저장 기간 및 저장 조건 (저장시)

2.6 시험조건 :

- 1) 시험 실시 일자
- 2) 처리한 시험 물질량
- 3) 사용한 유기용매 및 시험 물질에 처리한 방법
- 4) 최초 처리 토양 및 분석을 위해 각 시간별로 채취한 토양시료의 무게
- 5) 사용한 배양 시스템 기술
- 6) 공기 흐름식(Flow-through) 시스템
- 7) 실험 온도
- 8) 배양 중 토양 수분 함량
- 9) 호기성 시험시 초기, 중기, 말기의 미생물량
- 10) 혐기성 및 논토양 시험시 초기, 중기, 말기의 pH, 산소 농도 및 산화환원 전위
- 11) 추출 방법

12) 토양 중 시험물질 및 전환물질과 포집물질의 정량 및 동정방법

13) 시료 반복수와 대조시료 수

2.7 시험결과 :

1) 미생물 활성 측정 결과

2) 사용한 분석법 재현성 및 민감성

3) 회수율

4) 초기 처리 농도의 %나 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 토양(건중량 근거)으로 계산한 결과표

5) 시험기간 중과 종료시점에서의 물질수지(Mass balance)

6) 토양 중 비추출성(결합) 방사능 또는 잔류물 특성 규명

7) 이산화탄소 및 휘발성 물질 정량화

8) 시험물질 및 주요 전환물질에 대한 시간 대비 토양 농도 그래프

9) 신뢰한계를 포함한 시험물질 및 주요 전환물질의 반감기 또는 DT_{50} , DT_{75} 및 DT_{90}

10) 멸균 조건에서 비생물적 분해율 예측

11) 시험물질 및 주요 전환물질의 전환 역학 평가

12) 전환경로 제안

13) 토의 및 결과해석

14) 측정값(Raw data)

표 1. 수분장력, 지면 수용력(FC) 그리고 용수량(WHC)

water column의 높이(cm)	pF ^(a)	bar ^(b)	주의
10^7	7	10^4	건조토양
$1.6 \cdot 10^4$	4.2	16	위조점(Wilting point)
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2.8	0.6	
$3.3 \cdot 10^2$	2.5	0.33 ^(e)	지면수용력 ^(d) 의 범위
10^2	2	0.1	
60	1.8	0.06	
33	1.5	0.033	
10	1	0.01	WHC(근사값)
1	0	0.001	수분에 포화된 토양

(a) pF = water column cm의 log값

(b) 1bar = 10^5 Pa.

(c) 모래에 10%, 양토에 35%, 점토에 45% 포함된 수분의 값과 대략적으로 일치한다.

(d) 지면용수력은 일정하지 않고 토양 유형에 따라서 pF 1.5와 2.5사이의 값을 갖는다.

수분장력 : Water column의 cm 또는 Bar로 측정한다. 흡입장력의 범위가 넓기 때문에 Water column의 cm 값을 로그화한 pF value로 간단하게 표시한다.

지면 수용력(FC) : 충분한 물을 급수하거나 2 일간 비가 온 후 중력에 저항하며 토양에 저장되어지는 물의 총량으로 정의한다. 이것은 지면의 원래 장소에서 평정한 상태에 있는 토양에서 측정해야 한다. 그러므로 실험실의 교란된 토양표본에서는 적용할 수 없다. 교란된 토양이 높은 계통적 다양성을 보일 때 FC 값을 결정할 수 있다.

용수량(WHC) : 실험실에서 교란된 토양과 교란되지 않은 토양으로 Column을 만들어 모세관 이동으로 물을 스며들게 하여 결정한다. 지면 수용력보다 30 %이상 높은 값이 나오며 특히 교란된 토양에서 유용하다. 이것은 또한 신뢰적인 FC 값보다 실험으로 쉽게 결정할 수 있다.

표 2. 여러나라의 다양한 토양유형별 수분 함량(건조 토양 100 g당 물의 g)

토양유형	국가	토양 수분 함유		
		WHC ¹	pF=1.8	pF=2.5
모래	독일	28.7	8.8	3.9
양질사토(Loamy sand)	독일	50.4	17.9	12.1
양질사토	스위스	44.0	35.3	9.2
미사질 양토(Silt loam)	스위스	72.8	56.6	28.4
점질 양토(Clay loam)	브라질	69.7	38.4	27.3
점질 양토	일본	74.4	57.8	31.4
사양토(Sandy loam)	일본	82.4	59.2	36.0
미사질 양토	미국	47.2	33.2	18.8
사양토	미국	40.4	25.2	13.3

¹ 용수량

제11항 수중 퇴적물에서의 호기성 및 혐기성 전환시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 퇴적물 내의 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 다른 형태의 물질로 전환되는 과정을 평가하는데 목적이 있으며, 그 평가내용은 대상시험 물질의 전환률과 수계환경에 노출될 가능성이 있는 전환물질의 속성이나 형성되는 속도, 감소비율 등이다.

2. 정의

2.1 시험물질(Test substance)

모 화합물(parent) 또는 관련 전환물질 등 모든 물질

2.2 전환물질(Transformation products)

이산화탄소 및 결합잔류물(Bound residues) 내 산물을 포함한 시험 물질의 생물적 또는 비생물적 변환 반응에서 생기는 모든 물질

2.3 결합잔류물(Bound residues)

토양, 식물 또는 동물 체내에 결합된 화합물을 나타내며, 추출 후에 모 물질 또는 그 대사물질(들)/전환 물질 형태로 매트릭스 내에 잔존하는 물질

2.4 호기성전환(Aerobic transformation)

산소분자가 존재 시 발생하는 반응

2.5 혐기성전환(Anaerobic transformation)

산소분자 부재 시 발생하는 반응

2.6 천연수(Natural water)

호수, 강, 하천 등의 표층수

2.7 퇴적물(Sediment)

무기질 및 유기 화학적 성분의 혼합물이며, 후자는 탄소와 질소 고함량 및 고분자량을 가진 화합물을 함유하고 있음. 퇴적물은 천연수에 의해 퇴적되고 그 천연수와 계면(Interface)을 형성

2.8 무기질화(Mineralisation)

유기 화합물이 호기성 조건에서 CO_2 와 H_2O 로, 혐기성 조건에서 CH_4 , CO_2 와 H_2O 로 완전히 분해되는 현상. 이 가이드라인에서는 ^{14}C 동위원소로 표지된 화합물을 사용하므로 무기질화는 표지된 ^{14}C 원자가 산화되며 적정량의 $^{14}\text{CO}_2$ 를 방출하는 광범위한 분해를 의미한다.

2.9 반감기(Half-life, $t_{0.5}$)

반감기, $t_{0.5}$ 는 토양에서의 전환을 1차 반응속도식(First-order kinetics)으로 설명할 수 있을 때 시험 물질의 50 %가 전환에 이르는 시간이며, 초기농도와는 무관.

2.10 50 %, 75 %, 90 % 소멸시간($\text{DT}(\text{Disappearance Time})_{50}$, DT_{75} , DT_{90})

시험 물질 농도가 초기농도와 비교하여 50 %, 75 %, 90 % 줄어드는데 소요되는 시간.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법 적용성

1.1.1 이 방법은 모든 화학물질(비표지 또는 방사성표지)에 적용 가능하며, 약한 휘발성, 비휘발성, 수용성 또는 비수용성 화합물에도 적용가능하다. 그러나 토양으로부터 휘발이 강한 화학물질(예, 훈증제, 유기 용제) 등은 적용이 불가하다.

1.1.2 이 방법은 담수와 퇴적물 내에서 화학물질 전환 연구에 적용 가능하고, 강 하구/해양 시스템에도 적용 가능하나 흐르는 물(강과 같은)이나 바다와 유사한 조건에서는 적용이 불가하다.

1.2 시험물질 정보

^{14}C -표지화합물을 권장하지만 ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P 와 같은 다른 동위원소 물질도 사용 가능하며 시험물질의 화학적/방사화학적 순도는 95 % 이상이어야 한다.

퇴적물 내 호기성 및 혐기성 전환에 관한 시험 실시 전에, 시험 물질에 대한 다음과 같은 정보의 확보가 필요하다.

- 1) 수용성
- 2) 유기용매에서의 용해도
- 3) 증기압 및 헨리(Henry) 상수
- 4) n-옥탄올/물 분배계수
- 5) 흡착계수(K_d , K_f 또는 K_{oc})
- 6) 가수분해
- 7) 해리상수(pK_a)
- 8) 시험물질의 화학적 구조, 동위원소 표지 위치

1.3 시험용 수중 퇴적물

1.3.1 퇴적물 선택

1.3.1.1 호기성 시험용으로 두 종류의 퇴적물을 선택한다. 선택된 퇴적물 2 종은 유기 탄소 함량과 구성면에서 달라야 한다. 하나는 퇴적물은 유기탄소 고함량(2.5 % ~ 7.5 %)에 세립질(Fine texture)이어야 하며, 다른 하나는 유기탄소 저함량(0.5 % ~ 2.5 %)에 조립질(Coarse texture)이어야 한다. 두 퇴적물간 유기탄소 함량 차이는 일반적으로 최소 2 % 이내이다. “세립질”은 [점토(Clay)+미사(Silt)] 함량이 > 50 %이며 “조립질”은 [점토+미사] 함량이 < 50 %인 경우로 정의한다. 두 퇴적물간 [점토+미사] 함량 차이는 일반적으로 최소 20 %다. 대상 시험물질이 해양까지 도달할 가능성이 있다면 적어도 한 종은 해양 부근의 퇴적물을 선택해야 한다.

1.3.1.2 정확한 혐기성 시험을 위해서는, 두 종의 퇴적물 (물 포함)는 표층수의 혐기성 구역에서 채취하여야 한다. 퇴적물과 함께 채취한 물 시료 모두 혐기 조건 하에서 이송해야 한다.

1.3.2 물-퇴적물 시료의 특성

1.3.2.1 물과 퇴적물의 주요 요소들은 반드시 측정하고 기록해야 한다.

1.3.2.2 그 외에, 다른 변수들은 필요시 측정하여 기록한다. 예를 들어 담수의 경우 입자, 알칼리도, 경도, 전기전도도, NO₃/PO₄ (비율 및 개별 값) 등을, 퇴적물의 경우 양이온 치환 능력, 수분함량(Water holding capacity), 탄산염(Carbonate), 총 질소 및 총인, 해수의 경우 염도 등을 필요시 측정, 기록한다.

표. 물-퇴적물 시료 특성 규명을 위한 변수 측정

변수	시험 과정 단계					
	현장 표본추출	사후 처리	순용 시작	시험 시작	시험 중	시험 종료
물						
출처	○					
온도	○					
pH	○		○	○	○	○
TOC			○	○		○
산소 농도	○		○	○	○	○
산화환원 전위			○	○	○	○
퇴적물						
출처	○					
층 깊이	○					
pH		○	○	○	○	○
입도 분포		○				
TOC		○	○	○		○
미생물체량 ^{주1)}		○		○		○
산화환원 전위	관찰(색깔 /냄새)		○	○	○	○

1.3.3 수집, 취급 및 저장

1.3.3.1 수집 : 퇴적물 시료는 퇴적물 상층 5 cm ~ 10 cm부위에서 채취해야 한다. 함께 채취되는 물은 퇴적물과 같은 장소나 위치에서 동시에 수집한다. 혐기성 시험을 위해서는 퇴적물과 함께 채취한 물 시료 모두 무산소 조건 하에서 이송해야 한다.

1.3.3.2 처리 : 퇴적물은 물로부터 여과하여 분리하고 분리한 퇴적물은 과량의 시

료채취지점의 물을 사용하여 2 mm 체에 습식 체질 후, 물은 폐기한다. 기지의 퇴적물과 물을 배양플라스크에 원하는 비율로 혼합하여 순응시킨다. 혐기성 시험의 경우 모든 처리단계는 산소가 배제된 상태에서 진행한다.

1.3.3.3 저장 : 바로 채취한 퇴적물과 물을 시험에 사용하는 것을 권장하지만 저장이 필요할 경우 1.3.3.2와 같이 퇴적물과 물을 체로 걸러서 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건에서 물로 채운 후(6 cm ~ 10 cm 수층) 최대 4주간 저장하며 사용한다. 호기성 시험에 사용할 시료는 공기가 잘 통하게 보관하고(뚜껑 없는 용기 사용), 혐기성 시험에 사용할 시료는 산소가 배제되게 보관한다. 퇴적물과 물은 이송 및 저장 중에 얼거나 건조되어서는 안된다.

1.4 시험용 퇴적물/물 시료 준비

순응기간은 각 퇴적물/물 시료를 본 시험에 사용할 배양 용기에 담아서, 시험물질을 첨가하지 않고 수행한다. 순응은 시험시와 완전히 동일한 조건에서 수행한다. 순응기간은 일반적으로 1 주 ~ 2주 간 수행하며 4 주를 초과해서는 안된다.

2. 품질기준(Quality criteria)

2.1. 회수율

회수율은 표지 화합물은 90 % ~ 110 %, 비표지 화합물은 70 % ~ 110 % 범위여야 한다.

2.2. 검출한계

시험 물질 및 전환물질의 분석법 검출한계(LOD)는 최소 $0.01\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 또는 초기 처리량의 1 % 이하여야 하며, 정량한계(LOQ)도 구해야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험조건

3.1.1 시험은 배양장치에 물 : 퇴적물 비율을 3 : 1과 4 : 1 사이로 하고 퇴적물 층을 2.5 cm($\pm 0.5\text{ cm}$)로 하여 수행한다. 배양용기 당 최소 50 g의 퇴적물 (건중량 기준) 사용을 권장한다.

3.1.2 시험은 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 온도범위의 암조건에서 수행한다. 온도는 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

가 적합하다. 배양온도는 반드시 측정하고 기록한다.

3.2. 시험 물질 처리

3.2.1 일반적으로 시험물질 한 농도를 사용하여 시험하나, 필요한 경우 두 번째 처리농도를 추가하여 시험할 수 있다. 작물 보호용 화학물질은 수표면에 직접 처리하므로 표지 상 최대 처리량은 시험 용기 속 물 표면적을 기반으로 계산된 최대 처리율로 간주한다. 모든 경우에 있어서 처리 농도는 예측 가능한 환경 노출량을 기반으로 선정한다. 시험물질 처리농도가 초기부터 검출 한계에 가깝거나 또는 주요 전환물질이 시험물질 처리량의 10 %에서도 검출이 불가능 할 경우 처리량을 높일 필요가 있다(예, 10 배). 그러나 더 높은 시험 농도를 사용한다면 그 농도가 물-퇴적물 내 미생물 활성화에 역효과를 미쳐서는 안된다. 시험용기에 따른 처리용량의 계산 예는 (주 2)을 참조한다.

3.2.2 시험물질 처리시 가장 좋은 방법은 시험물질을 물에 녹여 처리하는 것이다. 시험물질이 물에 용해가 잘 안되면 소량의 수용성 용매(아세톤, 에탄올 등)를 사용하는 것은 가능하다. 용매의 양은 1 % v/v를 초과해서는 안되며 미생물의 활성화에 영향을 주어서는 안된다.

3.2.3 제제(Formulation) 형태의 시험물질 처리는 일반적으로 사용하지 않는 것이 좋다. 제제된 시험물질은 물층과 퇴적물 상에서 시험물질 혹은 전환물질의 분산에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 그러나 물에 거의 녹지 않는 시험물질의 경우 대체 방법으로 제제된 시험물질을 사용하는 것이 적절하다.

3.2.4 배양 용기의 수는 시료채취 횟수에 따라 다를 수 있다. 충분히 많은 수의 배양 용기를 준비한다. 각 시료 채취 시기마다 퇴적물의 미생물량(Biomass)과 물과 퇴적물의 TOC 측정을 위해 시험물질이 처리되지 않은 대조구 시료가 필요하며, 또한 순응기간 중 퇴적물과 물에 대해 요구되는 인자들을 측정하기 위한 2 개의 대조구 시료가 필요하며, 추가로 시험물질 처리시 유기용매를 사용한 경우 미생물의 활성화에 영향을 주는지 확인할 수 있는 대조시료가 필요하다.

3.3 시험 기간 및 시료 채취

3.3.1 시험 기간은 일반적으로 100 일을 넘어서는 안 되며, 분해 경로와 물/퇴적물의 분배 경향이 확정될 때까지 혹은 시험물질의 90 %가 전환되거나 휘발로 소실될 때까지 시험이 진행되어야 한다. 시료 채취 횟수는 최소 6 회 이상(0 시간 포함)

이어야 하고, 이전 시험에서 시험물질에 대한 활용가능 자료가 충분하지 않다면, 적절한 시료채취 방식과 시험기간 결정을 위한 조건 부적 예비시험을 수행한다. 소수성 시험 물질의 경우, 시험초기 단계에서 물층과 퇴적물 층 사이의 분산율을 측정하기 위해 추가적인 시료 채취가 필요할 수 있다.

3.3.2 시료를 채취한 후 분석을 위해 모든 배양 용기를 제거한다. 퇴적물과 상층부의 물은 각각 분리하여 분석한다. 표층수는 퇴적물의 교란을 최소화하면서 조심스럽게 제거한다. 시험물질과 전환물질의 추출 및 정량 등은 적절한 분석법에 따라 수행한다.

3.4 조건부적 예비 시험

시험기간 및 시료 채취 방식 등이 시험물질과 관련된 다른 연구로부터 예측이 불가능하면 조건부적 예비시험을 수행하는 것이 적절하다. 예비시험은 본시험을 수행하기 위해 설정된 시험조건과 동일하게 수행하며, 그 결과를 간략하게 보고서 형태로 작성한다.

3.5 측정 및 분석

3.5.1 모든 물과 퇴적물의 시료채취 시기마다 시험물질과 전환물질의 농도를 측정하여 보고해야 한다(처리량에 대한 농도와 백분율). 일반적으로 전환물질은 시료채취시마다 총 물/퇴적물 시스템에 처리된 방사능의 10 % 이상 검출되는 경우 규명(Identification) 해야 한다. 시험 기간 중 지속적으로 농도가 증가하는 경향을 보이는 전환물질의 경우는 10 % 이상 검출되지 않아도 규명과정이 수행되어야 한다. 이와 같은 전환물질은 잔류될 가능성이 높기 때문이다.

3.5.2 각 시료 채취시기마다 측정된 가스/휘발성 물질 포집시스템(이산화탄소 및 휘발성 유기 화합물)에 대한 결과는 제시되어야 하고, 무기질화 비율에 대한 결과도 제시해야 한다. 시료 채취 시기마다의 퇴적물 내의 비추출(결합) 잔류물에 대한 측정 결과도 제시해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 계산

1.1 처리한 방사능의 총 물질수지(Mass balance) 또는 회수율은 모든 시료 채취시기마다 계산되어야 한다. 결과는 처리한 방사능량에 대한 백분율로 보고한다. 물과 퇴적물 사이의 방사능 분포 량도 각 시료 채취시기마다 농도와 백분율로 보고해야 한다.

1.2 시험물질의 반감기, DT_{50} , DT_{75} , DT_{90} 는 신뢰한계와 함께 계산해서 제시해야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질

1) 일반명, 화학물질명, CAS 번호, 구조식(방사성표지 물질 사용 시 표지 위치 표시) 및 관련 물리화학적 성질

2) 시험 물질 순도, 불순물 함량

3) 동위원소 표지 화합물의 방사화학적 순도 및 특정활성도(Specific activity)

4) 참조 물질의 화학물질명 및 구조 (사용할 경우)

2.5 시험 퇴적물과 물

1) 장소, 수중 퇴적물 채취 지역에 대한 기술, 오염 역사(가능시)

2) 물/퇴적물 시스템의 수집, 저장 및 순응과 관련된 모든 정보

3) 물/퇴적물 시료의 특성

2.6 시험조건

1) 사용한 시험 시스템(공기흐름식, 생체(이산화탄소) 측정기, 통풍 방법, 교반 방법, 물 용량(Water volume), 퇴적물 질량, 물/퇴적물 층 두께, 시험 용기 크기 등).

2) 시험물질 처리 : 처리한 시험물질 농도, 반복 수, 시험물질 처리 방법 등

3) 배양 온도

- 4) 시료채취 시간
- 5) 추출방법 및 효율, 분석방법과 검출한계
- 6) 전환물질 특성/동정 방법
- 7) 시험기간 중 시험계획서 또는 시험조건의 이탈 내용

2.7. 시험결과 :

- 1) 대표적인 분석관련 측정값(Raw data) 그림(모든 Raw data는 GLP 자료보관실에 보관되어야 함)
- 2) 사용한 분석방법의 재현성, 감도
- 3) 회수율
- 4) 시험물질 초기 처리량에 대해 %와 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 표현한 결과 표 : 물과 퇴적물, 전체 시스템(% 로만), 가능하다면 전환물질과 비추출 방사능물질 포함
- 5) 시험기간 중 및 종료 시점에서의 물질수지(Mass balance)
- 6) 물과 퇴적물 분획 및 전체 시스템(무기질화 포함)에서의 전환에 대한 그래픽 표시
- 7) 무기질화 비율
- 8) 시험 물질 및 적절한 경우, 물, 퇴적물 및 전체 시스템 내 신뢰 한계를 포함한 전환물질의 반감기 또는 DT_{50} , DT_{75} 및 DT_{90}
- 9) 시험물질과 적절한 경우, 전환물질의 전환 kinetics 평가
- 10) 적절한 경우, 전환 경로 제안
- 11) 결과 논의

주1) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method

주2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No 308 ANNEX 5.

제12항 지표수의 호기성분해 : 모의 생분해성 시험

I. 개요

1. 목적

본 시험의 목적은 호기성 자연수에서 낮은 농도의 시험 물질의 생분해에 소요되는 시간을 측정하고, 관찰 결과를 반응속도 형태로 정량화하는 것이다. 본 모의시험은 자연 지표수(민물, 반염수 또는 해수) 시료에서 유기물질의 호기성 생분해율을 결정하기 위하여 실험실에서 교반 플라스크를 이용하여 실시한다.

2. 정의

2.1 일차 생분해(Primary biodegradation)

시험 물질이 미생물의 활성으로 인해 화학적 특성을 잃게 되어 일어나는 구조적 변화(변형)

2.2 기능적 생분해(Functional biodegradation)

시험 물질이 미생물의 활성으로 인해 특정 기능(특성)을 잃게 되어 일어나는 구조적 변화(변형)

2.3 최종 호기성 생분해(Ultimate aerobic biodegradation)

미생물이 산소의 존재를 바탕으로 화학물질을 이산화탄소, 물, 무기염 및 다른 무기원소(분자)로 전환하는 분해 및 새로운 생체량 및 유기 미생물 생합성 산물을 생산하는 과정

2.4 무기화(Mineralisation)

미생물이 산소의 존재를 바탕으로 화학물질을 이산화탄소, 물, 무기염 및 다른 무기원소(분자)로 전환하는 분해

2.4 지연기(Lag phase)

시험의 시작으로부터 미생물에 의한 분해가 시작되는 시점 즉, 물질 분해 정보가 감지 가능한 수준(이론상 최대 분해량의 10 %, 또는 측정 기술의 정확도에 따라 이보다 낮은 수준)이 되기까지의 기간

2.5 최대 생분해 수준(Maximum level of biodegradation)

더 이상 분해가 진행되지 않는, 화학물질 또는 유기물의 생분해 수준 (%)

2.6 일차 기질(Primary substrate)

미생물 군집의 성장 및 유지를 위해 자연 탄소 및 에너지원의 집합

2.7 이차 기질(Secondary substrate)

매우 낮은 농도로 존재하는 기질. 주요 기질 구성요소(일차기질)의 분해를 통하여 공급되는 탄소 및 에너지와 비교하여, 분해가 일어남에 따라 미생물에 공급되는 극소량의 탄소량 및 에너지

2.8 분해 속도 상수(Degradation rate constant)

일차 반응 또는 유사일차 반응속도 상수 k (d^{-1})는 분해의 속도를 표시함. 일반 batch 실험의 경우, 지연기 이후 얻어진 분해곡선의 초기부분에서 k 를 계산

2.9 반감기(Half-life, $t_{1/2}$ (d))

일차반응 속도를 정의하기 위해 사용되는 용어. 반감기 및 분해속도 상수는 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 로 나타냄

2.10 분해 반감기(DT_{50} (d), Degradation half time)

분해 시험의 결과를 통하여 얻은 결과를 표현하기 위한 용어. 지연기를 포함하여 50 %의 생분해율을 얻는데 걸리는 시간을 의미

2.11 검출한계 및 정량한계(LOD, Limit of detection, LOQ, Limit of quantification)

LOD는 분석시료에서 대조시료와 통계적으로 다르게 결정될 수 있는 가장 낮은 농도이며, LOQ는 신뢰할만한 정확성으로 정량이 가능한 가장 낮은 농도

2.12 용존 유기탄소(DOC : Dissolved organic carbon)

물 시료에서 특정한 상분리 방법(예, 15 분간 $40,000\text{m/s}^2$ 원심분리 또는 $0.2\ \mu\text{m}$ ~ $0.45\ \mu\text{m}$ pore size의 필터로 여과)으로 분리할 수 없는 유기탄소 부분

2.13 총 유기 ^{14}C 활성(TOA : Total organic ^{14}C activity)

유기탄소와 결합된 ^{14}C 활성 총량

2.14 용존 유기 ^{14}C 활성(DOA : Dissolved organic ^{14}C activity)

용존 유기 탄소와 결합된 전체 ^{14}C 활성 총량

2.15 입자 유기 ^{14}C 활성(POA : Particulate organic ^{14}C activity)

입자 유기탄소와 결합된 전체 ^{14}C 활성 총량

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법의 적용

1.1.1 이 방법은 낮은 농도의 휘발성물질 또는 약간의 휘발성이 있는 유기화합물 질에 적용가능하다. 대기로 노출(면숨으로 막은)되는 열린 플라스크를 이용했을 때, Henry's law 상수가 $1\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (대략 $10^{-5}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) 정도 되는 물질을 휘발성 물질로 간주한다. 휘발성이 약간 있는 물질 (Henry's law constants $100\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하 또는 $10^{-3}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하)을 시험하는 경우, 시험물질의 손실을 줄이기 위해 입구를 밀폐한 플라스크를 사용할 수 있다. 생분해 반응을 확인하기 위하여 시험물질의 농도는 물에 대한 용해도보다 낮아야 한다. 물에 대한

용해도가 낮은 시험물질을 희석할 때 자연수를 사용하기도 한다.

1.1.2 모의 생분해성 시험은 부유물이 없는 지표수에서 수행하는 방법(표층시험, Pelagic test) 또는 물/퇴적물 사이에 존재할 수 있는 부유물이 있는 지표수에서 시험을 수행하는 방법(Suspended sediment test) 2 가지가 가능하다.

1.2 시험물질 정보

방사성 동위원소 표지(Radio labelled) 화합물이나 비표지(Non-labelled) 화합물 모두 시험에 사용할 수 있다. ^{14}C 표지 기술을 사용하는 것이 일반적으로 권장되며, ^{14}C 표지는 분자의 가장 안정적인 부분에 하도록 하며, 쉽게 분해될 수 있는 결합의 양쪽 모두에 ^{14}C 표지를 하는 것이 권장된다. 시험 물질의 화학적 및/또는 방사능 화학적 순도는 95 % 이상이어야 한다. 최초 농도가 낮게 설정된 시험에서 ^{14}C 측정을 돕기 위해 동위원소로 표지한 물질의 특수 활성은 대략 $50 \mu\text{Ci/mg}$ (1.85 MBq) 또는 이상이어야 한다.

시험물질에 대하여 다음과 같은 정보의 확보가 필요하다.

- 1) 수용해도
- 2) 유기용매에 대한 용해도
- 3) 해리상수(Dissociation constant: pK_a) : 물질이 양자화(Protonation) 또는 탈양자화(Deprotonation) 되는 경우
- 4) 증기압, Henry's law 상수
- 5) 물 및 암실에서 화학적 안정성(가수분해)
- 6) 물에 대한 용해도가 매우 낮은 물질을 해수에서 시험하는 경우, 염석상수 (Salting out constant 또는 "Setschenow constant") K_s 를 알아두는 것이 도움이 될 수 있다. K_s 는 $\log (S/S') = K_s \cdot C_m$ 로 정의되며, S 및 S' 는 각각 민물과 해수에서의 용해도이며, C_m 은 염분 몰 농도이다.

시험을 부유 퇴적물(Suspended sediment) 조건으로 수행하는 경우, 다음과 같은 정보가 필요할 수 있다.

- 1) N-octanol/물 분배계수
- 2) 흡착계수(Adsorption coefficient)

다른 유용한 정보로는 다음과 같은 항목이 있다.

- 1) 환경 내 농도(알려져 있거나 추정된 값)
- 2) 미생물에 대한 시험물질의 독성
- 3) 이분해성 또는 난분해성
- 4) 토양과 퇴적물/물 전이 연구에서의 호기성 또는 혐기성 생분해성

1.3. 시험대조물질(Reference substance)

일반적으로 호기성 환경에서 쉽게 분해되는 물질(예, Aniline 또는 Sodium benzoate)을 참고 물질로 사용한다. 아닐린 및 소듐 벤조에이트의 추정 분해 시간은 일반적으로 2 주 미만이다. 시험대조물질을 사용하는 목적은 시험용수에서의 미생물의 활성이 시험 가능한 기준범위 이내에 있음을 확인하기 위함이다.

2. 품질기준(Quality criteria)

2.1. 회수율

시험물질을 첨가한 직 후, ^{14}C 의 측정 또는 비표지 물질인 경우 화학적인 분석방법을 통하여, 농도 그룹 당 최소 두 샘플에 대해 최초 각 시험농도를 확인해야 한다. 이를 통하여 분석방법의 적용능력 및 반복능력은 물론 시험 용기 내의 시험물질의 균질성, 분포도를 확인할 수 있다. ^{14}C 로 표지 시험물질에 대하여, 시험 종료 시 회수율 정도는 질량수지로 계산하며, 범위는 90 % ~ 110 %가 되어야 한다. 비표지 물질의 경우 초기 회수율은 70 % ~ 110 % 범위 내에 있어야 한다. 그러나 이 범위들을 목표로 해석되어야 하며, 시험의 타당성을 인증하는 기준으로 사용되어서는 안 된다.

2.2. 분석 방법의 재현성 및 감도

2.2.1. 시험물질과 전환물질을 정량화하는데 분석방법의 재현성 확인은 지표수의 추출은 각각 5회 반복적으로 추출, 분석한다.

2.2.2. 시험물질과 전환물질의 검출한계(LOD)는 초기 농도의 최소 1 %가 되어야 한다. 정량한계(LOQ)는 초기 농도의 10 % 또는 그 이하이어야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험장비

시험은 적절한 용량(0.5 L 또는 1.0 L)의 원뿔형(Conical) 또는 원통형 플라스크를 실리콘 또는 고무마개로 막아서 사용하거나, 혈청수집용 플라스크에 CO₂ 밀폐 마개(예, Butyl rubber septa)를 사용한다. 비표지 물질의 사용 시, 비휘발성 시험물질에 대해서는 기체 밀폐 마개 또는 뚜껑을 사용할 필요가 없으며, 면숨으로 입구를 막아 공기에서부터 들어올 수 있는 오염원만 막아주도록 한다. 휘발성이 약간 있는 물질은 Biometer-type system을 사용해야 한다. 박테리아 오염의 발생을 방지하기 위해, 모든 용기는 사용 전에 열 멸균처리하거나 멸균한다. 또한, 다음과 같은 표준 실험실 장비가 사용된다.

- 1) 교반 테이블 또는 자석 교반기
- 2) 원심분리기
- 3) pH meter
- 4) 물의 혼탁도 측정을 위한 탁도계(Turbidimeter)
- 5) 건조중량 확인을 위해 사용할 오븐 또는 전자오븐
- 6) 멤브레인 여과(Membrane filtration) 장치
- 7) 유리 용기의 열 멸균을 위한 멸균 또는 오븐
- 8) ¹⁴C 표지 물질을 다루기 위한 설비
- 9) CO₂ 흡수용액 또는 퇴적물에서 ¹⁴C-activity 확인할 수 있는 장치
- 10) 시험물질(또는 시험대조물질)의 확인을 위한 분석장비 (GC, HPLC 등)

3.2. 시험물질의 농축용액(Stock solution)

시험물질 및 시험대조물질의 저장용액을 만들기 위해 탈이온수를 사용한다. 탈

이온수는 미생물에 대한 독성영향이 없는 것을 사용하며, 용존 유기탄소 (DOC : Dissolved organic carbon)가 1 mg/L 이하여야 한다.

3.3. 지표수의 수집 및 운반

지난 4 년 간, 대상 시험물질 또는 구조상 유사한 물질에 의한 오염이 있었던 경우에는 이전에 해당 장소에서의 분해 연구 시험결과가 알려져 있지 않으면, 해당 장소의 지표수 시료를 사용하지 않도록 한다. 채취 시, 지표수의 pH와 온도 및 시료 채취 깊이 및 외관(예, 색깔 및 탁도)을 반드시 기록해야 한다. 채취한 지표수를 옮길 때에는 청결한 용기를 이용하며, 시료를 이동하는 동안에는 시험 시 사용할 온도와 급격한 차이가 나지 않도록 유의한다. 운반 시간이 2 시간 ~ 3 시간 이상인 경우, 4 °C로 보관하도록 한다. 지표수 시료는 얼리지 않도록 한다.

3.4. 지표수의 보관 및 준비

시험은 반드시 샘플 채취 후 1 일 이내에 실시하도록 한다. 샘플의 보관이 필요한 경우, 보관 기간을 최소화하며, 4 주 이상 보관은 피하도록 한다. 시험을 시작하기 전까지 지표수 시료는 4 °C에서 공기를 공급하면서 보관한다. 시험 시작 전 100 µm 메시 나일론 필터 또는 성긴 종이 필터를 이용하여 굵은 입자 또는 퇴적물을 제거한다.

3.5. 퇴적물로 보정된 물 준비[선택 사항]

부유퇴적물 시험을 위하여, 자연수가 포함된 플라스크에 퇴적물을 첨가(굵은 입자를 여과하여 제거한 시료) 하여, 부유고형물 농도를 0.01 g/L ~ 1 g/L 사이가 되도록 한다. 표면 퇴적물은 물 시료를 채취한 같은 장소에서 채취한 것을 사용한다. 표면 퇴적물은 다음과 같이 준비한다. 투명한 플라스틱 튜브를 사용하여 몇 개의 퇴적물 코아로 시료를 채취한 후, 상부의 공기와 접하는 부분(표면에서 약 5 mm 깊이)들을 잘라내어 합친다. 퇴적물 시료는 호기성 상태를 유지하기

위하여 내부용적이 넓은 용기에 담아 호기성상태로 운반한다(운반 시간이 2 시간 ~ 3 시간을 넘는 경우 4 °C로 유지). 퇴적물 시료는 1 : 10 비율로 시험용수에 혼합하여 사용할 때까지 4 °C에서 공기를 공급한다. 퇴적물의 보관기간은 최소화 하도록 하나 보관이 필요한 경우 4 주를 넘기지 않도록 한다.

3.6. 반-연속식(Semi-continuous) 방법 [선택사항]

시험물질의 뚜렷한 분해가 일어나는데 지연기(Lag time)가 길어지는 경우에는 배양기간의 연장(수개월)이 필요하다. 이 물질의 예비 시험을 통하여 이와 같은 사실이 알려져 있는 경우, 시료수는 또는 부유물의 일부분을 주기적으로 새로 주입하는 반-연속적 방법으로 시작할 수 있다. 만약 Batch 실험을 이용하여 약 60 일간 시험물질의 분해가 일어나지 않으면, 일반적으로 Batch 실험은 반-연속식으로 변경하여 수행할 수 있다.

3.7. 시험 물질(또는 시험대조물질)의 첨가

3.7.1. 물에 대해 높은 용해성(1 mg/L 이상)과 낮은 휘발성(Henry's law Constants $1 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ 이하 또는 $10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ 이하) 물질의 경우, 탈이온수로 저장용액을 만들 수 있다. 원하는 농도에 맞게 적절한 양의 저장용액을 시험용기에 첨가한다. 저장용액의 첨가량은 가능하면 최소화(최종시험액 용량의 10 % 이하)하여야 한다. 다른 방법으로, 시료수가 많은 양일때는 시험물질을 용해시키기 위하여 유기용매를 사용할 수도 있다.

3.7.2. 수용해도가 낮은 비휘발성 물질의 저장용액을 만들 때에는 휘발성 유기용매를 사용하여 준비한다. 그러나 시험과정에 더해지는 유기용매의 양은 1 % v/v를 넘지 않도록 해야 하고, 미생물 활성에 영향을 주지 않도록 한다. 또한 유기용매의 사용으로 물에 있는 시험물질의 안정성에도 영향을 주지 않도록 최소한의 양이 되도록 탈기시켜야 한다. 용매의 사용을 극소화하여, 물 시료 및 부유물의 DOC 농도의 증가에 영향을 주지 않도록 해야 한다. DOC 분석이 가능한 경우, 적합한 분석방법으로 확인하도록 한다. 시험물질의 첨가를 위해 유기용매를

사용하는 경우, 물 시료를 포함하는 용매 대조군과 시험대조물질이 첨가된 물 시료는 용매중의 시험물질로 보정되도록 시험용기가 동일하게 처리되어야 한다. 용매 대조군을 사용하는 목적은 유기용매의 첨가로 인하여 시험대조물질의 분해에 영향을 주는 미생물군에 대한 영향을 확인하기 위함이다.

3.8. 시험 조건

3.8.1. 시험 온도

배양은 채취 현장의 온도 또는 기준온도($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)로 조절된($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) 암실(권장됨) 또는 빛을 줄인 환경에서 수행하도록 한다. 채취 현장의 온도는 실제 장소의 지표수 온도 또는 채취 현장의 평균 온도를 사용하도록 한다.

3.8.2. 교반

부유물 중의 입자와 미생물들이 유지되도록 연속적으로 교반을 해야 한다. 교반은 용기 상부의 산소를 용액 중으로 전달시키는 장치로서 호기성으로 적정하게 유지되도록 한다. 교반은 반드시 지속적으로 실시하며, 용액이 균질한 상태가 유지되도록 가능하면 부드럽게 한다.

3.8.3. 시험 기간

(1) 시험기간은 시험용 부유물질을 주기적으로 교체해야 하는 반-연속식 방법을 사용하지 않는 한, 대체로 60 일을 넘기지 않도록 한다. 그러나 시험물질의 분해가 최초 60 일 동안 일어나지 않는 경우, 일반 시험을 위해 기간은 최대 90 일까지 연장할 수 있다. 일정 시간 간격으로 ^{14}C 활성 또는 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양을 확인하거나 화학적인 분석방법을 통해 시험물질의 분해를 관찰한다. 분해 과정을 평가할 수 있도록 배양시간을 충분히 두도록 한다. 동력학적인 분해 속도 상수 평가를 가능케 하기 위하여 50 % 이상 분해가 되도록 하고, 분해가 느린 물질의 경우 20 % 이상의 분해를 기준으로 한다.

(2) 물과 퇴적물 시료로 사전에 유사한 시험결과가 없는 경우, 시험 시스템의 pH와 산소농도는 주기적으로 측정한다. 물과 퇴적물 시료는 일부 조건에서 매우 높은 농도의 일차물질의 대사가 일어나는 경우, 많은 양의 CO_2 발생과 산소 감

소가 발생함으로써 시험기간 중에 조건 변화가 일어날 수 있다.

4. 시험과정

4.1. 표층시험(Pelagic test)을 위한 플라스크의 준비

4.1.1. 적절한 용량의 시험수를 시험용 플라스크 용량의 1/3까지, 100 mL 이상 채워 넣는다. 여러 개의 플라스크를 사용하는 경우(각 시료 채취 시 플라스크 전체를 사용하는 경우), 시험양이 지나치게 적은 경우 지연기의 길이에 영향을 줄 수 있기 때문에, 적절한 시험수의 용적은 100 mL가량이다.

분해반응 및 분해속도 상수를 계산하기 위해 5 배 ~ 10 배가량 다른 물질을 최소한 두 개 이상의 농도를 사용하도록 한다. 선택한 농도 모두 100 $\mu\text{g/L}$ 이하여야 하며, 1 $\mu\text{g/L}$ ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 범위가 권장된다.

4.1.2. 플라스크를 공기나 CO_2 가 통하지 않도록 마개를 덮는다. ^{14}C 표지가 없는 시험물질을 사용하는 경우, 주요 분해산물이 비휘발성으로 알려졌고, 간접적으로 CO_2 측정을 수행해야 하므로 면솜으로 입구를 막아 공기로부터 오염원이 들어오는 것을 방지한다.

4.1.3. 시험 시작 시점(생물학적 분해가 시작되는 시점)과 일정 시간간격으로 시료를 채취하여 화학적 분석 또는 ^{14}C 활성을 측정한다. 시험물질의 처리는 직접, 혹은 간접적인 방법으로 확인한다. 일반적으로 신뢰할만한 속도상수를 구하기 위하여, 신속히 분해되는 물질의 경우 세 번의 시료채취가 충분하다는 것에 대한 합당한 근거를 제시하지 않는 한, 분해 기간(즉, 지연기직후) 동안 최소 다섯 번의 시료 채취를 수행한다. 분해가 즉시 일어나지 않는 시험물질에 대해서는 분해기간 동안 더 빈번한 측정을 수행하게 되므로, k 를 구하기 위해 더 많은 데이터를 사용한다. 시험 물질에 따라 분해기간이 달라지므로 시료채취는 꼭 정해진 스케줄에 실시하지는 않는다. 그러나 분해가 느린 경우에는 일주일에 1 회 측정한다. 만일 시험물질의 분해가 빠른 경우, 시험 시작 후 3 일간 매일 측정 하고, 이후 2 일 ~ 3 일에 1 회 측정한다. 가수분해가 매우 빠르게 일어나는 특별한 경우에는 시간당 시료를 측정해야 하는 경우도 있다. 시료채취 간격을 정하기 위해 예

비실험을 수행하는 것이 권장된다.

4.2. 플라스크와 시료의 수

4.2.1. 충분한 수의 시험플라스크를 준비 :

- (1) 시험플라스크 : 반복적인 시료채취로 인하여 플라스크가 회수되는 것을 감안하여 시험물질의 각 농도에 대하여 최소한 두개의 반복군을 두거나(최소 3 개가 권장됨) 여러 개의 시험플라스크를 준비한다(이하 F_T)
- (2) 물질수지 계산을 위한 시험플라스크; 각 시험 농도에 대해 최소한 두 개 이상의 플라스크 사용(이하 F_M)
- (3) 시험물질 포함하지 않는 대조군; 시험수만 포함하여 최소한 하나의 대조군 플라스크(이하 F_B)
- (4) 기준대조군 : 시험대조물질(즉, 10 $\mu\text{g/L}$ 농도의 Aniline 또는 Sodium benzoate) 대조군에 대한 플라스크 두개 (이하 F_C). 대조물질을 사용하는 이유는 최소한의 미생물 활성을 확인하기 위함이다. 가능하면 동위원소로 표지된 시험대조물질을 사용하며, 시험물질의 분해는 화학적 방법으로 측정한다.
- (5) 멸균 대조군 : 시험물질의 생물학적 분해가 아닌 것을 확인하기 위하여 하나 혹은 두개의 플라스크에 멸균한 시험수를 넣고 시험을 수행한다 (이하 F_S). 생물학적 활성을 배제하기 위하여 멸균 (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 분간) 하거나 독성물질(e.g. Sodium azide (NaN_3) 10 g/L ~ 20 g/L , Mercuric chloride (HgCl_2) 100 mg/L 또는 포르말린 100 mg/L)을 첨가하거나 감마 광선을 조사한다. 만일 HgCl_2 를 사용하는 경우, 시험 후, 독성 폐기물에 포함시켜 폐기하도록 한다. 시험수 중 다량의 퇴적물이 추가된 경우, 멸균 조건을 달성하기가 어렵다. 이와 같은 경우에는 멸균을 반복적으로 실시(세 번)하는 것이 권장된다. 반복된 멸균으로 인하여 퇴적물의 흡착 특성이 바뀔 수 있다는 사실을 염두에 두어야 한다.
- (6) 시험수 및 시험수와 시험대조물질이 포함된 유기용매 대조군; 시험물질의 저장용액에 들어간 동일 량의 유기용매를 첨가한 대조군을 두개 이상 사용한다. 이를 사용하는 이유는 유기용매가 참고물질의 분해에 영향을 주는지 알아보기

위함이다.

4.2.2. 시험을 설계함에 있어서 연구자는 시험 반복군의 증가와 시험수 증가간의 상관성을 감안해야 한다. 분해 측정시 사용하는 방법에 따라 필요한 플라스크의 수를 정확히 판단할 수 있다.

4.2.3. 각 시료채취 시, 시험 플라스크에서 두 개의 서브샘플(예, 5 mL씩)을 채취하도록 한다. 플라스크 전체를 채취할 수 있도록 여러 개의 플라스크를 사용하는 경우, 각 시료채취 시점에서 최소 두 개의 플라스크를 채취한다.

4.3. 부유퇴적물 시험의 플라스크 준비[선택사항]

필요한 양의 시험수와 퇴적물을 시험 용기에 넣는다. 부유퇴적물 부유 시험을 위한 플라스크를 준비하는 과정은 표층시험과 동일하다. 혈청수집용 시험관(Conical tube) 또는 유사한 모양의 플라스크 사용을 권장한다. 밀폐된 플라스크를 shaker에 가로로 놓는다. ^{14}C 표지를 쓰지 않은 물질, 비휘발성 물질 시험에 사용하는 개방형 플라스크는 세워서 놓는다. 이 경우에는, 자석 Stirring 및 유리로 코팅된 Magnetic bar를 사용할 것이 권장된다. 필요한 경우, 적절한 호기성 조건을 유지하기 위하여 공기를 공급한다.

4.4. 동위원소의 측정

4.4.1. 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 는 직접 혹은 간접적으로 측정할 수 있다. $^{14}\text{CO}_2$ 를 간접적으로 측정하는 경우 pH 2 ~ 3 정도로 산성화 시킨 후 CO_2 를 배제시킨 후 시험수 또는 부유물질에서 최초 ^{14}C 활성과 각 시료채취 시점에서의 잔존활성 사이의 차이를 비교한다. 이와 같은 과정을 거쳐 무기탄소는 제거되며, 유기 물질로부터 유래된 잔존 활성도를 측정하게 된다. 시험 물질의 변형이 일어나는 동안 주요 휘발성 전환물질이 생성되는 경우 간접적인 $^{14}\text{CO}_2$ 의 측정방법은 사용할 수 없다. 가능하면, 각 시료채취 시, 최소 각 하나의 플라스크에서 $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생을 직접 측정하도록 한다. 이와 같은 과정에서 질량수지 및 생분해 과정을 확인해야 하며, 밀폐된 플라스크를 시험을 수행해야 한다.

4.4.2. 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 를 시험기간 동안 직접적으로 측정하는 경우, 시험을 시작할 때 더 많은 플라스크를 준비한다. 시험물질의 분해가 일어나는 동안 주된 산물이 휘발성인 경우, 직접적으로 $^{14}\text{CO}_2$ 측정을 실시하는 것이 권장된다. 각 측정 시점에서 내부 또는 외부의 흡수장치에 수집된 $^{14}\text{CO}_2$ 를 산성화(pH 2 ~ 3) 한 다음 측정한다.

4.4.3. ^{14}C 로 표지된 시험물질 및 주요 전환물질의 농도는 Radiochromatography(즉, Thin layer chromatography, RAD-TLC) 방법 또는 동위원소 검출이 가능한 HPLC를 사용하도록 한다.

4.4.4. 시험 종료 시, 시험 기간 동안 시료를 채취한 적이 없는 플라스크를 분리하여 직접적인 $^{14}\text{CO}_2$ 측정을 통해 물질 수지를 확인한다.

4.5. 특정 화학물질의 분석

4.5.1. 만일 감도가 높은 특정한 화학물질 분석이 가능할 경우, 일차적인 생분해도를 구하기 위하여, 동위원소 검출방법 대신 시험물질의 전체 잔존 농도를 측정한다. 동위원소로 표지된 시험물질을 사용하는 경우(전체 무기화를 측정하기 위해), 유용한 추가적인 정보를 제공하고, 절차를 확인하기 위해 특정한 분석방법을 사용할 수 있다. 화학물질 분석방법은 시험물질의 분해가 일어나는 중에 발생하는 전환물질을 측정하기 위해 사용하며, 이 방법은 시험물질의 반감기가 60일이 넘는 경우 권장된다. 매 시료채취 시간마다 시험물질 및 전환물질의 농도를 측정하고 보고한다(농도당, 처리한 물질의 %로 나타냄). 일반적으로 각 시료채취 시점에서 전환물질은 적용된 농도의 10 % 이상 검출된 경우에 동정한다. 동정을 하지 않는다면 합리적인 근거를 제시해야 한다. 시험기간 동안 꾸준히 전환물질의 농도가 증가하게 되면 이 물질의 동정이 필요하다. 농도나 위에서 나타낸 제한 농도를 초과하지 않으며 분해가 잘 되지 않음을 의미한다. 시험물질의 신속한 전환(예, 가수분해)이 일어나는 경우에는 멸균 대조군에서 전환물질에 대한 분석이 검토되어야 한다. 각각의 경우에 따라 전환물질의 동정과 정량이 필요하며, 이에 대한 합당한 근거가 보고서에 제시되어야 한다. 관련된 분석

절차에서 주어진 방법에 따라 유기용매를 이용하여 추출방법을 사용해야 한다.

4.5.2. 모든 시료는 2 °C ~ 4 °C 밀폐용기에 보관하며, 분석은 24 시간 이내에 하는 것이 권장된다. 더 긴 기간 보관하는 경우, 시료를 -18 °C 또는 화학적으로 보관한다. 시료를 산성화시켜 보관하는 것은 시료의 안정성 측면에서 권장하지 않는다. 만일 시료를 24 시간 내에 분석하지 않고 더 오래 보관하는 경우에는 저장 안정성에 대한 시험이 수행되어야 하고, -18 °C 또는 다른 저장조건에서 화학물질이 안정하다는 확인자료가 필요하다. 만일 분석 방법에 용매추출 또는 고상추출(SPE)이 포함되는 경우, 시료채취 직후 추출을 수행하거나 추출전 최대 24 시간 동안 시료를 냉장고에 보관할 수 있다.

4.5.3. 분석 방법의 감도에 따라 많은 시료 량이 필요할 수 있다. 2 L ~3 L 용량의 플라스크를 이용해 1 L의 시험용량을 수행할 수 있으므로, 이 경우에는 100 mL 까지의 시료를 채취하는 것이 가능하다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. 데이터 plot

- 1.1.1. 시료채취 시간을 날짜가 아닌 시간별로 정수로 반올림한다. 시험물질의 잔류 활성(^{14}C 표지 물질) 또는 잔류 농도(^{14}C 표지가 없는 물질)를 시간에 대하여 선형 및 반 로그(Semi-logarithmic)로 나타낸다. 물질의 분해가 일어나는 경우, F_T (시험군)를 F_S (멸균군)와 비교한다. F_T 에서의 평균값이 F_S 와 10 % 이상의 차이가 없는 경우, 관찰된 물질은 거의 생물학적으로 제거가 안되는 것으로 예상된다. 생분해율을 추산하기 위하여, F_S 의 분해율이 낮은 경우, F_T 값을 빼줌으로써 그래프를 보정한다. 주요 전환물질을 확인하기 위한 다른 분석법이 수행되는 경우, 그래프에 시험물질 자체의 감소는 물론, 해당 산물의 증가양상을 추가하도록 한다.
- 1.1.2. 직선부분을 무분해(Zero degradation)로 외삽(Extrapolate)하거나 10 % 가량의 분해 시간을 추정함으로써 분해 곡선(Semi-logarithmic plot)에서 지연기(Lag phase) 기간 t_L 을 구한다. Semi-logarithmic plot에서 시간에 따라 일차반응 속도상수, k 및

ln (잔류 ^{14}C 활성 또는 시험물질 농도)에서의 직선 회기 방법으로 표준편차를 구한다. 특히 ^{14}C 를 측정하는 경우, 전체 곡선에서 지연기가 끝나는 최초 직선 부분의 데이터만 사용하며, 불확실한 데이터에서 더욱 많은 수를 선택하기보다는 적은 수의 대표성 있는 데이터를 골라 제시한다. 여기에서 말하는 불확실성에는 측정된 잔류 ^{14}C 활성을 직접 사용할 때 발생할 수 있는 자체의 에러를 의미한다. 여기에는 만일 분해양상이 두 개의 형태로 나타나는 경우, 두 개의 상이한 속도 상수를 계산하여 나타낼 수 있다. 이와 같은 목적을 위해 분해곡선은 두 개의 다른 형태로 정의된다. Subsample을 한 플라스크에서 채취한 경우 속도 상수 k 및 반감기 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 계산을 각 반복군 플라스크에 대해 수행하며, 각 시료 채취기간에 플라스크를 모두 사용한 경우에는 이 값들의 평균값을 사용하여 계산한다. 전자의 절차를 사용하는 경우, 각 반복군에 대하여 속도 상수 및 반감기를 표준편차를 포함한 평균값을 보고해야 한다. 고농도의 시험물질이 사용된 경우, 분해곡선이 직선이 아닌 Semi-logarithmic plot의 형태로 나올 가능성이 높으며, 이 경우 일차반응은 유효하지 않다. 따라서 이 경우 반감기를 정의하는 것은 별 의미가 없다. 그러나 제한된 데이터 범위 때문에 유사일차반응을 적용할 수 있으며, 분해 반감기 DT_{50} (50 % 분해까지 소요되는 시간)을 추산할 수 있다. 그러나 DT_{50} 은 주어진 데이터에 대한 사실을 보여주는 것이므로, 선택한 데이터 범위 밖의 분해 양상에 대해서는 DT_{50} 을 사용하여 확인이 불가능하다. 통계적 계산 및 곡선의 적합을 용이하게 해 주는 소프트웨어를 사용할 것이 권장된다.

1.1.3. 특수한 화학분석 방법을 활용하는 경우, 일차 분해에 대한 속도 상수 및 반감기를 전체 무기화에 대하여 계산한다. 일차 분해가 제한된 과정인 경우, 전체 분해 과정에서 데이터 포인트를 사용할 수 있다. 이는 ^{14}C 활성의 측정에 대조하여 측정이 이루어지기 때문이다.

1.1.4. ^{14}C 표지 물질이 사용되는 경우, 시험 종료 시에 물질수지는 최초 사용한 농도에 대하여 %로 나타낼 수 있다.

1.2. 잔류 활성

시험물질에서 ^{14}C 로 표시된 부분이 분해되는 경우, ^{14}C 의 주요부분은 $^{14}\text{CO}_2$ 로 전환되며, 나머지는 시험 용기 내 미생물의 합성 및 세포의 대사에 사용된다. 따라서 완전히 “최종” 생분해는 물질의 100 %가 $^{14}\text{CO}_2$ 로 변환되는 것은 아니다. 생합성을 통하여 형성되는 ^{14}C 는 “이차 무기화”를 통하여 $^{14}\text{CO}_2$ 로 천천히 발생된다. 이 같은 이유로, 잔류 유기 ^{14}C 활성(CO_2 탈기 후 측정) 또는 시간당 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 는 분해가 마무리 된 후 “꼬림 효과(Tailing)”를 보이게 된다. 이 때문에 데이터의 역학 분석이 복잡해 질 수 있으므로(50 % 분해가 달성되기 전에 지연기가 끝나는 경우), 일반적으로 분해 속도 상수를 추산하기 위해 곡선의 시작부분만을 사용한다. 만일 시험물질이 감소하는 경우, 전체 잔류 유기 ^{14}C (분해된 부분) 활성은 항상 원래 물질에 표지된 ^{14}C 활성보다 높게 나타난다. 만일 시험물질이 일차반응을 통해 분해되는 경우, 시험물질의 지속 부분은 CO_2 로 무기화가 일어나며, ^{14}C 감소곡선(전체 유기 ^{14}C 와 시간 관계)에서 시작부분의 기울기는 시험물질의 농도에 대한 해당 곡선의 배수가 된다(더 정확히 하기 위해 ^{14}C 로 표지된 시험물질).

2. 결과의 해석

- 2.1. k값이 첨가된 농도에 독립적인 경우(계산된 k 값이 대략 시험물질의 농도차와 거의 동일할 때), 일차반응속도 상수가 사용된 시험조건은 시험 물질, 물 시료 및 시험 온도를 반영하는 것이라고 가정할 수 있다. 높은 농도의 시험물질을 사용한 경우, 일차반응을 따르지 않으므로, 데이터를 일차반응속도 상수 또는 이에 따른 반감기 분석을 위해 사용할 수 없다. 그러나 전체 무기화의 정도 및/또는 검출 및 정량정도를 확인하기 위해 높은 농도의 시험물질을 사용한 결과를 활용할 수 있다.
- 2.2. 가수분해 또는 휘발 등의 영향이 있는 경우 생물학적 분해량만을 계산하기 위하여, 전체 분해속도에서 다른 분해과정을 빼주어야 한다.
- 2.3. $^{14}\text{CO}_2$ 의 직접, 간접 측정 결과는 CO_2 에 대한 시험물질의 무기화 범위를 통하여 사용할 수 있다. ^{14}C 표지된 물질 및 주요 변형 산물의 농도분석을 위해

Radiochromatography (RAD-TLC) 또는 HPLC를 사용한다. 반감기를 직접 계산하기 위해서는 다른 주요 전환물질(사용한 시험물질 양의 10 % 이상으로 정의)이 잔존하지 않는다는 사실이 증명되어야 한다. 실제 생분해(무기화 및 생물학적 질량에 포함된 양)에 대한 이해를 돕기 위해, 시험의 종료 시 ^{14}C 의 phase 분포를 분석한다. ^{14}C 전체량에는 미생물 중량에 포함되거나 유기물에 흡착된 양 모두가 포함된다.

3. 시험의 타당성

- 3.1. 시험대조물질(Aniline 과 Sodium benzoate)이 2 주 이내에 분해되지 않는 경우 재확인을 위해 다른 지표수 샘플을 이용해 재시험을 수행한다.
- 3.2. 시험의 종료 시 전체 회수율(Mass balance)은 동위원소 표지군에서 90 % ~ 110 %이어야 하며, 비표지 물질의 회수율은 70 % ~ 110 %여야 한다. 이 범위는 목표로서 해석되어야 하고, 시험의 허용 기준으로 이해해서는 안 된다.

4. 시험결과의 보고

결과 보고서에는 시험의 종류(즉, Pelagic 또는 부유침전물 시험 여부)를 반드시 기재해야 하고 다음과 같은 사항을 기재한다.

4.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

4.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

4.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

4.4. 시험물질 및 참고 물질

- 일반명, 화학물질명(IUPAC명명 및/또는 CAS명), CAS 번호, 구조식(또는 ^{14}C 의 위치) 및 시험물질, 참고물질의 물리·화학적 성상
- 전환물질의 정량 및 동정시 사용한 표준품의 일반명, CAS명, CAS 번호, 구조식(또는 ^{14}C 의 위치) 및 물리·화학적 성상
- 시험 물질 및 시험대조물질의 순도(불순물 함유도)
- 동위원소 표지 물질의 동위원소 순도 및 비활성도(Specific activity)

4.5. 지표수

- 오염 기록을 포함한 시료 채취 장소에 대한 세부사항
- 시료 채취 날짜 및 시간, 영양분(총질소, 암모니아, Nitrate, nitrite, 총인, 용해된 Orthophosphate)
- 채취 깊이
- 시료의 외관 (예, 색깔 및 탁도)
- DOC, TOC, BOD
- 채취 장소의 온도 및 pH, 채취시간
- 산소 또는 산화/환원전위 (호기성조건이 명확하지 않은 경우 반드시 보고)
- 염도 또는 전도성 (해수 및 반염수의 경우)
- 부유물 (탁한 샘플을 사용하는 경우)
- 시료 채취 시 채취 장소에 대한 다른 관련된 정보(예, 강의 유속 또는 해수의 이동율, 주요 배출 및 배출의 형태, 샘플 채취 시 날씨 조건 등)

4.6. 선택적 기재 사항

- 미생물량 (예: Acridine orange 직접 측정 또는 콜로니형성 단위)
- 무기 탄소
- 조류 생물량 평가방법으로서의 클로로필-a 농도

4.7. 부유 퇴적물 시험 수행시 기재 사항

- 퇴적물 채취 깊이
- 퇴적물의 외관 (색깔, 진흙, silt, 모래 등)
- 조성 (예, % Coarse sand, Fine sand, Silt, Clay 등)
- 부유고형물(SS)의 건중량(g/L), 유기물 측정을 위한 TOC농도 또는 작열감량
- pH
- 산소 또는 산화/환원 전위 (호기성 조건이 명확하지 않은 경우 반드시 보고)

4.8. 시험조건

- 시료채취와 시험 사이의 시간차, 시료 보관여부(조건) 및 시험수행을 위해 처리

한 시료의 전처리 과정

- 처리한 시험물질의 양, 시험물질 및 참고 물질의 농도
- 사용한 용매 및 시험물질 처리방법
- 지표수 및 퇴적물의 용적(사용한 경우), 각 시료채취 시간당 채취 시료량
- 사용된 시험 시스템의 세부사항. 만일 압 조건이 유지되지 않은 경우, "어두운 빛"으로 보고
- 멸균 대조군을 만들기 위해 사용한 방법(예, 멸균을 실시한 온도, 시간, 회수)
- 배양 온도
- 동위원소 측정 및 물질수지 확인, 상분포 측정을 위해 사용한 분석기술 및 방법
- 반복 수

4.9. 결과

- 회수율(%)
- LOD 및 LOQ를 포함한 분석방법의 재현성 및 감도
- 모든 측정된 데이터(시료 채취 시점 포함) 및 계산 값을 표 및 분해 곡선 형식으로 제공. 각 시험 농도 및 각 반복군 플라스크에 대하여 로그 플롯을 통한 기울기의 선형 비례계수, 추산된 지연기 및 일차반응 또는 유사일차반응속도 상수(가능한 경우) 및 분해 반감기(일반 반감기, $t_{1/2}$)
- 각 반복군에서 측정된 수치의 평균값, 예를 들어 지연기, 분해속도 상수 및 분해 반감기(또는 $t_{1/2}$)
- 분해 곡선의 외향 및 시험 농도에 대한 가능한 영향을 감안하여 적합 또는 비적합의 범주 구분
- 최종 물질수지 확인 및 상분포 측정 결과 (있는 경우)
- ^{14}C 의 무기화 양 및 특수분석 방법이 사용된 경우, 일차분해의 최종수준
- 적용 가능한 경우, 주요 전환물질의 동정, 몰 농도 및 % 농도
- (필요한 경우) 물질의 제안된 전환관련 경로
- 결과의 논의