

Stenotrophomonas maltophilia에 의한 폭약 2,4,6-Trinitrotoluene의 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인

김 영 진 · 이 명 석 · 조 윤 석 · ¹한 현 각 · ²김 승 기 · † 오 계 현
순천향대학교 생명과학과, ¹순천향대학교 화학공학과, ²한국과학기술연구원
(접수 : 1999. 3. 15., 게재승인 : 1999. 5. 27.)

Effect of Various Physicochemical Factors on the Biodegradation of Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene by *Stenotrophomonas maltophilia*

Young-Jin Kim, Myung-Seok Lee, Yun-Seok Cho, Hyun-Kak Han¹, Seungki Kim², and Kye-Heon Oh†
Dept of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea
¹Dept of Chemical Engineering, Soonchunhyang University, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea
²Bioanalysis and Biotransformation Research Center, KIST, Seoul, 130-650, Korea
(Received : 1999 3 15., Accepted : 1999 5 27.)

The relationships between the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and several relevant physicochemical environmental parameters were examined. At neutral pH of the cultures, the degradation of TNT proceeded to completion, whereas only about 50% of TNT was utilized when the cultures were adjusted to acidic pH. The effect of various co-substrates (e.g., glucose, fructose, acetate, citrate, succinate) on the degradation of TNT by the test culture of *S. maltophilia* was evaluated. The results indicated that, among the various co-substrates studies, the test culture that received 2 mM fructose degraded 100 mg/L of TNT completely within 20 days of incubation at ambient temperature, whereas partial degradation of TNT was observed in the test culture with acetate, citrate, or succinate as a co-substrate, respectively. In fact, fructose was the best co-substrate for TNT degradation in this experiment. The effect of supplemented nitrogens [e.g., (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, urea] on the TNT degradation was monitored. All supplemented nitrogens in this study were inhibitory to TNT degradation. Addition of 1% Tween80 accelerated TNT degradation, and showed complete degradation of TNT within 8 days of incubation. Addition of yeast extract resulted higher growth yields, based on turbidity measurement, but it inhibited TNT degradation.

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), biodegradation, co-substrate

서 론

질소 방향족 화합물(nitroaromatic compounds)은 폭약, 염료, 중합 첨가제, 농약, 의약품 등 다양한 용도로 최근 산업적 중요성이 크게 대두되고 있으며, 대량 생산과 소비로 인한 환경생태계에 대한 피해가 보고되어 왔다(1,2). TNT(2,4,6-trinitrotoluene)는 폭약의 주요 성분으로서 여러 나라에서 국지적 전쟁이나 군사 훈련의 목적으로 막대한 양이 사용되어왔다. 제 2차대전이 끝난 후에 여러 국가에서는 수십 만 톤의 사용할 수 없는 TNT를 포함하는 재래식 폭약들을 환경에 미치는 영향이 고려되지 않은 채 해양투기, 지하매장, 또는 노천소각 등을 통해 폐기 처리되어왔다(3). TNT는 세계도처에서 군사적 목적

으로 이용되는 과정에서 토양오염과 수질오염의 문제가 대두되고 있으며, 많은 폭약제조공장에서 생산되는 TNT를 포함하는 폐수는 물리화학적으로 처리하여 pinkwater의 상태로 배출되고 있다. TNT는 구조적으로 매우 안정한 화합물로서 자연계에서 분해가 어려운 난분해성 물질이므로 토양에 장기간 지속되어 토양 생태계를 오염시키며, 특히 이들 화합물 관련 시설주변의 수 생태계에 커다란 문제를 일으킨다(4). 토양에 잔존하는 TNT는 지하수로 침출되어 식수오염으로 인간에게 있어서 건강상 문제의 원인이 되기도 한다(5). 수 생태계에 TNT가 미치는 영향은 녹조류, copepods, 조개류 등에 치명적인 것으로 알려져 있고(2), 이런 TNT에 오염된 생산자물 소비하는 1차 소비자는 먹이 연쇄를 통하여 각각 생물체에 농축되어짐이 보고되었다(6). 미국 환경보호청의 보고에 의하면 21 개월 동안 매일 2 mg 이상의 TNT가 투여된 설치류에서 신장의 색소퇴적물 증가와 골수의 섬유조직 과다증식(bone marrow fibrosis), 체중 감소증, 비정상적인 세포분열 등을 유발하며(7), 이와 같이 돌연변이 유발물질로서 생태계에 대한 독성효과로 인하여 TNT를 우선처리대상 화합물(priority pollutants)로 분류해 관리해 오고 있다(8).

† Corresponding Author Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan-si, Chung-Nam 336-600, Korea
Tel 0418-530-1353, Fax : 0418-530-1350
e-mail : kyeheon@asan.sch.ac.kr

환경오염원으로서 TNT의 미생물학적 처리방법에 대해 많은 연구가 시도되어왔다. TNT 분해능을 가진 일부 미생물이 분리되었으며 이들을 이용한 TNT 생분해에 관련된 연구가 보고되고 있다. 미생물에 있어서 세균뿐 만 아니라 진균류에 의한 분해와 분해기작에 관한 연구가 일부 보고되었다. TNT의 미생물학적 분해에 대하여 가장 많은 연구는 백색부후균(white-rot fungus)인 *Phanerochaete chrysosporium*이며(9-13). 세균에 의한 TNT 분해에 관한 연구는 *Pseudomonas fluorescens* (14-16), *Enterobacter cloacae* PB2(17,18), *Desulfovibrio* sp(19), *Serratia marcescens*(20) 등이 보고되었다.

TNT는 호기적 또는 혐기적 조건에서 생분해될 수 있음이 알려져 있으며 분해경로는 몇가지 다른 기작이 제안되어 있으나 명백히 규명되어 있지 않다. 다만 분해과정의 초기단계에서 TNT의 치환기인 니트로기가 아미노기로 환원되어 2-amino-4,6-dinitrotoluene (2-ADNT), 4-amino-2,6-dinitrotoluene(4-ADNT), 2,4-diamino-6-nitrotoluene(2,4-DANT), 2,6-diamino-4-nitrotoluene 등의 중간대사물질이 탐침되었다(20-23). *Pseudomonas fluorescens*에 의한 TNT 분해경로는 방향족 고리에 존재하는 니트로기의 환원 반응이 일어나 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene로 환원된 후, 아미노기로 치환된 2-ADNT와 2,4-DANT 등이 중간산물로 형성되어지고, 이렇게 형성된 중간대사산물은 일련의 분해과정을 거쳐 phloroglucinol과 pyrogallol 등을 형성한다는 기작이 제안되었다(9) *Desulfovibrio* sp.(b strain)에 의한 분해경로를 통해 TNT의 방향족 고리에서 니트로기가 아미노기로 치환된 후, 방향족 고리에서 탈아미노현상으로 폴루엔을 형성한다고 제안되었고(18), 또 다른 연구에서 두 종의 *Pseudomonas* hybrid strain 인 C1S1과 clone A를 이용하여 TNT의 니트로기가 제거되어 중간대사 산물로 2,4-dinitrotoluene와 2-nitrotoluene이 생성된다는 새로운 분해경로가 제안되었다(16). Triazine계 제초제에서 농화분리된 *Stenotrophomonas maltophilia*에 의한 TNT의 생분해 과정에서 2-ADNT와 4-ADNT가 HPLC와 GC-MS에 의하여 각각 탐침 및 동정되었다(24) TNT의 분해에 있어서 *Serratia marcescens*을 이용한 TNT 분해 연구에서 계면활성제와 benzyl alcohol 등을 첨가하여 효율적인 효과를 얻기 위하여 연구를 하였다(25). 최근까지 토양 미생물에 의한 TNT 분해에 대한 연구가 생화학이나 유전학적 측면에서 연구가 되어왔으며, TNT를 생산하는 과정에서 방출되는 폐수의 생물학적 적용에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구에서는 산업적 적용을 위한 목적으로 TNT를 분해하는 순수 배양 균주를 분리하여 동정하고, TNT 분해에 미치는 여러 가지 물리화학적 요인들에 대한 영향을 조사하여 분해의 최적조건을 확립함으로써 효과적인 TNT의 미생물학적 처리가 능성에 대하여 알아보려고 하였다

재료 및 방법

순수배양균주의 확보 및 배양조건

본 실험에서 사용된 균주는 s-Triazine계열의 농약인 atrazine에 오염된 토양으로부터 농화분리된 세균으로서 TNT의 분해를 위하여 적용되었다. 증류수 1 리터에 K_2HPO_4 10 mM, $MgSO_4$ 1 mM, NaH_2PO_4 5 mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

10 mg, $MnCl_2$ 100 mg, $ZnSO_4$ 0.01 mg에 TNT를 100 mg를 첨가한 배지를 기본배지(basal medium)로 설정하고, 여기에 보조기질(co-substrate)로서 glucose 2 mM를 첨가하여 생장배지(growth medium)로 사용하였다(24). 배지는 1N NaOH을 이용하여 7.2로 조절한 후 121°C에서 15분간 고압멸균하였다. 순수 배양균주의 접종은 사용배지의 10%를 접종하고 진탕 혼합 배양기에서 배양(30°C, 150 rpm)하였다. 배지내의 순수 배양 균주 생장은 분광광도계(V-550 UV/vis Spectrophotometer, Jasco Co, Japan)를 사용하여 파장 660 nm(A_{660})에서 흡광도를 측정하였다

TNT 분해능 측정방법

배지내에 존재하는 TNT는 HPLC에 의하여 측정되었다. 사용된 HPLC 시스템은 SPD-10A UV/vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 제품을 사용하였다. 사용 컬럼(column)은 Du Pont사의 ZORBAX ODS 컬럼(250 mm × 4.6 mm, 입자크기 5 μ m)을 사용하였고, HPLC의 작동조건은 time scale 20, LC time 45 min, attenuate 7, wavelength 254 nm, mobile phase의 flow rate은 1.0 ml/min 이었다. Mobile phase는 HPLC용 이소프로판올(Fisher Scientific Co.)과 증류수(EM Science Co.)를 1 : 4의 비율로 혼합하여 사용하였다. TNT 표준품 제조는 분석용 TNT를 각각 100 mg, 50 mg, 25 mg, 10 mg, 5 mg, 2 mg을 증류수 1L에 녹이고 이 표준품을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 제조된 TNT 표준용액은 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 20 μ l Hamilton syringe를 이용하여 HPLC 인젝터 내로 주사하였다. TNT 분해능을 측정하기 위하여 배양액으로부터 채취한 시료는 3,500 × g에서 10분간 원심 분리한 후, HPLC용 증류수에 적당한 비율로 희석하여 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 분석하였다.

TNT 분해균주의 특성과 동정

TNT를 분해하는 혼합배양 균주로부터 분리된 TNT 분해균주는 Luna-Bertani 고체배지 상에 도달하여 단일 집락 형성여부와 집락의 형태 등을 관찰하였으며 그람 염색을 하여 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 분리세균에 대한 생리학적 특성조사도 병행 실시하였다. 분리세균은 Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph를 이용한 Microbial Identification System에 의하여 동정되었는데(26), 사용된 컬럼은 HP Ultra 2 fused-silica capillary column이었으며 carrier gas로는 수소를 사용하였다.

TNT분해에 영향을 미치는 환경요인

분리균주가 TNT의 분해에 미치는 물리화학적 환경요인들에 의한 영향을 주어진 조건하에서 균주의 생장과 분해율을 조사하여 비교하였다. TNT의 분해에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 H_2SO_4 및 NaOH로 6.4, 7.2, 8.0으로 조절된 배지내에 10%의 순수배양 균주를 접종한 후 배양하여 균주의 생장과 TNT 분해를 조사, 비교하였다. TNT의 분해실험에 사용되는 기본배지에 보조기질로서 glucose 대신에 fructose, acetate, citrate, succinate 등을 각각 2 mM씩 첨가하여 TNT의 분해에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 보조기질이 부가되지 않은 경우와 부가된 경우에 TNT의 분해에 미치는 영향에 대하여 비교

하였다 TNT의 분해에 대한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 TNT를 포함하는 배지에 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, 그리고 urea를 각각 10 mM씩 첨가하여 질소원의 첨가에 따른 TNT 분해능을 각각 비교, 분석하였다. 부가영양물로서 효모 추출물(yeast extract)을 첨가하여 TNT의 분해에 미치는 영향을 관찰하였다. TNT를 포함하는 배지에 150 mg/l의 효모 추출물을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 비교하여 배양의 성장과 TNT 분해능을 각각 비교 분석하였다. 계면활성제인 Tween 80을 첨가하여 배양균주가 TNT의 분해에 미치는 영향을 관찰하였다. TNT를 포함하는 배지에 1 ml/l의 Tween 80을 첨가하고 첨가하지 않은 것과 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

TNT 분해균주의 분리과 동정

TNT의 생분해에 관한 물리화학적 요인들에 대한 연구를 위하여 토양으로부터 농화배양하여 얻은 TNT를 이용하는 세균을 분리하여 사용하였으며 계속적인 실험을 위하여 30℃, 분당 150회 회전하는 회전 교반기에서 진탕배양하여 유지시켰다. 배양중에 균주의 대수기를 식별하여 새로운 배지에 연속 계대배양시켜 실험에 필요한 양을 확보하고 일부는 추후의 실험을 위하여 -70℃에서 냉동보관하였다.

분리된 TNT를 분해하는 순수배양 균주의 형태학적 분석을 위해 그람 염색을 하였다. 위상차 현미경으로 관찰한 결과 짧고 둥근 간균(coccobacillus) 형태를 나타내었으며 그람음성을 나타내었다. 집락의 색깔은 옅은 노란색이었고 불투명하였다. 그러나 TNT를 포함하는 고체배지상에서의 집락은 점차 갈색을 나타내

Table 1. Morphological and Physiological characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia*.

Morphological characteristics	
Gram staining	Negative
Cell shape	Coccobacillus
Physiological characteristics	
Indole	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	+
H ₂ S (KIA)	-
Lithmus milk(peptonization)	-
Chrntensen's urease	-
MacConkey agar	Growth
Phenylalanine deaminase	-

+, positive reaction ; -, negative reaction

었다. 다양한 생리화학적 실험을 실시하였으며 그 결과는 Table 1에 요약되었다.

분리된 TNT 분해세균은 세포막에 포함된 지방산의 조성을 GC로 분석하고, 분석결과는 TSBA version 3.9(Standard library)와 비교 분석하여 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었다.

분해균주에 의한 TNT 분해

*S. maltophilia*에 의한 TNT 분해와 균주의 성장, 그리고 배양기간중의 pH 변화를 관찰하였다 배지내의 TNT의 농도는 100 mg/L이고, 초기 pH는 7.2였다 (Figure 1). 배양 4일에서 8일 사이에 TNT가 크게 제거되었으며 배양 28일만에 완전히 제거되었다 배지내의 pH는 초기 pH 7.2에서 배양이 진행됨에 따라 서서히 증가하여 최종 pH 측정결과 7.4로 나타났다. 세균의 생장은 배양 4일부터 12일 사이에 급격히 증가하였으며, TNT 분해의 시작은 배양 후 2일부터 서서히 시작되어 대수기인 배양후 4일부터 배지내의 잔존 TNT 농도가 급격히 감소되었다.

TNT 분해에 미치는 환경요인

(1) pH의 영향

*S. maltophilia*를 이용한 TNT 분해에 있어서 최적 pH를 알아보기 위하여 초기 pH를 각각 변화를 주어 분해와 성장에 미치는 영향을 관찰하였다 (Figure 2). 초기 pH를 6.4, 7.2, 8.0으로 조정하여 각각 분해능을 관찰한 결과 초기 pH가 6.4인 경우에는 TNT 분해능에 있어서 50%이하의 저조한 분해를 나타내었으며, 균주의 성장에 있어서도 낮은 성장률이 관찰되었다. 반면 초기 pH 7.2의 경우에는 28일동안 완전분해를 나타내었으며 pH 8.0인 경우에는 80%의 분해능을 나타내었다. 비교적 *S. maltophilia*는 성장과 TNT 분해를 하는데 있어서 배지내의 pH 환경이 약 산성상태보다는 약 알칼리상태에서 적응능력이 높았으며 분해에 있어서도 효과적인 것으로 분석되었다. 약 염기성 상태에서의 분해능 증가요인은 TNT의 분해과정 중 생성되는 탈 아미노 현상에 의해 배지내의 환경이 약 염기성 상태로 변화함으로써 배지의 초기 pH가 약 산성 상태에서보다 균주의 성장과 분해가 활발하게 나타난 것으로 보인다.

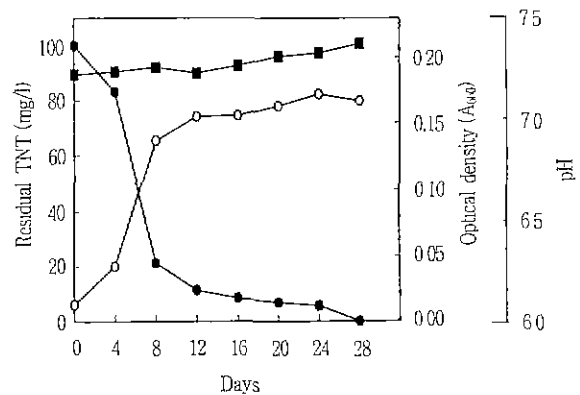


Figure 1. Degradation of TNT(●) by the culture of *S. maltophilia* and the associated changes in optical density at 660 nm(○) and pH (■).

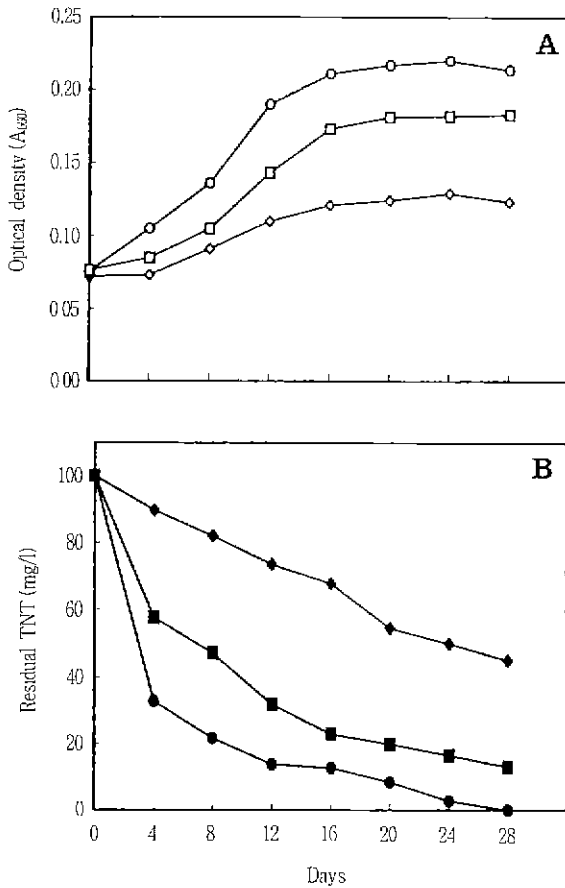


Figure 2 Growth of the culture of *S. maltophilia* (A) and the degradation of TNT (B). The media were adjusted at pH 6.4(◇,◆), 7.2(○,●), and 8.0(□,■), respectively.

(2) 보조기질의 종류에 따른 영향

TNT에 있어서 보조기질의 첨가에 의한 분해를 관찰하기 위해 배지내에 보조기질로서 각각 glucose, fructose, citrate, acetate, succinate 등을 첨가하여 TNT 분해에 미치는 영향을 비교분석하였다 (Figure 3). 보조기질로서 glucose가 첨가된 배지상에서 28일동안 TNT의 완전분해를 나타내었다. Glucose 대신에 fructose를 첨가한 경우 동일 농도의 TNT는 16일만에 완전분해를 나타내었다. Glucose의 첨가에 비해 acetate가 첨가된 것은 TNT 분해에 있어서 분해능이 현저하게 저하됨이 관찰되었다. Acetate의 첨가는 성장률에 있어서 다른 보조기질에 비해 대수생장기에 도달하는 시간이 길게 나타났으며 분해능에 있어서도 28일동안 48% 정도 분해하는 결과를 나타내었다. 또한 citrate가 보조기질로 첨가된 경우는 28일 동안 82%의 분해를 나타내었으며 succinate의 경우는 배양기간 28일 동안 65%의 TNT 분해를 나타내었다. 보조기질을 첨가하지 않은 경우에 배지내의 TNT는 거의 분해가 되지 않았는데 이러한 결과로 미루어보아 분리된 *S. maltophilia*에 의한 TNT의 분해는 cometabolism에 의한 분해로 사료된다. 이 결과는 혼합배양에서 glucose와 같은 보조기질의 첨가에 의한 TNT의 cometabolism 보고와 일치하였는데(27), cometabolism은 미생물이 성장을 위하여 동화할 수 있는 탄소나 에너지 또는 다른 영양물질의 유도함이 없이 특별한 화합물을 변화시킬 수 있는

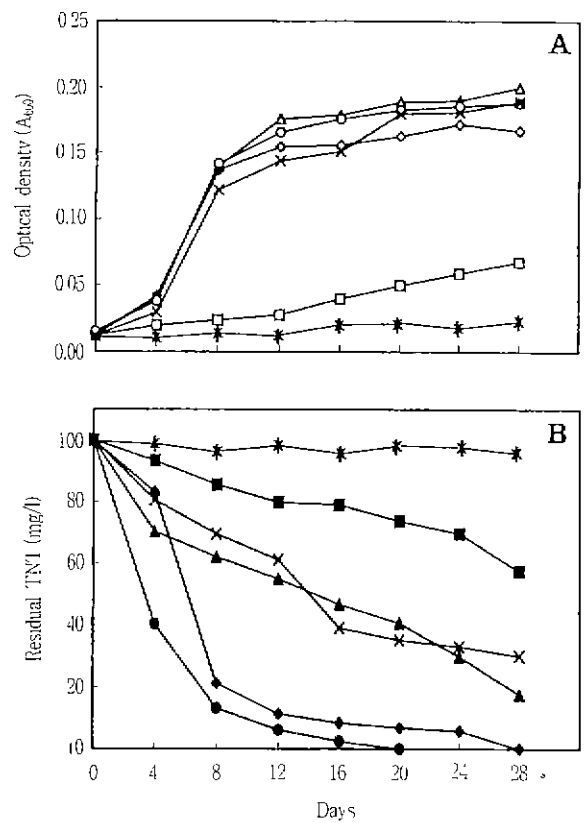


Figure 3. Growth of the culture of *S. maltophilia* (A) and the degradation of TNT degradation curve (B) in the presence of co-substrate - 2 mM each of glucose (◇,◆), fructose (○,●), citrate (△,▲), succinate (×,×), and acetate (□,■). No co-substrate was added in the medium (*,*).

물질대사로서 이 실험에서 사용된 여러 가지 보조기질은 cometabolite로서 작용되는 것으로 판단된다.

(3) 질소원에 대한 TNT의 분해효과

질소원으로 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 그리고 urea를 배지에 첨가하여 TNT의 분해에 미치는 영향을 조사하였다 (Figure 4). 질소원이 첨가된 배지에서 배양 초기에 TNT 분해세균인 *S. maltophilia*의 생장은 질소원을 첨가하지 않은 배지에서의 성장에 비하여 왕성하였으나 TNT의 분해는 배양기간이 지속됨에 따라 감소하여 28일간의 배양기간동안 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 그리고 urea에서 각각 약 75%, 78%, 90%의 부분분해가 관찰되었다. 그러나 질소원이 전혀 첨가되지 않은 TNT를 포함하는 배지에서 28일 이내에 TNT는 완전 분해되었다. 한 분자의 TNT에는 치환기로서 세 개의 니트로기를 포함하는데 세균에 의한 생분해가 진행되는 동안 아미노기로 전환되어 배지내에 유리되어 이를 세균생장을 위한 질소원으로 이용되기 때문이다. 별도의 질소원 첨가는 초기의 세균생장에는 다소 도움이 되나 결국 배지내에 과량의 암모니아가 존재하여 오히려 TNT 분해에는 효과적이지 못한 것으로 사료된다.

(4) 효모 추출물(Yeast extract)의 농도에 따른 영향

부가 영양물로 효모 추출물의 첨가에 따른 TNT의 분해능과

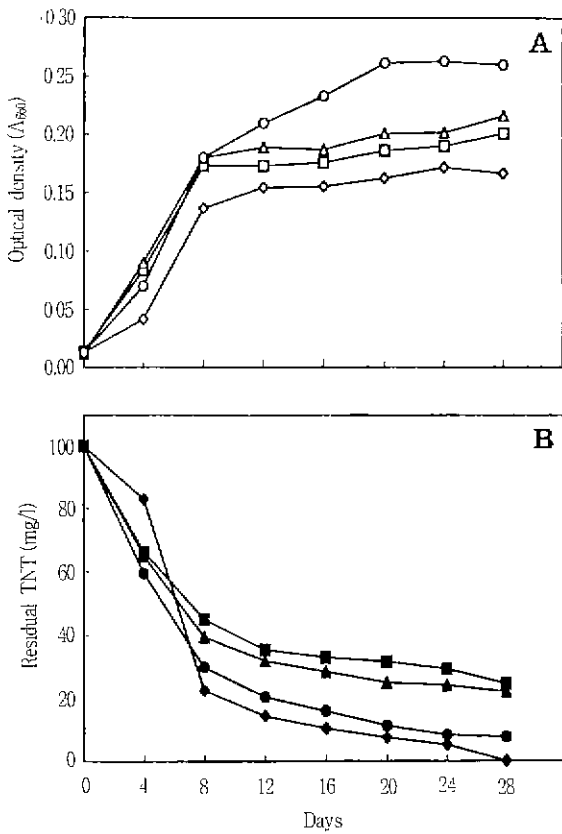


Figure 4. Growth of the culture of *S. maltophilia* (A) and the degradation of TNT (B) in the absence of nitrogen source(◇,◆) and in the presence of nitrogen source, (NH₄)₂SO₄(△,▲), NH₄Cl(□,■), urea(○,●) of 2mM per liter

본해 균주의 성장 정도를 알아보았다. 같은 배양 조건에서 효모 추출물 150 mg을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 비교, 관찰하였다 TNT를 탄소원과 에너지원으로 사용하는 미생물에 있어서 효모 추출물을 이용하여 배양 4 일째부터 급격한 성장을 나타내었지만 TNT분해능에 있어서는 효모 추출물이 첨가되지 않은 것에 비해 낮은 분해능을 나타내었다 (Figure 5). 효모 추출물이 첨가되지 않은 것은 28일만에 완전 분해를 나타내었고, 효모 추출물이 첨가된 것은 28일 동안 80%정도의 분해를 나타내었다. 이는 TNT의 분해로 인한 에너지원의 이용보다 더 이용하기 쉬운 효모 추출물의 여러 가지 미생물의 성장인자 (growth factor)를 이용한 것으로 사료되며 이들로 인한 대사작용의 활성화로 인해 배양균주의 생장은 크게 증가하였으나, TNT 분해능은 저하되었다. 폐녹시계 계초제인 2,4-D나 MCPA와 화합물의 생분해에서 효모 추출물을 첨가한 경우 분해능이 크게 향상되는 것으로 알려져 있으나 (28,29), TNT의 분해에서 효모 추출물의 첨가는 TNT 자체가 치환기로서 가지고 있는 니트로기가 아미노기로 환원되면서 이것이 질소원으로 사용되기 때문에 별도의 질소원 첨가는 TNT의 분해에 오히려 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다.

(5) Tween 80에 의한 영향

부가 첨가물로서 계면활성제인 Tween 80을 TNT가 포함된

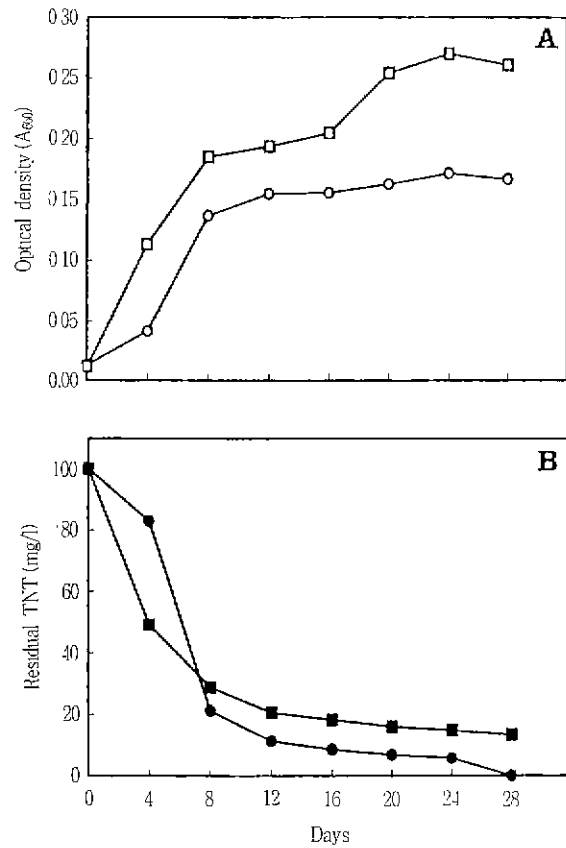


Figure 5. Growth of the culture of *S. maltophilia* (A) and the degradation of TNT (B) in the absence of yeast extract (○,●) and in the presence of 150 mg of yeast extract(□,■) per liter.

배지에 첨가하여 계면활성제가 첨가되지 않은 상태와 비교하여 TNT 분해에 미치는 영향을 비교, 관찰하였다 (Figure 6). Tween 80이 첨가된 것은 첨가되지 않은 것에 비해 현저한 차이를 나타내었다. TNT 분해 균주의 생장률은 배양후 8일까지 급격한 증가를 나타내었으며, TNT 분해에 있어서는 8일만에 완전분해를 나타내었다. 이런 결과는 TNT의 용해도가 매우 낮기 때문에 계면활성제를 첨가하였을 경우 물에 대한 용해도를 높여주어 bioavailability를 향상시키고, TNT 분해 균주의 세포막 형태를 느슨한 구조로 변화시켜 세포내로 TNT의 도입을 증진시켜주는 역할을 하는 것으로 판단된다 본 연구에서 얻어진 결과는 *Serratia marcescens*에 의한 Tween 80의 첨가에 따른 TNT 분해증진 효과와 일치하였다(24)

난분해성 유기화합물로서 TNT의 생산공정으로부터 발생하는 폐수와 폐기물, 그리고 군사목적으로 사용되는 TNT에 의하여 토양과 수계가 오염되는 상황에서 처리비용의 절감과 물리화학적 처리에 의하여 파생되는 이차 환경오염의 문제점을 극복하기 위한 방법으로 미생물학적 처리의 가능성에 대해 연구하였다. TNT의 분해능을 가진 세균을 분리하여 효율적인 TNT 제거를 위한 여러 가지 물리화학적 환경요인이 미치는 영향에 대하여 조사하였으며 이러한 연구를 토대로 TNT 제거에 최적화를 위한 조건을 확립하였다 본 연구는 환경을 오염시키는 난분해성 물질로서 TNT의 효율적 제거를 위한 실험으로서 생물

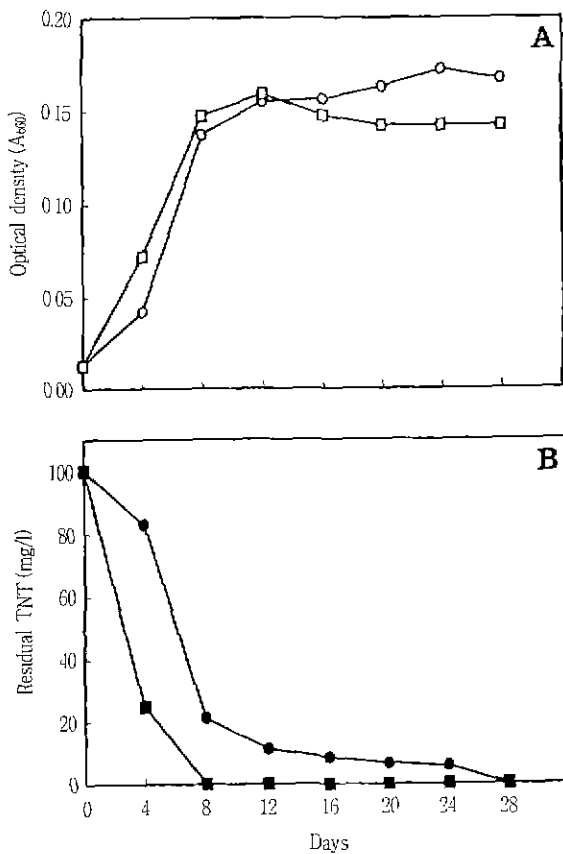


Figure 6. Growth of the culture of *S. maltophilia* (A) and the degradation of TNT (B) in the absence of additional Tween 80 (○, ●) and in the presence of 1 ml of Tween 80 (□, ■) per liter.

분해(biodegradation)나 생물 복원(bioremediation)의 형태로서 널리 사용될 균주를 확보하고 나아가 분자유전학적인 접근과 병행하여 분해능이 증진된 균주 개발 및 환경오염 모니터링 시스템(environmental pollution monitoring system) 개발을 위하여 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

TNT의 미생물학적 제거의 일환으로, 토양에서 분리된 *Stenotrophomonas maltophilia*에 의한 TNT의 분해와 물리화학적 요인과의 상호관계에 대하여 조사하였다. 중성 pH의 배양에서 TNT는 완전분해를 나타내었으나 산성 pH로 조절되었을 때 TNT의 약 50%만이 이용되었다. *S. maltophilia*의 배양에 의한 TNT의 분해에 보조기질(예, glucose, fructose, acetate, citrate, succinate)이 미치는 영향에 대하여 조사하였으며 그결과 여러 가지 기질 가운데 2 mM의 fructose가 포함된 배양은 주어진 온도에서 20일 이내에 100 mg/L의 TNT를 완전히 분해하였다. 반면에 보조기질로서 acetate, citrate, succinate가 부가된 배양에서 TNT는 일부만이 분해되었다. 본 실험에서 fructose는 TNT 분해에서 가장 좋은 보조기질이였다. TNT 분해에 대한 부가 질소원 [예, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, urea]의 효과에

대하여 조사하였으며 모든 부가 질소원은 TNT 분해에 억제효과를 나타내었다. 1% Tween 80의 부가는 TNT 분해를 촉진시켰으며 8일이내에 완전분해를 나타내었다. 호모 추출물의 부가로 혼탁도 측정에서 높은 성장을 나타내었으나 TNT 분해는 억제하였다

참 고 문 헌

- Rieger, P. G. and H. J. Knackmuss (1995). Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. Biodegradation of nitroaromatic compounds (J. C. Spain ed), pp. 1-18, Plenum Press, New York.
- Yinon, J. (1990), Toxicity and metabolism of explosive, 1st ed. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Comfort, S. D., P. J. Shea, L. S. Hundal, Z. Li, B. L. Woodbury, J. L. Martin and W. L. Powers (1995), TNT transport and fate in contaminated soil *J. Environ. Qual.* 24, 1174-1182
- Won, W. D., S. H. DiSalvo and J. Ng (1979), Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 576-580.
- Pereira, W. E., D. L. Short, D. B. Mangold and P. K. Ross (1979), Isolation and characterization of TNT and its metabolites in groundwater by gas chromatography-mass spectrometer-computer techniques. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 554-562.
- Sabatini, D. A., R. C. Knox and J. H. Hawell (1995), Surfactant-enhanced subsurface remediation, ACS Symposium Series 594.
- Johnson, L. R. Light enhanced toxic/tumorigenic potential of trinitrotoluene (TNT) and analog, Ph.D Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois.
- Keith, L. H. and W. A. Telliard (1979), Priority pollutants, *Environ. Sci. & Technol.*, 13, 416-423.
- Bumpus, J. A. and M. Tatarco (1994), Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. *Curr. Microbiol.* 28, 185-190
- Fernando, T., J. A. Bumpus and S. D. Aust (1990), Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 175, 1666-1671.
- Spiker, J. K., D. L. Crawford and R. L. Crawford (1992), Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT on explosive-contaminated soils by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3199-3202.
- Stahl, J. D. and S. D. Aust (1993), Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 477-482.

- 13 Stahl, J. D. and S. D. Aust (1995), Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biodegradation of nitroaromatic compounds (J. C. Spain, ed), p. 117-133, Plenum Press, New York.
14. Schackmann, A. and R. Muller (1991). Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 809-813.
15. Boopathy, R., C. F. Kulpa, J. Manning and C. Kulpa (1994), Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions. *Curr Microbiol.* **28**, 131-137
- 16 Duque, E., A. Haidour, F. Godoy and J. L. Ramos (1993), Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *J. Bacteriol.* **175**, 2278-2283.
17. Christopher, E. F., N. Stephen and C. B. Neil (1998), Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase, *Appl Environ. Microbiol.*, **64**, 2864-2868
18. Boopathy, R., C. F. Kulpa and M. Wilson (1993), Metabolism of TNT by *Desulfovibrio* sp.(b strain). *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 270-275.
19. Bryant, C., L. Hubbard and W. D. McElroy (1991), Cloning nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4126-4130.
20. Funk, S. B., D. J. Robert, D. L. Crawford and R. L. Crawford (1993), Initial-phase optimization for biodegradation of munition compound-contaminated soils. *Appl Environ. Microbiol.*, **59**, 2171-2177.
21. Gilcrease, P. C. and V. G. Murphy (1995), Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic condition. *Appl Environ. Microbiol.*, **61**, 4209-4214.
22. Walker, J. R. L. and B. G. Taylor (1993), Metabolism of phloroglucinol by *Fusarium solani*. *Arch Microbiol.*, **134**, 123-126.
23. Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J. Spain and H. J. Knackmuss (1998), Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl Environ. Microbiol.*, **64**, 246-252.
24. Oh, K. H. and Y. J. Kim (1998), Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by s-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil, *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **61**, 702-708.
25. Montpas, S., J. Samson, É. Langlois, J. Lei, Y. Piché and R. Chênevert (1997), Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. *Biotech Lett.* **19**, 291-294.
26. Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi and K. Schleifer (1994), Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 792-800.
27. Boopathy, R., C. F. Kulpa, J. Manning and C. D. Montemagno (1994), Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by co-metabolism with co-substrates: a laboratory-scale study. *Biores Technol.* **47**, 205-208.
28. Oh, K. H. and Y. S. Kim (1994), Biodegradation of the commercial phenoxy herbicide 2,4-D by microbial consortium, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 469-474.
29. Oh, K. H., S. K. Ahn, K. H. Yoon, Y. S. Kim, (1995), Biodegradation of the phenoxy herbicide MCPA by microbial consortium isolated from a rice field, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 539-545.