한국지하수토양환경학회 추계학술발표회
2002년 9월 13일~14일 부 산 대 학 교

토착미생물을 이용한 TNT(2,4,6-Trinitrotoluene)의 생물학적분해

배범한 · 유경민 · 장윤영* · 이인숙**
경원대학교 토목환경공학과, 광운대학교 환경공학과, 이화여자대학교 생태학과***

요약문

Microorganisms were isolated from military shooting site. Aerobic batch reactor and resting cell condition experiments were carried out using isolated microorganisms. Experiments were examined at room temperature on shaker and ten-roll mixer. During 10 days of reaction time, TNT was degraded 15.51~22.47 mg/L from initial concentration(31±1 mg/L) by aerobic batch reactor. Aerobic resting cell condition experiments were carried out in phosphate buffer with 58(±1) mg/L TNT at pH of 6.0(±0.2). TNT was degraded 67.8% of initial concentration. The major component was found 4-ADNT(4-Aminodinitrotoluene).

key word : TNT, Aerobic batch reactor, resting cell, 4-ADNT.

1. 서론

니트로계 방향족 화합물은 염료, 살충제 그리고 폭발성 물질의 원료로서 광범위하게 사용되었으며 토양 및 지하수에 오염되어왔다.[1] 니트로계 방향족 화합물 중 TNT(2,4,6-Trinitrotoluene)는 난분해성이며, 인간 및 동물의 돌연변이 등을 유발할 수 있는 화합물로 알려져있다.[2] 지금까지 많은 연구에서 호기성 슬러리 반응조, compost 및 활성슬러지 등을 이용한 호기성 조건에서의 TNT의 제거를 연구하였으며, 이러한 연구의 경우 종종 물질수지가 맞지 않는 결과가 나타났지만 nitro-group의 부분적 감소의 결과로 형성되는 ADNT(Aminodinitrotoluene) 및 DANT(Diaminonitrotoluene) 등의 생성을 보고하였다.[3]

미생물을 이용한 생물학적 처리의 경우 그 비용이 저렴하며, 친환경적 공법으로서 사람들에게 수용되기 쉬운 장점이 있다. 또한 현장오염토양으로부터 분리한 미생물을 사용할 경우 현장 적용시 생태계에 미치는 악영향을 작게 할 수 있는 이점을 지니고있다. 본 실험에서는 화약류로 오염된 현장토양으로부터 분리한 미생물을 이용하여 회분식 반응조 및 resting cell을 이용하여 TNT의 분해능력을 검토하여 보았다.

2. 실험방법

본 실험에서는 현장토양으로부터 분리한 미생물의 TNT 분해능력을 확인하기 위하여 호기성 회분식 반응조를 이용한 TNT의 제거실험을 수행하였다. 반응조의 뚜껑을 다공질의 Form-plug을 사용하여 반응조 내부를 호기성상태로 유지하였으며, 실험기간 중 미생물의 성장 촉진 및 원활한 산소의 공급을 위하여 Shaker 상에서 150 RPM으로 교반하여 주었다. 또한, 실험기간 중 빛에 의한 TNT의 광분해를 방지하기 위하여 별도의 case를 제작하여 shaker를 덮어 줌으로써 직사광선에 대한 노출을 방지하였다. 반응조에 첨가된 nutrient는 분리시와 동일한 조성으로 하였으며, Chem Service社에서 제조한 순도 98%이상의 TNT를 이용하여 인공오염 시켰다. 미생물의 성장은 UV spectrophotometer(SIMAZU社, UV mini 1240)을 사용하여 UV 543 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TNT의 분석은 반응조 내의 상징액을 채취하여 15,000 RPM에서 원심분리

한 후 액상시료를 분석하였다.

충분하게 acclimation 시킨 미생물 중 3종을 선별하여 resting cell을 이용한 TNT의 제거효율 및 그 부산물을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 접종미생물은 Nutrient Broth(Difco社, 8g/L) 배지를 이용하여 배양하였으며, 배양한 미생물은 4,000 RPM으로 원심분리하여 수확하였다. 반응조는 빛에 의한 광분해를 배제하기 위하여 Wheaton社의 40 mL amber vial을 사용하였으며, 반응은 roll mixer 상에서 수행하였으며, 3종의 미생물에 대한 실험결과 TNT의 제거 효율이 가장 뛰어나게 나온 미생물에 대하여 각기 다른 질소원을 첨가하여 질소원의 변화에 따른 TNT의 제거효율 변화를 검토하기 위하여 TNT를 단일 탄소원 및 단일 질소원으로 사용한 경우와 NH_4 및 NO_3를 질소원으로 첨가한 경우에 대하여 실험을 수행하였다. 질소원으로서의 NH_4 및 NO_3의 첨가는 각각 NH_4Cl 및 $NaNO_3$를 이용하여 첨가하였다. 미생물 내에 잔류하는 화합물의 추출 및 분석은 15,000 RPM으로 상징액과 미생물을 분리하였으며, 분리된 미생물 덩어리를 acetonitrile로 현탁시켜 24시간 동안 방치한 후 그 상징액을 HPLC를 이용하여 분석하였다.

TNT 의 농도는 HPLC(영린기기 Model NO. 9600L)와 Shiseido Capcell Pak(4.6×250 mm, 5 ㎛)으로 분석하였다. 분석조건은 이동상의 구성 methanol : phosphate buffer 20 mM = 50 : 50, UV 230 nm에서 측정하였다.

3. 실험결과

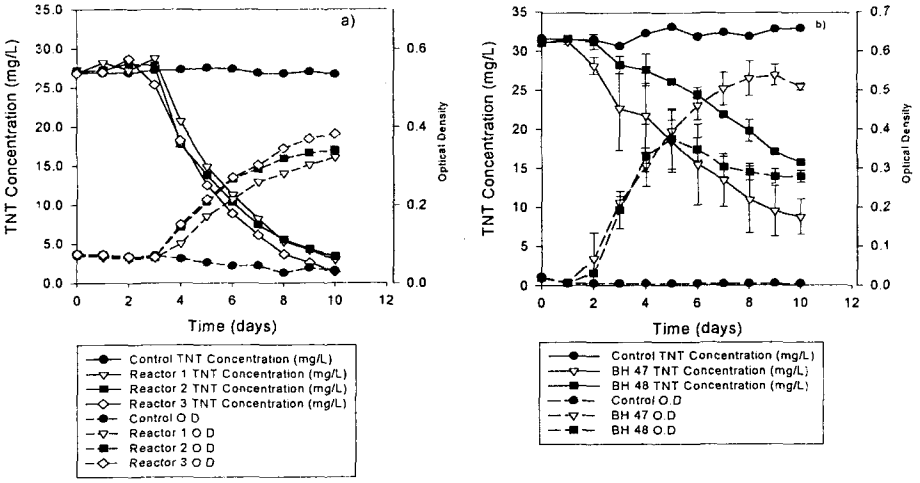

그림 1. 호기성 회분식 반응조를 이용한 TNT의 제거.

그림 1은 TNT를 단일 탄소원으로 하여 조성한 액상배지에 TNT분해 미생물을 접종하여 회분식 실험을 수행한 결과이다. 그림 1의 a) 그래프의 경우 미생물의 분리 초기에 수행한 회분식 실험의 결과로서, 토양을 첨가하여 배양 중인 배지의 상징액 5mL을 반응조에 첨가하였다. 미생물 접종 후 3일간의 lag-time을 가진 후 미생물의 성장 및 TNT의 농도 감소가 감지되었으며, 접종 10일 후 TNT의 농도는 초기농도에서 23.68~25.64 mg/L의 농도가 감소되었다. 그림 2의 b) 그래프는 분리한 미생물에 대하여 TNT를 첨가한 plate 배지 상에서 지속적으로 배양함으로써 acclimation 시킨 미생물 중 성장이 가장 뛰어난 미생물을 접종하여 실험을 수행한 결과이다. 실험의 조건은 첫 번째와 동일하게 TNT를 단일 탄소원으로 하여 수행하였다. 실험결과 미생물 접종

후 lag-time은 종전의 3일에서 1일로 단축되었으며, 종전과 동일하게 미생물의 성장과 함께 TNT의 농도감소가 관측되었다. 이러한 lag-time의 감소는 지속적인 TNT 오염배지에서의 배양에 의하여 미생물이 TNT에 대한 충분한 내성이 생겼음을 추측할 수 있다. TNT의 농도감소는 반응 10일 후 BH 47 접종 반응조에서 22.47 mg/L, BH 48 접종 반응조에서 15.51 mg/L로 각각 관측되었다. BH 47 접종 반응조에 비하여 BH 48 접종 반응조에서의 적은 농도감소양은 반응 5일 이후의 optical density 곡선의 하향으로 보아서 미생물 성장률의 감소에 기인하는 것으로 추측되어진다. 1의 a)와 b)의 실험결과를 비교해 볼 때 3일의 lag-time을 가진 a) 실험에서 반응 10일 후의 TNT 감소 양이 오히려 더 크게 발생하였음을 알 수 있다. 이는 1)의 접종 미생물의 경우 단일종의 분리에 의한 순수배양이 이루어지지 않은 상태이므로 여러 종의 미생물이 반응조에 접종되어, TNT의 제거 효율이 더 높게 발생한 것으로 추측되어지며, 문헌에 의하면 선별된 한가지의 미생물 보다 자연적으로 오염된 지역의 미생물 군집의 사용이 오히려 더 유익할 수 있음이 보고되어 있다.[4)]

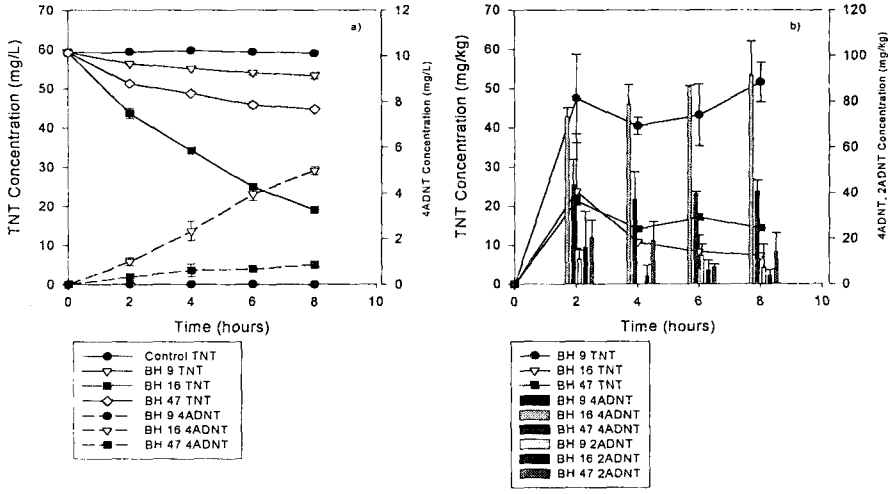

그림 2. Resting Cell을 이용한 TNT의 제거.

그림 2의 경우 분리 배양중인 3종의 미생물에 대하여 단일 탄소원으로 TNT 만을 첨가하여 실험을 수행한 결과 BH 16 미생물을 접종한 반응조의 경우 반응 개시 8시간 안에 초기 농도의 67.8 %가 제거되는 효율을 보였다. 또한 모든 반응조에서 TNT의 감소와 함께 4ADNT 및 2ADNT의 생성이 감지되었다. Avinash M, Tope의 경우 *Arthrobacter sp.*의 resting cell을 이용하여 실험한 결과 초기농도 58.9 mg/L에서 18시간 후 14.83 mg/L 로 감소한 결과를 보였다. Avinash M, Tope의 경우 반응개시 12시간 이후부터 ADNT의 생성이 감지되었으며, 30시간 이후 DANT의 생성이 감지된 반면,[5)] 본 실험에서는 반응개시 2시간 이후 ADNT의 생성이 감지되었지만 DANT의 생성은 감지되지 않았다. 상징수의 분석 외에 미생물 cell 내에 잔류하는 TNT 및 그 부산물에 대한 분석을 실시하였다. 미생물 cell 내의 물질에 대한 추출은 acetonitrile을 이용하였으며, 그 결과는 다음에 제시한 그림과 같다. TNT 및 반응산물의 경우 반응시간의 경과에 따라 아주 작은 폭으로 증가하는 경향을 보였다.

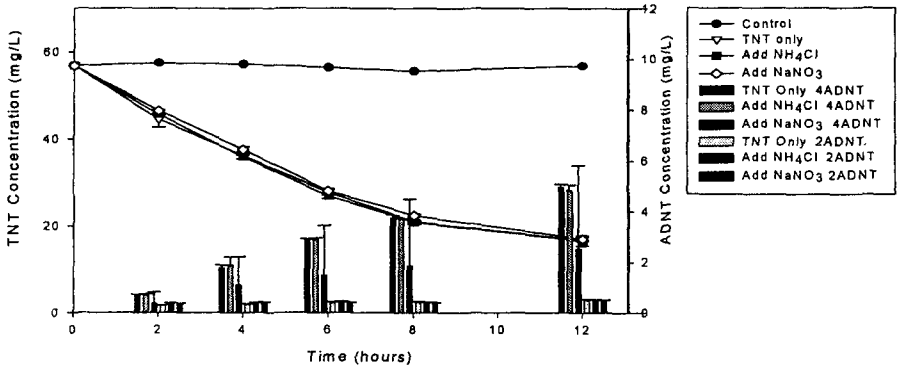

그림 3-3. 각기 다른 질소원을 첨가한 경우의 TNT의 제거 및 부산물의 생성.

탈질미생물(*G.8*)의 경우 TNT 외에 질산이온의 첨가가 있을 경우 TNT의 분해가 아질산이온의 분해와 경쟁적으로 발생하며, Lactate와 아질산이온이 함께 첨가된 경우에 있어서 100mg/L의 TNT가 24시간 이내에 완전히 분해되었음이 보고되어있다.[6] 이에 본 실험에서는 3종의 미생물에 대한 실험결과 TNT의 제거 효율이 가장 높았던 BH16 미생물에 대하여 질소원의 형태를 다르게 주입하였을 경우 TNT 제거 양상의 변화를 검토하였다. TNT 이외의 질소원으로서 NH_4Cl 및 $NaNO_3$가 사용되었으며, 첨가된 질소의 양은 0.264 mM로 동일한 양을 첨가하였다. 실험결과 TNT를 단일 탄소원 및 단일 질소원으로 하여 실험을 수행한 결과와 각기 다른 형태의 질소원을 첨가하였을 경우 $NaNO_3$를 첨가한 반응조에서의 4ADNT의 생성농도를 제외하고 TNT의 감소양 및 감소속도에 있어서 매우 유사한 결과가 발생하였으며, TNT의 분해과정에서 생성되는 ADNT의 생성양상 및 생성농도에 있어서도 유사한 결과가 발생되었다. 이 실험을 통해 실험에 사용된 미생물의 경우 TNT의 분해에 있어서 다른 질소원의 존재 여부가 TNT 분해 효율에 미치는 영향이 매우 적음을 알 수 있다.

본 실험을 통하여 현장에서 분리한 토착미생물의 TNT 분해능력은 검토할 수 있었으나, 이 미생물에 의한 TNT의 분해경로 및 분해시 물질수지의 산정에 있어서는 더 많은 연구가 필요함을 알 수 있다.

4. 참고문헌

1) Pavlostathis, S. G., Comstock, K. L., Jacobson, M. E. and Saunders, F. M., "Transformation of 2,4,6-TNT by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*," *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 2266~2273(1998)

2) Medina, V. F., Larson, S. L. Bergstedt, A. E. and McCutcheon, S. C., "Phyto-removal of TNT from water with batch kinetics studies," *Wat. Res.*, 34, 2713~2722(2000)

3) Trapp, S. and McFarlane, J. C., "Plant contamination : Modelling and Simulation of Organic Chemical Process," Lewis Publisher, Boca Raton(1995)

4) Fiorella, P. D. and Spain, J. C., "Transformation of 2,4,6-TNT by *Pseudomonas pseudoakaligegls* JS52," *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2007~2015(1997)

5) Avinish M. Tope, Kaiser Jamil and T.R Baggi., "Transformation of 2,4,6-Trinitrtoluene(TNT) by Immobilized and Resting Cell of *Arthrobacter sp.*" Journal of Hazardous Substance Research. volume two (1999)

6) 이태진, Kenneth J. Williamson., "Trinitrotoluene(TNT) Transformation Mechanisms under Denitrification Conditions by Ruminal Microoraganism G.8" , *대한환경공학회*, Vol. 19, No. 9, pp. 1175~ 1184, (1997)