

## 혼합배양 미생물의 세포외 물질이 2,4,6-Trinitrotoluene 변환에 미치는 영향에 관한 연구

한 기 봉  
국립환경연구원

### Study on the 2,4,6-Trinitrotoluene reduction rate by mediation of extracellular material of mixed culture

Gee Bong Han

*National Institute of Environmental Research*

#### Abstract

2,4,6-Trinitrotoluene(TNT) was reduced into intermediate products by mixed culture incubated in anaerobic condition. To test the effects of extracellular material to electron transfer between sulfide and TNT, filtered medium of mixed culture was loaded in the test tubes with TNT and sulfide. The transformation rate was measured under four different conditions. The rate under microbial activity was the fastest among under different conditions. With sulfide or filtrate alone and TNT, the reactions were measured as the slowest reactions or no reactions occurred, respectively.

The reaction rate coefficient were calculated by linear regression and the first order kinetic was fitted best. Also, the plot of rate coefficients ( $K_r$ ) showed linear relationships when at time zero TNT and sulfide concentration were 20 mg/l and 6.0 mM, respectively. By extrapolation, reaction rate coefficient of 100% filtrate could be calculated as 0.0054/minute. However, reaction rate was affected by different concentration of sulfide, so it is a dependent of sulfide concentration.

The results of this test showed TNT reduction rate can be limited more by microbial reaction than by mediation of filtrate or sulfide and filtrate alone.

## I. 서 론

선택적 nitroaromatic 화합물은 많은 경우 폭발물의 주 원료로 이용되고 있으며 그 과정에서 폭약제조공장 또는 군수 화학기지제조창 등으로부터 우리의 환경으로 유입되고 있다. 또한 이들공장이나 관련부대시설등을 위해 설치된 폐수운반시설 주변오염등으로 인해 호소나 강 또는 인근 하천등으로 유입되는 경우도 있다<sup>1)</sup>. 독성으로 인한 영향에 대해서는 bluegill fish의 경우 수중농도가 2.3 ~ 2.8mg TNT/L 일때 나타났다고 보고되었고, 민물고기에게 대해서는 2.0 ~ 3.0mgTNT/L 의 수중농도일때 LC<sub>50</sub> 로 보고되었다<sup>2)</sup>. 인체에 대한 영향에 대해서는 대규모의 제조공장 또는 취급장에서 일하는 노동자들이 장기간 노출되었을 경우 이들의 간에 피해를 주거나 빈혈의 증상을 일으키는 것으로 보고되었다<sup>3)</sup>.

따라서, 많은 연구자들이 이러한 화합물에 의해 오염된 환경을 정화코자 완전분해에 의한 처리방법에 대해 연구하였으며, 최근 들어서는 생물학적 처리의 장점으로 인해 분해능을 가진 미생물을 이용한 처리방법에 대해 더욱 그 관심이 높아지고 있다. 미생물에 의해 nitroaromatic compound가 분해될경우 혐기성 상태에서 nitro기는 수소에 의해 amino기로 환원된다고 보고되었고<sup>4)</sup>, 이때 hydroxylaminoaromatic compound가 중간물질로 생성된다. 그러나, 선택적 nitroaromatic 화합물은 결합된 nitro기에 의한 강력한 산화성으로 인하여 자연에서 미생물에 의한 완전분해가 어려운것으로 알려져 있다. 그렇지만, 최근에는 완전분해를 얻기위한 새로운 방법을 연구하기 위해 연속적으로 서로다른 metabolic regime을 미생물분해 시스템에 적용시키기도 한다<sup>5)</sup>.

본연구에서는 혐기성상태에서 nitroaromatic compound가 미생물을 이용한 처리 시스템내에서 환원될경우 이에 대한 세포외물질(filtered medium of mixed culture)의 영향유무 및 전자 공여체로 sulfide를 사용하였을 경우의 반응율에 대해 최적화 기법을 사용하여 조사를 하였다.

## II. 실험방법

### 1. 재료 및 방법

#### 1.1 filtrate medium 준비

전자 운반 매개체로서의 실험을 위해 1주일 동안 혐기성상태로 배양시킨 medium으로부터 0.2 $\mu$ m membrane filter를 이용하여 활동성있는 미생물을 제거한 여액을 만든뒤 이를 filtered medium으로 사용한다. 여액내 활동성있는 미생물의 존재여부를 확인키 위해 여액내 agar plate test를 하였으며, 실험결과 colony 형성은 없었다.

#### 1.2 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) 변환율 실험

40ml test tube를 사용하여 TNT 및 여액을 채운뒤 40 mM 완충용액(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 사용하여 pH를 7로 조정하도록 하였다. 전자공여체로 400mM Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O Stock Solution을 사용 6.0 mM [S=] 가 되도록하였다. 여액의 농도는 각각 50 %, 60 %, 70 %, 그리고 80% (v/v)로 조정하여 반응을 계수를 구하였다. Test tube내 혐기성 상태를 유지하기 위하여 argon gas를 사용하였다. 미생물의 활성을 확인하기위해 필요할때마다 agar plate 를 사용하였다. Test tube들은 상온 25°C의 온도로 유지된채 시험되었다.

#### 1.3 분석

Sulfide농도는 Standard Methods, Sections 421B and 427D<sup>6)</sup>에서 제시된 방법에 따라 분석하였다. TNT 와 환원성 중간유도물질은 HPLC시스템을 사용분석하였는데, detector로는 Waters Associate Absorbance 440을, gradient pump로는 Beckman model 110A를 사용하였고, integrator로는 Hewlett Packard 3380A 를 사용하였다. 이들을 분리하기 위한 reverse phase column으로는 Rsil C-18; 4.6 x 250 mm; particle diameter, 5 $\mu$ m 의 Beckman Instruments, Inc.사의 제품을 사용하였다. 또한 mobil phase는 water-methanol (50:50, v/v)을 2 ml/min 로 유지하였다

## III. 결과 및 고찰

1974년 Won. et al등은 TNT가 미생물에의해 환원될때 먼저 nitro기가 환원되어 hydroxylaminotoluene으로 전환

된 뒤 중간물질인 monoaminodinitrotoluene으로 환원된다고 보고하였다<sup>7)</sup>. 1992년 Glaus et al.등은 Streptomyces sp.의 세포외물질을 nitroaromatic compounds의 환원실험에 적용시킨결과 촉매역할을 하였음을 보고하였다<sup>4)</sup>. Sulfide농도 변화에 따른 TNT 환원율에 대한 영향을 조사하고자 서로다른 4종류의 농도범위를 설정 전자공여체로서 시험하였다. Fig. 1 에는 여액의 농도를 70%로 일정하게 유지한뒤 Sulfide의 농도변화에 따른 영향을 나타내었다. Fig. 1에 나타난 결과를 보면 Sulfide농도가 3.0 mM일때는 2시간 동안의 실험에서 충분한 반응을 나타내지 않았으나, 추가로 2.4mM의 Sulfide를 더하였을때 반응률이 높아졌다. 또한, Sulfide의 농도가 12.9mM로 되었을때 반응속도가 최고로 되었다.

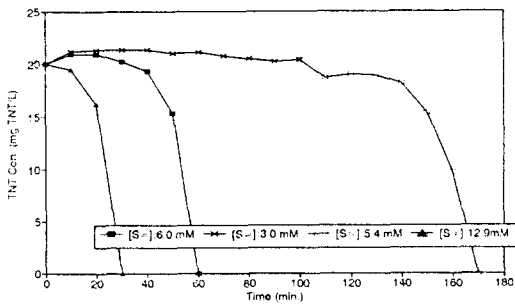


Fig.1. Sulfide effect to TNT reduction (filtrate : 70% ; [S-]:3.0-12.9mM)

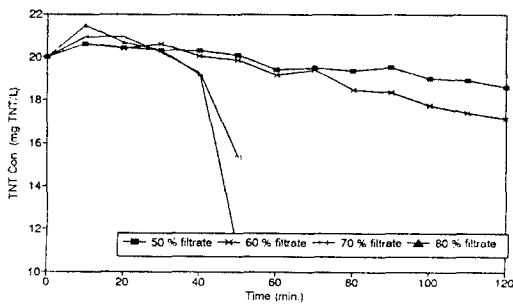


Fig.2. Profile of TNT Transformation (filtrate : 50, 60, 70, 80% ; [S-]:6.0mM)

그러나, TNT 환원은 Sulfide가 공존할경우 여액의 증가를 통해서도 고무되었다. Fig. 2는 Sulfide의 농도를 6.0 mM로 일정하게 유지하고 여액의 농도를 변화시켰을때의 TNT변환율을 나타낸 것이다. TNT가 aminonitrotoluene으로 환원되어 감소될때의 변환율(감소율)을 식으로 표현하면 다음과 같다.

$$\text{감소율} = -\frac{d[\text{TNT}]_t}{dt} = K_f \times ([\text{TNT}]_t)^n$$

여기서, [TNT] : 변환전의 농도,  $K_f$  : 관찰 반응물 계수  
 $n$  : 반응차 상수,  $t$  : 반응시간

Fig. 3과 4에는 1차 반응의 linear regression fit을 설명하였고, 감소율은 다음과 같이 적분을 취하여 제정리 하였다.

$$\int \frac{1}{[\text{TNT}]_t} \times d[\text{TNT}]_t = \int -K_f dt$$

$$\ln ([\text{TNT}]_t / [\text{TNT}]_0) = -K_f \times t$$

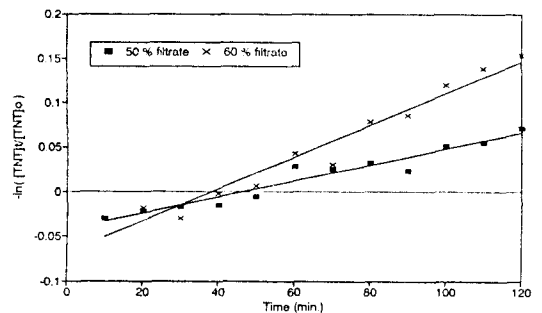


Fig.3. Regression fit of 1st order rate (filtrate : 50, 60% ; [S-]:6.0mM)

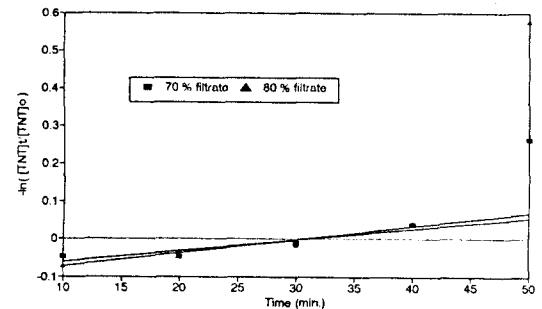


Fig.4. Regression fit of 1st order rate (filtrate : 60, 70% ; [S-]:6.0mM)

Table.1에는 여액의 농도변화에 따른 반응을 계수를 나타내었다.

Table. 1 여액의 농도변화에 따른 반응을 계수  
[S=]: 6.0mM

여액농도(% V/V)	반응을 계수 (K <sub>f</sub> ) (min <sup>-1</sup> )
50	0.000902
60	0.001785
70	0.002862
80	0.003527

Fig. 5에는 여액의 농도에 따른 K<sub>f</sub> 변화를 나타내었으며, 농도변화에 비례함을 그림에서 직선의 상관관계로 알 수 있다. 또한, 외삽법에 의해 회색되지 않은 여액 (filtrate, 세포의 물질)에 대한 K<sub>f</sub>의 값 (0.0054)을 구할 수 있으며, 이 값은 이전에 다른 연구자에 의해 보고된 값보다도 한 차수가 낮은 값이다<sup>4)</sup>. 따라서, 반응율에 대한 여액의 영향은 미생물 반응에 의한 영향에 비해 무시할 정도로 볼 수 있다.

또한, Fig. 6에는 Sulfide의 농도를 6.0mM로 고정시키고 미생물 반응 및 여액에 의한 TNT변환에 미치는 영향을 도식화 하였다.

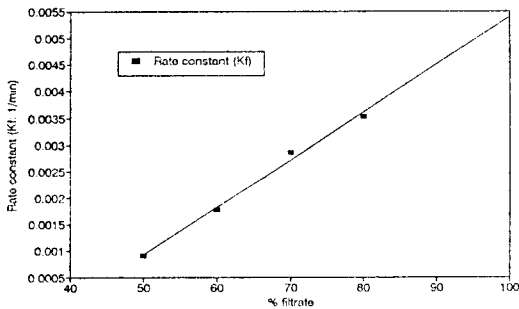


Fig.5. Plot of reaction rate constant (pH: 7.0, [S=]: 6.0mM, [PO4-]: 40mM)

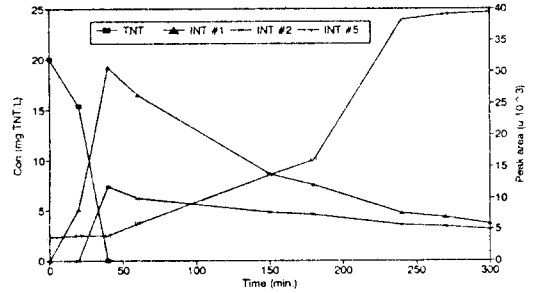


Fig.6. Plot of reaction rate constant (pH: 7.0, [S=]: 6.0mM, [PO4-]: 40mM)

#### IV. 결론

1. 여액에 의한 TNT변환은 직선의 상관관계를 나타내는 특성을 갖고 있으며, 전자공여체인 Sulfide의 공존시 변환에 영향을 미치는 것으로 나타났다.
2. 또한, Sulfide의 농도가 일정농도(3.0mM) 이상일 때부터 반응율에 제한적인 인자로 작용하는 것으로 나타났다. 따라서, 변환율에 대해서 여액에 의한 독립적인 영향은 무시될 수 있으며, 세포의 물질에 의한 TNT변환은 그 영향이 없는 것으로 사료된다.

#### 참고 문헌

1. Pereira, W.E., Short, D.L., Manigold, D.B., and Roscio, P.K. : Isolation and Characterization of TNT and Its Metabolites in Groundwater by Gas Chromatograph-Mass Spectrometer Computer Techniques. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 21, 554-562, 1979.
2. Osmon, J.L. and Klausmeier, R.E. : The microbial degradation of explosive. Dev. Ind. Microbiol., 14, 247-252, 1972.
3. McCormick, N.G., Feeherry, F.E., and Levinson, H.S. : Microbial Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Appl. Environ. Micro., 31(6), 949-958, 1976.

4. Glaus, M.A., C.G. Heijman, R.P. Schwarzenbach, and J. Zeyer : Reduction of nitroaromatic compounds mediated by *Streptomyces* sp. Exudates, *Appl. Env. Micro.*, 58(6), 1945-1951, 1992.
5. Han, Gee Bong. : Biodegradation of nitroaromatic compounds in TNT munitions wastes under different metabolic regimes, Ph.D. Thesis, Oklahoma State University, 1993.
6. APHA, AWWA, and WPCF : Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th Ed. Washington, DC: APHA, 1985.
7. Won, W.D., R.J. Heckly, D.J. Glover, and J.C. Hoffsomer : Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene, *App. Env. Micro.*, 27, 513-516, 1974.