

# *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5에 의한 TNT 함유폐수 (pink water)의 생물학적 처리와 Nitroreductase (*pnrB*) 유전자의 RT-PCR 정량화

조수희 · 조윤석 · 오계현\*

순천향대학교 생명공학과

## Biological Treatment of TNT-containing Wastewater (pink water) by *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5, and RT-PCR Quantification of the Nitroreductase (*pnrB*) Gene

Su-Hee Cho, Yun-Seok Cho, and Kye-Heon Oh\*

Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chungnam 336-600, Korea

**Abstract** The biological treatment of TNT-containing wastewater, known commonly as pink water, was investigated using a stirred tank reactor with *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5 bacterial culture. *S. maltophilia* OK-5 exhibited effective degradation of TNT contained in pink water, completely degrading TNT (100 mg/L) within 6 days of incubation. The dark-red brown color derived from Hydride-Meisenheimer complex became more pronounced during the incubation period, which was determined quantitatively. High-pressure liquid chromatography was used to measure residual TNT, which also resolved the metabolic intermediates (*i.e.*, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene and 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene). Gas chromatography-mass spectrometry was used to verify these intermediates. Quantification of the nitroreductase (*pnrB*) gene isolated from *S. maltophilia* OK-5 growing in pink water was performed with real-time PCR. The amount of *pnrB* gene copies increased to 10<sup>3</sup>-fold after 5 days of incubation time.

**Keywords:** Pink water, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), Biodegradation, *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5, Real-time PCR

### 서 론

TNT (2,4,6-Trinitrotoluene)의 제조 공정 중 발생하는 폐수인 pink water 또는 red water는 TNT 뿐만 아니라 여러 가지 질소 방향족을 포함하는 산업폐수로서, 미국의 경우 TNT를 생산하는 단일 공장에서 하루에 약 200 kL의 폐수가 배출되고 있다 [1]. Pink water는 TNT 제조 공정 중 부

분적으로 정제된 TNT를 마지막으로 정제하는 공정에서 발생하는 폐수로서 이로부터 유래하는 것처럼 수용액 상태로 존재하는 질소방향족 화합물의 광화학적 반응으로 인해 점차 노란색에서 분홍색으로 변하며, pH 3 이하의 강산성이고, 특유의 향기를 가진다 [1,2]. 또한 TNT 제조 공정 중 발생하는 다른 형태의 폐수인 red water는 TNT의 정제 과정과 TNT를 축·중합하는 과정에서 발생한다 [1,3]. TNT 제조 공정에서 배출되는 이들 폐수 속에는 TNT 성분 뿐만 아니라, dinitrotoluenes (DNT), nitrobenzenes (NB) 등이 포함되어 있어 이러한 폐수가 환경에 유출되면 심각한 환경오염문제를 초래한다 [4,5]. 폐수의 주성분인 TNT

### \*Corresponding author

Tel: +82-41-530-1353, Fax: +82-41-530-1350

e-mail: kyeheon@sch.ac.kr

에 인체가 장기간 노출될 경우 골수섬유증 (myelofibrosis) 과 채중감소증 및 재생불량성 빈혈 (aplastic anemia) 등의 질병을 유발시킬 수 있다 [6]. 또 다른 성분들인 DNT와 NB 는 생명체에 축적되어 내분비교란물질 (endocrine disrupture) 로서 작용하며 자연생태계에서 배출된 질소방향족 화합물 들은 자연적으로 분해가 어려워 토양에 장기간 지속되어 토 양 및 수계 생태계를 오염시킨다 [7,8]. 특히 하천이나 해양 으로 이들 산업 폐수가 방출될 경우 부영양화의 원인이 될 수 있다는 연구 보고가 있다 [9]. 따라서 이러한 질소방향족 화합물들은 생태계에 대한 독성효과로 인하여 미국환경보 호청에서 우선감시대상 화합물로 분류하고 있다 [10].

환경오염물질로서 난분해성인 TNT와 DNT의 생물학적 제거방법에 대해 많은 연구가 시도되어왔으며, 세균뿐만 아니 라 진균류에 의한 분해와 분해기작에 관한 연구가 활발히 보 고되었다 [11,12]. TNT를 분해하는 세균들로는 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Desulfovibrio* sp. 등이 보고 된 바 있다 [13-17]. 지금까지 TNT 함유 폐수에 대한 처리 공정으로는 주로 과립활성탄을 이용한 흡착제거 방법과 고 온 소각공정을 이용하여 TNT 함유 폐수를 처리하였으나, 물리·화학적 폐수 처리 공정은 경제적 비용과 이차 환경 오염물질의 발생 등의 문제점을 가지고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하고자 습지 식물인 *Myriophyllum aquaticum*과 백색부후균 (white-rot fungus)인 *Phanerochaete chrysosporium* 을 이용한 생물학적 처리방법에 관한 연구가 시도된 바 있 다 [18,19]. 사실 최근까지 토양미생물을 이용한 TNT 분 해 연구는 주로 생화학적 혹은 유전학적 측면에서 분해 관련 유전자 및 단백질의 탐색에 중점적으로 연구되고 있으며, TNT 대사과정 중 실시간으로 변화하는 대사 관련 유전자들의 발현량과 TNT의 분해율에 대한 연구는 보고 된 바 없다. 또한 TNT를 생산하는 과정에서 발생하는 막 대한 양의 폐수에 대해 세균을 이용한 생물학적 처리 적용 에 관한 연구는 Kwon 등 [20]이 혐기적조건 하에서 혼합 배양을 통해 TNT 함유 폐수를 처리한 보고가 있을 뿐 거의 미비한 실정이다.

본 연구실에서는 TNT 분해능이 우수한 *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5를 분리하여 다양한 생리화학적 및 분자 유전학적 특성 연구를 통하여 이 균주의 산업적 이용가능 성을 조사하였으며, 특히 계놈 셔플링 및 단백질체학 분석 을 통해 TNT 대사작용에 관여하는 중요 유전자들에 대한 탐색을 실시하였다 [21-25].

본 연구에서는 이 *S. maltophilia* OK-5를 이용하여 교반 탱크 반응조 내에서 TNT 제조 공정에서 발생하는 pink water의 생물학적 처리가능성을 조사하였으며, 처리과정 에서 생성되는 TNT 분해대사산물들을 HPLC와 GC-MS 등에 의한 분석을 통하여 확인하였다. 또한 *S. maltophilia* OK-5가 pink water를 생물학적으로 분해하는 동안 TNT 대사에 관여하는 nitroreductase (*pnrB*) 유전자의 발현량을 RT-PCR로 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 분해세균의 배양조건

본 연구에 사용된 TNT 분해세균은 폭약에 오염된 지역 의 토양으로부터 농화배양 기법으로 분리된 *S. maltophilia* OK-5를 사용하였다. 분리균주의 배지조성과 배양조건은 Lee 등 [17]에 의해 발표된 방법에 따랐다. 생장배지는 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.2로 조절하였으며, 배양온도는 30°C 에서 150 rpm으로 진탕혼합 배양기에서 전배양 (pre-culture) 을 하였으며, 이를 교반탱크 반응조 내에 접종하였다. 분해 세균인 *S. maltophilia* OK-5의 생장은 분광광도계 (V-550 UV/Vis spectrophotometer, Jasco Co., Japan)를 이용하여 파장 660 nm에서 흡광도 측정을 통하여 관찰하였다.

### 교반탱크 반응조에서 pink water의 미생물학적 처리

TNT 분해세균인 *S. maltophilia* OK-5를 TNT 함유폐수 인 pink water에 적용하기 위하여 2.5 L의 총 용량 가운데 운전 용량이 1.5 L인 교반탱크 반응조 내에서 TNT의 미 생물학적 제거실험을 실시하였다. 사용한 배지는 1 L pink water에 *S. maltophilia* OK-5의 전배양에 사용한 생장배지 를 첨가하여 사용하였다. Pink water를 포함한 배양액 은 pH 7.2로 조절하였으며, 산업폐수를 직접 적용하는 바, 효율성을 고려하여 별도로 멸균은 하지 않았다. 분해세균인 *S. maltophilia* OK-5의 접종은 전체 용량의 10%를 접종하고 교반탱크 반응조의 운전은 호기적 조건하에서 진행되었다. 배양온도는 30°C를 유지하였고, 임펠러 (impeller)는 분당 300회 회전하며, 공기는 1.2 L/min으로 주입하였다. 배양 기간 동안 매 24시간 마다 시료를 채취하여 분해 세균의 생장과 잔존 TNT의 양을 관찰하였다. 분해 세균의 생장은 배양액을 적당한 비율로 멸균된 0.8% 생리식염수에 희석 하여 LB 고체 평판배지에 평판 도말하여 30°C에서 배양한 후 형성된 집락을 계수하여 측정하였다.

### TNT 분해능 측정 방법

TNT 함유 폐수에서 미생물학적으로 제거된 TNT를 측정 하기 위하여 UV/Vis detector (Shimadzu SPD-10A, Japan) 가 부착된 LC-10AT HPLC 시스템 (Shimadzu Co., Japan) 을 사용하였다. 사용한 컬럼은 Agilent 사의 Zorbax ODS reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 입자 크기 5 μm) 을 사용하였다. UV/Vis detector의 파장은 254 nm이었으 며, mobile phase의 flow rate는 1.0 mL/min 이었다. Mobile phase는 acetonitrile (HPLC grade, Fisher Scientific Co., USA)과 증류수 (HPLC grade, Fisher Scientific Co., USA) 를 2 : 3 (vol/vol)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 폐수가 함유된 배양액으로부터 채취한 시료는 3,500 × g에서 10분 간 원심분리한 후 0.45 μm의 syringe filter로 여과하여

HPLC 분석에 이용하였다. 또한 pink water에 함유된 TNT의 정량은 HPLC 분석을 통해 측정하였다.

### Pink water의 분석

Pink water의 성분 분석을 위해 GC-MS를 이용하여 분석하였다. GC-MS 분석에 사용한 기기는 Hewlett-Packard 5970 mass selective detector가 부착된 Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph를 사용하였고, 컬럼은 HP-5MS capillary column (25 m × 0.20 mm × 0.33 μm)을 사용하였다. GC-MS의 작동 조건은 carrier gas로서 헬륨을 사용하였으며, flow rate는 0.8 mL/min 되도록 조절하였다. Injection volume 2 μL, injection temperature 250°C, transfer line temperature 300°C, total running time 16분이었다. GC-MS 분석을 위한 시료제작은 50 mL의 배양액을 3,500 × g에서 20분간 원심분리한 후, 상등액을 0.45 μm nylon membrane filter를 이용하여 여과하였다. 여과한 용액을 1 N HCl을 이용하여 pH 3.0으로 적정후, 동량의 ethyl acetate와 배양액을 분획깔대기에 넣고 세계 혼든 후 층을 분리시켰으며, 용매 분획은 3회 반복 추출하였다. Ethyl acetate 층을 취해서 감압 증발기 (vacuum rotary evaporator, EYELA, Co., Japan)로 감압 증발시킨 후, ethyl acetate 층을 증발시켜 얻은 시료를 GC-MS로 분석하였다.

### Nitroreductase (*pnrB*) 유전자 발현량 측정

TNT 생분해 경로의 중요한 요소로 작용하는 nitroreductase (*pnrB*) 유전자의 발현량 검사를 위해 real-time PCR법으로 상대적 정량분석을 시행하였다 [26,27]. Pink water가 첨가된 교반 반응 탱크조에서 배양된 *S. maltophilia* OK-5로부터 RNA 추출 kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였으며, reverse transcriptase 반응은 RT-PCR kit (Bio-Rad Co., USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 SYBR Green의 활성을 CFX96 (Bio-Rad Co., USA)를 이용하여 실시간 확인하였다. 각 반응에 사용한 *pnrB* primer는 forward 5'-CGAGATGACTGAAGAACACCTGAAC-3'와 reverse 5'-GTAGTGACGGCGGCTCTGG-3'를, 그리고 16S rRNA primer는 forward 5'-AAGGAACACCAGTGGCGAAGG-3'와 reverse 5'-CCAGGCGGTCAACTTAATGCG-3'를 사용하였다. Real-time PCR 반응은 iScript™ One-Step RT-PCR Kit (Bio-Rad Co., USA)를 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C에서 30초간 1회 denaturation 시킨 후 95°C에서 5초간 denaturation, 60°C에서 5초간 annealing, 72°C에서 5초간 extension 조건으로 50회 반복하였다. PCR 산물 결과는 Bio-Rad CFX 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 교반탱크 반응조에서 pink water에 함유된 TNT 생분해

분해능이 우수한 *S. maltophilia* OK-5 균주를 이용하여 교반탱크 반응조 내에서 TNT 생산공정에서 얻어지는 pink water에 함유된 TNT의 분해실험을 실시하였다 (Fig. 1). Pink water 내의 TNT 제거는 배양기간 동안 매 24시간마다 시료를 채취하여 HPLC로 측정하였다 (Fig. 2). *S. maltophilia* OK-5는 TNT 농도가 100 mg/L가 되도록 희석된 pink water 내에 포함된 TNT를 반응조에서 6일 동안의 배양 기간 내에 완전히 제거하였다. 초기 배양 3일 동안 *S. maltophilia* OK-5의 성장과 TNT 제거의 변화는 뚜렷이 나타나지 않았으나, 배양 4일째부터 *S. maltophilia* OK-5의 생장이 현저히 증가하기 시작하였으며, 접종균주의 성장과 더불어 TNT 제거도 동시에 진행되어, 이 기간 동안 pink water 내에 함유된 TNT의 양은 약 65% 이상이 분해되었다. 배양이 5일째 접어들면서 약 90% 정도가 분해되었으며, 궁극적으로 6일 만에 교반탱크 반응조 내의 TNT는 완전히 분해되는 것을 HPLC를 통해 확인하였다 (Fig. 2). 이전에 보고된 연구결과에서 *S. maltophilia* OK-5는 100 mg/L의 시약용 TNT를 동일한 운전조건의 교반탱크 반응조에서 4일 만에 완전히 분해하는 것을 보여주었다 [17]. 그러나 이 시약용 TNT에서의 분해는 pink water에서 TNT 분해에서 얻어진 결과와 비교해 볼 때 TNT의 완전 분해에 소요되는 기간이 다소 늦어지는 것으로 나타났다. 이것은 pink water 내에는 TNT 뿐만 아니라, dead-metabolite로서 Hydride-Meisenheimer complex를 포함하여 다른 여러 유사 화합 물질들이 포함되어 TNT 분해에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

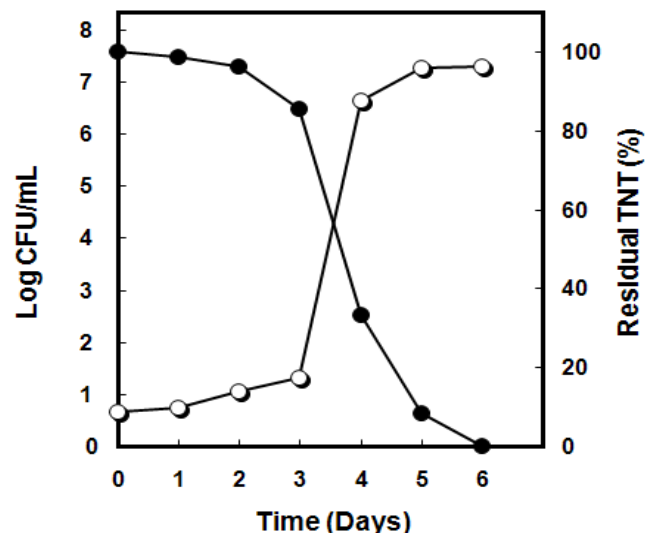


Fig. 1. Growth of test culture, *S. maltophilia* OK-5, measured as colony forming unit (○), associated with TNT degradation in pink water (●).

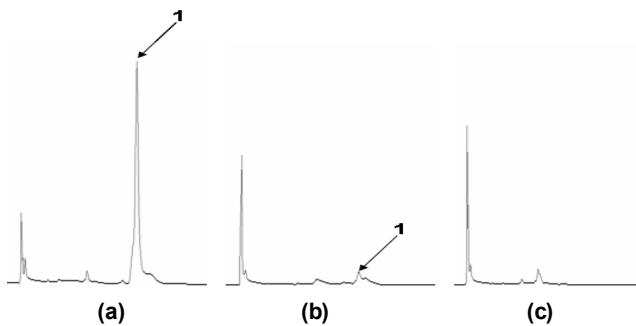


Fig. 2. HPLC chromatograms of culture samples, initially (a), after 4 days (b), and after 6 days (c) of incubation. Peak 1 indicates TNT in the chromatograms.

### TNT 대사 작용에서 탈질소 반응 확인

Pink water에 *S. maltophilia* OK-5를 접종하고 배양기간 경과에 따른 배양액의 색깔 변화를 알아보기 위하여 분광광도계의 파장 475 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 3). 교반탱크 반응조에서 배양 기간 동안 매 24시간 마다 배양액을 채취하여 분광광도계로 흡광도를 확인한 결과, 배양 3일째부터 배지의 색깔 변화가 급격히 변하기 시작하였으며 배양 4일 이후부터 색깔 변화는 완만하게 진행되는 것이 관찰되었다. Vorbeck 등 [28]은 TNT 분해과정 중 붉은 갈색의 대사물질인 Hydride-Meisenheimer complex가 일시적으로 생성된다고 보고하였다. 또한 French 등 [15]은 TNT 중간대사물질 중 아질산염 (nitrite) 및 dinitrotoluene의 생성은 TNT가 먼저 Hydride-Meisenheimer complex로 전환된 이후 여러 다른 분해 경로를 통해 TNT가 분해된다고 보고하였다. 따라서 이러한 보고들을 통해서 TNT가 함유된 배지에서 TNT의 잔존량이 줄어들면서 *S. maltophilia* OK-5의 배양 배지의 색이 점점 붉은 갈색으로 변화되는 현상은 *S. maltophilia* OK-5가 TNT 생분해 경로에서 탈질소화 반응을 거친 후 분해되는 것으로 판단된다.

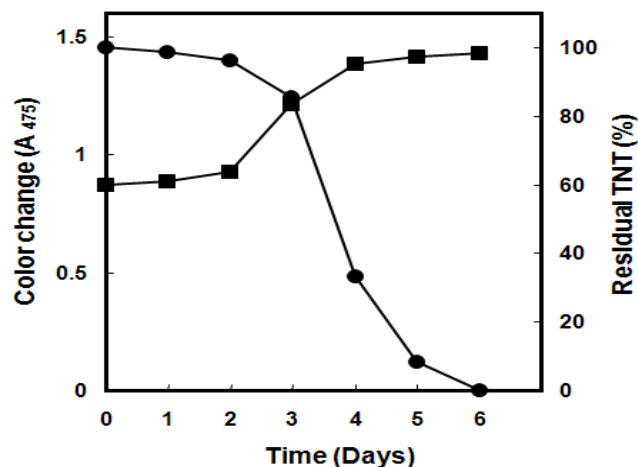


Fig. 3. Color change (■) of STR was measured at 475 nm, associated with TNT degradation (●) in pink water.

### Pink water의 분석

Pink water의 함유화합물 및 TNT의 분해과정에서 생성되는 중간대사물질들을 확인하기 위해 pink water와 *S. maltophilia* OK-5의 배양시료에 대하여 gas chromatography를 사용하여 분석하였다 (Fig. 4). Pink water에 접종된 *S. maltophilia* OK-5는 배양 6일째의 배양액을 GC로 분석한 결과에서 보여주는 바와 같이, 배양 6일만에 완전히 제거되는 것을 보여주었다 (Figs. 4(a), 4(b)). 이 결과는 HPLC 분석을 통해서 배양 6일의 배양시료에서 확인된 TNT 완전 제거의 결과와 동일하게 나타났다.

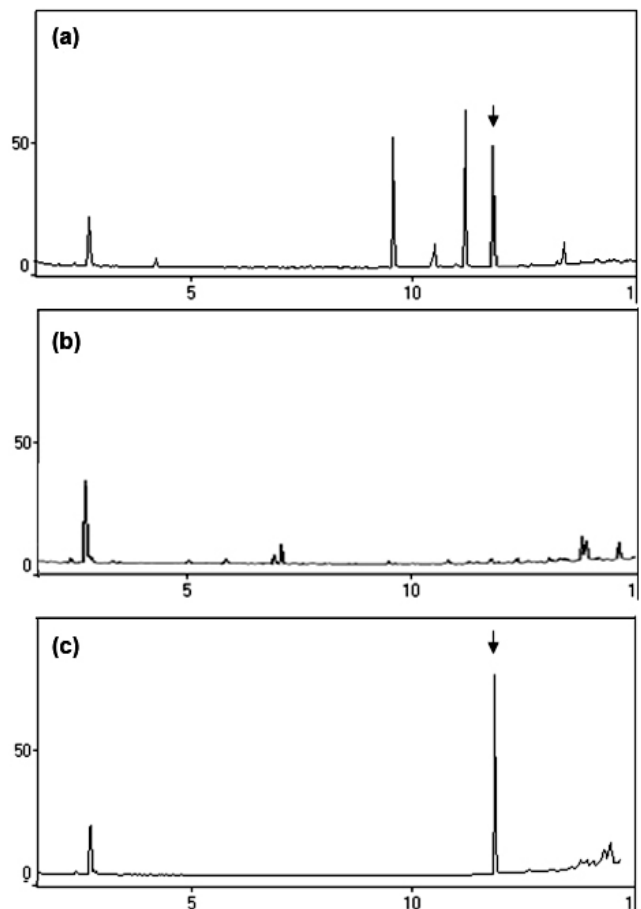
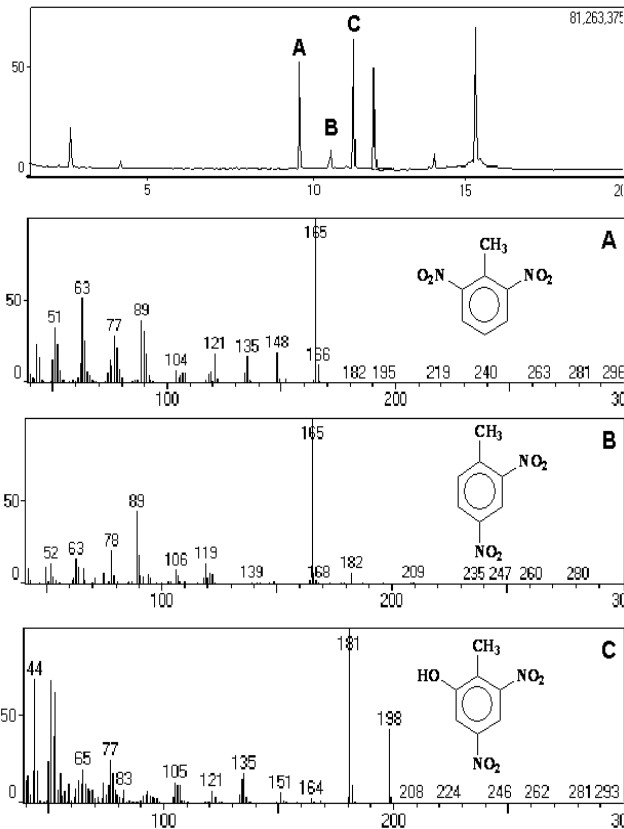


Fig. 4. GC chromatograms of culture samples in pink water, initially (a), and after 6 days of incubation (b). The arrow in chromatogram (c) indicates TNT.

Pink water에 함유된 화합물을 알아보기 위하여 GC chromatogram 상에서 나타난 주요 peak들에 대하여 mass-spectrometry (MS) 분석을 실시하였다. 이들 peak 가운데 표준 TNT와 동일한 retention time을 가지고 있는 peak를 제외한 나머지 주요 peak들에 대해 MS 분석결과는 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT), 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene으로 각각 확인되었다 (Fig. 5).

Chang 등 [14]에 의하면 *S. maltophilia* OK-5는 TNT의 중간대사물질인 2,4-DNT와 2,6-DNT를 호기적 조건하에서 이 두가지 화합물을 모두 완전 분해한다고 보고한 바 있으며, Bhadra 등 [18]은 수서 식물인 *Myriophyllum aquaticum*에 의한 TNT의 주요 대사산물로서 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene이 생성된다고 보고하였다. 이러한 보고에 근거하여, 본 연구에서 사용된 pink water에는 TNT 뿐만 아니라 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene 등도 포함되어 있으며 이들 화합물은 분리세균인 *S. maltophilia* OK-5에 의해 모두 제거됨을 HPLC와 GC-MS 분석을 통해서 확인하였다.



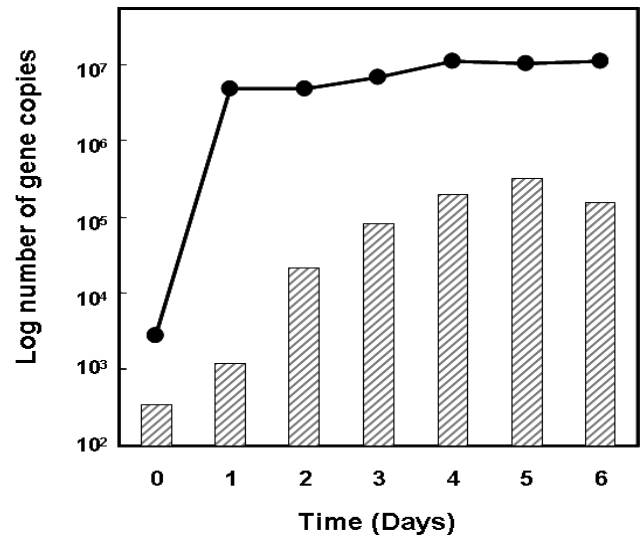
**Fig. 5.** GC-MS data for a sample of pink water. MS fragmentation patterns of the major compounds representing the three peaks (A, B and C) in the TIC are indicated, and the respective chemical structures of the compounds are also given.

### Nitroreductase (*pnrB*) 유전자의 정량 분석

Pink water에 함유된 TNT의 대사 작용 과정에서 발견되는 *S. maltophilia* OK-5의 nitroreductase (*pnrB*) 유전자 발현 정량을 real-time PCR로 분석한 결과 pink water 배양 배지 내에서 TNT의 제거율에 비례하여 *pnrB* 유전자의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 배양 초기에 비해 배양 5일째 *pnrB* 유전자 copy수는  $10^2$ 에서  $10^5$  이상으로 급격히 증가하였으며, *pnrB* 유전자발현 증가에 따라

TNT의 생분해율도 비례하여 분해되는 것을 확인하였다. Beller 등 [26]은 hydrocarbon 분해세균에서 대사작용에 관여하는  $\alpha$ -subunit of benzylsuccinate synthase (*bssA*)의 발현량을 배양 기간동안 real-time PCR 기법으로 측정할 결과 기질 분해율에 비례하여 *bssA* 유전자도 증가한다고 보고하였다. 이러한 보고에서처럼 환경오염의 주요 원인 물질들을 에너지원 및 탄소원으로 이용하는 균주에서 기질 대사 작용에 관여하는 유전자들의 발현량은 균주의 성장과 상호 비례적으로 증가한다. 본 연구 결과에서도 TNT 대사에 작용하는 nitroreductase (*pnrB*) 유전자의 발현량은 단일 질소원으로 TNT가 함유된 배지에서 *S. maltophilia* OK-5의 성장율과 상호 비례적으로 증가하여 pink water에 포함된 TNT 제거에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

본 연구에서 얻어진 *S. maltophilia* OK-5의 pink water의 미생물학적 처리 결과를 토대로 하여, 향후 TNT 함유 폐수인 pink water에 대한 산업적 적용과 그 효율성을 규명하고, TNT 대사에 관여하는 유전자의 탐색 방향으로 진행될 것이다.



**Fig. 6.** Quantification of eubacterial 16S rDNA genes (●) and nitroreductase (*pnrB*) gene (▨) using real-time PCR assay during biodegradation of pink water.

### 요 약

본 연구는 TNT 분해능이 우수한 세균인 *S. maltophilia* OK-5를 이용하여 TNT 함유 폐수인 pink water의 미생물학적 처리 가능성에 대한 연구를 하였다. Pink water에 함유된 TNT 제거를 위해 *S. maltophilia* OK-5를 교반탱크 반응조에서 배양한 결과 pink water 내에 존재하는 100 mg/L의 TNT를 배양 6일 만에 완전 분해하였다. Hydride-Meisenheimer complex에서 유래하는 진한 적갈색은 배양기간 내에 증가하였으며, 이를 정량적으로 확인하였다. 본 연구에서 pink

water에 잔류하는 TNT 뿐만 아니라 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene, 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene 등의 대사산물도 HPLC 분석방법으로 측정하였으며, GC-MS를 사용하여 확인하였다. 또한 pink water에서 배양된 *S. maltophilia* OK-5에서 발현되는 nitroreductase (*pnrB*)의 유전자 발현정량을 real time PCR로 측정하였다. 그 결과 배양 5일째 *pnrB* copy 수가  $10^3$  이상 증가하는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 순천향대학교 2009년도 고가기자재연구사업의 지원을 받아 수행되었음.

접수 : 2009년 7월 6일, 게재승인 : 2009년 12월 23일

## REFERENCES

1. Yinoon, J. and S. Zitrin (1993) *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosive*. pp. 211-230, Wiley, New York, USA.
2. Patterson, J., J. Brown, W. Duckert, J. Polson, and N. L. Shapira (1976) *State-of-the art: Military Explosive and Propellants Production Industry*. Vol. III. Waste Water Treatment. Rep. No. EPA-600/2-76-213c. American Defense Preparedness Association, Washington, D.C., USA.
3. Oliver, J. H., K. P. Kotu, and M. C. Jin (1994) Wet oxidation of TNT red water and bacterial toxicity of treated waste. *Water Res.* 28: 283-290.
4. Knackmuss, H.-J. (1996) Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* 51: 287-295.
5. Yinon, J. (1990) *Toxicity and Metabolism of Explosive*. 1st ed., CRC Press, Florida, USA.
6. Won, W. D., L. H. DiSalvo, and J. Ng (1976) Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 576-580.
7. Nishino, S. F., G. C. Paoli, and J. C. Spain (2000) Aerobic degradation of dinitrotoluene and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2139-2147.
8. Nishino, S. F., J. C. Spain, H. Lenke, and H.-J. Knackmuss (1999) Mineralization of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene in soil slurries. *Environ. Sci. Technol.* 33: 1060-1064.
9. Horan, N. J. (1990) *Biological Wastewater Treatment System: Theory and Operation*. John Wiley & Sons, New York, USA.
10. Keith, L. R. and W. A. Telliard (1979) Priority pollutants, *Environ. Sci. Technol.* 13: 416-423.
11. Bumpus, J. A. and M. Tatako (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.
12. Stahl, J. D. and S. D. Aust (1993) Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 477-482.
13. Schackmann, A. and R. Müller (1991) Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 809-813.
14. Chang, H. W., S. I. Kim, and K. H. Oh (2001) Microbiological elimination of 2,4-dinitrotoluene/2,6-dinitrotoluene by a TNT-degrading bacterium in stirred tank reactors. *Kor. J. Microbiol.* 37: 66-71.
15. French, C. E., S. Nickin, and N. C. Bruce (1998) Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2864-2868.
16. Boopathy, R., C. F. Kulpa, and M. Wilson (1993) Metabolism of TNT by *Desulfovibrio* sp. (B strain). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 270-275.
17. Lee, M. S., H. W. Chang, H. Y. Kahng, J. S. So, and K. H. Oh (2002) Biological removal of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *Stenotrophomonas* sp. OK-5 in bench-scale bioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 105-111.
18. Bhadra, R., R. J. Spanggard, D. G. Wayment, J. B. Hugues, and J. V. Shanks (1999) Characterization of oxidation products of TNT metabolism in aquatic phytoremediation systems of *Myriophyllum aquaticum*. *Environ. Sci. Technol.* 33: 3354-3361.
19. Sublette1, K. L., E. V. Ganapathy, and S. Schwartz (1992) Degradation of munition wastes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34: 709-723.
20. Kwon, S. H. (2000) A biological approach in the treatment of TNT wastewater. *Toxicol. Environ. Chem.* 75: 17-23.
21. Ho, E. M., H. W. Chang, S. I. Kim, H. Y. Kahng, and K. H. Oh (2004) Analysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)-inducible cellular responses and stress shock proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Curr. Microbiol.* 49: 346-352.
22. Ho, E. M., J. W. Chun, H. Y. Kahng, and K. H. Oh (2003) Characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase purified from the TNT-degrading bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Kor. J. Microbiol.* 39: 223-229.
23. Ho, E. M., H. Y. Kahng, and K. H. Oh (2004) Physiological and molecular characterization of NAD(P)H-nitroreductase from *Stenotrophomonas* sp.

- OK-5. *Kor. J. Microbiol.* 40: 183-188.
24. Chang, H. W., S. Y. Song, S. I. Kim, H. Y. Kahng, and K. H. Oh (2002) Cellular responses of a TNT-degrading bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5 to explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Kor. J. Microbiol.* 38: 247-253.
25. Lee, B. U., Y. S. Cho, S. C. Park, and K. H. Oh (2009) Enhanced degradation of TNT by genome-shuffled *Stenotrophomonas maltophilia* OK-5. *Curr. Microbiol.* 59: 346-351.
26. Harms, G., A. C. Layton, H. M. Dionisi, I. R. Gregory, V. M. Garrett, S. A. Hawkins, K. G. Robinson, and G. S. Sayler (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37: 343-351.
27. López-Gutiérrez, J. C., S. Henry, S. Hallet, F. Martin-Laurent, G. Catroux, and L. Philippot (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 57: 399-407.
28. Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fisher, and H.-J. Kanckmuss (1994) Identification of a Hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *J. Bacteriol.* 176: 932-934.