

교반탱크 반응조에서 TNT 분해세균에 의한 2,4-Dinitrotoluene/2,6-Dinitrotoluene의 미생물학적 제거

장효원 · 김승일¹ · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부; ¹기초과학지원연구원 생체고분자분석팀

1.5 L 교반 탱크반응조에서 이미 그 특성이 밝혀진 TNT 분해세균인 *Stenotrophomonas maltophilia*의 배양을 이용하여 dinitrotoluenes (DNTs) [2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)]를 호기적 조건하에서 미생물학적으로 제거하는 시험을 하였다. 2,4-DNT와 2,6-DNT는 각각 10일과 14일의 배양기간 중에 완전히 분해되었다. 이차 탄소는 DNTs의 분해에 필수적이었으며 이차 탄소가 없는 상태에서는 거의 분해되지 않았다. DNTs의 분해에 이차 탄소가 미치는 효과에 대하여 조사하였다. 이차 질소원이 없는 상태에서 DNTs는 완전히 분해되었으나 이차 탄소원이 첨가된 배지에서는 부분적으로 분해되었다. HPLC와 GC-MS가 잔존 DNTs와 중간대사산물을 확인하기 위하여 사용되었다. 그 결과, HPLC와 GC-MS chromatograms은 대상 화합물인 2,4-DNT와 2,6-DNT, 그리고 각각의 중간대사산물인 2-amino-4-nitrotoluene과 2-amino-6-nitrotoluene을 성공적으로 확인할 수 있었다.

Key words □ biodegradation, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene, TNT-degrader

질소 방향족 화합물(nitroaromatic compound)은 일반적으로 용매, 염료, 그리고 폭발물 합성의 중간물질 등의 다양한 산업 공정으로부터 생산된다. 질소 방향족 화합물이 산업적으로 널리 사용되고 이와 아울러 생산 과정에서 얻어지는 이들 화합물이 포함된 폐수는 새로운 환경오염원으로 대두되고 있다(3,8). 2,4-Dinitrotoluene (2,4-DNT)과 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)은 질소 방향족 화합물로서 폴리우레탄(polyurethane) 생산에 사용되는 toluenediisocyanate의 중요한 생성 출발물질이며, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)의 합성 공정에서 유래하는 난분해성의 환경오염물질이다. 1982년에 미국에서 생산된 DNTs (dinitrotoluenes)의 양은 대략 3.2×10^8 kg이었으며(1), 우리나라에서도 1994년 기준으로 DNTs의 생산량은 6.4×10^7 kg이었으며 현재 그 생산시설의 확대를 도모하고 있는 실정이다(21). DNTs는 구조적으로 안정한 화합물로서 포유동물을 포함하는 생명체에 축적되어 암을 일으키는 독성물질로서 뿐만 아니라 내분비계를 교란시키는 물질(endocrine disrupter)로 작용한다고 보고되었다(18). 또한 자연계에서 분해가 어려워 토양에 장기간 지속되어 토양 및 수계 생태계를 오염시키고, 산업공정에서 유래하는 DNTs를 포함하는 폐수는 지하수 및 토양의 주요 오염원으로 알려져 있으며(14, 15), 특히 하천이나 해안에 방류시 부영양화의 원인이 될 수 있는 것으로 보고되어 왔다(5). 이러한 심각한 환경 문제를 해결하기 위하여 DNTs를 포함하는 다량의 산업폐수를 장치내에서 생물학적으로 제거하기 위한 노력이 있어왔다(10). 이러한 DNTs의 대량 사용에 의한 독성 때문에 이들은 미국환경보호청의 우선

감시대상 화학물질로 분류되어왔다(6).

난분해성물질(xenobiotics)들의 생물학적 제거는 친환경적인 접근성 때문에 최근 커다란 주목을 받고 있다(2,8). 세균이나 곰팡이에 의한 DNTs의 생분해에 대한 연구들이 일부 보고되었으며, 이들 화합물의 생분해 기작도 제안되었다(14,15,19,20). DNTs가 미생물에 의해서 분해되는 과정에서 고리 환으로부터 nitro 기가 점차적으로 제거되는 것은 확인되었으나, 구체적인 분해 기작은 확실히 규명되지 않고 있다. DNTs는 미생물에 의한 생분해 과정에서 azoxy 화합물, nitroso 화합물, amino 화합물 등이 생성되는 것을 확인하였다(11-13). 그러나 최근의 질소 방향족 화합물의 생분해에 대한 연구는 nitrotoluene (NT)이나 DNT의 연구보다는 TNT의 연구가 더욱 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구에서는 오염지역의 토양으로부터 분리된 TNT 분해세균을 이용하여 교반 탱크반응조(stirred tank reactor)내에서 TNT와 구조적으로 유사한 2,4-DNT와 2,6-DNT의 생분해, 이차 탄소원과 질소원의 첨가가 이들 화합물의 분해에 영향을 미치는지를 조사하였다.

재료 및 방법

세균의 확보 및 배양조건

본 실험에서 사용된 세균은 전라남도의 폭약으로 오염된 지역의 토양으로부터 농화배양을 통하여 얻어졌다. 이 세균의 배양에 이용된 배지는 Kim 등(7)에 의해 발표된 조성을 따랐으며 대상 탄소원으로 TNT 대신에 2,4-DNT 또는 2,6-DNT를 각각 50 mg 씩 첨가한 배지를 사용하였다. 순수배양세균의 접종은 사용 배지의 10%를 접종하고 배양온도 30°C에서 150 rpm으로 진탕

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 041-530-1353, Fax : 041-530-1350
E-mail : kyeheon@sch.ac.kr

혼합 배양기에서 전배양(pre-culture)을 하였으며, 이를 교반 탱크 반응조에 접종하였다. 분해세균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/Vis spectrophotometer, Jasco Co., JAPAN)를 이용하여 파장 660 nm에서 측정하였다.

이차 탄소원 및 질소원의 첨가 대한 DNTs 분해 효과

분해세균에 의한 DNTs의 분해에 대한 이차 탄소원의 첨가 효과를 조사하기 위하여, 2,4-DNT나 2,6-DNT를 포함하는 성장배지에 이차 탄소원으로서 glucose 대신에 fructose, acetate, citrate 와 succinate 등을 각각 2 mM씩 첨가하여 2,4-DNT와 2,6-DNT의 분해에 미치는 영향을 각각 관찰하였다. 또한 2,4-DNT나 2,6-DNT를 포함하는 배지에 질소원으로서 (NH₄)₂SO₄, KNO₃ 또는 NH₄Cl을 각각 2 mM씩 첨가하여 이들 화합물의 분해에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

교반 탱크반응조에서의 DNTs 생분해

2.5 L의 총 용량 가운데 운전 용량이 1.5 L인 교반 탱크반응조 내에서 2,4-DNT와 2,6-DNT의 생분해를 각각 실행하였다. 사용된 배지는 농화배양에서 사용한 기본배지 1 L에 각각 50 mg의 2,4-DNT이나 2,6-DNT와 2 mM의 이차 탄소원을 첨가하여 사용하였다. 교반 탱크반응조의 운전은 호기적 조건하에서 진행되었다. 배양온도는 30°C로 유지하였고, 임펠러(impeller)는 분당 300 회 회전하며 공기주입속도는 분당 1.2 L였다. 배지내의 순수 배양세균 생장은 분광광도계를 이용하여 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양기간 동안의 잔존 2,4-DNT와 2,6-DNT의 양은 HPLC를 이용하여 측정하였다.

HPLC와 GC-MS에 의한 분석

HPLC 시스템은 UV/Vis detector (Shimazu SPD-10A, Japan)가 부착된 LC-10AT (Shimazu Co., Japan)을 이용하였다. 사용 column은 ODS reverse-phase column (250 mm×4.6 mm, 입자 크기 5 μm DuPont Co., USA)을 이용하였다. UV/Vis detector의 파장은 254 nm이고, mobile phase의 flow rate은 1.0 ml/min 였다. Mobile phase는 HPLC-grade acetonitrile (Fisher Scientific

Co., USA)과 HPLC-grade water (Fisher Scientific Co., USA)를 2:3 (V/V)의 비율로 혼합하여 사용하였다. DNTs (Sigma Chem. Co, USA)의 잔존량을 측정하기 위하여 배양액으로부터 채취한 시료는 3,500 × g 에서 10분간 원심 분리한 후 0.45 μm의 syringe filter로 여과하여 분석하였다(17). GC-MS 분석을 위하여 배양액으로부터 시료를 채취하여 ethyl acetate로 2회 추출하였다. 용매는 진공상태에서 제거하고 dichloromethane에 다시 녹인 후 GC/MS-QP5050 gas chromatograph (Shimazu Co., Japan)를 이용하여 분석하였다. CBP-1 capillary column (25 m×0.25 mm×0.33 μm)이 사용되었으며, 70°C에서 250°C로 분당 10°C씩 오르도록 입력시켰다. 인젝터 온도는 250°C였으며 carrier gas는 헬륨(helium)을 사용하였다. 배양액내의 중간대사 물질의 생성을 확인을 위하여 표준 2-A-4-NT (Sigma Chem. Co, USA)와 2-A-6-NT(Aldrich Chem. Co.)를 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

교반 탱크반응조에서의 DNTs 분해

사용된 분해세균은 폭약에 오염된 지역으로부터 분리된 세균으로 TNT 뿐만 아니라 atrazine, 그리고 simazine의 분해능이 입증된 세균이었다(9). 본 연구에서는 이 TNT 분해세균이 TNT와 구조적으로 유사한 2,4-DNT와 2,6-DNT의 분해능을 알아보기 위하여 사용하였다(Fig. 1). TNT 분해세균은 교반 탱크반응조에서 50 mg의 TNT를 3일 이내에 효과적으로 분해하였다 (Fig. 2A). 본 실험에서는 이 TNT 분해세균을 이용하여 각각 초기농도 50

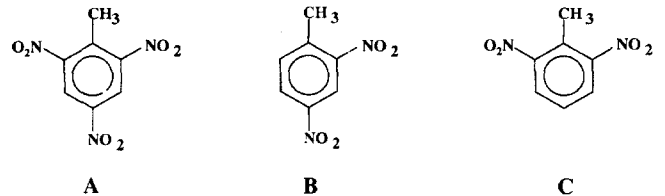


Fig. 1. Chemical structures of the test compounds; TNT (A), 2,4-DNT (B), and 2,6-DNT (C).

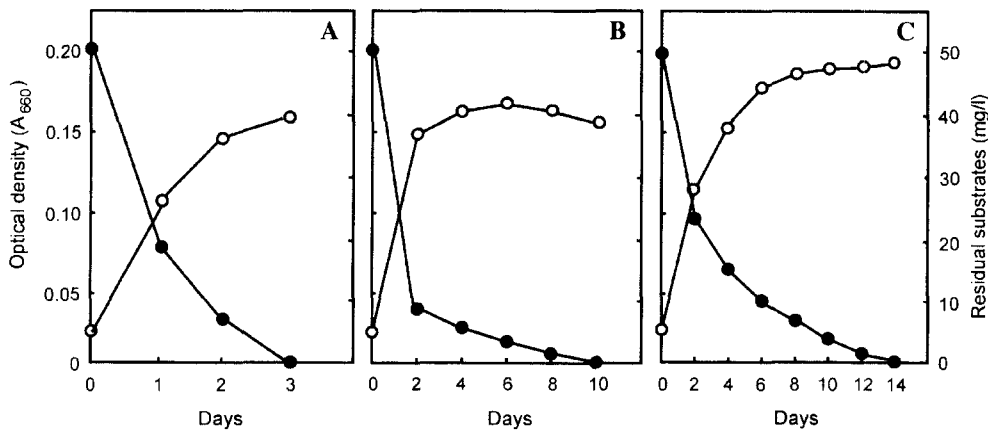


Fig. 2. Growth of test culture, *S. maltophilia*, measured as cell density (○), associated with the degradation (●) of 50 mg TNT (A), 50 mg 2,4-DNT (B), and 50 mg 2,6-DNT, respectively (C).

mg/l의 2,4-DNT와 2,6-DNT의 분해에 적용하였다. 2,4-DNT의 분해에서 분해세균의 생장은 배양초기에 급격한 생장을 나타내었으며, 이에 따라 잔존 2,4-DNT의 양은 크게 감소하였다. 2,4-DNT는 배양 2일 동안에 거의 90%가 분해되었으며, 10일 내에 완전 분해되었다(Fig. 2B). 그러나 이와는 달리 동일 조건하에서 2,6-DNT의 분해는 다소 완만하게 진행되었으며, 분해세균의 생장 역시 2,4-DNT의 분해에서 나타나는 생장곡선보다는 완만한 생장을 나타내었다. 2,6-DNT는 분해세균에 의해 14일만에 완전히 분해되었다(Fig. 2C). 2,6-DNT는 화학적 구조에 따른 입체장애 효과로 인하여 2,4-DNT보다 구조적으로 안정하다. 그러나 본 연구에서 얻어진 결과에서 보여주는 것처럼 수 차례에 걸친 세균에 의한 2,4-DNT가 2,6-DNT의 분해실험에서 2,4-DNT가 2,6-DNT의 분해가 다소 빠르게 진행된 것은 분해에 관여하는 효소의 특성에 기인하는 것으로 사료된다.

DNTs 분해에 이차 탄소원과 질소원이 미치는 영향

2,4-DNT와 2,6-DNT의 분해세균에 의한 분해에 있어서 이차 탄소원의 첨가가 미치는 영향을 관찰하기 위해 배지 내에 이차 탄소원으로서 각각 glucose, citrate, succinate, 또는 acetate 등을 첨가하여 비교 관찰하였다(Fig. 3). 이차 탄소원으로서 glucose가 첨가된 배지 내에서 10일 이내에 2,4-DNT는 완전히 분해되었다. 이차 탄소원으로서 glucose의 첨가 대신에 citrate, succinate, 또는 acetate를 첨가하였을 경우에 2,4-DNT의 분해능이 지연됨이 관찰되었으며, 그 분해율은 주어진 배양기간동안 각각 약 40-60% 정도의 분해를 나타내었다. 이차 탄소원의 첨가에 의한 2,6-DNT의 효과적인 생분해에 대한 실험도 2,4-DNT와 동일한 조건에서 실시되었다. 이차 탄소원 첨가에 대한 2,6-DNT의 분해에 미치는 결과는 2,4-DNT에서의 결과와 유사한 양상으로 나타났다. 이차 탄소원으로서 glucose가 첨가된 배지 상에서 14일 이내에 2,6-DNT의 완전분해가 일어났다. 또한 이차 탄소원으로서 acetate, succinate 또는 citrate를 첨가한 배지에서 2,6-DNT의 분해는 2,4-DNT와 비교하여 볼 때 다소 지연됨이 관찰되었으며,

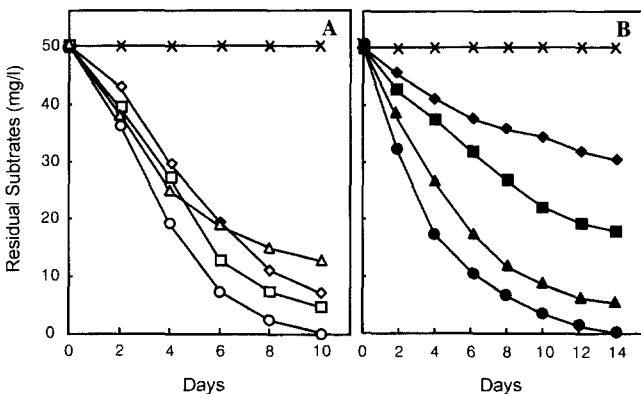


Fig. 3. Time course of the degradation of 2,4-DNT (A) and 2,6-DNT (B) by *S. maltophilia* in the media, which contained glucose (●, ○), succinate (■, □), citrate (▲, △), or acetate (◆, ◇) as a second carbon. No secondary carbon was added in the medium (X).

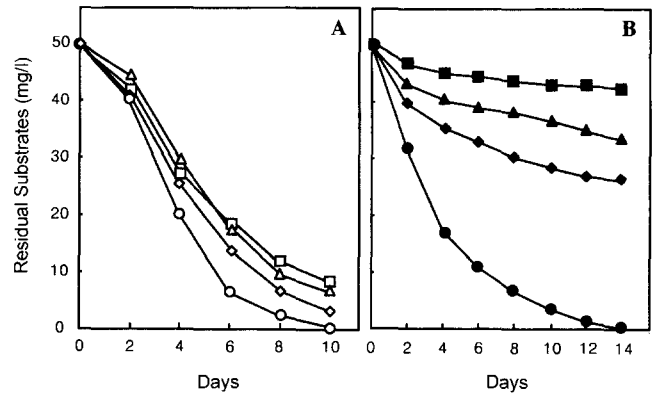


Fig. 4. Time course of the degradation of 2,4-dinitrotoluene (A) and 2,6-dinitrotoluene (B) by *S. maltophilia* in the media, in the presence of the secondary nitrogen source, (NH₄)₂SO₄ (■, □) KNO₃ (◆, ◇), or NH₄Cl (▲, △) of 2 mM, respectively and in the absence of nitrogen source (●, ○).

주어진 배양기간동안 부분적인 분해를 나타내었다. 이차 탄소원을 첨가하지 않은 경우에 배지내의 2,4-DNT나 2,6-DNT는 거의 분해되지 않았으며, 이러한 결과로 분리세균을 이용한 2,4-DNT나 2,6-DNT의 생분해는 배지내에 이차 탄소원의 첨가가 필수적임을 확인하였다. Spanggard 등(19)은 2,4-DNT의 생분해를 위하여 yeast extract, acetate, 또는 succinate 등을 배지내에 첨가하여 사용하였다. 산업폐수내에 포함되어 있는 s-triazine계열의 질소방향족 화합물은 이차 탄소원을 첨가하여 탄소:질소 비율(C:N ratio)을 유지함으로써 생분해를 효율적으로 유도할 수 있음이 제안되었다(4). 이러한 보고들은 본 연구에서 얻어진 이차 탄소원의 첨가가 DNTs에 미치는 영향에 대한 결과와 일치하였다. 질소원으로 (NH₄)₂SO₄, KNO₃ 또는 NH₄Cl를 배지에 첨가하여 2,4-DNT와 2,6-DNT의 분해에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 2,4-DNT의 분해는 10일의 배양기간동안 (NH₄)₂SO₄, KNO₃ 또는 NH₄Cl가 첨가된 경우에 각각 약 20-40%의 부분적인 분해를 나타내었다. 그러나 질소원이 첨가되지 않은 2,4-DNT를 포함하는 배지에서는 10일 내에 2,4-DNT가 완전히 분해되었다. 질소원의 첨가에 의한 2,6-DNT의 효과적인 생분해에 대한 실험도 2,4-DNT와 동일한 조건에서 실시되었다. 2,6-DNT의 분해는 배양기간동안 (NH₄)₂SO₄, KNO₃, NH₄Cl 등을 첨가한 경우에 2,4-DNT와 거의 비슷한 분해를 보여주었다. 반면에 질소원이 전혀 첨가되지 않은 2,6-DNT를 포함하는 배지내에서는 14일 이내에 2,6-DNT가 완전히 분해되었다. 질소원의 첨가에 따른 2,6-DNT의 분해실험에서 분해세균의 생장은 매우 느렸으며 2,6-DNT의 분해정도도 낮았다. *Pseudomonas* sp.에 의한 2,4-DNT의 생분해를 위하여 (NH₄)₂SO₄나 암모니아와 같은 이차 질소원의 첨가는 필수적이라는 연구결과가 발표되었다(16,19). 최근에 Nishno 등(14)은 *Burkholderia* sp.이 질소원이 전혀 첨가되지 않은 상태에서 유일 탄소원 및 질소원으로 2,6-DNT를 사용한다고 보고하였다. 본 연구에서 얻어진 이차 탄소원과 질소원에 대한 결과를 분석해 볼 때, DNTs의 생분해는 탄소 : 질소 비율 (C:N ratio)이 DNTs의 효율적인 생분해에 크게 영향을 미치며, 본 연구에서 사용된

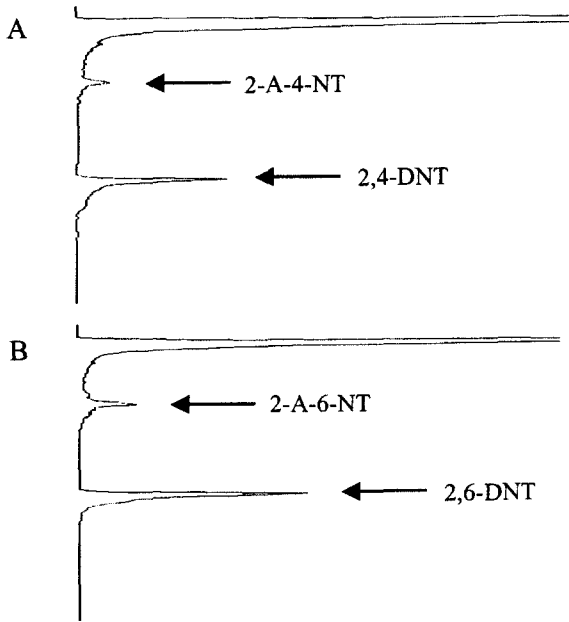


Fig. 5. HPLC chromatograms of centrifuged culture samples after 3 days of incubation in the growth media containing 2,4-DNT (A) and 2,6-DNT (B), respectively.

DNTs 분해세균이 다른 과학자들에 의해 보고된 DNTs의 분해세균들과는 다른 분해경로를 통하여 진행되는 것으로 판단된다.

잔존 2,4-DNT/2,6-DNT와 중간대사물질의 확인

배양기간동안 정기적으로 배양액을 채취하여 HPLC를 이용하여 2,4-DNT와 2,6-DNT의 잔존량을 측정하였다. HPLC chromatograms은 초기의 2,4-DNT나 2,6-DNT의 peak는 배양기간이 경과함에 따라 각각 감소하였으며 이 기간동안 HPLC chromatogram상에 존재하지 않았던 새로운 peak들이 탐침되었다 (Fig. 5). 배양기간이 1 일이 경과한 시료로부터 2,4-DNT나 2,6-DNT의 분해과정에서 중간대사물질의 생성유무를 확인하기 위하여 GC-MS를 사용하여 분석하였다. GC chromatogram 상에 나타난 두 개의 커다란 peak를 MS spectrum을 분석한 결과 2,4-DNT와 2-A-4-NT로 확인되었다(Fig. 6). 따라서 2,4-DNT이 분해되면서 중간대사물질로서 2-A-4-NT이 나타나는 것이 입증되었다. Noguera와 Freedman (15)은 *Pseudomonas* sp.에 의한 2,4-DNT의 생분해 연구를 통하여 2-A-4-NT 이외에, 2,4-diaminotoluene, 4-acetamide-2-nitrotoluene, 2-acetamide-4-nitrotoluene, 4-cetamide-2-aminotoluene, 2,4-diacetamidetoluene 등을 탐침하였다. 또한 Spanogord 등(19)은 2,4-DNT의 생분해과정에서 4-methyl-5-nitrocatechol이 생성됨을 확인하였다. 이렇게 다른 종류의 중간대사물질의 생성은 생분해에 사용된 세균의 분해기작에 차이가 있음에 기인되는 것으로 판단된다. 2,6-DNT에 대해서도 2,4-DNT와 같은 방법으로 GC-MS를 이용하여 분석해본 결과 얻어진 두 개의 커다란 peaks는 각각 2,6-DNT와 중간대사물질인 2-A-6-NT임이 확인되었다(Fig. 7). 이와 같이 2,4-DNT나 2,6-DNT가 생분

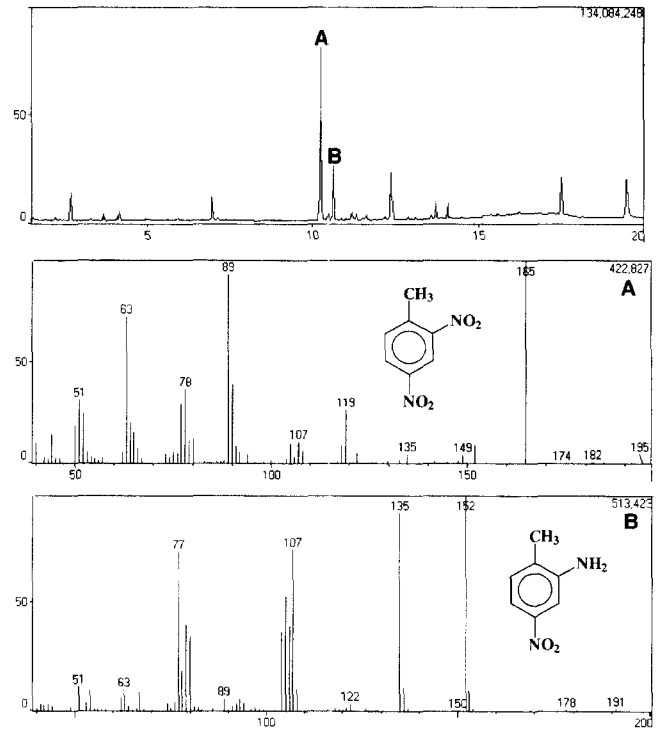


Fig. 6. GC/MS data for a culture sample analyzed for 4 days of incubation in the growth medium containing 2,4-DNT. MS fragmentation patterns of the compounds representing the two major peaks (A and B) in the TIC are indicated and the respective chemical structures of the compounds are also given.

해되는 초기단계에서 이들 DNTs 분자의 치환기인 nitro 기가 amino 기로 환원되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 사용된 분해균주인 *S. maltophilia*가 배지 내에 별도의 질소원 첨가 없이 2,4-DNT와 2,6-DNT를 효율적으로 분해하여 성장할 수 있음을 나타내는 것이다.

본 연구에서 사용된 분해세균 *S. maltophilia*는 TNT에 대한 분해능 뿐만 아니라, atrazine과 simazine에 대하여 탁월한 분해능이 있는 것이 이미 보고되었다(9). 이 연구를 통하여 이 세균에 의한 2,4-DNT와 2,6-DNT에 대한 효율적인 분해능도 입증되었는데 이 결과는 단일 세균으로서 *S. maltophilia*가 갖는 여러 가지 난분해성 화합물들을 분해시킬 수 있는 능력이 크고, 이 균주에 대한 학술적 및 산업적 의미가 매우 크다는 것을 의미한다. 흔히 토양 생태계에서 오염된 토양은 한가지 화학물질에 오염되어 있는 경우보다는 관련 화합물을 포함하는 다양한 화학물질들이 혼합되어 장기간 잔류하는 경우가 더욱 많기 때문에 *S. maltophilia*를 활용하여 상기의 분해능이 입증된 여러 가지 화학물질에 오염된 지역의 토양을 생물복원(bioremediation)시킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 향후 실험의 방향은 이 분해세균이 가지는 구조적으로 유사한 난분해성 화합물들에 대한 분해능의 범위를 조사하고 이들 화합물의 분해에 관여하는 유전자의 특성을 규명하는 분자유전학적 접근이 될 것이다.

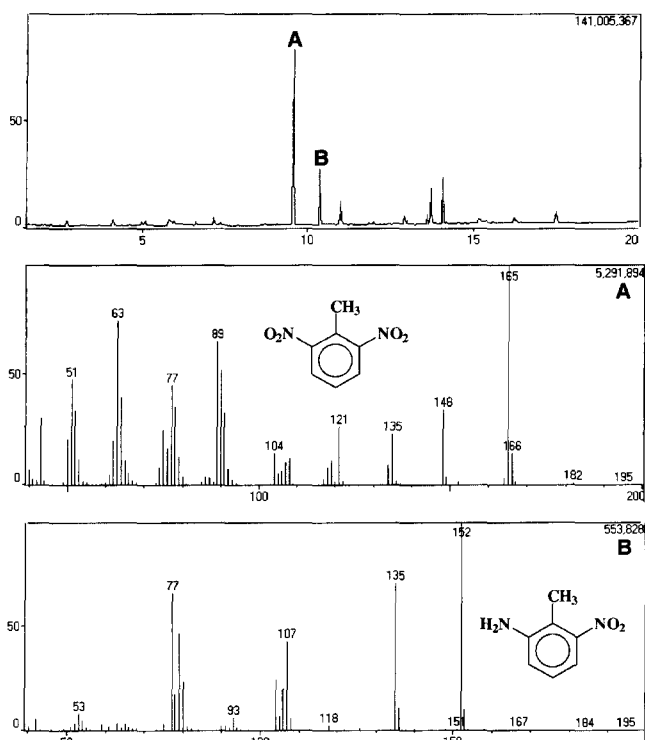


Fig. 7. GC/MS data for a culture sample analyzed for 6 days of incubation in the growth medium containing 2,6-DNT. MS fragmentation patterns of the compounds representing the two major peaks (A and B) in the TIC are indicated and the respective chemical structures of the compounds are also given.

참고문헌

- Dunlap, K.L. 1979. Nitrobenzene and nitrotoluenes, p. 916-932. In H.F. Mark, D.F. Othmer, C.G. Overberg, and G.T. Seabog (ed.), Encyclopedia of chemical technology, 3rd., vol. 15. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Hallas, L.E. and M. Alexander. 1983. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1234-1241.
- Hartert, D.R. 1985. The use and importance of nitroaromatic chemicals in the chemical industry, p. 1-14. In D.E. Rickert (ed.), Toxicity of nitroaromatic compounds. Chemical Industry Institute of Toxicity series. Hemisphere Publishing Corp., Washington, D.C.
- Hogrefe, W., H. Grossenbacher, A.M. Cook, and R. Hutter. 1984. Biological treatment specific for an industrial wastewater containing *s*-triazine. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1291-1296.
- Horan, N.J. 1990. Biological wastewater treatment systems: theory and operation, John, Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Keith, L.H. and W.A. Telliard. 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13, 416-423.
- Kim, Y.J., M.S. Lee, Y.S. Cho, H.K. Han, S. Kim, and K.H. Oh. 1999. Effect of various physicochemical factors on the biodegradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 14, 315-321.
- Knackmuss, H.-J. 1996. Basic knowledge and perspectives of biotransformation of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* 51, 287-295.
- Lee, M.S., H.W. Chang, J.S. So, and K.H. Oh. 2000. Microbial decomposition of *s*-triazine herbicides, atrazine and simazine by a TNT-degrading bacterium. *Kor. J. Microbiol.* 36(3), 209-215.
- Lendenmann, U., J.C. Spain, and B.F. Smets. 1998. Simultaneous biodegradation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene in an aerobic fluidized-bed biofilm reactor. *Environ. Sci. Technol.* 32, 82-87.
- Liu, D., K. Thomson, and A.C. Anderson. 1984. Identification of nitroso compounds from biotransformation of 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1295-1298.
- McCormick, N.G., F.F. Feeherry, and H.S. Levinson. 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 949-958.
- McCormick, N.G., J.H. Cornell, and A.M. Kaplan. 1978. Identification of biotransformation products from 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 945-948.
- Nishino, S.F., G.C. Paoli, and J.C. Spain. 2000. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2139-2147.
- 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.
- Noguera, D.R. and D.L. Freedman. 1996. Reduction and acetylation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2257-2263.
- 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.
- Rickert, D.E., B.E. Butterworth, and J.A. Popp. 1983. Dinitrotoluene acute toxicity, oncogenicity and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 13, 217-234.
- Spanggord, R.J., J.C. Spain, S.F. Nishino, and K.E. Mortelmans. 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. 57, 3200-3205.
- Valli, K., B.J. Brock, D.K. Joshi, and M.H. Gold. 1992. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. 58, 221-228.
- www.cischem.com/chemical-report.

(Received February 19, 2001/Accepted March 2, 2001)

ABSTRACT: Microbiological Elimination of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitro-toluene by an TNT-degrading Bacterium in Stirred Tank Reactors

Hyo-Won Chang, Seung-II Kim¹, and Kye-Heon Oh*(Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. BOX 97, Asan, 336-600, ¹Biomolecular Research Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea)

An aerobic microbiological process was tested in 1.5 L stirred tank reactors for the treatment of dinitrotoluenes (DNTs)[e.g., 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)] in the test culture of *Stenotrophomonas maltophilia*, which had previously characterized. Both 2,4-DNT and 2,6-DNT were completely degraded within 10 days and 14 days of incubation, respectively. Addition of the secondary carbon was essential to degrade DNTs, and little degradation was achieved in the absence of the secondary carbons. The effect of additional nitrogens on the degradation of DNTs was evaluated. Complete degradation of DNTs was observed in the absence of any additional nitrogens, whereas DNTs were partially degraded in the growth media with additional nitrogens. Both HPLC and GC-MS were used to detect and verify the residual DNTs and their intermediates. As the results, the HPLC and GC-MS chromatograms demonstrated that the both parent compounds, 2,4-DNT and 2,6-DNT, and respective intermediates, 2-amino-4-nitrotoluene and 2-amino-6-nitrotoluene, could be successfully identified under the analytical conditions.