

## 외부탄소원으로 활성화된 토착미생물에 의한 화약물질(TNT and RDX) 분해 최적화

박지은 · 배범한\*

가천대학교 토목환경공학과

## Optimization of Explosive Compounds (TNT and RDX) Biodegradation by Indigenous Microorganisms Activated by External Carbon Source

Jieun Park · Bumhan Bae\*

Department of Civil & Environmental Engineering, Gachon University

### ABSTRACT

Contamination of explosive compounds in the soils of military shooting range may pose risks to human and ecosystems. As shooting ranges are located at remote places, active remediation processes with hardwares and equipments are less practical to implement than natural solutions such as bioremediation. In this study, a series of experiments was conducted to select a suitable carbon source and to optimize dosing rate for the enhanced bioremediation of explosive compounds in surface soils and sediments of shooting ranges with indigenous microorganisms activated by external carbon source. Treatability study using slurry phase reactors showed that the presence of indigenous microbial community capable of explosive compounds degradation in the shooting range soils, and starch was a more effective carbon source than glucose and acetic acid in the removal of TNT. However, at higher starch/soil ratio, i.e., 2.0, the acute toxicity of the liquid phase increased possibly due to transformation products of TNT. RDX degradation by indigenous microorganisms was also stimulated by the addition of starch but the acute toxicity of the liquid phase decreased with the increase of starch/soil ratio. Taken together, the optimum range of starch/soil ratio for the degradation of explosive compounds without significant increase in acute toxicity was found to be 0.2 of starch/soil.

**Key words :** Biodegradation, Carbon source, Indigenous microorganisms, RDX, TNT

### 1. 서 론

화약물질(Explosive compounds)은 외부 충격이나 정전기, 열 등을 가하면 급격한 화학반응이 발생하고, 고온 고압 및 고속으로 가스를 생성하여 주위로 충격파를 발생하는 물질을 말한다(US EPA, 2005). 화약은 특수목적으로만 사용되며, 건설부문에서 발파 및 폭파에 이용되는 상용화약물질과 군용 탄약, 포탄 및 추진제 등에 사용하는 군용 화약물질로 구분된다. 이 중에서 군용화약물질은 2차 대전 전후에 발명된 3종 화약물질, TNT(2,4,6-trinitrotoluene), RDX(Royal Demolition explosive, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) 및 HMX(High Melting Explosive,

Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine)이 가장 대표적이고 현재까지도 널리 사용되고 있다(Akhavan, 1998). 그러므로 화약물질에 의한 환경오염은 화약물질 생산공장, 탄약저장소, 군 사격장, 불발탄 야외소각 및 야외처리장에서 빈번히 발생하며, 모든 국가가 국방산업을 유지하기 때문에 전세계적 문제로 대두되고 있다(TTCP 2008). 우리나라도 예외는 아니어서 국내 군사격장 개황 및 정밀조사 결과, 포사격장 피탄지 토양에서 3종의 화약물질이 모두 검출되었고(Korea Water Co., 2002), 피탄지 토양에 부착된 화약물질이 강우시 토사와 함께 지표로 유출되어 하천으로 유입되었다(Park et al., 2008). 이에 국방부(Ministry of Defense, MoD)에서는 사격장 오염물질

\*Corresponding author : bhbae@gachon.ac.kr

Received : 2014. 3. 26 Reviewed : 2014. 4. 9 Accepted : 2014. 4. 10

Discussion until : 2014. 8. 31

배출을 저감하기 위한 침전지를 사격장에 건설하고 있다 (MoD, 2002).

화약물질은 구조적으로 난분해성 물질일 뿐 아니라, 독성이 강하여 자연계로 배출될 경우 인간 및 생태계에 악영향을 준다(ATSDR, 1996). TNT와 RDX는 미국 EPA 기준 C급 발암물질로 TNT는 간 손상, 피부발진과 백내장을 유발하고, RDX는 전립선 및 신경계통 손상, 기관손상 등을 일으키는 것으로 보고되었다(USEPA, 1997; USEPA, 1998). 미국 EPA에서는 TNT와 RDX를 음용수 Candidate Contaminants List(CCL)로 지정하였고, 음용수 건강권고기준도 2 ug/L로 매우 낮게 규정하고 있다 (US EPA, 1994 & 2009). 또한, 영·미권 5개국 군사협력교류 프로그램인 TTCP(The Technical Cooperation Program)에서도 화약물질에 대한 인체건강, 토양생태계 및 수생태계로 구분하여 환경기준을 설정하는 연구를 공동으로 진행하고 있다(TTCP, 2008).

화약물질은 고도로 산화되어, 자연계에 존재하는 분해자(미생물)에 의하여 쉽게 분해되지 않는 난분해성 물질로, 일부 미생물에 의해 분해될 수 있으나 성장을 지속할 충분한 에너지원으로는 부족하기 때문에 생물학적 분해속도가 매우 느려 환경에서 오래 잔류하며 독성을 발휘한다 (McCormick et al., 1976 & 1981). 그러나 지속적인 연구에 의해 TNT와 RDX를 혐기 혹은 호기성 조건에서 완전 무기화하는 다수의 박테리아와 곰팡이가 화약물질 오염토양에서 분리·동정되었고, 이 미생물들에 의한 전환산물 및 분해 경로는 총설 논문에서 상세히 수록되어있다 (Hawari et al., 2000). Rylott et al.(2011)은 화약물질 분해에 작용하는 효소 및 유전자에 대한 총설 논문에서 nitroreductase, pentaerythritol tetranitro reductase, xenobiotic reductase *XenB* 등에 의해 환원된 후, Meisenheimer dihydride 복합체 등에 의해 nitrite가 제거되는 TNT 분해 경로를 제시하였고, RDX를 분해하는 cytochrome P450 유사효소인 *Xpl A/B*가 TNT 환원효소인 *XenA* 및 *XenB*에 비해 RDX 분해 활성이 높았으며, *Rhodococcus* sp.에서만 발견된 이 효소 동족체(homologue)가 다른 미생물들에서도 발견되는 것은 수평적 유전자 전달에 기인한다고 하였다.

단일미생물을 이용한 화약물질 오염토양 정화시 토착미생물과의 경쟁우위 여부가 불확실하며, 화약물질 오염토양에는 이를 분해하는 토착미생물이 존재한다. 또한, RDX는 탄소원이 아닌 질소원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 다른 연구자들은 화약물질의 생물학적 분해를 증진하기 위하여 다양한 외부탄소원을 주입하는 연구를 수행하

였다. Bruns-Nagel et al.(1996)은 토양칼럼실험에서 TNT (70~2,100 mg/kg)로 오염된 토양에 포도당 혹은 포도당+황산암모니아를 주입하면 TNT 농도가 90% 이상 감소하였고, 독성과 최기형성(teratogenicity)도 감소한다고 보고하였다. 이는 화약물질 초기 환원에 필요한 nitroreductase는 모든 미생물에 내재되어 있어, 미생물에 필요한 에너지원을 추가로 공급하면 화약물질을 여분의 에너지로 분해하는 공대사(cometabolism)가 일어나기 때문이다(Esteve-Nunez et al., 2001). Coleman et al.(1998)은 화약물질 오염토양에서 RDX를 질소원으로 사용하는 *Rhodococcus* sp., strain DN22를 분리하여 최소배지에 배양했을 때, 질소원(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)를 주입하면 RDX 분해가 저해되었지만, 귀리 왕겨를 첨가하면 미생물 성장이 증가되고 21일내 RDX 90%가 제거됨을 보고하였다.

Adrian et al.(2003)은 메탄발효혼합균주를 이용한 3종 화약물질(TNT, RDX 및 HMX) 분해 실험에서, 기본배지에 에탄올, propylene glycol(PG), 부틸산 혹은 수소가스를 첨가하며 화약물질 분해도를 조사하였다. 그 결과, 배양 29일 후 미첨가군에서는 화약물질 분해가 전혀 일어나지 않았으나, 외부탄소원 첨가군에서는 TNT와 RDX는 완전히 제거되었고, HMX는 에탄올 첨가군에서 53%, 수소첨가군에서 40% 및 PG 첨가군에서 22%가 제거되었다. Zhao et al.(2003)는 호기성 조건에서 외부탄소원(포도당)을 첨가한 경우, *Clostridium bifermentans* HAW-1이 RDX를 mononitroso-RDX, dinitroso-RDX, 및 trinitroso-RDX로 환원한 다음, methanol, formaldehyde 및 CO<sub>2</sub>로 분해하는 것을 보고하였다. Davis et al.(2004)는 토양 내 생물학적 활성화지역(BAZE, biologically active zone enhancement)을 모사한 칼럼실험을 수행하면서, 초산, 에탄올, 용해성 전분 및 초산 + 암모니아를 전자공여체로 하여 RDX 제거에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과, 초산을 첨가할 경우 대조군에 비해 RDX 제거속도가 4.6~5.3배 증가하였지만, 암모니아를 첨가한 경우에는 RDX 분해에 영향을 미치지 않았다. 용해성 전분을 첨가한 경우에는 RDX 제거율이 증가되었으나, MicroTox로 측정된 발광미생물 급성독성값이 증가하여 RDX 분해산물 독성이 증가한다고 보고하였다. Fuller et al.(2005)는 현장조건을 모사한 토양층진 칼럼실험에서 표토에 화약물질(TNT, RDX 및 HMX)을 살포하고 강수를 모사하여 물을 살포한 결과, 외부 탄소원으로 토탄(peat moss)과 콩기름을 첨가한 칼럼에서 화약물질 제거율은 대조군에 비하여 우수하였으나, 토탄만을 첨가한 칼럼에서는 TNT와 HMX제거는 우수하였지만, 칼럼유출수에서 RDX 농

도가 증가하였다. 유사하게, 미국 DoD(Department of Defense)에서는 RDX와 HMX 오염 지하수를 처리하기 위해 mulch로 충전한 생물벽체공법을 개발한 바 있다(U.S. DoD, 2008).

화약물질 제거를 위해 외부에서 화학물질을 공급하는 것이 항상 긍정적 효과를 주지는 않는다. Thompson et al.(2005)은 RDX를 탄소 및 질소원으로 사용해 완전히 분해할 수 있는 두 종의 미생물 *Williamsia* sp. KTR4 and *Gordonia* sp. KTR9를 분리하였는데, 외부에서 질소를  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 공급하면 KTR9 미생물의 RDX 분해능은 저해를 받았으나, KTR4 미생물에는 영향을 주지 않았다. Ringelberg et al.(2005)는 화약물질로 오염된 불포화 토양에 용매 아세토니트릴을 첨가하면 토착미생물의 성장을 저해하여 RDX의 생물학적 분해에 악영향을 준다고 보고하였다.

군에서는 사격장 오염물질 유출을 방지하기 위한 침전지를 설치하고 있다. 군사시설이 외딴 곳에 위치해 침전지 이외의 시설 설치와 유지관리가 매우 어려우며, 국내 사격장은 장기간 운영되어 자연적으로 순화 및 변이, plasmid를 통한 화약물질 분해 유전자 습득 등을 통하여 화약물질 분해능을 가진 토착미생물이 발달했을 가능성이 높다. 그러므로 침전지 퇴적토에 잔류한 화약물질을 제거하기 위하여 외부탄소원 주입으로 토양 내 토착미생물군의 활성을 증진하는 생물학적증진공법이 자연적이고 친환경적이며, 유지관리가 간편한 장점으로 매우 적절한 공법이라 할 수 있다. 본 연구에서는 사격장에 건설된 침전지 퇴적토 내 화약물질을 원위치(*in situ*)에서 토착미생물에 의해 생물학적으로 분해하기 위한 탄소원을 선정하고, 분해산물로 인한 처리 매질의 독성이 증가하지 않는 최적조건(주입비율)을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

## 2. 실험방법 및 분석방법

### 2.1. 실험방법

실험에 사용한 토양은 인공오염을 시키지 않고, 현장토착미생물을 활성화한다는 실험목적에 의해 군에서 운용중인 경기도 OO 사격장 피탄지 토양을 분석하여 사용하였다. TNT로 오염된 토양은 OO1 사격장에서, RDX 오염 토양은 OO2 사격장에서 각각 채취하여 실험에 사용하였다. 심도 0~30 cm에서 채취한 토양은 암소에서 풍건한 다음 30번 체로 체가름하여 토양 균질성을 확보하고 3배수 실험으로 처리군 간의 오차를 최소화하였다. 외부 탄소원은 2차오염이 없는 물질 중에서 가장 단순하면서 구

입, 보관, 적용 및 관리가 간단한 포도당, 초산, 및 전분으로 하였다.

탄소원의 종류를 결정하기 위해 TNT 오염토양으로 예비실험을 실시하였다. 화약물질이 흡착되지 않는 50 mL 플라스틱 바이알에 사격장 토양시료 10 g을 넣고, 탄소원으로 포도당, 초산 및 전분 1.0 g을 각각 투입하였다. 그 후, 멸균한 DIW 30 mL을 첨가하여 25% 슬러리 반응조를 만들고, 플라스틱 캡으로 밀봉하였다. 준비된 반응조는 빛이 차단된 항온교반기에서 25°C, 150 rpm으로 교반하면서, 주기적으로 액상시료 2.5 mL을 채취하고 화약물질 농도를 측정하였다. 실험 완료 후, 슬러리 반응조 토양을 암소에서 풍건하고, 화약물질을 추출하여 화약물질과 분해산물의 농도를 측정하였다. 이 때, 대조군(Control)을 포함한 모든 실험은 3배수로 하였다.

적절한 탄소원이 예비실험을 통해 결정된 다음, 주입할 외부탄소원의 최적주입량을 결정하기 위해 전분/토양(S/S) 비율을 변화하면서 동일한 슬러리 반응조 실험을 실시하였다. TNT 분해실험에서는 S/S 비율을 0.01~2.0까지 단계별로 증가하였고, RDX 실험에서는 0.01~1.0까지 변화하였다. 슬러리 반응조 실험이 종료되는 시점에서 액상시료를 채취하여 Microtox와 동등한 성능을 가진 Lumis Tox(Hach-Lange, UK)로 급성독성을 측정하였다.

### 2.2. 분석방법 및 화학물질

토성은 270 mesh 체로 모래를 먼저 거르고, 침강 실린더로부터 1회에 미사와 점토를, 2회에 점토를 취하는 pipette method(Gee and Bauder, 1986)를 이용하였으며, 토성삼각표로 결정하였다. 토양 pH는 습윤토양 5 g에 증류수 25 mL을 넣고 1시간 진탕 후 pH meter로 측정하였다(US. EPA, 2007). 급성 독성은 LumisTox를 사용하여 측정하였는데, *Vibrio fischeri*를 재활성화하여 NaCl 2% 용액으로 보정한 시료에 넣고, Lumis mini로 대조군과 시료첨가군에서 발생하는 광자량의 차이를 측정하여 발광저해도를 계산하였다.

토양 및 액상 화약물질과 부산물 농도는 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 Varian Prostar Gradient System(240 solvent delivery module, 335 photodiode array detector, 410 autosampler, 500 column valve module)로 구성되어 있으며, HPLC 분석 조건은 유량 0.8 mL/min(Methanol : Water = 55 : 45)와 190 nm~600 nm scanning mode이며, 주입시료량은 20  $\mu\text{L}$ 이고 정량은 UV 230 nm에서 실시하였다. 액상 시료는 15,000 rpm에서 약 3분간 원심분리한 후 상정수를 0.2  $\mu\text{m}$ 의 공

**Table 1.** Physico-chemical properties of the shooting range soils used in the experiments

Soil	Soil pH	% Clay	% Silt	% Sand	% Organic carbon
TNT soil	6.63	4.18	32.34	63.48	3.52
RDX soil	7.23	3.25	28.50	68.25	2.61

극을 가진 PTFE 주사기 필터로 여과하여 분석하였다. 토양 내 화약물질은 암소에서 약 2일 간 완전히 풍건한 다음, 10 g 토양 당 20 mL의 아세트니트릴을 넣고, 30°C 이하의 초음파 수조에서 18시간 추출하였다. 추출액은 50,000 mg/L CaCl<sub>2</sub> 용액과 1 : 1로 섞어 30분간 토양을 침강시키고 상정액을 0.2 µm의 공극을 가진 PTFE 주사기 필터로 여과한 다음 분석하였다.

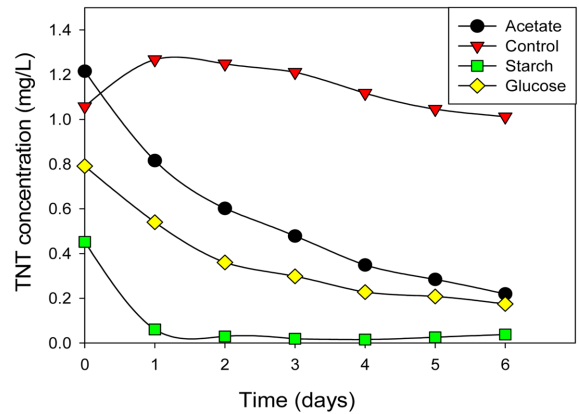
정량에 사용한 TNT 및 RDX 표준용액은 AccuStandard (New Haven, CT, USA)에서 구매하였고, RDX 전환 산물인 mono-nitroso RDX(MNX), di-nitroso RDX(DNX) 및 tri-nitroso RDX(TNX)는 SRI International(Menro Park, CA, USA)의 Dr. R. Spanggord께서 공여해 주었다. 그러나 기술등급(technical grade)이어서 부산물 확인만 가능하고 정량할 수는 없었다. 추출에 사용된 용매는 HPLC급이었고, 다른 화약물질은 ACS급이었다. 실험에 사용된 탈이온수는 고순도(18.3 MΩ·cm)이었다.

### 3. 결과 및 토의

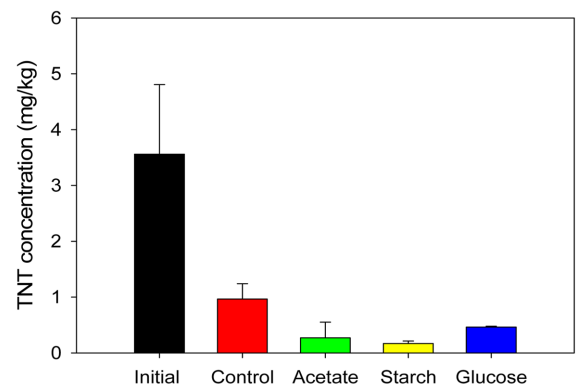
#### 3.1. 탄소원 선정실험

실험에 사용된 사격장 토양의 물리화학적 특성은 Table 1과 같이 토성은 sandy loam이며, pH는 6.63~7.23이었고, 강열감량으로 측정된 유기물 함량은 TNT 오염 토양이 3.52%로 조금 높고, RDX 오염토양은 2.61%로 낮았다.

슬러리 반응조에서 탄소원 첨가 후, 액상 TNT 농도 감소는 Fig. 1과 같이 전분 > 포도당 > 아세트산의 순서로 빨랐으며, 대조군에서 가장 느렸다. 전분은 포도당이 glucosidic 결합된 물질로 기본 구조는 동일하다. 기본적으로 같은 물질임에도 불구하고 포도당 첨가군에 비해 전분 첨가군에서의 TNT 분해 속도가 빠른 것은, 포도당은 첨가와 동시에 용해되어 화약물질을 분해하지 않는 토착미생물들에 의해 빨리 섭취된 반면, 전분은 포도당에 비해 용해가 느려, 토착미생물에게 지속적인 탄소원으로 작용했기 때문이라 사료된다. 대조군에서는 액상 TNT는 초기에 증가하였다 감소하는데, 이는 토양에서 액상으로 용해가 발생한 것이며, 다시 감소한 것은 제거 속도가 늦지만 현장 토양 조건에서도 토양 유기물과 토착미생물로 인해 TNT가 분해됨을 의미한다.



**Fig. 1.** TNT concentrations in the liquid phase of slurry reactor amended with different carbon sources.



**Fig. 2.** Comparison of remaining TNT concentrations in the solid phase of slurry reactor amended with different carbon sources after 7 days of incubation.

실험 7일 후, 토양에 잔류하는 화약물질의 농도를 측정 한 결과(Fig. 2), 초기 토양 내 TNT 농도 3.56 mg/kg에서 대조군은 0.96 mg/kg으로 73% 제거된 반면, 포도당 처리군은 87%, 초산 처리군은 91%, 전분 처리군에서는 95%가 제거되었다. 이상의 결과는 토착미생물이 화약물질을 분해할 수 있고, 외부탄소원으로 인해 화약물질 분해능이 증진됨을 증명하고 있다. 또한 액상 및 고상에서 가장 많은 TNT가 제거된 전분을 외부탄소원으로 선정하였다.

#### 3.2. TNT 제거를 위한 전분 최적 주입량

토양 10 g당 전분 주입량 변화가 액상 TNT 제거, 토

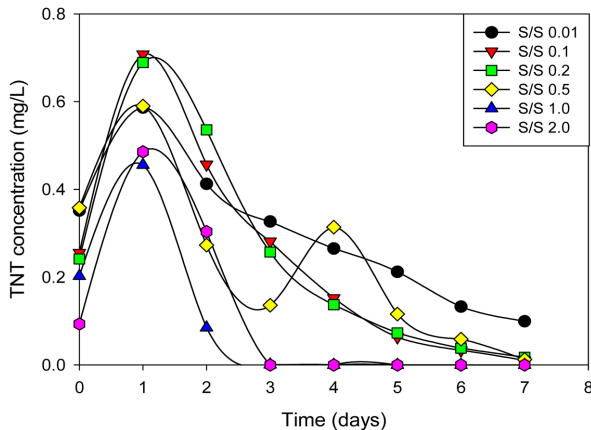


Fig. 3. TNT concentrations in the liquid phase of slurry reactor incubated with varying ratio of starch/TNT contaminated soil.

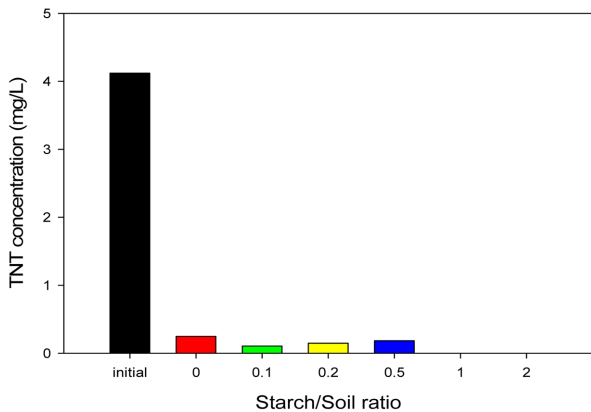


Fig. 4. TNT concentrations remaining in the solid phase of slurry reactor incubated with varying ratio of starch/TNT contaminated soil.

양 잔류 TNT 및 반응산물 독성에 주는 영향을 실험하였다. 전분/토양 비율을 0.01~2.0으로 변화하면서 동일한 실험을 실시한 결과는 Fig. 3~4와 같다. 초기 약 1일까지는 토양입자에 부착된 TNT가 액상으로 용해되는 속도가 미생물에 의한 분해속도보다 빨라 액상 내 TNT 농도가 증가하였으나, 이후 토착미생물이 활성화되어 생물학적 분해속도가 증가하면서, 액상 내 TNT 농도도 감소하였다. 생물학적 분해에 의한 TNT 제거속도는 전분/토양 비에 비례하였다. 즉 외부탄소원인 전분을 많이 넣을수록 TNT 농도도 빨리 감소하였다. 실험 종료 후 토양 잔류 TNT 농도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 초기 토양의 TNT 농도는 4.12 mg/kg이었으나, 전분/토양 비율이 0.1~0.5인 경우 0.10~0.18 mg/kg의 TNT가 잔류하였고, 전분/토양 비율이 1.0 이상에서는 모두 제거되었다. 반응 종료시 액상 DO(Dissolved Oxygen)를 측정된 결과, 전분/토양 비율이 0.2 이하에서는 0.2~0.3 mg/L이었고, 비율이 높아질

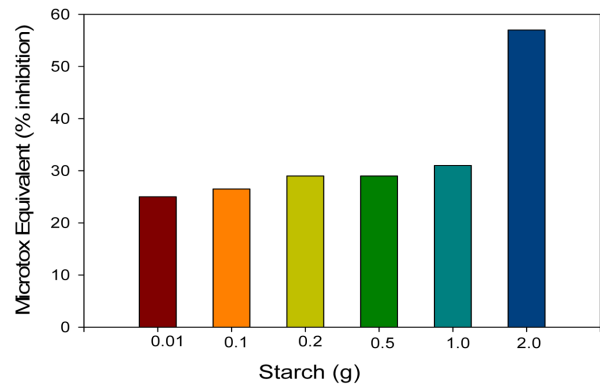


Fig. 5. Acute toxicity of the liquid phase in TNT slurry reactor at day 7.

수록 혐기성 상태가 유지되었다.

TNT 감소는 생물학적 분해가 주원인이겠지만, 생물학적 환원산물인 hydroxyl-aminodinitrotoluenes 및 2,4,6-triaminotoluene이 토양 점토 및 휴믹질에 비가역적으로 흡착되어 제거된다(Daun et al., 1998). 잘 알려진 바와 같이 nitro-기가 생물학적으로 환원되는 과정에서 발생하는 hydroxylamino-기와 amino-기 사이의 무생물학적 coupling 반응에 의해 독성이 강한 azoxy 화합물이 생성되고(McCormick et al., 1976), 또한 혐기성 조건에서 TNT 분해시 주입한  $^{14}\text{C}$  총량의 9.7%가 미지의 극성물질로 축적되었고, 호기성 조건으로 연속하여 처리할 경우에만 모두 제거되었다(Achtnich et al., 2009). 본 연구에서도 TNT 분석 크로마토그램에서 극성 미지물질이 축적되어 완전히 제거되지 않았다. 이에 액상시료를 채취하여 급성독성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 전분/토양 비율이 0.01일 때 발광저해율은 26.5%로 control 25%와 비교하여 큰 차이가 없었다. 전분/토양 비율이 증가하면서 발광저해율은 조금씩 증가하다가, 전분/토양 비율 1.0에서는 31%로, 2.0인 경우에는 57%로 크게 증가하였다. 따라서 TNT의 빠른 생물학적 전환이 오염물질의 독성 저감과는 일치하지 않으며, 높은 전분/토양비율에서 독성이 증가함이 확인되었다. 이상의 액상 TNT 제거율, 토양 잔류 TNT 농도, 액상 급성독성을 종합하면 TNT 제거에 대한 전분/토양 최적비율은 0.01~0.1이라 판단된다.

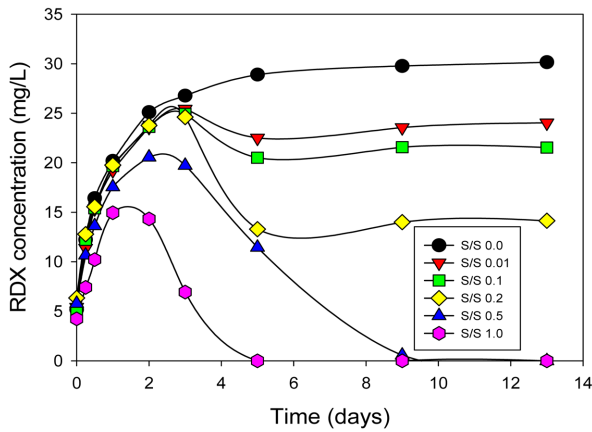
### 3.3. RDX 제거를 위한 전분 최적 주입량

경기도 지역 OO2사격장에서 채취한 RDX 오염토양을 사용하여 RDX 제거를 위한 최적 주입량 실험을 실시하였다. 전분/토양 비율은 무첨가구, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0으로 변화하고, 상기한 방법과 동일하게 슬러리 반응조

**Table 2.** Liquid phase pH at day 13 in slurry reactor amended with different ratio of starch/RDX contaminated soils

pH	Control	Starch/Soil ratio				
		0.01	0.1	0.2	0.5	1.0
Average	7.23	7.13	7.00	6.98	6.82	6.63
Stdev	0.06	0.02	0.02	0.01	0.02	0.04

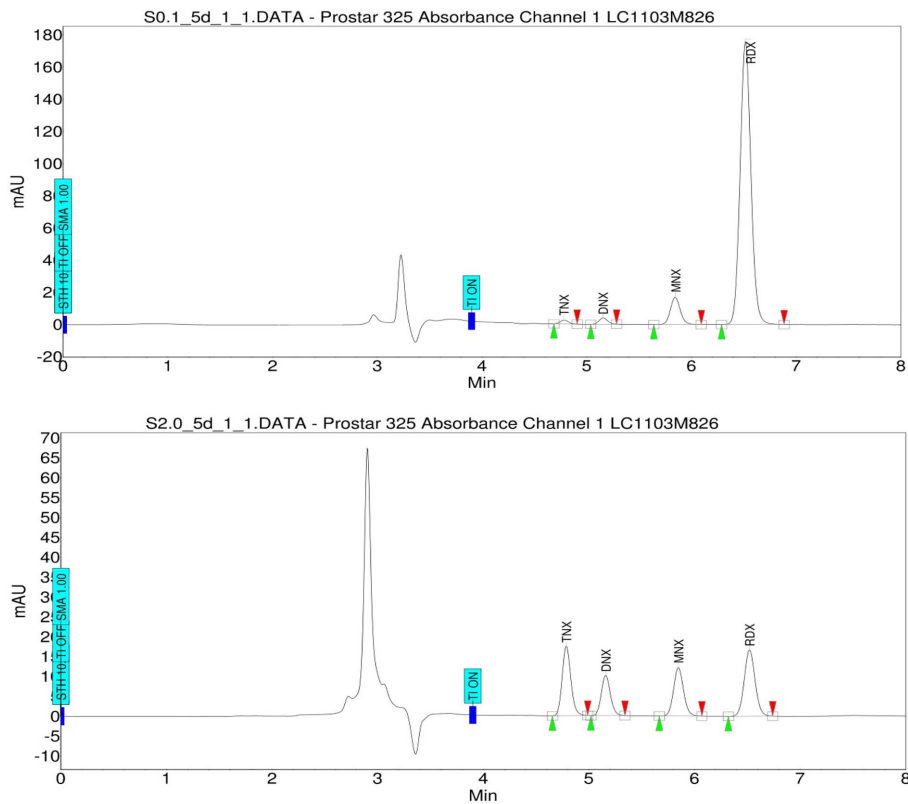
\*S/S = Starch (g) / Soil (g) ratio



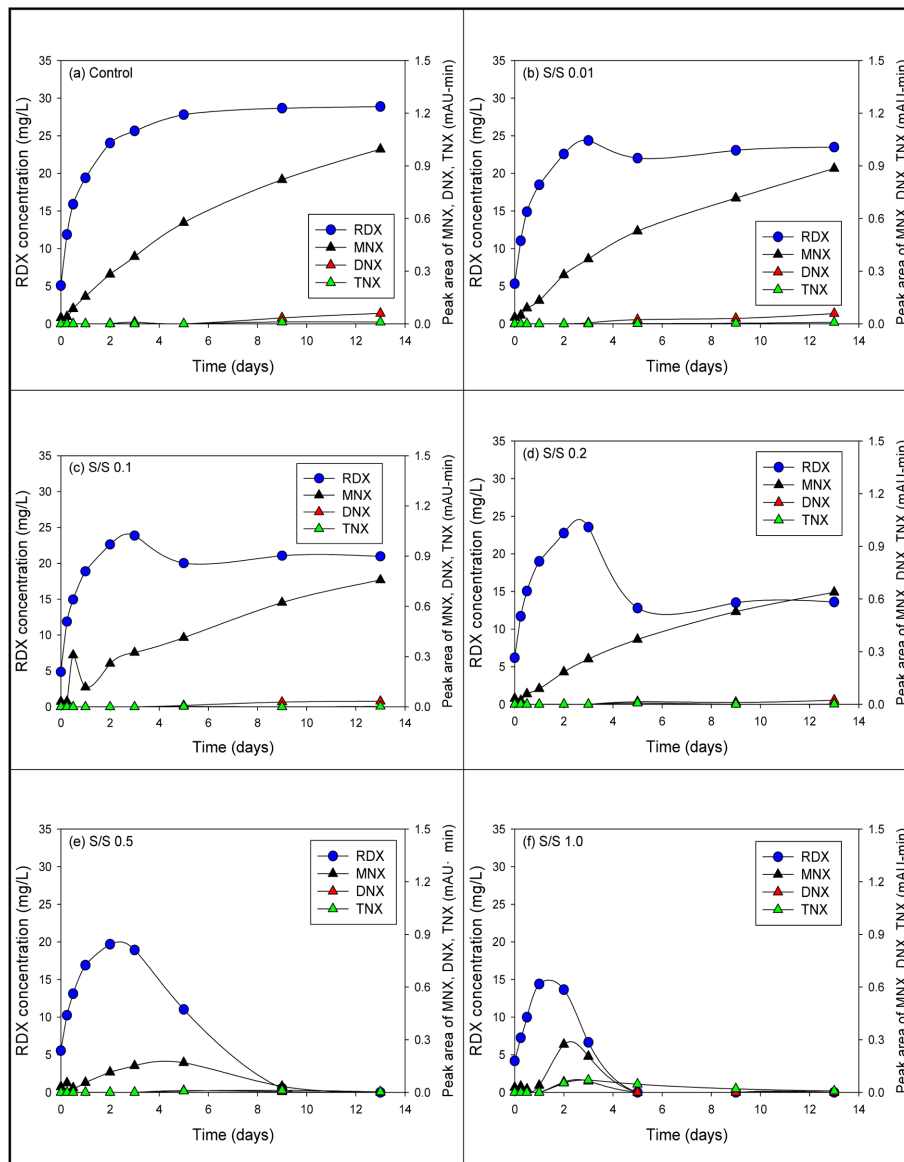
**Fig. 6.** Liquid phase RDX concentrations in slurry reactor incubated with varying ratio of starch/RDX contaminated soil.

를 운영하였다. 실험은 RDX 제거가 TNT 제거에 비해 속도가 느려서 13일간 계속하였다. 실험이 종료된 다음 반응조 pH는 Table 2와 같이 전분주입량이 증가할수록 감소하였다. 이는 반응조가 미호기성/혐기성 상태로 유지되었기에 여분의 탄소원이 산발효로 유기산을 생산하였기 때문이라 판단된다.

액상 RDX 농도변화는 Fig. 6와 같다. 대조군 반응조 액상에는 토양으로부터 RDX가 지속적으로 용해되어 13일 후에 30.2 mg/L까지 증가하였다. 반면, 전분 첨가 반응조에서는 첨가량에 따라 1~2일 동안 농도가 증가하다가 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 전반적으로 전분/토양 비율이 높을수록 반응조 액상 RDX 농도는 빨리 감소하였고, 그와 함께 환원산물인 MNX, DNX 및 TNX



**Fig. 7.** Liquid phase chromatogram showing concomitant increase of reduced RDX metabolites and decrease in RDX concentration at day 5. (a) starch/RDX contaminated soil ratio of 0.01, (b) starch/RDX contaminated soil ratio of 0.2.



**Fig. 8.** Reduction of RDX and accumulation of three RDX metabolites in the liquid phase of slurry reactor amended with different ratio of starch/RDX contaminated soil.

가 증가하였다. RDX 고리에 있는 3개의 nitro-기가 각각 환원되면서, mononitroso-RDX(MNX), dinitroso-RDX(DNX) 및 trinitroso-RDX(TNX)가 연쇄적으로 생성된다(McCormick et al., 1981). 본 연구에서도 3종의 환원산물이 관측되었으며(Fig. 7), 액상 내 MNX, DNX 및 TNX 농도는 전분/토양 비율이 높은 반응조에서 RDX가 빨리 환원되어 제거될수록 더 많은 양이 반응조 액상에 축적되었다. 동일한 시간(5 days)에 채취한 액상시료 분석 결과를 보면, S/S 비율이 0.01인 경우(0.1 g-전분/10 g-토양)에서는 화약물질의 피크면적이 RDX > MNX > DNX > TNX의 순이었다. 이후 전분/토양 비율이 점차 증가함에

따라 외부탄소원에 의한 미생물 활성화로 RDX 환원제거량이 증가하고, 동시에 환원산물 피크도 증가하여 마침내 TNX > RDX > MNX > DNX의 순으로 변경되었다.

액상 RDX와 3종 환원산물의 거동은 Fig. 8과 같다. TNT 실험에서와 같이 외부탄소원을 첨가하지 않은 대조군에서도 RDX 환원이 일어났다. 이는 토양에 있는 약 3% 정도의 유기물중 일부를 탄소원으로 이용하는 것으로 판단되는데, 충분한 에너지를 추출할 수 없어 RDX 전환율은 낮았고, MNX가 가장 많이 축적되었다. 그러나 두 물질 모두 13일이 지난 다음에도 여전히 증가하고 있어 RDX의 분해는 요원한 것으로 보인다. MNX는 수중에서

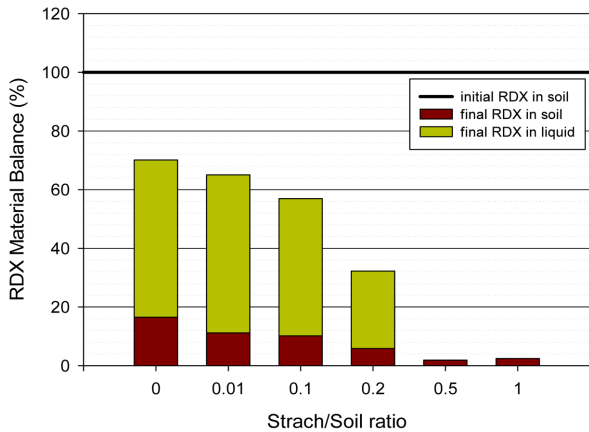


Fig. 9. Material balance of RDX in slurry reactor at the end of incubation (Day 13).

가수분해되는 불안정한 물질임에도 불구하고(Zhao, et al., 2002) 반응조 내에서 축적되는 것은 에너지원 부족으로 DNX 및 TNX로의 환원반응이 지체됨을 의미한다.

반면, 전분을 넣은 경우에는 약 3일 후부터 RDX가 감소하는 추이가 나타났고, 전분/토양 비율이 높아질수록 액상 RDX와 3종 환원산물 농도가 빨리 감소하였다. 전분/토양 비율이 매우 높은 0.5~1.0에서는 반응 2일부터 RDX와 3종 환원산물이 동시에 감소하였고 4~10일부터는 미량만이 잔류하였다(Fig. 8e and f). 슬러리 반응조 실험 초기 토양 RDX 농도는 88.8 mg/kg이었고, 실험이 끝난 13일 후 토양에 잔류한 RDX 농도는 대조구에서 29.4 mg/kg, 전분/토양 비율 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0에서 각각 19.8, 18.0, 10.4, 1.68 및 2.16 mg/kg이었다. 대조구 토양에서는 67%가 제거된 반면, 전분/토양 비율 0.01에서는 77.7%가 제거되어 소량의 전분만으로도 10.7% 이상의 제거율이 증가되었다. 액상 RDX와 고상 RDX 농도를 더하여 물질수지를 산정한 결과는 Fig. 9와 같다. RDX에 대한 물질수지에 의하면 대조구에서는 70.1%, 전분/토양 비율 0.01에서는 65.0%, 전분/토양 비율 0.1에서는 56.9%, 0.2에서는 32.2%가 각각 잔류하였고, 전분/토양 비율 0.5 및 1.0에서는 단지 1.89 및 2.43%만이 잔류하였다. 그러나 이 값은 RDX에 대한 물질수지일 뿐이며, 대조군에서 3종의 환원산물(MNX, DNX 및 TNX) 농도가 가장 높았음을 고려한다면(Fig. 8a), 전분 첨가군에 비해 대조군에서는 더욱 많은 양의 RDX가 잔류한 것으로 산정될 것이다.

반응이 완료된 13일 후, 슬러리 반응조 배양액에 대하여 발광미생물을 이용하여 발광저해율을 측정된 결과는 Fig. 10과 같다. 그림에서와 같이 전분/토양 비율이 증가

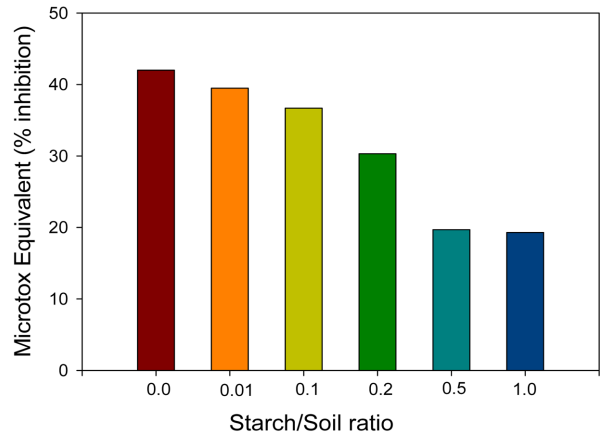


Fig. 10. Acute toxicity of the liquid phase in RDX slurry reactor at the end of incubation (Day 13).

함에 따라 발광저해율(%)은 감소하고 있다. 대조구에서는 발광저해율이 42%인 반면, 전분/토양 비율 0.01에서는 39.5%, 0.1에서는 36.7%, 0.2에서는 30.3%로 크게 낮아지고, 전분/토양 비율 0.5~1.0에서는 저해가 거의 없는 것을 의미하는 19.7 및 19.3%의 발광저해율을 보이고 있다. 전분/토양 비율 0.01~0.2 반응조에서와 같이 RDX 농도가 감소되었음에도 불구하고 독성이 발현되는 것은 환원산물인 MNX, DNX 및 TNX에 기인하는 것으로 판단된다. RDX 전환산물을 이용하여 지렁이에 대한 독성 실험을 한 결과, MNX와 TNX에 노출로 인하여 지렁이 성장이 감소하였고, LOLC(Lowest Observed Lethal Concentration)은 각각 100 및 200 mg/kg-soil이었으며 LOEC(Lowest Effect Concentration)는 각각 50 및 100 mg/kg-soil이었다(Zhang et al., 2006). 다른 연구에서 생쥐에 MNX와 TNX를 경구 투여하여 독성을 조사한 결과, MNX가 전환산물 중에는 가장 독성이 높은 것으로 나타났다(Meyer et al., 2005) 이상과 같은 독성 연구 결과로 미루어 생물학적 처리에서 생성되는 RDX 환원물질인 MNX와 TNX 독성도 매우 높으므로, 이 물질들도 분해되는 배양조건을 제공해야 하며, 군사격장 침전지에서는 본 연구에서와 같이 탄소원 공급량을 증가하는 것이 가장 효과적이고 실용적인 방법일 것이다.

일반적으로 사격장 토양에는 TNT와 RDX가 공존한다. 상기 TNT 실험에서는 전분량을 증가할수록 급성독성이 증가하였고, RDX 분해에는 독성 감소를 위해 전분량을 증가해야 하는 문제가 발생한다. 본 연구 결과에 의하면 토착미생물에 의한 TNT 및 RDX의 제거속도를 높이면서도 독성이 증가하지 않는 범위는 전분/토양 비율 0.2~0.5이었으며 이 비율에서는 화약물질 분해속도가 증가하는



반면 반응조 액상에서의 독성증가가 관측되지 않았다. 이 때 투입하는 전분/토양 비율보다는 전분/화약물질 비율로 계산하는 것이 이론적으로 타당할 것이다. 그러나 전분을 소모하는 주체가 토양미생물이며, 탄소원 공급으로 발생한 여분의 에너지가 화약물질 전환에 사용되는 것이다. 또한 본 연구의 목적이 운영 중인 사격장에 설치된 침전지 퇴적토 내 화약물질 분해 최적화하는 것으로, 배출되는 혹은 퇴적토에 존재하는 화약물질량에 대한 정확한 정보가 없는 상태에서는 토양을 기준으로 하는 것이 보다 실용적일 수 있다고 판단된다.

## 5. 결 론

군 사격장 유출수 제어를 위해 설치된 침전지 퇴적토 내 화약물질(TNT 및 RDX)을 외부탄소원(전분, 포도당 및 아세트산)으로 토착미생물 활성을 증진하여 제거하기 위해 슬러리 반응조를 이용하여 최적의 탄소원 선정 및 주입비율에 대한 연구를 실시하였다. 실험은 사격장 오염 토양을 채취하여 체가름하고, 25% 슬러리 반응조로 만든 다음, 탄소원을 첨가하여 수행하였다.

그 결과, TNT 제거에 가장 효과적인 탄소원은 전분이었다. 최적의 전분/토양 비율을 규명하기 위한 실험에서, 전분/토양 비율이 높을수록 TNT 제거속도는 증가하였으나 배양액내 미지의 극성물질이 축적되었고, 그 비율이 2.0 이상에서는 발광미생물로 측정된 급성독성이 크게 증가하였다. 따라서 TNT 제거를 증진하면서 독성이 증가하지 않는 전분/토양 최적주입비는 0.01~0.1이었다. RDX 오염토양에 전분/토양 비율을 0.01~1.0까지 변화하면서 동일한 방법으로 실험을 수행한 결과, RDX 제거율은 전분/토양 비율이 높을수록 증가하였고 대조군에 비해 최고 30 배 이상 증가하였다. 또한 TNT와는 달리 RDX 처리시에는 전분/토양 비율이 증가할수록 급성독성의 지표인 발광 저해도가 감소하였다. 이는 RDX 전환산물중에서 독성이 높은 MNX, DNX 및 TNX도 모두 분해되었기 때문이라 판단된다.

본 연구의 결과 토착미생물 활성을 높여 화약물질 분해를 증진하면서 독성이 크게 증가하지 않는 최적 전분/토양 비율은 0.2~0.5 범위이었다. 그러나 전분 주입량이 토양에 비해 너무 높아 현실적이지 않고, 침전지에서 분해되지 않은 탄소원이 하천으로 유출된다면 BOD를 유발할 것이다. 또한 침전지 저부가 본 연구에서와 같은 호기성~미호기성 상태가 아님을 고려한다면, 본 연구에서 사용한 시험관 실험보다 규모가 큰 반응조를 이용하여 탄소원 주

입에 따른 침전지 저부에서의 생화학적 변화 및 화약물질 분해에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것이다.

## 사 사

본 연구는 환경부 환경산업기술원 GAIA Project No. 173-111-036 지원으로 수행되었습니다.

## References

- Achtnich, C., Sieglén, U., Knackmuss, H.-J., and Lenke, H., 2009, Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**(11), 2416-2423.
- Adrian, N.R., Arnett, C.M., and Hickey, R.F., 2003, Stimulating the anaerobic biodegradation of explosives by the addition of hydrogen or electron donors that produce hydrogen, *Wat. Res.*, **37**, 3499-3507.
- Akhavan, J., 1998, The Chemistry of Explosives, The Royal Society of Chemistry Information Service, Letchworth, UK.
- ATSDR, RDX Fact Sheet, 1996. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts78.html>
- Bruns-Nagel, D., Breitung, J., von Low, E., Steinbach, K., Gontzy, T., Kahl, M., Blotvogel, K.-H., and Gemsa, D., 1996, Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(7), 2651-2656.
- Coleman, N.V., Nelson, D.R., and Trevor Duxbury, T., 1998, Aerobic biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) as a nitrogen source by a *Rhodococcus* sp., strain DN22, *Soil Biol. Biochem.*, **30**(8-9), 1159-1167.
- Daun, G., Lenke, H., Reuss, M., and Knackmuss, H.-J., 1998, Biological treatment of TNT-contaminated soil. 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1956-1963.
- Davis, L., Wani, A.H., O'Neal, B.R., and Hansen, L.D., 2004, RDX biodegradation column study: comparison of electron donors for biologically induced reductive transformation in groundwater, *J. Hazard. Mater.*, **B112**, 45-54.
- Esteve-Nunez, A., Caballero, A., and Ramos, J.L., 2001, Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene, *Microbiol. and Mol. Biol. R.*, **65**(3), 335-352.
- Fuller, M.E., Lowey, J.M., Schaefer, C.E., and Steffan, R.J., 2005, A Peat Moss-based technology for mitigating residues of the explosives TNT, RDX, and HMX in soil, *Soil Sediment Contam.*, **14**(4), 373-385.
- Gee, G.W. and Bauder, J.W., 1986, Particle-size Analysis, p. 383-411. In A. Klute (ed.) *Method of Soil Analysis: Part 1*, 2nd

- ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, USA.
- Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., and Ampleman, G., 2000, Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 605-618.
- Korea Water Cooperation, 2002, Prediction of Water Quality of Hantan River and Remediation Technology Selection through Remedial Investigation of Darakdae Shooting Range.
- McCormick, N.G., Feeherry, F.E., and Levinson, H.S., 1976, Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 949-958.
- McCormick, N.G., Cornell, J.H., and Kaplan, A.M., 1981, Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 817-823.
- Meyer, S.A., Marchand, A.J., Hight, J.L., Roberts, G.H., Escalon, L.B., Inouye, L.S., and MacMillan, D.K., 2005, Up-and-down procedure (UDP) determinations of acute oral toxicity of nitroso degradation products of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), *J. Appl. Toxicol.*, **25**, 427-434.
- Ministry of Defense, 2002, Remedial Investigation and Counter Measure for Contaminants Dispersion in the Military Shooting Range.
- Park, S.H., Bae, B., Kim, M., and Jang, Y.Y., 2008, Distribution and behavior of mixed contaminants, explosives and heavy metals, at a small scale military shooting range, *Kor. Soc. Water Environ.*, **24**(5), 523-532.
- Ringelberg, D.B., Reynolds, C.M., and Perry, L.B., Foley, K.L., 2005, Effect of Acetonitrile on RDX Biodegradation in an Unsaturated Surface Soil, ERDC/CRREL TR-05-5.
- Rylott, E.L., Lorenz, A., and Bruce, N.C., 2011, Biodegradation and biotransformation of explosives, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 434-440.
- Thompson, K.T., Crocker, F.H., and Fredrickson, H.L., 2005, Mineralization of the cyclic nitramine explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by *Gordonia* and *Williamsia* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(12), 8265-8272.
- TTCP (The Technical Cooperation Program), 2008, Development of Environmental Tolerance Values for Defense Sites Contaminated with Energetic Materials, Annual Report for KTA 4-32-04.
- U.S. DoD, 2008, Treatment of RDX and/or HMX Using Mulch Biowalls, ESTCP (Environmental Security Technology Certification Program), Cost and Performance Report ER-0426.
- U.S. EPA, 1994, Drinking Water Regulations and Health Advisories. Washington, D.C., Office of Water.
- U.S. EPA, 1997, Integrated Risk Information System (IRIS), TNT.
- U.S. EPA, 1998, Integrated Risk Information System (IRIS), RDX.
- U.S. EPA, 2005, Handbook on the Management of Munitions Response Actions, Interim Final, EPA 505-B-01-001.
- U.S. EPA, 2007, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846.
- U.S. EPA, 2009, 2009 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisory, Office of Water, EPA 822-R-09-011.
- Zhang, B., Kendall, R.J., and Anderson, T.A., 2006, Toxicity of the explosive metabolites hexahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triazine (TNX) and hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (MNX) to the earthworm, *Eisenia fetida*, *Chemosphere*, **64**, 86-95.
- Zhao, J.-S., Halasz, A., Paquet, L., Beaulieu, C., and Hawari, J., 2002, Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and its mononitroso derivative hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (MNX) by *Klebsiella pneumoniae* Strain SCZ-1 isolated from an anaerobic sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5336-5341.
- Zhao, J.-S., Paquet, L., Halasz, A., and Hawari, J., 2003, Metabolism of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine through initial reduction to hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine followed by denitration in *Clostridium bifermentans* HAW-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 187-193.