

TNT-분해세균에 의한 s-Triazine계 제초제인 Atrazine과 Simazine의 미생물학적 분해

이명석 · 장효원 · 소재성¹ · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹인하대학교 생물공학과

이 연구는 물리화학적 환경요인에 따른 TNT 분해세균에 의한 s-triazine 계열의 atrazine과 simazine의 분해를 조사하기 위하여 실시되었다. TNT 분해세균은 atrazine과 simazine에 대해서도 높은 분해능을 나타내었다. Atrazine (<50 mg/l)과 simazine (<15 mg/l)은 각각 30 시간과 4 일의 배양기간 중에 완전히 분해되었다. 배양내에서 atrazine과 simazine의 농도가 증가함에 따라 이들의 분해는 지연되었다. 부가 탄소원은 atrazine과 simazine의 분해를 위하여 필수적이었으며 부가 질소원이 없는 상태에서는 분해되지 않았다. Atrazine과 simazine의 분해에서 부가 질소원의 효과에 대하여 조사하였다. Atrazine이나 simazine을 포함하는 성장배지에 부가 질소원이 첨가된 배양에서 배양 기간동안 이들 제초제는 일부만 분해되었다. 그러나 부가 질소원이 첨가되지 않은 배양에서 atrazine과 simazine은 완전히 분해되지 않았다. 이 연구에서 효모추출물의 첨가는 atrazine과 simazine의 분해를 억제하였다. TNT 분해세균은 작은 그람음성의 간균이었다. BIOLOG system을 이용한 생리학적 분석으로 이 균주는 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었다.

Key words □ atrazine, biodegradation, simazine, TNT-degrader

농약은 질병을 일으키는 병원체를 매개하는 곤충으로부터 인간을 보호하고 잡초로부터 농작물을 보호하며, 곰팡이, 곤충, 쥐 등으로부터 농작물과 가축을 보호하기 위하여 사용되고 있다(5). s-Triazine 계열의 농약 가운데 atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine)과 simazine [2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine]은 농업에서 활엽 잡초와 일년생 잔디를 제거하는 제초제로서 전세계적으로 널리 사용되고 있다(15,16,20). 국제농업통계청(National Agricultural Statistics Service)에서는 1990년 미국에서 옥수수 재배를 위하여 사용된 s-triazine 계열의 제초제는 atrazine, cyanazine, simazine 등으로 사용된 양이 약 376,000 톤이었다고 보고하였다(9). 우리나라에서도 s-triazine 계열의 농약 사용이 점차 증가추세에 있으며 그 가운데 simazine은 비교적 널리 사용되는 제초제이다(1). s-Triazine계 화합물들은 반감기($t_{1/2}$)가 평균 57 주(week)로서 수계와 토양에 지속적으로 잔류하는 것으로 보고되어 있다(15). 미국환경보호청(US EPA)에서는 atrazine, cyanazine, simazine과 propazine을 암유발 가능 물질(possible human carcinogens, Group C)로 분류하고 있다(5). s-Triazine계 화합물들은 제초제로서 널리 사용되고 있으며 특히 simazine은 조류(algae)를 제어하는 살조제(algicide)로서의 기능을 포함하고 있어 실내 수영장에서도 흔히 사용하고 있다. Atrazine과 simazine을 포함하는 s-triazine계 화합물들 중 다수가 미국환경보호청에 의해 내분비계교란물질인 환경호르몬으로 인식

되고 있다.

미생물에 의한 s-triazine계 화합물들의 생분해에 대한 연구결과가 많이 보고되어 왔다. Atrazine은 *Agrobacterium radiobacter* J14a에 의한 생분해과정에서 중간대사물질인 hydroxyatrazine과 deethylhydroxyatrazine이 확인되었다(21). *Pseudomonas* sp.의 단일배양과 세균혼합배양에서 ¹⁴C로 표지된 atrazine을 이용하여 ¹⁴CO₂의 방출에 의한 atrazine의 s-triazine 고리가 개열하여 완전히 분해됨을 확인하였다(6,13,14). Atrazine의 분해는 N-dealkylation, 탈염소화 반응과 s-triazine 고리의 분해 등을 포함하는 생물학적 과정들이 주로 나타난다(2). Atrazine의 생분해는 ethyl기나 deisopropyl기의 결가지의 N-dealkylation에 의해서 시작되어 deethylatrazine이나 deisopropylatrazine으로 전환된다. 그리고 탈염소화 반응과 히드록시화 반응에 의해 cyanuric acid의 형태로 전환되며, 결국 s-triazine 고리가 분해되면서 암모니아와 이산화탄소를 생성한다고 보고되었다(15). *Rhodococcus* strain TE1은 atrazine 뿐만 아니라 또 다른 s-triazine 화합물인 propazine, simazine과 cyanazine 등도 분해하였다(2,4). Simazine의 생분해는 진균류인 *Aspergillus fumigatus*에 의하여 두 개의 결사슬에서 탈아민화(deamination) 혹은 탈알킬화(dealkylation)를 통하여 일어난다고 보고되었다(10,11). *Klebsiella pneumoniae* strain 99는 s-triazine계 화합물을 분해하는데, 중간대사물질로서 cyanuric acid와 biuret을 거쳐 요소(urea), 이산화탄소, 암모니아(ammonia)를 최종산물로 방출한다(3,9). s-Triazine계 화합물은 주로 atrazine에 관한 연구를 중심으로 생분해 연구가 이루어져 왔으며 이 화합물의 분해 경로가 제안되었다(17). 최근에는 이를 바탕으로 분자 생물학적인 연구와 미생물의 반응기작에 관한 연

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

구가 보고되고 있다(4,8,15,16).

본 연구에서는 토양으로부터 분리된 TNT 분해세균을 이용하여 TNT와 구조적으로 유사한 *s*-triazine 계열의 농약인 atrazine과 simazine의 생분해에 대한 연구를 실시하였으며, 또한 이 세균이 이들 난분해성 화합물의 분해에 미치는 여러 가지 물리화학적 요인들에 대한 영향을 조사하여 분해의 최적조건을 확립하여 효과적인 관련 화합물의 미생물학적 처리 가능성에 대하여 알아보고자 하였으며 이러한 여러 가지 화합물을 생분해하는 분리세균에 대한 생리학적 특성조사를 병행하여 실시하였다.

재료 및 방법

분해세균의 확보 및 배양조건

이 실험에서 사용된 세균은 전라남도의 폭약으로 오염된 지역의 토양으로부터 농화배양하고 수 차례에 걸친 계대배양을 통하여 TNT 분해능이 탁월한 단일균주를 분리하였다. 분리균주의 배양 및 유지를 위하여 증류수 1 liter에 K_2HPO_4 1.74 g, $MgSO_4$ 0.25 g, NaH_2PO_4 0.6 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mg, $MnCl_2$ 100 mg, $ZnSO_4$ 0.01 mg, Tween 80 1 ml에 TNT를 100 mg를 첨가한 배지를 기본배지(basal medium)로 설정하고, 여기에 부가 기질로서 glucose 2 mM를 첨가하여 생장 배지(growth medium)로 사용하였다(12). TNT 분해실험에 사용된 분리세균을 구조적으로 유사한 *s*-triazine계 화합물인 atrazine과 simazine의 생분해를 위하여 사용하였다. 이 분리세균을 atrazine과 simazine 분해에 적용하기 위하여 기본배지에 TNT 대신에 atrazine과 simazine을 각각 50 mg과 10 mg을 첨가하였으며 Tween 80은 제외한 배지에 농화배양하여 처음 분리된 세균을 접종하였다. 각각 atrazine과 simazine을 포함한 액체배지에서 수 차례의 계대배양을 통하여 atrazine과 simazine에 적용된 분해세균을 확보하였다. 순수배양세균의 접종은 사용배지의 10%를 접종하고 배양온도 30°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 혼합 배양기에서 배양하였다. 분해세균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/vis Spectrophotometer, Jasco Co., JAPAN)를 이용하여 파장 660 nm에서 측정하였다. 분해세균은 GN2 Microplate™ (BIOLOG, Hayward, CA, USA)을 이용한 다양한 기질이용능력을 근거하여 특성조사를 실시하였다. Trypticase soy agar 평판에서 자란 분해세균을 5%의 sheep blood를 포함하는 BIOLOG universal growth agar 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 배양된 세균을 식염수에 희석시켜 GN2 Microplate™에 접종하여 20시간 배양한 후 그 결과를 Biolog's automated Micro-Station™ instrument로 확인하였다.

Atrazine과 Simazine 분해특성

배지내에 존재하는 atrazine과 simazine은 HPLC에 의하여 측정되었다. 사용된 HPLC 시스템은 SPD-10A UV/vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 체계를 사용하였다. 사용 컬럼은 DuPont사의 Zorbax ODS 컬럼 (250 mm×4.6 mm, 입자크기 5 μ m)를 사용하였으며, mobile phase는 HPLC용 isopropanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 증류수를 1:4의

비율로 혼합하여 사용하였다. 이들 화합물의 표준용액 제조는 분석용 atrazine과 simazine을 각각 100 mg, 50 mg, 25 mg, 10 mg, 5 mg, 2 mg을 증류수 1 l에 녹이고 이 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 제조된 atrazine과 simazine 표준용액들은 pore 크기 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 20 μ l Hamilton syringe를 이용하여 HPLC 인젝터내로 주사하였다. 배양액의 잔존 atrazine과 simazine의 분해를 측정하기 위하여 채취시료를 3,500×g에서 10분간 원심분리한 후, HPLC용 증류수에 적당한 비율로 희석하여 pore 크기 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 분석하였다.

Atrazine과 Simazine 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인

분리균주의 atrazine 및 simazine 분해에 미치는 물리화학적 환경요인들의 영향을 비교하였다. TNT 분해세균이 TNT를 포함하는 구조적으로 유사한 atrazine과 simazine을 분해시킬 수 있는지를 조사하여 비교하였다. 분해세균에 의한 농도에 따른 atrazine과 simazine의 분해능을 비교하였다. Atrazine의 경우 50 mg/l, 40 mg/l, 30 mg/l, 20 mg/l과 10 mg/l의 농도로, simazine의 경우는 15 mg/l, 10 mg/l과 5 mg/l의 농도로 하여 새로이 준비된 100 ml의 배지에 전 배양(pre-culture)된 TNT 분해세균을 각각 10% 접종하여 배양기간동안의 각 화합물의 분해능을 비교 관찰하였다. 분해세균에 의한 atrazine과 simazine의 분해에 부가 탄소원의 첨가에 따른 세균의 생장과 분해능을 조사하여 비교하였다. Atrazine이나 simazine을 포함하는 생장배지에 부가 탄소원으로서 glucose 대신에 fructose, acetate, citrate와 succinate 등을 각각 2 mM씩 첨가하여 atrazine과 simazine 분해에 미치는 영향을 각각 관찰하였다. 또한 부가 탄소원이 첨가되지 않은 경우와 첨가된 경우에 atrazine과 simazine 분해에 미치는 영향에 대하여 비교하였다. Atrazine과 simazine을 포함하는 배지에 $(NH_4)_2SO_4$ 또는 NH_4Cl 각각 2 mM씩 첨가하여 질소원의 첨가에 따른 atrazine과 simazine 분해능을 각각 비교 관찰하였다. 부가영양물로서 효모 추출물을 첨가하여 atrazine과 simazine 분해에 미치는 영향을 관찰하였다. Atrazine과 simazine을 각각 포함하는 배지에 150 mg/l의 효모 추출물을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것의 분해세균 생장과 atrazine과 simazine 분해능을 각각 비교 관찰하였다.

결과 및 고찰

분해세균의 분리와 생리학적 특성조사

오염된 국내토양으로부터 농화배양하여 혼합세균을 확보하여 이로부터 TNT를 분해하는 단일 세균을 분리하였으며, 이렇게하여 선별된 세균들은 TNT를 포함하는 액체배지로 옮겨 배양온도 30°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하며 TNT의 분해를 확인하였다. 얻어진 배양은 atrazine과 simazine을 포함하는 배지에 접종하여 적용시켜 분해능 실험에 이용하였으며 일부는 추후의 실험을 위하여 -70°C에서 냉동보관하였다.

분리된 분해세균은 그람염색을 통하여 형태학적 분석을 실시

Table 1. Physiological and biological characterization of the isolate using the BIOLOG Analysis System

| Physiological & biochemical tests | | |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| Water | - | <i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid - |
| α -cyclodextrin | - | Itaconic acid - |
| Dextrin | + | α -ketobutyric acid + |
| Glycogen | - | α -ketoglutaric acid + |
| Tween 40 | + | α -ketovaleric acid - |
| Tween 80 | + | D,L-lactic acid + |
| N-acetyl-D-galactosamine | + | Malonic acid + |
| N-acetyl-D-glucosamine | + | Propionic acid + |
| Adonitol | - | Quinic acid - |
| L-arabinose | - | D-saccharic acid - |
| D-arabitol | - | Sebacic acid - |
| Cellobiose | + | Succinic acid + |
| i-erythritol | - | Bromo succinic acid + |
| D-fructose | - | Succinamic acid - |
| L-fucose | - | Glucuronamide - |
| D-galactose | - | Alaninamide + |
| Gentiobiose | + | D-alanine + |
| α -D-glucose | + | L-alanine + |
| <i>m</i> -inositol | - | L-alanylglycine + |
| α -D-lactose | - | L-asparagine + |
| Lactulose | - | L-aspartic acid - |
| Maltose | + | L-glutamic acid - |
| D-mannitol | - | Glycyl-L-aspartic acid + |
| D-mannose | + | Glycyl-L-glutamic acid + |
| D-melibiose | - | L-histidine - |
| β -methyl D-glucoside | - | Hydroxy-L-proline - |
| Psicose | - | L-leucine + |
| D-raffinose | - | L-omithine - |
| L-Rhamnose | - | L-phenylalanine - |
| D-Sorbitol | - | L-proline + |
| Sucrose | - | L-pyrogutamic acid - |
| D-trehalose | + | D-serine - |
| Turanose | - | L-serine + |
| Xylitol | - | L-threonine + |
| Methylpyruvate | + | D,L-camitine - |
| Mono-methylsuccinate | + | γ -aminobutyric acid - |
| Acetic acid | + | Urocanic acid - |
| <i>Cis</i> -aconitic acid | - | Inosine - |
| Citric acid | + | Uridine + |
| Formic acid | - | Thymidine - |
| D-galactonic acid lactone | - | Phenylethylamine - |
| D-galacturonic acid | - | Putrescine - |
| D-gluconic acid | - | 2-aminoethanol - |
| D-glucosaminic acid | - | 2,3-buthanediol - |
| D-glucuronic acid | - | Glycerol - |
| α -hydroxybutyric acid | + | D,L- α -glycerolphosphate - |
| β -hydroxybutyric acid | - | Glucose-1-phosphate - |
| γ -hydroxybutyric acid | - | Glucose-6-phosphate - |

하였으며 위상차 현미경으로 관찰한 결과 그람 음성세균으로 간균의 형태를 나타내었다. 집락의 색깔은 노란색으로 불투명하였다. 이 세균의 자세한 특성을 조사하기 위하여 BIOLOG Identification System을 사용하였으며, 그 결과 분리세균은 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었다. BIOLOG Analysis System을 사용하여 얻어진 생리학적 특성들은 Table 1에 나타나 있다.

분리세균에 의한 Atrazine과 Simazine의 분해

분리세균은 오염된 토양으로부터 TNT를 분해하는 세균을 농화배양하여 얻어진 세균으로 이를 이용하여 TNT와 구조적으로 유사한 atrazine과 simazine의 분해를 위하여 사용하였다(Fig. 1). 이 분해세균은 이미 TNT 분해에 적응(adaptation)되어있어 TNT 대신에 atrazine이나 simazine을 포함하는 배지에 접종하였을 때 낮은 분해능을 나타내었으나 몇 차례에 걸친 계대배양으로 atrazine 및 simazine을 포함하는 액체배지 내에 적응되면서 분해 세균의 유도기가 짧아지고 분해능도 증가하였다.

분리세균에 의한 TNT, atrazine, 그리고 simazine의 분해와 세균의 생장을 관찰하였다(Fig. 2). 배지내의 atrazine 초기 농도는 50 mg/l 였으며, 배양 6시간에서 24시간 사이에 세균의 생장은 빠른 속도로 진행되었으며, 이에 비례하여 atrazine의 분해도 이루어졌다. Atrazine을 포함하는 액체배지 내에 atrazine은 36시간 이내에 완전히 분해되었다. 미생물에 의한 atrazine 분해연구에서 오염된 토양으로부터 분리한 *Agrobacterium radiobacter* J14a은 50 mg/l atrazine을 72시간만에 94% 분해하였고 (20), *Rhodococcus* strain은 80 μ M의 atrazine을 144시간동안 약 95% 분해하였다 (2). Simazine의 분해와 세균 생장에서 배지 내의 simazine 초기 농도는 10 mg/l였다. 배양후 3일이 경과하는 동안 세균의 생장이 빠르게 이루어졌으며, 이에 상응하여 simazine의 분해도 빠르게 진행되었다. Simazine의 완전분해는 배양 4일 이내에 이루어졌으며, atrazine의 분해에 비해 느린 분해속도를 나타내었다. 이 연구에서 사용된 TNT 분해세균은 TNT 뿐만 아니라 atrazine과 simazine도 분해할 수 있는 독특한 특성을 가졌으며, 위에 서술된 바와 같이 이들 화합물의 분해능에서도 탁월한 것으로 조사되었다.

Atrazine과 Simazine 분해에 영향을 미치는 환경요인

(1) 농도에 따른 영향

Atrazine과 simazine을 다양한 농도에 따른 이들 화합물의 분해능을 측정하기 위하여 glucose를 포함하는 배지에 atrazine의 경우 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l과 50 mg/l의 농도로,

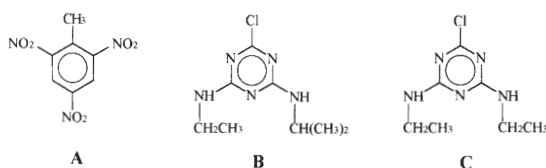


Fig. 1. Chemical structures of the test compounds; TNT (A), atrazine (B), and simazine (C).

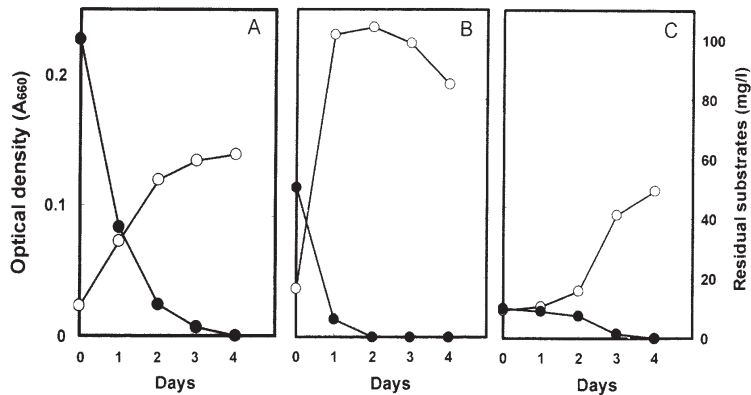


Fig. 2. Growth of test culture, TNT-degrader, measured as cell density (○), associated with the degradation (●) of TNT (A), atrazine (B), and simazine (C).

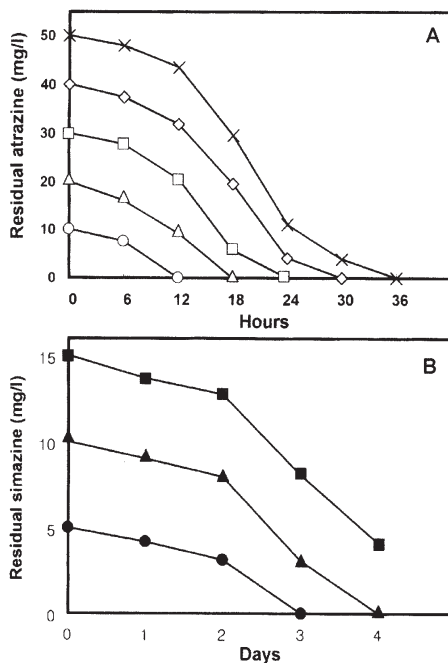


Fig. 3. Time course of the degradation of atrazine (A) and simazine (B) by TNT-degrader. The medium contained 10 (○), 20 (△), 30 (□), 40 (◇), and 50 (X) mg of atrazine per liter, and 5 (●), 10 (▲), 15 (■) mg of simazine per liter, respectively.

그리고 simazine의 경우 각각 5 mg/l, 10 mg/l과 15 mg/l이 첨가된 배지에서 배양하면서 분해세균에 의한 각각의 분해를 조사하였다(Fig. 3). Atrazine의 농도가 증가함에 따라 분해에 소요되는 시간이 길어짐이 관찰되었다. Simazine의 농도가 점차 증가함에 따라 분해가 느려지며, 분해세균의 성장도 이와 관련하여 저하되는 것이 관찰되었다. Simazine은 낮은 농도에서 분해세균에 의하여 사용되었지만, 배지내에 simazine의 농도가 증가함에 비례하여 분해가 느려졌다. 저농도의 atrazine이나 simazine은 분해세균

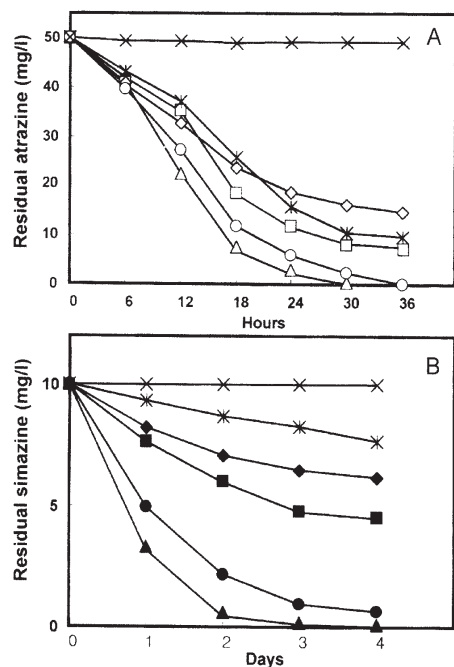


Fig. 4. Time course of the degradation of atrazine (A) and simazine (B) by TNT-degrader in the media, which contained glucose (○, ●), fructose (△, ▲), succinate (□, ■), citrate (◇, ◆), and acetate (▽, ▼) as an additional carbon. No additional carbon was added in the medium (X,X).

에 의해서 이용될 수 있으나 농도가 높아짐에 따라 이 화합물들의 이용에서는 저해작용으로 나타나 분해가 지연되었다. 이는 다른 난분해성 물질에서 나타나는 고농도에 따른 저해효과의 공통된 현상으로 2,4-D나 MCPA 등에서도 보고된 바 있다(18,19)

(2) 부가 탄소원에 따른 영향

Atrazine과 simazine의 분해세균에 의한 분해에 있어서 부가 탄소원이 미치는 영향을 관찰하기 위해 배지 내에 부가 탄소원으로서 각각 glucose, fructose, sodium citrate, sodium acetate 또

는 sodium succinate 등을 첨가하여 비교 관찰하였다(Fig. 4). 부가 탄소원으로서 glucose가 첨가된 배지 내에서 36시간 이내에 atrazine은 완전히 분해되었다. Glucose 대신에 fructose를 첨가한 경우 동일한 농도의 atrazine은 30시간 이내에 완전히 분해되었다. 부가 탄소원으로서 glucose의 첨가 대신에 acetate, citrate, 또는 succinate를 첨가하였을 경우에 atrazine의 분해능이 지연됨이 관찰되었으며, 그 분해율은 주어진 배양기간동안 각각 약 80% 정도의 분해를 나타내었다. 부가 탄소원을 첨가하지 않은 경우에 배지내의 atrazine은 거의 분해되지 않았다. 부가 탄소원의 첨가에 의한 simazine의 효과적인 생분해에 대한 실험도 atrazine과 동일한 조건에서 실시되었다. 배지내에 각각 glucose, fructose, citrate, acetate와 succinate 등을 첨가하여 simazine 분해를 비교, 관찰하였다. 부가 탄소원으로서 glucose가 첨가된 배지 상에서 4일 이내에 simazine의 완전분해가 일어났으며, glucose 대신에 fructose를 첨가한 경우 동일 농도의 simazine은 3일 이내에 완전히 분해되었다. 또한 부가 탄소원으로서 acetate, citrate 또는 succinate를 첨가한 배지에서 simazine의 분해는 현저하게 지연됨을 관찰되었으며, 주어진 배양기간동안 약 35%~55% 정도의 분해를 나타내었다. 부가 탄소원을 첨가하지 않은 경우에 배지내의 simazine은 거의 분해가 되지 않았는데 이러한 결과를 통하여 simazine의 분해에도 TNT나 atrazine에서와 마찬가지로 배지 내에 부가 탄소원의 첨가는 필수적이었음이 입증되었다. 그러나 *Agrobacterium radiobacter* J14a를 이용한 atrazine의 생분해 연구에서 부가 탄소원으로 sucrose를 첨가하였을 경우에 atrazine의 분해율을 증진시키는데 커다란 영향을 주지 못하였다고 보고되었다(21). 이 연구에서 나타난 부가 탄소원의 첨가에 대한 제반 결과는 사용된 세균이 최초 TNT 분해세균의 분리를 위한 농화 배양 조건에 적용되어 atrazine이나 simazine의 분해를 위해서도 동일한 배지조건을 요구하는 것으로 사료된다.

(3) 질소원 첨가에 따른 영향

질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 또는 NH_4Cl 를 배지에 첨가하여 atrazine과 simazine의 분해에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). Atrazine의 분해는 36시간의 배양기간동안 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이나 NH_4Cl 가 첨가된 경우에 각각 약 83%의 부분적인 분해를 나타내었다. 그러나 질소원이 전혀 첨가되지 않은 atrazine을 포함하는 배지에서는 36시간 내에 atrazine이 완전히 분해되었다. 질소원의 첨가는 atrazine의 분해에 효과적이지 못한 것으로 관찰되었다. Simazine의 분해는 배양기간동안 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이나 NH_4Cl 을 첨가한 경우에 약 20-30%의 부분적인 분해를 나타내었다. 반면에 질소원이 전혀 첨가되지 않은 simazine을 포함하는 배지내에서는 4일 이내에 simazine이 완전히 분해되었다. 질소원의 첨가에 따른 simazine의 분해실험에서 분해세균의 생장은 매우 느렸으며 simazine의 분해정도도 낮았다. 이는 동일한 조건하에서 atrazine의 분해실험에서 나타난 왕성한 세균의 생장과 낮은 분해율과 비교되었다. 미생물을 이용하여 산업폐수 내에 포함되어 있는 s-triazines을 효율적으로 제거하는데 있어서 탄소-질소 비율(C/N ratio)이 미치는 영향에 대하여 조사하였는데 C/N=1에서는 거의 분해가 되지 않았으나 C/N=12에서는 분해효율이 크게 증가함이 보고되었다(7). 이것은 본 연구에서 질소원의 첨가에 따라

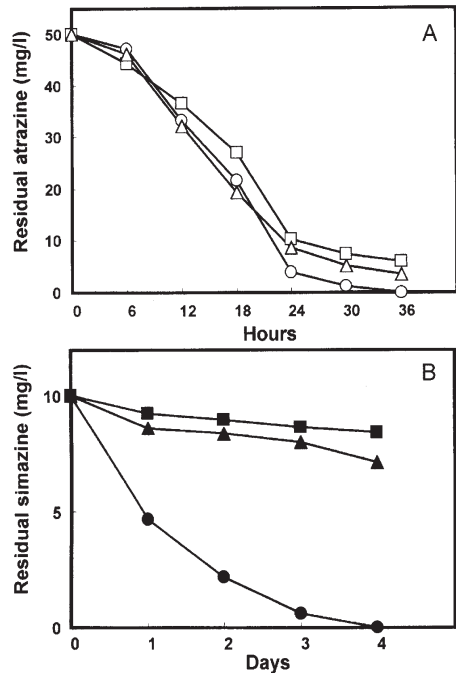


Fig. 5. Time course of the degradation of atrazine (A) and simazine (B) by TNT-degrader in the medium, in the presence of supplemented nitrogen source, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (□, ■) or NH_4Cl (△, ▲) of 2 mM, respectively and in the absence of nitrogen source (○, ●).

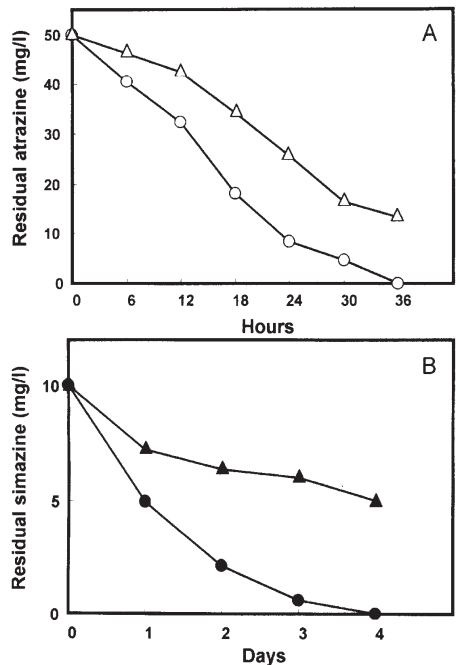


Fig. 6. Time course of the degradation of atrazine (A) and simazine (B) by TNT-degrader in the medium, in the presence of 150 mg yeast extract (△, ▲), and in the absence of yeast extract (○, ●) per liter.

atrazine이나 simazine의 생분해가 감소한다는 사실과 일치하는 결과이다.

(4) 효모 추출물의 첨가에 따른 영향

부가영양물로서 효모 추출물의 첨가에 따른 atrazine과 simazine의 분해능을 알아보았다. 같은 배양 조건에서 효모 추출물 150 mg/10이 첨가된 것과 첨가하지 않은 것을 비교, 관찰하였다(Fig. 6). Atrazine의 분해에 있어서 효모 추출물이 첨가되지 않은 것은 배양기간 36시간동안 완전히 분해되었고, 효모 추출물이 첨가된 것은 65% 정도의 부분적인 분해를 나타내었다. Simazine의 분해에 있어서 효모 추출물이 첨가되지 않은 것은 배양기간 4일 동안 완전한 분해를 나타내었으나, 효모 추출물이 첨가된 배지내의 simazine은 약 50% 정도의 부분적인 분해를 나타내었다. 분해세균의 생장은 촉진되었으나 simazine의 분해율은 감소하였는데 이러한 결과는 atrazine의 실험 결과와 유사하였다.

Atrazine이나 simazine과 같은 제초제는 그 사용 범위와 사용량이 지속적으로 증가하고 있다(1). 그러나 효율적인 이들 제초제의 생분해에 관한 연구는 매우 미진한 상태에 있으며 특히 본 연구를 통하여 얻어진 TNT 분해세균이 atrazine이나 simazine과 같은 s-triazine 계열의 난분해성 유기화합물을 동시에 분해한다는 연구결과는 보고되어진 바가 없다. 혼합배양을 이용하여 s-triazines 생산공장에서 발생하는 atrazine과 simazine, 그리고 다양한 관련 중간 화합물들을 포함하는 산업폐수의 처리에 대한 연구를 실시하였으며 2 l 규모의 반응조에서 120시간의 운전기간동안 폐수에 포함된 약 80%의 s-triazines을 제거하였음이 보고되었다(7). Atrazine에 오염된 토양을 생물복원(bioremediation)하기 위하여 atrazine을 분해하는 세균 *Agrobacterium radiobacter* J14a를 적용시켜 토양으로부터 분해 중간 대사물질인 hydroxy-atrazine, deethylatrazine, deethyl-hydroxyatrazine 들을 검출하였다(21). 본 연구에서 얻어진 연구결과를 토대로 사용된 분해세균을 활용하여 TNT 뿐만 아니라 atrazine, simazine의 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 특성을 최적화시켜 산업적인 생물학적 분해에 적용시킬 수 있으며, 이들 난분해성 화합물들이 제조의 목적으로 atrazine이나 simazine에 의해 오염된 특정 지역에서 이들 화합물들을 효과적으로 제거하여 토양을 생물복원 시키는데 사용될 수 있다고 사료된다. 또한 이러한 독특한 분해능을 가지는 세균은 분자 유전학적인 접근과 병행하여 환경모니터링 시스템의 개발을 위하여 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

참고문헌

1. 농약연보. 2000. 농약공업협회.
2. Behki, R., E. Topp, W. Dick, and P. Germon. 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1955-1959.
3. Cook, A.M. and R. Hutter. 1981. s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 29, 1135-1143.
4. De Souza, M.L., D. Newcombe, S. Alvey, D.E. Crawley, A. Hay, M.J. Sadowsky, and L.P. Wackett. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 178-184.
5. Freedman, B. 1995. *Environmental Ecology*, 2nd ed., p. 213-277. Academic Press. London, United Kingdom.
6. Grossenbacher, H., C. Horn, A.M. Cook, and R. Hutter. 1984. 2-Chloro-4-amino-1,3,5-triazine-6(5H)-one: a new intermediate in the biodegradation of chlorinated s-triazines. *J. Chromatogr.* 48, 451-453.
7. Hogrefe, W., H. Grossenbacher, A.M. Cook, and R. Hutter. 1985. Biological treatment specific for an industrial wastewater containing s-triazines. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1291-1296.
8. Laura, D., G. De Socio, R. Frassanto, and D. Rotilio. 1996. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2644-2646.
9. Kams, J.S. and R.W. Eaton. 1997. Genes encoding s-triazine degradation are plasmid-borne in *Klebsiella pneumoniae* strain 99. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 1017-1022.
10. Kaufman, D.D., P.C. Kearney, and T.J. Sheers. 1965. Microbial degradation of simazine. *J. Agric. Food Chem.* 13, 238-242.
11. Kearney, P.C., D.D. Kaufman, and T.J. Sheers. 1965. Metabolites of simazine by *Aspergillus fumigatus*. *J. Agric. Food Chem.* 13, 369-372.
12. 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.
13. Mandelbaum, R.T., D.L. Allan, and L.P. Wackett. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1451-1457.
14. Mandelbaum, R.T., L.P. Wackett, and D.L. Allan. 1993. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1695-1701.
15. Mulbry, W.W. 1994. Purification and characterization of an inducible s-triazine hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 613-618.
16. Nagy, I., F. Compemolle, K. Ghys, J. Vanderleyden, and R.D. Mot. 1995. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC(s-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2056-2060.
17. North Carolina State University database. 1999. Water resource characterization, DSS-Pesticides/Herbicides.
18. Oh, K.H., S.K. Ahn, K.H. Yoon, and Y.S. Kim. 1995. Biodegradation of the phenoxy herbicide MCPA by microbial consortia isolated from a rice field. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 539-545.
19. Oh, K.H. and M.S. Cha. 1996. Degradation of dimethylamine salt of 2,4-dichlorophenoxyacetate by a mixed bacterial culture in stirred tank reactors. *Biotechnol. Lett.* 18(9), 1035-1040.
20. Radosevich, M., S.J. Traina, Y.-L. Hao, and O.H. Tuovinen. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 297-302.
21. Struthers, J.K., K. Jayachandran, and T.B. Moorman. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3368-3375.

(Received August 23, 2000/Accepted September 5, 2000)

ABSTRACT: Microbial Decomposition of s-Triazine Herbicides, Atrazine and Simazine by a TNT-degrading Bacterium

Myung-Seok Lee, Hyo-Won Chang, Jae-Seung So,¹ and Kye-Heon Oh*(Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. BOX 97, Asan 336-600; ¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

The purpose of this work was to investigate the degradation of *s*-triazine herbicides, atrazine and simazine by TNT-degrader under several relevant physicochemical environmental parameters. TNT-degrader showed effective degradability of atrazine and simazine as well. Both atrazine (<50 mg/l) and simazine (<15 mg/l) were completely degraded within 30 hrs and 4 days of incubation, respectively. As the concentrations of atrazine and simazine increased in the media, the degradation of those compounds were delayed. Additional carbons were essential to degrade atrazine and simazine, and no degradation was achieved in the absence of additional carbons. The effect of supplemented nitrogens on the degradation of atrazine and simazine was evaluated. Addition of a supplemented nitrogen in the growth medium containing atrazine or simazine showed partial degradation of those herbicides during the incubation period. However, complete degradation of atrazine and simazine was examined in the absence of any supplemented nitrogens. Addition of yeast extract in this study was inhibitory to atrazine and simazine degradations, respectively. TNT-degrader was a small Gram-negative cocco-bacillus. Physiological analysis using BIOLOG system revealed that this strain was *Stenotrophomonas maltophilia*.