Korean J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 40, No. 1, 76–81 (2012)
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1201.01003
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KOREAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

© The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

메탄, 벤젠 및 톨루엔 제거용 바이오커버의 세균 군집 특성

류희욱[1] · 조경숙[2]*
[1]숭실대학교 화학공학과, [2]이화여자대학교 환경공학과

Received : January 26, 2012 / Revised : March 5, 2012 / Accepted : March 7, 2012

Characterization of the Bacterial Community in a Biocover for the Removal of Methane, Benzene and Toluene. Ryu, Hee Wook[1] and Kyung-Suk Cho[2]*. *[1]Department of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea, [2]Department of Environmental Science and Engineering, EwhaWomans University, Seoul 120-750, Korea* –Removal of methane, benzene and toluene was evaluated in a lab-scale biocover packed with a soil mixture of forest soil and earthworm cast (75:25 weight ratio). The bacterial community in the biocover was characterized using quantitative real-time PCR and terminal restriction fragment length polymorphism. Methane was removed at the upper layer of the biocover (-0.1 ~ -0.4 m), where the oxygen concentration was remarkably lower. The average removal efficiencies for methane and benzene/toluene were 90% and 99%, respectively. The *pmoA* gene copy numbers, responsible for methane oxidation, in the upper layer were higher than those in the lower layer. While type I methanotrohs dominated the lower layer, type II methanotrophs, such as *Methylocystis* and *Methylosinus,* were noted to be predominant in the upper layer. Benzene and toluene were removed from the lower layer (-0.6 ~ -0.9 m) as well as the upper layer. Moreover, the *tmoA* gene copy number, responsible for benzene/toluene oxidation, seen in the upper layer was not significantly different from those seen in the lower layer. These results suggest that a biocover packed with a soil and earthworm cast mixture is a promising method which could be utilized for the control of methane and volatile organic compounds such as benzene and toluene.

Keywords: Biocover, methane, benzene, toluene, bacterial community

매립지에서는 폐기물이 혐기적으로 분해되면서, 폐기물 1톤당 135~375 m^3의 바이오가스가 생성되는데, 메탄이 30~70%, 이산화탄소가 20~50%를 차지한다[14]. 메탄은 무색, 무취의 가스로, 복사강제력이 이산화탄소에 비해 25배 이상 높은 온실가스이다[2]. 매립지에서 발생되는 바이오가스에는벤젠, 톨루엔 및 쟈일렌 등과 같은 휘발성 유기화합물도 미량 혼합되어있는데, 이는 폐기물 중 존재하는 산업공정에서 사용된 유기용제나 탈지제 등에서 직접적으로 발생할 수도 있고, 폐기물이 생물학적, 화학적으로 분해되면서 발생하는 경우도 있다[16]. 이러한 악취성 휘발성 유기화합물은 바이오가스의 1% 미만을 차지하지만, 이들은 발암성 물질로 건강에 유해하며, 인근 주변 지역에 악취 문제를 야기시킨다[17].

일부 매립지에서는 이러한 바이오가스를 포집할 수 있는 가스포집정이 설치되어있어 바이오가스의 40~60% 정도 회수하고, 회수된 바이오가스는 에너지 등으로 자원화할 수 있다[14]. 그러나 이러한 바이오가스를 에너지원으로 자원화하는 방법은 바이오가스 중 메탄의 함량이 30% 이상일 때만 가능하기 때문에, 오래되거나 매립 규모가 작은 매립지의 경우에는 바이오가스포집이 불가능하다[2]. 우리나라의 경우 이러한 바이오가스를 포집하여 고농도 메탄을 자원화할 수 있는 설비를 갖춘 매립지는 약 4%에 불과하고, 나머지 89%가 넘는 대부분의 매립지에서는 바이오가스를 대기 중으로 확산시키고 있는 실정이다[2]. 최근 들어 자원화가 불가능한 저농도의 메탄이 배출되는 매립지를 대상으로바이오커버[1, 2, 8, 10, 12, 15] 혹은 바이오필터[4,21]를 이용하여 생물학적으로 메탄 및 악취성 물질을 제거하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

바이오커버는 생물학적으로 메탄이 소비되기 위한 최적의 환경조건을 만들어준 기능성 매립지 복토로, 매립지에서 발생하는 바이오가스를 환경친화적이고 저비용으로 처리할 수 있다[2,8]. 바이오커버의 충전제로는 유기물 함량과 water holding capacity가 높고 비표면적이 넓은 compost가 많이 사용되고 있으며, compost에 지렁이 분변토, 슬러지, 모래, perlite, wood-chip 및 leaf 등을 다양하게 섞은 혼합물도 많이 사용되고 있다[2]. 잘 숙성되고, 입자크기가 균일하며, C/N비가 낮고, 암모니아의 농도가 낮은 compost를 충진제로

*Corresponding author
Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

사용했을 때 메탄의 산화가 가장 활발하게 일어나는 것으로 알려져 있다[2]. 특히, 바이오커버에서 메탄을 분해하는 세균은 이들 가스를 탄소원으로 사용하기 때문에 바이오커버에 사용하는 소재의 C/N비가 낮을수록 유리하다. 지렁이 분변토는 일반적으로 미생물 상이 다양하고 수가 많으며, C/N비가 낮고 비표면적이 넓고 soil porosity를 향상시킬 수 있기 때문에 우수한 바이오커버용 소재로 사용될 수 있다[13]. 이와 같이 메탄 제거를 위한 바이오커버 소재로 지렁이 분변토의 효율성이 입증되었으나[13, 15], 지금까지는 메탄 단독 가스만을 대상으로 연구를 수행하였다. 즉, 메탄과 동시에 배출되는 벤젠과 톨루엔 등과 같은 휘발성 유기화합물의 혼합가스를 대상으로 지렁이 분변토를 활용한 바이오커버의 성능을 평가하고 미생물 군집 특성을 조사할 필요가 있다.

본 연구에서는 산림 토양과 지렁이 분변토를충진제로 사용하여 실험실 규모의 바이오커버를 제작하여 메탄, 벤젠 및 톨루엔 제거효율을 조사하였다. 또한, 바이오커버의 각 깊이에 존재하는 메탄, 벤젠 및 톨루엔 산화세균의 quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 방법으로 정량 분석하였고, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 방법으로 세균 군집 특성을 분석하였다.

바이오커버에 넣을 충진물질을 얻기위해 이화여대 산림토양과 지렁이 분변토를 채취하였다. 이화여대 산림토양은 표면으로부터 약 10 cm 깊이에서 채취하였고, 지렁이 분변토는 난지 물 재생센터에서 채취하였다. 지렁이 분변토는 하수처리 과정에서 발생한 하수오니를 지렁이에 공급하여 6개월 이상 자연 발효건조 과정을 거친 후 불순물 제거 및 입자 크기 선별과정을 거친 것을 이용하였다. 토양과 지렁이 분변토 시료를 각각 2 mm 체로 거른 뒤 산림 토양과 지렁이 분변토를 75:25(중량비) 비율로 혼합하였다. 혼합시료의 pH는 5.53±0.13이었고, 수분함량과 유기물 함량은 각각 24.46±0.52%, 12.38±0.53%이었다.

바이오커버는 지름 200 mm, 높이 500 mm의 컬럼 2단으로 제작하였고, 2단의 바이오커버에 상기의 혼합토양을 채워넣었다(Fig. 1). 메탄, 벤젠 및 톨루엔 혼합 가스는 다음과 같이 제조하여 humidifier (Pyrex glass, 2 L)를 거쳐 바이오커버의 하단으로 20 mL/min의 속도로 공급하였다. 메탄/이산화탄소(40:60) 혼합가스(Dong-A gases, Seoul, Korea)를 20 mL/min의 속도로 가스 mixing chamber (Pyrex glass, 2 L)에 주입하였다. 벤젠과 톨루엔 용액 각각 1:1(부피 비)로 혼합한 용액을 정량펌프(M930 peristaltic pump, Young-Lin Instrument Co. Ltd., Korea)를 이용하여 0.005 mL/min의 속도로 가스 mixing chamber에 주입하여, 벤젠과 톨루엔이 완전 기화시켜 메탄/벤젠/톨루엔 혼합가스를 제조하였다(최종적으로 제조된 혼합가스 중 벤젠과 톨루엔 농도는 20~70 ppm 이었다). 매립지 토양과 접해있는 대기의 상태를 모사하기 위해서, 바이오커버 상단에 설치한 높이 300 mm의 컬럼에 공기를 200 mL/min의 속도로 불어넣어 주었다. 바이오커버는

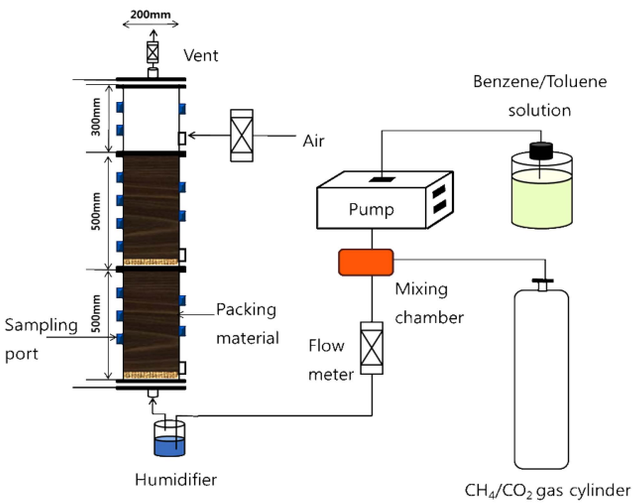

Fig. 1. Schematic diagram of a lab-scale biocover.

실온(20±3°C)에서 30일 동안 운전하였다.

바이오커버의 깊이별로 존재하는 가스의 농도를 분석하기 위해, 1 mL gas tight syringe를 이용하여 총 8개의 샘플링 포트로부터 가스를 0.3 m씩 채취하여, HP-molesieve5A column (30 m × 530 μm × 50 μm)이 장착된 가스크로마토그래피(Agilent 7890A, 6890N USA)-열전도도 검출기로 분석하였다. 메탄, 산소, 질소 가스의 분석 온도는 오븐 50°C, 주입부 200°C, 검출부 250°C이었다. 이산화탄소의 경우에는 오븐 280°C, 주입부 200°C, 검출부 250°C이었다. 벤젠과 톨루엔 가스의 경우에는 Supelco-wax column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)이 장착된 가스크로마토그래피(GC 6850N, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA)-불꽃 이온화 검출기를 이용하여 분석하였다. 분석 온도는 오븐 100°C, 주입부와 검출부는 230°C이었다.

메탄 산화세균과 벤젠/톨루엔 산화세균의 정량 분석 및 군집 분석을 위해 바이오커버의 깊이별토양 시료를 채취하여 DNA를 추출하였다. 약 0.5 g(습중량) 토양으로부터 BIO101 FastDNA SPIN Kits for Soil (MP Biomedicals LLC, Solon, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 추출 방법은 설명서에 따라 수행하였다.

메탄 산화세균과 벤젠/톨루엔 산화세균을 정량적으로 분석하기 위해 qRT-PCR 방법을 이용하였다. 메탄 산화세균을 증폭하는데 사용한 primer set는 A189f(5'-GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3')[7]와 mb661r(5'-CCG GMG CAA CGT CYT TAC C-3')[3]이고, 벤젠/톨루엔 산화세균 검출에 사용한 primer set은 TMOAf(5'-CGA AAC CGG CTT YAC CAA YAT G-3')과 TMOAr(5'-ACC GGG ATA TTT YTC TTC SAG CCA-3')[6]이었다. qRT-PCR의 검량선을 작성하고자, *pmoA* gene은 *Methylobacter luteus* (NCIMB11914)를 *tmoA* gene은 *Pseudomonas stutzeri* OX1을 대표 균주로 이용하였다. PCR mixture조성과 PCR

조건은 위와 동일하다. 총 200 μL의 PCR product를 1% 한천 젤에 loading하고 사이즈(510 or 505 bp)에 맞춰 젤을 잘랐다. 자른 젤로부터 QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, USA)을 이용하여 DNA를 추출하였고, 추출된 DNA를 qRT-PCR 검량선 작성을 위한 시료로 사용하였다. Gene copy number와 C_t (Threshold cycle)의 상관관계를 알아보고자 standard 시료를 10^{-12}까지 희석하였고, 희석된 시료를 3 반복으로 qRT-PCR을 수행하였다. PCR mixture 조성은 template 2 μL, dH_2O 7 μL, Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, USA) 10 μL, 10 mM primer 각 0.5 μL이고, PCR 조건은 95°C에서 6분, 95°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초를 40 cycles 반복하였고 마지막에 72°C에서 6분간 유지시켰다. 데이터 수집온도는 72°C에서 이루어졌다. 작성된 검량선으로부터 각 시료의 메탄 산화세균 및 벤젠/톨루엔 산화세균 gene copy number를 계산하였다.

메탄 산화세균과 벤젠/톨루엔 산화세균의 군집 구조를 분석하고자 T-RFLP 기법을 이용하였다. 추출된 초기 토양 시료와 바이오커버의 깊이조건별 토양 시료 DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 메탄 산화세균을 증폭하는데 사용한 primer set는 FAM (6-carboxyfluorescein)을 부착한 A189f와 mb661r이고, 벤젠/톨루엔 산화세균 검출에 사용한 primer set은 FAM을 부착한 TMOAf과 TMOAr 이었다. PCR mixture는 DNA template를 2 μL, 10×Buffer를 5 μL, Bovine serum albumin을 5 μg, dNTP를 200 μM, primer를 각각 20 pmol, 1.25 U Takara Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRaBioInc., Shiga, Japan)을 넣고 총 부피가 50 μL가 되도록 dH_2O로 채웠다. PCR은 다음과 같은 조건으로 수행되었다. 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 96°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 시키는 과정을 40 cycles 반복하였다. 그 후 final extension을 72°C에서 10분간 유지하였고, 증폭이 끝난 후에는 4°C로 유지되도록 하였다. PCR 기기는 GeneAmp® PCR system Model 2700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA)을 이용하였다. 증폭된 PCR products는 Qiagen PCR purification kit (Qiagen, USA)을 이용하여 정제하였고, 정제된 product를 digestion하였다. Digestion 조건은 PCR product 7 μL에 buffer 1.5 μL, 제한효소 5 U 첨가 후 dH_2O로 15 μL를 맞췄고, 37°C에서 4시간 배양하였다. 제한효소는 메탄 산화세균 군집 분석에 *MspI* (5'-C↓CGG-3', Beams Biotech. Co., Ltd, Korea)을 벤젠/톨루엔 산화세균 군집 분석에는 *Hha*I (5'-GCG↓C-3', Beams Biotech. Co., Korea)을 사용하였다. 각 시료의 terminal restriction fragment (T-RF) size 분석은 ABI 377 DNA auto sequencer (GMI Inc., Ramsey, USA)를 이용한 denaturing polyacrylamide gel (6 M urea and 5% polyacrylamide)에서의 electrophoresis를 통하여 이루어졌다. 선택된 T-RFs는 GENESCAN analytical software (Applied Biosystems Inc., Foster, USA)를 이용하여 분석된 피크의 면적을 통해 정량적으로 분석되었고, 50 relative fluorescent units (RFU) 이상의 피크 높이만을 사용하였다. 전체 피크 면적에 대한 각 시료의 피크 면적을 통해 상대적인 미생물 군집의 양(%)을 계산하였다.

Moon *et al*.[13]은 산림 토양과 지렁이 분변토를 각각 100:0, 50:50 그리고 75:25의 비율로 혼합한 토양을 이용하여 바이오커버를 운전한 결과, 75:25의 혼합 비율에서 메탄의 제거효율이 가장 좋은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서도 산림 토양과 지렁이 분변토를 75:25(중량비) 비율로 혼합한 토양을 바이오커버에 채워넣었다. 바이오커버 운전 초기 1주일 동안 메탄 제거 효율은 40%이었으나 운전시간이 경과할수록 메탄 제거효율이 증가하여 2주일 경과 이후부터 메탄 제거효율은 90% 이상 있었다(결과 미제시). 벤젠과 톨루엔 제거 효율은 운전 초기부터 99% 이상 이었다. 혈청병을 이용하여 메탄 분해용 미생물 consortium에 의한 메탄, 벤젠 및 톨루엔 혼합가스 생분해 특성을 조사한 결과, 이들 세가지 가스는 동시에 생분해 되었다[10,11]. 본 연구에서는 바이오커버 시스템에서 이들 3종의 혼합가스가 동시에 생분해 됨을 확인할 수 있었다.

바이오커버의 깊이별로 혼합가스의 농도를 측정하여 메탄, 벤젠 및 톨루엔이 제거되는 특성을 조사하였다. 메탄은 바이오커버 하단에서는 거의 제거되지 않았고, -0.4~-0.1 m에서 급격하게 메탄이 제거되었다(Fig. 2A). 또한, 메탄이 제거되는 상부층에서 산소 농도도 급격하게 감소되었다(Fig. 2A). 이와 같이 메탄이 바이오커버의 상부층에서 감소되는 것은 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다. Park *et al*.[15]은 바이오커버에 매립지 복토 토양과 지렁이 분변토를 혼합한 시료를 채워넣고 메탄 분해를 조사한 결과, 본 연구 결과와 동일하게 메탄은 바이오커버 상단층에서 분해되었다. 실험실 규모의 lysimeter에 숙성 퇴비를 채워 놓은 후 메탄을 공급한 결과, 상부 0~-30 cm 층에서 메탄 제거가 관찰되었고, 이러한 층에서 산소 농도도 급격하게 감소하였다[20]. 바이오커버에서 메탄 분해에 영향을 미치는 가장 중요한 무생물적 인자는 온도와 산소 이용성이다[12,14]. 본 연구에서 메탄이 바이오커버 상부층에서 제거되는 것은 바이오커버 표면 위 공기층으로부터 바이오커버 상부층으로 확산되어 공급된 산소를 메탄 산화세균이 이용하여 메탄을 산화할 수 있었기 때문이다. 한편, 벤젠과 톨루엔은 바이오커버 하단부분(-1.0~-0.8 m)에서 거의 대부분 제거 되었다(Fig. 2B).

바이오커버의 깊이별로 존재하는 메탄 및 벤젠/톨루엔 산화세균을 정량화 하고자 qRT-PCR을 수행하여 *pmoA* gene과 *tmoA* gene을 정량분석 하였다. 메탄 산화에 관여하는 *pmoA* gene은 윗단과 아랫단에서의 gene copy number의 차이가 현저하게 다르게 나타났다. 즉 -0.4~-0.1 m인 윗쪽 구간에서 *pmoA* gene이 더 높게 검출되었는데(Fig. 3A), 이는 메탄이 주로 제거되었던 구간과 일치하였다. 캐나다 Quebec

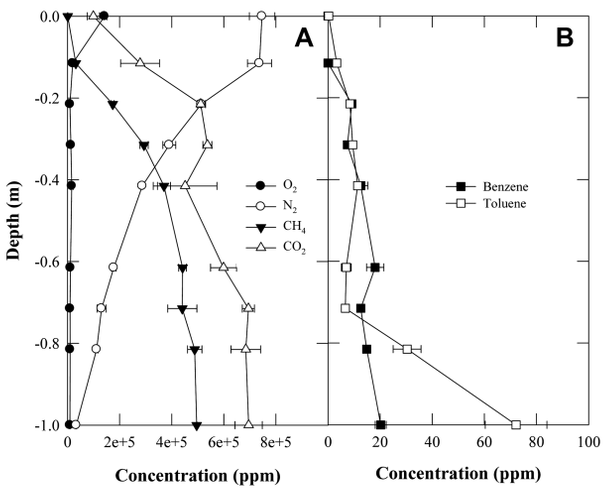

Fig. 2. Depth profiles of gas concentration in the lab-scale biocover. (A) Oxygen, nitrogen, methane and carbon dioxide concentrations. (B) Benzene and toluene concentrations.

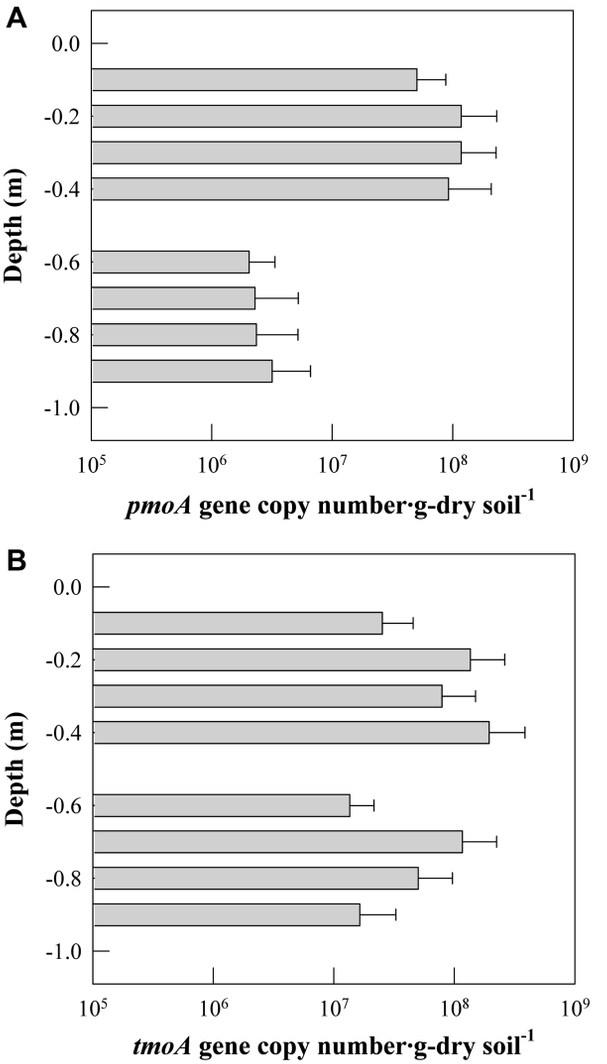

Fig. 3. Depth profiles of gene copy number in the lab-scale biocover. (A) *pmoA* gene copy numbers. (B) *tmoA* gene copy numbers.

의 매립지에 pilot 규모의 바이오커버를 설치하여 운전 시간 경과에 따라 바이오커버 깊이 별로 메탄 산화 세균을 정량화하여 비교한 결과, 운전 초기에는 메탄 산화 세균 수가 10^6 cellsg-dry weight^{-1}이었는데 3달 후에는 10^7~10^8 cellsg-dry weight^{-1}로 증가하였고, 바이오커버 상부층의 메탄 산화 세균 수가 하부층보다 10배 정도 많았다[1]. 또한, 메탄 산화 세균 수가 많은 상부층의 잠재 메탄산화속도도 하부층보다 높았다[1].

벤젠과 톨루엔 산화에 관여하는 *tmoA* gene의 경우, 깊이별로 뚜렷하게 증가하게 감소하는 경향이 보이지 않았고, 10^7~10^8 gene copy numberg-dry soil^{-1}로 거의 비슷한 수준이었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 벤젠과 톨루엔은 바이오커버 깊이에 상관없이 전체 층에서 조금씩 분해되는 경향(Fig. 2B)과 일치한다.

바이오커버의 깊이별로 존재하는 메탄 산화세균 및 벤젠/톨루엔 산화세균의 군집을 알아보고자 *pmo*A와 *tmoA* gene을 가진 세균 군집을 T-RFLP 방법을 이용하여 분석하였다(Table 1). *pmoA* gene의 경우, 75 bp인 *Methylococcus/Methylocaldum* 비율은 바이오커버 하단에서 상단으로 갈수록 점점 감소하는 경향이 보였다[18]. 그러나 244 bp인 *Methylocystis/Methylosinus*의 비율은 바이오커버 하단에서 상단으로 갈수록 점점 증가하는 경향을 보였고[18], 특히, 메탄의 제거가 가장 활발하게 일어나고 *pmoA* gene의 copy number도 가장 높게 나타났던 -0.4~-0.1 m 구간에서의 비율이 매우 크게 증가하였다. 한편, 438 bp인 *Methylomonas* (Type I)는 -0.4~-0.2 m 구간에서 2% 미만의 비율로 존재하였다.

지렁이 분변토를 혼합한 토양을 이용한 바이오커버에 메탄 단일가스를 공급하여 약 1개월 정도 운전한 후 메탄 산화 세균 군집을 조사한 결과, *Methylobacter*와 같은 type I methantrophs가 우점화되었다[9]. 그런데, Wang *et al*.[22]은 메탄 제거용 바이오커버는 *Methylococcus* (type I) 뿐 만 아니라, *Methylocystis* (type II) 및 *Methylosinus* (type II) 등이 우점된다고 보고하였다. 또한, 매립지 토양을 접종원으로 하고 메탄 단일가스를 공급하여 농화배양한 consortium과 메탄, 벤젠 및 톨루엔의 혼합가스를 공급하여 농화배양한 consortium의 메탄 산화 세균 군집을 비교한 결과, 메탄/벤젠/톨루엔 혼합가스로 농화배양한 consortium에서는 type II에 속하는 methanotrophs의 비율이 증가하였다[11]. 본 연구에서의 메탄/벤젠/톨루엔 처리용 바이오커버에서도 type IImethanotrophs에 속하는 *Methylocystis/Methylosinus*의 비율이 높아지는 동일한 경향이 관찰되었다. 종다양성을 의미하는 *pmoA* gene의 T-RFs수는 바이오커버 하단과 상단보다는 중간에서 층에서 가장 많아, 이 부위의 메탄 산화 관련하는 세균의 다양성이 가장 높은 것으로 추측되었다[5].

tmoA gene의 경우, 바이오필터최상부층(0~-0.1 m)에서

Table 1. Relative abundance of T-RFs for *pmoA* and *tmoA* functional genes.

Depth (m)	*pmoA* functional gene Relative abundance of T-RFs (%)				No. of T-RFs	*tmoA* functional gene Relative abundance of T-RFs (%)					No. of T-RFs
	75 bp[a]	244 bp[b]	438 bp[c]	Others		105 bp	107 bp	114 bp	172 bp	Others	
-0.1	7.9	71.8	0	20.3	5	8.05	8.68	8.27	29.8	45.2	7
-0.2	18.5	52.3	1.11	28.1	9	37.5	22.5	2.42	20.0	17.6	12
-0.3	16.7	47.0	1.88	34.4	10	21.0	17.7	3.29	26.9	31.1	10
-0.4	19.0	51.6	1.33	28.1	11	40.2	20.8	0	22.8	16.2	7
-0.6	51.5	37.3	0	11.1	7	29.8	14.4	0	42.5	13.3	5
-0.7	51.8	38.9	0	9.3	6	47.3	13.9	4.76	30.9	3.1	8
-0.8	64.7	31.2	0	4.1	4	48.2	10.5	0	41.3	0	4
-0.9	51.0	35.2	0	13.8	5	38.0	17.0	0	33.1	11.9	7

*In-silico*analysis[18]: [a]*Methylococcus* (Type X)/*Methylocaldum* (Type I); [b]*Methylocystis* (Type II)/*Methylosinus* (Type II); [c]*Methylomonas* (Type I)
bp, basepair

172 bp의 비율이 가장 높았으나, 상부층(-0.1~-0.4 m)에서는 105 bp 비율이 가장 높고 107 bp와 172 bp의 비율이 그 다음으로 높았다. 하부층(-0.6~-0.9 m)에서는 172 bp와 105 bp의 비율이 높았다. 종다양성을 의미하는 *tmoA* gene의 T-RFs 수는 바이오커버 하단보다는 상단에서 많아지는 경향을 보였는데, 이는 상부층(-0.1~-0.4 m)은 하부층(-0.6~-0.9 m)보다는 호기적인 조건이기 때문에, 이 조건에서 벤젠과 톨루엔을 이용하는 세균 종이 다양해지기 때문으로 사료된다[19].

본 연구에서는 산림 토양과 지렁이 분변토를 혼합한 토양을 이용한 바이오커버의 메탄, 벤젠 및 톨루엔 제거효율을 조사한 결과, 메탄뿐 만 아니라 벤젠과 톨루엔을 동시에 제거 가능함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 다양한 미생물이 존재하면서도 영양물질이 풍부한 지렁이 분변토가 바이오커버에서 메탄뿐만 아니라 벤젠 및 톨루엔을 동시에 제거하는데 매우 유용함을 시사한다.

Acknowledgement

This research was supported by the Basic Science Research Program, through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education, Science and Technology (MEST) (NRL program, R0A-2008-000-20044-0).

REFERENCES

1. Ait-Benichou, S., L. B. Jugnia, C. W. Greer, and A. R. Cabral. 2009. Methanotrophs and methanotrophic activity in engineered landfill biocovers. *Waste Manag*. **29**: 2509-2517.
2. Cho, K. S. and H. W. Ryu. 2009. Biotechnology for the mitigation of methane emission from landfills. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. **37**: 293-305.
3. Costello, A. M. and M. E. Lidstrom. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
4. Gebert, J. and A. Grongroft. 2006. Performance of a passively vented field-scale biofilter for the microbial oxidation of landfill methane. *Waste Manag*. **26**: 399-407.
5. Hanson, R. S. and T. E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
6. Hendrickx, B., H. Junca, J. Vosahlova, A. Lindner, I. Regg, M. Bucheli-Witschel, F. Faber, T. Egli, M. Mau, M. Schlmann, M. Brennerova, V. Brenner, D. H. Pieper, E. M. Top, W. Dejonghe, L. Bastiaens, and D. Springael. 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J. Microbiol. Methods* **64**: 250-265.
7. Holmes, A. J., A. M. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett*. **132**: 203-208.
8. Huber-Humer, M., S. Rder, and P. Lechner. 2009. Approaches to assess biocover performance on landfills. *Waste Manag.* **29**: 2092-104.
9. Kim, T. G., K. E. Moon, E. H. Lee, S. A. Choi, and K. S. Cho. 2011. Assessing effects of earthworm cast on methanotrophic community in a soilbiocover by concurrent use of microarray and quantitative real-time PCR. *Appl. Soil Ecol*. **50**: 52-55.
10. Lee, E. H., H. J. Park, and K. S. Cho. 2011. Effect of substrate interaction on oxidation of methane and benzene in enriched microbial consortia from landfill cover soil. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **46**: 997-1007.
11. Lee, E. H., H. J. Park, and K. S. Cho. 2010. Characterization of methane, benzene, and toluene-oxidizing consortia enriched from landfill and riparian wetland soils. *J. Hazard. Mater.* **184**: 313-320.
12. Lu, W. J., Z. F. Chi, Z. S. Mou, Y. Y. Long, H. T. Wang, and Y. Zhu. 2011. Can a breathing biocover system enhance methane emission reductionfrom landfill? *J. Hazard. Mater.* **191**: 228-233.

13. Moon, K.E., S. Y. Lee, S. H. Lee, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2010. Earthworm cast as a promising filter bed material and its methanotrophic contribution to methane removal. *J. Hazard. Mater*. **176**: 131-138.
14. Nikiema, J., R. Brzezinski, and M. Heitz. 2007. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **6**: 261-284.
15. Park, S., I. Lee, C. Cho, and K. Sung. 2008. Effects of earthworm cast and powdered activated carbon on methane removal capacity of landfill cover soils. *Chemosphere* **70**: 1117-1123.
16. Scheutz, C., H. Mosbæk, and P. Kjeldsen. 2004. Attenuation of methane and volatile organic compounds in landfill soil covers. *J. Environ. Qual*. **33**: 61-71.
17. Scheutz, C., J. Bogner, J. P. Chanton, D. Blake, M. Morcet, C. Aran, and P. Kjeldsen. 2008. Atmospheric emissions and attenuation of non-methane organic compounds in cover soils at a French landfill. *Waste Manag*. **28**: 1892-1908.
18. Shrestha, M., W. R. Abraham, P. M. Shrestha, M. Noll, and R. Conrad. 2008. Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environ. Microbiol*. **10**: 400-412.
19. Smith, M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**: 191-206.
20. Stralis-Pavese, N., L. Bodrossy, T. G. Reichenauer, A. Weilharter, and A. Sessitsch. 2006. 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidizingbacteria – Assessment, critical evaluation of methodologyperformance and application for landfill site cover soils. *Appl. Soil Ecol*. **31**: 251-266.
21. Streese, J. and R. Stegmann. 2003. Microbial oxidation of methane from old landfills in biofilters. *Waste Manag.* **23**: 573-580.
22. Wang, Y., W. Wu, Y. Ding, W. Liu, A.Perera, Y. Chen, and M. Devare. 2008. Methane oxidation activity and bacterial community compositionin a simulated landfill cover soil is influenced by the growthof *Chenopodium album* L. *Soil Biol. Biochem*. **40**: 2452-2459.