

GOVP 12016063

금속염 환원 세균을 이용하는 매개체 없는 생물 연료전지의 개발

Development of mediator-less biofuel cell using metal reducers

연구기관
한국과학기술연구원
(수질환경연구센터)

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 금속염 환원 세균을 이용하는 매개체 없는 생물 연료전지의 개발”의
보고서로 제출합니다.

2000. 7. 31

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 김 병 홍

연 구 원 : 김 형 주

연 구 원 : 박 형 수

연 구 원 : 장 인 섭

연 구 원 : 현 문 식

연 구 원 : 김 미 아

연 구 원 : 김 광 태

연 구 원 : 조 병 원

여 백

요 약 문

I. 제 목

금속염 환원 세균을 이용하는 매개체 없는 생물 연료전지의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

연료전지는 화학반응에서 발생하는 자유에너지를 전기 에너지로 직접 전환시킬 수 있는 장치이다. 현재까지 가장 널리 알려지고 가장 성공적인 연료전지로는 1834년 Grove에 의해 발명된 수소/산소형 전지로서 1960년대에 이르러 미국 유인우주선 계획의 일환으로 중점적으로 연구되고 실용화된 바 있으며 일반적으로 anode에 수소를, cathode에 산소를 사용한다. 이러한 연구 및 응용을 통하여 2000년 현재 세계 각국에서는 alkaline fuel cell (AFC), phospholipic acid fuel cell (PAFC), solid oxide fuel cell (SOFC), solid polymer electrolyte fuel cell (SPEFC), molten carbonate fuel cell (MCFC) 등 다양한 형태의 연료전지를 개발중이거나 상용화 하고있다. 그러나 대부분의 연료전지는 작동시 고온이 필요하며 (e.g. SOFC : 800 - 1000) °C; AFC, SPEFC: 100°C) 고온 유지를 위해서는 천연 가스나 methane 등이 부가적으로 소비된다.

이상에서 기술한 연료전지는 수소 등의 간단한 화합물은 연료로서

사용할 수 있으나 폐수 중의 복잡한 유기물인 탄수화물, 지질 단백질 등은 일반적인 연소이외에는 복잡한 산화-환원반응을 거쳐 전자가 이동하며 산화하기 때문에 간단한 화학 촉매를 이용하는 연료전지에서 사용하지 못한다. 이러한 유기물을 연료전지의 연료로 사용하기 위해서 biocatalysts 즉 미생물을 도입한 것이 미생물연료전지이다. 미생물을 사용함으로써 각종 복잡한 형태의 유기 화합물을 전지의 연료로서 사용할 수가 있으며 온화한 조건에서 전력생산이 가능하다. 1911년 Potter가 효모 배양액 (*Saccharomyces* sp.)과 미생물이 존재하지 않는 살균한 배지의 전압 차를 발견한 이후 이 전압 차의 발생원인이 미생물 때문이라는 것이 여러 연구에 의하여 확인되었다. 미생물 연료전지의 다른 장점으로는 미생물의 기질로 사용될 수 있는 다양한 유기물의 미생물에 의한 소비를 통하여 전기를 생산할 수 있다는 점이다. 이후 유기물을 연료로 이용하는 생물연료전지의 개발에 많은 연구가 이루어졌다. 생물에서 전자전달은 세포 내막에서 이루어지며, 이 내막은 세포벽 등 절연성 구조의 안쪽에 위치하기 때문에 생물의 전자전달 과정에서 직접 전자를 전극에 전달할 수 없다. 따라서 유기물을 산화하여 생성하는 미생물로부터 효과적으로 전자를 전극으로 전달하기 위해 양친매성이며 저분자 형태의 인공 전자전달매개체 (electrochemical mediator)를 사용하여야 미생물 연료전지를 구축할 수 있었다. 생물연료전지는 화학 연료전지와 더불어 우주선에서 발생하는 폐기물을 효율적으로 처리하기 위하여 1965-70년에 걸쳐 미국 NASA에서 집중적으로 연구되었으나 상대적으로 화학 연료전지에 비하여 전력 생산 능력이 낮고 불안정한 출력형태가 얻어진 것으로 나타났다.

1960년대 이후 여러 연구에 의하여 보다 효율적인 형태로 발전해 왔으며 1993년 Allen 등은 포도당을 연료로 하고 *Proteus vulgaris*를 이용하여 electrochemical mediator (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)를 첨가시 0.4mA의 전류를 5일 이상 안정적으로 생산하는 20ml용량의

생물연료전지를 제작하였다. 여기서 포도당을 전력으로 전환시키기 위해서는 위에서 언급한 electrochemical mediator의 첨가가 필수적이다. 이 mediator를 대체적으로 난분해성으로 2차 오염의 원인이 될 수 있으며 전극에 침착되어 효율을 떨어뜨리는 수도 있다. 현재까지 생물연료전지의 biocatalysts로 *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae* 등이 이용되었다 이들은 폐수 중의 다양한 유기물을 대사 할 수 있으나, 매개체를 반드시 사용해야하는 단점이 있다. 따라서 이와 같은 매개체를 사용하지 않아도 전력을 생산 할 수 있는 미생물 연료전지의 개발이 이루어진다면 다양한 유기 폐수를 별도의 전처리 없이 직접 연료로 사용할 수 있을 것으로 판단할 수 있었으나 현재까지의 기술로는 불가능한 것으로 여겨졌다.

최근 혐기성 생태계에서 산소 대신, 제2철을 전자수용체로 이용하여 성장하는 세균이 많이 보고되고 있다. 이들은 물에 녹지 않는 전자수용체[Fe(III)]를 세포 안으로 운반하지 않고 세포 밖에서 환원시키기 위해 세포외막 (outer membrane, OM)에 cytochrome을 보유하고 있는 것으로 보고되었다. 따라서 이와같은 외부의 전자수용체에 직접 전자를 전달하는 미생물을 사용, 미생물 연료전지를 구성하면 별도의 매개체 없이 전지를 운전할 수 있을 것으로 판단하였다.

무매개체 미생물 연료전지의 구성기술은 유기폐수의 자원화를 통한 효과적이며 환경 친화적인 폐수처리공정 기술 개발이 가능하며, 폐수 처리시 발생하는 활성오니의 감소를 유도 할 수 있고, 폐수 처리와 동시에 발생하는 전력으로 인한 에너지 절감효과가 있다. 또한 최초 개발에서 비롯된 기술 선도 및 미생물의 응용범위 확대에 따른 사회의 인식 변화 및 생물산업 활성화가 가능하다. 따라서 보다 다양한 폐수를 이용하여 전력을 생산 할 수 있도록 중의 다양한 유기물을 이용할 수 있는 무매개체 미생물연료전지를 개발하고 이에 대한 구체적인 조사 및 응용 연구를 본 과제의 목적으로 하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 전기 화학적 활성 세균 (electrochemically active bacteria)의 특성 연구

일반적인 유기 폐수에 함유된 복합적인 유기물을 생물연료전지를 통해 산화시키기 위하여 금속염 환원세균인 *Shewanella putrificiens* IR-1을 model strain으로 사용하여 전기 화학적, 생리학적 특성조사를 실시하였다.

특히 금속염 환원세균의 전기 화학적 특성을 조사하고 생물연료전지에의 적용성을 검토하였으며 위의 연구를 통해서 습득한 자료를 생물연료전지를 구축하기 위한 기본적인 자료로 활용하였다.

2. 효율적인 생물연료전지 시스템의 구축

전극재료의 변경, channeling이 발생하지 않는 연료전지 구조변경 등 물리화학적 방법을 통하여 효율적으로 전자가 전극으로 전달될 수 있도록 한다. 특히 효율적인 연료전지의 구조개선, 예를 들어 전극-미생물간의 친화력 증가, 효과적인 연료 공급 및 안정적 작동을 위한 기밀설계 등을 통해 구조개선을 실시하였다. 또한 미생물 농도, 전극의 재질 및 넓이 등 기본조건의 변화에 따른 기질 소모량, BOD 감소량, 전력 생산량 등을 조사하여 주어진 조건에서 효율적으로 운전되는 시스템을 구성하였다.

이상의 연구에서 습득한 자료를 바탕으로 하여 미생물 및 연료 등 생물연료전지의 최적화가 유지되도록 세포외적 조건을 computerized하고 적정 가동시간을 조사하고 장시간 가동한 생물연료전지의 기능상 문제점을 보완하였다.

3. 무매개체 미생물연료전지 기술의 응용 범위 확대 및 효율 증대 방안 조사

위에서 습득한 결과를 바탕으로 무매개체 생물 연료전지의 응용범위를 조사하고 발전 효율을 증가시킬 수 있는 방안을 실험적으로 조사하였다. 특히 생활 폐수를 위시한 각종 폐수의 이용성을 확인하고 미생물 연료전지를 이용한 전기 화학적 활성 세균의 농화 배양 및 기질 특이성, 전극에 대한 부착상태, 폐수처리능력, 전극에서의 미생물 분리 및 동정 등을 시행하였다.

IV. 연구개발결과

1. 금속염 환원 세균에 대한 기본특성조사 및 기본 연료전지 구축.

Cyclic voltammetry를 통한 전기화학적 활성세균의 전기 화학 활성도 조사법 확립을 확립하였고 기본형 생물연료전지의 제작을 완성, 0.65 V, 0.1mA의 전기가 생산됨을 확인하였다.

2. 효율적인 생물연료전지 시스템의 구축.

생물 연료전지 시스템을 이용한 전혀 새로운 전기 화학적 활성 세균의 농화배양법 개발을 개발완료 하였고 이를 이용, 다양한 기질 자화 능력을 갖는 미생물을 연료전지 내에서 농화배양하여 전기를 생산하였다. 또한 이 기술을 응용하여 다양한 폐수를 연료로 전기를 생산하는 무매개체 생물연료전지를 개발하였다.

3. 시스템 최적화 및 다양한 폐수를 직접 연료로 사용하는 생물 연료전지의 개발

생물 연료전지의 구조개선을 통한 최적운전조건을 확인하였다 또한 전기 화학적 농화배양시 전극에 부착되는 초미세세균 (nano bacteria)를 조사하였다. 생물 연료전지의 연속 작동 실험 및 다양한 폐수를 연료로 적용, 생물연료전지의 폐수 처리능 실험을 수행하였고 이를 바탕으로 다양한 분야에 적용할 수 있는 무매개체 생물 연료전지를 원천기술로서 개발하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 새로운 에너지 생산형 대규모 폐수처리장치의 개발

Scale-up 과정등 후속 연구를 통한 새로운 에너지 생산형 폐수 처리 system의 개발.

2. 농어촌에 적합한 소규모 폐수처리/발전 시설 제작

일련의 경제성 및 성능 검토 검토작업을 거친 후 후속연구를 통하여 적절한 크기(1 ton 내외)의 폐수처리/발전 system의 개발 .

3. 선진국에 대한 기술 수출 및 공동연구

연구기간 중 접촉한 미국, 일본, 영국등의 연구기관과 공동으로 본 연구에서 부족한 부분에 대한 정보를 교환하고 전극, 이온교환막등, 각 부품의 국산화 시도 및 공동 개발.

4. 특정 장소 및 목적 (잠수함, 우주선등)으로 폐수를 처리하는 compact한 고성능 연료전지의 제작

국방등 특수 한 목적에 사용 할 수 있는 고출력/고성능 생물연료전지의 개발. 폐수처리용 module 개발

5. 전기 화학적 활성세균의 농화배양 mechanism 규명을 통한 순수 미생물 연구

본 연구 결과를 토대로 전기 화학적 활성 미생물의 농화배양 및 전자 전달 mechanism을 규명하고 생물 연료전지 및 각종 전기화학기술을 이용한 미생물 생리현상 규명

여 백

S U M M A R Y

In the present study, construction and application of a novel mediator-less microbial fuel cell using electrochemically active bacteria were investigated. Direct electron transfer from different *Shewanella putrefaciens* strains and its mutants to an electrode was examined.

In the cyclic voltammetry, anaerobically grown cells of *S. putrefaciens* strains showed electrochemical activities. Microbial fuel cells were constructed using the *S. putrefaciens* strains. The concentration of lactate as the electron donor in the anode compartment determined the current generation capacity and potential development in the microbial fuel cell. When the high concentration of the bacteria (0.47g dry cell weight / l) and an electrode that has large surface area (apparent area: 50 cm²) were used, relatively high Coulombic yield (over 3 C for 12 h) was obtained.

Using a three-electrode cell the strain IR-1 was able to cultivate. In the cultivation system, the positively poised working electrode worked as an artificial electron acceptor.

On the basis of these results, the microbial fuel cell was used to enrich electrochemically active microbes using wastewater from a starch processing factory as the electron donor with activated sludge or

sludge of the anaerobic digester as the bacterial source. Within 4 weeks a current of 0.2 mA was generated with a resistance of 1k in sequential-batch operation mode. The COD of anode reaction mixture treated with anaerobic sludge decreased from 1942 ppm to 55 ppm after a month. Coulomb has been maintained almostly 10 Coulomb(C). The COD change and Coulomb production with aerobic sludge were 1100 ppm to 69 ppm and 20 Coulomb, respectively. Starch processing wastewater treatment was tested after enrichment of electrochemical active bacteria. The COD and TOC removal was more than 95% and 87%, respectively. The microbial fuel cell performed optimally at pH 7 -8, and the optimum temperature was 37C. Current generation was influenced by the presence of respiration inhibitors. The Uncoupler (DNP) and ATPase inhibitor (DCCD) showed the inhibition of current production. P-CMPS (Fe-S cluster inhibitor), HQNO(Cytochrome b site inhibitor) and Antimycin A (electron transport chain II inhibitor) also decreased the current generation. However, the terminal oxidase inhibitors, cyanide and azide did not inhibited.

Based on the previous experimental data the microbial fuel cell format was revised to decrease the channelling effect and contact resistance between electrode and the connection lead. Several attempts were made to overcome those problems, and the application of electron collector was selected for the construction of the microbial fuel cell. A 17 ml of newly constructed cell and an artificial wastewater were used for the further experiment. Various operational parameter such as different feeding rate of fuel and resistance were examined and the fuel cell system was optimized.

The anode from the enriched fuel was also examined microscopically. Low vacuum electron microscope showed bacterial clumps loosely associated with the electrode and biofilm onto the electrode. Scanning electron microscopic observation of the biofilm revealed particle of ultramicrobacterial size as well as of normal bacterial size. The smaller particles were found to possess bilayer membrane structure by transmission electron microscope. Confocal scanning laser microscopic observation of the enriched electrode showed that Gram negative and positive bacteria formed microcolonies throughout the bulk and biofilm at all depths.

When the bacteria concentration of the anode was analysed by the conventional colony count method, the biomass enriched on the electrode was 4 orders of magnitude less than that predicted by chemical analyses of the enriched electrode. Chemical analyses of the enriched electrode showed that one gram of the electrode generated biomass containing 131.759.8mg protein and 4.330.24mg DNA. These figures were used to calculate the number of bacteria present as $6.34 \times 10^{11}/g$ electrode assuming that the bacterial cells contain 55% protein and 1.8% DNA. Most of the Fe(III)-reducing isolates were electrochemically active. Based on these findings it was hypothesized that electrochemically active bacteria are wide spread, and that their electrochemical activity is related to a form of anaerobic respiration.

An obligately anaerobic bacterium designated as EG3 was isolated from a microbial fuel cell. The isolate was Gram-positive, motile and rod (2.8-3.0 μ m long, 0.5-0.6 μ m wide). The partial 16S rRNA gene

sequencing and analysis of the fatty acid profile suggested that EG3 clustered with *Clostridium* sub-phylum and exhibited the highest similarity (98%) with *Clostridium butyricum*. The temperature and pH optima for growth were 37°C and 6.8-7.4, respectively. *Clostridium butyricum* EG3 grew in phosphate buffered basal medium (PBBM) with glucose as a sole electron donor. Other simple carbohydrates were also used by the isolate. Growth was faster when the medium was supplemented with FeOOH than without FeOOH at the initial phase, but the final cell yield was similar. These results suggest that Fe(III) ion is utilized as an electron sink. The major products of glucose and glucose/FeOOH metabolism were lactate, formate, butyrate, acetate, CO₂, H₂. Cyclic voltammetry showed that *Clostridium butyricum* EG3 cells were electrochemically active. The fuel cell was able to generate the current of 0.21mA and 54 Coulomb at the glucose consumption of 10mM. It is a novel characteristic of strict anaerobic gram-positive bacterium.

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction	31
1-1 Purpose of the project	31
1-2 Importances of the project	34
1-3 Scopes of the project	37
1. Characterization of the electrochemically active bacteria	37
2. Development of an efficient microbial fuel cell system	37
3. Applications of the mediator-less microbial fuel cell system and investigations for the construction of an efficient fuel cell system	38
Chapter 2 Current world-wide microbial fuel cell technology	39
2-1 Recent development in the microbial fuel cell	39
2-2 Metal reducing bacteria	41
2-3 Electron metabolisms of the metal reducing bacteria ...	46

2-4 Mediator-less microbial fuel cell using electrochemically active bacteria	49
Chapter 3 Experiments, results and discussion	51
3-1 Operation of mediator-less microbial fuel cells using <i>Shewanella putrefaciens</i> IR-1	51
1. Theory	51
2. Materials and methods	53
- Strains and cultivation	53
- Investigation of electrochemical characteristics of the strain using cyclic voltammetry	54
- Construction of microbial fuel cell formats	56
- System configuration	58
- Organics analysis	58
3. Results and discussion	60
- Electrochemical activity of <i>Shewanella putrefaciens</i>	60
- Potential and current development from the microbial fuel cell	62
- Sequential batch operation of the microbial fuel cell	65
- Effect of bacterial concentration	68
3-2 Electrochemical cultivation of <i>Shewanella putrefaciens</i> IR-1	74
1. Theory	74

2. Materials and methods	75
- Strains and medium	75
- Three-electrode electrochemical cell	75
- analysis	77
3. Results and discussion	77
- Bacterial growth in an electrochemical cell	77
- Discussion	80
3-3 Enrichment of electrochemically active bacteria	82
1. Theory	82
2. Materials and methods	83
- Used wastewater	83
- Enrichment using microbial fuel cells	83
- Fuel cell optimization	84
- Effect of respiration inhibitor	84
- Effect of alternative electron acceptor	86
- Analysis	86
- Coulomb	86
- COD	87
- TOC	87
- Organic acid	87
- Anion	88
- Energy conversion	88
- Microscopy	88
3. Results and discussion	89
- Enrichment and operation	89

- Morphological observation of enriched bacteria	92
- Operation of the microbial fuel cell containing enriched bacteria	99
- Voltage and current generation	99
- COD change	99
- Effect of pH	101
- Effect of temperature	105
- Effect of resistance	110
- Effect of nitrogen gas	115
- Effect of air	118
- Effect of electrode area	121
- Effect of ion-exchange membrane area	124
- Effect of inhibitor	127
- Effect of electron donor	127
- Effect of electron acceptor	133
- air	133
- nitrate	133
- nitrite	136
- sulfate	139
3-4 Optimization of the mediator-less microbial fuel cell structure	139
1. Theory	139
2. Materials and methods	140
- fuel cell structure and electrode connection	140
- Packed=bed electrode	143

3. Results and discussion	144
- Operation of the fuel cell with packed-bed electrode	144
- Electrode connection	147
3-5 Characterization of the microbial fuel cell with different type of wastewater	147
1. Materials and methods	147
- Configuration of the microbial fuel cell	147
- System configuration	147
- Artificial wastewater	151
- Enrichment	151
- Effect of wastewater concentration	152
- Effect of wastewater feeding rate	152
- Effect of resistance	152
2. Results and discussion	153
- Variation of current with different concentrations of wastewater	153
- Variation of current with different feeding rates	153
- variation of wastewater treatment capacity with different resistance	159
3-6 Investigation of electrochemically active bacteria in the anode compartment	162
1. Theory	162

2. Materials and methods	163
- Strains	163
- Medium and cultivation condition	164
- Morphological characteristics	166
- Biochemical characteristics	167
- Starch and esculin hydrolysis	167
- Lipid and gelatin hydrolysis	168
- Hydrogen sulfide production	168
- Indole production	164
- Lecithinase activity	168
- Oxidase and catalase test	169
- Methyl red and Vogas-Proskauer (MR-VP) test	169
- Carbohydrates utilization	170
- Fatty acid analysis	170
- 16s rDNA Sequencing	171
- Cyclic Voltammogram	171
- Operation of the microbial fuel cell	171
- Analysis	172
3. Results and discussion	173
- Enrichment and isolation of the electrochemically active bacteria	173
- Morphological and biochemical characteristics ...	173
- Growth profile of the isolation	177
- Fatty acid analysis	181
- Phylogentic analysis	181
- Metabolic analysis	181

- Electrochemical activity	184
- Current generation using the isolate	184
Chapter 4 Evaluation of the project	187
4-1 Accomplishment of the project	187
- Objectives	187
- Evaluation points	187
- Accomplishment of the projects	189
4-2 Influence of the project toward related technology ...	190
Chapter 5 Further research plan using the results	193
5-1 Wastewater treatment and electricity generation	193
5-2 BOD sensor	195
Chapter 6 References	197

여 백

목 차

제 1 장 서론	31
1-1 연구 개발의 목적	31
1-2 연구개발의 필요성	34
1-3 연구개발의 범위	37
1. 전기 화학적 활성 세균 (electrochemically active bacteria)의 특성연구	37
2. 효율적인 생물연료전지 시스템의 구축	37
3. 무매개체 미생물연료전지 기술의 응용 범위 확대 및 효율 증대 방안 조사	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황	39
2-1 미생물 연료전지의 국내외 개발 현황	39
2-2 금속염 환원 세균	41

2-3	금속염 환원세균의 전자대사	46
2-4	전기 화학적 활성 세균을 이용하는 무매개체 생물 연료전지	49
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과		51
3-1	<i>Shewanella putrefaciens</i> IR-1을 이용한 무매개체 미생물 연료전지의 운전	51
1.	이론적 배경	51
2.	실험 재료 및 방법	53
가.	사용균주 및 배양	53
나.	Cyclic voltammetry를 이용한 전기 화학적 특성 조사	54
다.	미생물 연료전지의 제작	56
라.	실험 장치의 구성	58
마.	유기물 분석	58
3.	결과 및 고찰	60
가.	<i>Shewanella putrefaciens</i> 의 전기화학적 활성	60
나.	미생물 연료전지에서의 전압 및 전류 측정	62
다.	Sequential batch operation	65
라.	미생물 농도의 영향	68
3-2	<i>Shewanella putrefaciens</i> IR-1의 전기 화학적 배양	74
1.	이론적 배경	74

2. 실험재료 및 방법	75
가. 사용균주 및 배지	75
나. Three-electrode electrochemical cell	75
다. 분석 방법	77
3. 결과 및 고찰	77
가. Bacterial growth in an electrochemical cell	77
나. 고찰	80
3-3 전기화학적 미생물의 농화 배양	82
1. 이론적 배경	82
2. 실험재료 및 방법	83
가. 사용 폐수	83
나. 전기 화학적 활성 미생물의 농화배양	83
다. 운전 최적화	84
라. 호흡저해제의 영향	84
마. Alternative Electron Acceptor의 영향	86
바. 분석방법	86
(1) 전압과 쿨롱의 측정	86
(2) COD	87
(3) TOC	87
(4) 유기산	87
(5) 음이온	88
(6) Energy conversion	88
(7) Microscopy	88
3. 실험결과 및 고찰	89
가. 전기 화학적 활성 세균의 농화배양과 미생물 연료전지의	

운전	89
나. 전극에 농화 배양된 미생물의 형태학적 관찰	92
다. 전기화학적 활성 미생물이 농화배양된 연료전지의 운전	99
(1) 전압 및 전류 발생	99
(2) COD의 변화	99
(3) pH의 영향	101
(4) 온도의 영향	105
(5) 저항의 영향	110
(6) 음극부의 주입되는 질소의 영향	115
(7) 양극부로 주입되는 공기의 영향	118
(8) 전극 넓이의 영향	121
(9) 양이온 교환 막 넓이의 영향	124
(10) 저해제의 영향	127
(11) 전자공여체의 영향	127
(12) 전자수용체의 영향	133
(가) air	133
(나) nitrate	133
(다) nitrite	136
(라) sulfate	139
3-4 미생물 연료전지의 구성 최적화	139
1. 이론적 배경	139
2. 실험 재료 및 방법	140
가. 연료전지의 형태 및 electrode-lead connection ...	140
나. packed-bed type의 graphite granule electrode의 사용	143

3. 결과 및 고찰	144
가. Packed-bed electrode를 사용한 연료전지의 운전 ...	144
나. Electrode connection	146
3-5 폐수의 특성에 따른 연료전지의 운전특성	147
1. 실험재료 및 방법	147
가. 생물연료전지의 구성	147
나. 생물연료전지 시스템의 구성	147
다. 인공폐수의 제조	151
라. 농화배양	151
마. 폐수 농도의 영향	152
바. 폐수 공급속도의 영향	152
사. 저항의 영향	152
2. 결과 및 고찰	153
가. 폐수의 농도에 따른 전류생산량 변화	153
나. 폐수의 공급속도에 따른 전류생산 변화	153
다. 저항의 변화에 따른 폐수처리능 및 전류 생산 변화	159
3-6 연료전지 양극에서 농화된 전기화학적 활성 미생물의 검색 ...	162
1. 이론적 배경	162
2. 실험재료 및 방법	163
가. 균주	163
나. 배지와 배양조건	164
다. 형태학상의 특성	166

라.	생화학적인 특성	167
	(1) 전분과 esculin 가수분해	167
	(2) 지방과 젤라틴 가수분해	168
	(3) 황화수소의 생산	168
	(4) Indole 생산	168
	(5) Lecithinase 활성	169
	(6) Oxidase and Catalase Test	169
	(7) Methyl Red and Voges-Proskauer (MR-VP)Tests	169
	(8) Carbohydrates Utilization	170
마.	Whole Cell 의 지방산 분석	170
바.	16S rDNA gene sequencing과 분석	171
사.	Cyclic Voltammogram	171
아.	미생물연료전지의 운전	171
자.	분석	172
3.	결과 및 고찰	173
가.	농화와 분리	173
나.	형태학적 · 생리학적 특성	173
다.	성장특성	177
라.	세포의 지방산 합성 분석	181
마.	Phylogentic analysis	181
바.	Metabolic analysis	181
사.	전기화학 활성	184
아.	연료전지에서 전류의 생산	184

제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	187
-------	---------------------------	-----

4-1	연구개발목표의 달성도	187
	1. 본 과제에의 연구개발 목표	187
	2. 연도별 연구목표 및 평가 착안점	187
	3. 연구개발 목표의 달성도	189
4-2	관련분야 기술발전 기여도	190
제 5	장 연구 개발 결과의 활용계획	193
	5-1 폐수처리 및 폐수자원화	193
	5-2 BOD 측정용 센서의 개발	195
제 6	장 참고문헌	197

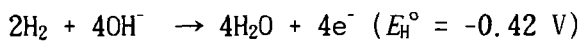
여 백

제 1 장 서론

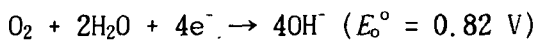
1-1 연구개발의 목적

연료전지는 화학반응에서 발생하는 자유에너지를 전기 에너지로 직접 전환시킬 수 있는 장치이다. 현재까지 가장 널리 알려지고 가장 성공적인 연료전지로는 1834년 Grove에 의해 발명된 수소/산소형 전지로서 1960년대에 이르러 미국 유인우주선 계획의 일환으로 중점적으로 연구되고 실용화된 바 그 원리를 간단히 표시하면 아래와 같다.

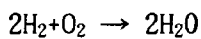
Anode (hydrogen)



Cathode (Oxygen)



Whole reaction



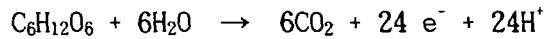
$$\Delta E_{\text{O}} = E_{\text{O}}^\circ - E_{\text{H}}^\circ = 1.24 \text{ V}$$

이러한 연구를 통하여 현재 개발 중이거나 실험 중인 연료전지로는 사용하는 전해질과 촉매에 따라 alkaline fuel cell (AFC), phospholipic acid fuel cell (PAFC), solid oxide fuel cell (SOFC), solid polymer electrolyte fuel cell (SPEFC), molten carbonate fuel cell (MCFC) 등이 있다. 그러나 대부분의 연료전지는 운전 시 고온이 필요하며 (e.g. SOFC : 800 - 1000 °C; AFC, SPEFC:

100℃) 고온 유지를 위해서는 천연 가스나 methane 등이 부가적으로 소비된다. 이상에서 기술한 연료전지는 수소, 산소 등의 간단한 화합물을 연료로서 사용한다.

다른 형태의 연료전지는 미생물 연료전지가 있다. 미생물 연료전지는 일반적인 연료전지와는 달리 유기성 연료를 미생물이 분해하면서 발생하는 전자를 전력화시키는 장치로서 일반적인 연료전지가 연료로서 사용하는 수소/산소 등의 간단한 화합물과는 달리 포도당, 지질 등을 연료로 사용하여 전기를 생산할 수 있다. 특히 산업화의 결과, 필연적으로 발생하는 각종 유기 폐수 내의 미생물이 자화할 수 있는 각종 유기물을 연료로 사용 할 수 있다. 유기성 폐수에는 복잡한 형태의 유기물인 탄수화물, 지질 단백질 등이 포함되어 있으며 미생물의 고유한 산화/환원 반응을 이용하는 각종 폐수처리 공정을 통하여 정화처리 된다. 미생물 연료전지는 미생물을 사용함으로써 각종 복잡한 형태의 유기 화합물을 전지의 연료로서 사용할 수가 있으며 온화한 조건에서 전력생산이 가능하다. 1911년 Potter가 효모 배양액(*Saccharomyces* sp.)과 미생물이 존재하지 않는 살균한 배지의 전압 차를 발견하였고 이 전압 차의 발생원인이 미생물 때문이라는 것이 여러 연구에 의하여 확인된 이후, 유기물을 연료로 이용하는 생물연료전지의 개발에 많은 관심이 있었다. 생물에서 전자전달은 세포 내막에서 이루어지며, 이 내막은 세포벽 등 절연성 구조의 안쪽에 위치하기 때문에 생물의 전자전달 과정에서 직접 전자를 전극에 전달할 수 없다. 유기물을 산화하여 성장하는 미생물로부터 효과적으로 전자를 전극으로 전달하기 위해 양친매성이며 저분자 형태의 전자 전달체를 매개체(electrochemical mediator, electron shuttle)로 사용하여 생물연료전지를 구축할 수 있었다. 생물연료전지는 화학 연료전지와 더불어 우주선에서 발생하는 폐기물을 효율적으로 처리하기 위하여 1965-70년에 걸쳐 미국 NASA에서 집중적으로 연구되었으나 상대적으로 화학 연료전지에 비하여 전력 생산 능력이 낮고 불안정한 출력형태가 얻어진 것으로 나타났다. 이후 생물연료전지는 여러 연구를 통하여 보다 효율적인 형태로 발전해 왔으며 1993년 Allen 등은 포도당을 연료로 하고 미생물(*Proteus vulgaris* : 435 mg in dry weight)을 biocatalyst로 사용하고 electrochemical mediator

(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)를 이용하여 0.4 mA의 전류를 5일 이상 안정적으로 생산하는 20 ml용량의 생물연료전지를 제작하였다. 여기서 포도당이 산화되며 전자가 발생하는 기작은 아래와 같다.



위의 식에서 1 분자의 포도당이 미생물에 의하여 산화되어 발생하는 24개의 전자를 전력으로 전환시키기 위해서는 위에서 언급한 electrochemical mediator의 첨가가 필수적이다. 즉 미생물의 전자 전달계를 통하여 산화된 포도당의 전자가 mediator를 환원시키고 이 환원된 mediator가 다시 전극을 환원시키면 자신은 산화된다. 산화된 mediator는 다시 미생물의 전자 전달계로 접근하여 환원되며 위의 과정을 되풀이한다. 포도당이 미생물의 대사과정을 통하여 산화되며 발생하는 전자는 mediator를 통하여 전극에 전자를 전달하게 되는데 mediator는 대체적으로 난분해성으로 2차 오염의 원인이 될 수 있으며 전극에 점착되어 효율을 떨어뜨리는 수도 있고 일반적으로 미생물의 성장을 저해하는 독성 물질이므로 연료전지의 수명을 제한한다.

현재까지 생물연료전지의 biocatalysts로 *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae* 등이 이용되었다 이들은 폐수 중의 유기물을 대사할 수 있으나, 매개체를 사용해야하는 단점이 있다. 또한 지금까지 선진국에서의 실험결과 1 종의 미생물을 순수 배양하여 미생물 연료전지를 운전하였기 때문에 운전 중 타균에 의한 오염의 발생 및 폐수 내의 이용할 수 있는 기질의 제한성이 미생물 연료전지의 개발에 문제점으로 부각되었다.

최근 혐기성 생태계에서 산소 대신, 제2철을 전자수용체로 이용하여 성장하는 세균이 많이 보고되고 있다. 이들은 물에 녹지 않는 전자수용체[Fe(III)]를 세포 안으로 운반하지 않고 세포 밖에서 환원시키기 위해 세포외막 (outer membrane, OM)에 cytochrome을 보유하고 있는 것으로 보고되었다. 예를 들어 Fe(III)를 전자수용체로 이용하는 *Shewanella putrefaciens* IR-1 은

전기 화학적으로 활성을 나타내고 이 세균이 전자 공여체로 이용하는 젖산이나, pyruvate를 연료로 사용하여 운전하는 연료전지에서 매개체 없이 전류를 발생하는 것이 밝혀졌다. 지금까지 알려진 Fe(III)환원세균이 이용할 수 있는 전자 공여체는 젖산, pyruvate, 아세트산, yeast extract 등과 benzene, toluene 등 일부의 방향족 화합물 등에 한정되어 있다. 따라서 폐수 중의 다양한 유기물을 이용할 수 있는 전기 화학적 활성세균을 개발하여 이를 이용하는 생물연료전지를 개발하면 폐수를 발전의 연료로 이용할 수 있기 때문에 폐수 처리비용을 줄일 수 있을 뿐 아니라 전자가 폐수 중의 유기물이 갖는 에너지의 대부분을 전기로 전환시키기 때문에 폐수 처리 과정에서 발생하는 오니의 양도 줄일 수 있으며, 이 과정에서 전기도 생산할 수 있는 이점이 있다. 따라서 본 연구를 통하여 일반적인 미생물연료전지의 단점인 매개체의 사용을 배제하고 보다 효과적이며 다양한 응용범위를 갖는 새로운 형태의 무매개체 생물연료전지를 개발하여 향후 폐수처리 및 폐수 오염도 감시 시스템, 중/소규모 자가 발전 시스템 등에 사용할 수 있도록 하는데 연구개발의 목적이 있다.

1-2 연구개발의 필요성

지금까지 선진국에서 개발된 미생물 연료전지는 매개체를 사용하며 단일균으로 작동하는 실험실 수준의 기술을 응용한 것으로서 산업화 가능성 및 응용성이 상당히 떨어진다. 본 연구를 통하여 개발된 새로운 기술인 미생물 연료전지의 운전은 위에서 언급한 기존 생물연료전지의 여러 가지 단점을 해결 할 수 있다.

특히 유기성 폐수는 미생물의 좋은 기질이 되며 폐수의 다양한 기질을 직접 전기로 만드는 장치인 미생물 연료전지를 운전 시 유기 폐수를 직접 전기로 자원화 할 수 있다. 현재 도시화, 산업화에서 발생하는 가장 큰 문제점중의 하나가 바로

여러 가지 공해물질의 발생이다. 그 중에서 폐수의 발생 및 효과적인 처리는 풀어야 할 난제중의 하나로 인식되고 있으며 현재 환경이 더 이상 복구할 수 없을 정도로 악화되는 것을 방지하기 위해 우리는 무거운 경비를 지출하여야만 하는 상황에 봉착되었다. 중요한 공해물질의 하나인 유기폐수는 인구의 급격한 증가로 인한 재래식 오염의 대표적인 예로 이미 오래 전부터 '오염의 해결방법은 희석이다' 라는 구식 논리를 폐수 처리에 더 이상 적용할 수 없는 상황에 이르게 되었다. 따라서 현재의 폐수 처리 기술은 반세기전 처럼 폐수를 아무런 처리없이 자연으로 돌려보내는 과정이 아니라 생물, 물리, 화학적 처리과정을 거쳐 오염물질이 상대적으로 짧은 시간 내에 한정된 공간에서 오염물질이 제거하는 기술로 변화되었다. 생물학적 폐수처리는 유기폐수를 주요 처리대상으로 하며 호기성 처리과정과 혐기성 처리과정이 포함된다. 이러한 처리과정을 거치는 동안 폐수 속의 유기물은 미생물의 에너지원으로서 세포의 증식과 성장에 이용되며 결과적으로 미생물의 활성에 비례하여 감소하여 처리산물로 물, 탄산가스, 암모니아, 질산염, 질소, 메탄가스, 황화수소 등을 발생시킨다.

지금까지 미생물을 이용한 생물학적 처리는 산소공급을 위한 폭기 등 단순히 에너지 소모적인 과정으로만 이해되어졌으며 미생물을 이용하는 폐수 처리과정 중에서 가용 에너지를 생산하는 방법은 알려진 바가 없었다. 앞서 설명한 바와 같이 미생물은 여러 종류의 유기물을 흡수하여 미생물 자체내의 대사과정과 이에 연관된 효소를 이용하여 분해하며 여기서 발생하는 여러 가지 상태의 에너지를 생육과 증식에 이용하게 된다. 이때 반드시 거쳐야 하는 과정이 이 흡수된 유기물의 산화-환원 과정이다. 이 과정을 거치며 고 에너지의 유기물이 저 에너지 상태의 미생물 분해산물로 변화되며 여기서 발생하는 에너지가 미생물에게 이용된다. 산화와 환원은 전자의 이동이며 미생물 내에서의 전자의 흐름은 상당히 낮은 밀도를 가지나 우리가 발전기를 통하여 얻은 전자와 똑같은 성질을 갖는다. 따라서 이러한 생체전류 및 전자를 이용 발전하는 미생물연료전지 기술을 개발하였을 경우 다음과 같은 구체적인 부가 기술을 개발 할 수 있다.

1. 유기폐수의 자원화를 통한 효과적이며 환경 친화적인 폐수처리공정 기술 개발
2. 생물학적 대체 에너지에 대한 가능성 탐색
3. 미생물의 대사가작 등에 대한 연구가 가능한 응용기술 축적
4. Biosensor 등 생체물질을 응용한 기기의 생산
5. 전기 생산 미생물 탐색을 통한 새로운 균주의 획득 및 응용기술 축적
6. 특정 오염성분의 선택적 제거

또한 많은 부분의 에너지가 전기로 전환되기 때문에 폐수처리 중에 유기물의 산화에서 발생하는 에너지를 이용하여 성장하는 미생물의 수율이 낮아진다. 따라서 일반적인 폐수처리 공정상에서 문제 시 되고 있는 오니의 발생도 미생물 연료전지를 이용한 폐수처리공정에서는 크게 저하될 수 있다. 이 경우 잉여오니의 처리비용을 줄일 수 있다. 또한 기존의 폐수 처리법과 비교하여 생물연료전지는 사용하는 금속염환원세균이 다른 미생물에 비해 난분해성물질의 분해력이 높고 중금속의 환원에 의한 침전 등의 능력이 있기 때문에 특수 산업폐수처리에 적합하며, 전력공급이 어려운 벽지의 보조전원으로도 가능하다고 본다. 따라서 미생물 연료전지의 경제적 산업적 측면에서의 기술 개발 필요성을 요약하면 다음과 같다.

1. 폐수 처리 시 발생하는 활성 오니의 감소
2. 폐수 처리와 동시에 발생하는 전력으로 인한 에너지 절감효과
3. 최초 개발에서 비롯된 기술 선도
4. 미생물의 응용범위 확대에 따른 사회의 인식 변화 및 생물산업 활성화
5. 폐기물 선별분류의 제도적 장치

이상과 같이 새로운 기술인 무매개체 미생물 연료전지 기술의 개발은 다양한 응용효과를 갖고 있으며 현재 발생하는 쓰레기 적재장 침출수 처리 및 잔여 음식물 처리, 특수폐수처리 등 환경문제, 폐수처리시설의 보조전원 및 산간오지의

소규모 발전 등 에너지문제해결로 적용 할 수 있고 이를 바탕으로 연료전지의 구성에 적용되는 여러 가지 기술을 정밀화학에 응용하여 bacterial metabolism analyser, biosensor 등 여러 가지 기술 집약적이며 선도적인 연구가 이루어 질 수 있다.

1-3 연구개발의 범위

1. 전기 화학적 활성 세균 (electrochemically active bacteria)의 특성 연구

일반적인 유기 폐수에 함유된 복합적인 유기물을 생물연료전지를 통해 산화시키기 위하여 금속염 환원세균인 *Shewanella putrificiens* IR-1을 model strain으로 사용하여 전기 화학적, 생리학적 특성조사를 실시하였다.

특히 금속염 환원세균의 전기 화학적 특성을 조사하고 생물연료전지에의 적용성을 검토하였으며 위의 연구를 통해서 습득한 자료를 생물연료전지를 구축하기 위한 기본적인 자료로 활용하였다.

2. 효율적인 생물연료전지 시스템의 구축

전극재료의 변경, channeling이 발생하지 않는 연료전지 구조변경 등 물리화학적 방법을 통하여 효율적으로 전자가 전극으로 전달될 수 있도록 한다. 특히 효율적인 연료전지의 구조개선, 예를 들어 전극-미생물간의 친화력 증가, 효과적인 연료 공급 및 안정적 작동을 위한 기밀설계 등을 통해 구조개선을 실시하였다. 또한 미생물 농도, 전극의 재질 및 넓이 등 기본조건의 변화에 따른 기질 소모량, BOD 감소량, 전력 생산량 등을 조사하여 주어진 조건에서 효율적으로 운전되는 시스템을 구성하였다.

이상의 연구에서 습득한 자료를 바탕으로 하여 미생물 및 연료 등

생물연료전지의 최적화가 유지되도록 세포외적 조건을 computerized하고 적정 가동시간을 조사하고 장시간 가동한 생물연료전지의 기능상 문제점을 보완하였다.

3. 무매개체 미생물연료전지 기술의 응용 범위 확대 및 효율 증대 방안 조사

위에서 습득한 결과를 바탕으로 무매개체 생물 연료전지의 응용범위를 조사하고 발전 효율을 증가시킬 수 있는 방안을 실험적으로 조사하였다. 특히 생활 폐수를 위시한 각종 폐수의 이용성을 확인하고 미생물 연료전지를 이용한 전기 화학적 활성 세균의 농화 배양 및 기질 특이성, 전극에 대한 부착상태, 폐수처리능력, 전극에서의 미생물 분리 및 동정 등을 시행하였다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

2-1 미생물 연료전지의 국내외 개발 현황

생물연료전지란 연료전지에서 anode에 연료를 산화하는 미생물 등 생물이나 그 일부를 촉매로 사용하는 장치이며 생물연료전지는 사용하는 촉매에 따라 다양한 유기물을 연료로 사용할 수 있는 이점이 있다. 이러한 관점에서 특정 조직 등 생물의 일부보다는 미생물을 사용하는 것이 일반적이다. 미생물에서 유기물의 산화로 발생하는 환원력(전자)은 원형질막에 있는 전자전달체의 작용으로 산소를 환원하면서 발생하는 에너지로 protonmotive force를 형성하여 ATP 생산에 이용한다. 이때 전자전달체와 전극 사이에 전기적으로 절연성이 강한 세포 표면 구조가 있기 때문에 전자를 전극으로 직접 연결시킬 수 없다. 이러한 이유 때문에 지금까지 연구된 생물연료전지에 관한 연구에서는 산화형과 환원형이 모두 친유성이 강해 쉽게 막을 통과할 수 있는 전자전달체를 매개체(electrochemical mediator)로 사용하였다(Roller 등, 1984).

Fig. 2.1.1에서와 같이 생물연료전지는 음극과 양극을 조합하여 한 개의 전지를 구성할 수 있으며, 양이온 교환 막을 이용하여 음극과 양극을 분리한다. 음극은 미생물과 전자를 흡수하는 전극 그리고 미생물에서 전자를 받아 환원된 상태가 된 후 전극에 전자를 공여하고 자신은 산화되는 과정을 되풀이하는 전자 전달 매개체 등으로 구성되고 양극은 전극과 전자수용체(여기서는 공기 중에 포함된 산소)로 구성된다(Allen and Bennetto 1993). 충분한 양의 매개체가 공급되는 조건에서 일부는 환원된 형태로 세포 밖으로 나와 음극내의 전해질 용액 상에 존재하게 된다. 이때 적당한 전극(탄소나 금속 전극 등)이 음극 내에 존재하고 이 음극이 상대적으로 높은 전위를 갖는 양극에 연결되어 있으면 환원된 상태의 전자전달체는 전자를 전극에 공여하고 산화된 형태로 바뀌며 다시

미생물에서 전자를 받아들일 준비가 된다. 이 과정이 반복되면 연속적으로 전자가 음극에서 양극으로 흐르게 되며 이는 곧 발전기나 일반적인 전지의 전류와 같다. 따라서 양극과 음극사이에 부하(예: 전구, 모터 등)를 걸어주면 작동하게 된다.

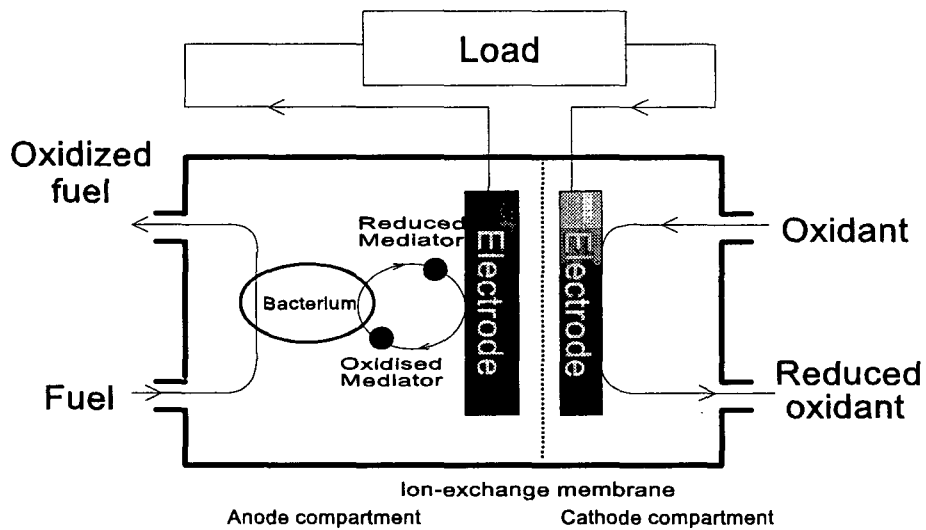


Fig.2.1.1 A schematic diagram of a conventional microbial fuel cell.

전자전달 매개체(electrochemical mediator) 를 사용하는 생물 연료전지의 구조와 작동기술 개발은 영국, 일본, 핀란드 등지에서 계속 연구되고 있다. 각국의 주요 연구관심사항은 Table 2.1.1과 같다.

그러나 지금까지의 보고에 의하면 위에서 언급한 연구들은 모두 HNQ, thionine 등의 electrochemical mediator를 사용하였고 실험실적 수준에서 벗어나지 못한 것으로 판단된다. 이러한 판단의 주요한 근거로는 electrochemical mediator의 필수적인 사용과 고가의 연료(e.g. glucose) 가 사용되고 있는 점이며 연구의 목적이 산업적 전력생산성 향상을 위한 실험실 수준의 연구에 집중되어 있었다. 특히 유기폐수를 연료로서 폐수처리공정의 중요한 단계로서

생물연료전지가 자리잡기 위한 필요조건인 mediator로 인한 2차 오염 및 부가적 비용이 발생하지 않는 system의 개발이 지금까지는 불가능한 것으로 알려져 왔기 때문이며 외국 연구기관에서 사용중인 생물도 균의 특성상 연료전지의 개발에 효과적인 것으로 보이지는 않았기 때문이다.

Table 2.1.1 Research concerns on conventional microbial fuel cells

Country	Concerns	Reference
UK	Immobilization of microbial cells, computer control systems	Allen and Bennetto, 1993
Japan	Use of photosynthetic organisms	Yagishita et al., 1996
Finland	Use of fishing wastes	Zhang and H a l m e , 1995
Germany	Use of sulphate/sulphide as mediator	Cooney et al., 1996

2-2 금속염 환원 세균

혐기성 호흡에서 이용되는 전자수용체는 질산염, Fe(III)과 Mn(IV)을 위시한 금속염, 황산염, 이산화탄소를 들 수 있다 (Table 2.2.1). 질산염을 전자수용체로 이용하는 혐기적 호흡은 탈질 반응으로 잘 알려져 있으며, 대부분 통성혐기성

세균에 의해 이루어진다. 황산염을 이용하는 황화수소(H_2S) 생산 반응은 발생하는 황화수소가 강한 부식작용을 갖기 때문에 오래 전부터 연구되어 왔으며, 이산화탄소의 환원 또한 메탄 발효와 관련하여 많이 알려져 있다.

금속염을 전자수용체로 이용하는 금속염 환원 세균은 비교적 최근에 알려지기 시작하였다. 생태계에서 오래 전부터 관찰되어 온 제2철[Fe(III)]의 환원이 황화수소 등 미생물의 대사 산물에 의한 무생물적인 반응으로 판단되었으나 최근 Fe(III)를 전자수용체로 성장하는 여러 종류의 세균이 분리되면서 Fe(III)는 물론 Mn(IV), chromate, selenate, arsenate 등 여러 종류의 금속염이 전자수용체로 이용되는 것으로 밝혀지고 있다 (Arnold 등, 1986 ; Myers and Nealson, 1990 ; Lovley, 1993 ; Nealson and Saffarini, 1994) (Table 2.2.2 참조).

Table 2.2.1 Free energy change in the oxidation of NADH coupled to the reduction of various electron acceptors (Kim, 1995).

Reduction	ΔG° (kJ/2e ⁻)
$O_2 \rightarrow 2H_2O$	-219.1
$2NO_3^- \rightarrow N_2$	-206.1
$Fe(III) \rightarrow Fe(II)$	-209.5
$Mn(IV) \rightarrow Mn(II)$	-134.5
$HSO_4^- \rightarrow HS^-$	-20.2
$CO_2 \rightarrow CH_4$	-14.6

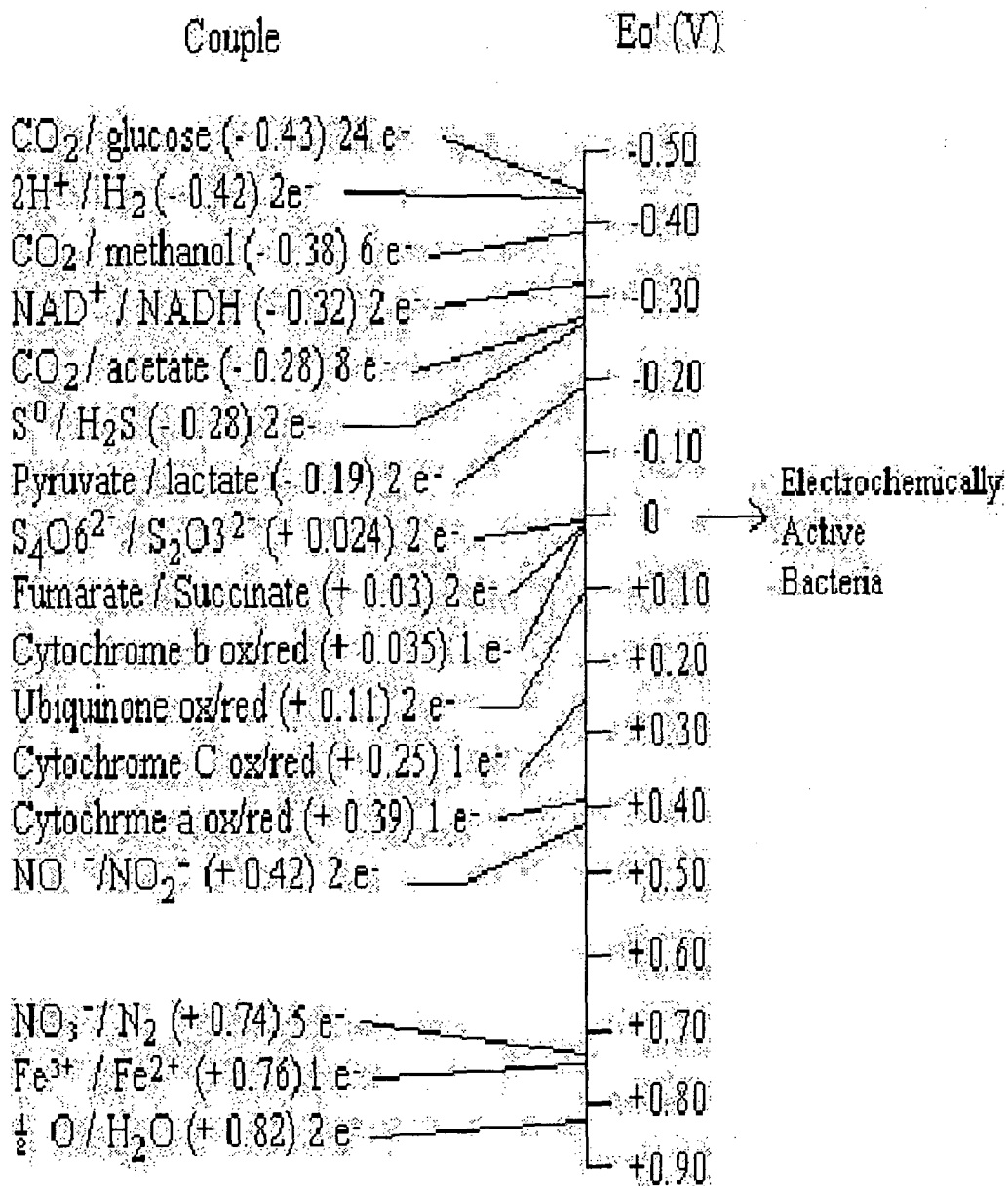


Fig. 2.2.1 Electron tower.

Oxidation and reduction couples are arranged from the strongest reductants (negative reduction potentials) at the top to the strongest oxidants (positive reduction potentials) at the bottom.

Fe(III)/Fe(II), Mn(IV)/Mn(II) 등 금속염의 산화-환원 전위는 질산염과 비슷하여(Table 2.2.2, Fig. 2.2.1) 황산염 환원 세균이나 메탄생산 세균보다 동일한 전자공여체로부터 많은 자유에너지를 얻을 수 있으며, 질산염보다 자연계에 광범위하게 분포되어 있기 때문에 혐기성 생태계에 유입되는 유기물의 50% 이상이 금속염 환원 세균에 의해 대사된다는 보고도 있을 정도로 자연계에 널리 분포되어 있다 (Arnold 등, 1990 ; Lovley, 1991 ; Myers and Myers, 1993a).

Fe(III) 외에도 혐기성 생태계에서 Mn(IV), U(VI), Cr(VI), As(V), Se(VI), Tc(VII) 등 여러 종류의 금속염이 전자수용체로 이용된다 (Table 2-3). 많은 종류의 금속이온은 산화-환원 상태에 따라 물에 대한 용해도가 변한다. Fe(III)의 경우 유기물의 산화와 금속염 특히 Fe(III)의 환원에서 발생하는 자유에너지가 미생물에 의해 보존(conserved)되는지에 관한 상반되는 보고가 있다. 호수의 sediment에서 분리한 세균에서 Fe(III)가 electron sink로 작용한다는 보고(Jones 등, 1983)와 혐기성 조건에서 활성이 나타나는 *Shewanella putrefaciens*의 ferric reductase에 의한 Fe(III)의 환원은 산화적 인산화 반응에 연결되지 않는다는 결과(Arnold 등, 1986)가 있는 반면 *Shewanella putrefaciens*에 의한 Fe(III) 환원에서 proton이 세포 밖으로 방출된다는 연구 결과도 있다(Myers and Nealson, 1990).

이러한 상반되는 결과는 실험에 사용한 Fe(III)의 형태가 서로 다르기 때문으로 판단된다. Jones 등(1983)은 불용성의 ferric oxy-hydroxide를 사용하였으며, Myers and Nealson(1990)은 물에 녹는 ferric citrate를 사용하였다. Arnold 등(1986)은 호기적 조건에서는 Fe(III)가 환원되지 않지만 낮은 활성의 ferric reductase가 원형질체에서 측정되며, 혐기적 조건에서는 호기적 조건에서 측정되는 원형질체 ferric reductase 외에 membrane ferric reductase가 합성된다고 보고하였다. 따라서 Myers and Nealson(1990)이 관찰한 proton translocation은 원형질체 ferric reductase에 의한 수용성 Fe(III)의 환원에서 이루어지는 것으로 수용성의 Fe(III)의 농도가 극히 낮은 자연 생태계에서는 일어나지 않는 것으로 판단된다.

Table 2.2.2 Metal in reducing bacteria.

Strains	Electron donation	Electron accept
<i>Bacillus infernus</i> (Boone <i>et al.</i> , 1995)	lactate (pyruvate)→acetate	Fe(III)→Fe(II)
<i>Deferribacter thermophilus</i> (Greene <i>et al.</i> , 1997)	acetate→CO ₂ peptone→CO ₂	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II)
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (Roden and Lovley, 1993)	acetate→CO ₂	Fe(III)→Fe(II)
<i>Enterobacter cloacae</i> (Komori <i>et al.</i> , 1990)	acetate→CO ₂	Cr(VI)→Cr(III)
<i>Ferrimonas balearica</i> (Rossello-Mora, <i>et al.</i> , 1995)	lactate (pyruvate)→acetate	Fe(III)→Fe(II)
<i>Geobacter metallireducens</i> (Lovley <i>et al.</i> , 1993)	acetate→CO ₂ aromatic compounds→CO ₂	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II) U(VI)→U(II) Tc(VII)→Tc(IV)
<i>Geobacter sulfurreducens</i> (Caccavo <i>et al.</i> , 1994)	acetate→CO ₂	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II)
<i>Geospirillum barnesii</i> (Stoltz <i>et al.</i> , 1997)	lactate (pyruvate)→acetate	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II) Se(VI)→Se(0) As(V)→As(III)
<i>Geovibrio ferrireducens</i> (Caccavo <i>et al.</i> , 1996)	acetate→CO ₂ amino acid→CO ₂	Fe(III)→Fe(II)
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (Dobbin <i>et al.</i> , 1996)	Anaerobic photosynthesis	Fe(III)→Fe(II)
<i>Shewanella alga</i> (Rossello <i>et al.</i> , 1994) (Truex <i>et al.</i> , 1997)	lactate (pyruvate)→acetate	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II) U(VI)→U(IV)
<i>Shewanellafrigidimarina</i> (Boman <i>et al.</i> , 1997)	glucose→acetate	Fe(III)→Fe(II)
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Lovley, 1993)	lactate(pyruvate)→acetat	Fe(III)→Fe(II) Mn(IV)→Mn(II)
<i>Thermoterrabacterium ferrireducens</i> (Slobodkin <i>et al.</i> , 1997)	glycerol→acetate glucose→acetate	Fe(III)→Fe(II)
<i>Thauera selenatis</i> (DeMoll-Decker and Macy, 1993)	acetate→CO ₂	Se(VI)→Se(0)
<i>Wolinella succinogenes</i> (Tomei <i>et al.</i> , 1995a, b)	acetate→CO ₂	Se(VI)→Se(0)

2-3 금속염 환원세균의 전자대사

많은 종류의 세균이 제2철을 전자수용체로 이용하는 것으로 알려지고 있으나 전자전달에 관련되는 연구는 초기 단계이며 *Shewanella putrefaciens*와 *Geobacter metallireducens*에 한정되어 있다. 최종전자수용체(terminal electron acceptor)로 이용되는 Fe(III)의 물에 대한 용해도가 극히 낮기 때문에 세포 밖에서 환원되는 것으로 알려지고 있다. 이는 assimilatory Fe(III) reduction에서 siderophore를 chelating agent로 합성하는 것이 Fe(III)의 환원에서 얻는 에너지보다 클 것으로 예상되기 때문에 타당성이 있다. 실 예로 그람음성균인 *Shewanella putrefaciens*는 혐기적 환경에서 cytochrome c를 outer membrane에 합성한다(Myers and Myers, 1992). 같은 세균에서 ferric reductase의 활성도 outer membrane에서 측정된다(Myers and Myers, 1993a). Outer membrane에 있는 이 두 단백질이 원형질체에서 이루어지는 전자공여체의 산화에서 공급되는 전자를 이용하여 세포 밖에서 Fe(III)를 환원하는 것으로 판단된다 (Fig. 2.3.1).

원형질체에서 이루어지는 전자공여체의 산화로 환원되는 전자전달체로부터 outer membrane에 있는 cytochrome으로 전자를 전달하기 위해 복잡한 경로를 거칠 것으로 생각된다. *Shewanella putrefaciens*에서 menaquinone(Myers and Myers, 1993b)과 환원전위가 낮은 cytochrome c_3 (Tsapin 등, 1996)이 혐기적 조건에서 철의 환원에 관여하는 것으로 알려졌다. Cytochrome c_3 은 정제되고 clone되어 특성이 연구되었다(Pealing 등, 1992; Myers and Myers, 1997a). 이 단백질은 원형질막의 안쪽에 결합한 상태로 원형질체의 전자공여체 산화와 outer membrane의 전자수용체 환원을 연결하는 역할을 갖는 것으로 판단된다. 정제된 outer membrane의 cytochrome c의 특성도 보고되었다(Myers and Myers, 1997b).

*Shewanella putrefaciens*는 통성혐기성 세균으로 산소를 전자수용체로 이용할 수 있을 뿐 아니라 혐기적 조건에서는 질산염, 아질산염, Fe(III), Mn(IV), fumarate, trimethylamine-*N*-oxide (TMAO), dimethyl sulfoxide (DMSO),

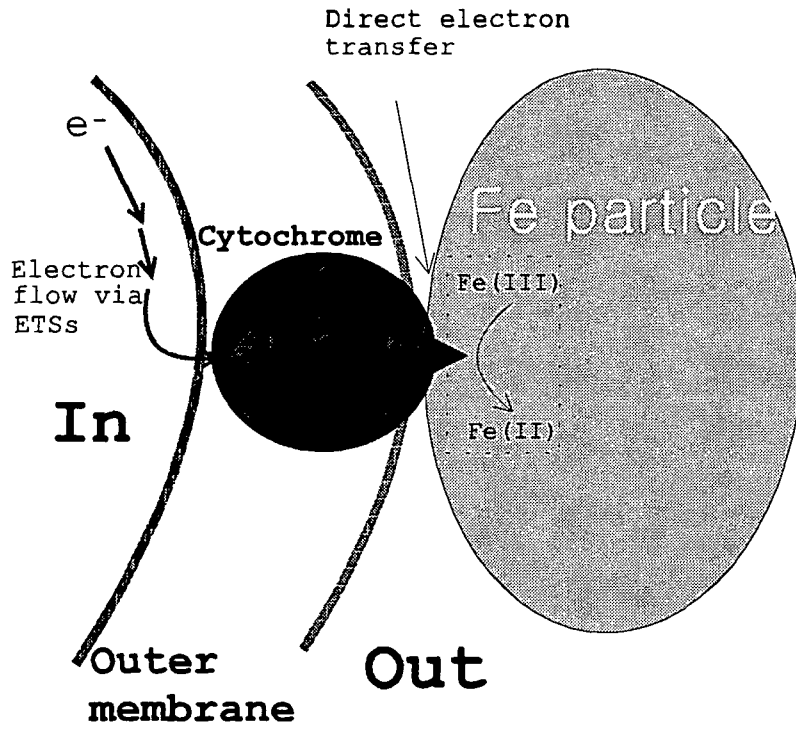


Fig.2.3.1 A schematic diagram of the direct electron transport from a metal-reducing bacteria to an water insoluble Fe particle.

thiosulfate, sulfite, elementary sulfur 등 다양한 전자수용체를 이용할 수 있다(Nealson and Saffarini, 1994). 비슷한 성질을 갖는 *Escherichia coli* 등 장내세균이 FNR의 작용으로 다양한 전자수용체를 이용하면서 주어진 조건에서 가장 많은 에너지를 보전하기 위해 복잡한 조절 작용을 갖는 것과 같이 *Shewanella putrefaciens*도 유사한 조절 단백질, ETRA의 작용을 통하는 적절한 조절 기작을 보유하고 있다(Saffarini and Nealson, 1993; di Christina and deLong, 1994).

*Geobacter metallireducens*의 전자 전달에 관한 연구는 거의 되지 않았으며,

다만 Fe(III)의 환원에 cytochrome a와 c가 관여한다는 것이 알려졌다(Gorby and Lovley, 1991).

탄소 대사의 경우 Table 2.2.2에서 보는 바와 같이 대부분의 금속염 환원 세균은 lactate, acetate 등 혐기성 발효 산물을 전자공여체로 이용한다. 포도당, 과당 등 6탄당을 전자공여체로 이용하는 금속염 환원 세균의 농화배양(enrichment culture)은 현재까지 실패하였으며(Nealson and Saffarini, 1994), Fe(III)을 전자수용체로 이용하는 혐기성 미생물도 황산염 환원 세균이나 methanogen과 같이 당을 직접 이용하지 못하기 때문에 자연 생태계에서 발효(fermentative) 세균과 공생하는 것으로 보고되었다(Lovley and Phillips, 1989). 최근에 분리된 고온성 금속염 환원 세균인 *Thermoterrabacterium ferrireducens*가 지금까지 알려진 당을 이용하는 유일한 금속염 환원 세균이다(Slobodkin 등, 1997). *Geobacter metallireducens*는 혐기적 조건에서 benzene 등 방향족 화합물을 분해할 수 있으며(Lovley and Longergan, 1990), 생태계에 Fe(III)를 공급하면 난분해성 물질의 분해가 촉진되는 것이 관찰되었다(Lovley 등, 1996).

이상에서 살펴본 바와 같이 금속염 환원 세균은 일반적으로 세균 외부에 존재하는 불용성 금속염을 electron acceptor로 사용하여 혐기적 호흡을 하는 성질을 가지고 있으며 이러한 성질을 갖게되는 주요한 원인 가운데 하나로서 세포외막에 존재하는 cytochrome (OM cytochrome)을 들 수 있다. 현재까지 *Shewanella putrefaciens*를 중심으로 OM cytochrome에 대한 연구가 이루어져 있으며 이들의 외부 불용성 전자 수용체의 환원능력은 곧 이들 세균의 전기 화학적 활성도를 나타낸다고 볼 수 있다. 따라서 본 보고서에서는 이후 미생물 연료전지에 사용된 미생물을 금속염 환원세균이라 칭하지 않고 보다 적절한 용어인 전기 화학적 활성 세균 (electrochemically active bacteria, EAB)으로 칭하기로 하였다. 전기 화학적 활성 세균은 *Shewanella putrefaciens*와 같이 cyclic voltammetry에서 oxidation-reduction peak를 나타내며 금속염 등을 이용한 혐기적 호흡을 수행하며 생육하는 것을 그 특징으로 한다.

2-4 전기 화학적 활성 미생물을 이용하는 무매개체 생물연료전지

본 연구기관에서는 여러 종의 철환원세균을 분리한 바 있으며 이 분리된 미생물을 전기화학연구의 기본적인 방법인 cyclic voltammetry를 사용하여 조사한 결과 일반적인 미생물과는 달리 전기 화학적으로 활성이 존재한다는 것을 최초로 확인하였다. 이러한 미생물 종을 적용하여 생물연료전지를 구성하고 운전한다면 이들 미생물 종 특유의 전기 화학적 활성으로 인하여 별도의 전자전달 매개체 투여 없이 폐수내의 유기물을 자화하며 여기서 발생하는 전자를 외부의 전극으로 이동시켜 전류를 발생할 수 있을 것으로 보고 여러 가지 실험에 착수하였다. 앞 절에서 언급한 바와 같이 금속염 환원 세균 등이 전자수용체로 이용하는 제2철 화합물은 물에 대한 용해도가 매우 낮다. 따라서 이들 세균은 전자수용체를 세포 안으로 흡수하지 않고 세포 밖에서 환원시키는 것으로 알려지고 있다. 철환원세균의 일종인 *Shewanella putrefaciens*를 혐기적으로 배양하면 막에 있는 cytochrome의 65% 정도가 outer membrane에 위치하여 불용성의 전자수용체를 세포 밖에서 환원하는 데 중요한 역할을 담당한다. 따라서 이러한 종류의 전기 화학적 활성 미생물을 미생물 연료전지에 투입하고 적절한 환경과 연료를 첨가하면 별도의 전자전달 매개체 없이 미생물의 전자가 외부의 전극을 환원하게 되고 미생물의 대사가 유지되는 동안 이러한 전자의 전달과정이 이루어지게 되므로 전지가 작동할 수 있게 된다. Fig. 2.4.1에서는 이와 같은 전기 화학적 활성 미생물을 사용하는 무매개체 미생물 연료전지의 모식도를 표시하였다. 그림에서 보는 것처럼 투입된 연료는 미생물의 electron transport system에 의하여 산화되며 여기서 발생하는 전자가 외부의 전극에 OM cytochrome을 통하여 직접 전달되게 된다. 이때 적절한 저항을 연결한 회로를 구성 시 전자는 cathode에 도달, 투입된 산소등 산화제를 환원시켜 물을 형성하게 된다. 이와 같은 원리를 응용하여 본 연구에서는 우선

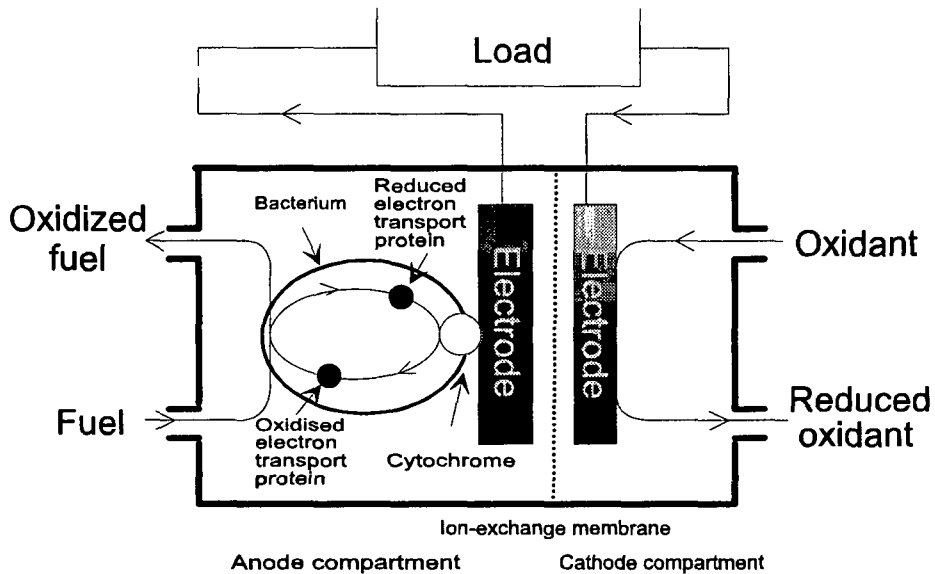


Fig. 2.4.1 A Schematic diagram of the mediator-less microbial fuel cell using electrochemically active bacteria.

*Shewanella putrefaciens*를 이용한 미생물 연료전지를 구성하고 이를 운전하여 전지로서의 성능을 조사하였다. 또한 *Shewanella putrefaciens*의 전기 화학적 배양을 통하여 이들의 외부 전자 수용체에 대한 환원 및 관련 대사부분을 확인하였고 이 실험을 근거로 여러 가지 종류의 유기물을 대사 할 수 있는 다양한 종의 미생물을 농화하기 위한 전기 화학적 농화배양법 및 이를 응용한 우수한 성능의 연료전지를 개발하였다. 이와 함께 연료전지의 구성 및 작동 최적화를 위한 여러 가지 실험을 병행하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

3-1 *Shewanella putrefaciens* IR-1을 이용한 무매개체 미생물 연료전지의 운전

1. 이론적 배경

최근 20년 동안 다양한 종류의 철환원 세균이 자연에서 분리되었으며 이와같은 미생물은 혐기적 환경에서 유기물 대사를 하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (Lovley and Phillips, 1986 ; Nealson and Saffarini, 1994 ; Greene *et al.*, 1997; Myers and Myers, 1992 ;Caccavo *et al.*, 1994 ; DiChristina, 1994).

특히 *Shewanella putrefaciens*와 *Geobacter metallireducens*를 이용한 연구가 중점적으로 이루어 졌다(Lovley *et al.*, 1993 ; DiChristina and DeLong, 1994). 특히 이들 미생물이 electron acceptor로 사용하는 Fe(III)는 중성의 pH에서 불용성이며 자연에서 일반적으로 미생물 보다 큰 거대분자로 존재하기 때문에 미생물이 이들의 환원을 통한 혐기적 호흡을 하기 위해서는 미생물-Fe(III)간의 물리적 접촉이 필수적이다 (Lovley *et al.*, 1989 ; DiChristina and DeLong, 1994).

보고에 의하면 혐기적으로 배양한 *Shewanella putrefaciens*의 cytochrome은 약 80 %가 outer membrane에 존재하는 것으로 알려져 있다(Myers and Myers, 1992; Myers and Myers, 1997). 이들 미생물의 outer membrane fraction은 조사하였을 때 호기적 상태에서 83 kDa의 c-type cytochrome의 양이 혐기적 상태보다 감소하는 것으로 나타났다. 또한 transposon insertion mutation을 통한 Fe(III) reduction activity가 결손된 *Shewanella putrefaciens*도 분리되었다 (Beleaev and Saffarini, 1998).

현재까지 몇 종의 전기화학적 방법이 cytochrome을 비롯한 미생물의 산화환원 단백질의 연구에 이용된 바 있으며 다양한 종류의 산화환원 단백질이 전기 화학적으로 활성을 갖는 것으로 나타났다(Kazlauskaite *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1999). 그러나 이와 같은 산화환원 단백질은 단백질의 redox center 부근의 peptide chain으로 인하여 가려져 있는 경우가 많기 때문에 이들의 전기 화학적 특성을 조사하기 위해서는 전극을 변형하여 전극-단백질간의 접촉을 유도하는 방법을 사용하여야 하였다 (Rivera *et al.*, 1994). 일반적으로 산화환원 단백질뿐만 아니라 미생물 자체도 전기적 절연체인 세포벽 및 다른 세포 막 구조로 인해 전기 화학적으로 불활성이다. 따라서 미생물에 대한 전기 화학적 연구 및 미생물 연료전지의 구축을 하기 위해서는 전자전달 매개체의 사용은 필수적이였다 (Kim and Kim, 1988 ; Rawson and Willmer, 1989; Kim *et al.*, 1990 ; Richardson *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 1995, Siebel *et al.*, 1984 ; Allen *et al.*, 1993 ; Palmore *et al.*, 1998)

미생물 연료전지는 미생물의 촉매작용을 통해서 발생하는 생화학 에너지를 직접 전기적 에너지로 변환 시키는 장치이다 (Bennetto *et al.*, 1987). *Desulfovibrio desulfuricans*, *Proteous vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas species* 등의 미생물과 산화환원 효소를 이용한 여러 가지 (미)생물 연료전지가 개발되었다 (Tayhas *et al.*, 1994). 일반적인 미생물 연료전지에서는 기질의 미생물에 의한 산화에 의하여 anodic potential이 발생하며 적절한 형태의 cathode를 연결하였을 때 회로를 따라서 전류의 발생을 관찰 할 수 있다. 미생물-전극간의 직접적인 전자전달이 몇몇 연구에서 증명된바 있으나 그 양이 극히 적기 때문에 전자전달 매개체를 사용한 미생물 연료전지의 구축이 필 수 적인 것으로 여겨져 왔다(Palmore *et al.*, 1998 ; Siebel *et al.*, 1984). 일반적으로 사용되는 매개체는 thionine, methyl viologen, 2-hydroxy-1, 4-naphtoquinone 등이 었다(Tayhas *et al.*, 1994). 여기서 매개체는 미생물-전극간의 전자운송에 사용된다 (Fig. 2.1.1).

미생물 연료전지는 전기의 생산을 위한 연구목적 이외에도 미생물 활성 측정 폐수 처리등의 목적으로 연구된 바도 있다 (Tayhas *et al.*, 1994). 그러나 이들 미생물 연료전지가 아직까지 상용화되지 못한 가장 큰 이유로는 아마도 매개체의 필수적인 사용에 기인하는 것으로 보인다(Tayhas *et al.*, 1994). 따라서 본 연구를 통한 매개체 없는 생물 연료전지의 개발은 미생물 연료전지의 사용화 및 응용성을 넓히는데 유용한 결과를 습득 할 수 있다.

2. 실험 재료 및 방법

가. 사용 균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 Table 3.2.1에 표시하였다. 배양은 LB 배지에서 실시 하였고 배양 온도는 30℃였다. 혐기적 배양은 LB배지를 13 L carboy (Wheaton Sci. Co, Millville, NJ, USA)에 첨가 후 가압 살균 즉시 질소를 sparging하여 냉각한 혐기적 배지에 over night culture한 균을 100 ml 첨가 후 진탕하지 않고 배양하여 실시하였다. 호기적 배양은 1000 ml flask에 200 ml의 배지를 첨가 후 진탕하여 (160 rpm) 실시하였다.

혐기적으로 배양된 미생물을 얻기 위하여 96시간 배양 후 continuous centrifugation system (KSB-R, Kendro Lab. Prod., Newtown, CT, USA)을 사용하여 13,000 g, 4℃에서 연속으로 원심 분리하여 균체를 분리하였다. 분리된 균체는 혐기적으로 처리된 phosphate buffer (pH 7.0 containing 0.1 M NaCl)을 사용하여 혐기적 조건에서 3 회 세척하였다. 세척한 균체는 buffer에 적량 희석하여 660 nm에서 흡광도를 측정한 후 건조균체와 흡광도를 비교한 graph를 작성 후 이를 이용하여 buffer내의 균체량을 측정하였다. 호기적으로 배양된 미생물은 24 시간 배양 후 별도의 혐기적 처리 없이 원심 분리 후 buffer를 사용하여 3회 세척 후 실험에 사용하였다.

Table 3.2.1 Bacterial strains used in this st

Strain	Source or reference
<i>S. putrefaciens</i> IR-1	(Hyun <i>et al.</i> , 1999)
<i>S. putrefaciens</i> MR-1 ^a	(Myers and Myers, 1992)
<i>S. putrefaciens</i> SR-21 ^{a,c}	(Beliaev and Suffarini, 1998)
<i>E. coli</i> NCIB 10772 ^b	

a Strains were kindly supplied by D. Saffarini (Department of Biological Sciences, Univ. of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA).

b The strain has been maintained in the laboratory for a number of years.

c A transposon mutant of *S. putrefaciens* MR-1.

나. Cyclic voltammetry를 이용한 전기 화학적 특성 조사

전기 화학적 활성 미생물의 직접적인 미생물-전극간의 전자전달능력을 확인하기 위하여 cyclic voltammetry를 실시하였다.

사용된 potentiostat는 CV-50W (BAS, West Lafayette, IN, USA)였으며 이는 IBM 호환 기종 PC에 기기제작 회사에서 공급한 software를 이용, 연결하였다. 작업전극은 glassy carbon electrode (MF-2012, BAS)이였으며 보조전극은 백금전극 (MW-4130, BAS)이였으며 기준전극은 Ag/AgCl (RE-5B, BAS)을 사용하였다. 기기를 통하여 습득한 data (*.dat)는 Sigma plot®을 이용하여 graph화하였다.

약 0.36 g/L (건조중량 기준)의 균체를 electrochemical cell에 첨가 후 측정을 실시하였으며 scan rate 및 작업 온도는 각각 0.1 V/s, 25 °C 였다 (Fig. 3.1.1).

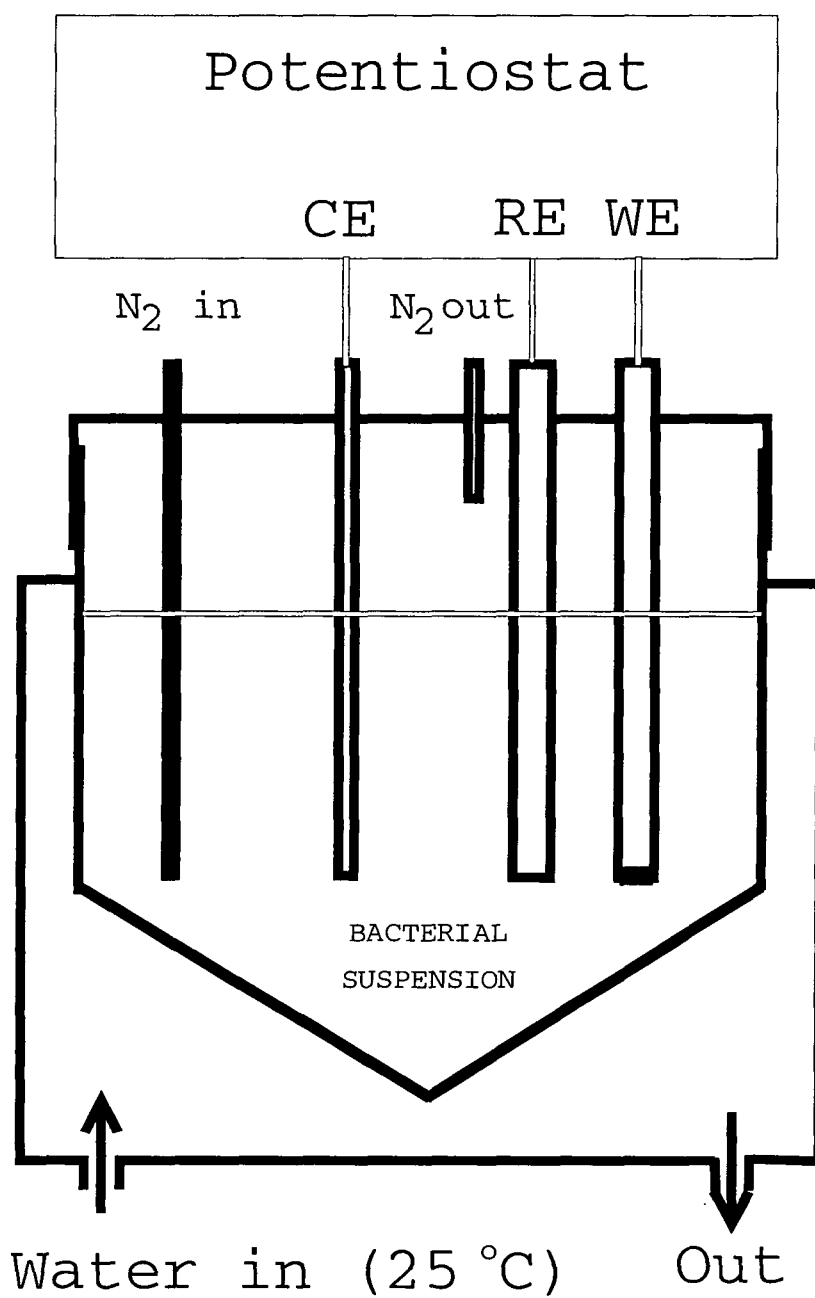


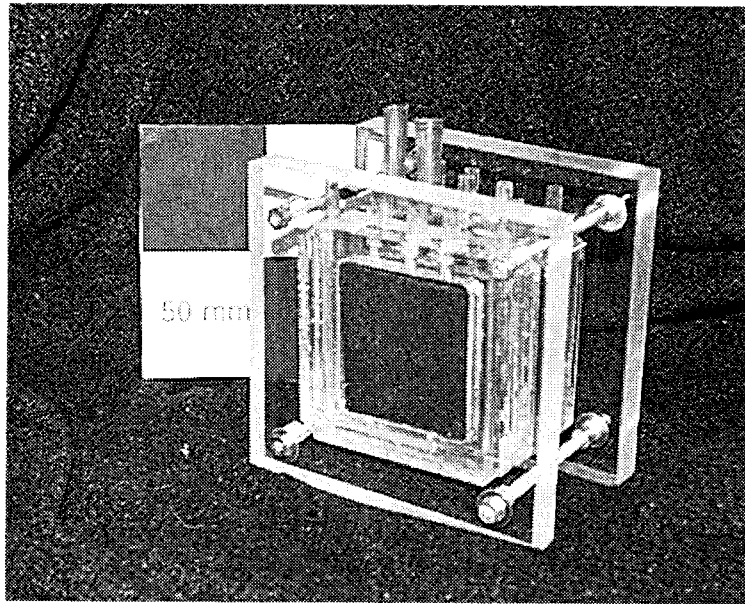
Fig.3.1.1 The electrochemical cell used in the study. Working volume of the cell was 5 ml.

다. 미생물 연료전지의 제작

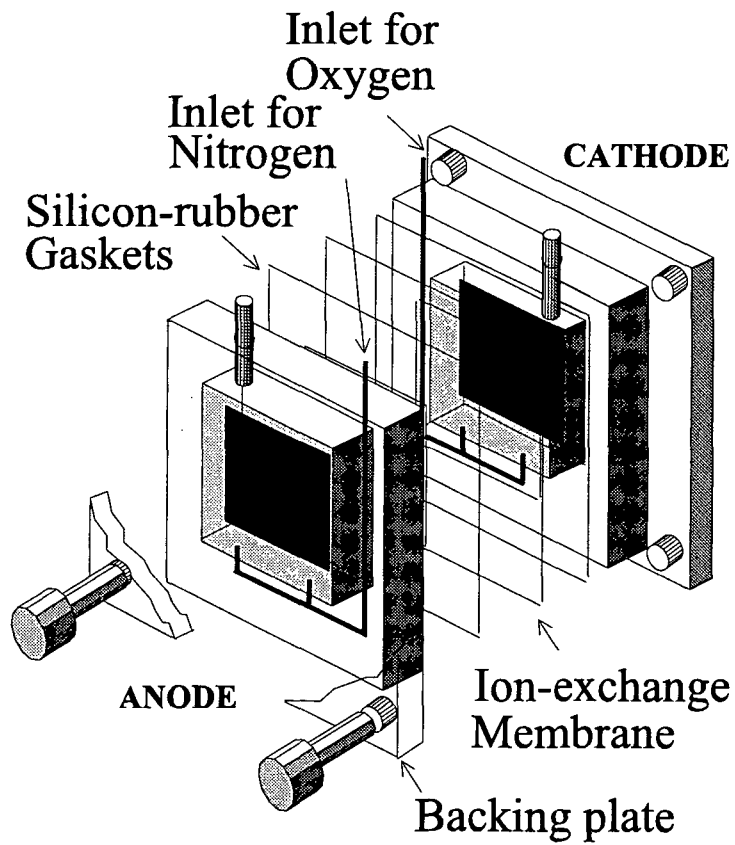
실험에 사용된 미생물 연료전지는 U. of London의 Dr. Bennetto로부터 원형을 분양 받은 후 이 연료전지의 용적을 증가한 개량형 연료전지를 사용하였다 (Fig. 3.1.2 6a,6b). 전극의 재질은 투명한 polyacryl 이었다. 양극부의 용적은 20 ml이며 상부에 wire connection, gas공급, sapling port가 달려있다. 양극은 cation-permeable ion exchange membrane (model 55165, BDH Lab supplies, Dorset, UK)으로 분리되며 sealing을 위하여 silicon rubber gasket가 2장 장착되었다. 전극-막간의 접촉은 작은 plastic bar를 첨가하여 방지하였다.

사용된 전극은 graphite felt (50 × 50 3 mm in dimension, GF series, Electrosynthesis, E. Amherst, NY, USA) 였으며 전극에 platinum wire contacts (0.5× 7 mm)를 conducting epoxy resin (EPOX-4, Electrosynthesis)을 사용하여 접착하였다. 접착은 접착제를 전극과 contact에 각각 바르고 압착하여 접착시킨 후 160℃에서 5시간 가열하여 완성하였다. 접착 후 5 ohm 이상의 전기저항을 갖는 전극은 접착제를 제거 후 재 접착하여 사용하였다. 전극이 완전히 접착 된 후 0.1M HCl에 전극을 첨가 후 30분간 boiling 한 다음 다시 증류수에 수 회 세척 후 실험에 사용하였다.

실험을 위하여 배양된 미생물을 음극부에 적량 첨가하였고 양극부는 phosphate buffer (50mM containing 0.1M NaCl)을 20 ml 첨가하였다. 음극부에는 질소를, 양극부에는 공기를 정량 pump를 통하여 각각 공급하여 혐기적, 호기적 상태를 유지 할 수 있도록 하였다 (25 ml per mins.). 준비된 연료전지는 25℃로 유지되는 수조에 담가서 온도를 유지하며 실험하였으며 음극부 및 양극부에 공급되는 기체로 인한 자연적인 용액의 증발을 방지하기 위하여 자작한 pre-saturator를 부착하였다. 이 pre-saturator에 적량의 물을 첨가 후 이 물을 통하여 gassing된 기체가



a) The photo of the microbial fuel cell



b) Schematics of the microbial fuel cell

Fig. 3.1.2 The microbial fuel cell used in the study.

연료전지 내부로 공급 될 수 있도록 하였다. 우수한 lead-wire 접촉을 위하여 매일 접촉 부위를 sand paper를 사용하여 부식을 제거하였다.

라. 실험 장치의 구성

미생물 연료전지의 set-up이 완료되었을 때 전압 및 전류는 voltammeter (Model 2000, Keithley, MA, USA)에 multichannel scanner (Model 2000-SCAN, Keithley)을 연결하여 측정하였다. 전류의 측정을 위하여 별도의 resistor box를 제작 후 전지에 부착하여 전압강하를 측정 후 $I=V/R$ 의 식을 이용하여 전류값을 구하였다 (Fig.3.1.3). 이때 각 신호는 IEEE488 input/output system (Model KPC-488.2AT, Keithley)와 cable (Model CTMGPIB-1, Keithley)를 통하여 IBM compatible PC에 기록되며 이들 기기의 제어는 control software (TestPoint, Keithley)를 통하여 이루어 졌다 (Fig.3.1.4).

전압이 안정되었을 때 10 mM(final concentration)의 연료(lactate)를 첨가 후 전압의 증가를 관찰하였다. 다시 일정 전압이 유지되었을 때 resistor box를 이용하여 적절한 저항을 선택하고 (1000 ohm)전압의 강하를 관찰하였다. 이때 voltammeter에는 매 120초마다 1회씩 기록되게 조정 하였다.

마. 유기물 분석

유기물 분석은 HPLC를 이용하였다 (Kim *et al.*, 1999). 사용된 HPLC 는 pump unit (Model M910, Young-In Science, Korea), sulfonated divinyl benzene-styrene copolymer column (300 7.8 mm, Aminex HPX-87H, BioRad,

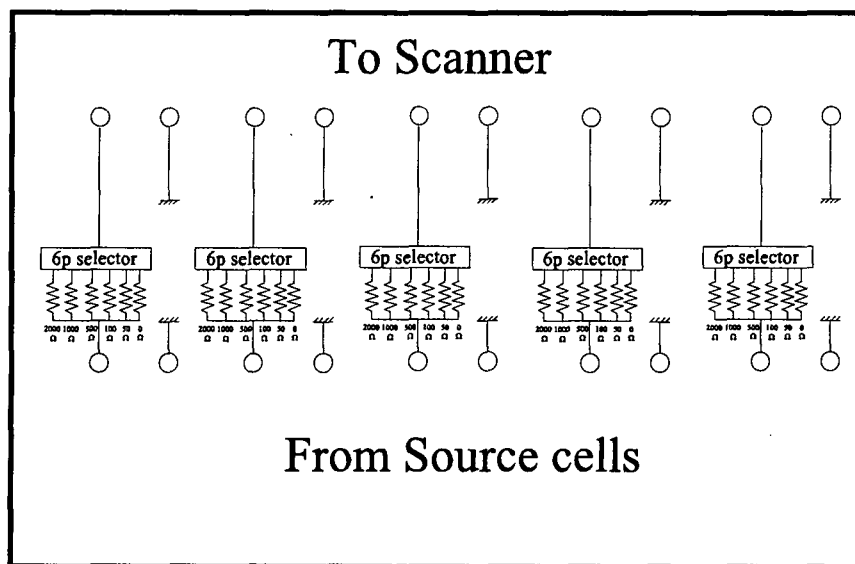


Fig.3.1.3 The resistor box used in the study. Each connector contains 6 different resistor for various ohmic selections.

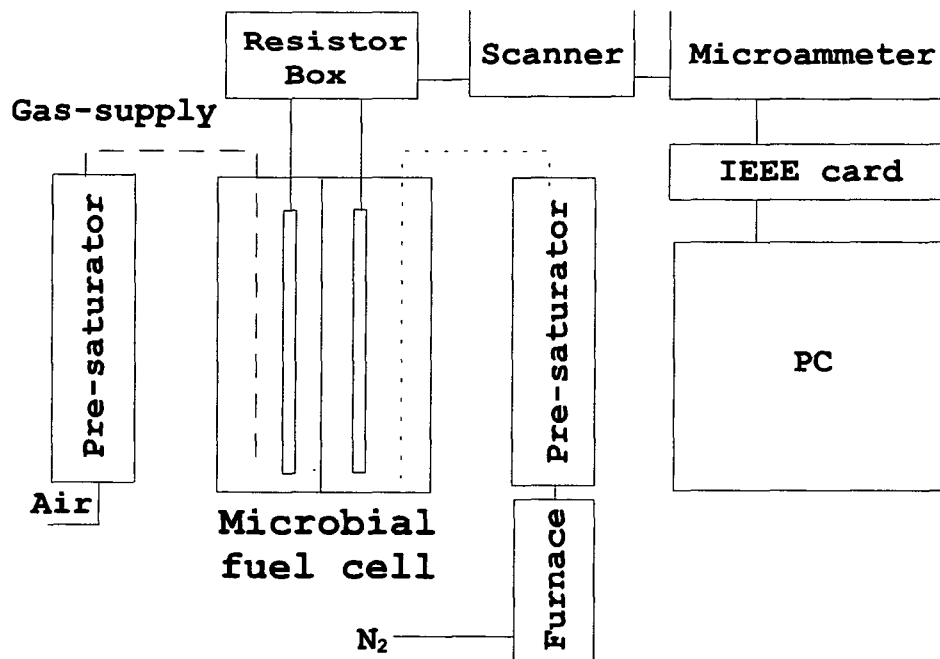


Fig. 3.1.4 The microbial fuel cell system configuration.

USA) 및 detector (216 nm Young-In Science, Korea)로 구성되어 있으며 0.01N H₂SO₄를 mobile phase (flow rate 0.6 ml/min)로 사용하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

가. *Shewanella putrefaciens* 의 전기화학적 활성

혐기적, 호기적으로 각각 배양한 0.36 g/l의 cell suspension을 사용하여 cyclic voltammetry를 실시하였고 그 결과를 Fig. 3.1.5에 표시하였다. 그림에서 보는 것처럼 혐기적으로 배양한 *Shewanella putrefaciens*에서는 각각 cathodic, anodic peaks를 관찰 할 수 있었다. 반면에 호기적으로 배양한 *Shewanella putrefaciens* cell에서는 전혀 peak가 관찰되지 않았다. 또한 *E. coli*의 경우도 혐기적으로 배양하거나 호기적으로 배양한 cell을 막론하고 전혀 peak가 관찰되지 않았다. *Shewanella putrefaciens*의 경우 wild type인 MR-1에서 가장 큰 peaks가 보였으며 Fe(III) reduction deficient mutant인 SR-21의 경우도 MR-1과 비교해서 상대적으로 낮지만 peak가 나타났다. 이 경우 Fe(III) reduction에 관계된 효소인 ferric reductase가 deficient되어있기 때문에 상대적으로 낮은 peak를 나타낸 것으로 보이며 peak의 발생은 OM cytochrome에 의한 것으로 볼 수 있다. MR-1의 경우 wild type이므로 ferric reductase와 OM cytochrome의 동시작용이 높은 electrochemical activity를 나타낸 것으로 보인다. IR-1의 경우는 역시 wild type이기는 하나 MR-1과 비교해서 약간 낮은 전기화학 활성을 보였다. 이는 균종의 차이에 의한 것으로 생각 할 수 있다.

이와 같은 cyclic voltammograms에 따르면 bacterial suspensions의 redox potential은 대략 Ag/AgCl 전극에 비교해서 -0.2 V의 값을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 수소 전극의 기준값으로 0 V 부근에 redox

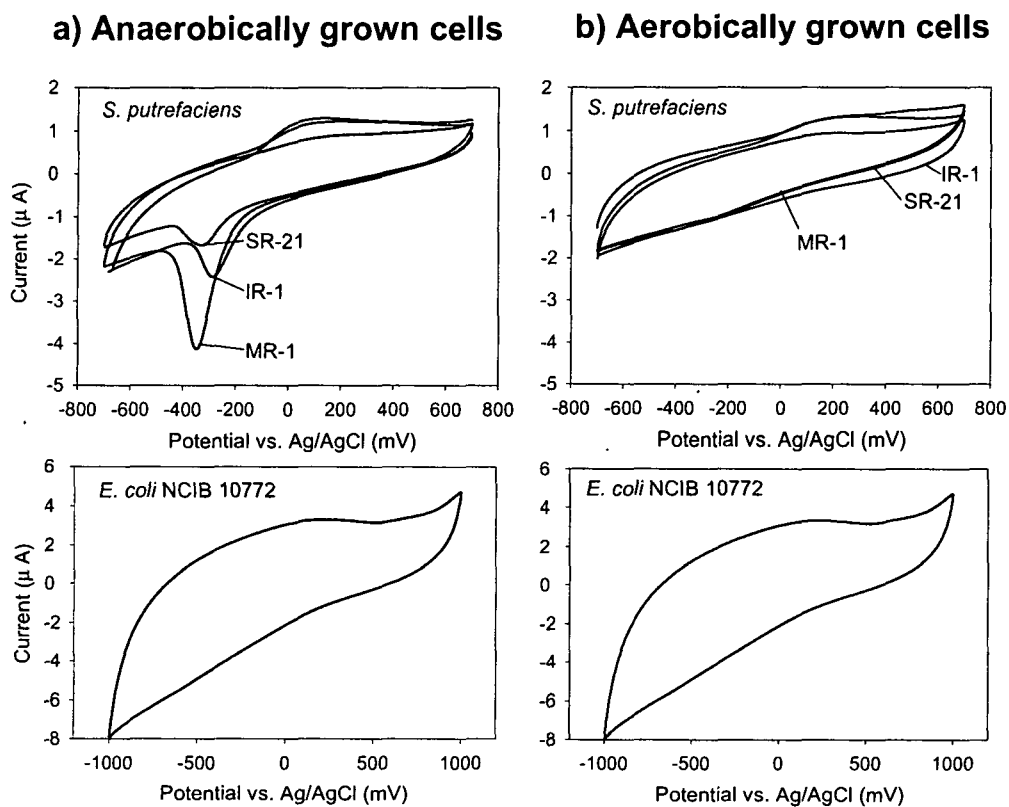


Fig.3.1.5 Cyclic voltammograms of the experimental strains grown aerobically and anaerobically. The cell suspensions (0.36 g/l dry cell weight) were prepared under anaerobic conditions.

potential이 존재하는 것으로서 수소 전극 기준으로 산소/물의 redox potential이 약 0.82 V라고 할 때 이와 같은 전기 화학적 활성 세균으로 구축한 미생물 연료전지의 최대 발생 가능 전압은 0.8 V로 나타날 수 있다. 이 가정을 근거로 *Shewanella putrefaciens* IR-1을 사용 미생물 연료전지를 운전하였다.

나. 미생물 연료전지에서의 전압 및 전류 측정

미생물 연료전지의 음극부에 새로 혐기적으로 배양한 *Shewanella putrefaciens* IR-1 (approximately 0.15 g dry weight/l)을 첨가하였다. 또 다른 연료전지에는 역시 혐기적으로 배양한 *E. coli* NCIB 10772 (0.16 g dry weight/l)을 첨가하고 발생하는 전압을 측정하였다. 연료를 첨가하기전의 *Shewanella putrefaciens* IR-1 및 *E. coli* NCIB 10772가 포함된 연료전지에서 각각 0.12 V 와 0.09 V의 전압이 발생하는 것으로 나타났다. 연료 첨가 시 (*Shewanella putrefaciens* IR-1: lactate, *E. coli* NCIB 10772: glucose) *Shewanella putrefaciens* IR-1이 첨가된 연료전지에서는 0.6 V 까지 전압이 급격하게 상승하였으나 *E. coli* NCIB 10772가 첨가된 연료전지에서는 전압의 증가가 발생하지 않았다. *E. coli* NCIB 10772가 첨가된 연료전지에 전자전달 매개체인 methylene blue (25 mM)을 첨가하자 전압이 0.55V 까지 상승하였다 (Fig. 3.1.6). *Shewanella putrefaciens* MR-1 및 SR-21에서도 연료 첨가시 같은 결과를 나타내었다 (Fig. 3.1.7). 이상의 결과에서 보는 것처럼 *E. coli*와 같은 일반적인 미생물은 전압을 상승시켜 연료전지를 작동할 수 있게 하기 위해서는 전자전달 매개체의 첨가가 필수적인 것으로 나타났으나 *Shewanella* strains는 매개체 없이 연료전지의 전압을 상승시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이는

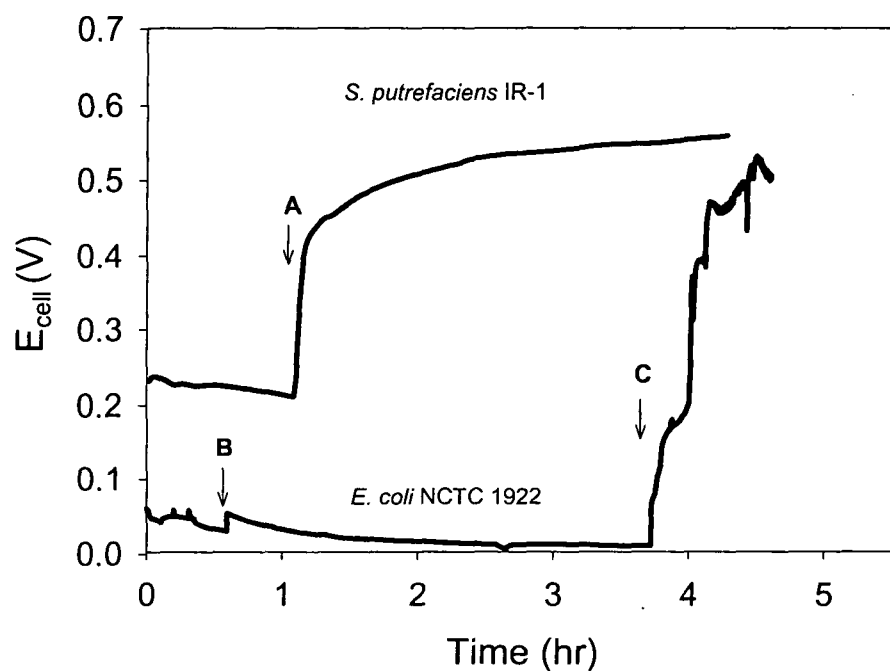


Fig.3.1.6 Open circuit potential of the fuel cell containing *S. putrefaciens* IR-1 (approximately 0.15 g dry cell weight/l) and *E. coli* NCTC 10772 (approximately 0.16 g dry cell weight/l). A: addition of lactate (10mM); B: addition of glucose (10 mM); C: addition of methylene blue (25 mM). Apparent electrode surface area: 50 cm².

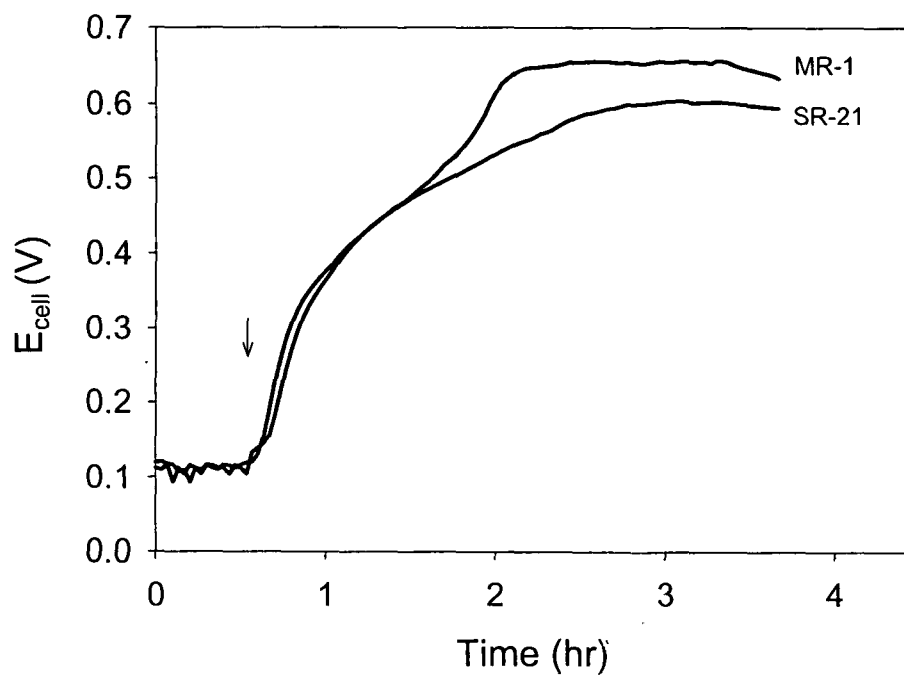


Fig. 3.1.7 Open circuit potential of the fuel cell with *S. putrefaciens* strains (approximately 0.12 g dry cell weight/l in each strain) with addition of lactate (10mM). Apparent electrode surface area: 50 cm².

cyclic voltammetry로 확인된 전기 화학적 활성 미생물들이 별도의 매개체 없이 대사과정에서 발생한 전자를 전극에 직접 전달하여 연료전지의 전압을 상승시켰으며 연료의 첨가에 따른 대사활성의 증가로 초기 저전압에서 0.6V까지의 전압 상승이 유도될 수 있었던 것으로 볼 수 있다.

Shewanella putrefaciens IR-1를 사용한 연료전지에서 이론적 예상치인 0.8V 까지 상승하지 못한 이유는 연료전지의 내부저항에 의한 voltage drop이 발생한 것으로 보이며 예비 실험의 결과 lactate나 glucose 자체는 연료전지의 전압 형성에 영향이 없는 것으로 나타났다.

전류 측정은 미생물 연료전지의 음극부에 *S. putrefaciens* IR-1 (0.12 g/1 dry cell weight/1)과 10 mM의 lactate를 첨가 한 후 전압이 상승하여 일정하게 되었을 때 1000 ohm의 저항을 연결하여 연료전지의 회로를 연결시키고 변화를 측정하였다.

Fig. 3.1.8에서 보는 것처럼 저항연결 초기의 전류값은 급격히 떨어졌으나 다시 상승하여 균종에 따라 0.03 mA에서 0.02 mA의 일정한 전류값을 나타내는 것으로 나타났다.

다. Sequential batch operation

미생물 연료전지의 연속적인 작동가능성을 실험하기 위하여 sequential batch operation mode로 운전 하였다. 미생물 연료전지를 나. 항의 방법과 동일하게 set-up 하고 전압이 평형에 도달하였을 때 1000 ohm의 저항을 연결하고 방전 시켰을 때의 전류를 기록하였다. 전류가 일정 수준까지 증가한 후 평형에 도달한 후 다시 감소하여 최저 (ca. 0.005 mA)에 도달하였을 때를 기준으로 일정량의 양극부 용액을 제거하고 (ca.0.7 ml) 다시 10 mM의 연료를 공급하여 전류의 증가 여부를 살펴보았다 (Fig. 3.1.9).

결과에서 보는 것처럼 미생물 연료전지에서 초기 2.5일간은 전류를

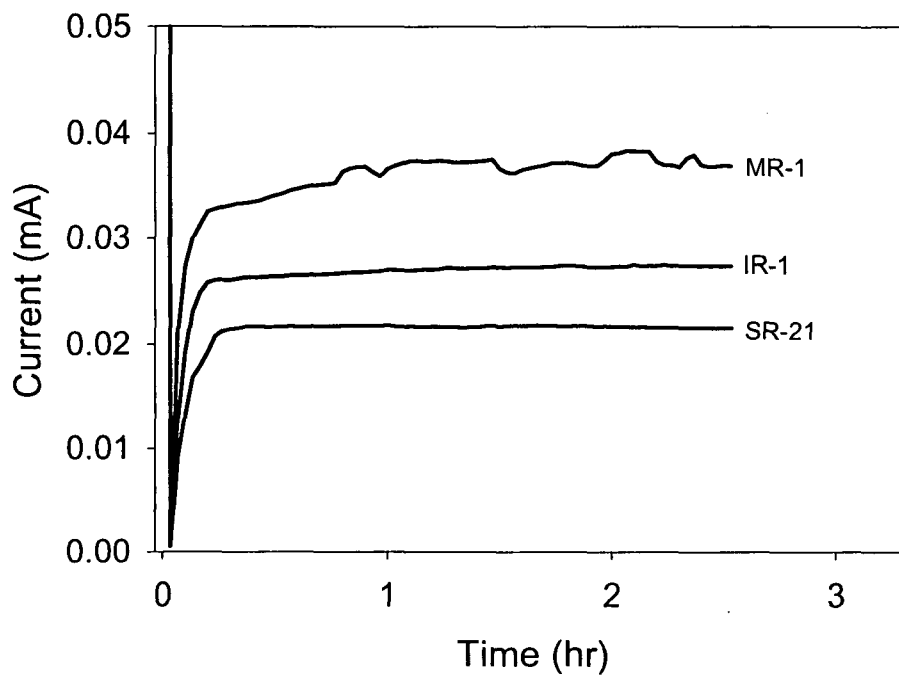


Fig. 3.1.8 Current generation from the microbial fuel cells using the experimental strains (approximately 0.12 g dry cell weight/l in each strain with 10 mM lactate). A 1000 ohm of resistor was applied at the initial stage of the experiment. Apparent electrode surface area: 50 cm².

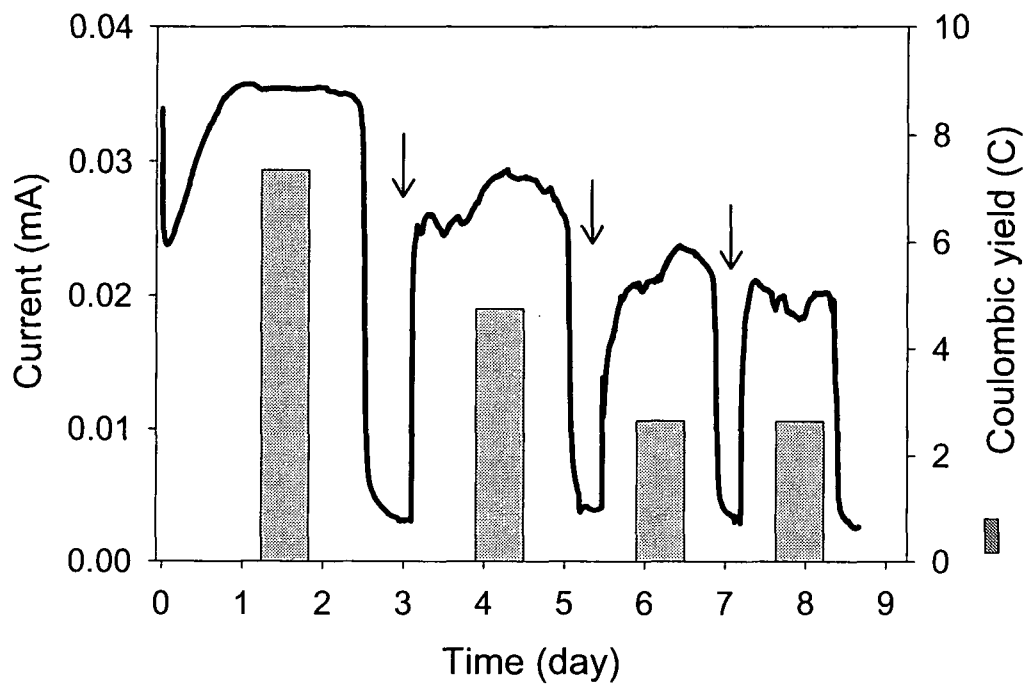


Fig. 3.1.9 The changes in current, and Coulomb from the microbial fuel cell containing *S. putrefaciens* IR-1 with a 1000 ohm resistor (approximately 0.2 g dry cell weight/l). Arrows indicate addition of lactate (10mM). Apparent electrode surface area: 50 cm².

연속적으로 발전하였고 2.5일 이후에 급격히 떨어지는 현상을 발견하였다. 이때 다시 적량의 연료를 첨가 하였을 때 일정 수준의 전류가 발생하는 것을 확인 할 수 있었다. 8.5일까지 미생물 연료전지에서 발생하는 전류는 연료의 첨가에 일정 수준으로 반응하였으며 그 양은 점차 감소하는 추세에 있었다. 이 감소는 미생물 연료전지에 인산완충액만을 사용하여 microbial activity의 감소에 그 원인이 있을 수 있다.

이 실험결과에서 미생물 연료전지에서의 전류 발생은 미생물의 전기 화학적 활성 및 대사작용에 근거하여 이루어지는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 대조 실험에서 미생물을 첨가하지 않은 상태에서 lactate를 투여하였을 때의 전류 발생은 관찰되지 않았다.

라. 미생물 농도의 영향

미생물 연료전지에 서로 다른 농도의 *Shewanella putrefaciens* IR-1을 첨가 한 후 발생하는 전압을 기록하였다. 전압이 일정하게 유지되었을 때 적정농도의 연료를 투입하고 다시 전압의 증가를 확인하였다 (Fig. 3.1.10).

연료를 투입하기 직전의 초기 평형전압은 미생물의 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 이 결과에서 미생물 연료전지의 전압발생은 미생물(표면)의 전기 화학적 활성 물질 (e.g. OM cytochrome)의 농도에 비례하는 것으로 생각 할 수 있다. 이론적으로 발생할 수 있는 전압 (0.8 V, 3절 가항 참조)에 도달하지 않은 이유로는 적절한 산소의 공급이 양극부에 이루어지지 않았기 때문에 발생하는 현상일 수 있다.

1000 ohm의 저항을 연결하고 12시간동안 측정된 전류의 합 ($C = i \times t$ where $C =$ Coulombic yield, $I =$ current, $t =$ time(sec)) 즉 Coulombic yield는 0.5 g/l의 미생물 농도 이상에서는 평형에 도달한 것으로 나타났다. 이 현상은 전극에 미생물의 포화에 기인한 것으로 본다 (Fig. 3.1.11).

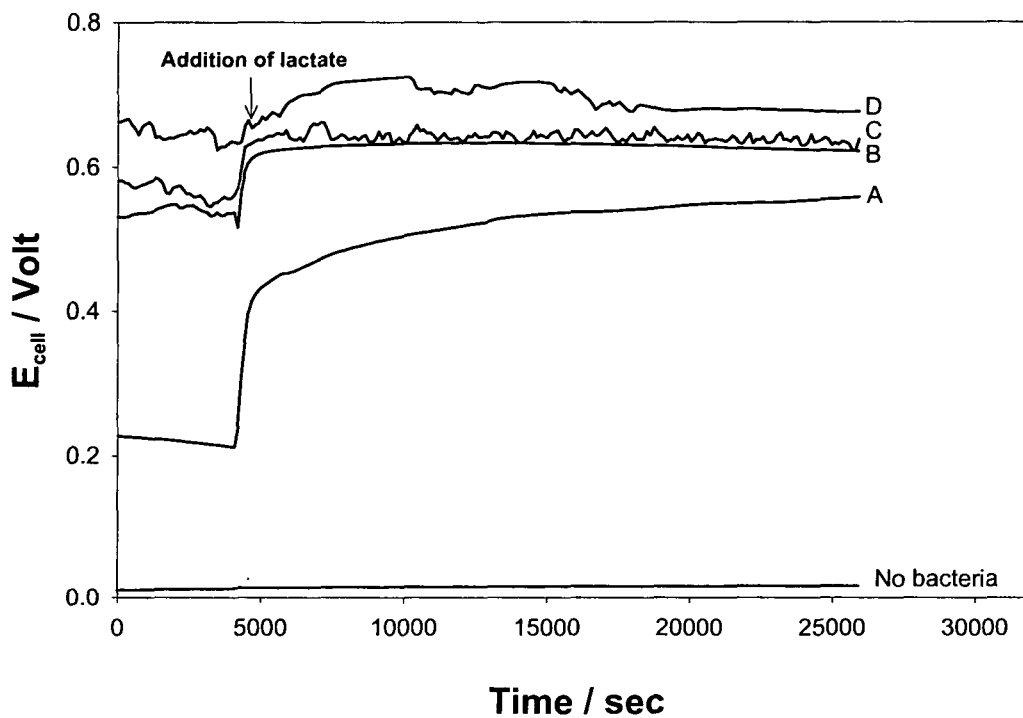


Fig. 3.1.10 Potential developments from the microbial fuel cells containing different concentrations of *S. putrefaciens* IR-1. The bacterial cell concentration in the microbial fuel cell; A: 0.2 g dry cell weight/l; B: 0.47 g dry cell weight/l; C: 1.06 g dry cell weight/l; D: 1.72g dry cell weight/l. Apparent electrode surface area: 50 cm².

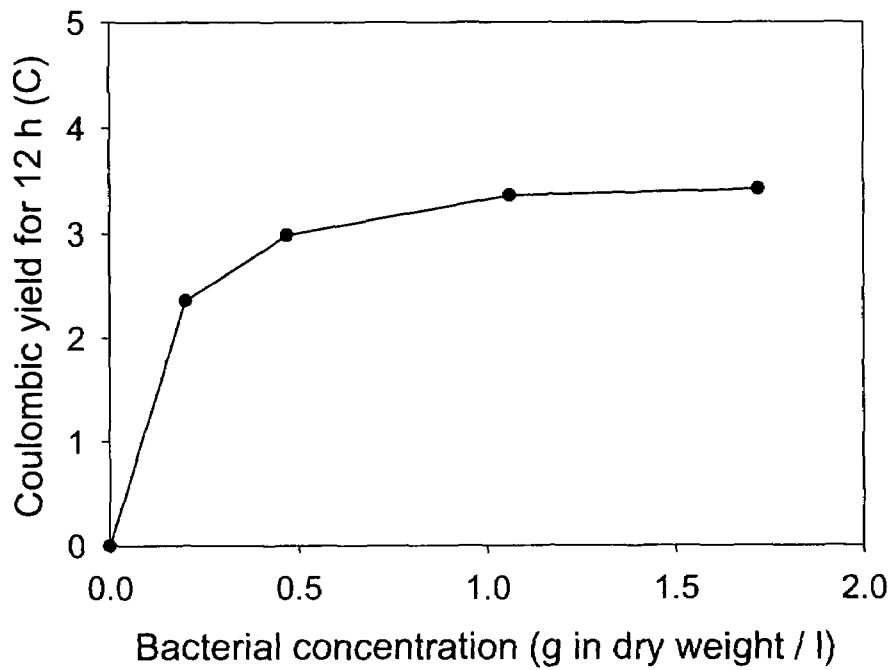


Fig. 3.1.11 Coulombic yields from the microbial fuel cells containing different concentrations of *S. putrefaciens* IR-1 for 12 hours. Coulombic yield was measured with a 1000 ohm resistor. Apparent electrode surface area: 50 cm².

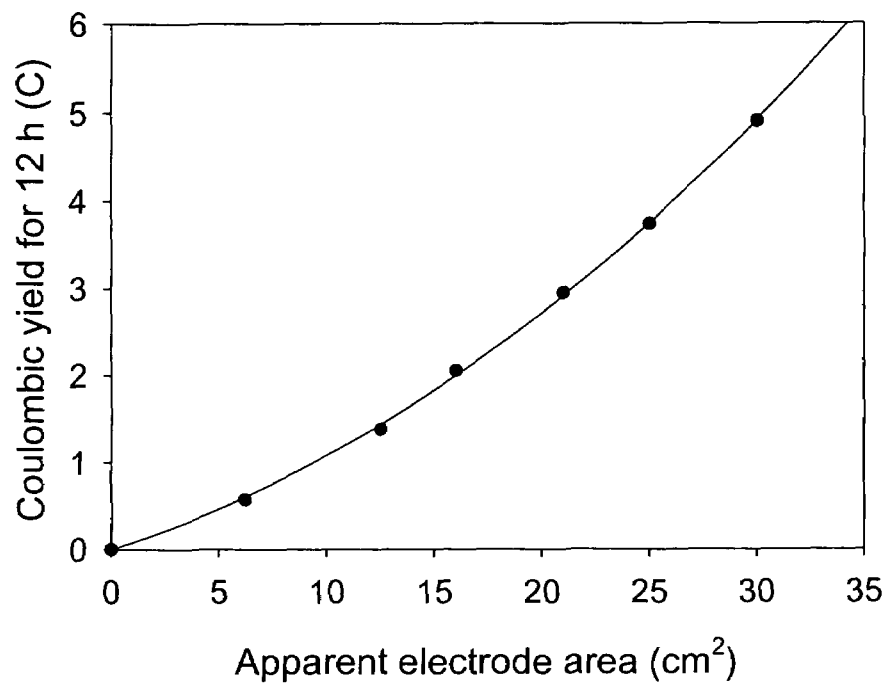


Fig. 3.1.12 Relationship between electrode surface area and Coulomb in a microbial fuel cell using *S. putrefaciens* IR-1. The bacterial cell concentration was 0.5 g dry cell weight/l and the Coulomb was measured under a 1000 resistor with 10 mM lactate.

이와 같은 현상을 조사하기 위하여 전극의 넓이를 0에서 30 cm² 까지 변화시키며 1000 ohm의 저항을 연결, Coulombic yield를 조사하였을 때 12시간동안의 Coulombic yield를 조사하였을 때 전극의 넓이의 증가에 따른 Coulombic yield의 증가를 확인 할 수 있었다 (Fig. 3.1.12). 이상의 결과에서 전극의 넓이를 증가 할 경우 고출력의 미생물 연료전지의 제작이 가능할 수도 있다는 것을 알았다.

이상의 실험결과에서 전기 화학적 활성 세균을 이용한 미생물 연료전지의 운전이 가능하며 연료전지에서 발생하는 전압/전류는 미생물의 농도, 대사능력, 연료전지의 구성 등에 관계하는 것으로 나타났다. 최근까지 redox protein의 전기 화학적 활성에 대한 연구는 전자전달 매개체의 채용으로 이루어졌으며 이의 사용이 거의 필수적인 것으로 인식되어졌다 (Hitchens, 1989). 그러나 전기 화학적 활성 미생물에 대한 연구는 별도의 전자전달 매개체를 사용하지 않고 이루어질 수 있다는 것을 본 연구를 통하여 증명하였고 더불어 다양한 용도로 응용 할 수 있는 미생물 연료전지의 개발도 가능하다는 것을 알았다. 이 무매개체 미생물 연료전지에서 사용될 수 있는 전기 화학적 활성 미생물은 외부의 불용성 금속염을 환원하여 혐기적 호흡을 하기 위한 OM cytochrome의 존재가 대단히 중요한 역할을 한다. 또한 OM cytochrome의 activity와 함께 Fe(III) 환원세균의 경우 ferric reductase activity도 철 환원능에 대한 일종의 additive effect를 나타내는 것으로 나타났다 (Fig.3.1.13). 이와 같은 전기 화학적 활성 미생물의 특성을 이해하면 대단히 광범위하고 중요한 실험 결과를 생산 할 수 있을 것으로 본다.

본 실험의 결과 *Shewanella putrefaciens* 등의 단일균을 사용한 무매개체 미생물 연료전지는 그 응용성이 기질의 사용에 제한을 받기 때문에 떨어진다고 볼 수 있다. 특히 정제된 lactate와 같은 고가의 기질 사용은 연료전지의 적용성과 응용성을 떨어뜨릴 뿐 아니라 특히 다양한 유기성분이 함유되어 있는 폐수 등을 연료로 사용하는 미생물 연료전지의 개발에는

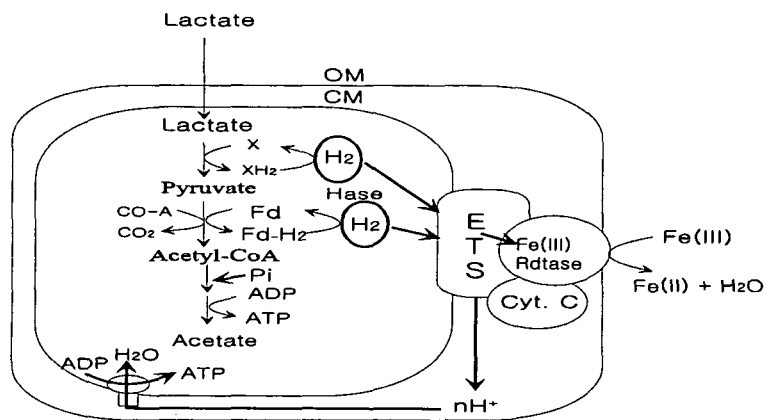
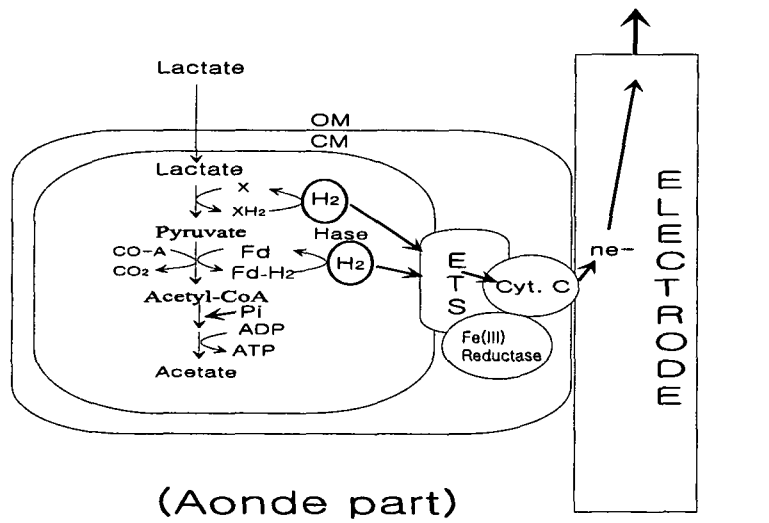


Fig. 3.1.13 A proposed schematic diagram of the mediator-less microbial fuel cell. A) Microbial fuel cell reaction model B) Fe(III) reduction model.

큰 제약이 될 수 있다 따라서 이와 같은 문제를 해결 할 수 있는 방법을 연구하여 다음 장에 제시하였다. 또한 낮은 전류값을 증가시켜서 보다 우수한 전지로서 응용 될 수 있는 방법을 연구하였다.

3-2 *Shewanella putrefaciens* IR-1의 전기 화학적 배양

1. 이론적 배경

지금까지의 실험결과에서 전기 화학적 활성세균을 이용한 무매개체 미생물 연료전지의 작동을 확인하였다. 또한 cyclic voltammetry를 이용한 이들 전기 화학적 활성 미생물의 전기 화학적 활성도를 측정하였으며 OM cytochrome의 역할이 전기 화학적 활성 미생물의 electrochemical activity와 혐기적 호흡에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

이 실험에서는 연료전지와 유사한 환경으로 electrochemical cell을 제작하여 양극부와 연결된 음극 대신에 potentiostat에 연결된 working electrode를 사용하여 적절한 전압을 주고 이 전압을 이용하여 전자를 미생물로부터 직접 전달받을 수 있는지 확인하여 보았다.. 이때 중요한 parameter로서 균체량의 증가와 연료 (lactate)의 소비, 대사물질의 생성 등을 조사하여 electrochemical cell에서 *Shewanella putrefaciens* IR-1을 model strain으로 사용, 이들 전기 화학적 활성 미생물의 전자 대사 및 기질 대사 능력을 확인하였다.

이때 전기 화학적 활성 미생물이 적절한 positive 전압으로 charge 된 electrochemical cell에서 charge를 걸어주지 않은 electrochemical cell과 비교, 증식하고 대사를 한다면 이들 전기 화학적 활성 미생물은 대사중에

발생한 전자를 외부의 electron acceptor에 전달하면서 증식할 수 있는 것으로 볼 수 있기 때문이다.

본 실험을 통하여 미생물의 직접적인 외부전자 수용체에 대한 직접적인 전자 전달 능력을 확인하고 향후 실험에 있어서 다양한 종의 전기 화학적 활성 미생물을 분리 또는 농화배양 할 수 있도록 하는데도 실험의 또 다른 목적이 있다.

2. 실험 재료 및 방법

가. 사용균주 및 배지

Shewanella putrefaciens IR-1을 사용하였다. 호기적 조건에서의 사용배지는 LB였으며 혐기적 조건에서의 배지는 35 mM의 lactate가 함유된 PBBM 이었다. 이때 일반적인 flask 배양일 경우 별도로 10 g/l의 FeOOH를 electron acceptor로 첨가하였다.

나. Three-electrode electrochemical cell

Shewanella putrefaciens IR-1의 전기 화학적 배양을 위하여 three-electrode cell을 제작하였다. 구성은 working electrode (graphite felt, surface 30×50 mm, Electrosynthesis, USA)와 Ag/AgCl reference electrode, platinum counter electrode (0.3 × 20 mm)로 구성되어 있고 counter electrode는 molecular cut-off range 12,000-14,000의 dialysis membrane (Sigma)로 싸여있었다 (Fig. 3.2.1).

Electrochemical cell은 sampling port와 질소 inlet 및 outlet이

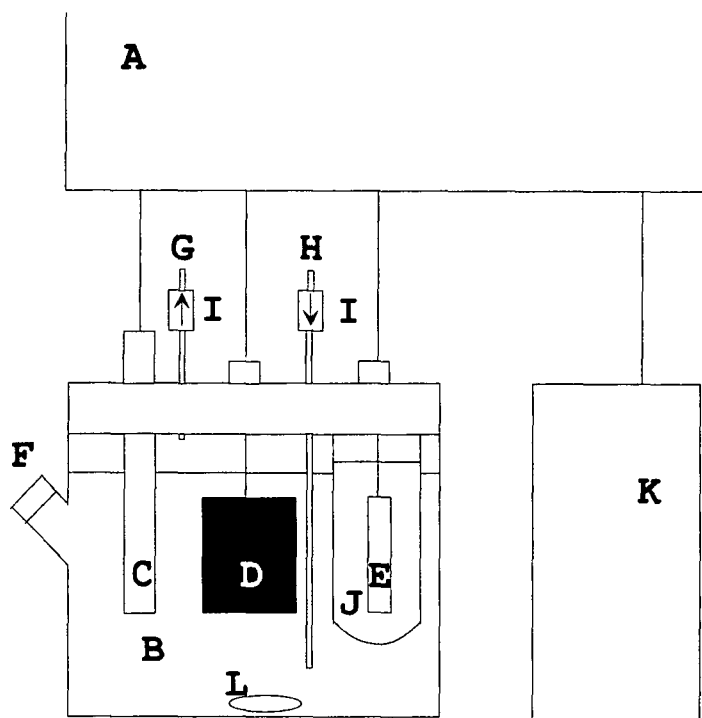


Fig. 3.2.1 Schematic diagram of the three-electrode electrochemical cell for the growth of *Shewanella putrefaciens* IR-1. (A) Potentiostat. (B) Electrochemical cell (anode compartment). (C) Ag/AgCl reference electrode. (D) Working electrode (anode). (E) Counter electrode (cathode). (F) Sampling and inoculation port (butyl rubber gasket). (G) N₂ outlet. (H) N₂ inlet (flow rate 20 ml min⁻¹). (I) Check valve (arrows indicate direction of flow). (J) Cathode compartment (separated from anode by dialysis membrane). (K) Recording system. (L) Magnetic stirrer bar.

장착되어 있으며 음극 및 양극부의 작업 용량은 각각 500 ml과 40 ml이었으며 사용된 배지는 lactate와 KCl이 각각 50 mM, 100 mM 함유된 PBBM을 사용하였다.

Potentiostat (E-series, Thompson Electrochemistry, UK)를 electrochemical cell에 부착 후 +1.0 V의 전압을 걸어준 후 미생물을 접종하여 실험을 시작하였다. 배양중 OD (at 660 nm)와 working electrode와 counter electrode 사이의 전류 변화를 별도의 single channel recorder를 설치하여 연속 측정하였다.

다. 분석 방법

유기물의 분석은 3-1-2-마 항과 동일하게 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Bacterial growth in an electrochemical cell

자연적인 electron acceptor의 부재 시 이 electron acceptor를 대신한 전극이 사용되었을 때 *Shewanella putrefaciens*와 같은 전기 화학적 활성 미생물이 lactate를 소비하며 생육 할 수 있는지 실험하였다. 균 접종 후 일정 시간마다 electrochemical cell 내부에서 sample을 취하여 분석하였다.

Fig. 3.2.2는 전극에 charge를 걸어 주었을 때와 걸지 않았을 때의 배양액내부의 균체농도, lactate 농도, acetate 농도 및 전류변화를

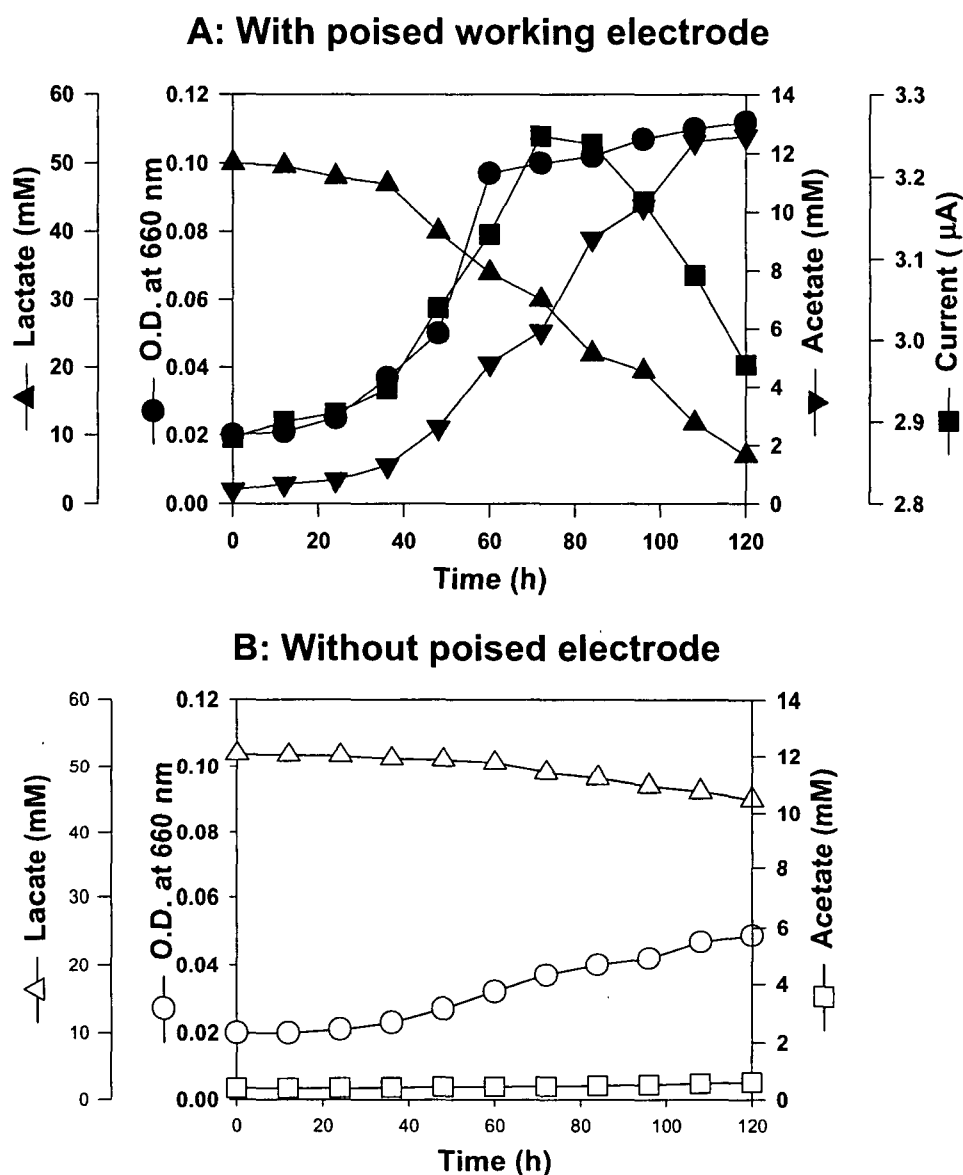


Fig.3.2.2 Growth of *S. putrefaciens* IR-1 on lactate in the anodic compartment of a three-electrode electrochemical cell. *S. putrefaciens* IR-1 was inoculated into the anodic compartment which contained basal medium with lactate. (A) The three-electrode electrochemical cell was connected to a potentiostat to poised a potential of 1.0 V against Ag/AgCl reference electrode. (B) A control culture was made in a similar electrochemical cell where the electrodes were not connected to the potentiostat.

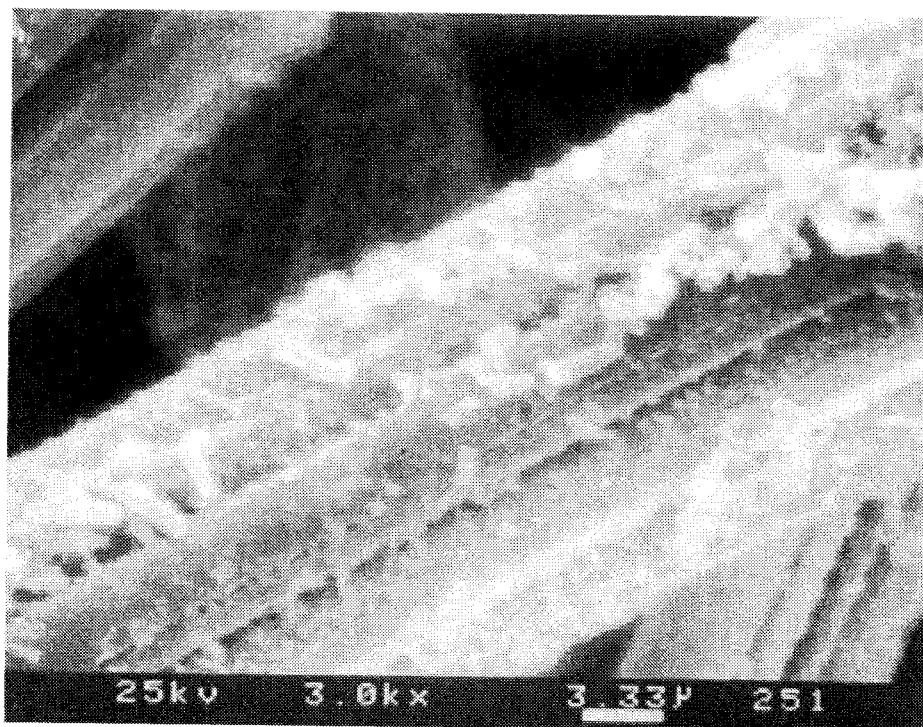


Fig. 3.2.3 Scanning electron micrograph of the electrode (anode) in the three-electrode bacterial cultivation system.

표시한 graphs이다. 그림에서 보는 것처럼 electrode에 positive charge를 걸어주고 배양하였을 경우 균체 농도의 증가는 일반적인 flask 배양에서 볼 수 있는 것과 대단히 비슷한 방향으로 증가하였다. 또한 substrate (lactate)의 소비 및 대사 산물인 acetate의 증가도 유사한 양상을 나타내었다. 70시간 정도의 배양이 진행 된 후 전류 값은 감소하였는데 이는 미생물의 대사에 따른 기질의 소비에 의한 것으로 생각된다.

나. 고찰

이 실험 결과 일반적인 flask 배양시 보다 비교적 낮은 균체 증식율을 나타내었는데 이 결과는 일반적인 상황에서 *Shewanella putrefaciens*와 같은 미생물이 잘 환원시키는 ferric citrate와 같은 electron acceptor 대신 FeOOH와 같은 insoluble electron acceptor를 사용할 경우 증식율이 떨어지는 것처럼 미생물 전극간의 physiochemical contact에 문제점이 있기 때문에 적절히 전자를 전극으로 이동시키지 못한 것에 기인하는 것으로 보인다. 또한 실험에 electrolyte로 사용된 0.1 M의 KCl 또한 높은 삼투압을 유지시키므로 생육에 저해를 유발 할 수도 있다. 배양이 끝난 후 전극의 일부를 채취하여 전자 현미경으로 관찰 한 결과 전극 표면에 미생물이 고착되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3.2.3).

Reference 실험으로서 사용된 dummy 전극을 이용한 실험에서는 charged electrode를 사용한 실험과 비교해서 대단히 낮은 수준의 균체량 증가가 확인되었는데 이는 미생물의 전자 전달이 이루어지지 않았기 때문에 호흡이 불가능하므로 발생하는 결과이다. 약간의 균체량 증식은 배지에 첨가된 소량의 yeast extract에 의한 미생물의 fermentation에 의한 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 실험에서 사용된 전극이 electron

acceptor로서의 역할을 수행하여 *Shewanella putrefaciens*의 성장을 유도한 것이라고 볼 수 있다. 또한 기질인 lactate의 소비와 함께 대사산물의 일종인 acetate의 증가가 균체량의 증가와 함께 확인되고 있다. 이 결과는 전극이 electron acceptor로서 작용할 수 있다는 또 다른 증거로서도 볼 수 있으며 control 실험과 비교 시 그 증감의 차이가 명확해진다. 또한 lactate의 농도가 감소되었을 때 전류의 흐름도 감소하고 있음을 볼 수 있다. 따라서 lactate는 미생물의 전자생산을 위한 기질로 이용되며 대사물질인 acetate로 변환된다는 것을 알 수 있다. 따라서 이와같은 전기 화학적 활성 미생물은 미생물 외부에 존재하는 전자수용체를 직접 환원하면서 생육이 가능하다는 여러 연구가 확인되었으며 본 연구에서는 전자수용체가 자연계에 존재하는 일반적인 형태가 아닌 positive로 poised된 electrode가 그 역할을 대신하고있다..

이상의 결과에서 전기 화학적 방법을 이용한 미생물 연구가 가능하다는 것으로 알 수 있게 되었으며 금속염 등 외부의 불용성 금속염을 전기 화학적으로 환원 할 수 있는 미생물이 *Shewanella putrefaciens*뿐만이 아닐 수 있다는 연구 (Lovley et al.,1996) 등과 비교했을 때 자연계의 다양한 전기 화학적 활성 미생물을 이와 같은 방법 또는 유사한 방법, 예를 들어 미생물 연료전지 등을 사용하여 간단히 배양하거나 농화 할 수 있을 것으로 생각하고 실험을 계속 진행하였다.

특히 각종 폐수 및 폐수에서 발생한 슬러지를 각각 배지(연료) 및 종균원으로 사용하였고 연료전지를 사용한 경우는 연료전지의 음극이 electron acceptor로서 작용할 수 있게 된다. 따라서 연료전지를 이용, 폐수내의 각종 전기 화학적 활성 미생물의 선택적 증식을 확인하고 이들의 전기 화학적 신호 및 연료성분의 변화 등을 조사하고 궁극적으로 우수한 연료전지의 작동상태를 유도하였다.

3-3 전기 화학적 미생물의 농화배양

1. 이론적 배경

최근 연구에 의하면 Fe(III) 환원세균이 activated sludge treatment plants에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Nielsen, 1996 ; Nielsen *et al.*, 1997). 이때 Fe는 폐수의 한 구성물이거나 인 제거 공정에 투입된 Fe-salt인 경우가 많다. 또 다른 연구에 의하면 일반적인 폐수처리시설에 유입되는 철의 농도는 50-60 mg Fe/g VSS로 이 양은 혐기적 상태에서 미생물에 의해 모두 환원될 수 있는 양이라고 한다 (Rasmussen and Nielsen, 1996). 폐수처리 공정에서 미생물에 의한 Fe의 환원은 주로 sludge floc의 혐기적 소화가 발생하는 공정을 중심으로 연구되었다. 알려진 바와 같이 대단히 많은 종류의 유기물을 산화하며 Fe를 dissimilatory reduction 한다. (Lovely, 1995). 따라서 이러한 Fe reduction에 관계하는 미생물은 폐수처리 산업에 대단히 중요한 역할을 하며 이와 같은 미생물의 활발한 작용은 sludge의 발생 감소를 충분히 유도 할 수 있다 (Mikkelsen *et al.*, 1996). 이와 같이 폐수처리 공정내의 다양한 Fe-reducing 미생물과 이들이 산화시키는 유기물 및 여기서 발생하는 전자의 관점에서 지금까지 본 과제에서 얻은 실험결과를 종합하면 미생물 연료전지에서도 충분히 전기 화학적 활성이 있으며 폐수 내의 각종 유기물을 산화시키는 미생물을 배양 또는 농화 할 수 있을 것으로 생각하였다. 여기서 연료전지의 음극은 폐수내의 철 내신 미생물에 의하여 환원되며 외부의 회로를 통하여 전류를 발생시킨다. 이와 같은 형태의 무매개체 미생물 연료전지는 다양한 종의 미생물을 사용할 수 있기 때문에 폐수처리 등에 대한 적용성이 단일균을 사용하는 미생물보다 비교할 수 없을 정도로 높다. 또한 폐수 내의 다양한 종류의 유기물을 쉽게 분해시킬 가능성이 있다. 또한 연료전지로서의 운영능력이 증가한다. 따라서 본 과제를 통하여 폐수를 사용하여

운전하는 응용성이 높은 무매개체 생물 연료전지를 개발하고 이의 성능을 실험하여 보았다. 특히 폐수처리에 대한 응용 가능성과 전류의 발생능력을 중점적으로 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

가. 사용폐수

본 실험에 사용된 전분폐수와 혐기성 소화조 슬러지는 삼양제넥스(인천, 한국)에서 채취하여 사용하였으며, 폐수의 COD는 1300~2000 ppm이었다.

나. 전기화학적 활성 미생물의 농화배양

본 실험에 사용된 연료전지의 크기는 50×50×3 mm이며, 용적은 25 ml이다(Fig. 3.1.2). 음극과 양극의 각 part에는 가스 bubbling을 위한 주입구가 있다. 연료전지의 음극부에는 산소를 제거하기 위해 질소를 15 ml/min으로 주입하여 혐기성 상태를 유지하여 주었으며, 양극부에는 15 ml/min의 공기를 주입하여 주었다. 초기에 음극부에는 phosphate buffer를 이용하여 pH 7.0으로 조절한 전분폐수 20 ml과 5 ml의 혐기성 소화조 슬러지를 주입하였다. 양극부는 0.1 M NaCl을 포함한 phosphate buffer(50 mM, pH 7.0) 25 ml로 채워주었다. 백금선은 epoxy resin(EPOX-4, Electrosynthesis)을 이용하여 150 °C에서 20시간동안 반응시켜 전극에 부착시켰다. 전류의 흐름을 조절하기 위하여 음극과 양극사이에 1 kΩ의 저항을 걸어주었으며, 연료전지는 water bath를 이용하여 30 °C로

조절하였다. 전자는 회로를 통해 양극부로 이동하게 된다. 초기에 미생물연료전지는 미생물의 농화를 위해 open circuit(저항 무한대)에서 운전한 뒤, 최대 전압에 도달한 후에는 전기화학적 미생물의 농화를 위해 1 k Ω (closed circuit)의 저항을 걸어주었다. 이후 발생하는 전류/전압을 측정하여 연료전지의 상태를 monitoring하였다.

다. 운전 최적화

음극부에 pH 5~9로 조절된 폐수를 주입한 후에 적절한 pH를 판단하기 위해 전류값과 쿨롱값을 기록하였다. 미생물연료전지에 미치는 온도의 영향을 살펴보기 위해 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45 $^{\circ}\text{C}$ 까지 water bath의 온도를 변화시켰으며, 저항의 영향에 관한 실험에서는 저항을 각각 100 Ω , 500 Ω , 1 k Ω , 2 k Ω 으로 변화시켜 주었다. 미생물연료전지의 양극부에서 주입되는 공기의 영향에 관한 실험에서는 aeration rate를 5 ml/min에서 20 ml/min으로 변화시켜 주입하여 실험하였으며, 음극부의 질소 주입량의 영향에 관한 실험에서는 5 ml/min에서 20 ml/min으로 변화시켜 주었다. 음극부 전극의 넓이는 7.5 cm³(50×50×3 mm)에서 1.87 cm³로, 양이온 교환막의 면적은 5 cm²에서 1.25 cm²로 변화시켰다.

라. 호흡저해제의 영향

전류생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 호흡저해제를 첨가하여 주었다. 각 저해제의 stock solution은 다음과 같이 제조하였다: 20 mM p-CMPS (p-Chloromercuriphenylsulphonate), 40 mM KCN (Potassium cyanide), 20mM DNP (2,4-Dinitrophenol), 10mM DCCD

(Dicyclohexylcarbodiimide), 50mM NaN_3 (Sodium azide), 1mM HQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinolone-N-oxide), 50mM Rotenone, 4mM Antimycin A (in 95% ethanol) (Table 3.3.1).

Table 3.3.1 Respiratory inhibitors used and their reaction mechanisms.

Inhibitors	Restriction site	Concentration (mM)	Solvent
Rotenone	NADH dehydrogenase	0.01-5	Acetone
HQNO ¹	Cytochrome b	0.01-0.05	Ethanol
KCN	Cytochrome oxidase	0.2	H ₂ O
NaN_3	Cytochrome oxidase	0.01-2	H ₂ O
DCCD ²	F _o subunit of ATPase	0.001-0.1	Acetone
DNP ³	Uncoupler	0.001-0.5	Acetone
p-CMPS ⁴	Sulphydryl center (Fe-S protein)	0.1-0.5	H ₂ O
Antimycin A	Electron transport Chain site II	0.1	Ethanol

1. HQNO : 2-heptyl-4-hydroxyquinolone-N-oxide
2. DCCD : Dicyclohexylcarbodiimide
3. DNP : 2,4-Dinitrophenol
4. p-CMPS : p-Chloromercuriphenylsulphonate

마. Alternative Electron Acceptor의 영향

본 실험에 사용된 전자공여체는 다음과 같다: lactate(10 mM), pyruvate(5 mM), acetate(10 mM), glucose(10 mM), propionate(10 mM), butyrate(5 mM), Isobutyrate(5 mM), citrate(5 mM). 또한 alternative electron acceptor가 미치는 영향에 관한 실험도 수행하였다. 0.1 μ M에서 3.6 mM의 sulfate와 0.1 μ M에서 640 μ M의 nitrite가 음극부에 주입되었으며, 공기의 영향을 살펴보기 위해 공기로 포화 (9.14-9.34 ppm)된 폐수를 역시 음극부로 주입하였다. 공기로 포화된 폐수는 혐기적 폐수와 함께 혼합하였다.

바. 분석방법

(1) 전압과 쿨롱의 측정

전압을 측정하기 위해 전극을 voltmeter에 연결시켰다. 연료전지의 전압(V, volt)과 전류(I, ampere)는 multichannel scanner (Model 2000-SCAN, Keithley)가 연결된 voltmeter (Model 2000, Keithley, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 데이터는 IEEE488 input/output (Model KPC-488.2AT, Keithley)와 cable(Model CTMGPIB-1, Keithley)를 거쳐 IBM compatible computer에 기록하였다.

Voltmeter와 scanner는 control software (TestPoint[®], Keithley)를 이용하여 조절하였다. Software를 이용하여 전류와 Coulombic yield(전류(I)×시간(t))를 계산할 수 있다. 최대 전압값에 이르렀을 때 연료전지에 저항을 연결하였으며, 전류는 $I=V/R$ 로 측정되었다.

저항은 1 k Ω 을 사용하였으며, 2분마다 한번씩 값을 측정하였다.

연료전지의 쿨롱값은 생성된 전류와 시간값을 이용하여 그래프상에서 면적을 적분하여 판단하였으며, Coulombic yield는 소모된 COD의 완전한 산화로부터 얻어진 이론적인 쿨롱값과 비교하여 퍼센트로 표시하였다.

(2) COD

폐수의 COD농도는 colorimetric method (closed reflux method) (APHA, 1995)로 분석하였다. 적당히 희석된 시료 3 ml을 COD vial (HACH, USA)에 넣고, 여기에 digestion solution과 황산용액을 각각 1 ml과 4 ml을 첨가하였다. Vial을 잘 섞은 후에 150 °C에서 2시간동안 HACH heating reactor를 이용하여 반응시켜 주었다. 반응시킨 시료를 HACH spectrophotometer(HACH DR/300 spectrophotometer, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준용액으로는 potassium hydrogen phthalate (KHP)를 사용하였다.

(3) TOC

시료는 syringe filter(Whatman Co., pore size 0.45 μm)를 이용하여 여과시킨 후 희석하여 TOC analyzer(Sievers model 800, Sievers Inc. Voulder, CO, USA)로 측정하였다.

(4) 유기산

유기산은 HPLC(M910, Young-In Co., Korea)를 이용하여

분석하였다 (Kim et al., 1999): Aminex HPX-87H column(300×7.8 mm, Aminex HPX-87H, BioRad, USA), photometric detector at 215nm. 이동상으로는 0.01 N 황산을 0.6 ml/min으로 흘려주었다.

(5) 음이온

시료내의 음이온은 이온 크로마토그래피(Waters T6270A12, Hitachi, Japan)로 분석하였다. 시료 1 ml을 eppendorf tube에 넣고 10,000×g에서 5분 동안 원심 분리하여, 상등액을 syringe filter(4 mm, 0.45 μ m, PVDF, Whatman, USA)를 이용하여 여과시켰다. 시료는 10 ppm 이하로 희석하여 사용하였으며, 0.2 ml를 주입하여 주었다. Elution buffer는 NaH₂CO₃(1 mM)과 NaHCO₃(1 mM)를, 칼럼은 ICPAK-anion HR 4.6×95 mm를 사용하였다.

(6) Energy Conversion

소모된 COD의 이산화탄소와 물로의 완전산화에 의해 생성된 전기량을 계산할 수 있다. COD 1g에서 사용 가능한 전자는 $4 \times (1/32)$ mol = 0.125 mol이며, 전류는 mol electron과 Faraday 상수를 곱한 값이다: $0.125 \times 96,500 = 12,062$ Coulomb(C). 이론적인 Coulomb은 소모된 mg COD(12 C/mg COD)로 계산할 수 있다.

(7) Microscopy

SEM의 경우 electrode를 적절히 section 하여 2 %

glutaraldehyde (in 100 mM HEPES containing 2 mM $MgCl_2$)로 1 시간 고정 후 OsO_4 (1%)로 2시간 반응 시켰다. 반응 후 30, 50, 70, 90, 95% ethanol solution을 사용, 20분 간격으로 탈수 한 다음 다시 같은 농도의 iso-amyl alcohol 로 30분간 처리하였다. 처리된 sample은 sputtering device (Eiko IB-3 ion coater)로 coating 후 SEM (S-4200 FE-SEM, Hitachi, Jap)으로 5 kV에서 관찰하였다.

Low vacuum electron microscopy (LVEM)의 경우 electrode에서 적절한 sample을 취한 후 LVEM (JSM 5410, Jeol Co., Jap.)을 사용 직접 관찰하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 전기 화학적 활성 세균의 농화배양과 미생물 연료전지의 운전

미생물 연료전지의 구조를 사용하여 유기 폐수 (본 실험에서는 전분 가공공장 폐수)를 기질로, 같은 공장에서 발생한 호기성 슬러지를 종균으로 각각 사용하여 폐수내의 미생물을 연료전지 내부에서 농화배양하였다. Fig. 3.3.1에 그 결과가 표시되어 있다.

운전 초기는 open circuit에서 저항을 무한대로 설정하고 48시간 운전하였다. 이때 발생전압은 0.6-0.8V 정도였다. 2일 후 회로를 연결하여 1000 ohm의 저항을 연결하고 음극부 용액 5 ml을 새로운 배지로 치환하였을 때 전압은 다시 상승하였다. 이 결과에서 초기의 전류값 (또는 Coulomb)은 대단히 낮았으나 10일 이후부터는 점차 증가하여 18개월 이상 0.2 mA의 전류를 sequential batch mode에서 작동시켰을 때 안정적으로 발생 시켰다 (result not shown). 음극부의 COD는 30일간 운전하였을 때 1492에서 55

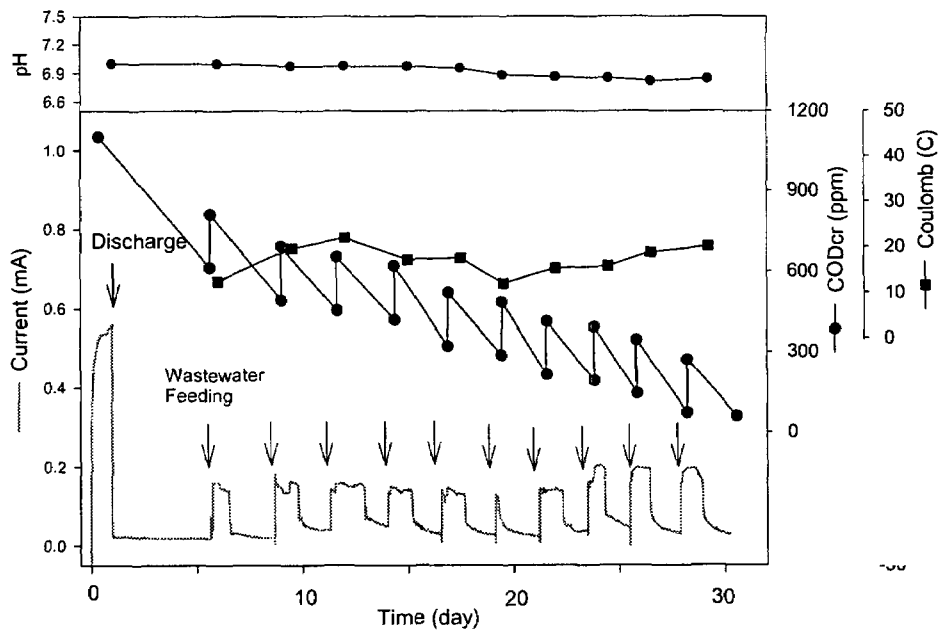


Fig.3.3.1 The performance of current output, COD removal and Coulomb of microbial fuel cell using aerobic sludge as a bacterial source. The current was generated addition of wastewater to anode and the production of Coulomb was analyzed integration of the areas under current versus time curves. COD change was measured in samples from the anode compartment at baseline of current.

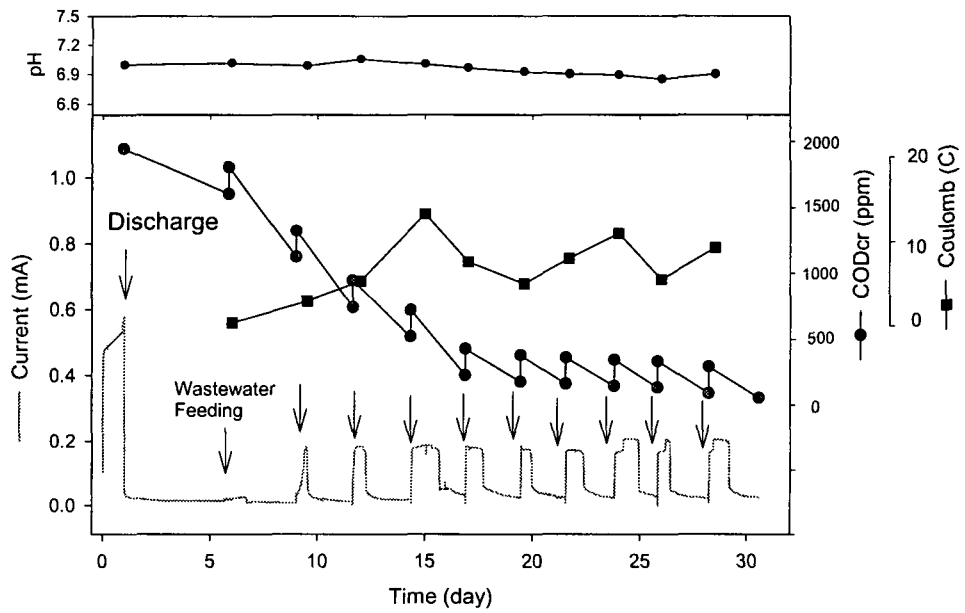


Fig. 3.3.2 Start-up of a mediator-less microbial fuel cell through enrichment of electrochemically active microbes using wastewater from a starch-processing plant as the fuel and sludge collected from an anaerobic digester as the inoculum.

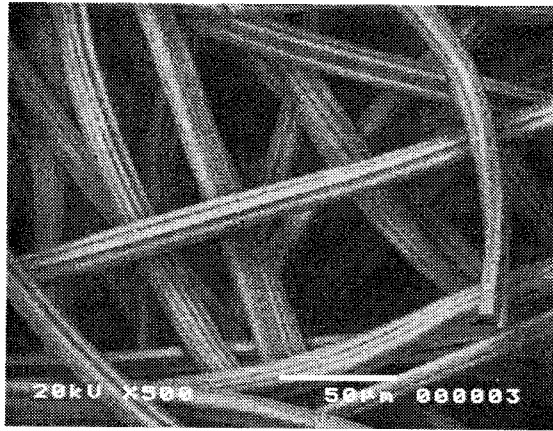
ppm으로 감소하였고 약 10 Coulomb의 전하가 생성되었다.

같은 조건에서 혐기성 슬러지를 종균으로 접종하고 실험하였을 때, 보다 빠른 COD의 감소가 관찰되었다. 이 경우 17일만에 내부의 COD를 소진한 것으로 나타났다. 따라서 이와 같이 혐기적 슬러지를 접종하여 농화 배양을 계속 실행하였다. 농화배양 초기 COD 값이 높은 조건, 즉 충분한 전자공여체가 있을 때에도 전류발생이 일정기간 유지된 다음 떨어지는 이유는 혼합 유기물 중에서 일부를 이용하는 미생물이 먼저 성장하고 농화배양이 진행되면서 나머지 유기물을 이용하는 미생물이 성장하여 농화가 끝난 시점에서는 폐수 중의 모든 유기물을 분해할 수 있는 미생물 군이 형성되는 것으로 판단된다.

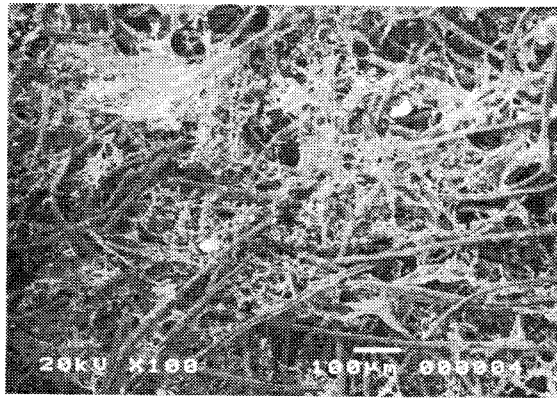
나. 전극에 농화 배양된 미생물의 형태학적 관찰

12개월간 운전한 미생물 연료전지의 음극중 일부를 절제하여 별도의 처리 없이 LVEM으로 관찰한 결과 biofilm 및 전극에 분산된 clumps를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3.3.3). 같은 전극을 SEM으로 관찰한 결과 일반적인 미생물 형태의 입자 및 작은 particle 형태의 부착물을 전극 표면에서 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3.3.4). 이 작은 particle의 크기는 대략 200-300 nm 였으며 이 sample을 강하게 vortexing 한 후 filter (pore size: 0.2 μm)로 분리하였다.

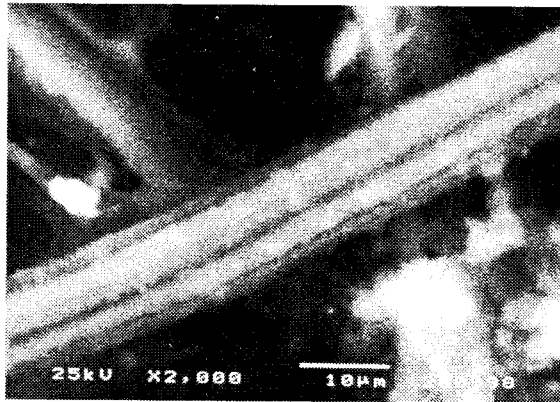
이 sample을 다시 SEM으로 관찰한 결과 Fig. 3.3.4에서 관찰된 것과 같은 크기로 밝혀졌으며 (Fig.3.3.5) 이 particle을 TEM으로 확인하였을 때 미생물의 특이적인 구조로 볼 수 있는 이중막 구조가 외피에서 관찰되었다 (Fig. 3.3.6). 따라서 이 작은 particle은 특수한 환경이나 저영양 상태에서 발견되는 ultramicrobacteria일 가능성이 높다 (Kaprelyants *et al.*, 1993).



(a)



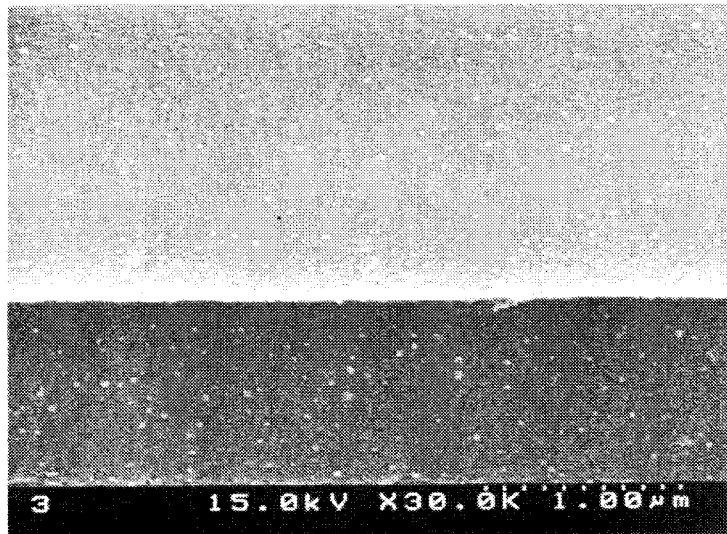
(b)



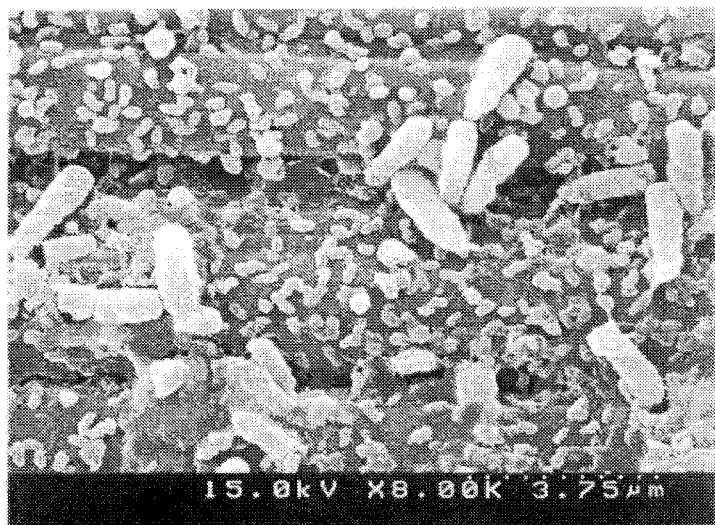
(c)

Fig. 3.3.3 Low vacuum electron micrographs (LVEM) of the anode electrode.

A) control before enrichment B) Samples after enrichment for 1 year. Showing biofilm developed on the electrode C).

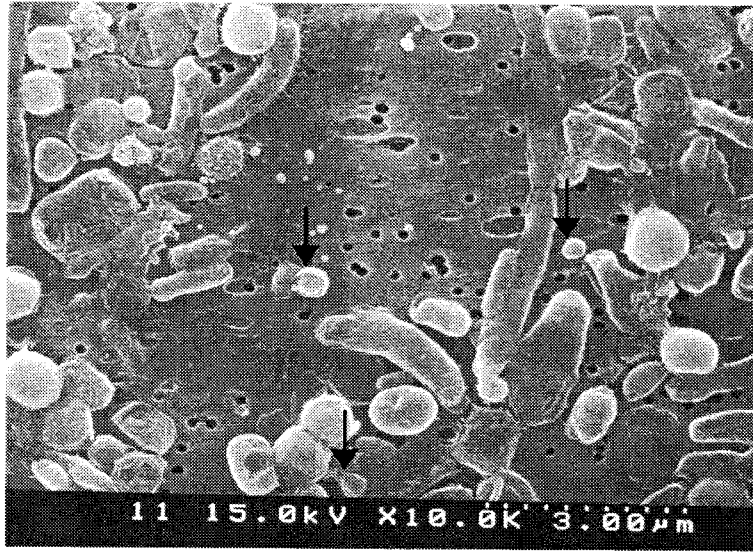


(a)

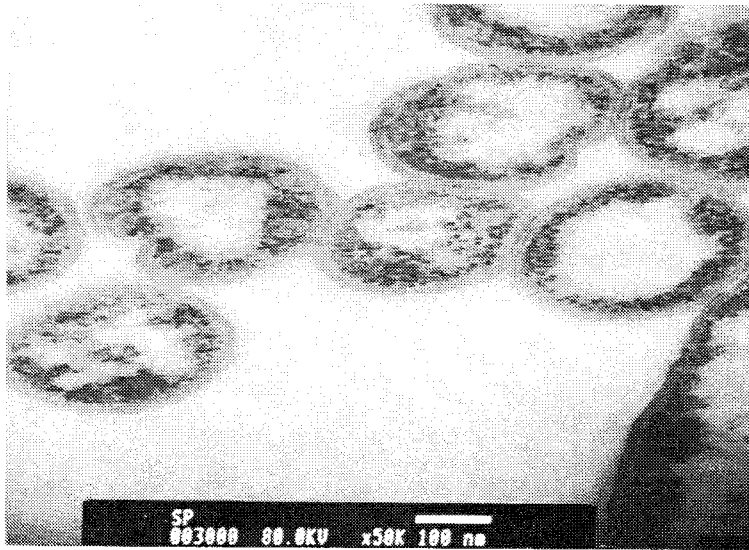


(b)

Fig. 3.3.4 Scanning electron micrographs (SEM) of electrode
A) Electrode sample before enrichment B) Surface of the enriched
electrode with normal and small size bacteria.

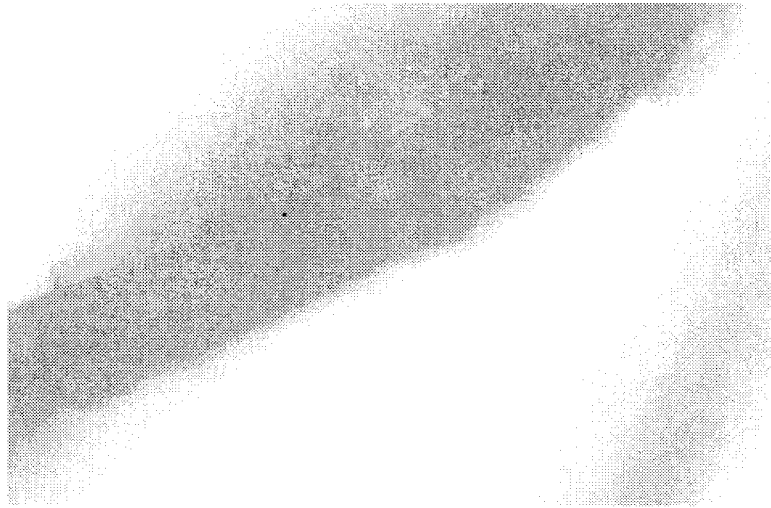


(A)

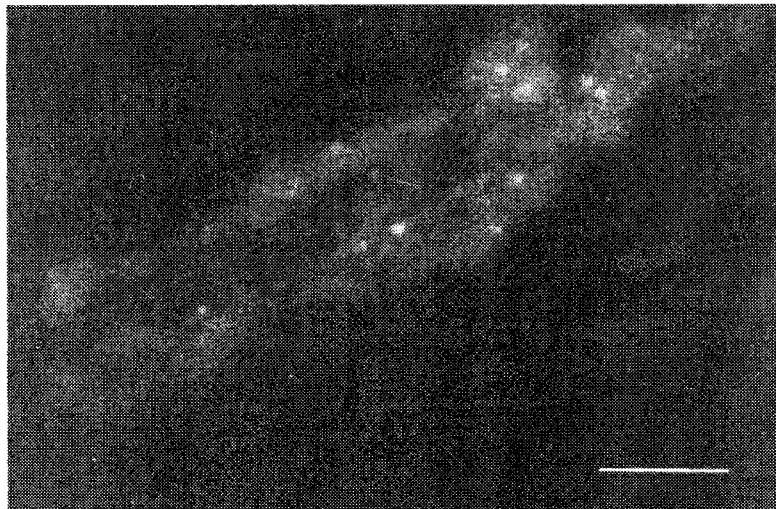


(b)

Fig. 3.3.5 Electromicrographs of particles with the size of 0.2-0.3µm. A) Scanning electron micrograph of the suspension prepared with filter from the anode electrode. B) Transmission electron micrograph of small size bacteria on the surface of electrode.

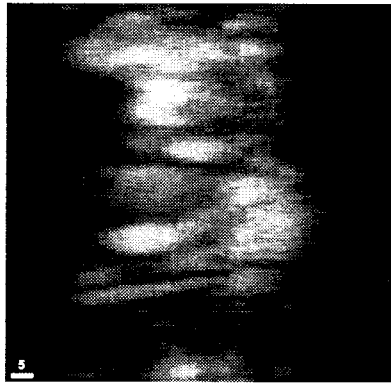


(a)

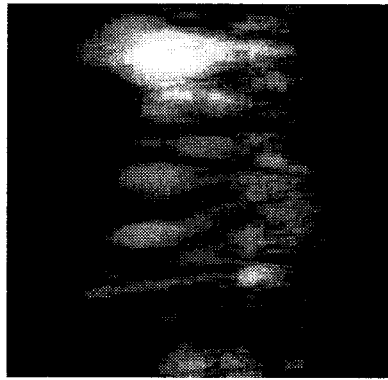


(b)

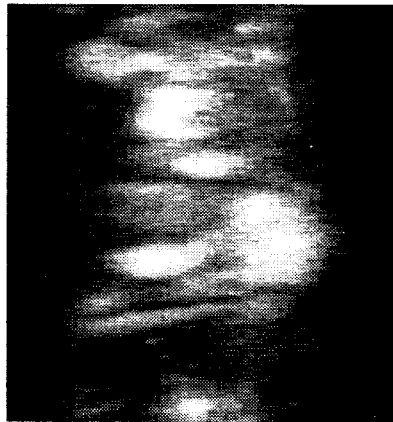
Fig. 3.3.6 Confocal scanning laser micrographs (CSLM) of electrode (A) Sample of electrode which operated on the fuel cell over a year was observed by light microscopy B) The image was showed using by the fluorescent staining to distinguish the Gram staining of the bacteria (Red : Gram positive, Green : Gram negative). Bar size : 3 μ m



(a)



(b)



(c)

Fig. 3.3.7 The CSLM of a bacterial clump developed on the electrode in the microbial fuel cell. Visualized by A)The photograph shows that the bacterial bulk and biofilm on the anode electrode are consisted of bacterial cluster(bulk and film), Gram positive and negative bacteria. Bar size : 5m B) Gram positive bacteria image C) Gram negative bacteria image

이를 보다 확실히 확인하기 위하여 CSLM으로 관찰하였을 때 많은 Gram (+)와 Gram (-) bacteria가 전극 표면 및 clumps에 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3.3.7). 전극에 부착된 biofilm 그리고 bulk structure 와 film 등을 다시 CSLM으로 확인 할 수 있었다.

CSLM으로 bulk의 optical thin section을 조사한 결과 bulk structure를 관찰 할 수 있었으며 cell cluster (microcolonies)와 개개의 normal cell이 bulk structure에 고르게 분포되어있었다 (Fig. 3.3.8). 이 optical section에서는 Gram(+) 및 Gram (-) bacteria가 모두 확인되었다. 따라서 전극 표면에 부착되어 있는 작은 particle 및 전극 외부의 bulk structure등은 미생물일 가능성이 대단히 높으며 이들의 작용에 의하여 미생물연료전지가 전자전달 매개체 없이 직접 전기를 생산하는 것으로 볼 수 있다.

형태학적 관찰에 의하면 전극표면의 particle 이외의 bulk structure가 보이며 이 particle과 bulk structure의 관계는 일종의 symbiosys일 수도 있다. 다시 말하면 폐수내의 다양한 유기물을 particle-like microorganism이 모두 분해할 수 없을 가능성이 있으며 이들 bulk structure의 미생물이 발효하여 발효산물이 발생하고 이들 발효산물을 다시 particle-like microorganisms가 전기로 변화시킨다는 가설이다. 관찰에 의하면 대단히 많은양의 미생물이 전극에 부착하여 존재하는 것으로 확인되었으며 향 후 연구에는 이들 미생물간의 ecology에 대한 연구가 필요하다. 현 과제에서는 이들을 가설을 완전히 확인하지 못하고 particle-like microorganisms의 전기 화학적 활성 여부를 조사하였다. 이를 확인하기 위하여 다음항의 실험에서는 다양한 부가실험, 즉 별도의 미생물 대사 저해제, 전자공여체 및 전자 수용체 등을 첨가 후 미생물 연료전지의 전기 출력 변화를 확인하였고 이들 실험과는 별도로, 미생물 연료전지의 운전조건의 변화를 통하여 전기 화학적 미생물이 농화배양된 미생물 연료전지의 운전조건 최적화를 유도하였다.

다. 전기화학적 활성 미생물이 농화배양된 연료전지의 운전

(1) 전압 및 전류 발생

농화 배양된 연료전지를 18 개월 동안 semi-continuous mode에서 운전하였을 때 연료전지에서 생성되는 전류, 쿨롱, pH와 COD의 변화 등의 패턴을 Fig. 3.3.8에 도시하였다. 3주 동안 농화한 후에 5 ml의 새로운 전분폐수를 주입하여 주면, 20-30 시간동안 약 0.18 mA의 전류를 생성하며, COD 값은 394 ± 4 ppm에서 73 ± 7 ppm으로 감소하였다.

일년동안 25 ml의 미생물연료전지를 이용하여 전분폐수를 처리 하였을 때 처리 전후의 데이터는 Table 3.3.2에 정리하였으며, 이는 폐수처리 단위로서 미생물연료전지를 평가하는데 이용할 수 있다.

55-60 시간 동안 COD와 TOC 제거율은 각각 95%와 87% 이상이었다. 폐수내의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 농도는 매우 낮았으며, 운전하는 동안 변하지 않았다. Nitrate와 nitrite의 농도는 매우 낮았으며, 모두 완전히 제거되었다. 그러나 $\text{PO}_4\text{-P}$ 의 농도는 1770 ppm으로 높았으며, 제거율은 28.8 %이었다. 염소이온의 농도는 64 ± 10 ppm으로 폐수내에서 상대적으로 높은 농도를 나타냈으며, 제거율은 8.8 %로서 처리하는 동안 변하지 않았다.

(2) COD의 변화

연료소모와 전류생성과의 관계를 알아보기 위해 미생물연료전지의 음극부로 주입되는 폐수의 부피를 달리하여 실험하였으며 (Fig. 3.3.9), 데이터는 coulombic yield를 계산하기 위해 사용하였다. 예상한 대로 실험적인 쿨롱값은 주입된 폐수의 부피가 증가함에 따라

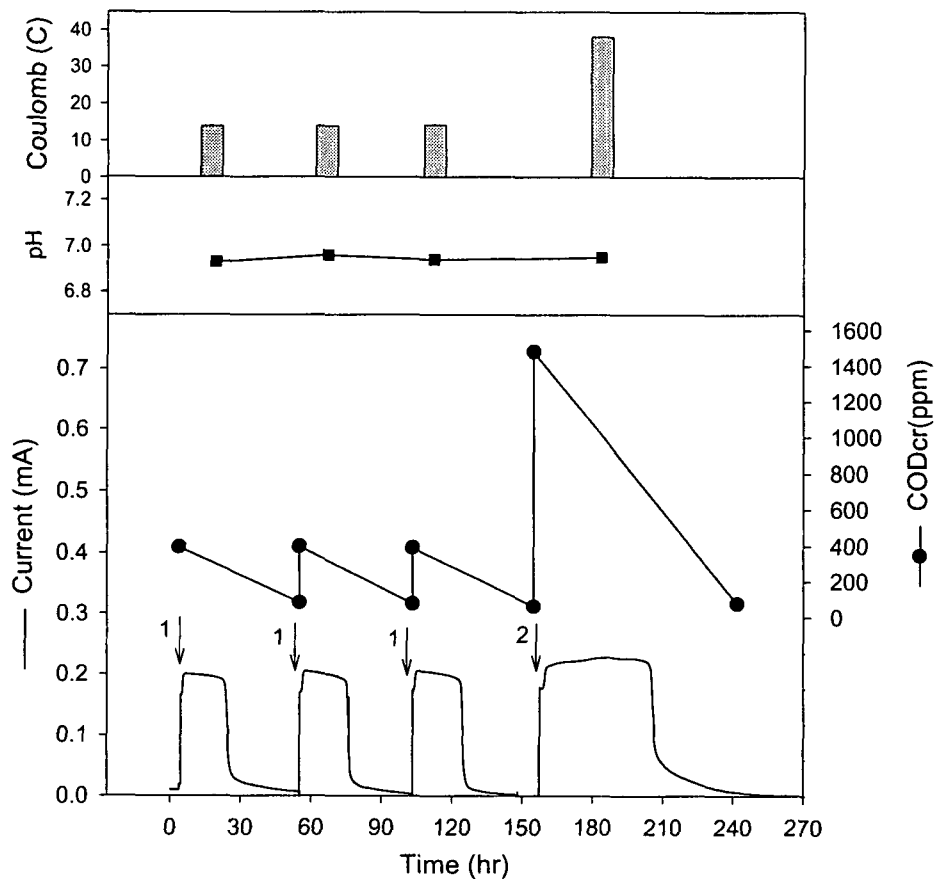


Fig. 3.3.8 The performance of the microbial fuel cell fed with starch process wastewater. The current(-) was recovered with the replacement of anode content by wastewater(1-5 ml and 2-25 ml) and the production of Coulomb was calculated by integration of the areas under current versus time curves. COD change was measured in samples from the anode compartment at baseline of current Details of the analyses are given in methods.

Table 3.3.2 Wastewater treatment parameter and efficiency.

* unit : mg/L (ppm) except pH

Parameters*	Before treatment	After treatment	Mean Removal Rate (%)
pH	6.98±0.2	6.95±0.2	
COD	1410±64	65±8	95
TOC	565±16	72±5	87
NH ₄ -N	<0.5	<0.5	-
NO ₃ -N	<2.2	-	100
NO ₂ -N	<3.4	-	100
PO ₄ -P	1770±34	1260±38	28.8
SO ₄ ²⁻	64±10	44±4	31.2
Cl ⁻	675±23	615±17	8.8

증가하였다 (Table 3.3.3). 15 ml의 폐수가 주입되었을 때 가장 높은 coulombic yield를 얻을 수 있었으며, 10 ml의 폐수 (COD = 658 ppm)가 치환되었을 때까지 제거된 COD와 생성된 클롱값 사이에는 직선적인 관계를 나타내었다 (Fig. 3.3.10).

(3). pH의 영향

음극부로 주입되는 폐수의 pH를 변화시켰을 때의 전류생성량을 관찰하였으며, 이때 양극부의 pH는 7.0으로 조절하였다. Fig. 3.3.11는 음극부의 pH를 변화시켰을 때 생성되는 전류와 COD의 변화를 나타낸 그래프이다. pH 7.0과 8.0에서 가장 높은 전류가 생성

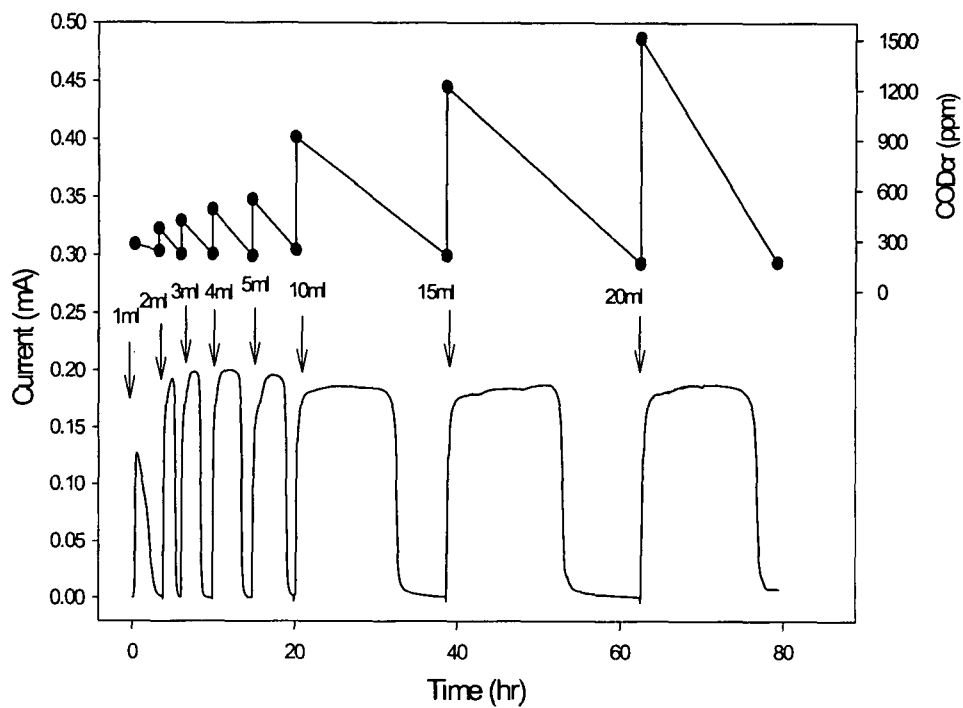


Fig. 3.3.9 Current generation from the microbial fuel cell fed with varying volume of wastewater as fuel.

Table 3.3.3 Relationship between fuel consumption and electric generation.

Feeding volume (ml)	ΔCOD^1 (ppm)	Theoretical Coulomb ² (C)	Experimental Coulomb (C)
1	62	18.6	0.68
2	147	44.1	0.92
3	189	56.7	1.55
4	256	76.8	2.40
5	276	82.8	2.72
10	658	197.4	8.09
15	981	294.3	9.24
20	1242	372.0	9.23

1. ΔCOD : different COD between initial and final COD depend on feeding volume of wastewater

2. Theoretical Coulomb: ΔCOD (ppm) x Working volume (25/1000 ml) = mg COD

* 1 mg COD = 12 Coulomb

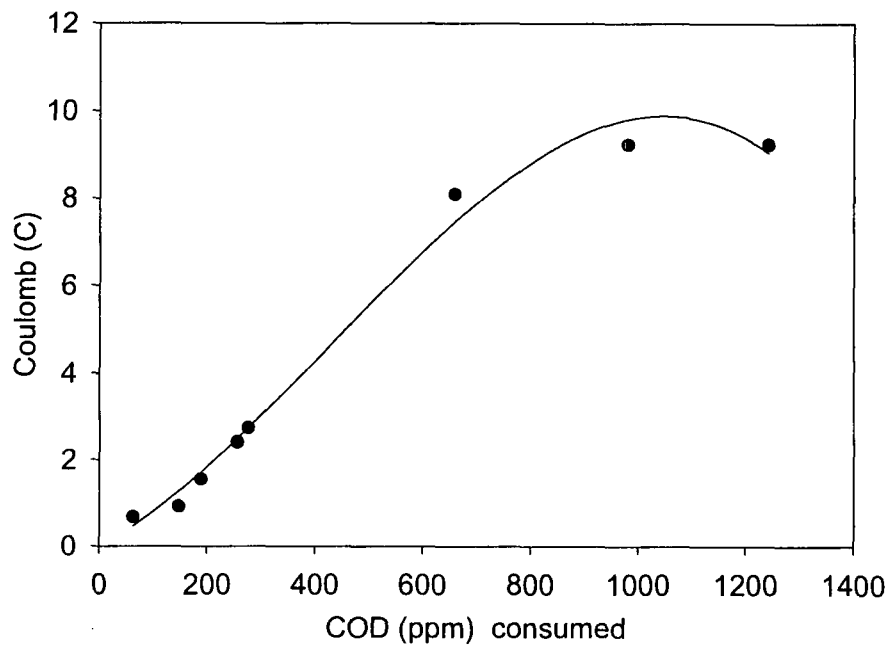


Fig. 3.3.10 The relationship between Coulomb and fuel consumption (COD)

되었으며, pH 5.0, 6.0, 9.0에서는 낮은 전류값을 나타냈다.

Fig. 3.3.11의 결과를 통해 다른 pH에서 생성되는 쿨롱값을 계산할 수 있으며 이는 Table 3.3.4에 정리하였다. pH 7.0에서 생성된 쿨롱값이 가장 높았으며, pH 5.0와 pH 9.0의 경우에는 유기물 소모율의 차이가 10% 이하였음에도 불구하고 pH 7.0의 반 이하의 쿨롱이 생성되었다. 이러한 결과는 아마도 전기화학적 활성을 가진 미생물의 활성이 중성의 pH에서 가장 높기 때문에, 미생물연료전지의 기능이 중성의 pH에서 가장 최적의 것으로 나타난 것이다. 양이온 교환막이 proton을 투과시키는 특성 때문에 음극부의 최종 pH는 중성으로 바뀌게 된다. 그 결과, 음극부와 양극부의 pH 차이는 30분의 짧은 시간 안에 안정화되었으며(data not shown), COD 제거는 중성 pH의 경우와 유사하였다. 산성과 알칼리성 pH에서는 coulombic yield가 낮은 값을 나타내는데, 이는 전자공여체가 전극반응보다는 미지의 전자흐름을 통해 산화되어지거나 또는 일시적인 초기 pH가 전기화학적 활성을 지닌 미생물로부터 전자를 생성하는데 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

(4) 온도의 영향

저항 1 k Ω 에서 전류생성을 측정하기 위해 미생물연료전지의 음극부에 폐수 5 ml을 치환시켜 주었다. 실험은 20 $^{\circ}$ C에서 45 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 결과는 Fig. 3.3.12에 도시하였다. 실험을 수행한 온도에서 거의 비슷한 전류가 생성되었다. 37 $^{\circ}$ C에서 약간 높은 전류가 생성되었지만 (Fig. 3.3.13), 25 $^{\circ}$ C에서 가장 높은 coulombic yield를 나타내었다 (Table 3.3.5). COD 제거율은 온도와 거의 무관한 값을 나타내었다. 45 $^{\circ}$ C에서는 매우 낮은 값의 전류가 생성될 것으로 예상하였으나, 쿨롱값은 거의 비슷한 값을 나타내었다 (Fig.

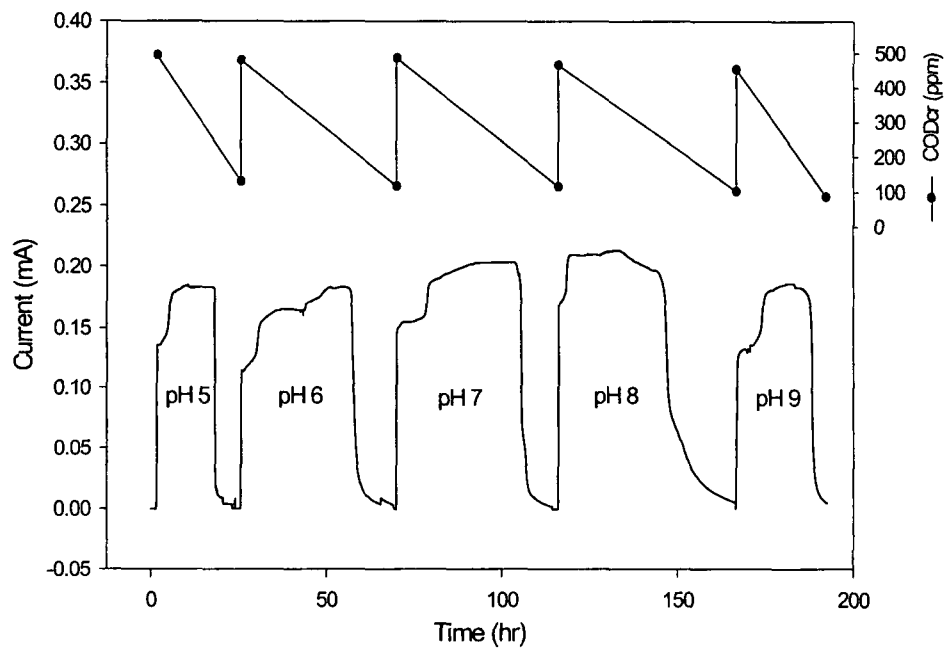


Fig. 3.3.11 The Performance of current and COD changes depend on pH of anode.

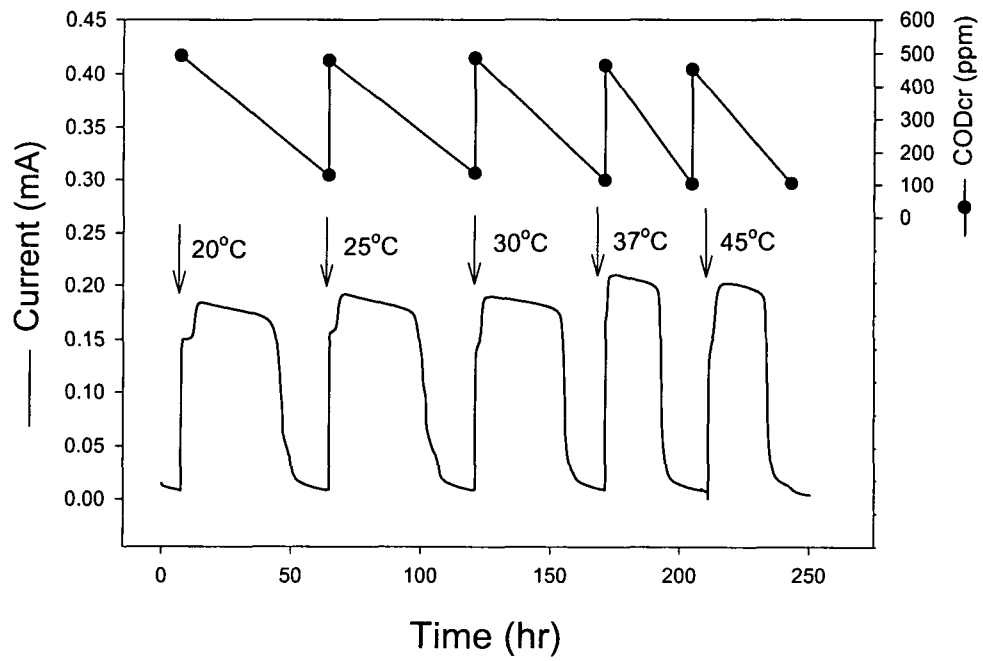


Fig. 3.3.12 The performance of current and COD change at different temperature of microbial fuel cell.

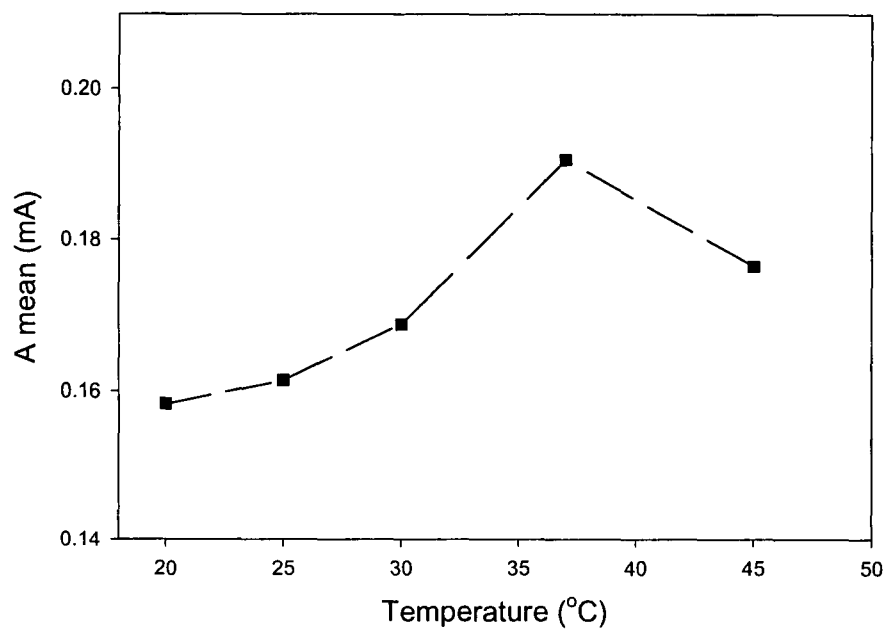


Fig. 3.3.13 The relationship between temperature and mean current generation.

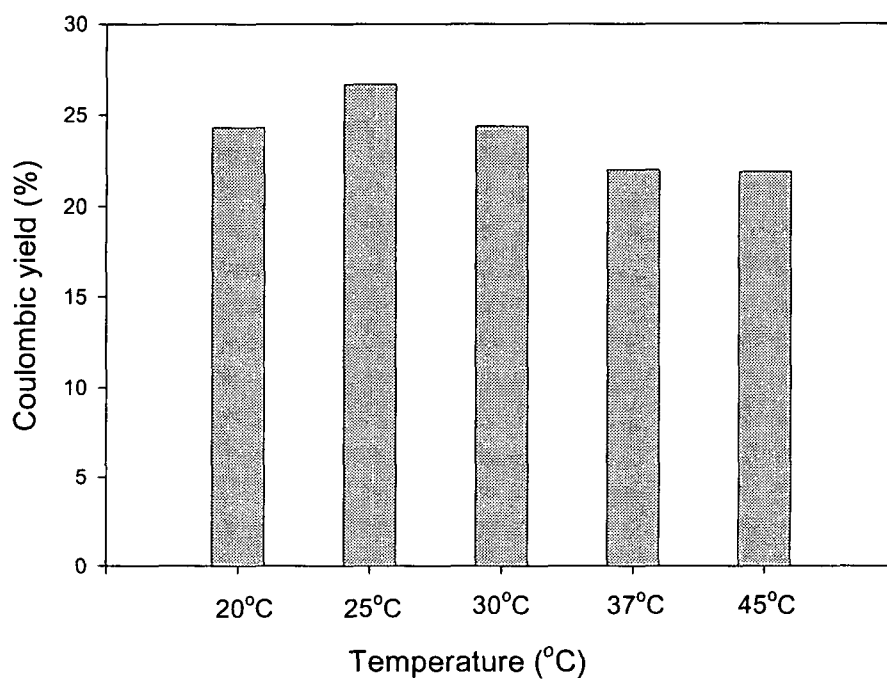


Fig. 3.3.14 The coulombic yield of the microbial fuel cell at different temperature (°C).

Table 3.3.4 The relationship between pH of the anode part and current generation .

pH of anode	$\Delta\text{COD}^{\text{I}}$ (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)	Coulombic Yield (%)	Final pH
5	365	109.5	11.42	10.4	7.23
6	343	102.9	21.15	20.5	6.98
7	371	111.3	27.01	24.2	7.49
8	363	108.9	26.95	24.7	8.25
9	365	110.1	14.34	13.0	8.23

1. The different COD between initial and final COD
2. $\text{Yield}(\%) = \text{Theoretical Coulomb} / \text{Experimental Coulomb} \times 100$

3.3.14). 20, 25, 30, 37, 45 °C에서 각각 약 38.5 시간, 39.2 시간, 21.8 시간, 23.1시간 동안 전류가 생성되었다. 이러한 결과를 통해 37 °C에서 미생물연료전지의 반응속도가 가장 높음을 알 수 있다.

(5) 저항의 영향

미생물연료전지에 저항이 미치는 영향을 실험하기 위해 semi-continuous mode에서 5 ml의 폐수를 첨가하여 주었으며, 결과는 Fig. 3.3.15에 도시하였다. 전류와 쿨롱생성량은 각각의 저항에서

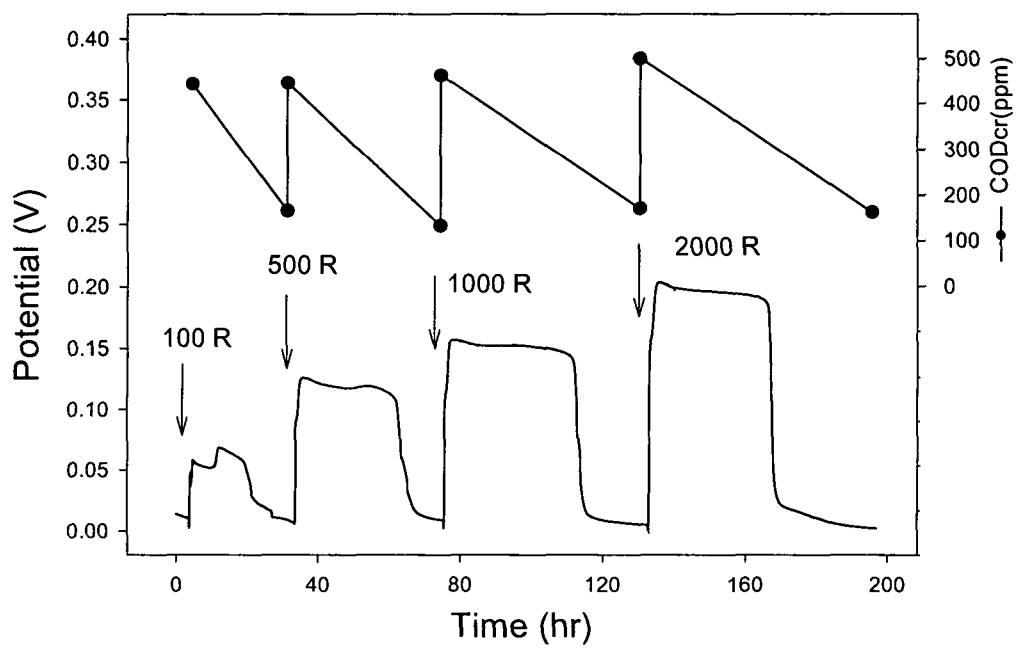


Fig. 3.3.15 The performance of the microbial fuel cell with different resistance.

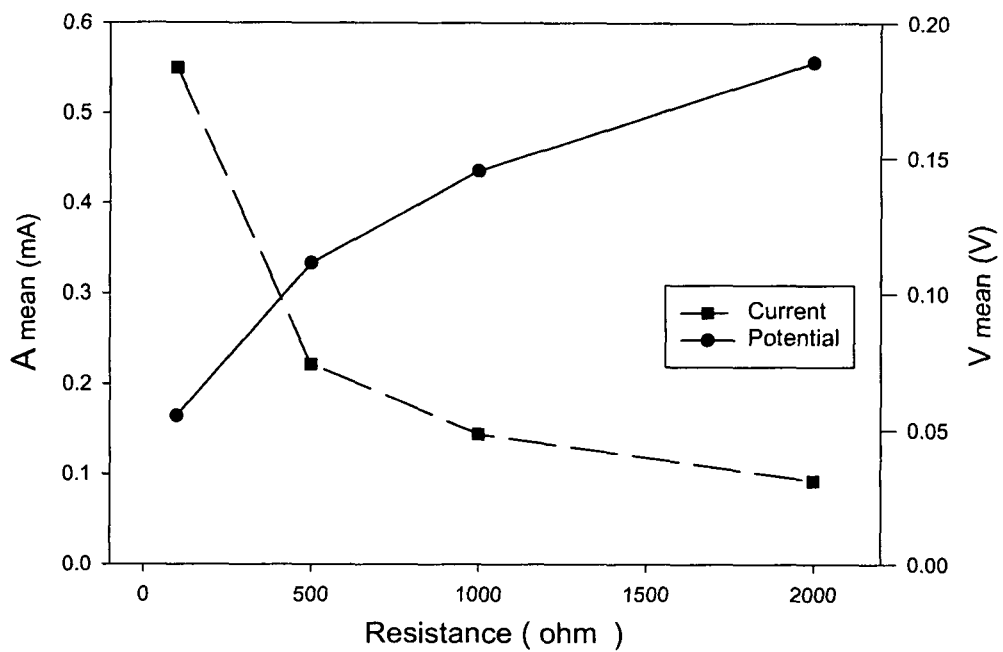


Fig. 3.3.16 The maximum current and potential of the microbial fuel cell at various resistance.

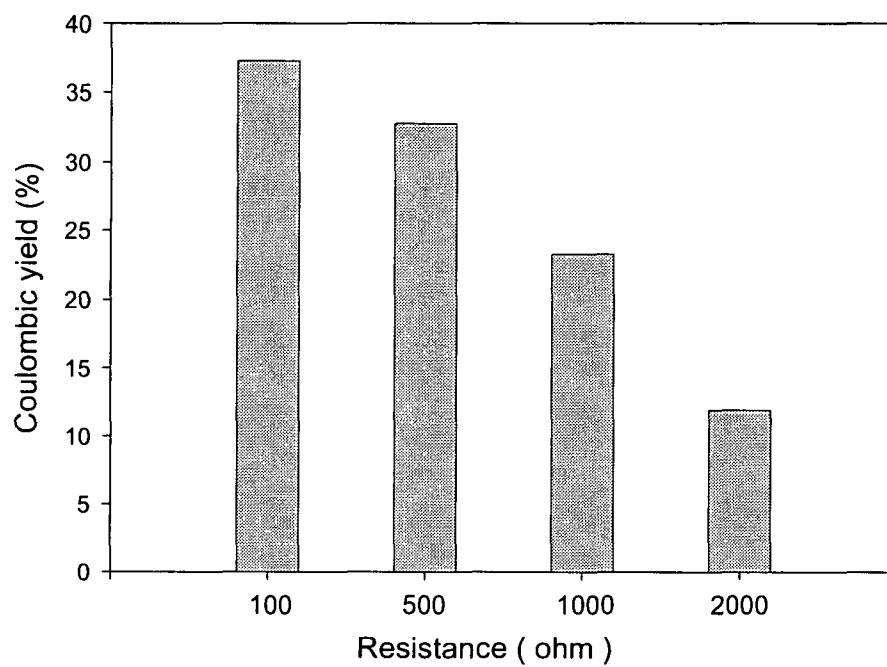


Fig. 3.5.11 The relationship between resistance and coulombic yield

계산하였다. $V=IR$ 의 식에 따라 저항(R, Ω), 전류(I, A), 전압(V, V)의 관계를 알 수 있으며, 저항이 낮을 수록 전류가 많이 생성되리라 예측할 수 있다. COD 제거율은 저항의 변화에 따라 약간 다르게 나타났다 (Fig. 3.3.16).

폐수(기질)의 산화에 따른 coulombic yield은 저항의 영향을 받는 것으로 나타났다 (Fig. 3.3.17; Table 3.3.6). 1000 Ω 이상의 고저항에서 coulombic yield는 저저항의 경우보다 현저하게 낮아졌다. 이러한 결과를 통해 저항은 미생물에서 전극으로의 전자전달에 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다.

Table 3.3.5 The current generation depend on temperature of microbial fuel cell.

Temperature ($^{\circ}C$)	ΔCOD^1 (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)	Coulombic Yield (%)
20	365	109.5	26.7	24.3
25	343	102.9	27.5	26.7
30	371	111.3	27.2	24.2
37	363	108.9	24.0	24.7
45	364	108.6	24.0	21.9

1 : The differences in COD between initial and final COD

Table 3.3.6 Relationship between the electric load and coulomb from the microbial fuel cell.

Resistance (Ω)	ΔCOD^1 (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)
100	328	98.4	36.7
500	313	93.9	25.9
1000	392	87.6	20.4
2000	339	101.7	21.1

1 : The differences in COD between initial and final COD

(6) 음극부의 주입되는 질소의 영향

미생물연료전지의 음극부에 질소의 gassing rate를 변화시켰을 때 영향에 관한 연구를 수행하였다. Fig. 3.3.18에서 볼 수 있듯이, 생성되는 최대전류값은 질소의 gassing rate와는 거의 무관하다. 그러나 coulombic yield에는 영향을 미치는데 0.4 vvm에서 가장 높은 값을 나타냈다 (Fig. 3.3.19). 이러한 결과를 통해 전자는 전극과 반응하여 소모되는 것이 아니라 반응에 의해 소모되는 것임을 알 수 있다. COD 제거율은 질소 gassing rate의 변화에 따라 차이를 보이지 않았다 (Table 3.3.7). 낮은 gassing rate에서 전자는 시스템 내로 분산된 산소를 환원시키는데 소모되며, 높은 gassing rate에서는 전자는 H_2 로 방출되는 듯하다.

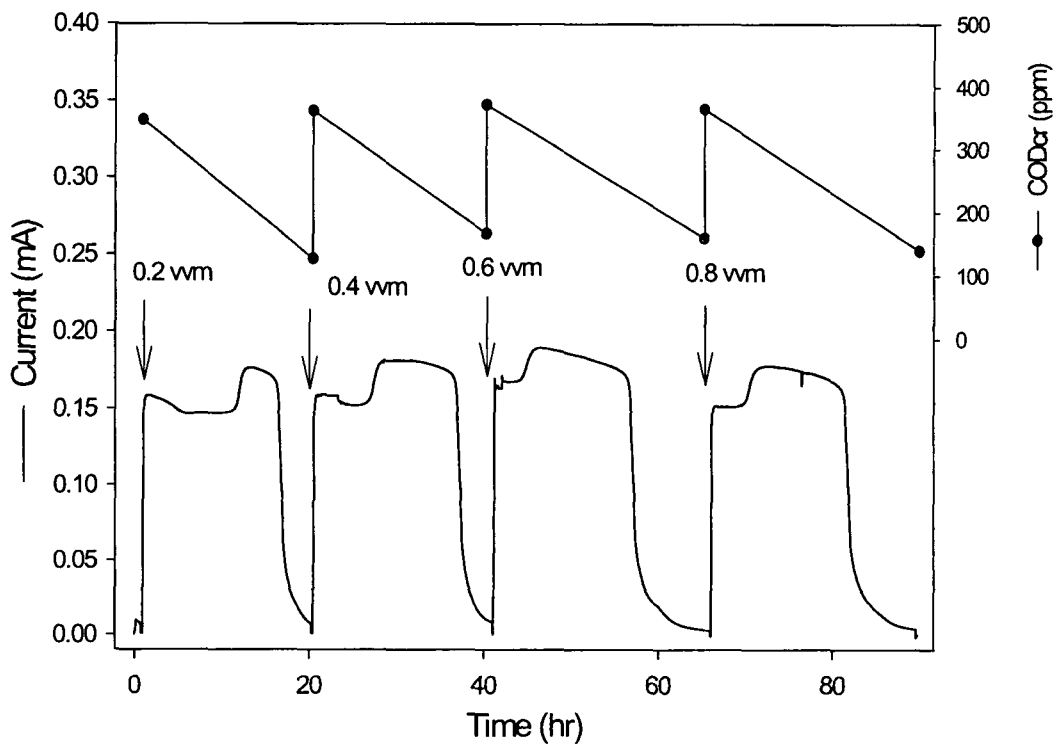


Fig. 3.3.18 The current generation and COD change at different nitrogen gas rate to anode part.

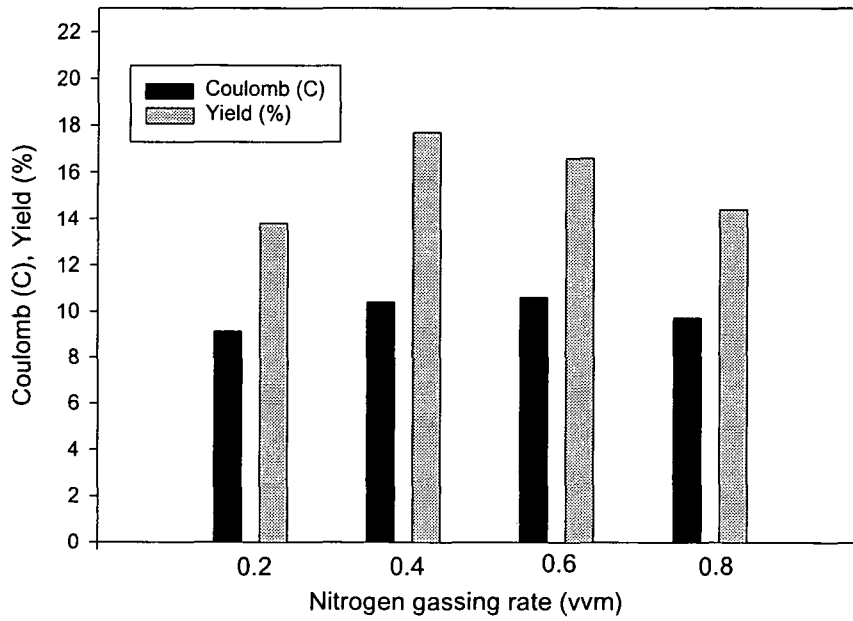


Fig. 3.3.19 The Coulomb and yield (%) depend on nitrogen feeding rate (vvm) to anode part of microbial fuel cell.

Table 3.3.7 The relationship between nitrogen gassing rate and coulomb from the microbial fuel cell.

Gassing rate (vvm)	Δ COD ¹ (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)
0.2	220	66.0	9.13
0.4	195	58.5	10.4
0.6	212	63.6	10.6
0.8	225	67.5	9.73

1 : The different COD between initial and final COD depend on nitrogen feeding rate to anode part

(7) 양극부로 주입되는 공기의 영향

미생물연료전지의 양극부에 aeration rate가 미치는 영향에 관한 실험을 수행하였다. 결과는 Fig. 3.3.20에서 볼 수 있듯이, 최대 전류값은 aeration rate와 무관하게 나타났지만 coulombic yield는 0.2 vvm (12.2 %)에서 낮은 값을 나타냈다 (Table 3.3.8). 연료전지에 잔존하는 COD는 0.2 vvm일 때 0.4 vvm 이상에서보다 높은 값을 보였는데, 이는 낮은 aeration rate (0.2 vvm)일 때 양극부에서 proton의 산화가 불충분하기 때문이다 (Fig. 3.3.21). 이러한 결과를 통해 0.4 vvm 이상에서 최적의 air feeding rate를 보임을 알 수 있다.

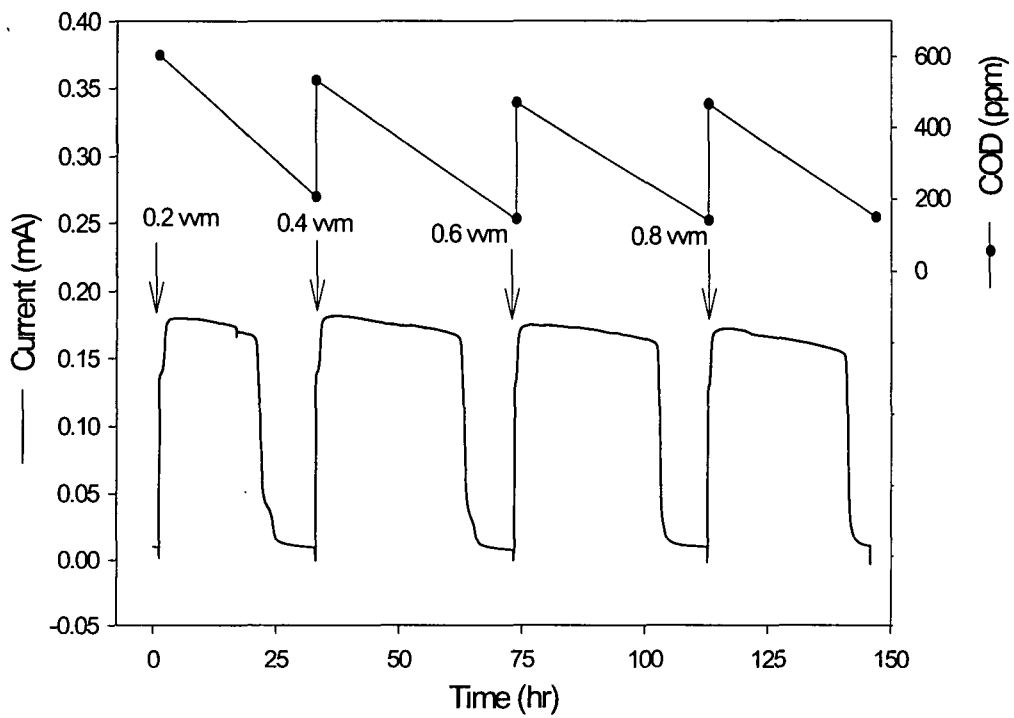


Fig. 3.3.20 The current generation and COD change in the microbial fuel cell at different cathode aeration.

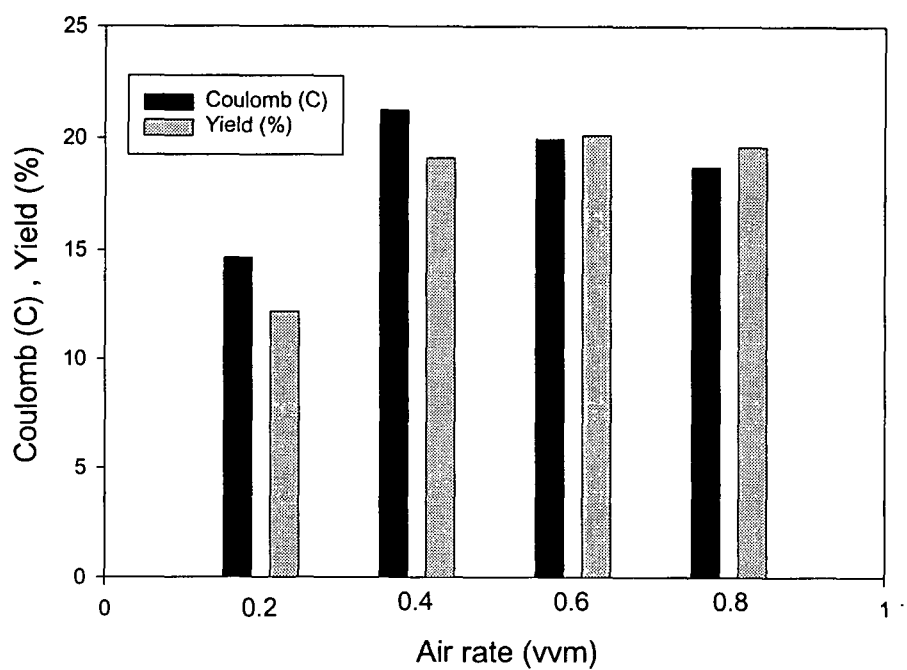


Fig. 3.3.21 Generated Coulomb and coulombic yield at different cathode aeration rate.

Table 3.3.8 The relationship between cathode aeration rate and coulombic yield from the microbial fuel cell.

Aeration rate (vvm) ¹	Δ COD ² (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)
0.2	402	120.6	14.7
0.4	390	117.0	22.3
0.6	330	99.0	19.9
0.8	317	95.1	18.7

1. vvm : The ratio of air feeding volume to working volume a minute
2. The different COD between initial and final COD depend on aeration rate to cathode part

(8) 전극 넓이의 영향

미생물연료전지의 운전에 음극부의 전극 넓이가 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였다. 실험결과 최대 전류값은 가장 작은 면적의 전극에서 가장 낮은 값을 보였으며, 전극의 면적이 3.75 cm²으로 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 3.3.22). 전극의 면적이 작을 때 COD 제거율은 면적이 큰 경우와 상응하는 값을 나타내었지만, coulombic yield는 낮은 값을 보였다 (Table 3.3.9, Fig. 3.3.23). 이러한 결과를 통해 전극 면적의 크기가 미생물연료전지에서 속도를 제한하는 하나의 요인으로서 작용하며, 전극표면적이 제한되었을 때 전극과의 반응 이외의 반응에 의해서 전자가 소모된다는 것을 알 수 있다.

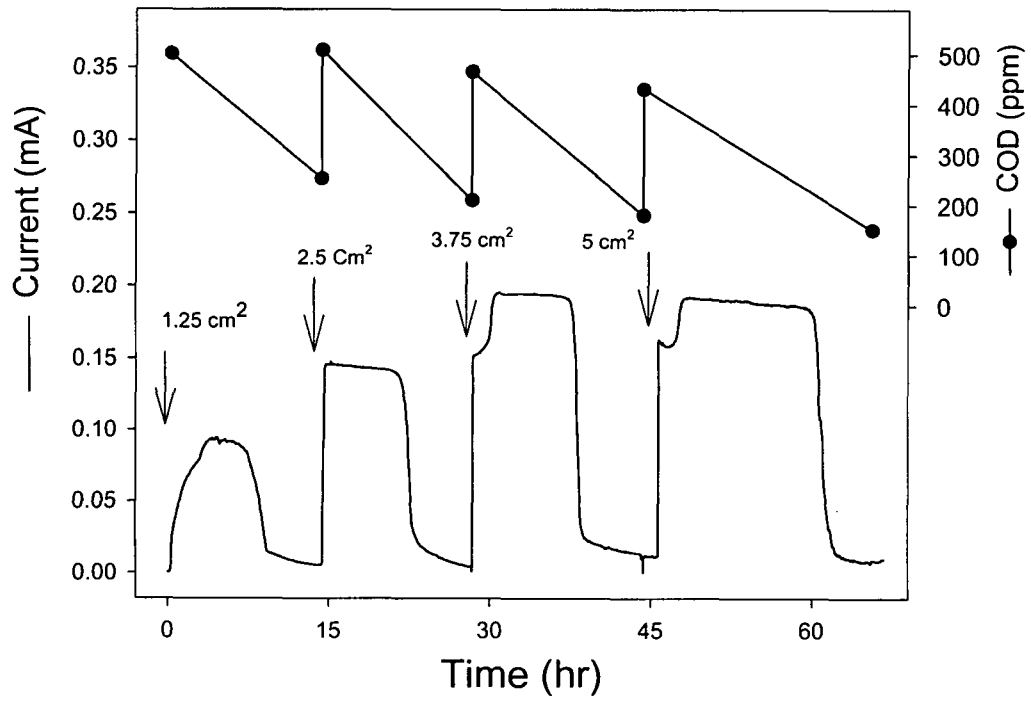


Fig. 3.3.22 The current and COD changes with different anode size.

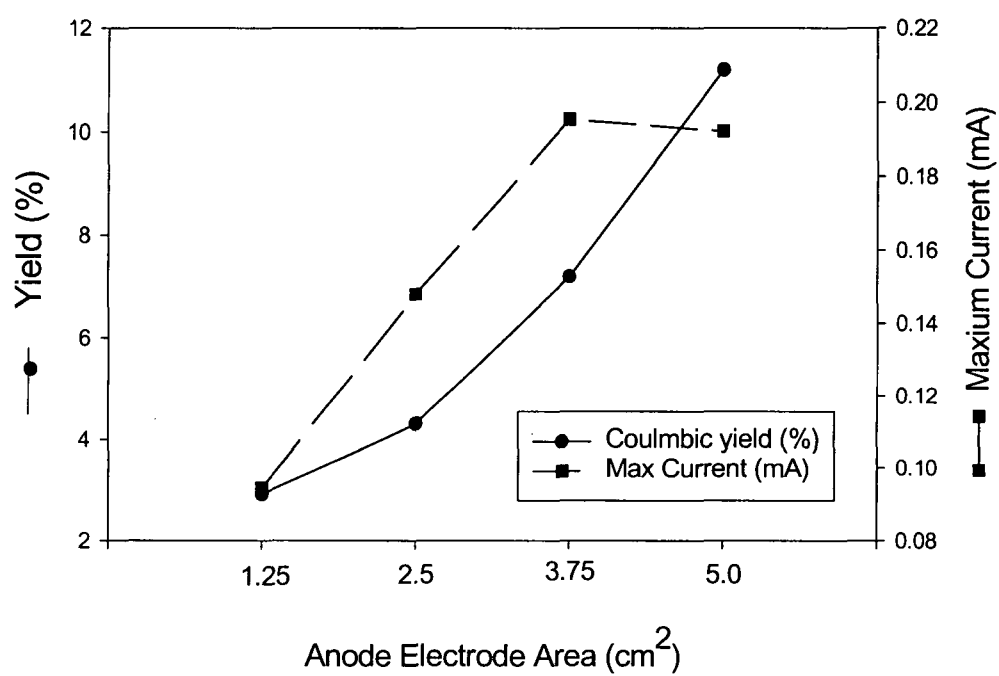


Fig. 3.3.23 The Coulomb and Coulombic yield (%) depend on anode electrode area.

Table 3.3.9 The current generation depend on electrode area of anode.

Area of anode electrode (cm ²)	△COD ¹ (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)
1.25	248	74.4	2.16
2.5	299	89.7	3.83
3.75	285	85.5	6.17
5	280	84.0	9.41

1. The different COD between initial and final COD depend on electrode area of anode

(9) 양이온 교환막 넓이의 영향

미생물연료전지의 운전에 양이온 교환막의 크기가 미치는 영향을 알아보기 위해 silicone-rubber gasket의 크기를 통해 막이 blocking 되는 부분을 조절하여 면적을 맞추었다. 실험결과 양이온 교환막의 넓이에 따라 쿨롱의 생산에 커다란 차이를 보였다 (Table 3.3.10, Fig. 3.3.24). Fig. 3.4.25를 보면 coulombic yield와 최대 전류값은 막의 면적에 비례함을 알 수 있으며, COD 제거율은 1.25 cm²의 작은 면적일 때 큰 면적인 경우보다 낮았다 (Table 3.3.10).

Table 3.3.10 The current generation depend on membrane area.

Area of membrane (cm ²)	△COD ¹ (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)
1.25	166	49.8	9.05
2.5	284	85.2	27.4
3.75	250	75.0	29.24
5	270	81.0	29.01

1. The different COD between initial and final COD depend on membrane area

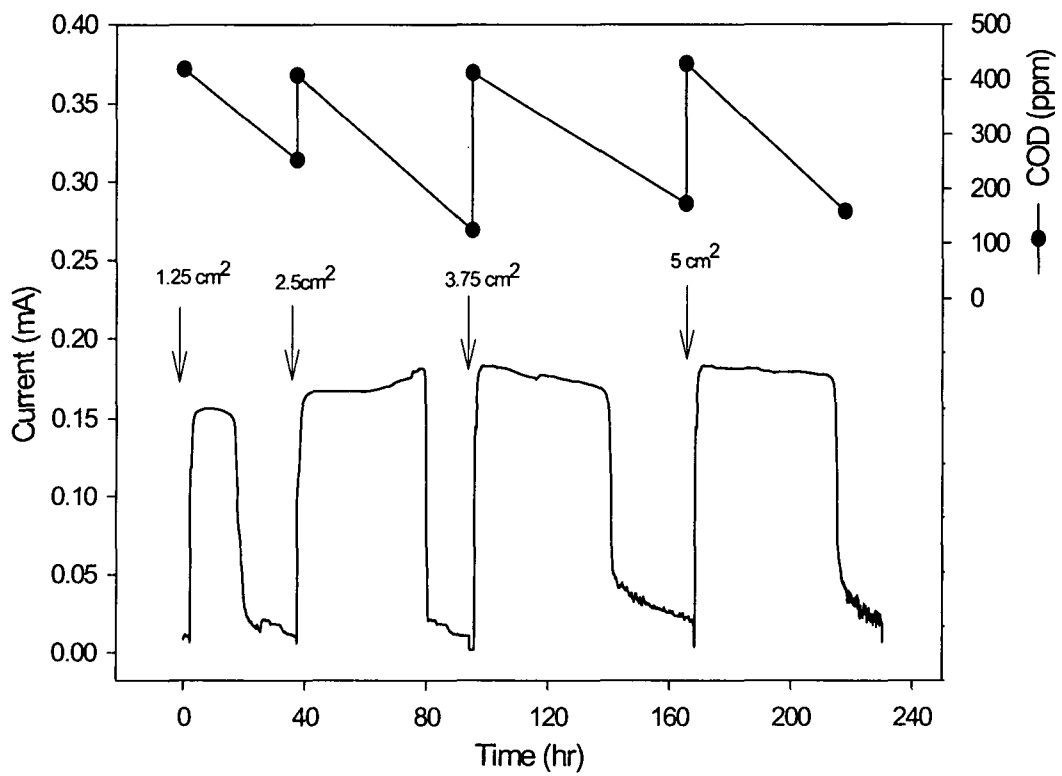


Fig. 3.3.24 The effects of different cation exchange membrane area on current output and COD removal.

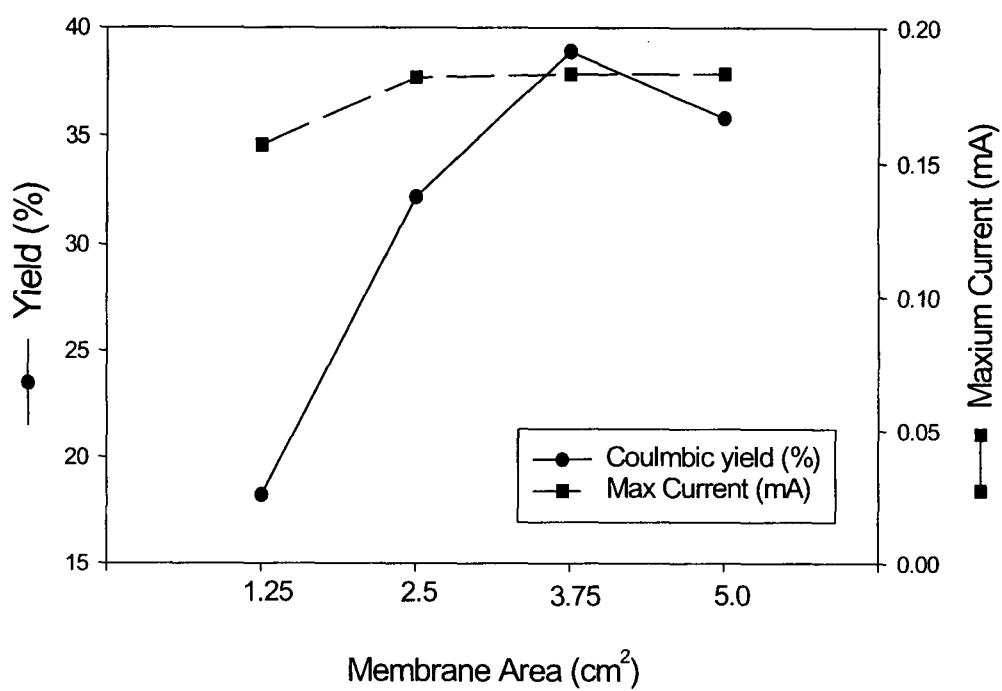


Fig. 3.3.25 The yield and maximum current depend on membrane area.

(10) 저해제의 영향

미생물 성장 저해제가 연료전지의 전류생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 저해제를 이용하여 실험하였다. 폐수 5 ml을 미생물연료전지에 첨가하면 20 시간동안 전류가 생성되었다. 본 실험은 연료 공급 후 10 시간 내에 수행하였다. Fig. 3.3.26과 Fig. 3.3.27에서 볼 수 있듯이, terminal oxidase 저해제로 알려진 cyanide와 azide는 전류생성에 저해작용을 하지 않았다. p-CMPS는 0.28 mM을 첨가하자 전류생성이 멈추었다. HQNO를 첨가하였을 때에는 4 μ M이상에서 저해를 일으켰으며 전류는 점차 감소하였으며, 164 μ M가 연료전지에 첨가되자 전류 생성이 결국 멈추었다. 저농도의 antimycin A를 첨가하였을 때에는 전류생성에 별다른 저해를 일으키지 않았으나, 0.34 mM이 첨가되자 뚜렷한 저해작용이 나타났다. Rotenone의 경우에는, 0.5 mM에서 1.5 mM의 범위에서 뚜렷한 전류생성의 저해가 관찰되지 않았으나, 7.5 mM을 첨가하자 전류의 흐름이 완전히 중단되었다. Uncoupler인 DNP를 첨가하면 처음에는 전류가 일시적으로 감소하지만 곧 회복되었다. 이러한 현상은 uncoupler 자체보다는 acetone의 효과에 기인한 것이다. 좀 더 높은 농도인 0.24 mM의 DNP를 첨가하자 전류생성에 저해를 나타냈다. ATPase 저해제인 DCCD의 저해 농도는 0.6 mM이었다.

(11) 전자공여체의 영향

본 실험에 수행된 미생물연료전지는 전분가공 폐수를 이용하여 농화하였으며, 전분폐수는 대부분 포도당과 이의 oligomer로 구성되어 있다. 본 실험에서는 전류생성을 위해 기질 형성의 과정과 형성된

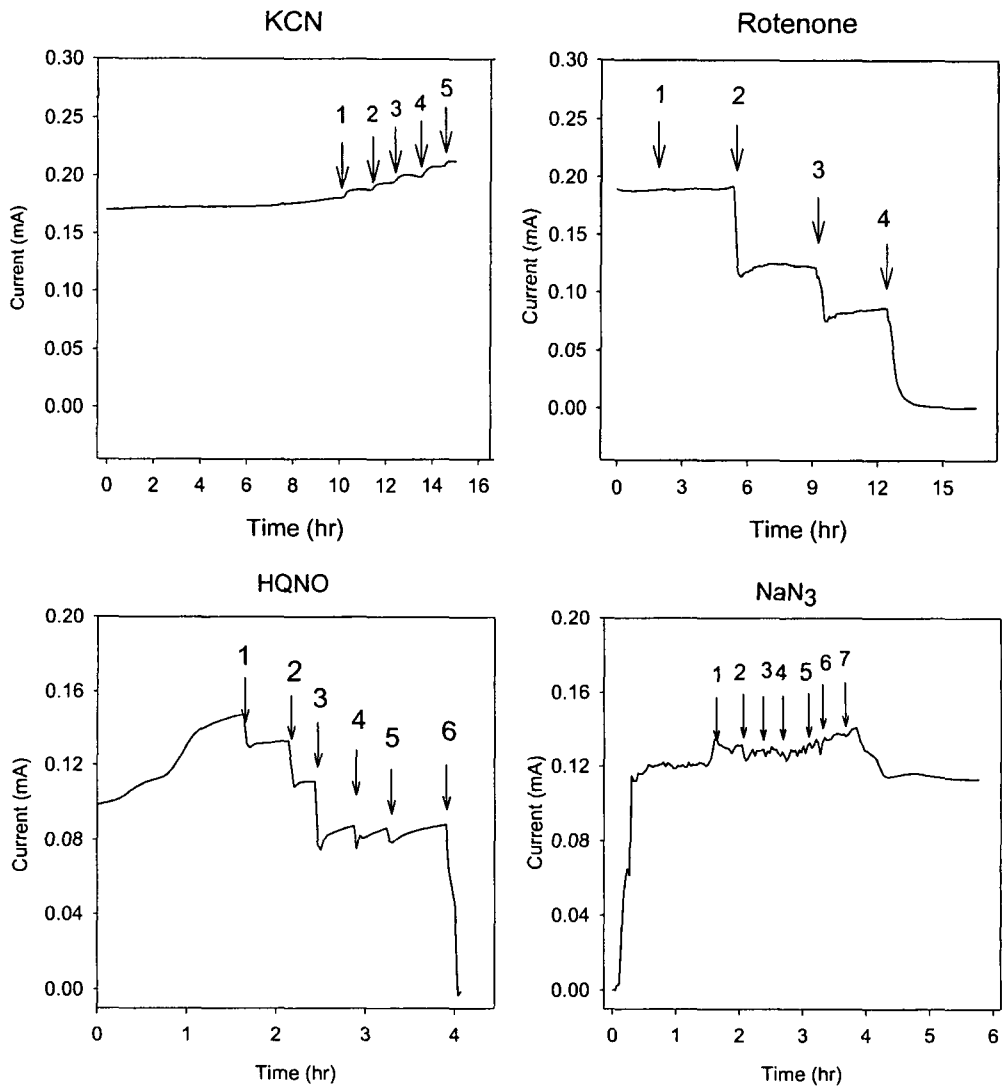


Fig. 3.3.26 The current generation from the microbial fuel cell fed by starch processing wastewater with respiratory inhibitor challenge. Inhibitors were added to the anode increasing the final concentration progressively at the points marked by arrows ; KCN (1-0.16, 2-0.48, 3-0.96, 4-1.54, 5-2.32mM), Rotenone (1-0.5, 2-1.0, 3-3.5, 4-7.5mM), HQNO (1-4, 2-12, 3-24, 4-44, 5-84, 6-164M), Azide (1-0.2, 2-0.6, 3-1.2, 4-1.8, 5-2.8, 6-4.8, 7-8.8mM)

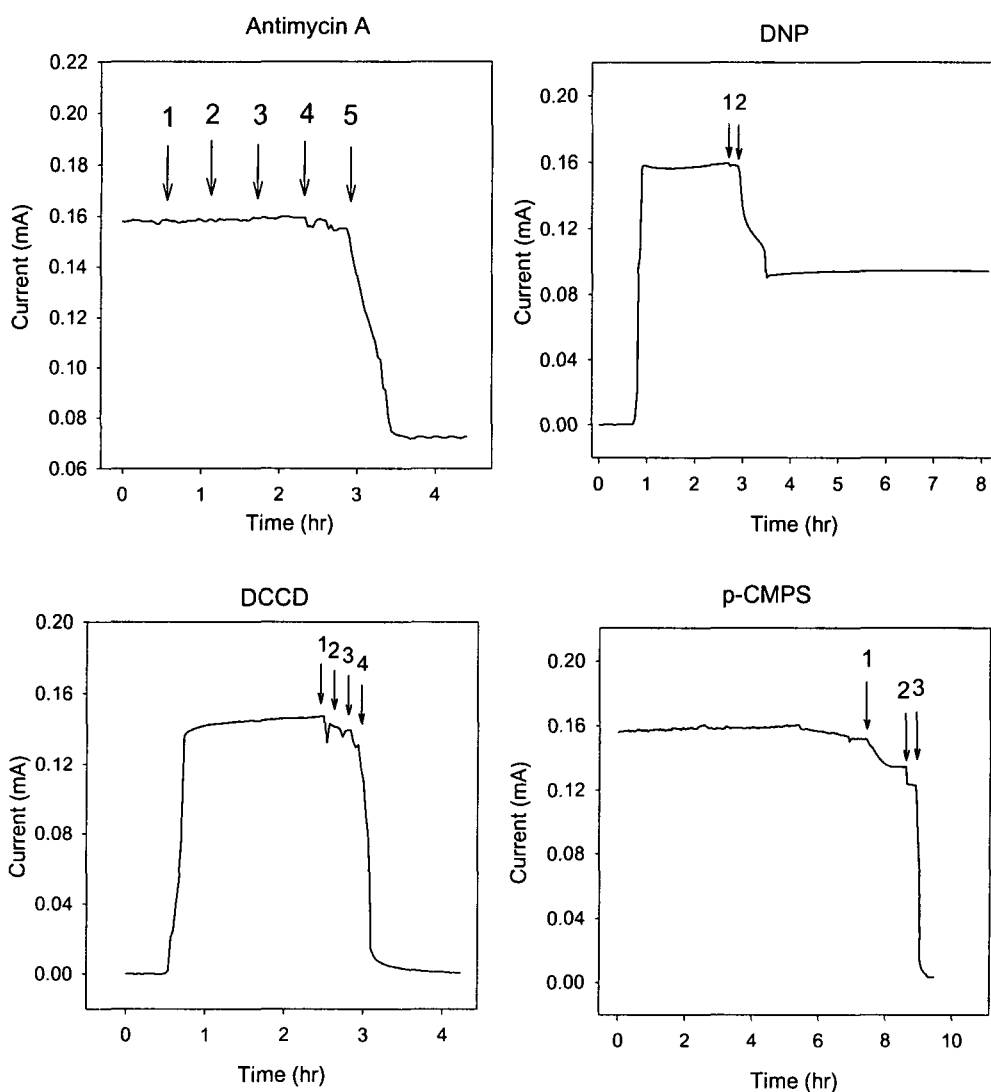


Fig. 3.3.27 The current generation from the microbial fuel cell fed by starch processing wastewater with respiratory inhibitor challenge. Inhibitors were added to the anode increasing the final concentration progressively at the points marked by arrows: Antimycin A (1-8, 2-24, 3-56, 4-120, 5-340 M), DNP (1-80, 2-240M), DCCD(1-40, 2-120, 3-280, 4-600 M), p-CMPS(1-40, 2-120, 3-280 M).

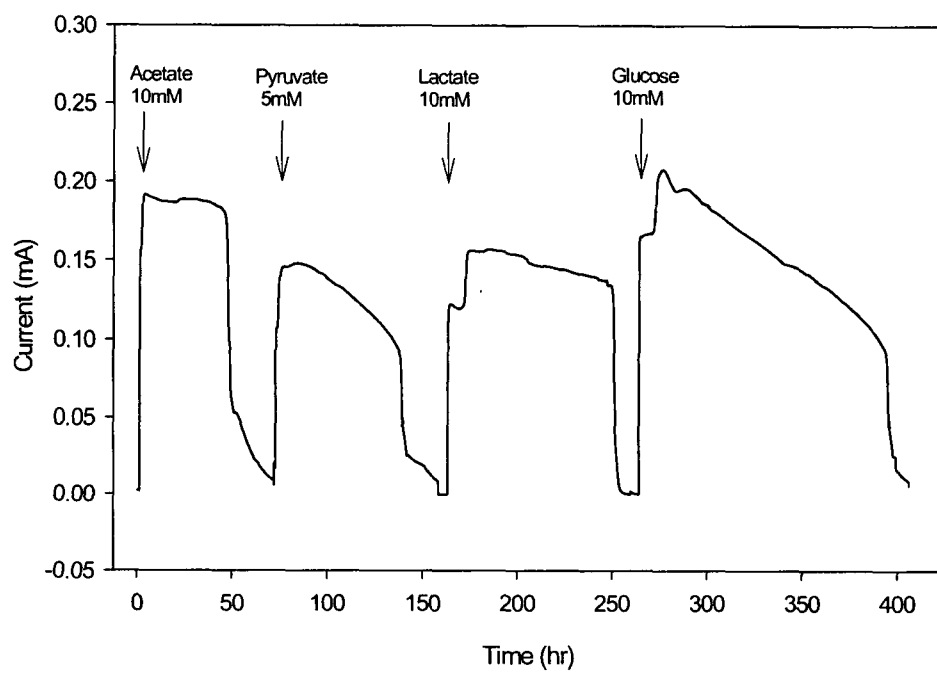


Fig. 3.3.28 The current generation by the microbial fuel cell fed by different substrates.

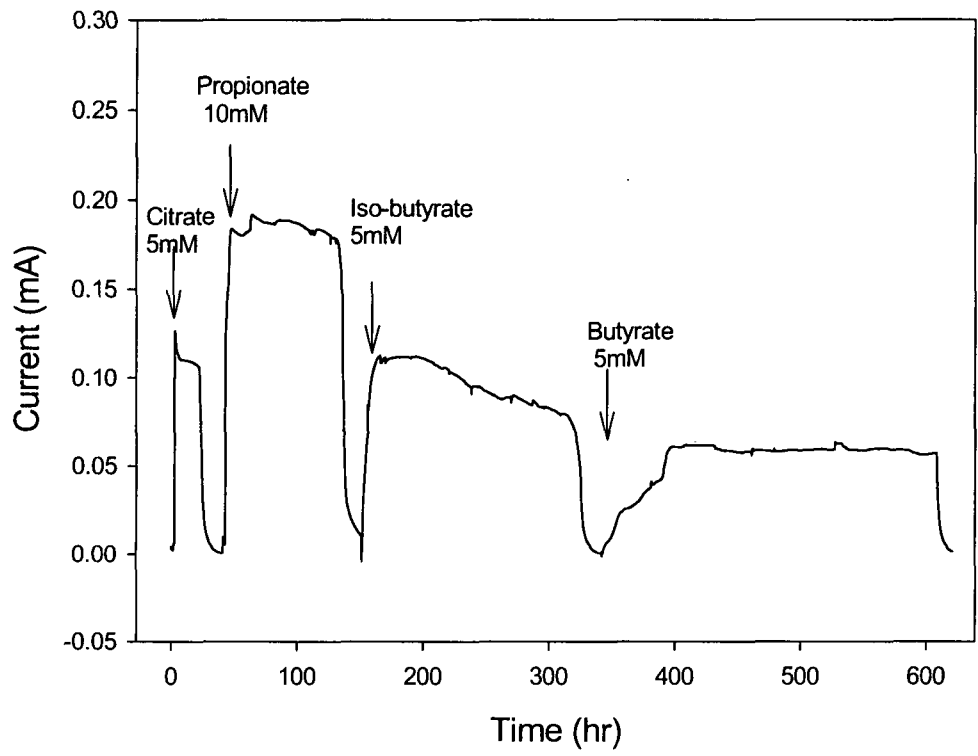


Fig. 3.3.29 The current generation by the microbial fuel cell fed by different substrates.

기질로부터 이론적인 전류를 얻는 과정을 알아보기 위하여 수행하였다. 저항 1k Ω 에서 다양한 기질을 첨가하여 실험을 하였으며 실험결과는 Fig. 3.3.28과 Fig. 3.3.29에 도시하였다. 다양한 기질 (지방산)이 연료전지에 첨가되자마자 전류가 생산되었다. 산의 sodium salt는 stock solution을 제조하여 사용하였으며, 전류생성을 측정하기 위하여 미생물연료전지의 음극부에 0.25 ml 첨가하였다 (Table 3.3.11).

최대전류값은 acetate에서 가장 높은 값을 나타냈으며, propionate, glucose, lactate, pyruvate, citrate, iso-butyrate, butyrate의 순서로 나타났다. 그러나 coulombic yield는 pyruvate에서 가장 높았으며, propionate, butyrate, acetate의 순으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 복잡한 구조의 연료는 제일 먼저 발효균에 의해 대사 되며, 발효산물이 전기화학적 활성을 가진 미생물에 의해 전기로 변환됨을 알 수 있다.

Table 3.3.11 The current generation from the microbial fuel cell fed by different substrates.

Substrates (mM)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)	Yield (%)
Lactate (10)	288	50.9	17.6
Pyruvate (5)	120	34.7	28.9
Acetate (10)	192	37.5	19.5
Glucose (10)	576	81.8	14.2
Propionate (10)	336	61.9	28.4
Citrate (5)	264	8.6	3.3
Iso-butyrate (5)	240	58.5	24.3
Butyrate (5)	240	51.1	21.3

(12) 전자수용체의 영향

앞선 연구결과들을 통해 몇몇의 호흡 저해제가 미생물 연료전지에서 전자의 흐름을 저해한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 전분가공폐수를 연료로 사용하는 연료전지를 운전할 때 전자수용체가 미치는 영향에 관한 실험을 수행하였다.

(가) Air

공기와 질소의 비를 조정하여 공기가 0에서 100%가 되도록 폐수에 주입하여 연료전지에 공급하였다. Fig. 3.3.30와 Table 3.3.12에서 볼 수 있듯이, 포화된 공기의 양이 증가할수록 생성되는 전류량이 감소하였다. 공기로 포화된 수용액에서 용존산소가 약 7-9 ppm정도 녹아있기 때문에(이 양은 연료전지에 첨가된 양과 비교해 볼 때 매우 적은 양이다), 쿨롱값이 감소된 이유는 첨가된 산소의 환원에 의한 것이라기 보다는 용해되어 있는 산소가 저해제로 작용하였기 때문인 것으로 사료된다.

(나) Nitrate

역시 전분폐수를 이용하여 nitrate가 미치는 영향에 관한 실험을 수행하였다. 연료전지에서 생성되는 쿨롱은 nitrate의 농도가 증가함에 따라 감소하였으며(Fig. 3.3.31) nitrate는 거의 소모되었다 (Data not shown). 이론적으로 nitrate의 완전산화에 필요한 COD의 양은 약 25.6 ppm이다. 본 실험에서 첨가된 COD의 양은 약 60 ppm이었으며 이론적인 쿨롱은 약 18 C

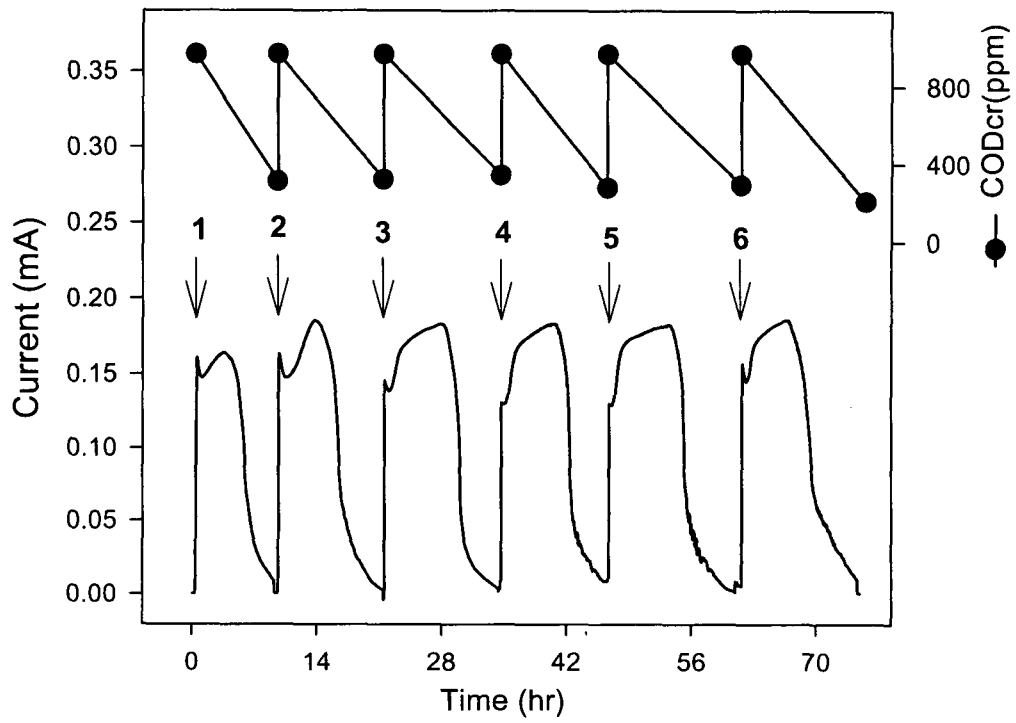


Fig. 3.3.30 Current generation and COD change in the microbial fuel cell fed by various air saturated wastewater (1-100%, 2-80%, 3-60%, 4-40%, 5-20%, 6-0%).

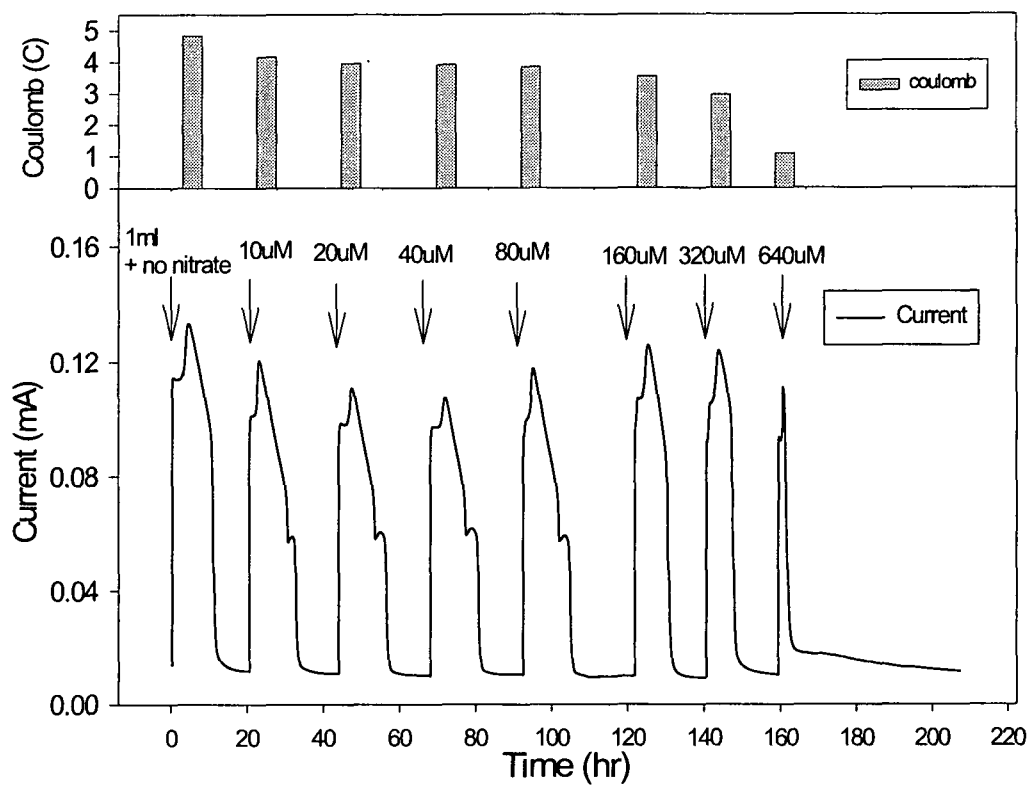


Fig. 3.3.31 The performance of the microbial fuel cell in the presence of nitrate.

이다. 그러나 미생물연료전지에서 실험결과 생성된 쿨롱량은 5 C이었으며, coulombic yield는 27 % 이었다. 전류생성율은 nitrate의 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

(다) Nitrite

Nitrite가 미치는 영향에 관한 비슷한 실험을 수행하였다. Fig. 3.3.32에서 볼 수 있듯이, nitrite가 저해시키는 효과는 nitrate보다 크게 나타났다. 최소 저해농도는 20 μ M이며, 약 640 μ M에서 전류생성이 급격하게 감소되었다. Nitrite는 활발한 저해작용을 일으키며 미생물에서 전극으로 전자를 전달하는 기작과 경쟁적으로 연결되어 있다. 감소된 전류는 nitrite를 첨가하지 않으면 즉시 회복된다 (data not shown).

Table 3.3.12 COD change and Coulombic yield of the microbial fuel cell fed by air saturated wastewater.

Air saturation (%)	Δ COD ¹ (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)	Yield (%)
100	610	183	3.31	1.80
80	624	187	4.35	2.32
60	654	196	5.26	2.68
40	674	202	5.38	2.66
20	687	206	5.59	2.71
0	728	218	5.92	2.72

1. The different COD between initial and final COD depend on saturation wastewater volume

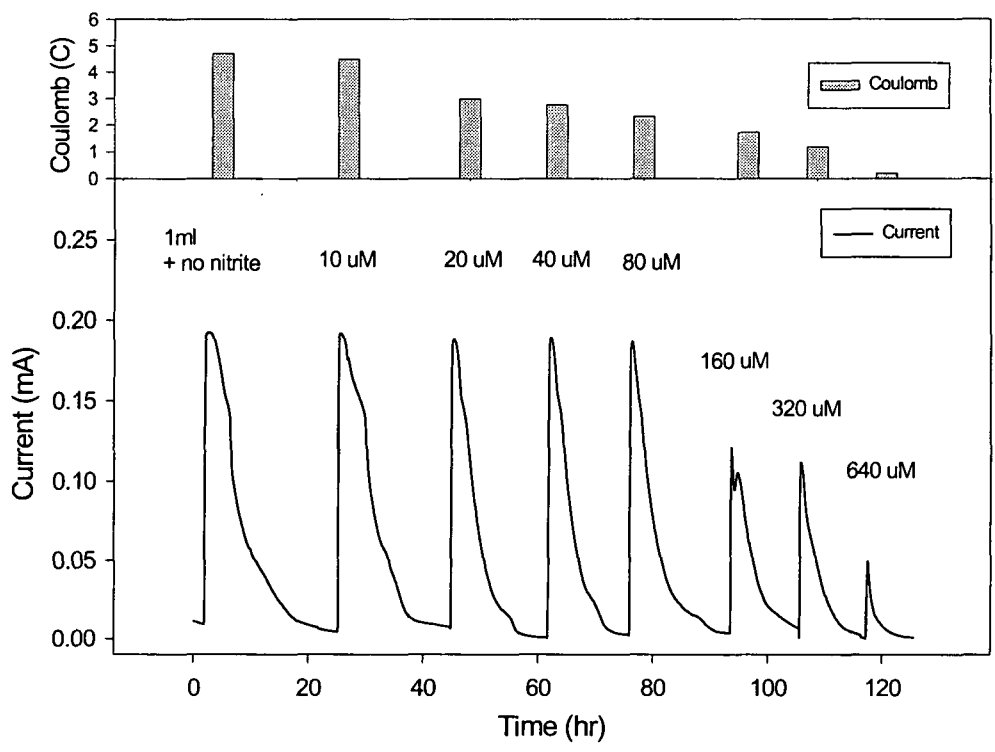


Fig. 3.3.32 The performance of the microbial fuel cell in the presence of nitrite.

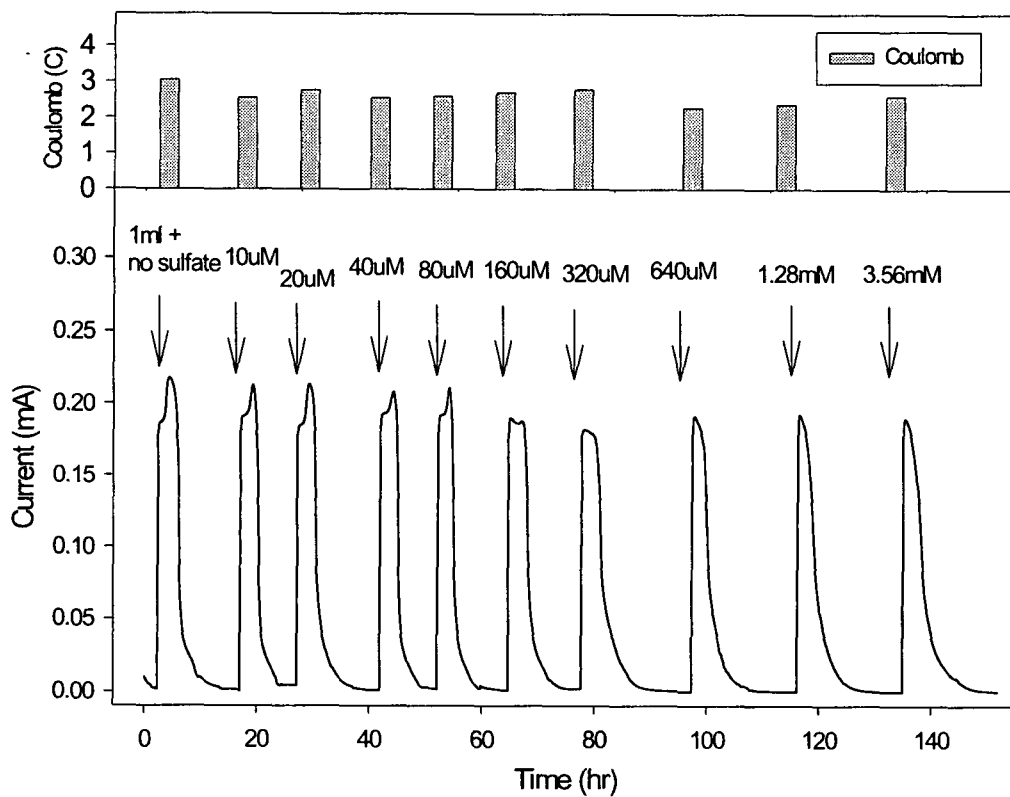


Fig. 3.3.33 The performance of the microbial fuel cell in the presence of sulfate.

(라) Sulfate

또 다른 전자수용체의 하나로 sulfate를 음극부에 주입하여 생성되는 전류를 측정하였다. 전류생성은 sulfate 농도에 의해 영향을 받지 않았으며 (Fig. 3.3.34) 잔존하는 sulfate는 첨가된 sulfate의 농도에 따라 증가하였다 (data not shown).

3-4 미생물 연료전지의 구성 최적화

1. 이론적 배경

미생물 연료전지는 그 음극에 전기 화학적 활성 미생물이 운전에 적합한 형태로 생육되어야 하며 향후에 적용될 수 있는 폐수처리 및 측정에 적절하게 사용될 수 있어야 하기 때문에 구조의 개선은 중요한 문제이다. 현재까지 실험에 사용된 미생물 연료전지는 Bennetto type (Bennetto, 1984)을 주로 사용하였으며 사용 시 다음과 같은 문제점이 발생되었다.

1. electrode-lead간의 높은 접촉저항 발생 할 수 있다.
2. 정사각형 구조로 인한 dead space의 발생 할 수 있다.
3. 고가의 전극재료 사용을 사용하기 때문에 운용비가 비싸다.
4. 상부가 open 되어 있으므로 외부 공기 (타균오염, 산화제)의 유입 가능성이 있다.
5. 면적이 증가된 전극을 사용할 수 없기 때문에 미생물 연료전지의 scale-up이 어렵다.

6. electrode-membrane의 간격이 넓기 때문에 음극부에서 발생한 수소이온의 막을 통한 전달이 용이하지 않아 미생물 연료전지의 효율이 감소 할 수 있다.

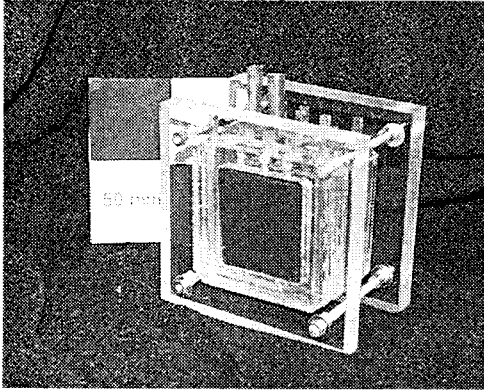
따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 다양한 형태의 미생물 연료전지를 구성하고 이들의 운전특성을 조사하였다. 또한 고가의 graphite felt electrode의 사용을 지양하고 spot welding등으로 쉽게 electrode-lead간의 접점을 생성 할 수 있는 porous nickel plate 및 collector를 사용한 packed-bed electrode를 사용한 미생물 연료전지를 제작하여 성능을 조사하였다.

2. 실험 재료 및 방법

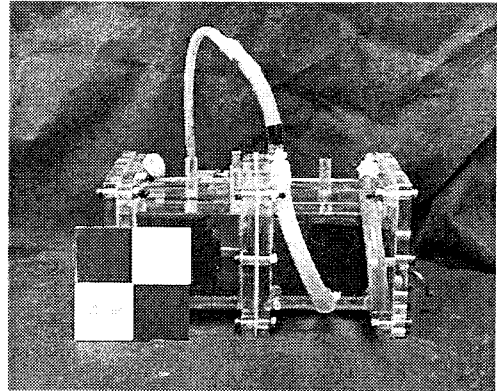
가. 연료전지의 형태 및 electrode-lead connection

전기 발생능력 및 연료-전기 변환율 (fuel-electricity conversion rate, FECY)가 높은 연료전지 시스템을 구성하기 위하여 다양한 형태의 연료전지 format를 구성하였다 (Fig. 3.4.1). 특히 electrode-lead간의 접촉저항을 줄이기 위하여 접착제를 쓴 Mk-1 형태에서 graphite 및 platinum collector를 사용한 Mk-2,3,4형태로 변경시켰다. 이때 Mk-2 type은 graphite load (1 × 8 cm)를 collector로 사용하였고 작업 용량은 750 ml이었다. 전극은 graphite granule (mean diameter 0.7 cm)을 음극부에 충전하여 사용하였다.

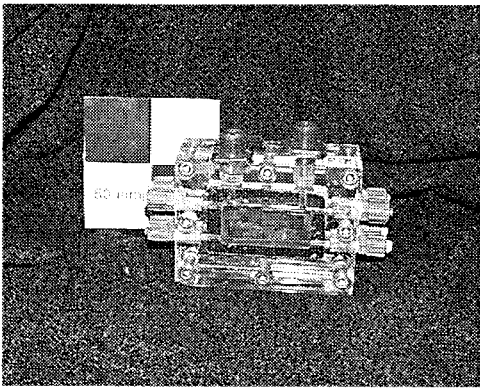
Mk-3 type의 경우는 Mk-2와 Mk-4사이의 과도기적 형태로서 최초로 백금선을 collector로 사용하였으며 간단한 구조성능 실험 뒤 바로 Mk-4 type으로 교체하였다. Mk-4는 정사각형 형태인 기존의



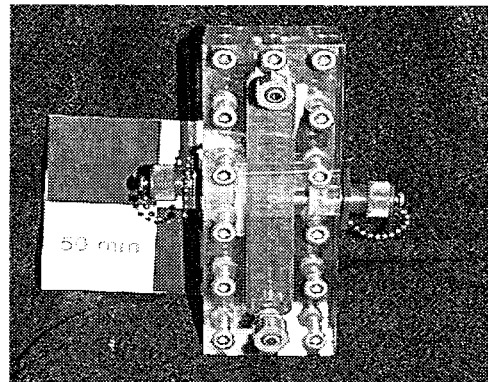
Mk 1



Mk 2



Mk3



Mk4

Fig. 3.4.1 The various microbial fuel cells used in this study.

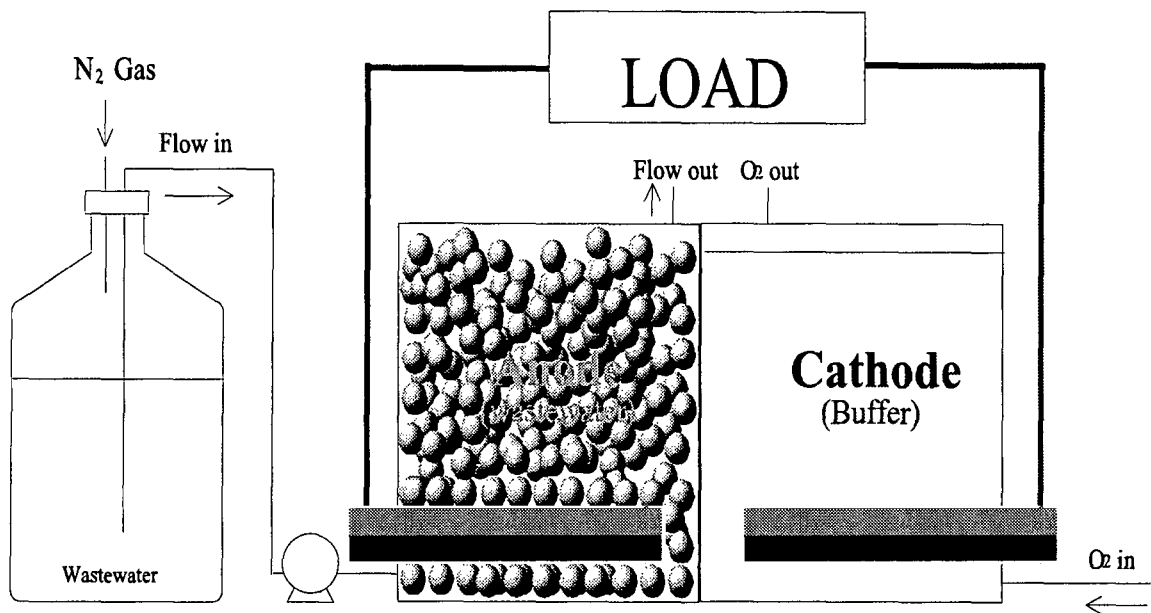


Fig. 3.4.2 The microbial fuel cell system configuration for the operation of the packed-bed electrode using the fuel cell typed Mk 2.

연료전지를 장시간 작동시켰을 때 발생하는 channelling 및 dead space의 발생을 최소화하기 위하여 직사각형의 형태로 연료전지를 구성한 형태이다. 작업용량은 17 ml 였으며 연료전지의 외형 크기는 65×65×170 mm 였다 (Mk-4에 대한 구체적인 기술은 다음절에서 하기로 한다).

나. packed-bed type의 graphite granule electrode의 사용

현재 실험에 사용중인 graphite felt electrode는 외산으로서 수입 가격이 비싸고 취급이 불편하기 때문에 대체품으로서 graphite granule (mean diameter 0.7 cm) 사용하였다. Graphite granule은 block (흑연 블록, 가람탄소, 안산소재) 탄소형태의 graphite를 마쇄 후 mesh를 사용, 직경 0.8-0.6cm 상태의 것을 골라서 수집한 후 사용하였다.

수집된 graphite granule은 산으로 수회 세척 후 buffer로 다시 세척 한 후 anode compartment에 투여하였다. Anode 부분을 membrane으로 덮고 후에 cathode 부분을 장착하였으며 이때의 void volume은 약 370 ml이었다.

전자의 collection을 위하여 사용한 collector는 앞 절에서 언급한 것과 마찬가지로 graphite load (1 × 8 cm, 2개)를 사용하였고 사용된 system configuration은 Fig.3.4.2에 표시하였다. 연료에 직접 질소를 공급하여 anaerobic condition을 만들었다.

실험은 pump를 사용하여 폐수를 fuel cell의 anode compartment에 연속적으로 첨가-배출하여 시작하였다. 초기 전압이 평형이 도달한 상태에서 저항을 연결하고 이에 따르는 전압의 변화를 전류로 환산하였다. 사용된 저항은 10000, 2000, 1000, 500, 100

ohm이었다. 1번 module을 중심으로 각 resistance applying step에서 폐수의 input와 output의 sample을 취하고 이의 CODcr을 측정하였다. 이때 사용된 폐수는 pH를 7.0으로 조절한 전분 가공공장 폐수 (삼양 제넥스, 인천 소재) 였으며 400 ml/day의 속도로 feeding 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Packed-bed electrode를 사용한 연료전지의 운전

Mk 2 형태의 연료전지를 이용한 packed-bed electrode의 collector간 저항을 확인한 결과 1-2 ohm 정도로 나타났다. 초기 운전 시 (open circuit 상태) 최대 전압은 약 0.52 V로 전압의 증감없이 Fig. 3.4.3에서 보는것처럼 안정적인 전압값을 나타내었다. 적절한 저항을 사용하여 전류를 방전시킨 결과 전압의 강하와 함께 전류가 발생하였으며 100 ohm의 저항을 사용하여 방전하였을 때 발생한 최대 전류값은 약 1.5 mA 였다. 그러나 이 실험에서 투입된 연료 (폐수)의 COD와 방출되는 COD의 차이는 전류의 발생에 비례하지 않고 거의 일정한 것으로 나타났다. 여기서 발생된 전류는 다량으로 사용된 graphite granule의 residual current에 의한 것으로 보인다. 지금까지 사용된 소형 연료전지에 비하여 전극의 부피가 크기 때문일 수도 있다. 또한 COD의 변화가 이루어지지 않음은 anode compartment내의 미생물 농도가 극히 낮기 때문에 폐수를 분해하지 못하는 것을 의미한다. 또한 연료전지의 운전 중 연료의 feeding에 있어서 channelling이 발생하는 관찰되었다. 이는 granule은 다공성이 아닌 거대 입자이며 cell의 설계 상 많은 aeration 및 feeding spots를

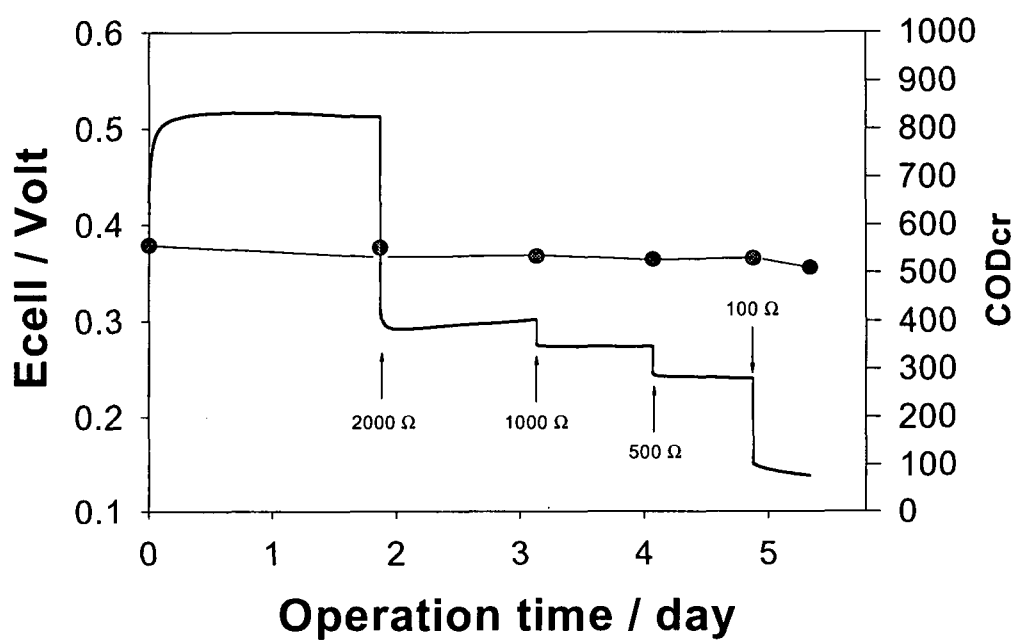


Fig. 3.4.3 The voltage and COD profiles of the microbial fuel cell (Mk-2) using the packed-bed electrode.

설치 할 수 없는 것에 기인한다. 또한 다량의 폐수를 상온에 보관하며 사용하였을 때 발생할 수 있는 부패 및 pH 변화, 적절하지 못한 속도의 feeding으로 인한 균체의 wash-out, 균체-전극간의 부착성 결여등 여러 가지 문제점이 발생한 것으로 보이기 때문에 전체적인 측면에서 보았을 때 graphite granule은 연료전지의 사용에 적절하지 않은 것으로 보인다.

나. electrode connection

Collector를 사용한 electrode configuration은 1 개월 이상 작동 시에도 우수한 전기적 성능을 나타내었다. 특히 전기적 저항의 증가는 작동초기의 1-2 ohm에서 크게 변하지 않은 안정적인 값을 나타내었다.

따라서 이 실험의 결과 channelling의 감소를 유도하고 collector를 적용할 수 있는 연료전지의 설계가 가능할 수 있었다. 즉 graphite felt를 사용한 수직형태의 연료전지를 구축하고 상향식으로 연료를 feeding하며 collector를 적용하여 장기적인 사용이 가능할 수 있도록 설계, 제작하여 (Mk-4, Fig.3.4.1) 계속 실험을 통하여 연료전지의 최적 조건을 확인하였다. 특히 다음절의 실험에서는 실험의 조건을 일정하게 하기 위하여 인공 폐수를 사용, 폐수의 농도에 따른 전류생산량 변화, 폐수의 공급속도에 따른 전류생산 변화, 저항의 변화에 따른 폐수 처리능력 및 전류 생산량 변화를 정량적으로 조사하여 새로 설계된 미생물 연료전지의 성능조사와 향후의 응용성 검토에 실험의 주목적을 두었다. 또한 새로 개발된 미생물 연료전지의 전기 화학적 특징을 조사하고 폐수의 처리능력도 조사하여 폐수를 이용, 전기 화학적 활성 미생물이 농화 배양된 미생물 연료전지가 우수한 성능으로 운전 수 있도록 유도하였다.

3-5 폐수의 특성에 따른 연료전지의 운전특성

효율적인 무매개체 생물연료전지를 개발하기 위하여 기질의 성분이 일정한 인공폐수를 사용하여 연료전지를 운전하고 보다 정량적인 data 습득을 통하여 보다 우수한 연료전지를 개발 할 수 있도록 실험을 수행하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 생물연료전지의 구성

본 실험에 사용된 생물연료전지의 구성은 Fig. 3.5.1과 같다. 연료전지 (65×65×170, mm)는 크게 음극부와 양극부 그리고 양이온 교환막으로 구성되어 있으며, 음극과 양극의 각 부피는 17 ml 이다. 전극으로는 graphite felt (두께 6mm, 면적 113.75 cm²)와 백금선 (길이 60 mm)을 사용하였으며, 백금선을 graphite felt에 밀착시켜 주었다. NAFION 450 양이온 교환막을 음극과 양극 사이에 넣어 주었으며 silicon plate를 이용하여 완전히 밀착시켜 주었다.

나. 생물연료전지 시스템의 구성

본 실험에 사용된 생물연료전지의 시스템의 구성도는 Fig. 3.5.2에 도시하였다. 질소로 bubbling된 폐수는 침전조를 거쳐 생물연료전지의 음극부로 주입되며, 양극부로는 수돗물과 함께 양극의 전압차를 유지시켜 주기 위하여 약 100 ml/min의 공기를 불어넣어 주었다. 음극부와 양극부는 적당한 저항을 걸어주어 음극부에서 폐수를 산화시키면서 생성된 전자가 양극부로 흐를 수 있도록 하여 주었으며, potentiostat (WMPG

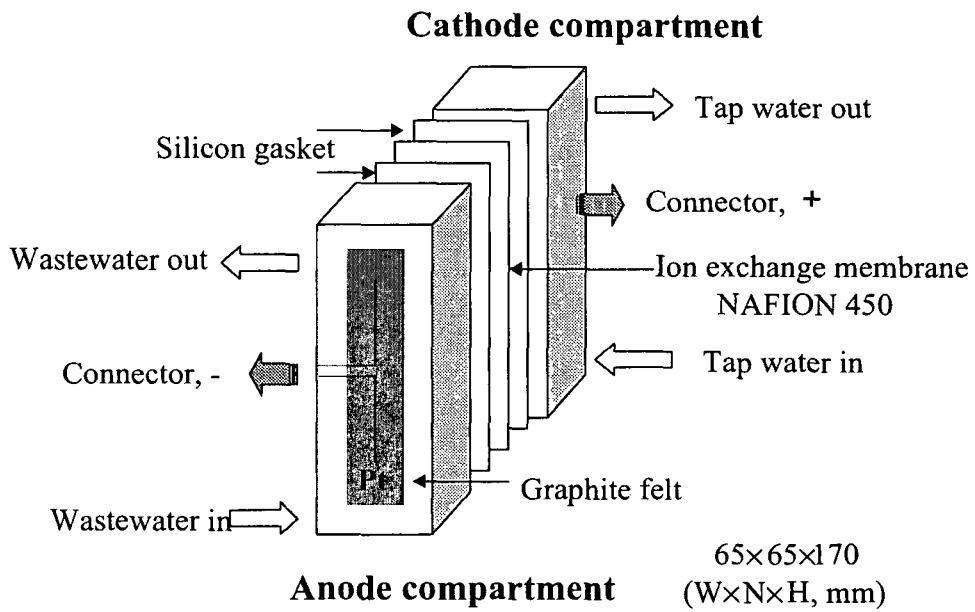
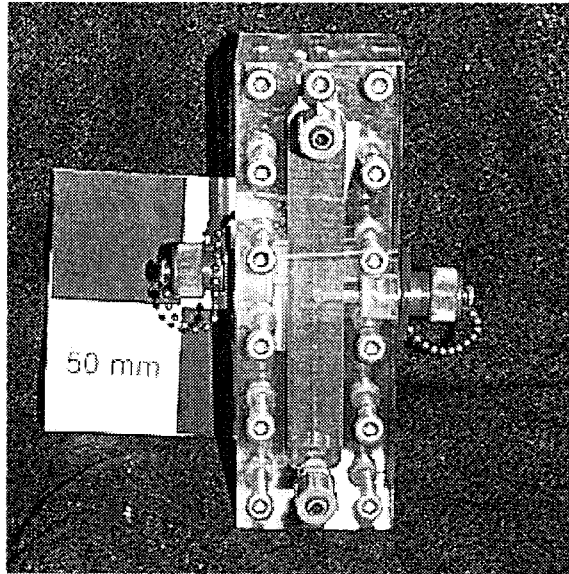


Fig. 3.5.1 Microbial fuel cell unit.

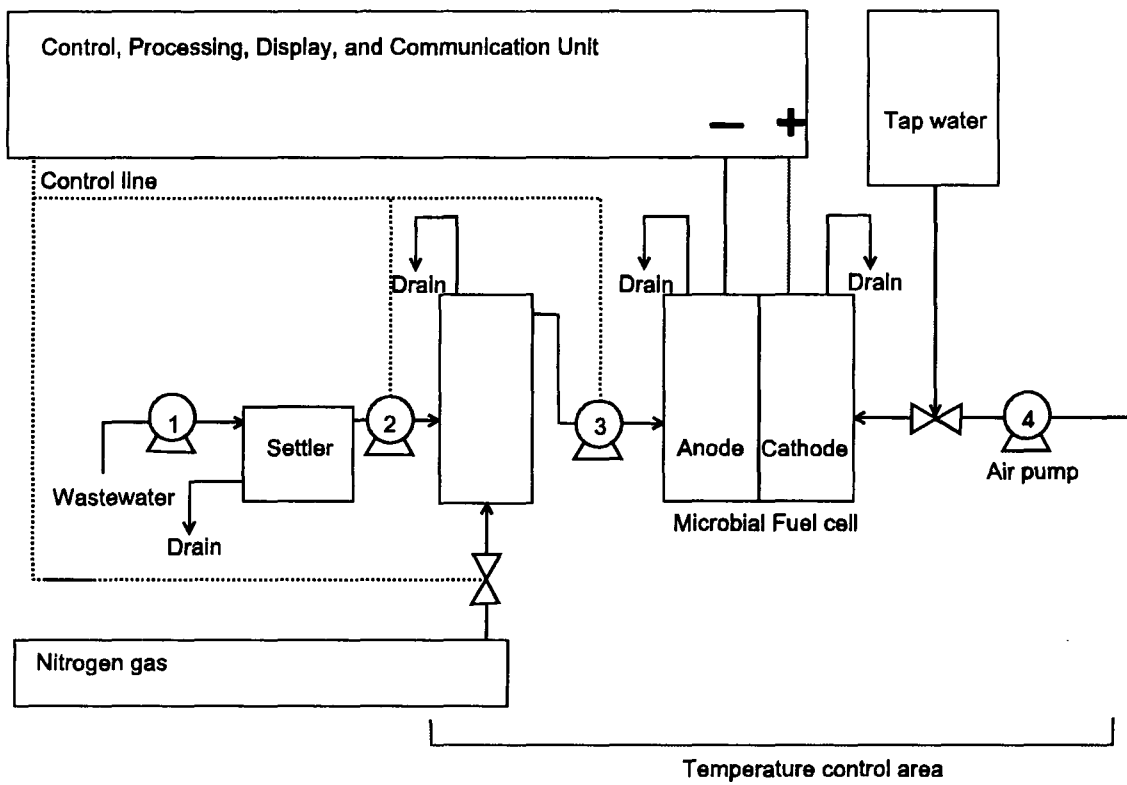


Fig. 3.5.2 Microbial fuel cell operation system.

Table 3.5.1 Composition of artificial wastewater.

Basal solution	
Components	Concentration (g/L)
KH ₂ PO ₄	15 as P
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 as N
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50
CaCl ₂	3.75
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.25
MnSO ₄ · H ₂ O	5.0
NaHCO ₃	105
trace mineral solution	10 ml/L
Trace mineral solution	
Components	Concentration (g/L)
NTA	1.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.17
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
ZnCl ₂	0.1
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
H ₃ BO ₃	0.01
Na · molybdate	0.01
Na ₂ SeO ₃	0.017
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.026
NaCl	1
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.1
Composition of artificial wastewater	
COD 2x mg/L = Basal solution + glucose x mg/L + glutamic acid mg/L	

1000, WonATech)를 이용하여 60 분마다 양극의 전압을 측정하였다. 생물연료전지의 온도는 30 °C로 조절하였다.

다. 인공폐수의 제조

본 실험에 사용된 인공폐수의 조성은 Table 3.5.1에 정리하였다. KH_2PO_4 , $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ 등을 포함하는 염용액에 glucose와 glutamic acid를 이용하여 유기물의 농도를 조절하여 주었으며, pH는 NaOH를 이용하여 6.8-7.2로 조절하여 주었다. 여기에 혐기적 미생물의 생육에 필요한 NTA, Fe, Mn, Co, Ca, Zn, Cu, Ni, W, Se 등을 포함하는 trace mineral solution을 10 ml/L 첨가하였다. 또한 폐수의 변질을 막기 위하여 모든 폐수는 121 °C에서 15분 동안 고압증기 멸균을 하여 사용하였다.

라. 농화배양

앞서 제작된 생물연료전지는 다음과 같은 방법으로 전기화학적 활성을 가진 미생물로 농화배양하였다. 생물연료전지의 양극부에는 수돗물과 함께 약 100 ml/min의 속도로 공기를 불어넣어 주었으며, 음극부에는 3.5의 다 항과 같은 방법으로 제조한 COD 100 ppm의 인공폐수를 멸균한 후 질소로 bubbling하여 주입하였다. 이와 함께 농화배양을 위하여 증량천 혐기성 소화조 슬러지를 10%(v/v) 접종하였다. 초기에는 저항을 무한대로 두다가 최대 전압에 이르르면 저항을 1000 Ω, 500 Ω, 100 Ω, 10 Ω으로 점차 낮추어 주었으며, 전류값이 거의 0 mA가 되었을 때 음극부에 인공폐수를 주입하여 주었다. 생물연료전지내에 유기물이 다 소모되면 다시 전류값은 거의 0으로 떨어지게 되며,

반복적으로 인공폐수를 주입하여 주면 인공폐수내의 유기물을 이용하면서 전기화학적 활성을 가지는 균들만으로 농화배양되게 된다.

마. 폐수 농도의 영향

Glucose와 glutamic acid를 조절하여 인공폐수의 COD 농도를 0, 10, 50, 230, 470 ppm으로 변화시켜 음극부에 약 1.25 ml/min의 속도로 30분 동안 주입시켜 주었다. 이 때 인공폐수의 pH는 NaOH를 이용하여 6.8-7.2로 조절하여 주었다. 양극부로는 같은 속도로 수돗물을 약 100 ml/min의 공기를 불어 넣어 주었다. 본 실험은 저항 500 Ω에서 수행하였다.

바. 폐수 공급속도의 영향

COD 100ppm의 인공폐수를 멸균하여 음극부로 주입되는 속도를 0.89, 1.34, 1.79, 2.24, 4.47 ml/min (각각 2, 3, 4, 5, 10 rpm)으로 변화시켜 주었다. 각 펌프속도를 고려하여 생물연료전지 부피의 약 6배가 치환되는 양인 105 ml이 주입되도록 하여 주었으며, 양극부에는 수돗물을 같은 속도와 양을 주입하고 공기를 약 100 ml/min으로 불어넣어 주었다. 본 실험은 저항 10 Ω에서 수행하였다.

사. 저항의 영향

COD 50ppm의 인공폐수를 멸균하여 약 0.95 ml/min의 속도로 30분

동안 음극부로 주입하여 주었으며, 양극부에는 같은 속도로 수돗물과 공기를 주입하여 주었다. 음극부와 양극부는 저항으로 연결시켜 주었는데, 이때의 저항을 1000 Ω, 500 Ω, 10 Ω으로 변화시켜 생성되는 전류량을 관찰하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 폐수의 농도에 따른 전류생산량 변화

인공폐수를 연료로 사용하고 전기화학적 활성이 있는 미생물로 농화배양된 생물연료전지를 이용하여 저항 500 Ω에서 음극부로 주입되는 인공폐수의 농도를 변화시켰을 때 생성되는 전류의 변화는 Fig. 3.5.3에 도시하였다. 생물연료전지의 음극부에 폐수를 주입하여 주면 전류값이 증가하여 최대 전류값에 도달한 후 유기물이 산화됨에 따라 전류값이 감소하는 경향을 보여주고 있다. 인공폐수의 농도가 높을수록 생성되는 최대 전류값이 컸지만 비례관계는 아니 었으며, Fig. 3.5.4에서도 알 수 있듯이 인공폐수의 농도와 생성되는 쿨롱량은 COD 농도 약 500 ppm까지 직선적으로 비례하였다. 그 직선식은 $y = 0.047 x + 0.907$ 이며, 상관계수 r^2 은 0.998이었다. 인공폐수 각 COD농도에서 생성되는 쿨롱량과 yield 값은 Table3.5.2에 정리하였다.

나. 폐수의 공급속도에 따른 전류생산 변화

COD 100 ppm의 인공폐수를 평균하여 음극부에 주입되는 속도를 0.89, 1.34, 1.79, 2.24, 4.47 ml/min으로 변화시켜 주었을 때 생성되는

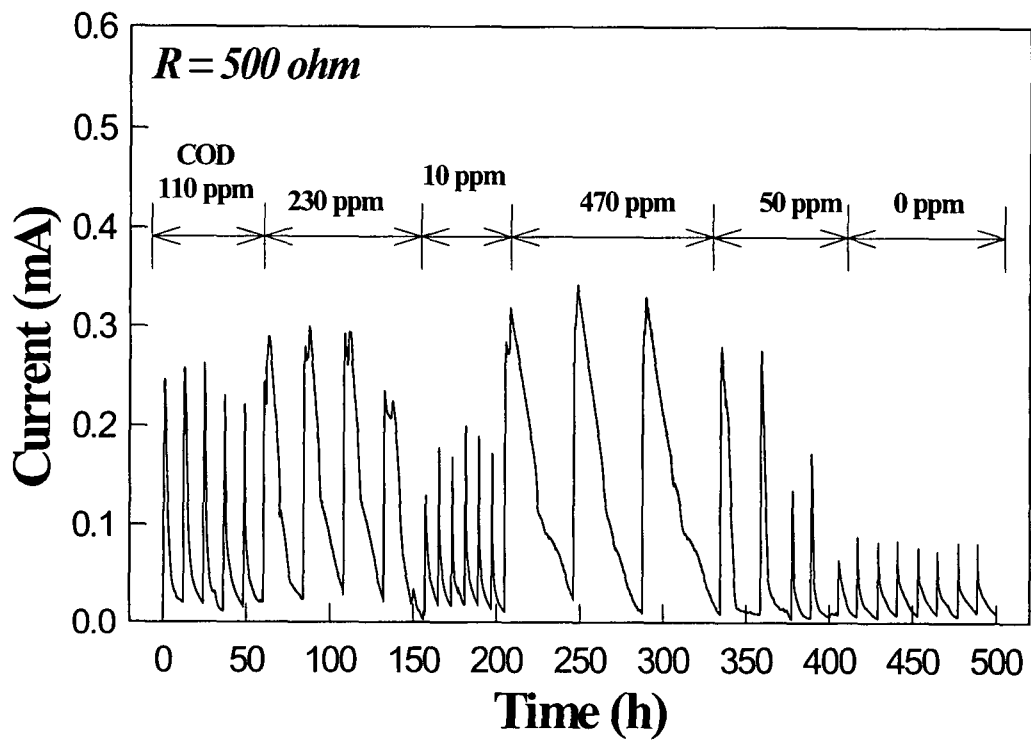


Fig. 3.5.3 Effects of concentration of artificial wastewater fed to the anode on the current generation from the microbial fuel cell.

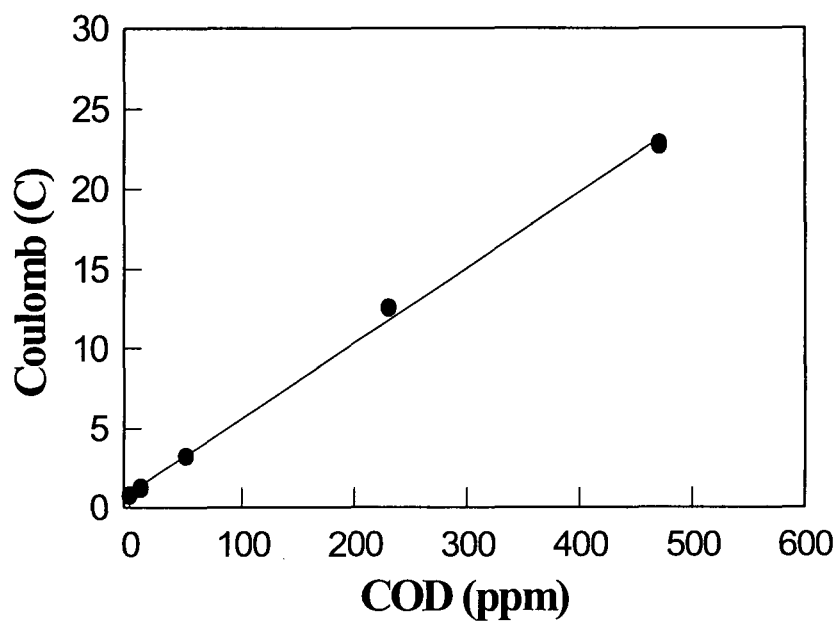


Fig. 3.5.4 The relationship between coulomb and fuel consumption (COD)

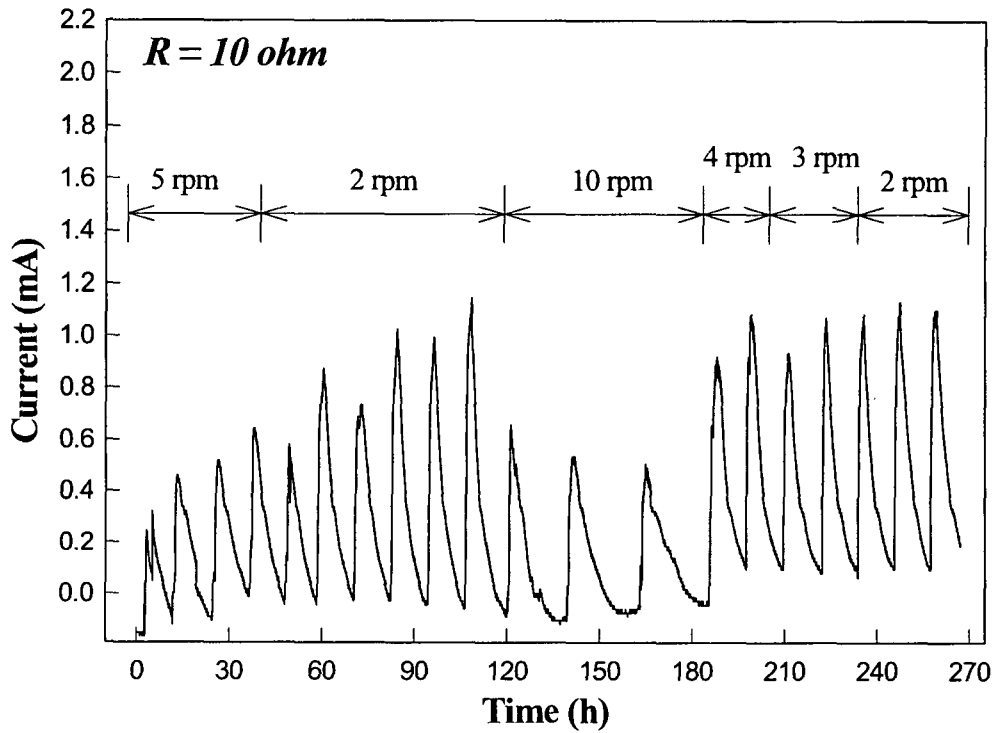


Fig. 3.5.5 Effect of feeding rate of artificial wastewater to the anode on current generation of microbial fuel cell (2 rpm-0.89 ml/min, 3 rpm-1.34 ml/min, 4 rpm-1.79 ml/min, 5 rpm-2.24 ml/min, 10 rpm-4.47 ml/min).

Table 3.5.2 The relationship between COD of the artificial wastewater fed to the anode part and current generation.

COD (ppm)	Theoretical Coulomb (C)	Experimental Coulomb (C)	Coulombic Yield ¹ (%)
0	0	0.10	-
10	2.04	1.27	62.3
50	10.2	3.67	36.0
230	46.92	12.58	26.8
470	95.88	23.09	24.1

1. Yield(%) = Theoretical Coulomb / Experimental Coulomb x 100

Table 3.5.3 The relationship between feeding rate of artificial wastewater to the anode part and current generation.

Feeding rate (ml/min)	Experimental Coulomb (C)	Coulombic Yield ¹ (%)
0.89	18.9	92.7
1.34	17.5	85.7
1.79	19.3	94.4
2.24	9.6	46.9
4.47	10.3	50.7

1. Yield(%) = Theoretical Coulomb / Experimental Coulomb x 100

※ Theoretical coulomb = 100 mg · COD/L × 17/1000 L × 12 C/mg · COD
= 20.4 C

전류량의 변화는 Fig. 3.5.5에 도시하였다. 또한 각 주입속도에서 생성되는 쿨롱량과 yiled값은 Table 3.5.3에 정리하였다. 폐수의 주입속도가 약 1.79 ml/min 이하에서는 약 18-20 C이 생성되었으며 약 90 %의 coulombic yield를 나타내었으나, 그 이상인 2.24 ml/min과 4.47 ml/min의 경우에는 약 10 C으로 생성되는 쿨롱값이 감소하였으며, coulombic yield도 약 50 % 이하의 값을 보였다. 또한 전류값이 증가하는 양상도 폐수의 주입속도에 따라 다른 경향을 보였는데, 1.79 ml/min 이하에서는 폐수 주입 시작 후 전류값이 서서히 증가하기 시작하여 최대 전류값에서 약 50-90 분 동안 지속된 후 서서히 전류값이 감소하였다. 그러나 특히 4.47 ml/min의 경우에는 폐수 공급 초기에는 전류가 증가하지 않는 양상을 나타내고 있다.

폐수 주입 속도가 빠르면 음극부에 형성된 미생물군집 중 bulk부분에 손상이 가해져 전류생성량이 적게 나타날 수 있다. Table 3.5.4는 2.24 ml/min으로 운전후에 바로 0.89 ml/min으로 운전한 경우와, 1.34 내지

Table 3.5.4 Coulomb and coulombic yield operating at rate of 0.89 ml/min depend on feeding rate.

	After operation at 2.24 ml/min	After operation at 1.34 and 1.79 ml/min
Mean current (mA)	0.40	0.48
Experimental coulomb (C)	14.3	20.4
Coulombic yield ¹ (%)	69.9	99.8

1. Yield(%) = Theoretical Coulomb / Experimental Coulomb x 100

※ Theoretical coulomb

= 100 mg · COD/L × 17/1000 L × 12 C/mg · COD =20.4C

1.79 ml/min으로 운전 후에 0.89 ml/min으로 운전하였을 때 생성되는 전류량과 쿨롱값 등을 비교한 표이다. 실험 결과, 같은 0.89 ml/min로 운전한 경우에도 2.24 ml/min으로 운전한 후에는 낮은 속도로 운전한 후와 비교해 보았을 때 쿨롱값과 coulombic yield가 각각 20 C에서 14 C으로, 99.8 %에서 69.9 %로 감소되었다.

다. 저항의 변화에 따른 폐수처리능 및 전류 생산 변화

COD 50 ppm의 인공폐수를 이용하여 저항을 500 Ω, 100 Ω, 10 Ω으로 변화시켜 주었을 때 생성되는 전류량의 변화는 Fig. 3.5.6에 도시하였으며, 각 저항별로 생성되는 평균 전류량과 쿨롱값 등은 Table 3.5.5에 정리하였다. 실험결과 저항이 커짐에 따라 평균 전류값은 감소하였으며, 이 때 생성되는 쿨롱값과 coulombic yield도 모두 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3.5.7).

Table 3.5.5 Relationship between the electric load and coulomb from the microbial fuel cell.

Resistance (Ω)	Mean current (mA)	Experimental Coulomb (C)	Coulombic Yield ¹ (%)
10	0.181	5.18	50.8
100	0.075	5.17	50.7
500	0.066	4.40	43.1

1. Yield(%) = Theoretical Coulomb / Experimental Coulomb x 100

※ Theoretical coulomb = 50 mg · COD/L × 17/1000 L × 12 C/mg · COD
= 10.2 C

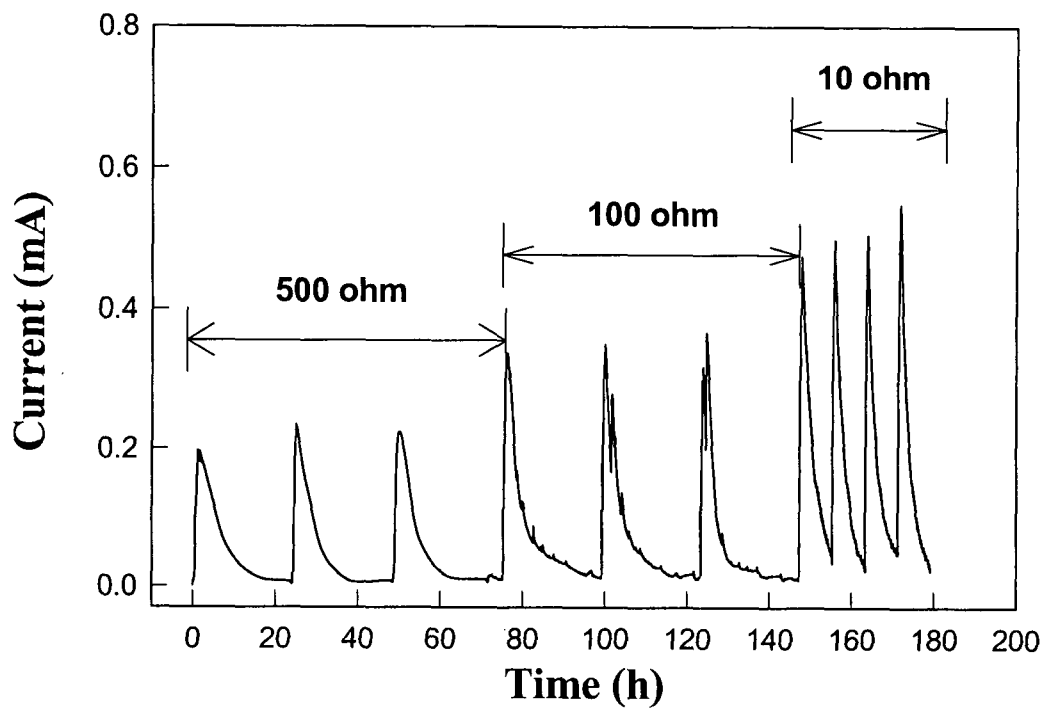


Fig. 3.5.6 The performance of the microbial fuel cell at different resistance.

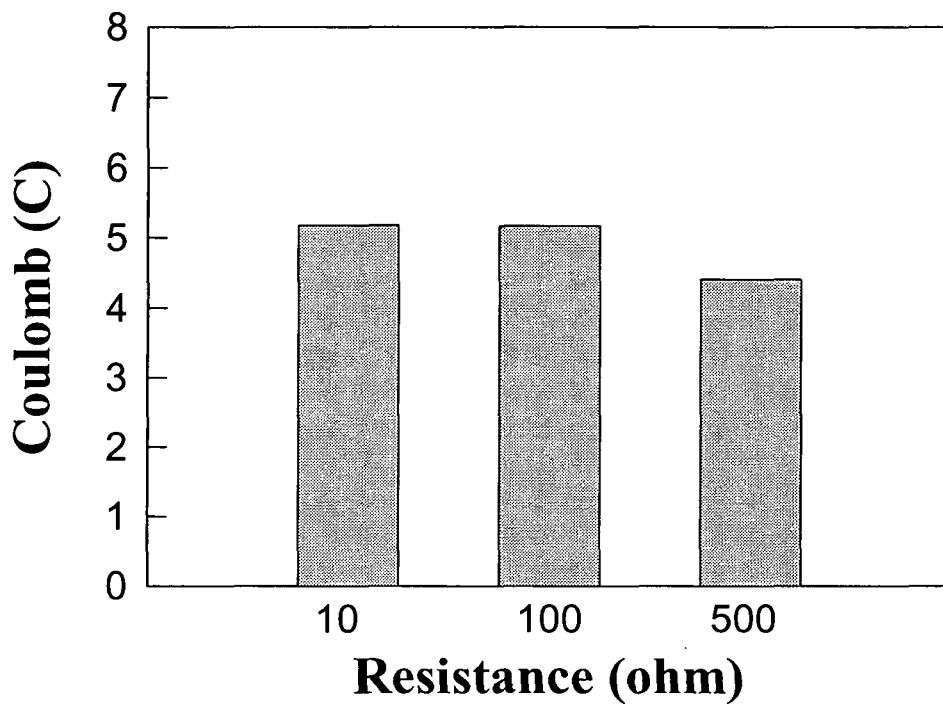


Fig. 3.5.7 The relationship between resistance and coulombic yield

3.6 연료전지 양극에서 농화된 전기화학적 활성 미생물의 검색

1. 이론적 배경

Fe(III)는 최종 전자 수용체로서 다양한 미생물에 의해 환원되고 몇몇 미생물의 발효 또는 광합성 대사에 전자 sink로서 사용되어 진다. 이러한 미생물은 유기산, 방향족 탄화수소, 수소 등을 산화시키면서 동시에 Fe(III)를 환원시킴으로써 성장에 필요한 에너지를 유지한다. 이러한 미생물들에는 *Proteobacteria*의 δ 하위종인 *Geobacteraceae* 科에 속하는데, 이러한 것들에는 *Geobacter* 種 (Lovely *et al.*, 1993; Caccavo *et al.*, 1996)과 통성 혐기성 미생물인 *Shewanella* 種 (Lovely *et al.*, 1989; Hyun *et al.*, 1999) 그리고 황산염 환원세균인 *Desulfotomaculum reducens* (Tebo and Ovraztsova, 1998)이 있다. 또한 혐기적인 조건하에서 Fe(III)를 환원시키는 발효세균이 보고되고 있으며, 양이온이 포도당대사 기간동안 전자 sink로서 작용한다 (Dobbin *et al.*, 1999). 다른 광합성 세균인 *Rhodobacter capsulatus*는 이화적으로 Fe(III)를 환원시킬 수 있으며, 혐기적인 광중속의 성장 조건하에서 산화환원 반응이 일어나는 동안 생리적으로 중요하게 Fe(III)가 보조 산화제로 작용한다고 생각되어 지고 있다 (Dobbin *et al.*, 1996).

Cyclic voltammetry는 cytochrome을 포함한 산화환원 단백질을 특성화하는데에 사용되어져 왔다 (Kazlauskaitė *et al.*, 1996). *S. putrefaciens*의 원래의 세포는 혐기적인 배양 조건에서 전기화학적으로 활성을 가지고 있다 (Kim *et al.*, 1999). 일반적으로 미생물 세포는 세포벽이 지방과 펩티도 클리칸과 같은 비전도적인 물질로 구성되어 있기 때문에 전기화학적으로 비활성이다. 그러나 매개체는 미생물 세포와

전극사이에서 전자를 전달해 줄 수 있다 (Kim and Kim, 1988; Kim *et al.*, 1990). 미생물 세포는 전기화학적인 활성을 증가시키기 위해 친유성의 전도 중합체에 의해 변형될 수 있다 (Park *et al.*, 1997). Fe(III) 환원 세균인 *Shewanella putrefaciens*는 외막에 cytochrome이 있다고 알려져 있다 (Myers and Myers, 1992). 외막의 cytochrome은 물에 녹지 않는 Fe(III)의 환원시키는데 관여한다고 믿어지고 있다.

*Clostridium butyricum*과 이와 관련된 유기체에 의한 포도당과 sugar의 혐기적 발효는 관심을 끄는데, 이는 많은 양의 수소 가스를 방출하기 때문이다. *Clostridium butyricum*에 의한 포도당의 연속적인 발효에 관한 데이터를 살펴보면, acetate, butyrate, CO₂, H₂보다는 다른 발효산물이 나타나고 있다 (Crabbendam, 1985). 그러나 포도당의 발효에 관한 최근의 결과는 lactate, formate, ethanol의 생산을 보고하고 있다 (Heyndrickx *et al.*, 1990). 이러한 결과들을 통해 *Clostridium butyricum* 발효가 발효조건과/또는 사용되는 종의 성질에 의존한다는 것이 명백하다.

이 연구의 목적은 미생물연료전지에서 분리한 Fe(III) 환원력과 전자화학적 활성을 가지는 *Clostridium butyricum* EG3의 특성에 대해서 연구하는 것이다. 성장과 대사에 불용성의 Fe(III)가 미치는 영향에 관한 연구 또한 수행하였다.

2. 실험재료 및 방법

가. 균주

본 연구에 사용된 균주는 전분 가공 폐수를 연료로 하여 농화시킨 무매개체 생물연료전지의 음극부에서 분리한 균주이다. 음극부 전극 1 cm²를 10 ml의 멸균된 혐기적 식염수에 넣고 잘 섞어 주었다. 부유물을

연속 희석하여 전자 공여체와 수용체로서 각각 5 mM의 포도당과 20 mM의 ferric citrate를 포함한 PBBM (phosphate buffered basal medium)에 도말하였다 (Schink and Bomar, 1991). 평판배지에 후광(halos)이 있는 colony가 형성되었는데, 이 균주들은 Fe(III) 환원력을 가지고 있다 (Coates et al., 1996). EG3는 이러한 후광을 가진 colony 중의 하나이다.

나. 배지와 배양조건

본 연구 전반에 걸쳐 혐기적인 기술이 이용되었다 (Hungate, 1969). 균주를 배양하고 유지시키는데 PBBM (phosphate buffered basal medium) 배지를 이용하였다 (Table 3.6.1). 배지는 butyl rubber stopper (Bello Glass Inc.)로 막은 serum vial (160 ml, Wheaton, Millville, NJ, USA)이나 pressure tube에서 혐기적으로 제조하였다. Agar (2%, Difco, Detroit, Michigan, USA)는 평판배지에서 단일 colony의 분리에 사용되었다. Glucose, acetate와 lactate는 각각 5-10 mM, 30 mM, 20 mM의 최종농도로 전자 공여체로 사용되었다. 무정형의 ferric oxyhydroxide (FeOOH, 0.1 g/10 ml)는 McLaughlin의 방법(McLaughlin, 1981)에 따라 준비하였으며, 전자 수용체로서 배지에 첨가되었다. Ferric citrate (5 g/L, FeC₆H₅O₇, Sigma Co.)는 agar plate에서 철환원세균을 배양하는 동안 수용성 Fe(III) 원으로서 사용되었다. 성장하는 동안의 최적 온도를 판단하기 위해, 분리균은 Fe(III)를 넣은 PBBM 배지와 넣지 않은 배지를 사용하여 serum vial에 접종하고 25, 30, 37, 55 °C의 수조에서 배양하였다. 또한 분리균의 성장에 가장 최적의 pH를 찾기 위해 배지의 pH를 acetate buffer (10 mM, for pH 5.5), phosphate buffer (10 mM, for pH 6.8)나 glycine-NaOH buffer (10 mM, for pH 8.0)로 조절하여 주었다. Disodium phosphate solution (1M) 1 ml을 acetate나

Table 3.6.1 The composition of phosphate-buffered basal medium (PBBM)

PBBM (1L, pH 7.2)	
1. Basal Medium (1000ml)	
Yeast extract	1 g
Ammonium chloride	1 g
Macro-mineral solution	100 ml
Trace mineral	10 ml
Vitamin solution	10 ml
Resazurin sol(0.02%, w/v)	1 ml
Phosphate buffer(1M, pH 7.2)	10 ml
Distilled water	869 ml
2. Macro-mineral solution(II)	
KH_2PO_4	0.3 g
NaCl	0.6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
3. Trace mineral solution(II)	
Nitrilotriacetic acid(NTA)	1.5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.17 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
ZnCl_2	0.1 g
$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
H_3BO_3	0.01 g
Sodium Molybdate	0.01 g
NaCl	1.0 g
Na_2SeO_3	0.017 g
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.026 g
4. Vitamin solution	
Biotin	2 mg
Folic acid	2 mg
B6(pyridoxine) HCl	10 mg
B1(thiamine) HCl	5 mg
B2 (riboflavin)	5 mg
Nicotinic acid (niacin)	5 mg
Pantothenic acid	5 mg
B12(cyanocobalamin) crystalline	1 mg
PA B	5 mg
Liponic acid	5 mg
5. Phosphate buffer (1M, pH 7.0, 1L)	
KH_2PO_4	136.09g
K_2HPO_4	358.14g

glycine-NaOH buffered media에 phosphorous를 공급하기 위해 첨가하였다
glycine-NaOH buffered media에 phosphorous를 공급하기 위해 첨가하였다
(Change *et al.*, 1997). 분리된 EG3의 대사특성에 관한 실험은 불용성의
FeOOH를 포함/포함하지 않는 glucose(5 mM)를 함유한 PBBM (100 ml)
배지에서 37 °C에서 수행하였다.

다. 형태학상의 특성

광학현미경 (Jenalumar, Carl Zeiss, Germany) 을 이용하여 gram
반응을 살펴보았다 (Harold, 1994). 그람 반응은 crystal violet과
iodine을 이용하여 실험하였으며 세포벽의 구조에 따라 다른 반응을
보인다 (Hanson, 1994). PBBM이나 LB 배지에서 12-24시간 동안 성장한
균을 crystal violet과 iodine으로 착색시킨 후, 에탄올로 씻어주었다.
그람양성 세균과 음성세균의 차이를 확연히 보기 위해 safranin O로
대조 염색하였다. 염색된 균을 광학현미경 (Jenalumar, Carl Zeiss Jena
GmbH, Jena, Germany)을 이용하여 관찰하였으며, 이 때 대조균으로 그람
양성균은 *Bacillus* sp.을, 그람 음성균으로는 *E. coli*를 사용하였다.
Nonstaining 방법 (Buck, 1982) 또한 그람 반응을 살펴보기 위해
부가적으로 수행하였다. 포자형성과 운동성에 관한 실험은 표준방법으로
수행하였다 (Harold, 1994). 주사 전자현미경 (scanning electron
microscopy)으로 관찰하기 위해, 균을 nucleopore filter (pore size
0.2 μ m, Whatman Co., Maidstone, England)로 수집하였다. 시료를 2mM
MgCl₂를 포함한 100mM HEPES buffer (pH 6.8)에서 1시간동안 1% OsO₄에서
2시간 동안 2% glutaraldehyde로 고정시켰다. 고정된 검체는 ethanol과
iso-amyl acetate로 탈수시켰다. 검체를 금으로 코팅 (Eiko IB-3 ion
coater, Tokyo, Japan)한 후에 S-4200 FE-SEM (Hitachi, Tokyo, Japan)을

이용하여 주사전자현미경사진을 찍었다 (Chang *et al.*, 1997). 분리균의 TEM 사진을 찍기 위해 단면을 준비하였다. 균들은 실온에서 2시간동안 glutaraldehyde로 고정시키고 원심분리 후 HEPES buffer로 2번 씻어주고 다시 원심분리(10,000 x g, for 3 minutes)한 후, 다시 실온에서 2시간동안 1% (w/v) OsO₄ 에 고정시켰다. HEPES buffer로 두 번 더 씻어주고 ethanol로 탈수시킨 후에, 균체의 pellet을 알콜로 닦은 유리 slide에 두었다. Embed된 cube를 35시간동안 60 °C 배양기에서 polymerization을 위해 Epon-araldite 혼합체로 섞어 주었다. 단면 (Ultramicrotome, Sorvall MT-II, Wilmington, Delaware, U.S.A)을 잘라 uranyl acetate와 lead citrate로 각각 15분, 10분 동안 염색하였다. TEM장치 (JEM 100cx-II, Tokyo, Japan)는 80 keV에서 운전되었다.

라. 생화학적인 특성

(1) 전분과 esculin 가수분해

115 °C에서 20분 동안 멸균하기 전에 전분 0.1 %(w/v)를 함유한 PY 배지 (per 1 L of distilled water: yeast extract, 10 g; Proteose peptone No.3, 5 g; Trypticase peptone 5 g; Trace mineral, 40 ml)를 준비하였다. PBBM 배지에서 자란 균을 5 %(v/v)에 접종하고 37 °C에서 7일 동안 배양하였다. 수용액상의 Lugol's iodine (I₂ 10g/L, KI 20g/L) 2-3방울을 배양 튜브에 첨가하였다.

115 °C에서 20분 동안 멸균하기 전에 0.25 %(w/v) esculin을 함유한 PY 배지를 준비하였다. 배지는 5 %(v/v)에 접종한 후 37 °C에서 7일 동안 배양하였다. 1 %(w/v) ferric ammonium citrate 용액 두 방울을 배양액에 첨가하였다.

(2) 지방과 젤라틴 가수분해

미생물이 성장하는 동안 미생물 주변의 clear area나 lipolysis 영역의 존재를 확인하기 위해 tributyrin agar plate에서 배양하였다.

(3) 황화수소의 생산

황화수소의 생산을 확인하기 위한 배지 (SIM medium, 72 g/900 ml; yeast extract, 8 g; trace mineral solution 100 ml)를 준비하여 115 °C에서 20분 동안 멸균하였다. PBBM 배지에서 자란 균을 접종하여 7일 동안 배양하여 검정색 침전을 통해 황화수소의 생산을 판단하였다.

(4) Indole 생산

멸균 전에 Indole-Nitrate dehydrated medium (25 g/L, BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, U.S.A.) 배지를 준비하였다. PBBM 배지에서 자란 균을 튜브에 접종하고 37 °C에서 7일 동안 배양하였다. Xylene과 Kovac's reagent (-dimethylaminobenzaldehyde; 5 g, iso-amyl alcohol; 75 ml, HCl; 25 ml) 각각 두 방울을 튜브에 첨가하고 섞어 주었다. Xylene층의 분홍색을 통해 indole의 생산을 판단하였다. Indole-Nitrate medium (BBL)에서 배양된 배양액에 solution A (sulfanillic acid; 8 g, 5 N acetic acid; 1000 ml) 1 ml과 solution B

(dimethyl--naphthylamine: 12 ml, 5 N acetic acid: 1000 ml) 0.5 ml을 첨가하였다. 붉은 색을 통해 nitrate의 생산을 판단하였다.

(5) Lecithinase 활성

Stain을 egg yolk agar plate에 streaking 하였다. 양성반응은 colony 주변의 배지사이에서 불투명한 대를 형성하게 된다.

(6) Oxidase and Catalase Test

Colony를 취하여 Dryslide Oxidase kit (Becton Dickinson, USA)에 두었다. Colony가 푸른색으로 착색되면 oxidase 양성임을 나타낸다. Catalase test를 위해 Spot kit(Difco)가 사용되었으며, 양성반응은 가스의 생성에 의해 알 수 있다.

(7) Methyl Red and Voges-Proskauer (MR-VP)Tests

VP test를 위해 균체는 FeOOH를 포함한 MR-VP medium에서 배양되었으며 fo Barrit's reagent A solution (Alpha-naphthol 5g, absolute ethylalcohol 100ml) 0.6 ml을 첨가하였다. 1 분이 지난 후에 B solution(KOH 40g/100ml d.w) 0.2 ml을 첨가해 주었다.

(8) Carbohydrates Utilization

기질 이용도를 실험하기 위해 PBBM이 사용되었으며, 여기에 5%(w/v)의 기질 (Amygdalin, Cellobiose, Fructose, Galactose, Gluconate, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Melibiose, Raffinose, Ramnose, Ribose, Sorbitol, Starch, Sucrose, Trehalose)을 첨가해 주었다. 37 °C에서 일주일동안 배양한 후에 pH와 OD를 측정하였다. 멸균에 의해 쉽게 분해되기 때문에 arabinose, xylose, rhamnose, ribose, mannose, fructose, maltose의 배양에는 filter-sterilised carbohydrate solution을 첨가해 주었다.

마. Whole Cell 의 지방산 분석

약간 변형된 Metcalfe에 따라 fatty acids의 methyl esters (FAME)를 준비하였다 (Metcalfe *et al*, 1966). 가수분해와 메틸화를 거친 후에 지방산은 MIDI 미생물 동정 시스템 (MIDI, Inc., Newark, Del, USA)을 이용하여 fatty acid methyl esters로 분석된다. FAMES는 FID가 장착된 HP 5898 II gas chromatograph (split mode injections with a 30m silica capillary column (BV-225, J&W Sc., Inc., folsom,CA, USA))로 분석하였다. Carrier gas (H₂)의 유속은 50 ml/min로 하여 주었으며, 칼럼의 온도는 초기 140 °C에서 5 °C/min 씩 증가하여 225 °C까지 오르는 승온 조건으로 하였다. Injector와 detector의 온도는 각각 225 °C, 250 °C 로 하였다. 시판되는 지방산(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)의 체류시간과 비교하여 시료의 지방산을 분류하였다.

바. 16S rDNA gene sequencing과 분석

본 연구에서 조사된 분리균에서 추출한 genomic DNA를 16S rDNA의 PCR mediated amplification를 위해 사용되었다 (Yoon *et al.*, 1996). 정확된 PCR 생산물은 복제되었다. 16S rDNA insert는 재증폭되고 sequence되었으며 (Rainey *et al.*, 1996), 부분적인 sequence 반응 혼합물은 model 373A automatic DNA sequencer (Perkin Elmar, USA)을 이용하여 electrophoresis 하였다.

사. Cyclic Voltammogram

Phosphate buffer (50mM, pH 7.0) with 0.1M NaCl로 씻어주고 미생물 세포를 suspend시켰다 (Kim *et al.*, 1999). 부유된 세포의 cyclic voltammogram는 personal computer와 연결된 (software : supplied by the manufacture) potentiostat (CV-50W, BAS, West Lafayette, IN, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 작업전극으로는 직경 2 mm의 glassy carbon 전극 (MF-2012, BAS)을, 대조전극으로 백금 (MW-4130, BAS)을 그리고 기준전극으로는 Ag/AgCl (MF-2052, BAS)를 사용하였으며 전기화학적 세균의 working volume은 5 ml으로 하였다. Scan rate는 100 mVs⁻¹로 하였다.

아. 미생물연료전지의 운전

연료전지는 음극부와 양극부로 나누어져 있으며 (Kim *et al.*, 1999), 크기는 50×50×7 mm로 부피는 25 ml이다. 미생물연료전지의 음극과 양극

모두에 graphite felt (50x50x3mm in dimension, GF series, Electrosynthesis, Amherst, NY, USA)를 넣어주고 두 극은 양이온 교환막 (Neosepta CM-1, Tokuyama soda co., LTD, Japan)으로 분리시켰다. 준비된 미생물 연료전지는 운전하기 전에 멸균하였다. 음극부와 양극부를 혐기적/호기적 조건으로 유지시키기 위해, 각각 질소와 공기를 10 ml/min의 유속으로 불어 넣어 주었다. 질소 가스에 포함된 약간의 산소는 350 °C에서 순수 구리로 충전된 furnace를 사용하여 제거시켜 주었다. 50mM phosphate buffer (pH 6.8)에 suspension된 미생물 세포 (0.32g/L)는 첨가하고 음극부에 10 mM glucose를 넣어주어 최종 세포농도가 660 nm에서 OD가 0.04가 되도록 하여 주었다. 전압의 차이는 multichannel scanner (Model 2000-SCAN, Keithley)가 연결된 digital voltmeter (Model 2000, Keithley, Cleveland, USA)를 이용하여 기록하였다. 전류는 1 kΩ에서 측정된 cell의 전압으로 측정되었으며, data는 IEEE488 input/output system (Model KPC-488.2AT, Keithley)이 장착되고 cable (Model CTMGPIB-1, Keithley)로 연결된 IBM compatible personal computer에 2분마다 기록되었다.

자. 분석

Fe(III) 환원은 HCl-extractable Fe(II)의 ferrozine시험으로 분광광도계로 모니터링하였다 (Lovley, 1986). 표준 Fe(II)물질로서 ferrous ethylenediammonium sulfate tetrahydrate (Fluka Chemie AG, Switzerland)를 사용하였다. 단백질은 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용하여 Biuret method (Herbert *et al.*, 1971)로 측정하였다. 포도당은 PGO-enzymatic glucose kit (Young-dong Pharm. Co., Korea)으로 분석하였다. 유기산은 Aminex HPX-87H column (Bio-Rad)가 장착된 HPLC

(Young-Lin co., Korea)를 이용하여 215 nm에서 분석하였다 (Chat *et al.*, 1996). 이산화탄소와 수소는 열전도 detector (TCD)가 장착된 GC (Varian 3400) 로 분석하였다 (Chang *et al.*, 1997).

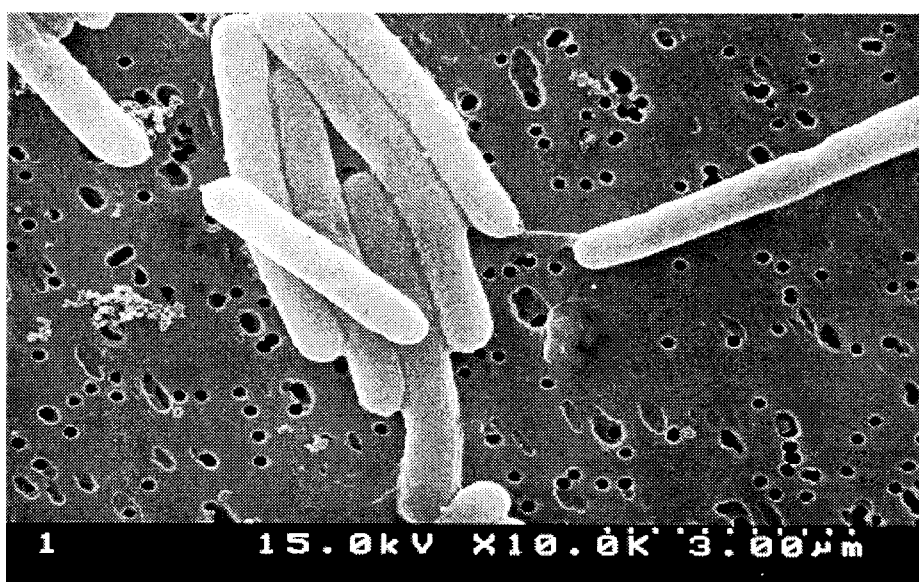
3. 결과 및 고찰

가. 농화와 분리

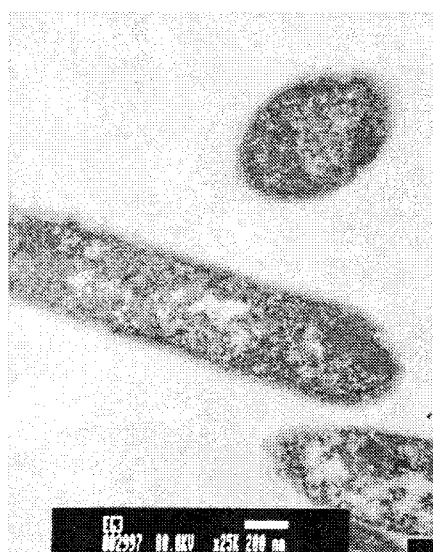
Glucose를 함유한 배지를 이용하여 3차례 transfer한 후에 미생물을 glucose/iron(III) pyrophosphate PBBM agar plate에 옮겨주었다. Fe(III)을 환원시키는 colony들은 녹색을 띤 iron(III) pyrophosphate 배지에서 colony 주변으로 투명한 대를 형성하면서 성장하기 때문에 쉽게 알아볼 수 있었다 (Coates *et al.*, 1996). Iron(III) pyrophosphate 배지에서 성장한 colony는 전형적으로 직경이 5 mm 이하였다. Colony는 노란색이며 반구형이고 Fe(II) mineral로 coating 되어 있는 것처럼 보였으며, *Geobacter* species의 경우와 유사하였다 (Coates *et al.*, 1996). Fe(III) 환원 colony를 선택하여 전자공여체와 수용체로서 각각 glucose와 불용성의 FeOOH를 함유한 PBBM에 transfer시켜 주었다. 몇 개의 균주가 Fe(III) 환원 활성 실험을 통해 분리되었으며, 이러한 분리균들 중의 하나인 EG3의 특성에 대해 깊게 연구하였다.

나. 형태학적·생리학적 특성

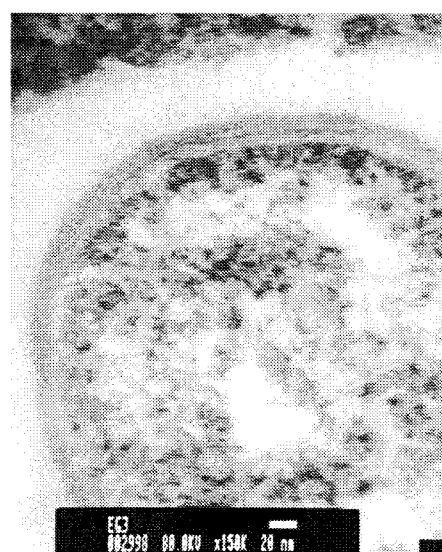
EG3균들을 염색한 결과 그람 반응에서 다양한 결과를 나타냈지만, nonstaining method를 통해 분리균은 그람 양성세균임을 밝혀냈다.



(A)



(B)



(C)

Fig 3.6.1 Electron micrographs showing the cell morphology of isolate strain *Clostridium butyricum* EG3. A) SEM image. The Cells were embed on nucleophore membrane (pore size 0.2 μ m, Whatman Co.). Observation was showed straight rod-shaped, 2.8-3.0 μ m long, 0.5-0.6 μ mwide. B,C) Thin section of EG3 showing the cell wall structure of Gram positive bacteria.

Table 3.6.2 Physiological characteristics of the isolate EG3

Physiological characteristics	Isolate EG3	<i>C. butyricum</i> ^a
Growth type :	Strict anaerobe	Strict anaerobe
Oxidase test	-	-
Catalase test	-	-
Growth with NaCl :		
3% NaCl	+	NT
4% NaCl	-	NT
6.5% NaCl	-	NT
Metyl red test	+	NT
Voges-Proskauer test	-	NT
H ₂ S production	-	-
Rezasrin reduction	+	+
Indole produced	-	-
Lecithinase produced	-	-
Lipase produced	-	-
Starch hydrolyzed	+	+
Gelatin hydrolyzed	-	-
Esculin hydrolyzed	+	+

a : Bergey's manual of systematic bacteriology,

Symbols : -, negative reaction, : +, positive reaction, : NT, not test

Table 3.6.3 Utilization of carbohydrates and related carbon compounds by the isolate EG3 and *Clostridium butyricum*

Carbon source	Isolate EG3	<i>C. butyricum</i> ^a
Amygdalin	+	+ -
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	-	- +
Mannose	-	+
Melibiose	-	+
Raffinose	+	+
Ramnose	-	-
Ribose	+	+
Sorbitol	-	-
Starch	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Glycerol	+	NT
Gluconate	-	NT

^aThe symbols of *Clostridium butyricum* were cited Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2. Symbols: -, negative reaction, : +, positive reaction, : NT, not test

길이가 2.5-3.0 μm 이며, 두께가 0.5-0.8 μm 인 막대형의 균이다 (Fig. 3.6.1). 편모는 발견되지 않았다. 내생포자는 고정상에서 쉽게 발견되었다. Esculin과 전분은 가수분해되지만, 젤라틴은 가수분해되지 않았으며, indole, lecithinase, lipase는 생성되지 않았다. 그리고 다른 생리화학적 특성은 Table 3.6.2에 정리하였다. 분리균 EG3는 amygdalin, cellobiose, fructose, galactose, glycin, lactose, maltose, raffinose, ribose, starch, sucrose, trehalose를 함유한 PBBM 배지에서 성장하였지만, mannitol, mannse, melibious, sorbitol 은 이용하지 않았다 (Table 3.6.3).

다. 성장특성

성장을 위해 혐기적 조건이 요구되어 진다. pH를 5.5에서 7.4로 조절하여 주었을 때 성장을 위한 최적의 pH는 6.8-7.4로 나타났다.

성장 온도는 15-42 $^{\circ}\text{C}$ 이며, 최적 성장 온도는 37 $^{\circ}\text{C}$ 였다 (Fig. 3.6.2). *C. butyricum* EG3에서 Fe(III) 환원의 역할을 분명히 하기 위해, Fe(III) 환원과 미생물의 성장을 5 mM의 glucose를 포함하는 PBBM 배지에 FeOOH를 포함한 경우와 포함하지 않은 경우의 성장을 12시간동안 비교하였다 (Fig. 3.6.3). FeOOH를 포함하여 배양한 경우 미생물의 단백질이 Fe(III)이 없는 경우에 비해 월등히 높게 나타났다. 혐기적 회분식 배양에서 glucose 소모는 10시간이 지난 후에 남아있는 0.5 mM보다 적게 나타났다. 미생물이 성장하는 동안 Fe(III)의 환원은 증가하였다. Fe(III) 환원율의 뚜렷한 증가는 배양 72시간에 나타났으며, 이것은 단백질 합성에서 증가에 상응하는 증가를 보이지는 않았다 (data not shown). pH는 Fe(III)의 첨가와는 무관하게 배양하는 동안 약 5.0으로 감소하였다.

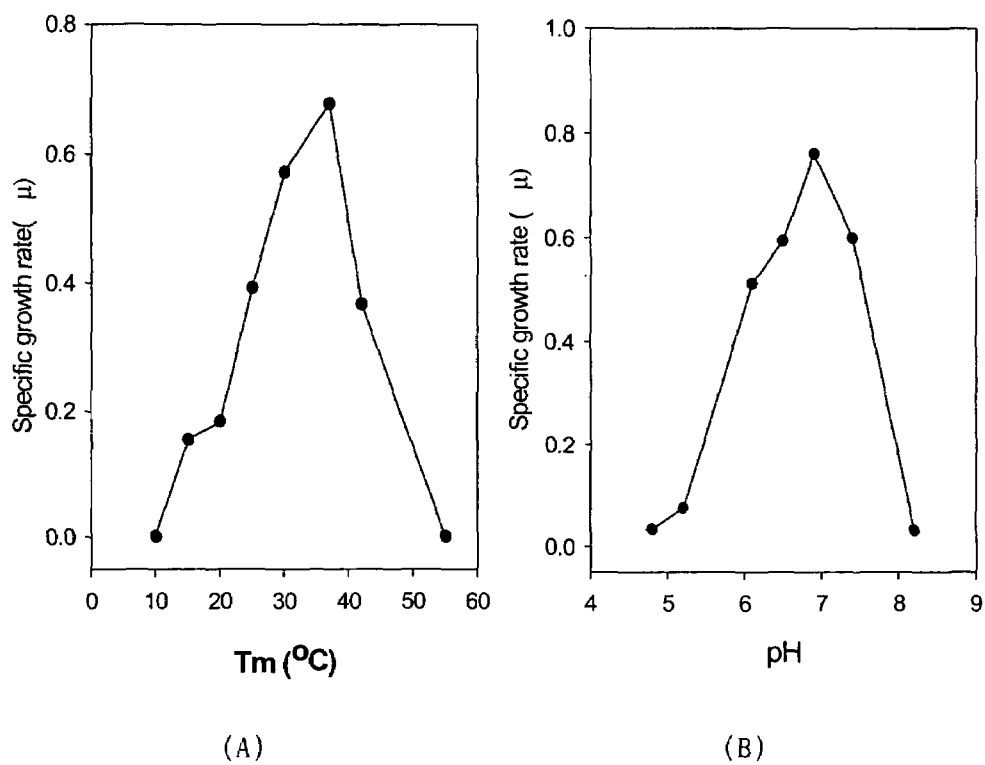
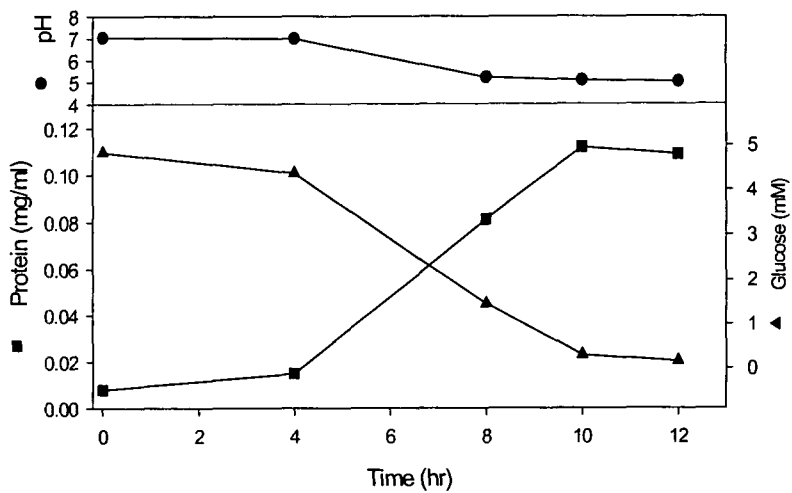
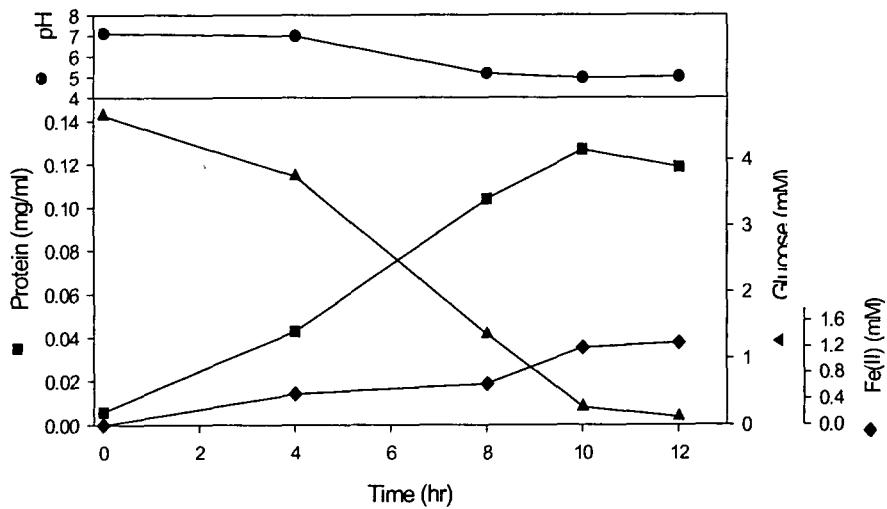


Fig. 3.6.2 Effect of temperature (A) and pH (B) on the growth of strain EG3



(A)



(B)

Fig. 3.6.3 Growth characteristics of isolate EG3 (A) Culture on 5mM Glucose. Symbols pH : ●, Glucose : ▲, Protein : ■ . (B) Culture on Glucose/FeOOH. Symbols - pH : ●, Glucose : ▲, Protein: ■, Fe(II): ◆. These results are averages of three cultures.

Table 3.6.4 The cellular acid compositions of isolate EG3

Component	Fatty acids(area %) in profile
11:0 FAME	1.26
12:0 FAME	0.43
14:0 FAME	6.49
14:0 DMA	2.84
15:0 ISO DMA	1.16
16:1 CIS 7 FAME	4.87
16:1 CIS 9 FAME	3.26
16:0 FAME	31.13
16:1 CIS 9 DMA	1.87
16:0 DMA	1.44
18:1 CIS 9 FAME	4.32
18:0 FAME	6.89
18:1 CIS 9 DMA	2.38
18:1 CIS 11 DMA	2.40
19 CYC 11,12/:1FAME	3.12
19:0 CYC 9,10 DMA	0.78
19:0 CYC11,12 DMA	1.24
20:1 CIS 11 FAME	1.46
15:0 ISO ALDE UN 13.570	1.80
UN 14.762 15:2 FA 15:1 CIS 7	1.49
15:0 ANTEI 3OH FAME 16:1 CIS 7DMA	3.51
17:2 FAME 16.760 17:1 CIS 8 FAME	1.41
17:1 CIS 9 FAME 17:2 FAME 16.801	4.26
18:1c 11/t9/t6 FAME UN 17.834	10.20

* analysis with Microbial identification System (Microbial ID, Inc., Newark, Del)

* In fatty acid designations, the first number indicated the number of carbon atoms, and the second the number of double bonds. The prefix x-OH indicate the position of the hydroxylation; cis indicate the position of the double bond.

● FAME, fatty acid methyl ester; DMA, dimethyl acetamide; UN, unknown compound; ALDE, aldehyde

라. 세포의 지방산 합성 분석

세포의 간단한 지방산의 분석은 straight-chain, 포화, 단포화 지방산의 패턴을 나타낸다. 우세한 지방산은 14, 16, 18 탄소원자로 이루어져 있다. 특히 hexadecanoic acid는 원핵세균에서 많이 보존되어 있다. 많은 혐기성 미생물들은 plasmalogen이라 불리는 단일 지방을 가지고 있다. 이것들은 glycerol 탄소에 지방산의 에스테르 결합 대신 에테르 결합을 가진 phospholipid 상사기관을 가지고 있었다. 유도체는 전형적인 메틸 에스테르 유도체가 아니라 dimethylacetal이었다. *C. butyricum*는 palmitic acid의 비율이 높게 나타났다 (Table 3.6.4).

마. Phylogentic analysis

EMBL과 유전자은행의 데이터에 의해 얻어진 reference 유기체의 sequence로부터 sequence의 유사성을 추측해 본 결과, 분리균 EG3는 그람양성균인 *Bacillus* - *Clostridium* 중의 하나임이 밝혀졌다. Maximum-likelihood analyses distance matrince에 기초한 phylogentic tree가 유사하였다. 16S rRNA sequence를 분석해 본 결과, similarity matrince는 EG3가 *Clostridium butyricum* 과 98% 유사하여 가장 가까운 것으로 나타났다 (Fig. 3.6.4).

바. Metabolic analysis

Glucose와 glucose/FeOOH 가 함유된 배지에서 성장하는 동안 분리균

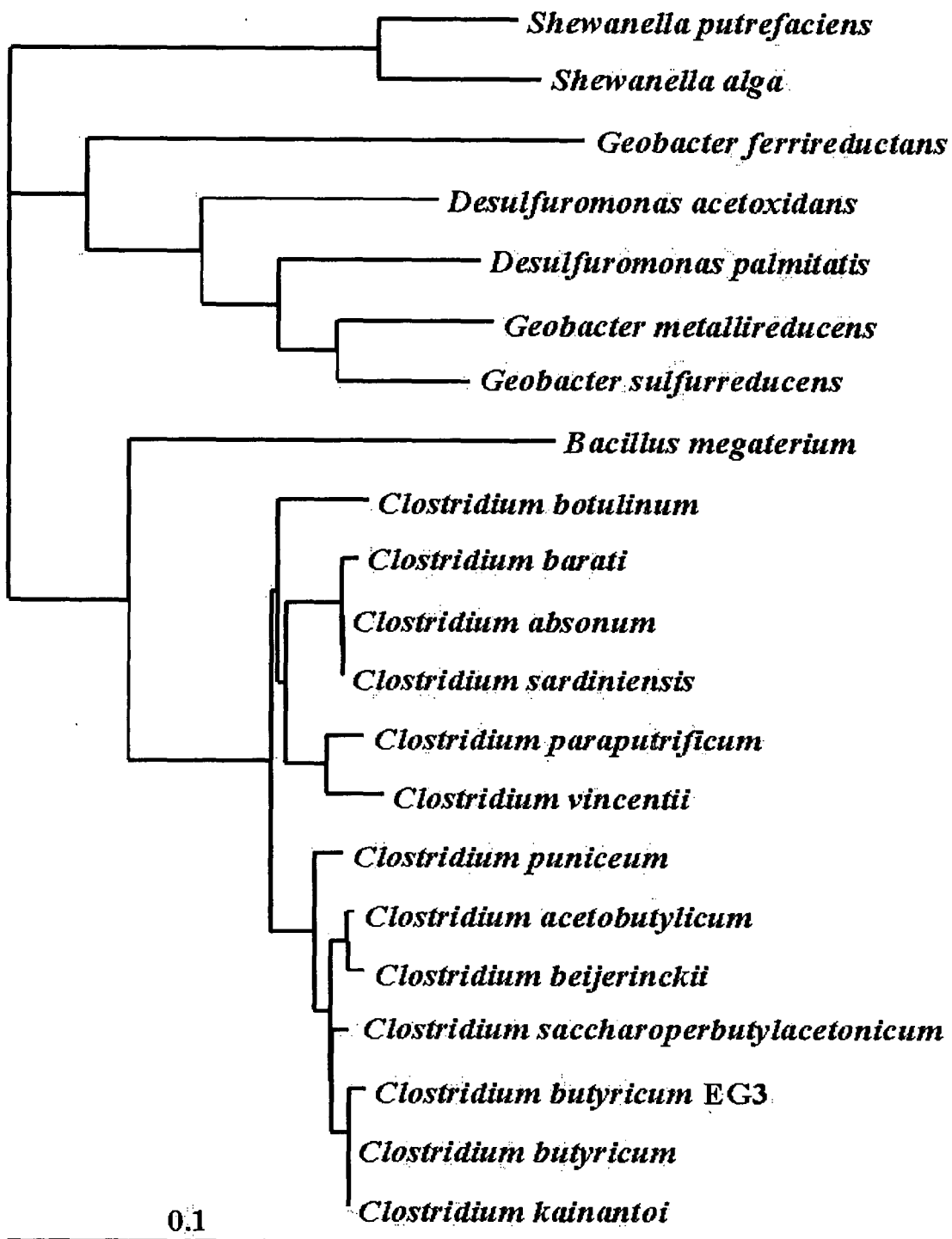


Fig. 3.6.4 Dendrogram showing the phylogenetic position of isolate EG3. The scale bar represents the expected number of changes per sequence position

Table 3.6.5 The metabolic products on glucose and glucose/FeOOH in isolate EG3

Substrate & acceptor	End product(mmol/100 mmol glucose used)					
	Lactate	Formate	Acetate	Butyrate	CO ₂	C. recovery(%)
Glucose	28.3	41.7	59.5	67.6	5.0	102.9
Glucose/FeOOH	31.5	42.3	60.3	59.0	2.9	93.2

*Numbers correspond to mean values of three determinations. The carbon recovery does not take into account the cell carbon.

EG3의 주된 생산물은 lactate, formate, butyrate, acetate, CO₂, H₂ 이다. Glucose와 glucose/FeOOH 가 함유된 배지에서 carbon recovery는 각각 102.9%와 93.2%이었다 (Table 3.6.5).

Glucose 발효에 의해 생산된 butyrate의 양은 거의 acetate의 양과 같았다. Lactate와 formate는 일반적인 *Clostridium butyricum* 에서는 생산되지 않는다. Acetate와 butyrate의 생산과 함께 조금 적거나 많은 양의 가스가 방출되었다. Glucose/FeOOH 대사(2.9 mmol)에서보다 glucose 발효(5.0 mmol/100 mmol glucose)에 의해서 훨씬 더 많은 양의 CO₂가 생산되었다. Glucose와 glucose/FeOOH 대사에서 최대 단백질 농도는 각각 0.115 mg/ml와 0.127 mg/ml 이었다 (Fig. 3.6.3). Glucose의 소비가 멈추었을 때 단백질 농도는 10시간 배양 후 최대값에 도달하였다. Fe(III) 환원은 glucose 소모와 함께 증가하였으며, 배양 3일 후 최대 activity는 3.1 mM 이었다 (data not shown).

사. 전기화학 활성

분리균 *Clostridium butyricum* EG3 의 전기화학 활성을 cyclic voltammetry를 이용하여 실험하였다. 산화-환원 피크는 각각 -70 mV/SCE와 -300 mV/SCE의 redox potential을 나타냈다. 그러나 *Clostridium butyricum* ATCC 1905는 전기화학적 활성을 보이지 않았다 (Fig 3.6.5 A and B). *Clostridium butyricum* KCTC 1785, 1903, 1905와 *C. acetobutyricum* KCTC 1790은 cyclic voltammetry에서 전기화학적 활성을 보이지 않았다 (data not shown).

아. 연료전지에서 전류의 생산

Glucose를 소모하면서 전류가 생산되었다 (Fig. 3.6.6). Glucose가 음극부에 첨가되었을 때, 전류의 생산을 증가하여 8 시간 후에 최대값에 이르렀다. 세포밀도는 약 0.4 (O.D. 660 nm)이었으며, glucose는 60 시간에 완전히 소모되었다. 연료전지의 coulomb 값은 전류-시간 곡선에서 면적을 적분함으로써 계산되었다. 연료전지의 최대 전류값은 0.21 mA이었으며, 200 시간 동안 54 coulomb을 생산하였다. 따라서 이상의 분리균은 미생물 연료전지를 작동 시킬 수 있는 균임이 확인되었다.

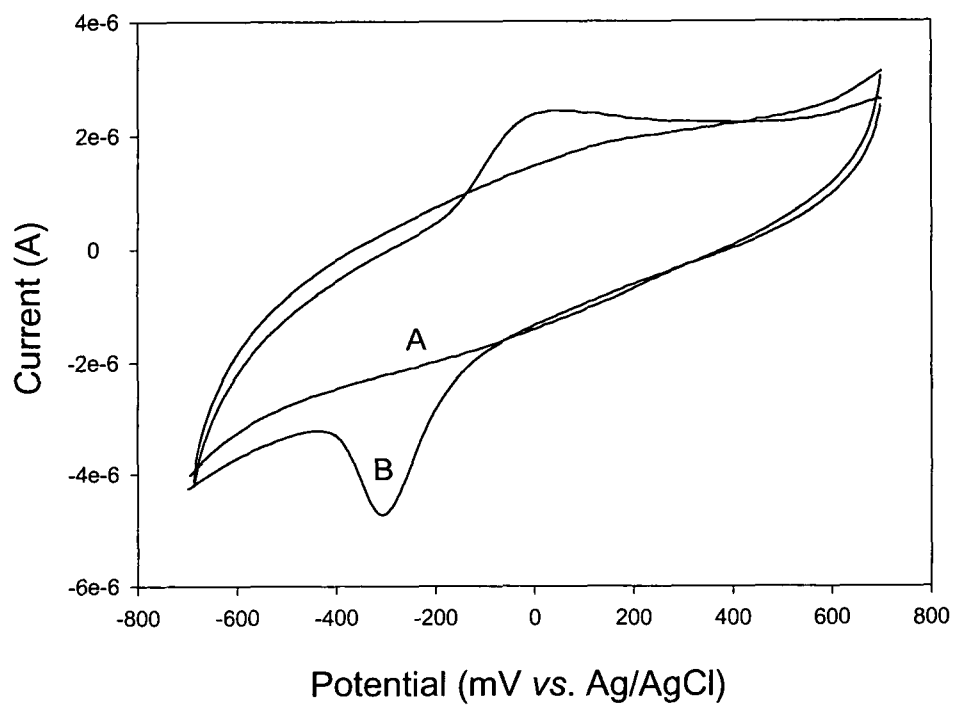


Fig. 3.6.5 Cyclic voltammograms of cell suspensions of 3 day-old cultures of *Clostridium butyricum* ATCC 1905 (A) and isolate EG3 (B) A phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) with 0.1M NaCl was used as the electrolyte. Scan rate was 100 mVs⁻¹

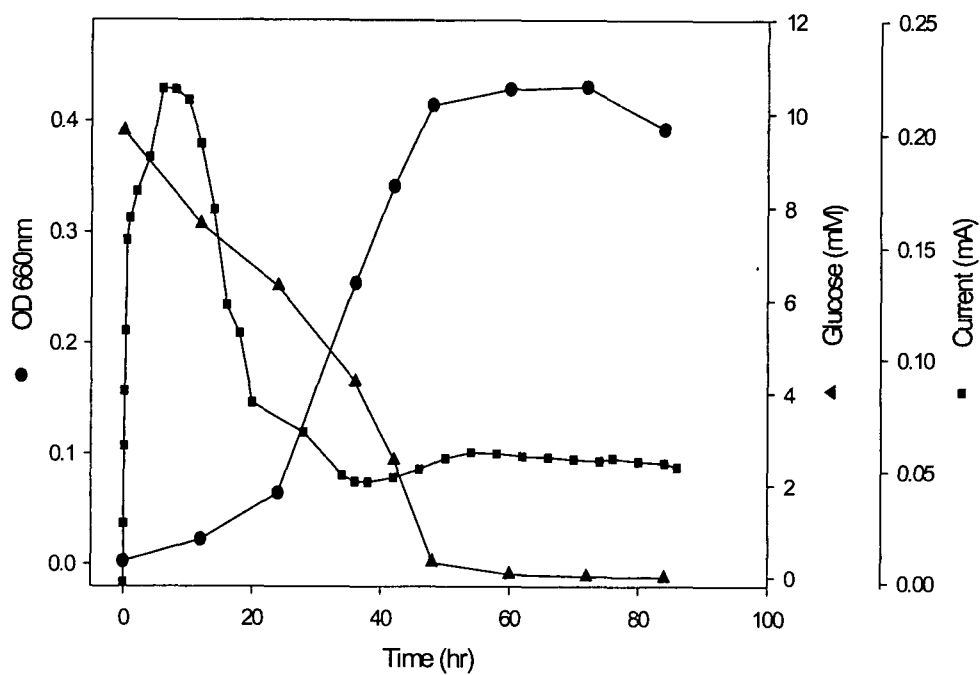


Fig. 3.6.6 The current generation of isolate EG3 using microbial fuel cell. Fuel cell was fed with 10 mM glucose and connected to an external resistance (1k Ω) to flow of current. Glucose was metabolized by the isolates and generated current. The maximum current output was 0.21 mA

제 4 장 연구개발 달성도 및 대외 기여도

4-1 연구개발목표의 달성도

1. 본 과제에의 연구개발 목표

본 과제에의 최종목표는 "전기 화학적으로 활성이 있는 미생물을 이용하여 유기성 폐수를 연료로 활용할 수 있는 생물연료전지를 구축하여 유기폐수를 자원화하는 공정 개발"이었으며 이는 선진국에서 개발된 매개체를 사용하는 미생물 연료전지와는 달리 전자전달 매개체의 채용 없이 순수하게 미생물과 유기성 폐수만으로 전기를 생산하고 폐수를 자원화할 수 있도록 하며 이에 대한 관련 메카니즘에 대한 조사 및 새로운 형태의 환경 친화적인 미생물 연료전지 시스템을 개발하는데 그 목적이 있었다.

2. 연도별 연구목표 및 평가 착안점

본 과제에의 proposal 상에 계획된 연도별 연구개발 목표 및 평가 착안점은 table 4.1.1에 표시하였다.

Table에서 보는것처럼 금속염 환원 세균의 기본 특성과 미생물 연료전지의 작동 및 효율증대 방안 등에 대한 것을 주요 연구목표로 삼았으며 구체적으로 금속염 환원세균에 대한 조사 및 연료전지의 제작 및 운전, 다양한 폐수의 적용 및 최적 연료전지 형태의 결정이 주요 연구 과제였다. 또한 이를 바탕으로 연료전지 운전의 최적화를 통하여 선진국보다 월등한 성능을 갖는 미생물 연료전지를 개발하는 것 이었다

Table 4.1.1 본 과제의 연구개발목표, 개발내용 및 평가의 착안점

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	평가의 착안점 및 척도
1차 년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> - 금속염 환원 세균에 대한 기본특성조사 - 기본 연료전지 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 금속염 환원 세균의 생리화학적 연구 - 전기화학적 특성조사 - 연료전지 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 금속염 환원세균의 연료전지에 대한 적용성
2차 년도 (1998)	<ul style="list-style-type: none"> - 분리 선별된 세균 특성 - 효율적인 생물연료전지 시스템의 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 생화학, 전기화학적 특성 - 생물연료전지의 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - 생물 연료전지의 작동 우수성
3차 년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> - 응용범위의 확대 - 생물연료전지 효율증대 	<ul style="list-style-type: none"> - 처리 가능 폐수의 결정 - 최적 연료전지 형태 결정 	<ul style="list-style-type: none"> - 생물 연료전지의 활용성

3. 연구개발 목표의 달성도

본 연구과제를 통하여 성공적으로 수행된 주요성과를 다음에 나열하였다.

1. 미생물 연료전지의 국내외 개발 현황 조사
2. Cyclic voltammetry를 이용한 전기 화학적 활성세균의 발견
3. 무매개체 미생물 연료전지의 구축 및 운전
4. *Shewanella putrefaciens* IR-1을 이용한 무매개체 연료전지의 운전 및 최적화
5. *Shewanella putrefaciens* IR-1의 전기 화학적 배양
6. 전기화학적 미생물의 농화배양법 및 이를 이용한 미생물 연료전지의 운전
7. 다양한 폐수를 이용한 미생물 연료전지의 운전
8. 폐수를 사용하는 연료전지의 운전 최적화
9. 관련 미생물의 분리, 동정 및 이를 이용한 미생물 연료전지의 작동
10. 다양한 형태의 연료전지개발

이상에서 보는 것처럼 설정된 연구 목표이상의 결과를 본과제의 수행을 통하여 이루어졌다. 특히 미생물 연료전지를 이용한 전기 화학적 활성세균의 농화 배양 및 이를 이용한 미생물 연료전지의 작동은 단일균을 사용하여 한정된 연료로 작동하는 무매개체 미생물 연료전지의 잠재적인 단점을 해결하여 다양한 폐수를 별도의 처리 없이 그대로 연료전지의 작동 연료로 사용할 수 있게 하였으며 또한 이 방법을 통하여 폐수내의 각종 전기화학적 활성 미생물과 그 외 다른 미생물이 연료전지 내에 공존할 수 있게 함으로써 본 연구를 통하여 개발된 미생물 연료전지가 다양한 응용범위를 가질 수 있게 되었다. 또한 6종의 특허출원 (2종 등록), 6종 이상의 출판, 15종 이상의 학회발표를 통하여 대외적으로 연구성과를 발표하였다.

4-2 관련분야 기술발전 기여도

미생물 연료전지는 생물 전기화학 (bioelectrochemistry)의 한 응용분야로서 구체적으로는 1960년대 이후 선진국에서 연구가 시작되었다. 그러나 그 후 현재에 이르기까지 산업화나 상용화된 예를 찾아볼 수 없었다. 그 이유는 서론에서도 언급한 바 있지만 전자 전달 매개체의 사용이 기존의 미생물 연료전지에서는 필수적 이었기 때문이다. 이는 환경 적으로나 경제적인 측면에서 연료전지의 작동에 큰 장애물로 작용할 뿐만 아니라 기술적으로도 기존의 기술 소유권에 저촉되기 때문에 범 세계적인 기술 선도가 불가능한 상태였다. 따라서 본 과제를 통한 무매개체 미생물 연료전지의 제작 및 시스템 구성, multi-channel voltameter를 이용한 측정 장치 및 computer를 이용한 data aquisition, manipulation, 그리고 다양한 폐수를 혼합균 형태로 이용하는 연료전지, 전기 화학적 농화 배양방법 개발 등은 기존의 연료전지 시스템의 단점을 확실히 개선한 우수한 원천기술이라고 볼 수 있으며 세계적인 주목을 받고 있다. 실 예로서 외국의 우수 학회 (American Society for Microbiology, 98년도 press release 참조, <http://www.asmta.org/pcsrc/gm98o012.htm>) 및 언론의 주목을 받았으며 이와 함께 국내의 언론매체, TV 및 신문에 수차 소개되었다. 현재까지 미국 MBI 및 국방성, Cold Spring Harbour Laboratory 등과 공동연구에 대한 접촉이 있었으며 영국 British Petroleum-Amoco와는 공동연구중이다. 이상의 결과를 볼 때 본 과제의 결과를 통한 국내외적인 기술 기여도는 국내외적으로 볼 때 대단히 우수한 편이라고 자체 평가 할 수 있다. 또한 기술기여도의 측면에서 볼 때 금속염 환원 세균의 주요 특성중 일부가 그 미생물의 전기 화학적인 활성화에 있음을 증명하였고 이와 유사한 다량의 균을 농화 배양 할 수 있는 시스템을 구성할 수 있었기 때문에 본 연구를 통하여 개발된 무매개체 미생물 연료전지를 이용한 일반적인 유기성 폐수의 자원화가 가능해 졌으며 폐수의

BOD측정이나 특정 폐수의 처리, 전기 화학적 미생물 배양 및 전기의 보조전원 시스템 개발이 가능해진 상태이다. 본 연구과제의 가장 두드러진 수행 결과는 별도의 미생물을 배양 후 전자전달 매개체와 함께 첨가하여 연료전지를 작동시키는 것이 아니라 미생물이 생육할 수 있는 거의 모든 유기성 폐수와 이 폐수 내에 존재하는 미생물을 이용, 매개체 없이 연료전지를 운전하는 기술로 집약 될 수 있으며 향후 이를 이용한 구체적인 연구를 진행 할 예정이다.

여 백

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

5-1 폐수처리 및 폐수자원화

본 연구결과에서 확인하였듯이 가정에서 발생하는 일반적인 폐수를 비롯하여 축산 폐수, 전분 가공공장 폐수 등 다양한 폐수를 연료로 이용하여 미생물 연료전지를 운전, 전기를 생산할 수 있다. 본 과제에서 사용된 연료전지는 통상 그 작업 용량이 10-20 ml 정도로 여기서 발생하는 전력은 200 ppm의 폐수를 사용 시 통상 0.01 mW의 전력이 발생하나 향후 scale-up을 시행 시 전극 1 m²당 최소 6 W 이상의 전력을 상시 발전 할 수 있다. 또한 단위 연료전지 당 발생전압은 0.8 V 정도로 연료전지를 직렬로 연결 시 원하는 전압을 쉽게 구할 수 있다. 이와 같은 결과는 현재까지의 실험결과에 근거하여 계산한 값으로 향후의 추가적인 실험을 통하여 발전량 등의 상승을 충분히 유도 할 수 있다고 본다. 따라서 현재까지는 단순히 에너지를 소모하면서 처리하여야만 하였던 유기성 폐수를 이용, 전력을 생산하는 공정이 탄생하게 된 것이다. 또한 이러한 과정을 통하여 일반적인 에너지 소모성 폐수처리 공정을 에너지 생산성 폐수처리 공정으로 탈바꿈 할 수 있게 된 것도 주요한 실험결과이다.

향후의 계획은 이와 같은 미생물연료전지 시스템을 이용한 폐수처리 공정을 보다 확실히 개발하고 이를 곧 산업에 응용할 수 있는 실험을 시행하고자 한다. 새로 연구될 수 있는 폐수처리 및 전력 생산 시스템의 또 하나의 예상될 수 있는 장점은 슬러지 발생율의 감소이다. 연료전지 내부에서는 미생물의 생육에 필요한 전자가, ATP를 생산하는 미생물의 전자전달계를 완전히 이동하지 못하고 전달계의 중간에서 외부의 전극으로 이동하기 때문에 충분한 양의 생육에 필요한 에너지를 생산하지 못하며 이는 미생물 증식, 특히 균체량의 증가에 영향을 미치게 된다. 따라서 산소를

사용하는 폐수처리법에서 문제시되는 과량의 슬러지 발생 및 이의 처리를 미생물 연료전지를 이용한 폐수처리 시스템에서는 쉽게 해결 할 수 있다. 현재까지의 실험결과 예상 슬러지 감소율은 일반적인 폐수처리공법과 비교 시 70 % 이상의 감소를 나타내고 있다.

이상에서 향후 수행하여야만 하는 다양한 응용분야를 확인하였으며 추가적인 연구를 통하여 미생물 연료전지를 이용한 전력발생 및 폐수의 자원화 및 새로운 폐수처리 시스템을 구성하고 이를 다양한 분야에 활용할 계획이다.

위에서 기술한 내용을 보다 구체적으로 다시 기술하면 다음과 같다.

1. 새로운 에너지 생산형 대규모 폐수처리장치의 개발

- Scale-up 과정등 후속 연구를 통한 새로운 에너지 생산형 폐수처리 system의 개발

2. 농어촌에 적합한 소규모 폐수처리/발전 시설 제작

- 일련의 경제성 및 성능 검토 검토작업을 거친 후 후속연구를 통하여 적절한 크기(1 ton 내외) 의 폐수처리/발전 system의 개발

3. 선진국에 대한 기술 수출 및 공동연구

- 연구기간 중 접촉한 미국, 일본, 영국등의 연구기관과 공동으로 본 연구에서 부족한 부분에 대한 정보를 교환하고 각 부품의 국산화 시도 및 공동 개발

4. 특이한 장소(잠수함, 우주선등)에서 폐수를 처리하는 compact한 고성능 연료전지의 제작

- 국방등 특수 한 목적에 사용 할 수 있는 고출력/고성능 생물연료전지의 개발

5. 전기 화학적 활성세균의 농화배양 mechanism 규명을 통한 순수 미생물 연구
본 연구 결과를 토대로 전기 화학적 활성 미생물의 농화배양 및 전자 전달 mechanism을 규명하고 생물 연료전지 및 각종 전기화학기술을 이용한 미생물 생리현상 규명

5-2 BOD 측정용 센서의 개발

본 연구과제의 수행 결과 전류/전압의 발생 및 증감은 일정한 조건에서 폐수의 농도에서 사용중인 폐수의 BOD에 비례하는 것으로 확인하였다. 이는 미생물의 전기 생산량이 폐수내의 유기물 농도에 비례하는 것을 의미하며 이와 같은 원리를 근거로 새로운 측정 원리를 갖는 BOD센서를 개발 할 수 있으며 이에 대한 구체적인 실험이 진행중이다.

지금까지 개발된 BOD 자동계측기의 일반적인 형태는 용존산소 전극 또는 산소센서를 이용한 형태이다. 그 원리는 폐수 속의 유기물이 막이나 담체에 고정화된 미생물에 의해 자화되어 산소를 소비하면서 이때의 용존산소값이 대조구의 용존산소값과 차이를 나타내게 되는데, 이것을 BOD 값으로 환산한 것이다. 그러나 이 방법은 다양한 폐수에 대한 적응성이 떨어져 측정값이 일치하지 않을 뿐 아니라 산소전극의 특성상 유지관리가 복잡하고 잦은 보수가 필요로 하는 단점이고 또한 폐수 속에 포함된 중금속이나 독극물에 의해 쉽게 고장이 날 뿐만 아니라 응용성이 거의 없다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 신기술 즉 미생물연료전지에 의한 BOD 계측기가 개발될 예정이다.

생물연료전지와 전기화학활성균을 이용하면 유기물의 대사시 발생하는 전자를 외부의 불용성 전자수용체에 전달하여 전자수용체를 환원시키므로 유기물의 양은 외부의 전자수용체의 환원되는 양과 비례하게 된다. 이 원리를 이용하여 전자수용체 대신 적당한 전극을 이용하면 미생물 내부에서 발생하는

전자가 전극을 환원시키고 전극에 전달된 전자는 회로를 통하여 전류가 흐르게 된다.

따라서 본 BOD 계측기는 서로 다른 유기폐수 및 오니속의 전기화학활성세균을 농화배양하여 BOD 측정을 원하는 각각의 폐수에 알맞은 미생물 균종을 분리할 수 있으며, 폐수농도에 따른 유기물 산화량에 비례하여 전기 신호량이 증가하므로 BOD량으로 환산하여 측정할 수 있는 특징이 있다. 또한 세계 최초로 개발한 생물연료전지와 전기화학적 활성을 갖는 미생물을 이용한 BOD 계측기는 일반적인 BOD 계측기의 단점을 해결할 수 있으며 여러 가지 응용연구에 사용하여 독극물센서나 중금속 센서 등 새로운 발명에 활용할 수 있다. 그리고 국내 개발된 환경 계측기 기술 중 세계 유일한 기술로서 기술수출을 통한 국내 환경계측기 기술을 세계 수준으로 올릴 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 참고문헌

Allen, R. M and H. P. Bennetto. 1993. Microbial fuel-cells: Electricity production from carbohydrates. *Appl Biochem Biotech.* 39:27-40.

Altschul S. R., T. L.Madden, A.A.Schaffer, J.H.Zhang, Z.Zhang, W.Miller, and D.J.Lipman.1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search program. *Nucleic Acid Res.* 25 : 3389-3402

APHA. American Public Health Association. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association. Washington. DC.

Ardern, E., and W.T.Lockett. 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters, *J Soc Chem Ind,* 33:523.

Arnold, R. G., DiChristina, T.J and Hoffmann,M.R. 1986. Inhibitor studies of dissimilative Fe(III) reduction by *Pseudomonas* sp. Strain 200('Pseudomonas ferrireductans'). *Appl Environ Microbiol.* 52:281-289.

Arnold ,R.G., DiChristina, T.J., and Hoffmann, M.R. 1988. Reductive dissolution of Fe(III) oxides by *Pseudomonas* sp. 200. *Biotech Bioeng.* 32 :1081-1096.

Arnold, R. G., M. R. Hoffmann, T. J. DiChristina, and F. W. Picardal. 1990. Regulation of dissimilatory Fe(III) reduction activity in *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 56:2811-2817.

Archer, D.B., and B.H.Kirsop. 1991. The microbiology and control of

anaerobic digestion, pp. 43-91, in : Anaerobic digestion : A Waste Treatment Technology, A. wheatly, ed, Elsevier Applied Science, London, U.K.

Aston. W. J and A.P.F.Turner. 1984. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1:89-120

Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R. and Wolfe R.S. 1979 Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev.* 43 : 260-296

Beliaev, A. S., and D. A. Saffarini. 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol.* 180:6292-6297

Bennetto, H.P. Microbial fuel cells. 1984. *Life Chemistry Reports.* 2: 363-453.

Bennetto, H. P., J. Box, G. M. Delaney, J. R. Mason, S. D. Roller, J. L. Stirling, and C. F. Thurston. 1987. Redox-mediated electrochemistry of whole micro-organisms: from fuel cell to biosensors, pp. 291-314. In A. F. T. Turner, I. Karube and G. S. Wilson (ed.), *Biosebsors: Fundamentals and applications.* Oxford university press, Oxford.

Boone, D. R., Liu, Y., Zhao, Z.-J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O. & Aldrich, D.C. 1995. *Bacillus infernus* sp. Nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol* 45:441-448.

Bragg, P.D. 1974. Nonheme iron in respiratory chains. In *Microbial Iron Metabolism* ed. Netherlands, J.B. pp.303-348, Academic Press, New York.

Buck, J.D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 44(4) : 992-993.

Caccavo, F. Jr., Blackmore, R.P., Lovley, D.R. 1992. A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Appl Environ Microbiol.* 58:3211-3216.

Caccavo, F. Jr., D. J. Lonergan, D. R. Lovely, M. Davis, J. F. Stolz, and M. J. Mcinerney. 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol.* 60:3752-3759.

Caccavo, Jr., F., Frolund, B., Van O. Kloeke, F., Nielsen, P.H. 1996. Deflocculation of activated sludge by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* strain BrY. *Appl Environ Microbiol.* 62:1487-90.

Caccavo F., Jr, Coates J.D., Rossello-Mora R.A., Ludwig W., Schleifer K.H., Lovley D.R. and McInerney M. J. 1996. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. *Arch Microbiol.* 165 : 370-376.

Chang, I.S., B.H. Kim, P.K. Shin, and W.K. Lee. 1996. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. *J Microbiol Biotechnol.* 5 : 309-314

Chang I.S., D.H. Kim, B.H. Kim, P.K. Shin, J.H. Yoon, J.S. Lee, and Y.H. Park. 1997. Isolation and identification of carbon monoxide utilizing anaerobic bacteria, *Eubacterium limosum* KIST612. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol.* 25 : 1-8

Coates J. D., Phillips E. J. P., Lonergan D. J., Jenter H. and Lovley D. R. 1996. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl Environ Microbiol* 64 : 1504-1509

Coleman, M.L., Hedrick, D.B., Lovley, D.R., White, D.C., and Pye, K. 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature*. 361 : 436-438.

Cooney, M.J., Roschi, E., Marison, I.W., Comninellis, C. 1996, Physiological-Studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio -Desulfuricans* - Evaluation for Use in a Biofuel Cell. *Enz. Micro Tech.* 18: 358-365.

Costerton, J.W., and H.M. Lappin-Scott. 1989. Behavior of bacteria in biofilms. *ASM News*. 55:650-654

Crabbendam P. M., Neijssel, O.M. and Tempest, D.W. 1985. Metabolic and energetic aspects of the growth of *Clostridium butyricum* on glucose in chemostat culture. *Arch Microbiol* 142: 375-382.

Davies D.G, Parsek, M,R, Pearson, J,P, Iglewski B,H, Costerton, J.W. Greenberg E,P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280:295-298.

Davis, G, H.A.O.Hill, W.J.Aston, I.J. Higgins and A.P.F.Turner. 1983. *Enzyme Microbi Technol.* 5:383.

Delaney, G. M., H. P. Bennetto, J. R. Mason, S. D. Roller, J. L. Stirling, and C. F. Thurston. 1984. Electron-transfer coupling in microbial fuel

cells. 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator substrate combinations. *J Chem Tech Biotechnol.* 34B:13-27.

Del Duca , M.G., and J.M.Fusco. 1965. *Intern Sci Technol.* 39:56.

Desai, M, Buhler. T, Weller p.H, Brown M.R.W. 1998. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidium during exponential growth. *J Antimivrob Chemother*, 42:153-160.

DiChristina, T.J., Arnold,R.G., Lidstrom,M.E., and Hoffmann,M.R. 1988. Dissimilative ironreduction by the marine eubacterium *Alteromonas putrefaciens* Strain 200. *Wat Sci Tech.* 20:69-79.

DiChristina, T.J, 1992. Effects of nitrate and nitrite on dissimilatory iron reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *J Bacteriol.* 174: 1891-1896.

DiChristina,T.J., and DeLong, E.F. 1993. Design and application of rRNA-targeted oligonucleotide probes for dissimilatory iron-and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 4152-4160.

DiChristina, T. J., and E. F. DeLong. 1994. Isolation of anaerobic respiratory mutants of *Shewanella putrefaciens* and genetic analysis of mutants deficient in anaerobic growth on Fe³⁺. *J Bacteriol.* 176:1468-1474.

Dobbin P. S., Carter J. P., San Juan C.G., Hobe M., Powell A. K. and Richardson D. J. 1999. Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol

enrichment. *FEMS Microbiol Lett.* 176: 131-138.

Dobbin P.S., Warren L.H., Cook N. J., McEwan A. G., Powell A. K. and Richardson, D. J. 1996. Dissimilatory iron(III) reduction by *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology.* 142 : 765-774.

Ehrlich, H.L. 1993. Electron transfer from acetate to the surface of MnO₂ particles by a marine bacterium. *J Industr Microbiol.* 12:121-128

Fickett, A.P. 1978. *Sci Am.* 239:54.

Fischer, W.R. 1988. Microbiological reactions of iron in soils. In *Iron in Soils and Clay Minerals*, ed. J. W. Stuchi, B. A. Goodman, U. Schwertmann, pp 715-748. Boston. Reidel.

Fredrickson J. K. and Gorby Y.A. 1996. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 7 : 287-294

Fuqua C, Winnans S.C, Greenberg, E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 50:727-751.

Ghiorse, W.C. A.J.B. Zehnder. 1988. Microbial reduction of manganese and iron. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, ed. pp. 305-331. New York: Wiley

Gorby, Y., and Lovley, D.R. 1991. Electron transport in the dissimilatory iron-reducer, GS-15. *Appl Environ Microbiol.* 57:867-870.

Gold, T. 1992. The deep, hot biosphere. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89:6045-49.

Greene, A. C., B. K. C. Patel, and A. J. Sheehy. 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. Nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. *Int J Sys Bacteriol.* 47:505-509.

Grove, W.R. 1839. *Philos Mag.* 14 : 127

Hammer, M.J. 1986. *Water and Wastewater Technology.* Wiley. New York.

Hanson, R.S. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, DC

Harold J. B. 1994. *Microbiological Applications.* 6th ed. Brown Publishers.

Hawkes, H.A. 1963. *The Ecology of Wastewater Treatment,* Macmillan, New York, NY.

Herbert, D., P.J. Philips, and R.E. Strange. 1971. Analysis of microbial cells, pp 209-344. *Methods in microbiology.* In J. R. Norris and D.W. Ribbons (ed.). Academic Press, New York, NY.

Heyndrickx M., De Vos P. and De Ley J. 1990. H₂ production from chemostat fermentation of glucose by *Clostridium butyricum* and *Clostridium pasteurianum* in ammonium and phosphate limitation. *Biotechnol lett.* 12(10):731-736.

Higgins, I.J., and R.G. Burns. 1975. *The Chemistry and Microbiology of Pollution,* Academic, London.

- Hill, H. A. O and I. J. Higgins. 1981. *Philos Trans R Soc London, Ser. A.* 302:267
- Hitchens, G. D. 1989. Electrode surface microstructures in studies of biological electron transfer. *TIBS.* 14:152-155.
- Hoyle, B. D., J. Jass, and J. W. Costerton. 1990. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother.* 26: 1-5.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiol* 3B pp. 117-132
- Hyun, M. S, B. H. Kim, I. S. Chang, H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, M. A. Kim and D. H. Park. 1999. Isolation and Identification of an Anaerobic Dissimilatory Fe(III)-reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1 ". *J Microbiol.* 37(4):206-212.
- Iizuka, T and Kotani, M. 1968. Analysis of a thermal equilibrium phenomenon between high-spin and low-spin states of ferrimyoglobin azide. *Biochim Biophys Acta.* 154:417-419.
- Itamar, W, G. Arad and E. Katz. 1998. A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinoe and mciroperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. *Bioelectrochem Bioenerget.* 44:209-214.
- Jagow, von, G, Link, T. A. *Methods Enzymol.* 1986, 126 : 253.
- Jean F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins. 2th Ed.

Kaprelyants, A. S., J. C. Gottschal, and D. B. Kell. 1993. Dormancy in Non-Sporulating Bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 104:271-286.

Karube, S. Suzuki, T. Matsunaga and S. Kurihama.1981. *Acad Sci.* 369:91

Kazlauskaite, J., H. A. O. Hill, P. C. Wilkins, and H. Dalton. 1994. Direct electrochemistry of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur J Biochem.* 241:552-556.

Kim B.H. 1995. Microbial physiology. 2th Ed Academy press. Seoul. Korea.

Kim, H. J., H. P. Bennetto, and M. A. Halablab. 1995. A novel liposome-based electrochemical biosensor for the detection of haemolytic microorganisms.

Biotechnol Technique. 9:389-394

Kim, B.H., H.J. Kim, M.S. Hyun, and D.H. Park. 1999a. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J Microbiol*

Biotechnol. 9: 127-131

Kim, B. H., T. Ikeda, H. S. Park, H. J. Kim, M. S. Hyun, K. Kano, K. Takagi, and H. Tatsumi. 1999b. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotech Tech.* 13:475-478.

Kim, H. J., M. S. Hyun, I. S. Chang, and B. H. Kim. 1999. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella*

putrefaciens. *J Microbiol Biotechnol.* 9:365-367

- Kim, H. J., H.S. Park, M.S.Hyun, I.S.Chang, M.A. Kim and B.H.Kim. 2000. A Mediator-Less Microbial Fuel Cell Using a Metal Redcing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*. Submitted.
- Kim, T. S., and B. H. Kim. 1988. Modulation of *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnol Lett*. 10:123-128.
- Kim, T. S., H. Y. Kim, and B. H. Kim. 1990. Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnol Lett*. 12:757-760.
- Kroger, A and Innerhofer, A. 1976. The function of menaquinone, covalently bound FAD and iron-sulfur protein in the electron transport from formate to fumarate of *vibrio succinogences*. *European Journal of Biochemistry*. 69:487-495.
- Lavrence, J. R, D.R.Korber, B.D.Hoyle, J.W.Costerton, and D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*. 173:6558-6567.
- Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol*. 51:683-689.
- Lovley, D.R. 1987. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol J*. 5:375-399
- Lovley, D. R., Phillips, E.J.P. 1989a. Requirement for a microbial consortium to completely oxidize fructose in Fe(III)-reducing sediments.

Appl Environ Microbiol. 55:3234-36.

Lovley, D.R., Phillips, E. J.P., Lonergan, D.J. 1989b. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 55:700-706.

Lovley, D. R., M. J. Baedeker, D. J. Lonergan, I. M. Cozzarelli, E. J. P. Phillips, and D. I. Siegel. 1989c. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* (London). 339:297-299.

Lovley, D.R., Lonergan, D.J. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl Environ Microbiol.* 56:1858-64.

Lovley, D.R. 1991a. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev.* 55:259-287

Lovley, D. R., Phillips, E.J.P, Lonergan, D. J. 1991b. Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. *Environ Sci Technol.* 25:1062-67

Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., and Goodwin, S. 1993a. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol.* 159:336-344.

Lovley, D.R., Roden, E.E., Phillips, E.J.P., and Woodward, J.C. 1993b. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geol.*

113:41-53.

Lovley, D.R. 1993c. Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol.* 47:263-290.

Lovley, D. R. 1995. Microbial reduction of iron, manganese and other metals. *Adv Agron.* 54:175-231.

Lovley, D. R., Coates, J. D., Saffarini, D. & Lonergan, D. J. 1997. Diversity of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. In *Iron and Related Transition Metals in Microbial Metabolism*, pp.187-215. Edited by G. Winkelmann & C.J. Carrano. Chur, Switzerland: Harwood Academic Press.

Mackie, R.I., and M.P. Bryant. 1981. Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl Environ Microbiol.* 41:1363-1373.

Marshall, K.C. 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic environments. *Can J Microbiol.* 34 : 503-506.

McInernay, M.J., M.P. Bryant, R.B. Hespell, and J.W. Costerton. 1981. *Syntrophomonas wolfei*, gen. nov. sp. nov., and anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 41: 1029-1039.

McLaughlin, J.R., Ryden J.C. and J.K. Syers. 1981. Sorption of inorganic phosphate by iron- and aluminum-containing components. *J Soil Sci.* 32 : 365-377.

Metcalfe L.D, schimitz. A.A, Pelka J.R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 38:415-515.

Metcalf L.D and Eddy. 1991. Wastewater Engineering. 3rd ed. McGraw Hill.

Michael L. Shuler and Fikret kargi. 1992. Bioprocess engineering. Englewood Cliffs, New Jersey.

Mikkelsen L.H, Gotfredsen A.K, Agerbak M.L, Nelsen P.H, Keiding K. 1996. Effects of colloidal stability on clarification and dewatering of activated sludge. *Wat Sci Tech*. 34, 449-457.

Mittelman, M.W., and G.G.Geeseey. 1985. Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Appl Environ Microbiol*. 49:846-851

Morita, T.Y. 1982. Starvation survival of heterotrophs in the marine environment. *Adv Microb Ecol*. 6:171-198.

Morita,R.Y. 1985. Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state. pp 111-130 in *Bacteria in the Natural Environments: The Effect of Nutrient Conditions*. Fletcher,M and Floodgate, G, Soc. Gen. Microbiol. London.UK.

Mosteller, T. M., and J. R. Bishop. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J Food Prot*. 56 : 34-41.

Myers,C.R., and Myers, J.M. 1992. Localization of cytochromes to the outer

membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol.* 174 : 3429-3438.

Myers, C.R., and Myers, J.M. 1993. Ferric reductase is associated with the membranes of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS microbiol Lett.* 108:15-22.

Myers, C. R., and J. M. Myers. 1997. Outer membrane cytochromes of *Shewanella putrefaciens* MR-1: Spectral analysis, and purification of the 83-kDA c-type cytochrome. *Biochim Biophys Acta.* 1326:307-318.

Naik, R.R., Murillo, F.M., and Stolz, J.F. 1993. Evidence for a novel nitrate reductase in the dissimilatory iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. *FEMS Microbiol Lett.* 106 : 53-58.

Nealson, K. H., and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation. *Annu Rev Microbiol.* 48:311-343

Nielsen, P.H. 1996. The significance of microbial Fe(III) reduction in the activated sludge process. *Wat Sci Tech.* 34(5), 129-136.

Nielsen P.H, B. Frolund, S. Spring and F. Caccavo. 1997. Microbial Fe(III) reduction in activated sludge. *System Appl Microbiol.* 20:645-651.

Norris, J. R.; Ribbons, D. W. *Methods in Microbiology.* 1972, Vol. 6B, p.247. Academic Press, New York, NY.

Obuekwe, C. O., Westlake, D. W. S., and Cook, F .D. 1981. Effect of nitrate on reduction of ferric iron by a bacterium isolated from crude oil. *Can J*

Microbiol. 27 : 692-697.

Obuekwe, C.O., and Westlake, D.W. S. 1982. Effects of medium composition on cell pigmentation cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas* sp. Isolated from crude oil. *Can J Microbiol.* 28 : 989-992.

O'Toole, G.A., Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28:449-461.

Palmore, G. T. R., H. Bertschy, S. H. Bergens, and G. M. Whitesides. 1998. A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependant dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to generate nicotinamide adenine dinucleotide at low over potential. *J Electroanal Chem.* 443:155-161.

Park D. H., Kim B. H., Moore B, Hill H.A.O., Song M. K. and Phee H. W. 1997. Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds. *Biotechnol Techniq.* 11: 145-148.

Plotkin, E.V, I.J.Higgins and H.A.O.Hill. 1981. Methanol dehydrogenase bioelectrochemical cell and alcohol detector. *Biotechnol Lett.* 3(4) : 187-192.

Polprasert, C. 1989. Organic Wastes Recycling, Wiley, Chichester, U.K.

Potter, M.C. 1911. *Proc R Soc. London. Ser, B*, 84:260

Pratt L.A, Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili. *Mol*

Microbiol. 30 : 285-293.

Pronk, J.T., Liem, K., Bos, P., Kuenen, J.G. 1991. Eenergy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 57:2063-68.

Rainey, F. A., N. Ward-rainey, R. M. Kroppenstedt, and E. Stackchrandt. 1996. *Clostridium paraloxnm* DSM7308 contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology.* 142 : 2087-2095.

Rasmussen, H., Bruus, J.H., Keiding, K. and Nielsen, P. H.1994. Observations on dewaterability and physical chemical and microbiological changes in anaerobically stored activated sludge from a nutrient removal plant. *Wat Res.* 28: 417-425.

Rasmussen, H. and Nielsen, P.H. 1996. Iron reduction in activated sludge measured with different extraction techniques. *Wat Res.* 30, 551-558.

Rawson, D. M., and A. J. Willmer. 1989. Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors.* 4:299-311

Richardson, N. J., S. Gardner, and D. M. Rawson. 1991. A chemically mediated amperometric biosensor for monitoring of eubacterial respiration. *J Appl Bacteriol.* 70:422-426

Rivera, M., M. A. Wells, and F. A. Walker. 1994. Cation-promoted cyclic voltammetry of recombinant rat outer mitochondrial membrane cytochrome *b5* at a gold electrode modified with mercaptopropionic acid. *Biochem.* 33: 2161-2170

Roden, E. E., Lovley, D. R. 1993. Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism, *Desulfuromonas acetoxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 59 : 734-742.

Roller, S.D., H.P. Bennetto, G.M. Delaney, J.R. Mason, J.L. Stirling and D.F. Thurston. 1984. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J Chem Tech Biotechnol.* 34B:3-12.

Saffarini, D.A, Nealson. K.H. 1993. Sequence and genetic characterization of *etrA*, an *fnr* analog that regulates anaerobic respiration in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol.* 175 : 7938-7944.

Schink B. and Bomar M. 1991. The genera *Acetogenium*, *Acetoanaerobium* and *Acetitomaculum*. The Prokaryotes, 2nd ed. pp 1923-1936. Springer Verlag. New York

Seeliger, S., R. Cord-Ruwisch, and B. Schink. 1998. A periplasmic and extracellular *c*-type cytochromes of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J bacteriol.* 180:3686-3691

Semple, K.M., and D.W.S. Westlake. 1987. Characterization of iron-reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oil field fluids. *Can J Microbiol.* 33 ; 366-371.

Siebel, D., H. P. Bennetto, G. M. Delaney, J. R. Mason, J. L. Stirling, and C. F. Thurston. 1984. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J Chem Tech Biotechnol.* 34B:3-12.

Sitou N. and Ne M. 1987 The neighbour-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evolution*. 4: 406-425.

Slobodkin, A., Reysenbach, A. -L., Strutz, N., Dreier, M. & Wiegel, J. 1997. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a continental hot spring. *Int J Syst Bacteriol*. 47:541-547.

Speece, R.E. 1983. Anaerobic biotechnology of industrial wastewater treatment. *Environ Sci Technol*. 17:416-427.

Sterritt, R.M., and J.N. Lester, 1988. Microbiology for Environmental and Public Health Engineers. Spon , London.

Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K., and Tano, T. 1989. Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur: ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim Biophys Acta*. 973:250-256

Tayhas, G., R. Palmore, and M. Whitesides. 1994. Microbial and enzymatic biofuel cells, pp. 271-290. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. In M. E. Himmel, J. O. Baker and R. P. Overend (ed.). American chemical society, Washington, D. C.

Tebo B.M. and Obraztsova A.Y. 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett*. 162 : 193-198.

Thurston, C.F, Bennetto, H.P Delaney, G.M, Mason, J.R, Roller, S.D and Stirling, J.L. Glucose. 1985. Metabolism in a Microbial Fuel Cell.

Stoichiometry of Product Formation in a Thionine-mediated *Proteus vulgaris* Fuel Cell and its Relation to Coulombic Yields, *J Gen Microbiol.* 131: 1393-1401

Tokutake, N, Miyoshi, H. Satoh, T, Hatano, T, Iwamura, H, 1994. *Biochim Biophys Acta.* 1185 : 271-275.

Tofield, .B.C. 1981. *Appl Energy.* 8:89

Vanhaecke, E., J.P.Remon, F.Raes, J.Moors, D.DeRudder, and A.V. Petghen. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl Envrion Microbiol.* 56:788-795.

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L & Lovley, D. R. 1998. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395:65-67

Venosa, A.D. 1975. Lysis of *S. natans* swarm cells by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl Microbiol.* 29 : 702-705

Yoon, J.H., H.I.Kim, S.B.Kim, H.J.Kim, W.Y.Kim, S.T.Lee, M.Goodfellow, and Y.H.Park. 1996. Identification of *Saccharomonospora* strains by the use of genomic DNA fragments and rRNA gene probes. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 502-506.

Young, C.C., R.T. Burghoff, L.G.Keim, V. Minak-Bernero, J.R. Lute, and S.M.Hinton, 1993. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soil. *Appl*

Environ Microbiol. 59:1972-1974.

Wikstrom, M.K.F., Berden, J.A. 1972, *Biochim Biophys Acta.* 283 : 403.

Willner. I, Arad. G, Katz. 1998. E. A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11monolayer-functionalized electrodes. *Bioelectrochem Bioenerg.* 44:209-214

Wehnder, A.J.B., and W. Stumm. 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats, p. 1-38. In A.J.B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms.* John Wiley & Sons, Inc., New York.

Yagishita, T., S. Sawayama, K. Tsukahara, and T. Ogi. 1996. Photosynthetic bio-fuel cells using cyanobacteria. World Renewable Energy Congress, Denver, CO.

Zhang, X., and Halme, A., 1995. Modelling of a Microbial Fuel Cell Process. *Biotech. Lett.* 17: 809-814