

Sediment에서의 전기활성 박테리아 분포 특성 Distribution of Electrochemically Active Bacteria in the Sediment

손형식 · 손희종* · 김미아 · 이상준†
Hyeng-Sik Son · Hee-Jong Son* · Mia Kim · Sang-Joon Lee†

부산대학교 미생물학과 · *부산광역시 상수도사업본부
Department of Microbiology, Pusan National University · *Water Authority, Busan

(2010년 10월 5일 접수, 2010년 12월 16일 채택)

Abstract : Microbial fuel cells (MFC) were enriched using sediment Nakdong river, Hoidong river and protected water area in Gijang. The microbial community of sediment and enriched MFC was analyzed by FISH (fluorescent *in situ* hybridization) and 16S rDNA sequencing. *α-Proteobacteria*, *Acidobacter* and *Cyanobactia* group were dominant in sediment by FISH. The coulombs of the final 10 peak of the 3 MFC (Nakdong, Hoidong, Gijang) were 0.64 C, 0.50 C, 0.61 C, respectively. When MFCs were enriched by sediment, *β-*, *γ-Proteobacteria*, *Acidobacter* and Firmicutes group increased 45~90%, 50~90%, 40~80% and 45~125%, respectively. In results of 16S rDNA sequencing, *Roseomonas* sp., *Azospillium* sp., *Frateuria* sp., *Dyella* sp., *Enterobacter* sp. and *Deinococcus* were isolated from Nakdong river and *Azospillium* sp., *Delftia* sp., *Ralstonia* sp., *Klebsiella* sp. and *Deinococcus* sp. were isolated from protected water area in Gijang and *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Deinococcus* sp., *Leifsonia* sp. and *Bacillus* sp. were isolated from Hoidong river.

Key Words : Microbial Fuel Cell, Sediment, Microbial Community, FISH, 16S rDNA

요약 : 낙동강, 회동 및 기장에서 채집한 sediment의 미생물 군집을 FISH 분석을 통하여 조사한 결과, α 그룹, *Acidobacter* 그룹 및 *Cyanobacter* 그룹의 분포비율이 가장 높았으며 전체적으로 서로 유사한 분포 특성을 나타내었다. 각각의 sediment를 접종한 MFC 농화배양 이후의 coulombic yield는 낙동강, 회동 및 기장의 경우 각각 0.64 C, 0.50 C, 0.61 C로 나타났으며, 농화배양 완료 후의 미생물 군집분포는 β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, *Acidobacter* 그룹 및 Firmicutes 그룹이 농화배양 전보다 각각 45~90%, 50~90%, 40~80% 및 45~125% 정도 생체량이 증가한 것으로 나타났다. 농화배양이 끝난 후 16S rDNA를 이용한 미생물 동정결과에서, 낙동강 sediment를 주입한 MFC의 경우는 α -*Proteobacteria*의 속하는 *Roseomonas* sp., *Azospillium* sp.와 γ -*Proteobacteria*의 *Frateuria* sp., *Dyella* sp., *Enterobacter* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococcus* sp.가 동정되었고, 기장 sediment는 α -*Proteobacteria*의 *Azospillium* sp.와 β -*Proteobacteria*의 *Delftia* sp., *Ralstonia* sp.와 γ -*Proteobacteria*의 *Klebsiella* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococcus* sp.가 동정되었으며, 회동 sediment는 γ -*Proteobacteria*의 *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococci* sp.와 Actinobacteria 그룹의 *Leifsonia* sp.와 *Bacilli* 그룹의 *Bacillus* sp.가 동정되었다.

주제어 : 미생물 연료전지(MFC), Sediment, 미생물 군집, FISH, 16S rDNA

1. 서론

현재의 화석에너지는 많은 환경오염을 일으키며, 그 양 또한 제한되어 있어 새로운 형태의 재생에너지(수소, 폐기물, 바람, 태양열 등)의 개발이 많이 진행되고 있다. 신재생에너지 기술에 대한 연구 가운데에서도 최근에는 축산폐수, 식품폐수, 하수, 슬러지에 포함되어 있는 유기물을 자원으로 활용하여 전기, 가스 등을 생산하는 재생에너지 기술에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중에서 미생물 연료전지(Microbial fuel cell, MFC)는 전기활성 미생물을 촉매로 이용하여 하·폐수에 포함된 유기물의 화학적 에너지를 전기에너지로 전환할 수 있는 새로운 개념의 하·폐수 처리기술 및 대체 에너지 기술로서 주목받고 있다.^{1,2)}

MFC는 크게 산화전극부와 환원 전극부로 나누어지며, 두 개의 전극부 사이에는 이온교환막이 놓여있다. 혐기성 조건의 산화전극에서는 전기활성미생물들에 의해서 glucose, acetate와 같은 유기물들이 산화되며, 전자와 수소이온이 발

생하게 된다. 산화전극부에서 발생한 전자는 외부 도선을 따라 환원전극으로 이동하게 되며, 수소이온은 이온교환막을 통과해서 환원 전극으로 이동한다. 환원 전극으로 이동한 전자와 수소이온은 전자수용체로서 공급된 물질(일반적으로 산소)에 전달되어 환원 반응을 일으키게 된다. 이러한 일련의 반응을 통하여 산화 전극부에서 환원전극으로 이동하는 연속적인 전자의 흐름이 전기에너지를 생성하게 된다.^{3,4)}

이전까지는 미생물 내부의 전자를 외부로 전달하기 위해서 여러 가지 매개체를 사용하였다.¹⁻⁴⁾ 하지만 이것은 여러 문제점을 초래하였다. 1990년대부터 금속염을 전자수용체로 사용하는 혐기성 미생물인 금속염 환원세균(metal reducing bacteria)이 알려져 매개체 없이 전자전달이 가능^{2,3)}하게 된 후 이에 관한 연구가 많이 진행되어왔다. 이런 매개체 없이 전자전달이 가능한 미생물을 전기화학적 활성미생물(electrochemically active bacteria, EAB)이라고 한다.^{5,6)} 이것은 외막에 존재하는 시토크롬(Cytochrome) C 등 여러 가

† Corresponding author E-mail: sangjoon@pusan.ac.kr Tel: 051-510-2268 Fax: 051-514-1778

지 전자 전달계를 통하여 세포 표면으로 특정한 전극으로 전자를 전달하여 환원시키므로 매개체를 필요로 하지 않는다. 이런 EAB에 대한 연구가 여러 그룹에서 진행되어 왔다. 많은 연구 결과를 보면 퇴적물 또는 슬러지로부터 농화배양시킨 연료전지의 전극에서 많은 미생물들이 분포하였다. 대표적인 EAB들로는 철 환원 미생물(Fe(III)-reducing bacteria, FRB)인 *Clostridium butyricum*,⁵⁾ *Rhodospirillum rubrum*,⁶⁾ *Enterococcus gallinarum*,⁶⁾ *Geobacter*,⁸⁻¹⁰⁾ *Shewanella*^{11,12)} 및 Sulfate-reducing bacterium인 *Desulfotomaculum reducens*¹³⁾ 등이 많이 알려져 있다. 본 연구에서는 비배양적인 방법인 fluorescent *in situ* hybridization (FISH)를 이용하여 다양한 sediment 중에 서식하는 EAB들을 MFC에서 농화배양 전과 후의 그룹별 미생물 군집 분포 특성을 비교하였으며, 또한, 이를 배양시킨 후 16S rRNA sequencing을 이용하여 종 동정을 함으로써, EAB 종별 MFC에서의 전류 생산능을 파악하기 보다는 MFC에 적합한 미생물 군집을 파악하는 것이 그 목적이다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. Sediment 시료 채취와 인공폐수 생성

2009년 4월에 부산 낙동강 하구에 위치한 을숙도, 회동저수지 및 부산 기장 상수원 보호구역 내의 퇴적물들을 채취하여 MFC의 접종원으로 사용하였으며, 각각의 sediment가 접종된 MFC의 작동을 위해 인공폐수를 사용하였다. 인공폐수는 15 mg/L KH₂PO₄, 30 mg/L (NH₄)₂SO₄, 50 mg/L MgSO₄ · 7H₂O, 3.75 mg/L CaCl₂, 0.25 mg/L FeCl₃ · 6H₂O, 5.0 mg/L MnSO₄ · H₂O, 105 mg/L NaHCO₃의 basal solution과 trace mineral solution (10 mL/L)으로 구성되며, 여기에 glucose와 glutamic acid의 양을 조절하여 BOD 농도를 220±20 mg/L 및 pH를 7.0±0.2로 조절하였다.¹⁴⁾

2.2. MFC 시스템 구성 및 농화배양

MFC 시스템의 구성은 MFC, 저항기(resistor, Korbi Co. Ltd, Korea), multimeter (Model 2700, Keithley Co. USA), 데이터 수집기 및 인공폐수를 공급하는 펌프로 구성하였고, MFC는 음극, 양극 및 양이온 교환막으로 구성되며, 전극은 graphite felts (GF series, Electrosynthesis, Lancaster, NY, USA)를 사용하였고, 양이온 교환막은 Nafion 424 (30×70 mm; Dupont, Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. 전기신호는 120초에 한번씩 multimeter와 DMM monitoring program (Korbi, Seoul, Korea)을 이용하여 PC에서 측정·저장하였다.

3곳에서 채취된 퇴적물들을 3개의 MFC의 음극부에 각각 주입한 후 약 24시간 동안 open circuit 상태로 발생하는 전기량을 모니터링하였으며, 24시간 후 저항기를 이용하여 200 Ω의 저항을 음극과 양극에 연결한 후 음극에는 BOD 220 mg/L (pH 6.8~7.2)의 인공폐수를 1 mL/min의 유속으로 매 시간당 20분 동안 간헐적으로 주입하였고, 양극부

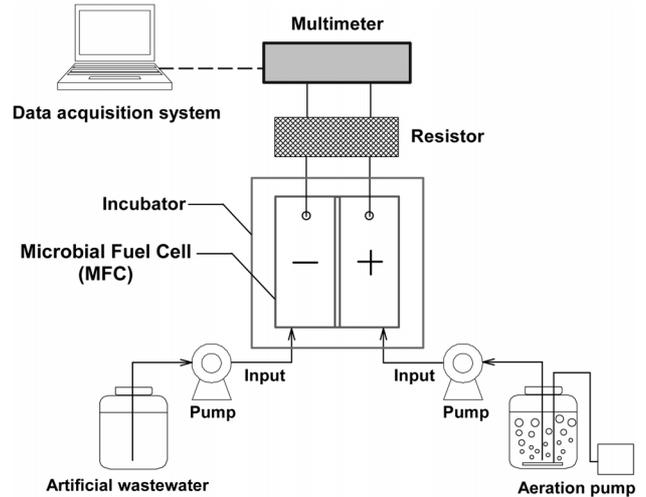


Fig. 1. The schematic diagram of MFC system.

에는 1 mL/min의 유속으로 공기로 포화된 증류수를 주입하여 음극과 양극의 전압차를 일정하게 유지하면서 실험기간 동안 농화배양하였다. 각각의 MFC에서 발생하는 전류는 multimeter에 수집되어 PC에 자동적으로 전송된다. 농화배양은 35°C의 항온배양기(HB-103S, Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 실시하였다.

2.3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 관찰^{15,16)}

농화배양 전·후의 미생물 군집을 관찰하기 위해 농화배양 전의 채취된 각각의 퇴적물들과 농화배양 후의 각각의 MFC 음극부의 전극들을 각각 1 g씩 취하여 멸균된 pH 7의 phosphate buffered saline 용액 (PBS) 9 mL에 투입하였다. 각각의 시료가 함유되어 있는 PBS 용액에서 1 mL를 분취하여 3 mL의 4% paraformaldehyde/PBS solution으로 4°C에서 16시간 고정하였다. 고정된 시료를 4°C, 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거를 PBS로 세척하였고, 그 작업을 3회 반복하였다. 전처리된 거친 고정된 시료 각 1 mL 씩을 polycarbonate membrane (diameter, 47 mm; pore size, 0.20 μm; type GTTP 4700; Millipore, Eschborn, Germany)으로 여과하여 50%, 80%, 100%의 에탄올에 순차적으로 각 3분씩 처리한 후 공기 중에서 건조시켰다. Table 1에는 FISH 관찰을 위해 13개의 probe들을 사용하였으며, 총 10개의 그룹들이 측정된다. 각각의 probe를 균체가 부착된 polycarbonate membrane에 떨어뜨린 후 46°C에서 90분 동안 혼성화시켰다. 그 후 48°C에서 미리 예열된 washing buffer에서 15분 동안 세척시킨 후 건조시켜 confocal laser scanning microscopy (LSM 510, ZEISS, Germany)를 통해 확인하였다.

2.4. 16S rRNA sequencing

MFC의 농화배양 후 전극에 부착되어 있는 EAB들의 동정을 위해 전극에 부착된 미생물들을 탈리시켜 LB agar에서 배양하여 단일 콜로니를 채취하여 colony PCR을 한 후,

Table 1. Characteristics of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Probe sequence (5'-3')	Specificity	Ref.
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	α subclass of <i>Proteobacteria</i>	15)
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	β subclass of <i>Proteobacteria</i>	15)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	γ subclass of <i>Proteobacteria</i>	15)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	15)
CF319b	TGGTCCGTATCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	15)
Aca23a	ATCCTCTCCCATACTCTA	<i>Acintobacter</i> spp.	17)
PLA46	GACTTGCATGCCTAATCC	<i>Planctomycetes</i>	18)
HoAc1402	CTTTCGTGATGTGACGGG	<i>Acidobacter</i>	19)
Cyan785	CTACTGGGGTATCTAATCC	<i>Cyanobacteria</i>	20)
DSV698	GTTCTCCAGATATCTACGG	<i>Desulfovibrio</i> spp.	21)
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)

universal primer set (27F, 1492R, Solgent, Korea)를 이용하여 PCR 분석기 (PCR Thermal cycler, Takara, Japan)를 사용하여 분석하였다.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

MFC의 농화배양 후 전극을 전처리 하고 백금으로 코팅을 한 후,⁵⁾ S3500N (Hitachi, Japan)을 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Sediment의 미생물 군집분석

FISH법을 이용하여 채취한 sediment의 미생물 군집을 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 낙동강, 회동저수지 및 기장에서 채취한 sediment 모두에서 α -*Proteobacteria* 그룹(α 그룹)이 $7.4\sim 8.5\times 10^9$ cells/g 정도로 나타나 가장 높은 우점비율을 나타내었고, *Acidobacteria*와 *Cyanobacteria*의 경우도 각각 $6.9\sim 7.5\times 10^9$ cells/g과 $3.8\sim 6.9\times 10^9$ cells/g으로 우

점을 보였다. β -*Proteobacteria* 그룹(β 그룹)은 기장의 경우만 4.4×10^9 cells/g으로 높게 나타났고, 낙동강과 회동저수지에서는 $0.6\sim 1.6\times 10^9$ cells/g으로 비교적 낮은 분포를 보였다. γ -*Proteobacteria* 그룹(γ 그룹)은 낙동강에서만 6.3×10^9 cells/g 정도로 높은 분포를 보였으며 기장과 회동저수지의 경우는 낮게 분포하였다. *Acintobacter* spp.는 3군데 퇴적물에서 약 0.5×10^9 cells/g으로 낮은 분포를 보였고, *Planctomycetes*는 낙동강에서만 약간 나타날 뿐 회동과 기장에서는 거의 발견되지 않았다. *Desulfovibrio* spp.와 *Firmicutes*의 생체량은 약 2.0×10^9 cells/g를 보였으며, 유사한 분포를 보였다. *Bacteroidetes*는 $1.8\sim 3.8\times 10^9$ cells/g의 생체량을 나타내었으며, 낙동강에서 가장 많은 분포를 나타내었다.

Sediment에서의 미생물 군집 분포의 경우 수질, 수온, 수심 및 지역 등과 같은 다양한 환경에 의해 많은 차이^{23,24)}를 보이지만 본 연구에 사용된 3 종류의 sediment은 β 그룹과 γ 그룹의 경우에만 약간의 차이를 나타낸 반면 전체적인 분포 특성은 거의 유사한 패턴을 보였으며, 이러한 이유는 시료 채취시기가 동일하였으며, 채취장소도 부산근교이기

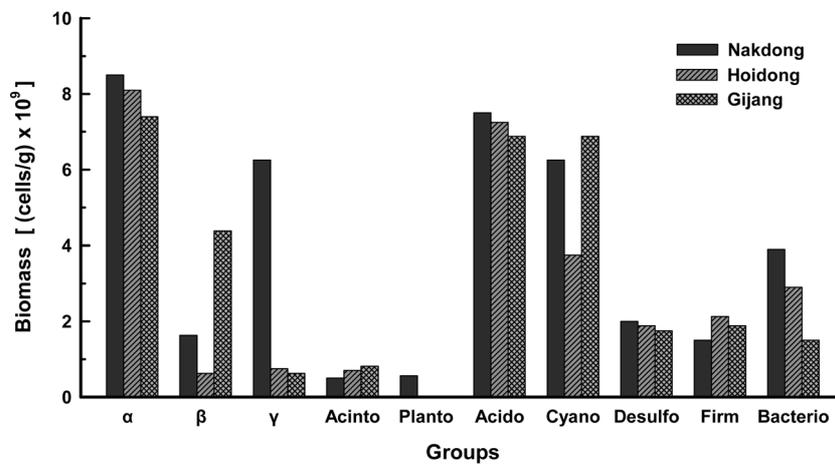


Fig. 2. Bacterial community structure in sediments by FISH analysis. (α : α -*proteobacteria*, β : β -*proteobacteria*, γ : γ -*proteobacteria*, Acinto: *Acintobacter* spp., Planto: *Planctomycetes*, Acido: *Acidobacteria*, Cyano: *Cyanobacteria*, Desulfo: *Desulfovibrio* spp., Firm: *Firmicutes*, Bacterio: *Bacteroidetes*)

때문으로 여겨진다.

3.2. MFC 농화배양 및 운전

각각의 sediment를 각각의 MFC에 주입한 후에 open circuit 상태에서 나타난 최대전압 (V)은 낙동강이 약 0.6 V로 나타났으며, 회동과 기장은 각각 약 0.5 V와 0.45 V로 나타나 퇴적물 내 EAB들의 존재를 확인할 수 있었고, sediment를 MFC에 주입하고 24시간 후부터 음극과 양극 사이에 200 Ω의 저항을 걸어주고, 배지공급을 하며 농화배양을 시작하였다. 이후의 실험기간 동안 농화배양이 진행될수록 전류의 생산량이 점진적으로 증가하는 것을 current profile을 통해 볼 수 있다. 농화배양 시작 10일경부터 각각의 MFC에서 생산되는 전류값이 0.15~0.24 mA ((a)기장), 0.12~0.22

mA ((b) 낙동강) 및 0.10~0.18 mA ((c) 회동)로 안정된 패턴을 나타내었다. 각각의 MFC가 안정된 전류생산 단계에 들어선 이후에 기장, 낙동강 및 회동의 sediment를 접종한 각각의 MFC에서 생산된 최대 전류값은 각각 0.24 mA, 0.22 mA 및 0.18 mA로 나타나 MFC 접종원으로 사용된 sediment의 종류에 따라 MFC에서의 전류 생산능은 약간의 차이를 나타내었다.

각각의 sediment를 접종한 MFC가 안정적인 전류생산 단계에 접어든 이후(농화배양 시작 10일경)에 생산된 전류값 peak 10개를 선택하여 분석한 결과를 Fig. 4(기장)에 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 최대 생산 전류값은 0.24 mA였고, 단위 시간당 전류 생산능을 나타내는 지표인 coulombic yield (CY)는 0.61 C로 나타났다. 기장, 낙동강 및

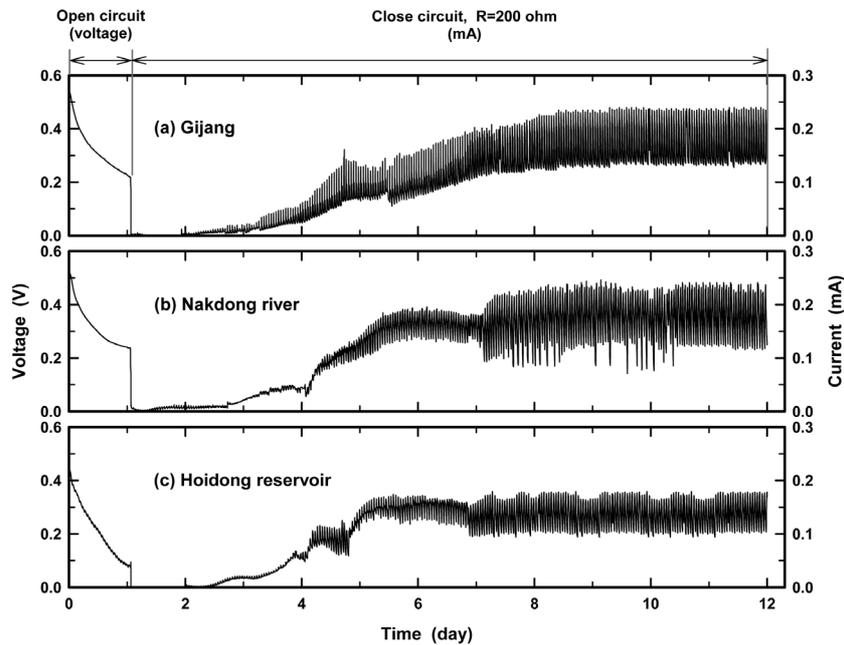


Fig. 3. The signal trends from the microbial fuel cells inoculated three sediments during the enrichment procedure.

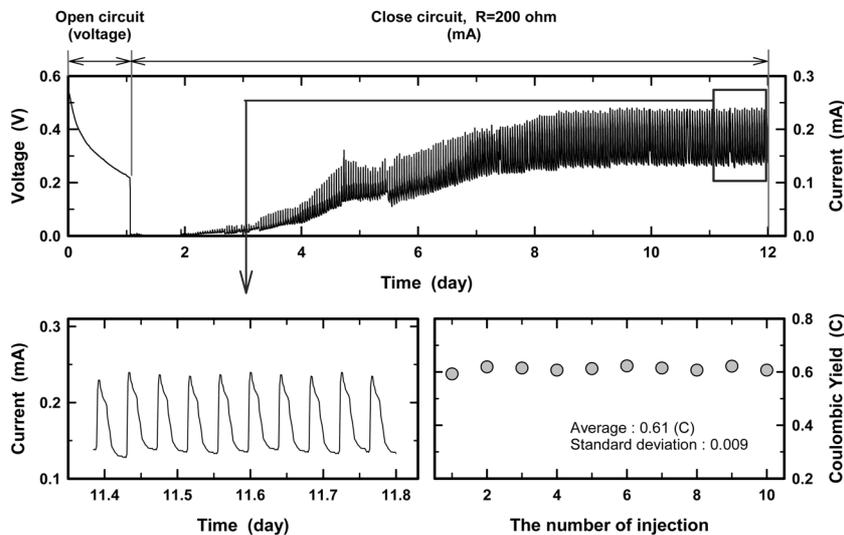


Fig. 4. The signal trends from the microbial fuel cells inoculated Gijang sediment during the enrichment procedure.

Table 2. Comparison of coulombic yields according to the sediment sources

Sampling sites	Coulombic Yield	
	Average (C)	Standard Deviation (C)
Gijang	0.61	0.009
Nakdong river	0.64	0.02
Hoidong reservoir	0.50	0.009

회동의 퇴적물을 접종한 각각의 MFC에서 CY를 구한 것을 Table 2에 나타내었다. 기장의 경우는 0.61 C, 낙동강 및 회동의 경우는 각각 0.64 C 및 0.50 C로 나타나 낙동강의 퇴적물을 접종한 MFC가 가장 전류 생산능이 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로 기장, 회동 순이었다. 그러나 피크의 패턴을 보면 낙동강에서 채취한 퇴적물을 접종한 MFC는 운전 10일경을 전후하여 가장 불안정한 피크 패턴을 나타낸 반면 기장, 회동은 안정화된 피크 패턴을 나타내었다. 그리고 각각의 퇴적물을 MFC에 접종한 후 10일 정도의 농화배양으로 CY의 값이 안정적으로 나타나 전극에 부착된 EAB들이 정상상태에 도달한 것을 확인할 수 있었다.

3.3. MFC 내의 미생물 군집분포

EAB들이 정상상태에 도달한 운전시작 12일경에 전극을

분리하여 SEM과 CLSM을 이용하여 전극표면에 부착된 EAB들을 관찰한 것을 Fig. 5에 나타내었으며, Fig. 5(a)는 농화배양 전의 전극 표면을 SEM으로 관찰한 것으로 농화배양 전에는 매끈하고 깨끗한 전극의 모습이 관찰되었다. 농화배양 후에는 전극의 표면에 EAB들이 biofilm을 형성하고 있는 것을 Fig. 5(b)와 (c)에서 확인할 수 있었다.

각각의 sediment에 대해 MFC에서 농화배양 전·후의 미생물 군집분포 변화를 Fig. 6에 나타내었다. α 그룹은 sediment에서는 가장 많은 분포를 나타내었지만(Fig. 2), 각각의 MFC를 농화배양한 후에는 생체량의 변화가 거의 없었다. 그러나 β 그룹과 γ 그룹의 경우는 농화배양 후에 각각 45~90% 및 50~90% 정도의 생체량 증가를 나타내었다. 또한, *Acidobacteria*는 농화배양 이후에도 40~80% 정도 생체량의 상승을 보였으며, *Firmicutes*도 45~125%의 생체량 상승을 보였다. 이 그룹들은 생체량의 증가로 보아 채취된 sediment에는 많은 EAB종들을 포함 할 것으로 사료된다. *Acinetobacter*는 농화배양 이후의 생체량이 낙동강의 경우 생체량이 농화배양 전의 80% 정도로 나타났고, 회동과 기장에서는 10% 이내로 감소하였다. *Plantomycetes*의 경우도 농화배양 전에도 낮은 분포를 보였고, 농화배양 이후에도 전과 비교하여 50% 이하로 감소하였다. *Desulfovibrio* spp.는 퇴적물 상태와 비교해서 약 30% 이하로 감소하였으며, *Bacter-*

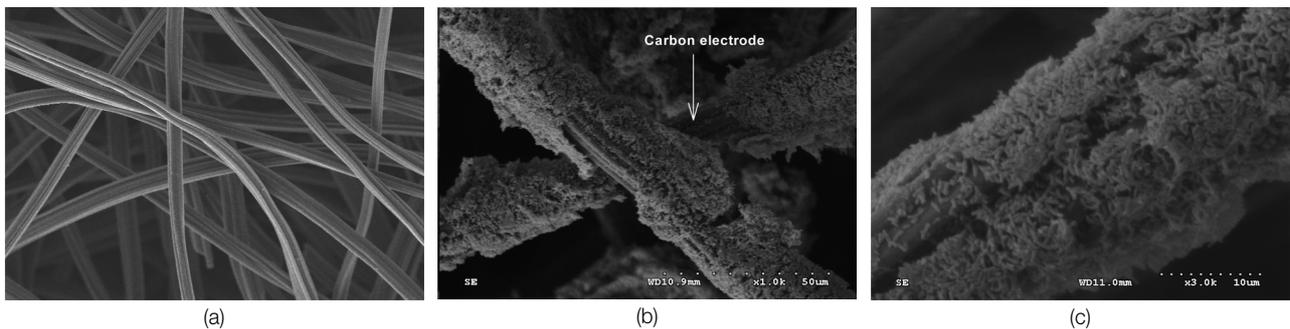


Fig. 5. SEM images of the electrodes before (a) and after enrichment (b, c) using sediments.

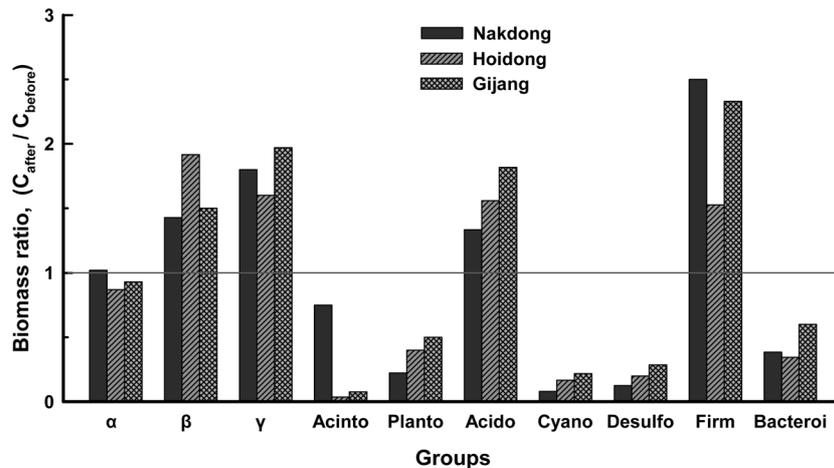


Fig. 6. Comparison of bacterial community structure before and after enriched culture in sediments by FISH analysis. (α: α-proteobacteria, β: β-proteobacteria, γ: γ-proteobacteria, Acinto: *Acinetobacter* spp., Planto: *Plantomycetes*, Acido: *Acidobacteria*, Cyano: *Cyanobacteria*, Desulfo: *Desulfovibrio* spp., Firm: *Firmicutes*, Bacteroi: *Bacteroidetes*)

*oidetes*는 농화배양 이후에 50% 이하로 떨어졌다. 농화배양 전과 비교하여 농화배양 후에 생체량이 감소한 그룹들은 EAB들의 분포가 적거나 없는 그룹들일 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

3.4. MFC의 미생물 동정

농화배양된 MFC에 부착된 EAB들을 16S rRNA sequencing을 이용하여 동정한 결과를 Fig. 7(a)~(c)에 나타내었다. 낙동강과 기장의 sediment를 접종원으로 사용한 MFC의 경

우는 6개 미생물종이 각각 동정되었으며, 회동과에서는 5개의 종이 동정되었다. 먼저 낙동강의 경우를 보면 α 그룹에 속하는 *Roseomonas* sp. (SN5), *Azospillum* sp. (SN6)와 γ 그룹에 속하는 *Frateria* sp. (SN1), *Dyella* sp. (SN2) 및 *Enterobacter* sp. (SN3), *Deinococci* 그룹에 속하는 *Deinococcus* sp. (SN4)가 동정되었다. 기장의 결과에서는 α 그룹인 *Azospillum* sp. (SG6)와 β 그룹인 *Delftia* sp. (SG1)와 *Ralstonia* sp. (SG2)가 동정되었고, γ 그룹인 *Klebsiella* sp. (SG3), *Deinococci* 그룹인 *Deinococcus* sp. (SG4, SG5)가 존재하였

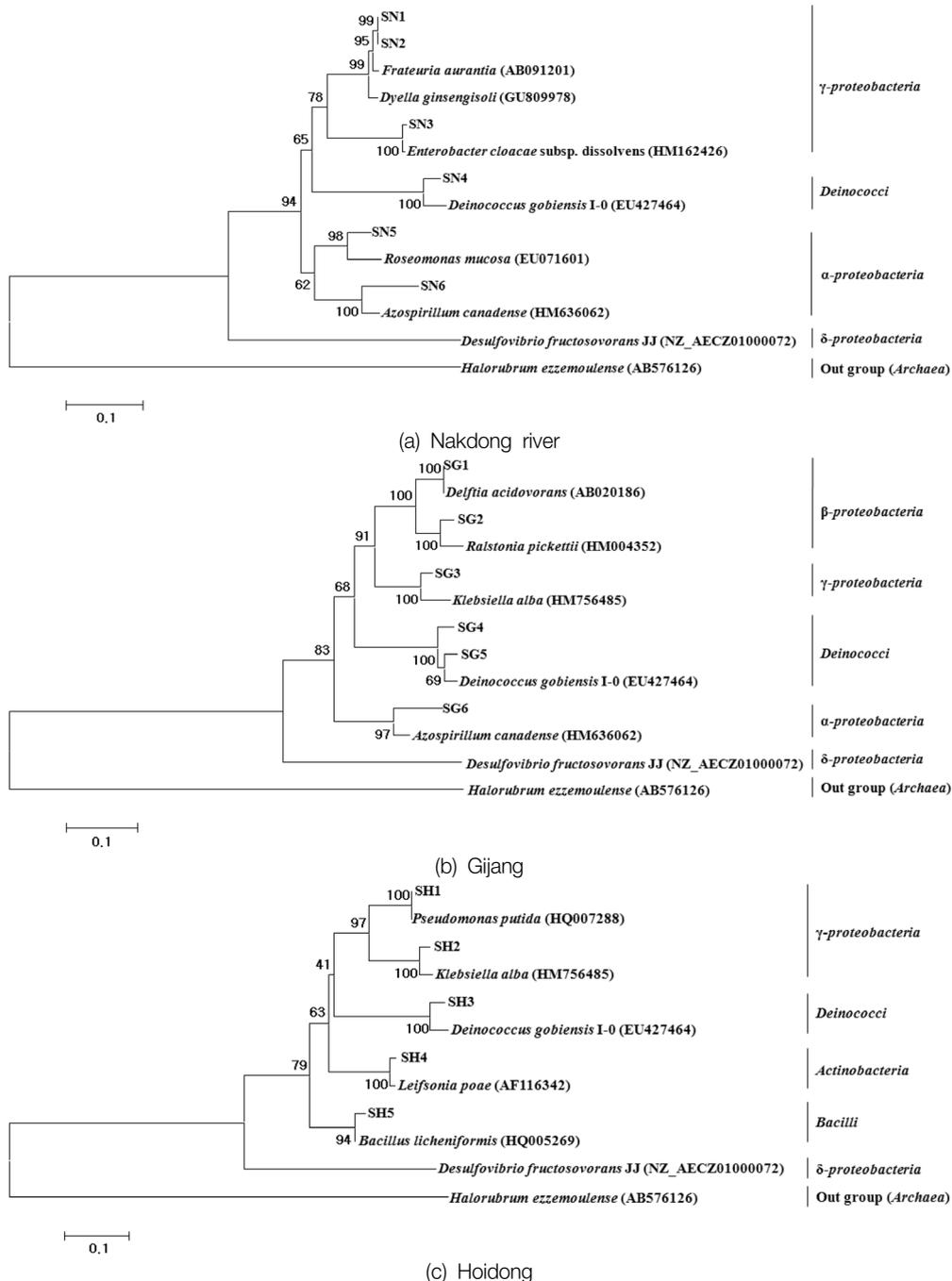


Fig. 7. Neighbor-joining trees showing phylogenetic relationships of 16S rDNA sequences clones from MFC with sediments to closely related sequences from GenBank. The scale bars on the bottom indicate the distances between sequences.

다. 회동의 경우는 γ 그룹인 *Pseudomonas* sp. (SH1)와 *Klebsiella* sp. (SH2)와 *Deinococci* 그룹인 *Deinococcus* sp. (SH3), Actinobacteria 그룹인 *Leifsonia* sp. (SH4), Bacilli 그룹인 *Bacillus* sp. (SH5)가 동정되었다.

비배양적 분석법인 FISH 결과와 배양적 분석법인 16S rRNA sequencing 결과를 비교해보면 γ 그룹의 경우 낙동강의 결과에서는 FISH 결과가 1.5~2배 정도 증가하여 16S rRNA sequencing에 의해 동정된 *Frateruia* sp., *Dyella* sp. 및 *Enterobacter* sp.가 생체량의 증가를 가져온 것으로 판단되며, 회동과 기장의 결과에서는 EAB로 많이 알려진 *Pseudomonas* sp.와 *Klebsiella* sp. 및 *Klebsiella* sp.가 동정되어 γ 그룹의 생체량의 증가를 가져온 것으로 보인다.

β 그룹의 경우는 낙동강과 회동에서는 16S rRNA sequencing에 의해 β 그룹의 미생물들은 동정되지 않았으나 기장에서는 *Delftia* sp.와 *Ralstonia* sp.가 검출되었다. 또한, 농화배양 후에 생체량이 증가한 *Acidobacteria* 그룹과 *Firmicutes* 그룹에서는 16S rRNA sequencing에 의해 동정되지 않았다. 또한, 특이하게 FISH 결과에서는 검출되지 않은 그룹인 *Deinococci* 그룹에 속하는 *Deinococcus* sp.가 3군데 모두에서 동정되었다.

4. 결론

낙동강, 회동 및 기장에서 채집한 sediment를 이용하여 MFC 농화배양 전·후의 전기 활성 박테리아 분포 특성을 FISH와 16S rDNA를 이용하여 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 낙동강, 회동 및 기장에서 채집한 sediment의 미생물 군집을 FISH 분석을 통하여 조사한 결과, α 그룹, *Acidobacter* 그룹 및 *Cyanobacter* 그룹의 분포비율이 가장 높았으며 전체적으로 서로 유사한 분포 특성을 나타내었다.

2) 각각의 sediment를 접종한 MFC 농화배양 이후의 coulombic yield는 낙동강, 회동 및 기장의 경우 각각 0.64 C \pm 2%, 0.50 C \pm 0.9%, 0.61 C \pm 0.9%로 나타났으며, 농화배양 완료 후의 미생물 군집분포는 β 그룹, γ 그룹, *Acidobacter* 그룹 및 *Firmicutes* 그룹이 농화배양 전보다 각각 45~90%, 50~90%, 40~80% 및 45~125% 정도 생체량이 증가한 것으로 나타났다.

3) 농화배양이 끝난 후 16S rDNA를 이용한 미생물 동정 결과에서 낙동강 sediment를 주입한 MFC의 경우는 α 그룹의 속하는 *Roseomonas* sp., *Azospillum* sp.와 γ 그룹의 *Frateruia* sp., *Dyella* sp., *Enterobacter* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococcus* sp.가 동정되었고, 기장은 α 그룹의 *Azospillum* sp.와 β 그룹의 *Delftia* sp., *Ralstonia* sp.와 γ 그룹의 *Klebsiella* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococcus* sp.가 동정되었으며, 회동은 γ 그룹의 *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.와 *Deinococci* 그룹의 *Deinococci* sp.와 *Actinobacteria* 그룹의

Leifsonia sp.와 *Bacilli* 그룹의 *Bacillus* sp.가 동정되었다.

참고문헌

1. Park, D. H. and Zeikus, J. D., "Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1292~1297(2000).
2. Kim, H. J., Park, H. S., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, M. and Kim, B. H., "A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*," *Enzyme. Microb. Technol.*, **30**, 145~152(2002).
3. Kim, T. S. and Kim, B. H., "Modulation of *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically supplied reducing equivalent," *Biotechnol. Lett.*, **10**, 123~128(1998).
4. McKinlay, J. B. and Zeikus, J. G., "Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3467~3474 (2004).
5. Park, H. S., Kim, B. H., Kim, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Kim, M., Chang, I. S., Park, Y. K. and Chang H. I., "A novel electrochemically active and Fe(III) reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a bacterial fuel cell," *Anaerobe*, **7**, 297~306(2001).
6. Kim, G. T., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, H. J., Park, H. S., Kim, B. H., Kim, S. M. and Wimpenny, J. W. T., "Dissimilatory Fe(III) reduction by electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil," *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 978~987(2005).
7. Chaudhuri, S. K. and Lovley, D. R. "Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells," *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1229~1232(2003).
8. Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A. and Goodwin, S., "*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(1993).
9. Caccavo, F., Coates, J. D., Rossello-Mora, R. A., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Lovley, D. R. and McInerney, M. J. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium," *Arch. Microbiol.*, **165**, 370~376(1996).
10. Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. and Lovley, D. R. "Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments," *Science*, **295**, 483~485(2002).
11. Lovley, D. R., Phillips, E. J. P. and Lonergan, D. J. "Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 700~706(1989).
12. Lovley, D. R., Caccavo, F. and Phillips, E. J. P., "Acetate oxidation by dissimilatory Fe(III) reducers," *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3205~3206(1992).

13. Tebo, B. M. and Obraztsova, A. Y. "Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors," *FEMS Microbiol. Lett.*, **162**, 193~198 (1998).
14. Kim, B. H., Park, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Chang, I. S., Lee, J. and Phung, T. N., "Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel cell type electrochemical cell," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 672~681 (2004).
15. Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Scheleifer, K., "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(5), 1520~1525(1993).
16. Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R., "Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(8), 3721~3726(1999).
17. Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K. H., "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge," *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(3), 792~800 (1994).
18. Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. and Scheleifer, K., "Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes," *Microbiol.*, **144**, 3257~3266(1998).
19. Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. and Wagner, M., "The Microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA Approach," *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**, 84~99(2002).
20. Nu'bel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G., "PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3327~3332(1997).
21. Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R. and Szewzyk, U., "Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **25**, 43~61(1998).
22. Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., "Specific oligonucleotide probes for In situ detection of a major group of gram-positive bacteria with Low DNA G+C content," *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 186~196(1999).
23. Rusch, A., Huettel, M., Reimers, C. E., Taghon, G. L. and Fuller, C. M., "Activity and distribution of bacterial populations in Middle Atlantic Bight shelf sands," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**, 89~100(2003).
24. Wobus, A., Bleul, C., Maassen, S., Scheerer, C., Schuppler, M., Jacobs, E. and Röske, I., "Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **46**, 331~347 (2003).