

가축분뇨를 이용한 미생물연료전지의 농화배양 단계에서 미생물 군집 변화 Microbial Communities of the Microbial Fuel Cell Using Swine Wastewater in the Enrichment Step with the Lapse of Time

장재경[†] · 홍선화* · 유영선 · 이은영* · 장인섭** · 강연구 · 김종구
Jae Kyung Jang[†] · Sun Hwa Hong* · Youg Sun Ryou · Eun Young Lee*
In Seop Chang** · Young Koo Kang · Jong Goo Kim

국립농업과학원 농업공학부 에너지환경공학과

*수원대학교 환경에너지공학과 · **광주과학기술원 환경공학과

Energy and Environmental Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

*Department of Environmental and Energy, The University of Suwon

**Department of Environmental Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology

(2013년 11월 7일 접수, 2013년 12월 5일 채택)

Abstract : These studies were attempted to investigate the change of microbial community of anode of microbial fuel cell using swine wastewater in the enrichment step with the lapse of time. Microbial fuel cells enriched by a 1 : 1 mixture of anaerobic digestive juices of the sewage treatment plant and livestock wastewater. Enrichment culture step was divided into three stages to indentify the microorganisms. It was separated by each lag phase, exponential phase, and stationary phase. These steps were determined by the change of the current value. The current after enrichment was generated about 0.84 ± 0.06 mA. We were cut out the different 17 bands in the DGGE fingerprint gel to do sequencing. The bands which the concentration was increasing or newly appearing with the lapse of time were included for this study. In the lag and exponential phase, *Clostridium*, *Rhodocyclaceae*, *Bacteroidetes*, and Uncultured bacterium etc. were detected. There were in the stationary phase *Geobacter* sp., *Rhodocyclaceae*, *Candidatus*, *Nitrospira*, *Flavobacteriaceae* and *uncultured bacterium* etc. *Geobacter* among microorganisms detected in this study is known as the Electrochemically active microorganisms. It may include electrochemically active microorganisms to be considered as electrical activity microorganisms.

Key Words : Microbial fuel cell (MFC), Enrichment Step, Microbial Community, Electrochemically Active Microorganisms

요약 : 이 연구는 전기화학적 활성을 갖는 미생물들을 알아내기 위하여 농화배양 단계에서 시간에 따라 미생물연료전지의 미생물 군집 변화를 알아본 것이다. 집종원으로 하수처리장 혐기 소화액와 가축분뇨를 1 : 1로 혼합한 액을 사용하였다. 농화배양 과정에서 미생물 생장곡선에 따라 지체기, 대수성장기 그리고 정지기로 전류발생 패턴을 보면서 구분하였다. 전류가 안정적으로 발생하는 시점을 농화배양이 끝난 시점으로 판단하였으며, 이때 전류는 0.84 ± 0.06 mA가 발생되었다. 농화배양이 되어 가는 과정에서 미생물군집 변화를 전기영동(DGGE)에서 확인하여 시간에 따라 새롭게 나타나는 band나 농도가 높아지는 band 17개를 잘라내어 염기서열을 분석하였다. 이 결과 지체기와 대수성장 단계에서는 *Clostridium*, *Rhodocyclaceae*, *Bacteroidetes* 그리고 *Uncultured bacterium* 등이 검출되었고, 정지기에서는 *Geobacter* sp., *Rhodocyclaceae*, *Candidatus*, *Nitrospira*, *Flavobacteriaceae*, 그리고 *Uncultured bacterium* 등이 검출되었다. *Geobacter*의 경우는 이미 전기활성 미생물로 알려져 있는 미생물 종류로 이를 포함하여 이 연구에서 검출된 다른 미생물들 중에도 전기활성이 있는 미생물을 포함하고 있을 것으로 판단된다.

주제어 : 미생물연료전지, 농화배양, 미생물군집, 전기화학적 활성 미생물

1. 서론

최근 미생물연료전지의 전류발생 향상 및 메커니즘을 구명하기 위한 다양한 연구가 시도가 되고 있다.¹⁻⁵⁾ 이 중 하나가 전기화학적 활성미생물의 전기전달 메커니즘을 구명하는 것이다. 이것은 미생물로부터 전극으로 전자가 전달되는 과정을 파악하기 위한 것으로,⁶⁻⁸⁾ 전기화학적으로 활성을 갖는 미생물들을 알아내는 것이 우선되어야만 한다. 따라서 다양한 기질(폐수)과 환경에서 미생물연료전지를 운전하면서 여기에 관여하는 미생물들이 어떤 미생물들인지, 또한 전기화학적으로 활성이 있는 미생물은 어떤 것인지를

알아내기 위한 연구가 여러 그룹에서 진행되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 이들 연구 그룹에서 발표된 공통적인 결과는 *uncultured bacterium*과 α -, β -, γ -, 그리고 δ -*proteobacteria*가 높은 비율로 포함되어 있었으며, 이외 *Firmicute*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 등이 관여하고 있다는 것이다.⁷⁻¹³⁾ 이것은 분류학 계층 중 문(Phylum)에 해당하는 것으로 종까지 전기활성미생물로 알려져 있는 미생물은 *Geobacter sulfurreducens*와 *Shewanella putrefaciens* 등 몇 종류 되지 않는다.⁷⁾

이러한 결과는 실제 폐수뿐 만 아니라 glucose, acetate와 같은 인공폐수를 이용하는 미생물연료전지를 운전하여 농화배양된 미생물을 대상으로 유전자분석 기법인 16S rDNA 기

[†] Corresponding author E-mail: jkjang1052@korea.kr Tel: 031-290-1815 Fax: 031-290-1840

법 및 전기영동법(denaturing and thermal gradient gel electrophoresis, DGGE) 등을 이용하여 분석되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 그러나 이들 미생물연료전지에 관여하는 미생물이 너무 많아 전기화학적 활성미생물을 구명하기가 용이하지 않았다.^{11,17)} 그래서 Jang 등은 Propionate를 이용하는 syntrophic bacteria를 농화 배양하여 균집 분석을 하였다. 그러나 이때도 마찬가지로 많은 미생물이 관여하기 때문인 것으로 나타나 미생물연료전지 음극부에서 전기활성 미생물을 파악하는 것에는 어려움이 있었다.¹⁷⁾ 이것은 미생물연료전지의 음극부내 존재하는 미생물들이 기질의 종류와 그의 부산물들과 서로 유기적으로 연관되어 매우 복잡하고 각 단계에 다른 종류의 미생물들이 관여하는 것으로 판단된다. 즉, 어떤 미생물은 고분자 탄소원을 이용하고, 이들이 대사하면서 발생한 저분자 탄소원을 이용하는 미생물들이 있으며 이들이 유기적으로 연결되어 복잡한 미생물군집을 이루고 있는 것으로 판단된다. 따라서 Jang⁸⁾은 이전의 연구 결과와 달리 농화 배양 단계에서 미생물들이 탄소기질 이용도에 따라 미생물군집 구조의 변화를 발표하였다.

본 연구는 Jang⁸⁾의 연구(2012)결과를 바탕으로, 농화 배양단계에서 지체기, 대수성장기 그리고 정지기로 구분하여 음극부내 전극의 미생물 군집의 유사도 및 미생물군집 변화를 알아보기 위한 것이다. 이것은 지체기에서 정지기로 가면서 농도가 높아지거나 새롭게 출현하는 band들 중에 전기에너지를 발생하는데 관여하는 전기화학적 활성이 있는 미생물을 포함할 가능성이 높기 때문이다. 따라서 이 연구에서는 각 단계에서 미생물군집 변화를 전기영동 기법을 이용하여 확인한 후 각 단계의 band 패턴을 비교 분석하고, 염기서열 분석을 적용하여 전기화학활성 미생물 군집을 확인하고자 하는 것이다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 미생물연료전지 및 농화배양

미생물연료전지는 양극부와 음극부에 6 mm인 탄소전극(GF series, Electrosynthesis, Amherst, NY, USA)을 사용하였으며 양극부에는 탄소전극 표면에 백금촉매(20% platinum on Vulcan XC-72, E-TEK, NJ, USA)를 $0.73 \pm 0.01 \text{ mg/cm}^2$ 으로 로딩하여 이용하였다.^{2,8)} 펌프는 연동펌프(505S, Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, UK)를 이용하여 $0.85 \pm 0.01 \text{ mL/min}$ 의 유속으로 연속 공급하였다. 양극부에는 공기를 포화시킨 증류수를 공급하였다. 집종원으로는 중량하수처리장의 혐기소화액과 가축분뇨(1:1) 혼합한 액 100 mL를 집종액으로 사용하였으며, 여기에 phosphate buffer (1 M, 30 ml) + mineral solution (10 mL) + salt solution (10 mL)를 넣어 최종 1 L가 되도록 조절하여 이용하였다.¹⁷⁾ 저항을 50 ohm으로 연결한 상태에서 집종액을 약 12시간 동안 공급한 이후에는 가축분뇨를 300 ppm으로 희석하여 공급하였다. 펌프

는 질소가스를 공급하여 혐기 상태가 유지되도록 하였다.⁸⁾ 미생물연료전지에서 발생하는 전류값은 multimeter (Keithley Instrument Inc., Cleveland, OH, USA)를 이용하여 5분 간격으로 전압차로 측정하였으며, 측정된 전압은 $V = IR$ (V: 저항, I: 전류, R: 저항)의 공식에 따라 환산하였다. 위의 실험 방법 장⁸⁾이 발표한 실험조건과 동일하다.

2.2. 전기영동 기법을 이용한 미생물 군집 분석

농화배양 과정 중에 미생물 군집 변화는 DGGE 밴드를 이용하여 지체기에서 정지기로 가면서 새로이 나타나는 band들 또는 band density가 증가하는 밴드들을 주요대상으로 하였다. 이 외 농화 배양 되는 전체 기간에서 각 단계에서 풍부하게 존재하는 band들을 직접 젤에서 cutting하여 분자생물학적 기법을 적용하였다. 이는 전기화학적으로 활성이 있을 것으로 추측되는 band들을 대상으로 조사하였다. 이것은 genomic DNA를 추출한 후, PCR (TaKaRa PCR thermal cycle, JAPAN)을 수행하였으며, primer는 Bf341-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 Br518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 사용하였다. PCR 조건은 pre-denaturation은 95°C에서 5분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초로 하였다. 이 조건으로 28 cycle을 실행한 후에 72°C에서 5분 동안 final extension을 하였으며 PCR product는 4°C에서 보관하여 사용하였다. PCR amplicon 시료를 이용하여 다음과 같이 전기영동(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Dcode™ System, BIO-RAD, USA)을 하였다. 8% acrylamide/bis gel에 대해 40%~60%까지 formamide와 urea를 이용하여 변화를 주기 위해 총 양 20 mL에서 40% acrylamide/bis 4 mL, 50 × TAE buffer 0.4 mL, formamide와 urea는 40% denaturation에 대해 formamide 3.2 mL, urea 3.36 g, 60% denaturation에 대해 formamide 4.8 mL, urea 5.04 g을 더하였으며, 10% ammonium Persulphate와 TEMED의 최종 농도가 각각 0.65%와 0.05%가 되도록 넣어 gel을 만들어서 이용하였다. 제작된 gel에 PCR product를 20 µL에 2 X loading buffer 20 µL 첨가하여 로딩하였다. 로딩한 후 TAE 1 X buffer (Tris-Acetate 2M, EDTA 50 mM, pH 8.0)에서 60°C에서 50 V로 14시간 전기영동 하였다. DGGE band 패턴의 유사도는 UVI-band 분석 프로그램(UVI soft, UVI-band version 12.14, 영국)을 이용하여 분석하였다.¹⁸⁾

2.3. 계통도 작성

DGGE 결과로부터 대표적인 밴드들을 잘라내어 DNA를 추출한 후 염기서열을 의뢰 분석하였다. 16S rDNA sequences는 GenBank database 넣어 비교하였다. 계통도(Phylogenetic tree)를 그리기 위하여 bioedit 프로그램으로 염기서열을 편집하였고, MEGA4 프로그램을 사용하여 계통도를 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물연료전지 및 농화배양

가축분뇨를 이용하여 운전한 미생물연료전지의 미생물군집 및 전기화학적 활성미생물을 알아보기 위하여 농화배양 단계에서 미생물군집 변화를 알아보았다. 미생물 분석은 같은 조건으로 3개를 운전하여 화살표 표시한 각각의 시점인 지체기(Lag phase, L), 대수성장기(Exponential phase, E), 그리고 정지기(Stationary phase, S)에서 미생물연료전지 하나씩을 해체하여 음극부의 전극을 실험에 이용하였다(Fig. 1).

농화 배양되는 과정 중 미생물 성장곡선의 지체기, 대수성장기, 그리고 정지기 각 단계는 전류가 발생하는 양상으로 판단하였다. 이는 전류발생도 미생물 성장 곡선과 같이 S모양으로 나타나기 때문에 발생하는 전류로부터 농화 배양이 되었는지 여부를 판단하였다. 약 15일이 경과하면서 전류값이 안정적으로 발생하는 것을 확인하였으며 Fig. 1에 나타난 것과 같이 open circuit 전압은 0.69 V이었으며, 농화 배양이 된 후 전류는 약 0.84 ± 0.06 mA가 발생되었다.⁸⁾

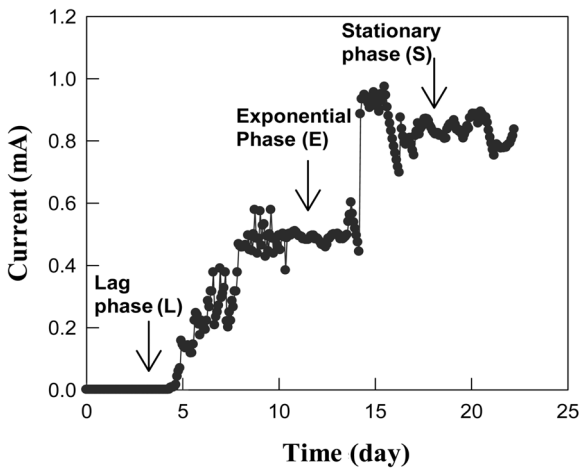


Fig. 1. Enrichment of an microbial fuel cell using swine wastewater. The reactor was inoculated with mixture of anaerobic activated sludge and swine wastewater and fed with diluted swine wastewater continuously.⁸⁾

3.2. 전기영동을 이용한 미생물 군집의 유사도 분석

각 시료의 genomic DNA를 추출하고 이를 16S rDNA-PCR로 증폭하여 전기영동(DGGE)을 하였다. 이 증폭한 genomic DNA를 이용하여 DGGE를 하여 미생물 군집의 유사도를 분석하였다(Fig. 2). 전기영동 결과, 혐기소화 슬러지를 포함하는 접종원의 미생물 다양성이 높은 것으로 나타났다. 농화 배양되어 가는 과정에서도 미생물 다양성은 접종원과 같이 높은 것으로 나타났으며, 또한 미생물 군집이 농화 배양되어 가는 각 단계에 따라 미생물군집이 달라지는 것을 확인하였다. 이때 접종원과 지체기 시료간의 유사도는 0%로, 농화 배양하는 과정에서 접종원에서 정지기로 가면서 출연하는 미생물이 크게 변화하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Jang⁸⁾이 주성분분석 PCA (Principal component analysis)을 수행하여 시간에 따른 시료간의 연관성을 분석한 결과에서도 시료의 미생물군집에 차이가 나타났는데 이 연구에서도 같은 결과를 나타냈다. 대수성장기와 정지기를 비교하였을 때도 시료간 유사도는 6%, 5%로 매우 낮은 것으로 나타났다. 즉, 각 단계에서 미생물군집이 서로 다른 미생물군집으로 시간에 따라 변화해서 농화 배양되었을 때는 접종원의 미생물 군집과는 상이해지는 것을 알 수 있었다. 또한 농화배양 되었을 때 전기화학적으로 활성이 있는 미생물들이 안정적으로 고정화 되어 있을 것이기 때문에, 미생물 군집을 비교하고 분리 배양할 수 있다면 전기화학적 활성 미생물을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

3.3. 계통도를 이용한 미생물 분석

DGGE 및 유사도 분석 결과, band가 대수성장기와 정지기로 가면서 농도가 낮아지기도 하고, 농도가 높아지는 새로운 band들이 나타나기도 하였다. Band가 지체기에서 전류발생이 안정적으로 나오는 정지기로 가면서 농도가 높아지거나 새로이 나타나는 band들은 다른 band들과 비교하여 상대적으로 전기화학적으로 활성이 있는 미생물일 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 따라서 전기화학적 활성이 있는 미생물인지를 알아보기 위하여 전기영동을 한 후 정지기로

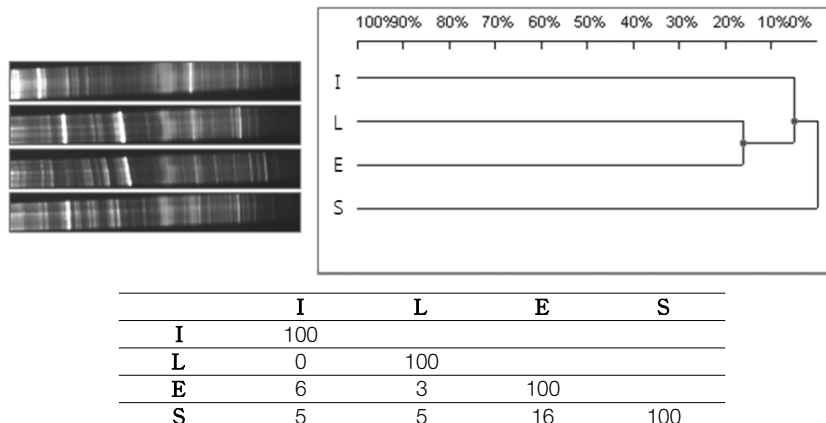


Fig. 2. Similarity analysis based on DGGE fingerprints.

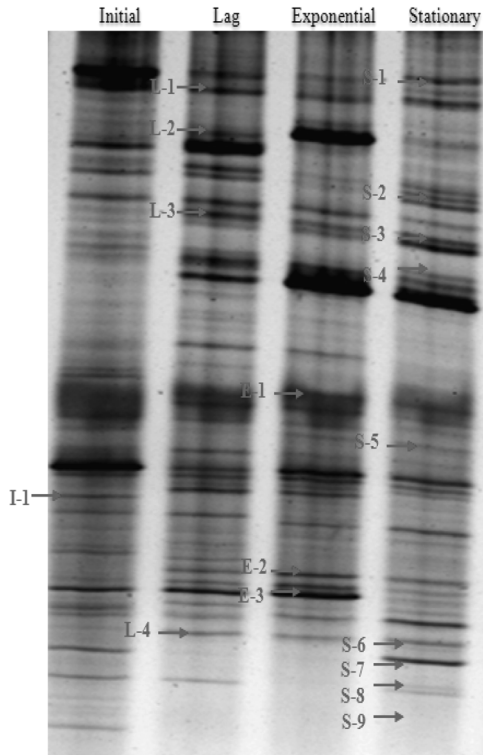


Fig. 3. Illustrating the cutting bands to do DNA sequencing.

가면서 새로이 나타나거나 또는 band density가 높아지는 것을 대상으로 band를 DGGE 젤에서 잘라내어 증폭하여 유전자 염기서열 분석을 시행하였다. 그리고 접종원으로부터 정지기까지 모든 단계에 존재하는 band는 가장 선명하고 이웃 band들과 확실히 분리되는 것 하나를 선정하여 유전자 염기서열 분석을 하였다. 계통도 작성을 위하여 잘라낸 band 들은 Fig. 3에 표시하였다.

Fig. 3에 나타난 것과 같이 DGGE fingerprint로부터 선택한 17개의 band들을 동정한 결과, 농화배양 초기 지체기와 대수성장기에는 *Clostridium*, *Rhodocyclaceae*, *Bacteroidetes*, *Uncultured bacterium* 등이 나타났으며, 정지기에는 *Uncultured bacterium*가 많았으며, 이외에 *Geobacter* sp., *Rhodocyclaceae*, *Candidatus Nitrospira*, *Flavobacteriaceae* 등이 나타났다(Fig. 4).

이 중 *Rhodocyclaceae*의 경우에는 대수 성장기와 정지기에 걸쳐 나타났으며, *Geobacter* sp.는 이미 전기화학적 활성이 있음이 알려져 있는 미생물 종인데, 가축분뇨를 이용한 본 실험에서도 존재하는 것으로 나타났다. 이 외 정지기에 나타난 미생물 군집 - *Rhodocyclaceae*, *Candidatus Nitrospira*, 그리고 *Flavobacteriaceae* - 중에 *Geobacter* sp.와 같이 전기 활성미생물들이 포함되어 있을 것으로 판단된다. 따라서 추후 이들에 속하는 단일 미생물을 이용하여 전류발생이 되는지를 확인하고 전류발생효율이 높은 미생물을 찾는 연구를 수행할 것이다. 이들 연구가 수행된다면 생물자원 확보와 함께 전기화학적 활성미생물의 전자 전달 메커니즘을 구명할 수 있을 것으로 기대된다.

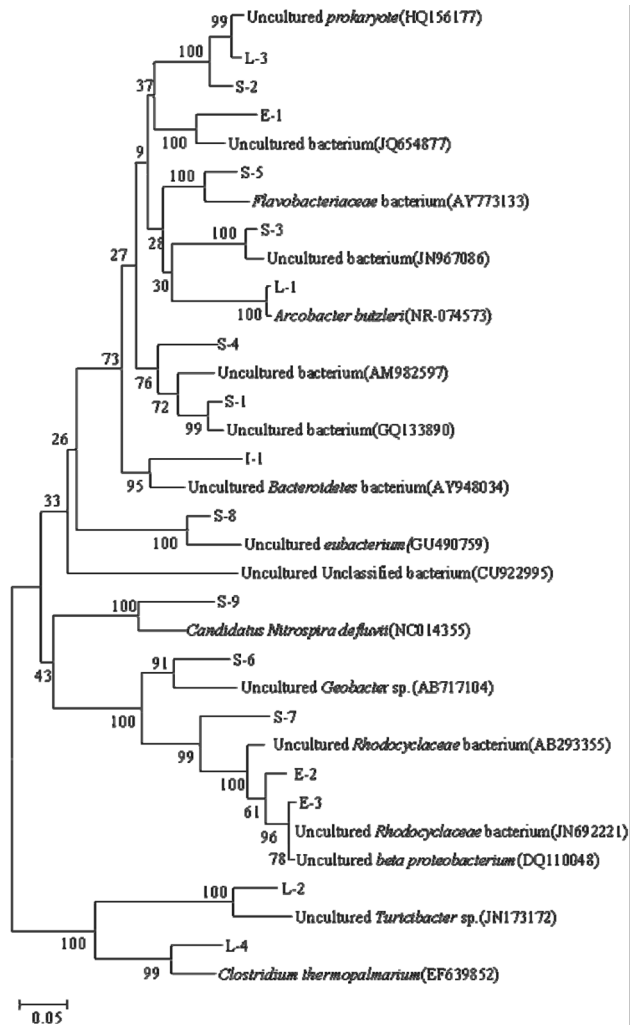


Fig. 4. Phylogenetic trees contain information on the relationships among the closest relatives in the GenBank database and the clones.

4. 결론

본 연구에서는 하수처리장의 혐기소화액과 가축분뇨를 혼합하여 미생물 연료전지의 전류발생 효율과 농화배양 단계의 미생물성장 곡선을 이용하여 접종원, 지체기, 대수성장기 그리고 정지기에서 미생물군집 구조가 어떻게 변화하는지 그리고 어떤 미생물들이 전기화학적 활성을 갖는 미생물인지를 알아보기 위하여 수행하였다. 지금까지는 미생물연료전지에 관여하는 미생물이 너무나 많이 검출되어 어떤 미생물들이 전기화학적으로 활성을 갖는 것인지 파악하기 어려웠다. 따라서 이 연구에서는 농화 배양되어 가는 과정에서 미생물군집 변화를 확인하고, 정지기로 가면서 농도가 증가하거나 새로이 출현하는 미생물을 전기영동을 수행하여 DGGE 젤에서 band들을 직접 잘라내어 염기서열을 분석하였다. 이 결과 *Geobacter* sp.가 존재하는 것으로 나타났는데, *Geobacter* sp.는 이미 전기활성이 있는 미생물로 알려져 있는 미생물 중 하나이다. 이것 이외 *Rhodocyclaceae*, *Candidatus Nitro-*

spira, 그리고 *Flavobacteriaceae*에 속하는 미생물들이 관여하는 것으로 나타났으며 이 가운데, *Nitrospira*는 폐수처리 시스템에서 주로 아질산성 질소를 산화하는 미생물로 알려져 있는 질소산화 미생물인 것으로 알려져 있다. 이것은 사용한 폐수가 가축분뇨를 N이온을 포함하고 있어 질소산화미생물을 포함하는 것으로 판단된다. 따라서 운전할 때 이용하는 폐수 종류에 따라 다른 미생물군집이 달라질 수 있기 때문에 폐수 종류에 따라 전기활성미생물들은 다양할 것으로 판단된다.

KSEE

참고문헌

- Gil, G. C., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, M., Jang, J. K., Park, H. S. and Kim, H. J., "Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell," *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 327~324(2003).
- Jang, J. K., Pham, T. H., Chang, I. S., Kang, K. H., Moon, H., Cho, K. S. and Kim, B. H., "Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell," *Proc. Biochem.*, **39**(8), 1007~1012(2004).
- Liu, H. and Logan, B. E., "Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane," *Environ. Sci. Technol.*, **38**(14), 4040~4046(2004).
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P. and Rabaey, K., "Microbial fuel cells: methodology and technology," *Environ. Sci. Technol.*, **40**(17), 5181~5192(2006).
- Rabaey, K. and Verstraete, W., "Microbial fuel cells; novel biotechnology for energy generation," *Trends Biotechnol.*, **23** (6), 291~298(2005).
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealon, K. H. and Fredrickson, J. K., "Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms," *PNAS*, **103**(30), 11358~11363(2005).
- Logan, B. E. and Regan, J. M., Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, *Trends in Microbiol.*, **14**(12), 512~518(2006).
- Jang, J. K., Honh, S. H., Lee, M. H., Ryou, Y. S., Chang, I. S., Kim, J. G., Kang, Y. K. and Lee, E. Y., "Microbial carbon substrate utilization in microbial fuel cell using livestock wastewater," *J. Kor. Soc. Waste Manage.*, **29**(8), 712~719(2012).
- He, Z., Kan, J., Wang, Y., Huang, Y., Mansfeld, F. and Nealson, K. H., "Electricity production coupled to ammonium in a microbial fuel cell," *Environ. Sci. Technol.*, **43**(9), 3391~3397(2009).
- Kim, I. S., Chae, K., Choi, M. and Verstraete, W., "Microbial fuel cell: Recent advances, bacterial communities and application beyond electricity generation," *Environ. Eng. Res.*, **13**(2), 51~65(2008).
- Lee, J., Phung, N. T., Chang, I. S., Kim, B. H. and Sung, H. C., "Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses," *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**, 185~191(2003).
- Chae, K., Choi, M., Lee, J., Kim, K. and Kim, I., "Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells," *Bioresource Technol.*, **100**(14), 3518~3525(2009).
- Zhang, Y., Min, B., Huang, L. and Angelidaki, I., "Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell," *Bioresour. Technol.*, **102**(2), 1166~1173(2011).
- Giovannoni, S. J., Brischgi, T. B., Moyer, C. L. and Field, K. G., "Genetic diversity in sargasso sea bacterioplankton," *Nature(London)*, **345**(6270), 60~63(1990).
- Head, I. M., Saunders, J. R. and Pickup, R. W., "Microbial evolution diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms," *Microbiol. Ecol.*, **35**, 1~21(1998).
- Muyzer, G., Waal, E. C. De, and Uitterlinden, A. G., "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), 695~700(1993).
- Jang, J. K., Chang, I. S., Hwang, H. Y., Choo, Y. F., Lee, J. Cho, K. S., Kim, B. H., and Nealon, K. H., "Electricity generation coupled to oxidation of propionate in a microbial fuel cell," *Biotechnol. Lett.*, **32**(1), 79~85(2010).
- Hong, S. H., Kim, S. H., Kang, H., Ryu, H. W. and Lee, S., "Effects of Pb and CO₂ on Soil microbial community associated with pinus densiflora-Lab," *J. Ecol. Field Bio.*, **39** (6), 551~558(2006).