

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe

Anna Sikora¹, Radosław Sikora²

¹ Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki,
Polska Akademia Nauk, Warszawa

² Katedra Biometrii, Wydział Rolnictwa i Biologii,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Microbial fuel cells

Summary

Recently, there has been growing interest in renewable energy sources. One of the ideas is the concept of biological fuel cells. Biofuel cells convert the chemical energy of organic compounds of biological origin directly into electric energy. The article relates to microbial fuel cells (MFC) where the catalyst is a microorganism. Metabolic cell processes associated with respiration can supply fuel for direct oxidation in the anode compartment, or be a source of electrons transferred to the anode. We show here different ways of microorganisms' application for producing electrical energy and the possible applications of MFC.

Key words:

microbial fuel cells, renewable sources of energy, biomass, microorganisms, anaerobic processes, electro-oxidation of bio-fuels.

Adres do korespondencji

Anna Sikora,
Zakład Biologii
Molekularnej,
Instytut Biochemii
i Biofizyki,
Polska Akademia Nauk,
ul. Pawińskiego 5a,
02-106 Warszawa;
e-mail:
annaw@ibb.waw.pl
lub
radeksikora@agrobiol.sggw.
waw.pl

1. Wstęp

Od wieków znaczna część wysiłku ludzkiego koncentruje się wokół pozyskiwania energii i surowców, które pochodzą ze źródeł kopalnych lub odnawialnych. W ostatnim czasie na świecie coraz bardziej wzrasta zainteresowanie odnawialnymi źródłami energii ze względu na perspektywę wyczerpania się konwencjonalnych jej źródeł. Wiek XX przyniósł z kolei konieczność zorganizowanej likwidacji lawinowo wzrastającej ilości odpadów wytwarzanych przez naszą cywilizację. Mamy zatem z jednej strony problem wzrastającego zapotrzebowania na energię ze źródeł odnawialnych, a z drugiej problem utylizacji zanieczyszczeń. Ponieważ dużo odpadów cywilizacyjnych to substancje organiczne,

przechowujące w swoich wiązaniach chemicznych energię słoneczną, naturalnym dążeniem jest usiłowanie łącznego rozwiązania tych dwóch problemów. Wśród wielu pomysłów jak to robić (spalarnie śmieci, biogaz), już w latach sześćdziesiątych pojawiła się koncepcja biologicznego ogniwa paliwowego (1,2). Jest to urządzenie przetwarzające substancje organiczne bezpośrednio w energię elektryczną przy udziale mikroorganizmów lub enzymów.

2. Zasada działania biologicznych ogniw paliwowych

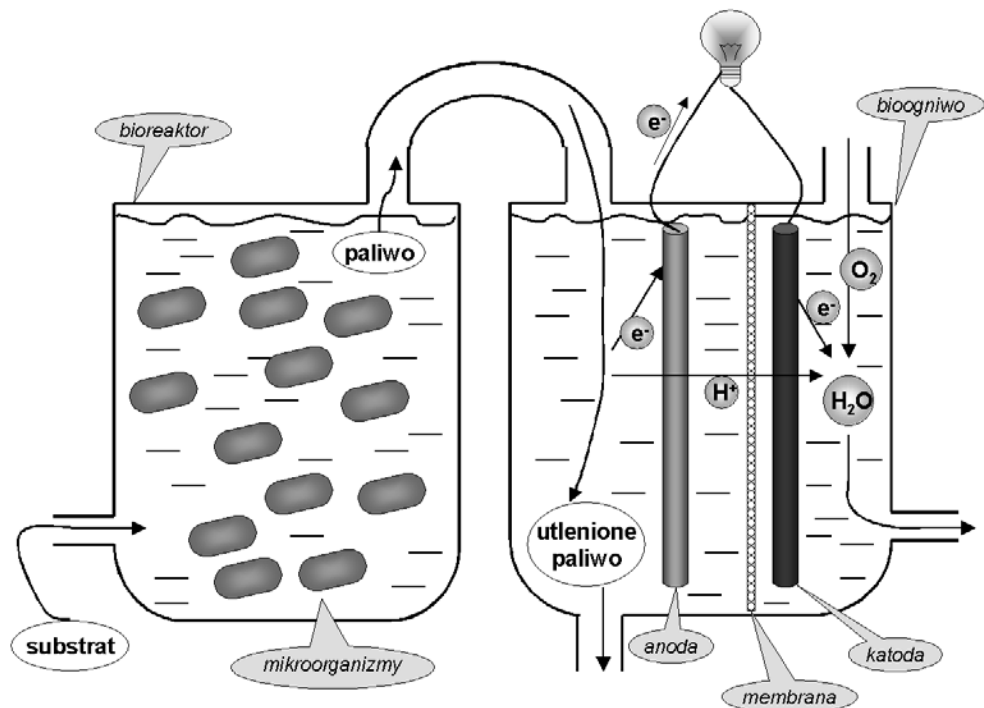
Zasada działania biologicznych ogniw paliwowych jest podobna jak chemicznych ogniw paliwowych (CFC, *chemical fuel cells*). W CFC produkcja energii elektrycznej następuje w wyniku elektrochemicznej reakcji spalania paliwa (substancji o właściwościach redukujących doprowadzanej do anody) w utleniaczu (np. tlenie z powietrza doprowadzonym do katody). Jako paliwo stosuje się zwykle wodór lub proste związki chemiczne bogate w wodór takie, jak np. metanol czy lekkie węglowodory (3).

W ogniwach biologicznych następuje przekształcenie energii chemicznej zawartej w związkach organicznych w energię elektryczną przy udziale wyizolowanych, oczyszczonych enzymów (najczęściej dehydrogenaz i oksydaz) lub mikroorganizmów, głównie bakterii. Reakcje enzymatyczne lub komórkowe procesy metaboliczne związane z oddychaniem mogą bezpośrednio dostarczać produktów będących paliwem utlenianym na anodzie w ogniwach biologicznych lub stanowić pośrednie źródło elektronów przekazywanych anodzie. Ogniwo biologiczne składa się z przedziałów anodowego i katodowego oddzielonych od siebie membraną jonoselektywną przepuszczającą jony, zwykle protony. Protony przenoszone są z przedziału anodowego do przedziału katodowego przez membranę. Elektrony przenoszone są na katodę przez zewnętrzny obwód elektryczny. W przedziale katodowym następują reakcje redukcji. W ogniwie biologicznym najczęściej redukowany jest tlen, ale może to być też np. heksacyjanożelazian (III) potasowy. Bezpośrednie zastosowanie mikroorganizmów w biologicznych ogniwach paliwowych eliminuje konieczność izolacji i oczyszczania enzymów, co jest często trudne i kosztowne, oraz zapewnia naturalne środowisko przebiegu procesów biologicznych jakim jest komórka. Źródłami problemów są natomiast konieczność zapewnienia odpowiednich warunków życia mikroorganizmom oraz elektrochemiczny kontakt żywych mikroorganizmów z elektrodą (2,4).

Artykuł ten dotyczy mikrobiologicznych ogniw paliwowych (MFC, *microbial fuel cells*).

3. Typy mikrobiologicznych ogniw paliwowych

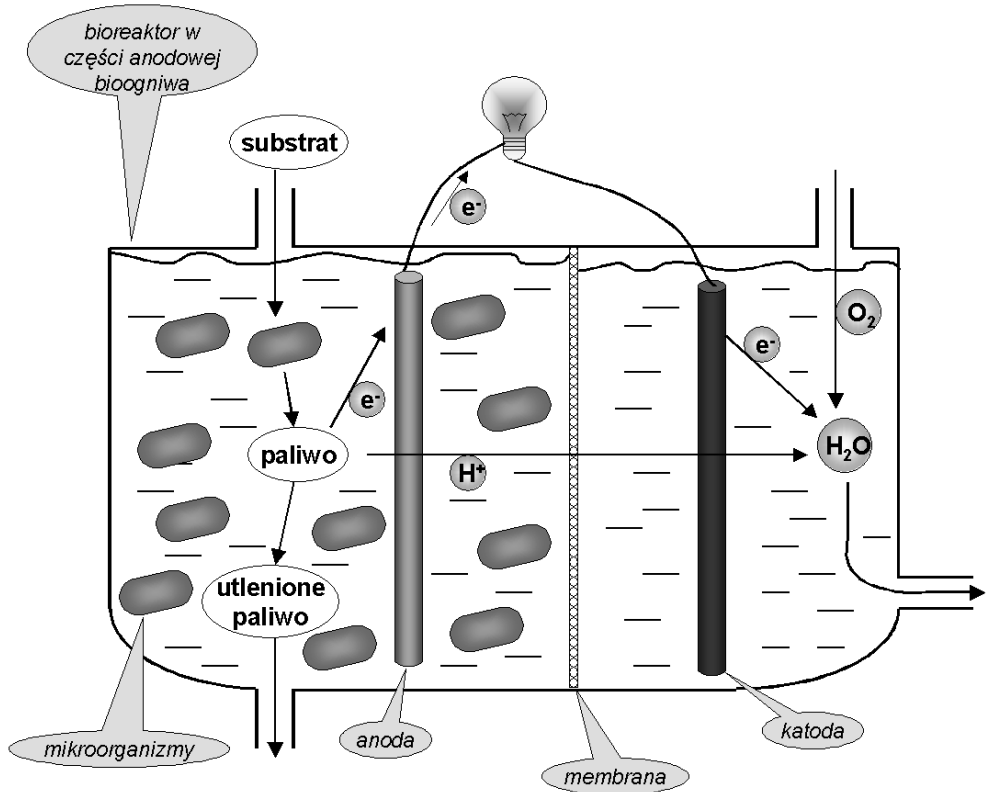
Istnieją cztery odmienne rozwiązania MFC (2). W pierwszym, część biologiczna i elektrochemiczna są rozdzielone i pracują niezależnie od siebie. Bakterie hodowane są w osobnym bioreaktorze, a produkty ich metabolizmu, jako paliwo dostarcza-



Rys. 1. Pierwszy typ mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Paliwo produkowane jest bezpośrednio przez mikroorganizmy hodowane w oddzielnym bioreaktorze.

ne są do odpowiedniego ogniwa (rys. 1). Paliwem w tej wersji MFC jest najczęściej wodór produkowany w wyniku różnych fermentacji. Produkcja energii zachodzi w wyniku utleniania cząsteczki wodoru wg równania: $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Wykorzystywane są tu fakultatywne beztlenowce z rodziny *Enterobacteriaceae* prowadzące fermentację kwasów mieszanych (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*) (2,4). Największą wydajność produkcji wodoru uzyskuje się w wyniku fermentacji (zwłaszcza masłowej) przeprowadzanej przez beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium* (5).

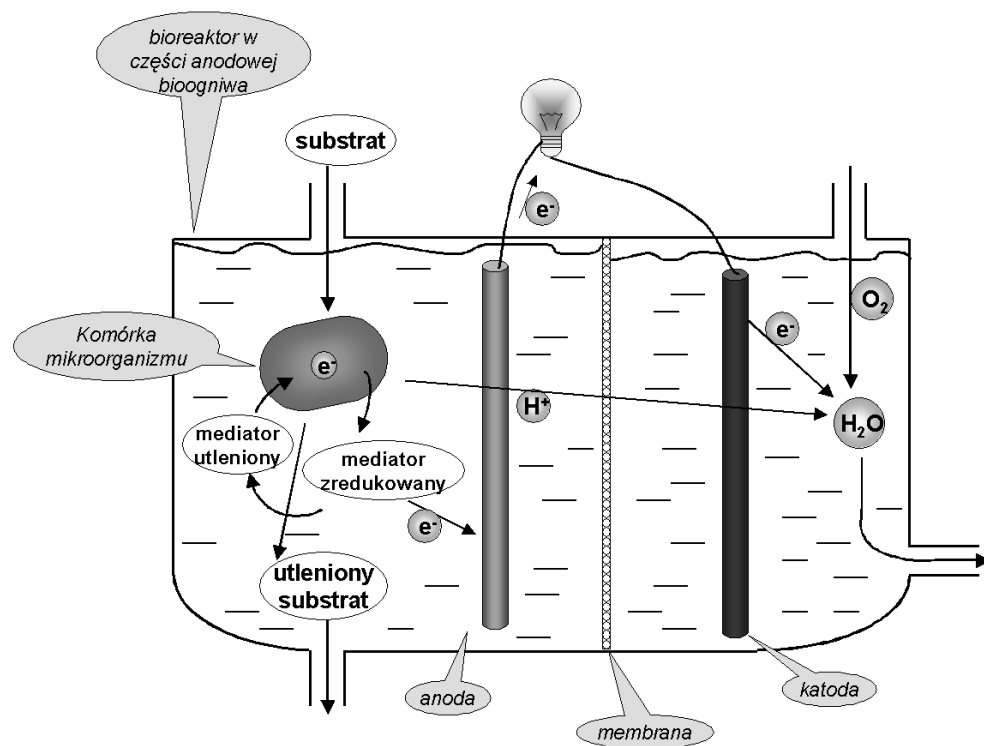
W drugim typie MFC (rys. 2) przedział anodowy ogniwa jest jednocześnie bioreaktorem, w którym hodowane są mikroorganizmy. Część biologiczna i elektrochemiczna ogniwa są ze sobą ściśle powiązane, a część biologiczna warunkuje pracę całego ogniwa. Jako paliwo w takim typie ogniwa wykorzystywano wodór i kwas mrówkowy produkowane w wyniku fermentacji *E. aerogenes*, *C. butyricum* (6,7) oraz siarkowodór produkowany przez bakterie *Desulfovibrio desulfuricans* redukujące siarczyn (jako ostateczny akceptor elektronów) w oddychaniu beztlenowym (8). Utlenianie kwasu mrówkowego zachodzi wg równania: $\text{HCOO}^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$, a siarkowodoru wg równań: $\text{S}^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$ i $2\text{S}^{2-} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 6\text{H}^+ + 8\text{e}^-$.



Rys. 2. Drugi typ mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Paliwo produkowane jest bezpośrednio przez mikroorganizmy hodowane w przedziale anodowym, który jest jednocześnie bioreaktorem.

W eksperymentach z *Clostridium butyricum* w obu typach opisywanych ogniw wykazano, że unieruchomienie bakterii na matrycy typu żel akrylamidowy lub agarozowy na anodzie zwiększały stabilność całego systemu i znacząco wydłużały czas pracy bioogniwa (5,7).

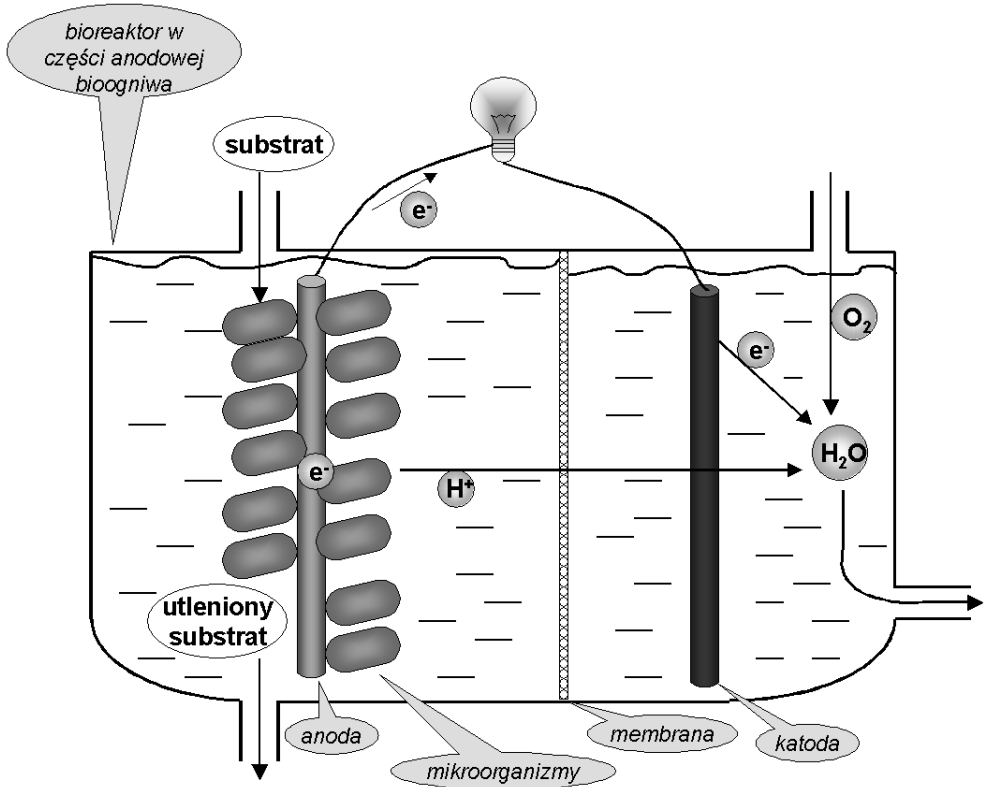
W obu opisanych typach MFC paliwo generowane jest bezpośrednio przez mikroorganizmy i pełni ono rolę przenośnika elektronów pomiędzy mikroorganizmami a anodą. W trzecim typie MFC (rys. 3) stosuje się związki, które wychwytyują elektrony z wnętrza komórek mikroorganizmów i przekazują je anodzie. Cechą odróżniającą ten typ bioogniwa od poprzednich jest wykorzystanie jako przenośników elektronów specjalnych niskocząsteczkowych związków łatwo ulegających reakcjom zarówno utleniania jak i redukcji, tzw. mediatorów redoks. Komórka jest środowiskiem zamkniętym i bezpośrednia wymiana elektronów między komórką a anodą jest praktycznie niemożliwa. Przedział anodowy tak jak w poprzednim typie, jest jednocześnie bioreaktorem. Związki będące przenośnikami muszą spełniać kilka warunków. Utleniony mediator powinien łatwo penetrować przez osłony komórkowe do wnętrza bakterii, natomiast



Rys. 3. Trzeci typ mikrobiologicznego ogniw paliwowych. Przedział anodowy jest jednocześnie bioreaktorem. Przenośnikami elektronów pomiędzy mikroorganizmem a anodą są specjalne niskocząsteczkowe związki łatwo ulegające reakcjom zarówno utleniania jak i redukcji, tzw. mediatorzy redoks.

zredukowany sprawnie ją opuszczać i nie adsorbować się na powierzchni komórki. Potencjał redoks mediatora musi odpowiadać potencjałowi zredukowanego metabolitu, a żaden stopień utlenienia mediatora nie może ingerować w inne procesy metaboliczne. Mediator powinien szybko ulegać utlenianiu na elektrodzie i nie osiadać na jej powierzchni (2,4). Testowano wiele związków organicznych w kombinacji z różnymi gatunkami bakterii dobierając odpowiednie podłoża. Przykładowe kombinacje mikroorganizm-przenośnik (2,4): *Pseudomonas methanica* z 2,6-dichlorofenol-indofenolem, *Escherichia coli* z błękitem metylenowym, *Proteus vulgaris* z tioniną, *Escherichia coli* z tioniną, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis* i *Erwinia dissolvens* z Fe(III)EDTA, *Proteus vulgaris* z 2-hydrokso-1,4-naftochinonem, *Escherichia coli* z czerwinią obojętną lub z 2-hydrokso-1,4-naftochinonem, a także drożdże *Saccharomyces cerevisiae* z błękitem metylenowym. Stosowano również mieszaninę dwóch mediatorów w celu uzyskania większej wydajności, np. tionina i Fe(III)EDTA (9).

W najprostszym modelu cząsteczki mediatora przemieszczają się swobodnie między komórkami bakterii a powierzchnią elektrody. W celu zapewnienia efektyw-



Rys. 4. Czwarty typ mikrobiologicznego ogniwa paliwowego z udziałem bakterii redukujących metale, które mają zdolność bezpośredniego przekazywania elektronów anodzie.

niejszego transportu elektronów można adsorbować cząsteczki mediatora na powierzchni komórki mikroorganizmu, np. poliviologen na powierzchni *Desulfovibrio desulfuricans* (10), a także wiązać kowalencyjnie z powierzchnią elektrody komórki bakteryjne bądź cząsteczki mediatora, np. czerwień obojętna, która pobierała elektrony z komórek *E. coli* i *Actinobacillus succinogenes* (11).

W czwartym typie MFC (rys. 4) znalazły zastosowanie nieliczne gatunki bakterii, które mają zdolność bezpośredniego (bez udziału sztucznych mediatorów) przekazywania elektronów anodzie. Są to bakterie redukujące metale w warunkach beztlenowych, głównie bakterie redukujące żelazo ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) i mangan ($\text{Mn}^{4+} \rightarrow \text{Mn}^{2+}$): z rodzaju *Geobacter* (12), *Rhodoferrax ferrireducens* (13), *Shewanella putrefaciens* (14), znalezione w beztlenowych osadach dennych. Posiadają one cytochromy na zewnętrznych błonach. Przedział anodowy, tak jak w dwóch poprzednich typach, jest też bioreaktorem. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe z zastosowaniem tych bakterii dają najlepsze wyniki i są najbardziej obiecujące. Stwierdzono, np. że energia wyprodukowana przez *Rhodoferrax ferrireducens* z kostki cukru może zapewnić zasilanie

telefonu komórkowego przez 4 dni (15). W najnowszych pomysłach zakłada się wykorzystywanie w MFC osadów dennych (m.in. morskich) i szlamu, które stanowią mieszaninę bakterii beztlenowych w tym redukujących metale (16-18).

Większość badań nad mikrobiologicznymi ogniwami paliwowymi dotyczy ich pracy w temperaturze pokojowej, a podniesienie temperatury w przedziale anodowym mogłoby zwiększyć wydajność pracy całego bioogniwa. Stąd obecnie wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem mikroorganizmów termofilnych w MFC np. *Bacillus licheniformis* czy *Bacillus thermoglucosidasius* (19).

W badaniach nad MFC stosuje się podłoża syntetyczne zawierające różne węglowodany, zwłaszcza glukozę, a także ścieki organiczne (5,20,21). Podkreślaną unikatową zaletą mikrobiologicznych ogniw paliwowych jest wykorzystanie wielu związków ulegających biodegradacji w tym ścieków lub innych zanieczyszczeń organicznych, które rozkładane są w łagodnych warunkach (temperatura, ciśnienie, pH).

Najczęściej używanymi materiałami do produkcji anod bioogniw paliwowych są platyna i różne postacie węgla. Istotne jest rozwinięcie powierzchni anody. Im jest ona większa tym wyższe są wartości uzyskiwanego prądu (2). Obecnie opracowuje się bioogniwa bezmembranowe co obniża koszty budowy i użytkowania (22).

4. Zastosowania bioogniw mikrobiologicznych

Prace nad bioogniwami mikrobiologicznymi na świecie rozpoczęły się już w latach sześćdziesiątych (2), ale nadal uważa się, że są one w fazie wstępnej. Przyczyną jest przede wszystkim niska wydajność stosowanych obecnie procesów biologicznych. W ogniwach mikrobiologicznych wydajność energetyczna oraz szybkość zachodzących reakcji jest zwykle stosunkowo niska ograniczając zastosowania tych urządzeń. Maksymalna uzyskana dotąd gęstość prądu to kilkadziesiąt mA/cm², choć zwykle jest to kilka rzędów wielkości mniej, podczas gdy w klasycznych chemicznych ogniwach paliwowych może to być nawet ponad tysiąc mA/cm². Rozrzut gęstości prądu dla MFC w zależności od mikroorganizmów wynosi nawet 3 rzędy wielkości (2). Sprawia to, że część z tych rozwiązań nie rokuje praktycznego znaczenia, ale badania na dużą skalę w tym kierunku dopiero zaczynają się rozwijać, zatem sytuacja zapewne szybko ulegnie zmianie. Perspektywy zastosowań i obecne aplikacje mikrobiologicznych ogniw paliwowych, jak się wydaje, są bardzo ciekawe i obiecujące (23). Podstawowym zadaniem bioogniw paliwowych jest produkcja energii elektrycznej. Zasilanie świecących małych urządzeń morskich było w latach sześćdziesiątych pierwszym znanym przypadkiem komercyjnego użycia MFC (2).

MFC mogą być jednocześnie wykorzystane do utylizacji nieczystości płynnych w nieuciążliwy dla otoczenia sposób. Jest to pierwsza grupa potencjalnych zastosowań MFC. W znacznej części aktualnie przeprowadzanych eksperymentów z MFC wykorzystuje się jako pożywkę dla bakterii różnego rodzaju zanieczyszczenia płynne: odpady przemysłu spożywczego czy celulozowego, ścieki pochodzenia zwierzę-

cego i z gospodarstw domowych (21,24). Ze ścieków izoluje się bakterie elektrochemicznie aktywne (20,25). Wskazuje to na silne powiązanie obu tych dziedzin wiedzy i praktyki. Inne metabolity mikroorganizmów, bezużyteczne w ogniwach paliwowych, mogą zostać wykorzystane do produkcji biogazu, co pozwoli zwiększyć efektywność produkcji energii z biomasy. Działanie MFC można połączyć z innymi metodami oczyszczania ścieków.

Druga grupa zastosowań to zasilanie przenośnych urządzeń elektrycznych w warunkach polowych, bez dostępu do sieci energetycznej lub tradycyjnych generatorów prądu. Najbardziej spektakularne przykłady to projekty autonomicznych mini-robotów (26). Jednym z ciekawszych jest *slugbot*, robot produkujący energię elektryczną z biomasy, którą stanowią ślimaki nagie, powszechne szkodniki angielskich pól. Wyprodukowaną energię robot wykorzystuje do poruszania się i chwytania kolejnych szkodników na polu (2).

Inna grupa zastosowań to bezobsługowe stacje telemetryczne, np. meteorologiczne lub monitorujące środowisko naturalne. Nie potrzeba tutaj dużych mocy, a objętości najmniejszych obecnie bioogniw bakteryjnych to kilkadziesiąt cm³. Przykładem może tu być EcoBotII, urządzenie do monitorowania środowiska z czujnikiem temperatury przekazujące informacje drogą radiową, zasilane martwą materią organiczną (np. martwe muchy) (27).

Do bardziej wyrafinowanych zastosowań należą biosensory, czyli systemy wykorzystujące reakcje biologiczne do wykrywania różnych związków. Obecność danego związku w przedziale anodowym uruchamia przepływ prądu co rejestrowane jest metodami elektronicznymi. Zaproponowano, np. biosensory do wykrywania glukozy (z udziałem *Gluconobacter suboxidans* i *G. industrius*), glicerolu (z udziałem *G. industrius*), etanolu (z udziałem *G. suboxidans* i *Acetobacter aceti*) (28), mleczanów (z udziałem *S. putrefaciens*) (29). MFC wykorzystuje się też jako biosensory do badania zanieczyszczeń środowiska, np. określenia BZT (biologicznego zapotrzebowania tlenu) wskazującego zawartość biologicznie degradablego materiału organicznego w ściekach czy zbiornikach wodnych (30).

Inne precyzyjne zastosowania to propozycje zasilania przez miniaturowe MFC mikroskopowych implantów medycznych dawkujących leki chorym. Takie miniaturowe bioogniwo może być umieszczone bezpośrednio w naczyniu krwionośnym i jako paliwo wykorzystywać glukozę z krwi (2).

5. Uwagi końcowe

Bioogniwa pod każdym względem, poza wydajnością, przewyższają inne źródła energii oparte na surowcach odnawialnych. W pierwszym rzędzie wytwarzają one bezpośrednio najwygodniejszą formę energii, elektryczność, z pominięciem procesu spalania cechującego się zawsze niską sprawnością przetwarzania energii paliwa w energię użyteczną. Likwidując odpady dają one ulgę środowisku naturalnemu.

Brak ciężkich elementów ruchomych (jak turbiny czy śmigła) poza, co najwyżej, małym mieszadłem zanurzonym w zbiorniku, eliminuje hałas i wibracje oraz zmniejsza ryzyko awarii mechanicznych o poważnych konsekwencjach. Możliwość budowania bioogniw paliwowych o zróżnicowanych rozmiarach – od centymetrów do metrów sześciennych – pozwala na rozproszenie produkcji energii, zmniejszając ryzyko poważnych strat w razie awarii scentralizowanego systemu energetycznego. Dodatkowo, cecha ta pozwala na przybliżenie ogniwa do miejsca powstawania odpadów, zmniejszając koszty ich transportu i uwalniając część przestrzeni zajętej przez infrastrukturę służącą do przesyłania, gromadzenia i utylizacji odpadów. Bardzo ciekawe są, jak się wydaje, zastosowania miniaturowych bioogniw mikrobiologicznych.

Zastosowanie biologicznych metod produkcji energii zmniejsza uzależnienie człowieka od techniki, powodując jego wyobcowanie ze środowiska, w którym żyje. Burzliwy rozwój biotechnologii wskazuje, że warto zaufać przyrodzie, starając się jednocześnie poznać jak najlepiej jej prawa i próbując się dostosować do nich.

Praca powstała w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (dawniej KBN) nr grantu: 2PO4B00429

Literatura

1. Davis J. B., Yarbrough Jr. H. F., (1962), *Science*, 137, 615-616.
2. Shukla A. K., Suresh P., Berchmans S., Rajendran A., (2004), *Curr. Sci. India*, 87, 455-468.
3. *Fuel Cell Handbook* (5th ed.), (2000), Ed. EG&G Services Parsons, Inc. Science Applications International Corporation Under Contract No. DE-AM26-99FT40575 U.S. Department of Energy Office of Fossil Energy National Energy Technology Laboratory, Morgantown, West Virginia, USA
4. Katz E., Shipway A. N., Willner I., (2003), *Handbook of fuel cells – fundamentals, technology and applications*, Eds. Vielstich, W., Gasteiger, H.A., Lamm A., Vol. 1. John Wiley and Sons, Ltd., New York, NJ., USA.
5. Suzuki S., Karube I., Matsunaga T., Kuriyama S., Suzuki N., Shirogami T., Takamura T., (1980), *Biochimie*, 62, 353-358.
6. Tanisho S., Kamiya N., Wakao N., (1989), *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 21, 25-32.
7. Karube I., Matsunaga T., Tsuru S., Suzuki S., (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1727-1733.
8. Coonney M. J., Roschi E., Marison I. W., Comninellis Ch., von Stockar U., (1996), *Enzyme Microb. Tech.*, 18, 358-365.
9. Tanaka K., Vega C. A., Tamamushi R., (1983), *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11, 289-297.
10. Park D. H., Kim B. H., Moore B., Hill H. A. O., Song M. K., Rhee H. W., (1997), *Biotechnol. Tech.*, 11, 145-148.
11. Park D. H., Zeikus J. G., (2000), *Appl. Environ. Microb.*, 66, 1292-1297.
12. Bond D. R., Lovley D. R., (2003), *Appl. Environ. Microb.*, 69, 1548-1555.
13. Chaudhuri S. K., Lovley D. R., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 1229-1232.
14. Kim H. J., Park H. S., Hyun M. S., Chang I. S., Kim M., Kim B. H., (2002), *Enzyme Microb. Tech.*, 30, 145-152.
15. Service R. F., (2003), *Science*, 301, 1453.
16. Bond D. R., Holmes D. E., Tender L. M., Lovley D. R., (2002), *Science*, 295, 483-485.
17. Tender L. M., Reimers C. E., Stecher H. A., Holmes D. E., Bond D. R., Lowy D. A., Pilobello K., Fertig S. J., Lovley D. R., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 821-825.

18. Rabaey K., Lissens G., Siciliano S. D., Verstraete W., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 1531-1535.
19. Choi Y., Jung E., Park H., Paik S. R., Jung S., Kim S., (2004), *Bull. Korean Chem. Soc.*, 25, 813-818.
20. Park H. S., Kim B. H., Kim H. S., Kim H. J., Kim G. T., Kim M., Ch I. S., Park Y. K., Chang H. I., (2001), *Anaerobe*, 7, 297-306.
21. Min B., Logan B. E., (2004), *Environ. Sci. Technol.*, 38, 5809-5814.
22. Jang J. K., Pham T. H., Chang I. S., Kang K. H., Moon H., Cho K. S., Kim B. H., (2004), *Process Biochem.*, 39, 1007-1012.
23. Scholz F., Schroder U., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 1151-1152.
24. Liu H., Ramnarayanan R., Logan B. E., (2004), *Environ. Sci. Technol.*, 38, 2281-2285.
25. Pham C. A., Jung S. J., Phung N. T., Lee J., Chang I. S., Kim B. H., Yi H., Chun J., (2003), *FEMS Microbiol. Lett.*, 223, 129-134.
26. Wilkinson S., (2000), *Auton. Robot.*, 9, 99-111.
27. <http://www.newscientist.com/data/images/ns/9999/99996366F1.JPG>
28. Ikeda T., Kano K., (2003), *Biochim. Biophys. Acta*, 1674, 121-126.
29. Kim H. J., Hyun M. S., Chang I. S., Kim B. H., (1998), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 365-367.
30. Kim B. H., Chang I. S., Gil G. H., Park H. S., Kim H. J., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 541-545.