

《原著》

Cu 이온에 적응된 토착호산성박테리아를 이용한 폐광석으로부터 미생물용출 효율 향상

김봉주 · 위대웅 · 최낙철 · 박천영*

조선대학교 에너지자원공학과

The Efficiency of Bioleaching Rates for Valuable Metal Ions from the Mine Waste Ore using the Adapted Indigenous Acidophilic Bacteria with Cu Ion

Bong-Ju Kim · Dae-Woong Wi · Nag-Choul Choi · Cheon-Young Park*

Dept. of Energy and Resource Engineering, Chosun University, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to leach valuable metal ions from the mine waste ore using the adapted indigenous bacteria. In order to tolerance the heavy metals, the indigenous bacteria were repeatedly subcultured in the adaptation-medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks and 6 weeks, respectively. As the adaptation experiment processed, the pH was rapidly decrease in the adaptation-medium of 6 weeks more than the 3 weeks. The result of bioleaching with the adapted bacteria for 42 days, the pH value of leaching-medium in the 3 weeks tend to increased, whereas the pH of the 6 weeks decreased. In decreasing the pH value in the adaptation-medium and in the leaching-medium, it was identified that the indigenous bacteria were adapted Cu^{2+} the ion and the mine waste ores. The contents of Cu, Fe and Zn in the leaching solution were usually higher leached in 6 weeks than 3 weeks due to the adaptation. Considering the bioleaching rates of Cu, Fe and Zn from these leaching solutions, the highest increasing the efficiency metal ion were found to be Fe. Accordingly, it is expected that the more valuable element ions can be leached out from the any mine waste, if the adapted bacteria with heavy metals will apply in future bioleaching experiments.

Key words : Mine waste ore, Indigenous acidophilic bacteria, Adaptation, Tolerance, Bioleaching

1. 서 론

화학무기자가영양체인 호산성박테리아는 황화광물에 함유되어 ferrous iron, 원소 황 혹은 황화광물에 속한 환원 형태의 황을 산화시켜 성장에 필요한 에너지를 얻는다. 세포합성에 필요한 탄소는 대기 중의 이산화탄소에서 그리고 질소, 인 기타 무기영양원은 자연계로부터 얻는다. 박테리아의 이러한 능력 덕분에 황화광물로부터 유용금속이온을 용출시키는데 호산성 박테리아를 이용하여 왔다. 호산성 박테리아를 이용하여 황동석, 섬아연석, 방연석 등으로부터 유용금속이온을 용출시킬 뿐만 아니라 황철석 혹은 유비철석으로부터 금을 회수하는데도 활용되고 있다. 박테리아를 황화광물에 적용하여 유용금속이온을 회수하

는 방법이 매우 단순하고 경비가 저렴하기 때문에 그리고 환경적 문제가 거의 발생하지 않는 장점 때문에, 외국에서는 heap 혹은 dump leaching과 같이 대규모로 활용되고 있다. 그러나 박테리아를 이용하여 황화광물로부터 유용금속을 용출시키는 경우, 용출 효율이 떨어지지 못한 것이 단점이다. 이러한 원인은 황화광물로부터 용출된 중금속 이온이 박테리아에게 독성(toxicity)으로 작용하기 때문이다(Norris and Kelly, 1978; Norris and Barr, 1985; Das et al., 1997). 그러나 박테리아가 중금속 이온에 내성(tolerance)을 갖게 되면 미생물 용출 효율이 향상된다(Tuovinen et al., 1971; Das et al., 1998). 독성 이온에 적응된 박테리아는 황화광물의 용출율을 2 내지 4배 이상으로 향상시킬 수 있고(Attia and Elzeky, 1990a) 박테리

*Corresponding author : cybpark@chosun.ac.kr

원고접수일 : 2011. 11. 29 심사일 : 2012. 8. 20 게재승인일 : 2012. 8. 22

질의 및 토의 : 2012. 10. 31 까지

아의 활성도가 2에서 4.8배 이상으로 향상된다(Xia et al., 2008). Karimi et al.(2010)은 중온성 호산성박테리아를 계속 높은 온도에 적응시켜 유용금속이온을 효과적으로 용출시키기도하였다. 박테리아가 중금속 이온의 독성에 내성을 갖게 할 수 있는 유일한 방법은 박테리아를 독성 이온에서 노출시켜 계속 계대배양(subculture)을 수행하는 것이다(Malouf and Prater, 1961; Torma et al., 1970; Natarajan et al., 1994; Das et al., 1998). 박테리아는 환경에 선택(selection)되고 적응(adaptation) 하면서 계속 진화(evolution)하는 미생물이다(Woese, 1987). 따라서 동일한 농도의 단일 독성 이온 혹은 두 종류 이상의 독성 이온을 혼합하여 계대배양을 계속 수행하는 방법(Tuovinen et al., 1971; Attia and Elzaky, 1989; Kai et al., 1995), 독성 이온의 농도를 증가시켜 가면서 계대배양을 계속 수행하는 방법(Natarajan and Iwasaki, 1983; Natarajan et al., 1994), 그리고 용출 대상 광석 시료에 노출시켜 계속 계대배양을 수행하여 적응(adaptation)시키는 방법들이 활용되었다(Attia and El-Zeky, 1990a; Barr et al., 1992; Elzaky and Attia, 1995; Shahverdi et al., 2001; Shi and Fang, 2004; Astudillo and Acevedo, 2008; Haghshenas et al., 2009). 독성이온을 이용하는 경우, 배양용액에 독성 이온과 미생물의 산화에너지원을 동시에 첨가하지만(Tuovinen et al., 1971; Natarajan et al., 1994), 광석 시료에 노출시키는 경우는 광석 시료가 박테리아의 산화에너지원으로 작용하기 때문에 따로 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 혹은 원소 황(S^0)과 같은 산화에너지원을 첨가하지 않는다(Shi and Fang, 2004, 2005; Shi et al., 2006). 박테리아가 독성 이온에 내성을 가질 수 있도록 1주일(Kai et al., 1995), 2주일(Attia and El-Zeky, 1990a; Elzaky and Attia, 1995; Shahverdi et al., 2001) 혹은 4주일(Attia and El-Zeky, 1989, 1990b) 주기로 반복하여 계대배양을 수행한다. Mason and Rice(2002)에 의하면 일반적으로 호산성 화학무기자가영양체는 약 3일간의 정체기(lag phase)를 거쳐 지수성장기(exponential phase)로 발달하고 16일 후에는 정체기(stationary phase)에 도달하는 것으로 해석하였다. 그러나 중금속이온에 적응된 박테리아일수록 정체기가 짧아지는 특성이 있다(Xia et al., 2008). 유용금속이온의 용출효과를 향상시키기 위하여 박테리아를 독성이온에 적응시키는 기간을 1년 이상(Li and Ke, 2001; Shahverdi et al., 2001; Shi and Fang, 2005; Shi et al., 2006), 3년 이상(Sanmugasunderam and Branion, 1985) 혹은 14년 이상(Jones et al., 2003)으로 수행한 연구 사례들이 있다. 박

테리아는 고 농도의 Cu 이온에 적응시킬수록 소수성(hydrophobicity) 특성을 띠게 되고 등전위(isoelectric point) pH가 증가하게 된다(Das et al., 1998). 미생물체가 중금속이온에 노출되면 이중반응(biphasic response)이 일어나서, 저 농도에서는 적응이 일어나지만 고농도에서는 사멸, 선택 혹은 돌연변이가 발생한다(Sadler and Trudinger, 1967). 그러나 독성 이온을 제거하면 박테리아의 독성이온에 대한 적응능력이 없어진다(Natarajan et al., 1994; Das et al., 1998). 우리나라에서 토착박테리아를 이용하여 광산폐석으로부터 유용금속 용출 연구 등이 Park et al. (2009; 2010a, 2010b, 2011), Ko et al. (2009), Han et al.(2010)에 의하여 수행되었으나 중금속 이온으로 토착박테리아를 주기적으로 적응시켜 용출효율을 향상시키고자하는 연구는 위대웅 등(2011)이 있을뿐 아직 미진하다.

본 연구의 목적은 광산 현장 환경에 적응된 토착호산성 박테리아를 채취하여 중금속에 내성이 형성될 수 있도록 중금속 이온에 주기적으로 적응실험을 수행하였다. 적응된 박테리아를 이용하여 폐광석으로부터 유용금속 이온을 효과적으로 용출시키고자하였다.

2. 시료채취, 적응실험, 용출실험 및 분석방법

2.1. 토착박테리아 및 연화 폐광석 채취

연화폐광석으로부터 유용금속이온을 효과적으로 용출시키기 위하여 연화광산배수에 서식하는 토착박테리아를 채취하였다. 강원도 삼척시 가곡면 풍곡리 연화제2광산의 광산배수(pH = 3.43)에서 10 ml를 채취하였다. 채취한 광산배수는 성장-배양액에 접종하고 항온배양기에서 32°C로 30일 동안 유지하였다. 광석은 연화제2광산의 폐광석에서 채취하였다(이하 연화폐광석). 이들 폐광석은 죠크라사와 디스크 밀로 크기 1 mm로 준비하였다. 또한 광석광물의 종류를 확인하기 위하여 연마편을 제작하였다.

토착박테리아가 계대배양되는 성장-배양의 조성은 무기 성분과 산화에너지원으로 구성하였다. 무기성분은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.25 g/L 및 KH_2PO_4 3.0 g/L을 3차 초순수 증류수 1.0 L에 용해시켜 제조하였다. 에너지원은 원소 황 분말 1.0 g/L과 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L을 첨가하였다.

2.2. 적응실험

박테리아 적응실험은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 을 성장-배양액에 5 g/L, 10 g/L 및 25 g/L을 각각 용해시켜 3주(21일) 주기

로 계대배양하였다(이하 적응-배양액). 적응실험이 종료되는 21일에 적응-배양액 10 ml를 다시 신선한 적응-배양액에 첨가하여 계대배양하였다. 물론 이 신선한 적응-배양액에는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 각각 용해시켰다. 이는 박테리아 Cu^{2+} 가 이온에 내성을 갖도록 3주(21일) 주기로 반복 계대배양하는 것이다(Tuovinen et al., 1971; Attia and El-Zeky, 1990b). 이때 초기 pH는 2.82로 조정하였다. 이는 30일 동안 성장-배양액에서 박테리아를 배양시켰을 때 안정적으로 나타난 pH 값이다.

2.3. 용출실험

3주와 6주 동안 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 g/L, 10 g/L 및 25 g/L)의 Cu^{2+} 이온에 내성이 형성된 박테리아, 즉 박테리아가 포함된 적응-배양액 10 ml를 연화폐광석(1mm)에 각각 접촉시켜 용출실험을 수행하였다(이하 용출-배양액(leaching-solution, 150 ml)). 용출-배양액의 무기영양원은 계대배양에서 사용하였던 무기영양원과 동일하게 하였으며, 산화 에너지원은 연화폐광석 0.75 g/L, 1.5 g/L, 3.75 g/L을 각각 사용하였다. 용출배양액의 초기 pH는 황산을 첨가하여 오직 한번 조정(2.82)하였고 42일 동안 미생물학적 산화가 일어나도록 32°C를 유지하였다.

2.4. 분석방법

연마편으로 제작된 연화광석을 편광현미경으로 관찰하였다. -200 mesh로 분쇄된 연화폐광석에 대하여 XRD로 정성분석하였고, 화학분석은 heating block(model; DMB-2, 24 hole)에서 왕수를 이용하여 분해한 후, 원자흡광분광기(atomic absorption spectrophotometer, model; AA-7000, Shimadzu)로 분석하였다. 적응-배양액, 용출-배양액의 pH(Horiba, Japan)와 Eh(TOA RM-12P)로 측정하였다. 박테리아는 적응-배양액 10 ml를 0.2 μm 여과지로 여과하고 글루타르알데히드로 고정하고 에틸알콜로 탈수하여 SEM(scanning electron microscopy, Japan, Hitachi, S4800)으로 관찰하였다. 용출-배양액의 유용금속함량은 원자흡광분광기로 측정하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 광석광물

연화 광석은 반사편광현미경으로 관찰한 결과 자류철석(pyrrhotite): 60.8%, 섬아연석(Sphalerite): 20.4% 등이 함유되었다(Fig. 1). 황동석과 섬아연석은 용리구조로 나타나며, 자류철석은 황동석과 공생광물로 산출된다. 연화 광

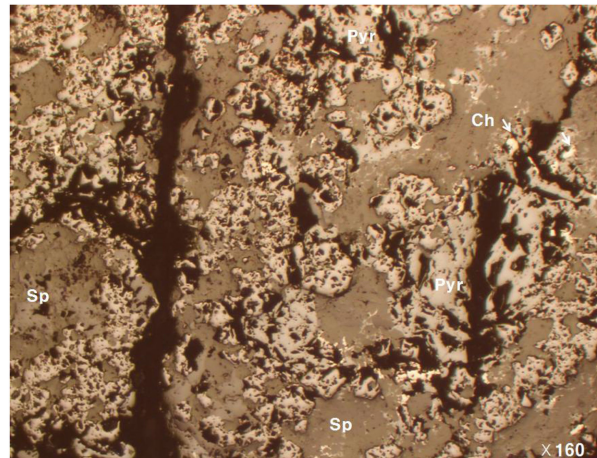


Fig. 1. Reflected photomicrograph of ore specimen from the Younhwa abandoned mine waste (magnification $\times 100$). Ch; chalcopyrite, Pyr; pyrrhotite, Sp; sphalerite.

석에 대하여 화학분석한 결과 Fe가 61.3%, Cu가 10.16%, Zn이 28.51%로 측정되었다.

3.2. Cu 이온의 적응에 따른 pH 감소 변화

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 용해된 적응-배양액에서 연화 토착박테리아가 성장함에 따라 pH가 감소하였다(Fig. 2). 적응실험이 진행되는 3주와 6주의 초기 pH는 황산을 사용하여 2.82로 각각 조정하였다. pH 조정에서 초기에 한 번 수행하였다. 5 g, 10 g 및 25 g의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 용해된 3주 적응-배양액의 pH는 박테리아가 성장함에 따라 비교적 서서히 감소하였다. 그러나 6주 적응-배양액의 pH는 매우 빠르게 감소하였다. 3주 적응-배양액의 초기 pH는 모두 2.62이었으나 22일에는 각각 2.18(5 g/L), 2.34(10 g/L), 2.32(25 g/L)로 감소하였다. 6주 적응-배양액의 초기도 모두 2.62이었으나 22일에는 각각 1.65(5 g), 1.64(10 g), 1.73(25 g)로 감소하였다. 3주 및 6주 적응-배양액의 pH 감소는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 첨가량이 많을수록 느리게 감소하였다. 이와 같은 결과는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 첨가량이 많으면 고농도의 Cu^{2+} 이온이 박테리아에게 독성으로 작용하였기 때문일 것으로 사료된다. 즉, 고농도의 Cu^{2+} 이온에 의해 박테리아의 대사활동에 장애를 받아 산화활동이 느리게 일어나게 되고 이로 인해하여 pH 감소가 서서히 일어난 것으로 사료된다. Fig. 3은 6주 적응실험이 완료된 42일에 적응-배양액 10 ml(42일)를 여과지로 여과하여 SEM에서 관찰한 토착박테리아들의 모습이다. 수많은 박테리아들이 막대 모양으로 여과지에 층을 형성하였다. 적응-배양액에는 5 g, 10 g 및 25 g의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 각각

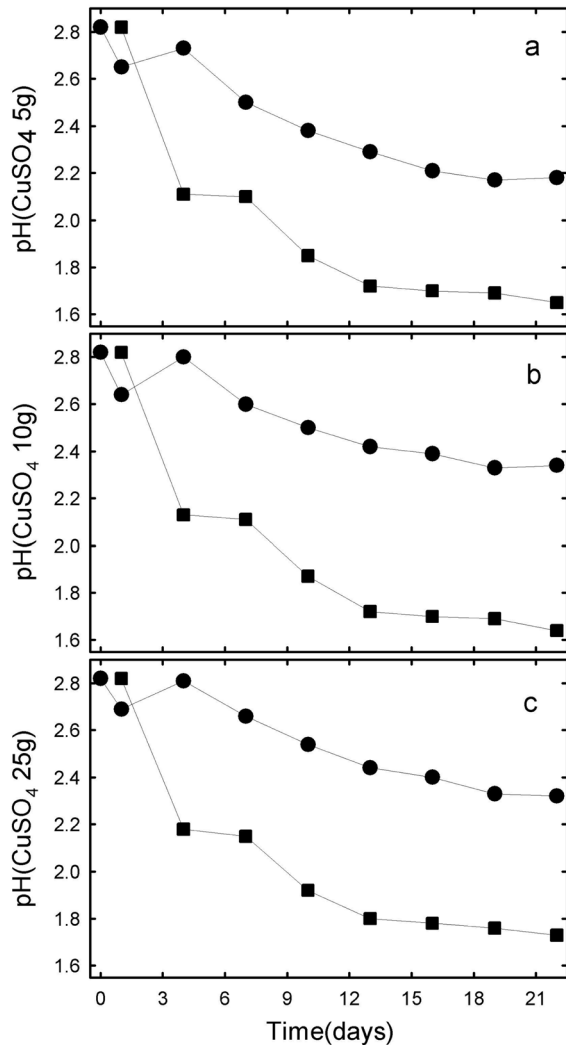


Fig. 2. The evolution of pH in the adaptation-medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 g/L(a), 10 g/L(b) 25 g/L(c)) with Younhwa bacteria. ●; 3 weeks, ■; 6 weeks.

용해되어 있어서 42일 동안 고농도의 이온이 독성으로 작용하였을 것이다. 그러나 이온의 독성에도 불구하고 Fig. 3과 같이 수많은 박테리아들이 관찰되었다는 것은 Cu^{2+} 이온에 어느 정도 내성이 형성되었음을 의미하는 것으로 생각한다(Rawlings and Kusno, 1994).

3.3. 미생물용출에 의한 pH 감소 변화

Cu^{2+} 이온에 3주와 6주 동안 적응된 박테리아를 연화 광석(0.75 g/L, 1.5 g/L, 3.75 g/L)에 각각 접종하였으며, 42일 동안 미생물용출이 일어나도록 32°C를 유지하였다. 42일 동안의 pH 변화를 Fig. 4에 나타냈다. 적응 3주 박테리아들에 의한 용출-배양액의 pH들은 대체로 초기 pH

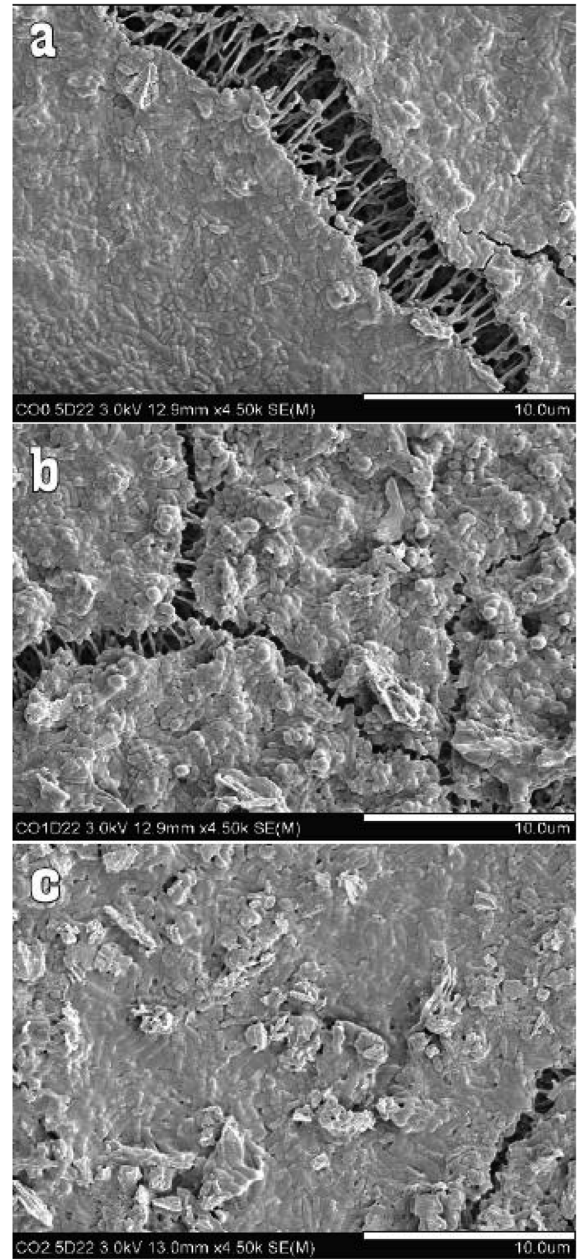


Fig. 3. SEM image of indigenous bacterial layer on the filter paper from the adaptation-medium. These bacteria have been adapted in the adaptation-medium for 42 days with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ of 5 g/L(a), 10 g/L(b) and 25 g/L(c), respectively. The scale bar is 10.0 μm (a, b and c) in length.

조정(2.82) 이후에는 감소하는 경향을 보였으나 용출 후기로 갈수록 증가하는 경향으로 나타났다. 이와 같이 적응 3주 박테리아가 포함된 용출-배양액에서 pH가 증가하는 경향을 보이는 것은 박테리아에 의한 생물학적 산화보다 무기적 산화작용이 우세하게 일어나기 때문이다(Sampson et al., 2005). 무기적 산화작용이 일어날 때 산소 반응에

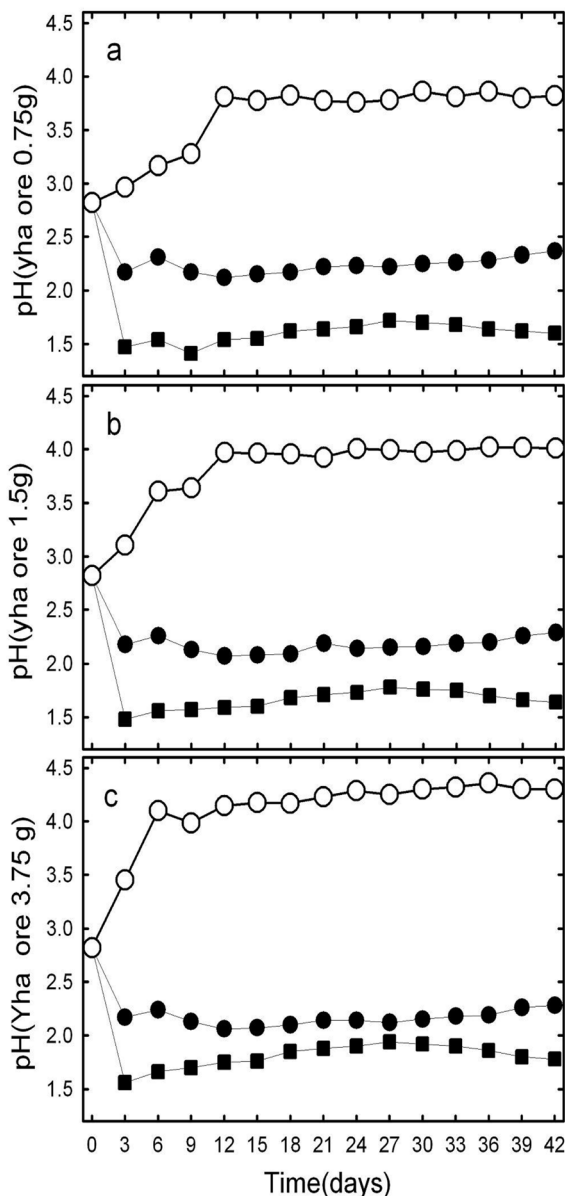


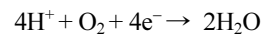
Fig. 4. The evolution of pH in the leaching-medium with Younwha mine waste ore (a; 0.75 g/L, b; 1.5 g/L, c; 3.75 g/L). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks (●), 6 weeks (■) and control (○), respectively.

의하여 다음과 같이 pH가 증가한다. 광석에 포함된 황동석이 산소에 의해 무기적 화학작용이 일어나며 수소이온이 소비되기 때문이다. 산소의 직접적인 산화작용으로 수소이온이 소비되는 반응은 다음과 같다(Mousavi et al., 2005).

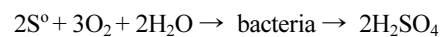


pH가 증가하는 또 다른 요인은 광석 사이에서 일어나

는 galvanic 반응 때문이다. 정지전압 차이가 다른 광석들이 용출-배양액에 혼합되어 있으면 갈바니 전지(galvanic cell)가 형성된다. 정지전압이 낮은 광석표면은 부식이 일어나 금속이 용해되고 정지전압이 큰 광석 표면에서는 산소가 물로 환원된다. 이때 수소이온이 소비되기 때문에 pH가 증가한다(Attia and El-Zeky, 1990a).



본 연화폐광석에는 자류철석이 상대적으로 제일 많이 산출된다(Fig. 1). 따라서 정지전압이 낮은 자류철석이 용출-배양액에서 양극(anode)으로 작용하고 황동석이나 섬아연석은 음극(cathode)로 작용하였을 것이다(Ahonen et al., 1986). 그러므로 자류철석 표면에서 Fe^{2+} 가 용출되고 황동석이나 섬아연석 표면에서 H_2O 가 생성되었을 것이다(Mehta and Murr, 1982, 1983; Natarajan and Iwasaki, 1983; Ballester et al., 1989). 적응 9주 박테리아에 의한 용출-배양액의 pH들은 초기 pH 조정 이후 증가 경향을 보였으나 용출실험 말기에는 감소경향으로 나타났다. 용출실험 말기에 pH가 감소하는 원인은 박테리아에 의하여 미생물학적 산화작용이 우세하게 일어나기 때문이다. 이는 적응된 박테리아의 활동으로 인하여 황화광물에 포함되어 있던 원소 황이 산화되어 황산이 생성되기 때문이다(Attia and El-Zeky, 1990a).



따라서 6주 적응 박테리아에 의해서 생물학적 산화작용이 우세하게 일어나고 또한 갈바니반응이 동시에 일어났을 것이다. 만약 갈바니 반응이 일어났다면, 정지전압이 낮은 자류철석 표면에서는 많은 양의 Fe^{2+} 가 방출되었을 것이고 음극으로 작용하는 황동석이나 섬아연석 표면에서는 상대적으로 적은 양의 Cu나 Zn 이온이 용출되었을 것이다.

3.4. 적응효과에 따른 용출량 변화 및 향상

Cu^{2+} 이온에 적응 3주된 박테리아와 적응 6주된 박테리아들을 연화폐광석에 각각 접종하고 미생물용출이 일어나는 42일 동안의 Cu 함량을 막대그래프로 나타냈다. 막대그래프는 3일 간격으로 나타냈다(Fig. 5a). 3주 적응 박테리아에 의하여 연화폐광석 0.75 g/L, 1.5 g/L 및 3.75 g/L로부터 용출된 평균 Cu 함량은 각각 54.16 mg/l, 74.39 mg/l, 132.33 mg/l이었다. 광석 첨가량이 증가하면 Cu의 미생물 용출량이 증가하였다. 그리고 6주 적응 박테리아에 의해서 용출된 Cu 평균 함량은 각각 67.76 mg/l,

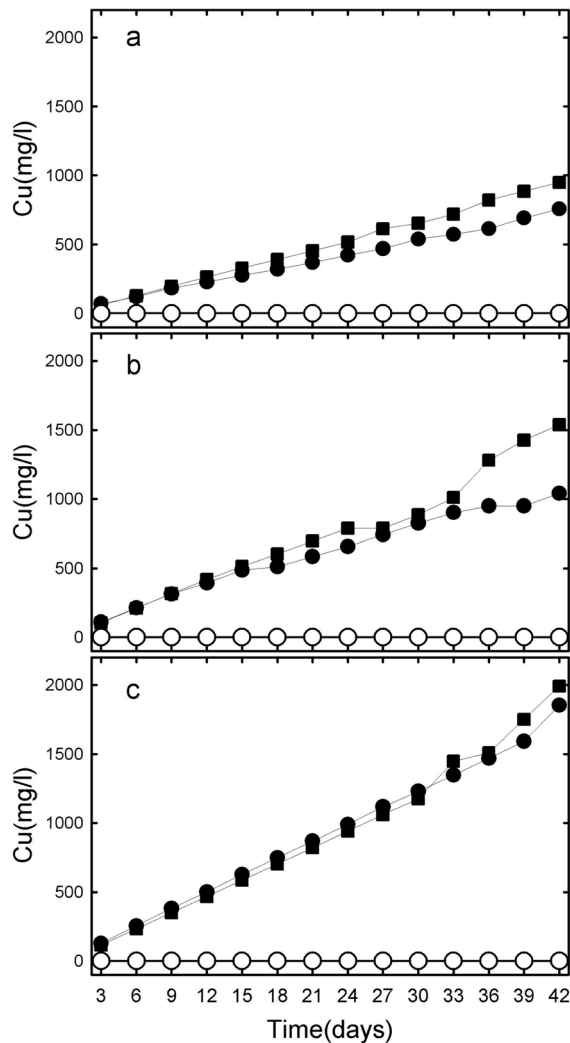


Fig. 5. The variation of Cu concentration in the leaching-medium with Younwha mine waste ore (a; 0.75 g/L, b; 1.5 g/L, c; 3.75 g/L). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks (●), 6 weeks (■) and control (○), respectively.

109.86 mg/l, 142.32 mg/l이었다. 역시 광석 첨가량이 증가하면 Cu의 미생물 용출 함량도 증가하였다. 적응 3주 박테리아 보다 적응 6주 박테리아에서 Cu가 평균 20%, 31%, 7% 향상되었다. 적응 3주 및 적응 6주 박테리아에 의하여 용출된 Cu 함량을 누계함량으로 나타냈다(Fig. 6). 0.75 g/L의 연화폐광석에서 용출된 Cu 함량은 적응 3주 박테리아에서 758.28 mg/l, 적응 6주 박테리아에서 948.58 mg/l이었다. 1.5 g/L의 폐광석으로부터 용출된 Cu 함량은 적응 3주에서 1041.38 mg/l, 적응 6주에서 1537.99 mg/l이었다. 3.75 g/L의 광석으로부터 용출된 Cu 함량은 적응 3주에서 1852.68 mg/l이었고 적응 6주 박테리아에서 용출

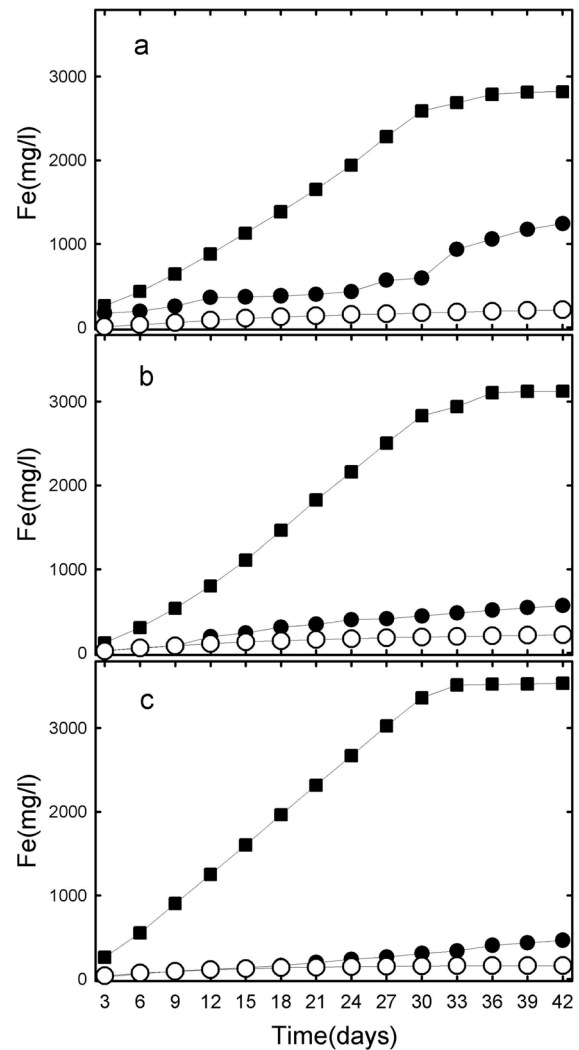


Fig. 6. The variation of concentration in the leaching-medium with Younwha mine waste ore (a; 0.75 g/L, b; 1.5 g/L, c; 3.75 g/L). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks (●), 6 weeks (■) and control (○), respectively.

된 함량은 1992.49 mg/l이었다. 광석 첨가량, 즉 광액 농도가 증가하면 용출되는 Cu 함량이 적응 3주 및 적응 6주 모두에서 증가하였다. 적응 3주와 적응 6주 사이에서 용출을 향상이 1.5 g의 폐광석에서 32.29%로 가장 높게 나타났다.

적응 3주와 적응 6주 박테리아에 의해 연화폐광석으로부터 용출된 Fe 함량을 막대그래프로 나타내었다(Fig. 7) 0.75 g/L의 폐광석으로부터 용출된 Fe 평균함량은 적응 3주 박테리아에서 88.76 mg/l이었고 적응 6주에서 201.30 mg/l이었다. 1.5 g/L의 폐광석으로부터 용출된 Fe 함량은 적응 3주에서 40.63 mg/l이었고 적응 6주에서는 223.20

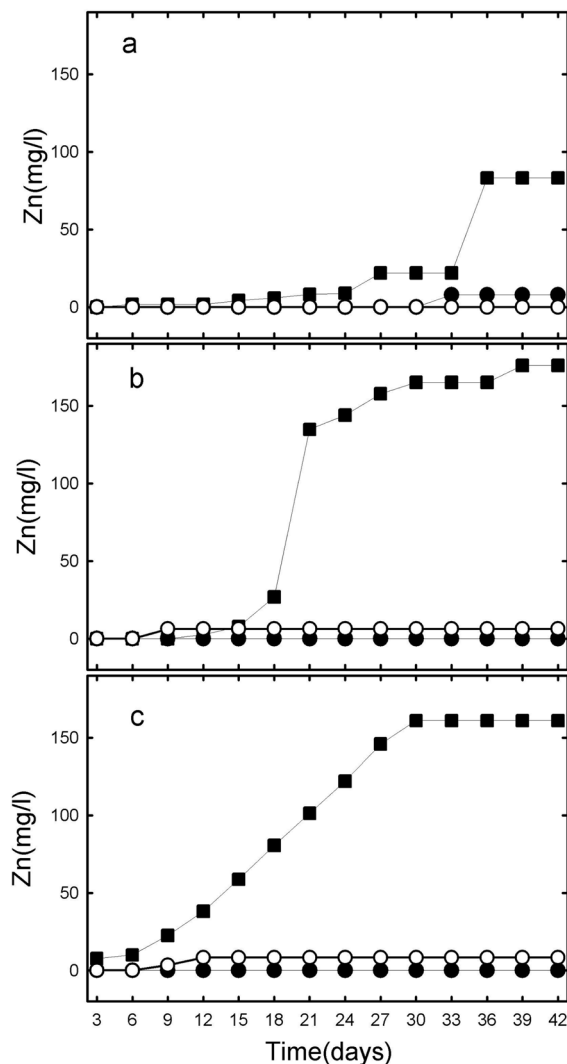


Fig. 7. The variation of Zn concentration in the leaching-medium with Younwha mine waste ore (a; 0.75 g/L, b; 1.5 g/L, c; 3.75 g/L). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks (●), 6 weeks (■) and control (○), respectively.

mg/l이었다. 3.75 g/L의 폐광석으로부터 용출된 Fe 함량은 적응 3주에서 33.10 mg/l이었고 적응 6주에서 252.38 mg/l이었다. 광액농도가 증가하면 적응 3주에서 용출된 Fe 함량은 감소하였지만 적응 6주에서는 증가하였다. 이와 같은 용출 결과는 무기적 산화작용이 적응 3주에서 주로 일어났고 적응 6주에서는 생물학적 산화작용이 우세하게 일어났기 때문인 것으로 사료된다. 42일 동안 용출된 Fe 함량을 누계함량으로 나타냈다(Fig. 6). 0.75 g/L의 폐광석에서 적응 3주 박테리아에 의해서 용출된 Fe 함량은 1242.63 mg/l이었고 적응 6주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 2818.18 mg/l이었다. 1.5 g/L의 폐광석으로부터 용출

된 Fe 함량은 적응 3주에서 568.82 mg/l이었고 적응 6주에서 3124.79 mg/l이었다. 3.75 g/L의 폐광석으로부터 용출된 Fe는 적응 3주에서 463.38 mg/l이었지만 적응 6주 박테리아에서는 3,533.37 mg/l이었다. 적응 3주와 적응 6주 사이의 용출율 향상은 0.75 g/L에서 55.91%, 1.5 g/L의 폐광석에서 81.80%, 3.75 g/L에서는 86.89%로 나타났다. Fe 용출량이 적응 3주 보다 적응 6주 박테리아에서 높게 용출되었다. 이와 같은 용출량 향상은 두 가지 요인으로 해석할 수 있다. 우선 Cu 이온에 적응된 박테리아에 의해 생물학적 산화작용이 활발하게 진행되었기 때문이다. 또 하나는 갈바니반응에 의한 결과이다. 생물학적 산화작용이 진행된 것으로 해석할 수 있는 근거는 6주 박테리아를 접종한 경우 용출-배양액의 pH가 용출 후반부에서 감소 경향으로 나타났기 때문이다(Fig. 4). 자류철석이 포함된 용출-배양액에서, 무기적 갈바니 반응이 우세하게 일어나는 적응 3주에서 보다 생물학적 산화작용과 갈바니 반응이 동시에 일어나는 적응 6주에서 많은 양의 Fe가 용출되었기 때문이다. 특히 정지전압이 낮은 자류철석과 정지전압이 높은 황동석 혹은 섬아연석이 용출-배양액에서 서로 접촉하는 경우, 자류철석은 양극으로 작용하여 자류철석 표면에서 Fe^{2+} 이온이 부식되어 용출되고, 음극으로 작용하는 황동석이나 섬아연석 표면에서는 H_2O 가 생성되기 때문에 Cu 이온이나 Zn 이온이 상대적으로 적게 용출된다(Malouf and Prater, 1961; Hiskey and Wadsworth, 1975).

Zn 이온은 대부분 적응 6주 박테리아에 의해서 용출되었고 적응 3주에서는 대부분 불검출로 나타났다. 용출된 Zn 함량을 누계 함량으로 나타낸 결과 적응 6주의 폐광석 1.5 g에서 가장 높게 용출되었다(Fig. 7).

4. 토 의

본 연구에 이용한 연화 토착 호산성박테리아에 대하여 16S rRNA 염기서열을 분석하여 ATCC(American Type Culture collection) 표준균주인 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 23270과 비교한 결과 유사성(similarity)이 97.59~97.90% 이상으로 나타났다(김봉주 등, 2011). 일반적으로 박테리아의 유사성이 97% 이상이면 같은 종(species)으로 간주한다(Stackebrandt and Goebel, 1994) 따라서 본 용출실험에 이용한 토착박테리아는 황화광물을 산화시켜 유용금속이온을 용출시킬 수 있는 호산성박테리아임을 확인하였다. 토착박테리아가 Cu^{2+} 이온에 내성을 가질 수 있도록 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 용해된 적응-배양액에서 3주 주기

로 되풀이하여 계대배양하였다. 적응 3주 동안 적응-배양의 pH는 매우 느리게 감소하였다(Fig. 2). 3주 동안 Cu^{2+} 이온에 적응된 박테리아를 용출-배양액에 접종하고 42일 동안 용출실험을 수행하였지만 pH 감소가 일어나지 못하였다(Fig. 4). 그러나 Cu^{2+} 이온에 3주 동안 적응시킨 박테리아를 다시 Cu^{2+} 이온에 6주 동안 적응시킨 결과 적응-배양의 pH가 매우 빠르게 감소하였다. 또한 6주 적응 박테리아를 폐광석이 포함된 용출-배양액에 접종하자 pH가 감소경향으로 나타났다. 이는 박테리아가 Cu^{2+} 이온에 내성이 길러지고 그리고 생물학적 산화작용으로 폐광석으로부터 유용금속이온이 용출될 수 있는 적응기간이 최소 6주 이상이 소요되는 것으로 생각된다. 특히 6주 적응 말기(22일)에 많은 박테리아들이 층을 이루어 나타나는 모습은 Cu^{2+} 독성 이온에 내성이 형성되었기 때문으로 해석된다(Fig. 3). 박테리아를 중금속이온에 노출시키면 이중반응(biphasic response)이 나타나는 것으로 알려져 있다(Sadler and Trudinger, 1967). 즉, 중금속이온의 농도가 낮은 경우, 박테리아는 이 중금속이온에 자극(stimulation)을 받아 내성이 형성된다. 그러나 중금속이온이 고 농도인 경우, 박테리아는 중금속이온에 의하여 성장장애를 일으켜 사멸 혹은 선택(selection)되거나 돌연변이(mutation)이가 출현한다(Woese, 1987; Rawlings and Kusno, 1994). Rawlings and Kusno(1994)는 박테리아가 중금속 이온에 내성이 형성되는 메커니즘을 선택과 돌연변이 축적으로 해석하였다. 수많은 박테리아가 중금속이온에 노출되었을 경우, 중금속이온에 대하여 내성인자를 갖고 있지 않은 대부분의 박테리아는 사멸한다. 그러나 내성인자를 갖고 있는 극소수의 박테리아는 중금속이온에 선택되어 증식하게 된다. 또한 내성인자를 갖고 있는 박테리아가 증식하는 과정에서 중금속이온의 독성에 더 잘 견디는 돌연변이가 계속하여 출현한다. 이 돌연변이들은 중금속이 포함된 환경에서 더 많이 증식하게 되고 결국 중금속이온에 내성인자를 갖는 우점 종으로 생존하게 된다(Silver and Phung, 1996). 실제로 Silver and Phung(1996)는 중금속이온에 내성이 형성된 박테리아 일수록 플라스미드(plasmid)가 증가하고 화학적 삼투력이 증가하는 것을 확인하였다.

적응 3주 및 적응 6주 박테리아를 연화폐광석에 접종하여 42일 동안 용출실험을 수행한 결과 Cu, Fe 및 Zn 함량은 대부분 적응 6주 박테리아에서 높게 용출되었다. 적응 3주 박테리아에 의한 용출량과 적응 6주 박테리아에 의하여 용출량을 서로 비교하면, Cu, Fe 및 Zn 용출량에서, Fe 용출량이 가장 많이 향상되었다. Fe 이온에서 용

출을 향상이 많이 일어난 이유는 자류철석이 연화폐광석에서 가장 많이 포함되어 있기 때문에 그리고 갈바니 반응이 일어난 결과로 사료된다. 따라서 연화폐광석에 함유된 자류철석을 미생물용출에 사용하면 갈바니 효과가 일어나 더 많은 유용금속이온을 효과적으로 용출시킬 수 있을 것이다.

방대한 양으로 방치되어 있는 폐광석에는 다양한 종류의 광석광물들이 포함되어 있다. 폐광석에 포함되어 있는 황화광물들에 의하여 고농도의 중금속이 함유된 산성광산배수가 형성된다(Machemer and Wildeman, 1992; Schrenk et al., 1998; Mielke et al., 2003). 산성광산배수의 수질은 폐광석에 함유된 광석광물의 화학성분이 반영된다. 이러한 산성광산배수에 서식하는 호산성박테리아는 광석광물의 화학성분에 내성이 형성되어 있다(Colmer et al., 1950; Dugan et al., 1970; Miller et al., 1987; Groudev and Groudeva, 1993). 그러므로 폐광석에 함유된 유용금속 이온을 회수하기 위해서는 산성광산배수에 적응된 토착박테리아를 활용하고 또한 이들 박테리아를 폐광석에 함유된 중금속 이온으로 되풀이하여 적응시키면 목적 중금속이온에 내성이 형성된다(Tuovinen et al., 1971; Das et al., 1997, 1998; Shi and Fang, 2004). 본 연구에서는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 을 성장-배양액에 용해시켜 Cu^{2+} 이온에 박테리아를 적응시켰지만, 향후 용출실험에서, 폐광석의 광석광물을 반영하여 여러 종류의 중금속 이온을 혼합하여 박테리아를 적응시키면 효과적으로 유용금속을 용출시켜 낼 수 있을 것이다.

5. 결 론

폐광산에 방치되어 있는 폐광석으로부터 유용금속이온을 박테리아를 이용하여 효과적으로 용출시키고자 하였다. 광산 현장 환경에 적응된 토착호산성박테리아를 채취하였고, 또한 중금속 이온에 내성이 형성될 수 있도록 Cu 중금속 이온에 주기적으로 적응실험을 수행하였다. 적응실험이 진행될수록 성장-배양액의 pH가 더 빠르게 감소하였다. 적응 3주 및 적응 6주 박테리아를 이용하여 42일 동안 미생물용출을 수행한 결과, 적응 3주에서 pH는 증가 경향으로 나타났지만 적응 6주에서는 감소하였다. Cu, Fe 및 Zn 함량은 적응 3주 보다 적응 6주 박테리아에서 높게 용출되었다. 적응 3주와 적응 6주 박테리아에 의하여 용출된 Cu, Fe 및 Zn 함량을 향상율을 비교해 보면 Fe가 가장 많이 향상되었다. 따라서 현장 환경에 적응된 토착박테리아를 이용하고 또한 목적중금속 이온으로 박테

리아를 적응시켜 준다면 어떤 지역의 광산폐석에서라도 유용금속이온을 효과적으로 용출시킬 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 김봉주, 조강희, 위대웅, 백근식, 성치남, 최낙철, 박천영, 2011, 16S rRNA 염기서열을 이용한 고성, 연화 및 일본 토착호산성박테리아 동정, 한국지구시스템공학회 추계학술발표회, 강원랜드, p. 18-20.
- 위대웅, 조강희, 김봉주, 최낙철, 박천영, 2011, 적용효과에 따른 폐광석으로부터 생물학적 용출 향상, 한국지구시스템공학회 추계학술발표회, 강원랜드, p. 21-23.
- Ahonen, L., Hiltunen, P., and Tuovinen, O.H., 1986, The role of pyrrhotite and pyrite in the bacterial leaching of chalcopyrite ores, In R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.G. Ebner (eds.), *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, Amsterdam, 13-22.
- Astudillo, C. and Acevedo, F., 2008, Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate, *Hydrometallurgy*, **92**, 11-15.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M., 1989, Bioleaching of gold pyrite tailings with adapted bacteria, *Hydrometallurgy*, **22**, 291-300.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M., 1990b, Effects of galvanic interactions of sulfides on extraction of precious metals from refractory complex sulfides by bioleaching, *International Journal of Mineral Processing*, **30**, 99-111.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M.A., 1990a, Bioleaching of non-ferrous sulfides with adapted thiophilic bacteria, *The Chemical Engineering Journal*, **44**, P.B31-B40.
- Barr, D.W., Jordan, M.A., Norris, P.R. and Phillips, C.V., 1992, An investigation into bacterial cell, ferrous iron, pH and Eh interactions during thermophilic leaching of copper concentrates, *Minerals Engineering*, **5**, 557-567.
- Colmer, A.R., Temple, K.L., and Hinkle, M.E., 1950, An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines, *Journal of Bacteriology*, **59**, 317-328.
- Das, A., Jayant, M., Modak, M., and Natarajan, K.A., 1998, Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance, *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 215-222.
- Das, A., Modak, J.M., and Natarajan, K.A., 1997, Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Minerals Engineering*, **10**(7), 742-749.
- Dugan, P.R., MacMillan, C.B., and Pfister, R.M., 1970, Aerobic heterotrophic bacteria indigenous to pH 2.8 acid mine water: Microscopic examination of acid streamers, *Journal of Bacteriology*, **101**(3), 973-981.
- Elzeky, M. and Attia, Y.A., 1995, Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides, *The Chemical Engineering Journal*, **56**, B115-B124.
- Groudev, S.N. and Groudeva, V.I., 1993, Microbial communities in four industrial copper dump leaching operations in Bulgaria, *FEMS Microbiology Reviews*, **11**, 261-268.
- Haghshenas, D.F., Alamdari, E.K., Torkmahalleh, M.A., Bonakdarpour, B., and Nasernejad, B., 2009, Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate, *Minerals Engineering*, **22**, 1299-1306.
- Han, O.H., Park, C.Y., and Cho, K.H., 2010, The characteristic of bioleaching for chalcopyrite concentrate using indigenous acidophilic bacteria-column leaching at room temperature-, *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, **47**(5), 678-689. (in Korean)
- Hiskey, J.B. and Wadsworth, M.E., 1975, Galvanic conversion of chalcopyrite, *Metallurgical Transactions B*, **6B**, 183-190.
- Jones, R.A., Koval, S.F., and Nesbitt, H.W., 2003, Surface alteration of arsenopyrite (FeAsS) by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**(5), 955-965.
- Kai, T., Nishi, M., and Takahashi, T., 1995, Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* to nickel ion and bacterial oxidation of nickel sulfide, *Biotechnology Letters*, **17**(2), 229-232.
- Karimi, G.R., Rowson, N.A., and Hewitt, C.J., 2010, Bioleaching of copper via iron oxidation from chalcopyrite at elevated temperature, *Food and Bioprocess Technology*, **88**, 21-25.
- Ko, M.S., Park, H.S., and Lee, J.U., 2009, Bioleaching of heavy metals from tailing in abandoned Au-Ag mines using sulfur-oxidizing bacterium *Asdithiobacillus thiooxidans*, *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, **46**(2), 239-251. (in Korean).
- Li, H.M. and Ke, J.J., 2001, Influence of Cu^{2+} and Mg^{2+} on the growth and activity of Ni^{2+} adapted *Thiobacillus ferrooxidans*, *Minerals Engineering*, **14**(1), 113-116.
- Machemer, S.D. and Wildeman, T.R., 1992, Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal process from acid mine drainage in a constructed wetland, *Journal of Contaminant Hydrology*, **9**, 115-131.
- Malouf, E.E. and Prater, J.D., 1961, Role of bacteria in the alteration of sulfide minerals, *Journal of Metals*, **13**, 353-356.
- Mason, L.J. and Rice, N.M., 2002, The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel-iron sulphide concentrate, *Minerals Engineering*, **15**, 795-808.
- Mehta, A.P. and Murr, L.E., 1982, Kinetic study of sulfide leaching by galvanic interaction between chalcopyrite, pyrite, and sphalerite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*

- (30°C) and a thermophilic microgram (55°C), *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 919-940.
- Mehta, A.P. and Murr, L.E., 1983, Fundamental studies of the contribution of galvanic interaction to acid-bacterial leaching of mixed metal sulfides, *Hydrometallurgy*, **9**, 235-256.
- Mielke, R.E., Pace, D.L., Porter, T., and Southam, G., 2003, A critical stage in the formation of acid mine drainage: colonization of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* under pH-neutral conditions, *Geobiology*, **1**, 81-90.
- Miller, C.L., Landa, E.R. and Updegraff, D.M., 1987, Ecological aspects of microorganisms inhabiting uranium mill tailings, *Microbial Ecology*, **14**, 141-155.
- Mousavi, S.M., Taghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A. and Hoseini, S.A., 2005, Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopryrite concentrate in an airlift bioreactor, *Hydrometallurgy*, **80**, 139-144.
- Natarajan, K.A. and Iwasaki, I., 1983, Role of galvanic interactions in the bioleaching of Duluth gabbro copper-nickel sulfides, *Separation Science and Technology*, **18**, 1095-1111.
- Natarajan, K.A., Sudeesha, K., and Ramananda Rao, G., 1994, Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**, 303-306.
- Norris, P.R. and Barr, D.B., 1985, Growth and iron oxidation by acidophilic moderate thermophiles, *FEMS Microbiology Letters*, **28**, 221-224.
- Norris, P.R. and Kelly, D.P., 1978, Toxic metals in leaching systems, In L.E. Murr, A.E. Torma and J.A. Brierley, (eds), *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, p.83-102. London, New York: Academic Press.
- Park, C.Y., Cheong, K.H., Kim, B.J., Wi, H., and Lee, Y.G., 2011, The corrosion and the enhance of bioleaching for galena by moderate thermophilic indigenous bacteria, *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, **48**(1), 11-24 (in Korean).
- Park, C.Y., Cheong, K.H., and Kim, B.J., 2010b, The bioleaching of sphalerite by moderately thermophilic bacteria, *Economic and Environmental Geology*, **43**(6), 573-587 (in Korean).
- Park, C.Y., Cheong, K.H., Kim, K.M., Hong, Y.U., and Cho, K.H., 2009, Bioleaching of pyrite from the abandoned Hwasun coal mine drainage using indigenous acidophilic bacteria, *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, **46**(5), 521-535 (in Korean).
- Park, C.Y., Kim, S.O., and Kim, B.J., 2010a, The characteristic of selective attachment and bioleaching for pyrite using indigenous acidophilic bacteria at 42°C, *Economic and Environmental Geology*, **43**(2), 109-121 (in Korean).
- Rawlings, D. and Kusno, T., 1994, Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Microbiological Reviews*, **58**, 39-55.
- Sadler, W.R. and Trudinger, P.A., 1967, The inhibition of microorganisms by heavy metals, *Mineralium Deposita*, **2**, 158-168.
- Sampson, M.I., Van der Merwe, J.W., Harvey, T.J., and Bath, M.D., 2005, Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermalolty during biooxidation heap leaching, *Minerals Engineering*, **18**, 427-437.
- Sanmugasunderam, V. and Branion, R.M.R., 1985, A growth model for the continuous microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biotechnology and Bioengineering*, **27**, 1173-1184.
- Shahverdi, A.R., Yazdi, M.T., Oliazadeh, M., and Darebidi, M.H., 2001, Biooxidation of mouth refractory gold-bearing concentrate by an adapted *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Sci. I. R. Iran*, **12**, 209-212.
- Silver, S. and Phung, L.T., 1996, Bacterial heavy metal resistance: new surprises, *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 753-789.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994, Taxonomic note: a place for DNA-DNA hybridization and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition on bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, **44**, 846-849.
- Torma, A.E., Walden, C.C., and Branion, R.M.R., 1970, Microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate, *Biotechnology and Bioengineering*, **12**, 501-517.
- Tuovinen, O.H., Niemela, S.I., and Gyllenberg, H.G., 1971, Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals, *Antonie van Leeuwenhoek*, **37**, 489-496.
- Woese, C.R., 1987, Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, **51**, 221-271.
- Xia, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J., and Qiu, G., 2008, Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopryrite, *Hydrometallurgy*, **92**, 95-101.