

*Thiobacillus ferrooxidans*를 이용한 광미 정화의 효율 증진에 관한 연구

A Study on the Enhanced Cleanup of Mine Tailings Using *Thiobacillus ferrooxidans*

이지희(Jee-Hee Lee)* · 최상일(Sang-Il Choi)*

요 약 : 충북 단양에 위치한 조일 광산에서 채취한 구리와 아연으로 오염된 광미(광산 폐기물로서 금속 추출 후 남은 찌꺼기)의 처리방안으로서 생물학적 용출기법(bioleaching)의 효율 증진에 관한 연구를 수행하였다. 기본 배지 조성 (9 K medium) 중 미생물의 성장 및 증식에 영향을 미치는 에너지원, 인, 질소원의 농도를 변화시켜가며 배지 조성에 따른 중금속의 생물학적 용출 특성을 관찰하였다. 먼저, 배지 조성 중 인의 농도를 0 mM, 3.0 mM, 6.0 mM로 각각 조절하여 중금속의 용출효율을 관찰한 결과, 인을 첨가하지 않았을 때 아연, 구리 각각 98.8%와 47.5%의 용출효율을 보인 반면, 인의 농도가 6.0 mM로 증가 시켰을 경우, 오히려 중금속의 용출효율이 감소하였다. 배지 내 질소원의 농도를 0 mM, 45 mM, 90 mM로 조절하여 중금속의 용출정도를 알아본 결과, 45 mM 농도로 주입하였을 때 아연, 구리 각각 85%와 46.4%로 90 mM 농도에서보다 더 높은 용출효율을 나타내었다. 에너지원 변화에서는 아연의 경우 에너지원을 첨가하지 않았을 때 93%의 용출효율을 보였고, 구리의 경우는 160 mM 첨가했을 때 46.4%로 가장 높은 중금속 용출효율을 보였다.

Abstract : This study was carried out to enhance the efficiency of bioleaching of heavy metals, copper and zinc from the soil samples obtained from mine tailings in Cho-il Mine located in Dan-Yang, Choong-Buk. The effects of medium (9 K) composition on the leaching efficiency were investigated by changing concentrations of the dominant components, phosphorus, nitrogen source, and energy source which are the most important factors governing the growth and multiplication of microorganism. The results of the bioleaching test at different phosphorus concentrations of medium, 0 mM, 3.0 mM, and 6.0 mM showed that leaching efficiency for zinc and copper was 98.8% and 47.5% respectively at 0 mM and decreased at higher phosphorus concentration 6.0 mM. In the bioleaching test of zinc and copper at 0 mM, 45 mM, and 90 mM nitrogen concentrations, the highest efficiency of 85% and 46.4% was obtained for zinc and cooper respectively at 45 mM and the lower efficiency observed for 90mM nitrogen addition. The zinc and copper leaching with variation of energy source dosage showed the highest removal efficiency, 93% for zinc in the absence of energy source and 46.4% for copper at 160mM energy source.

서 론

각종 경제·산업 활동의 확대와 더불어 국지적 토양오염이 심화되고 있으나, 그 영향이나 노출이 대부분 만성적이고 간접적으로 나타나기 때문에 다른 환경오염 문제에 비하여 심각성이거나 인지도가 상대적으로 낮게 다루어져 왔다. 토양오염의 경우에는 자연정화 속도가 매우 느리기 때문에 인위적으로 복원을 하기 전에는 오염 상태가 지속 되므로 생태계뿐만 아니라 인간에게도 악영향을 미치게 된다.

특히, 우리 나라의 경우처럼 국토가 매우 협소하고 지하수위가 비교적 낮은 국가에서는 토양오염으로 인한 지하수의 동반오염문제가 심각한데, 특히 토양에 축적된 중금속은 자연적인 분해가 어렵고, 토양으로부터 용출되어 지하수나 주변하천의 오염을 가속화시키고 있다. 실제로 폐광산 주변의 토양 및 지

하수 중의 중금속 함유량을 조사한 결과, 법적 기준치 이상의 높은 농도를 나타내고 있으며 주변 농경지의 농작물에서도 다양한 중금속이 검출되고 있어 중금속오염의 피해가 심각함을 보여주고 있다.

금속 광산에 의한 광해 실태는 중금속 시약 및 시약 성분 등이 포함된 선광 폐수와 적치된 광미에서 나오는 침출수로 인해 지하수 오염이 가중되고 있으며, 또한 폐석 유실로 훼손된 산림이 방치되고 있어 광미댐, 침전지 등에 대한 적절한 관리 대책이 요구되고 있다.

중금속 오염토양으로부터 오염물을 제거하기 위한 물리·화학적 처리기술들은 과다한 약품 사용과 장치비용으로 현실적으로 적용하는데 많은 어려움을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 중금속으로 오염된 토양 및 광산 폐기물에서 중금속을 효율적으로 용출시킬 수 있는 미생물 중의 하나인 *Thiobacillus ferrooxidans*(이하 *T. ferrooxidans*라 함)를 이용하여 오염된 토양 내에 존재하는 중금속을 효과적으로 용출시킬 수 있는 생물학적 용출기법의 최적 조건에 대하여 연구하고자 하였다.

* 광운대학교 환경공학과(Department of Environmental Engineering, Kwang-woon University, Seoul, Korea)

사용 광미의 특성 조사

본 연구에 사용된 시료는 충청북도 단양군 적성면 상원곡리에 위치한 조일 광산에서 중금속의 오염도가 가장 높은 광미로서 적절한 전처리 후 실험에 사용하였다.

조일 광산은 남·아연 광산으로 1983년 폐광되었으며, 개구 주변에 폐석이 그대로 방치되어 있었다(Figure 1). 집적된 광미의 규모와 식생이 이루어지지 않은 현장조건으로 보아 주변 지역의 오염상태가 심각한 것으로 보이며 주변 하천으로 광미가 유입되었을 것으로 추정된다.

채취 지점별 토양은 광산 입구 토양, 산 위 토양, 산중턱 토양, 광미 별로 채취하였으며, 실험대상 중금속으로는 오염농도가 가장 높은 구리와 아연을 선정하였다. 광미 및 토양에 대한 현장조사와 토양 채취는 삽 등으로 채취하여 비닐 백에 넣어 실내로 이동하였고 채취된 시료는 실험 전에 풍건하여 사용하였다.

광미 기초조사 실험

광미 토양시료는 110°C의 온도에서 약 2일간 건조시킨 후, #200체(0.75 μm)를 통과한 것을 사용하였다. 용출 실험을 실시하여 토양 내의 중금속 및 철의 농도를 원자흡광광도계(Atomic Absorption Flame Emission Spectrometer, Model No.: AA-6401F, Shimadzu Co.)로 측정하였고, 자동 원소분석기(Auto Elemental Analyzer, Model No.: EA1110 CHNS-O, CE Instruments)를 이용하여 토양 시료 내의 C, N, H, S의 구성성분을 측정하였다. 토양에 존재하는 중금속과 다른 원소들간의 상호 결합 상태를 X-Ray Diffractometer(Model No.: RINT 2000 SERIES, Rigaku(Japan))를 사용하여 측정하였으며, pH는 pH meter (Model No.: Digital pH/Ion Meter DP-880M, DMS Co.)로 측정하였다.

용출 실험

EPA 3050법에 의해 지점별 채취한 시료 2 g을 각각 취하여



Figure 1. Heavy metal-contaminated site of Cho-il mine.

HNO₃와 H₂O₂, HCl을 순서대로 넣고 용출과 냉각을 반복한 후, 중류수를 첨가하여 100 mL이 되도록 한다. 이를 여과 또는 2000~3000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 광미 기초조사 실험에 사용한 원자흡광광도계로 용출된 중금속의 농도를 측정하였다.

미생물 선정 및 배양 방법

금속·황 화합물들은 주로 불용성으로서 강한 산성용액 내에서도 화학적으로 쉽게 침출되지 않는다. 그러나 미생물의 작용이 첨가되면 oxidative solubilization에 의해 금속이 용출될 수 있다(강선홍, 최상일, 1995). 이에 금속을 용출시킬 수 있는 다수의 미생물들 가운데 문헌을 통해 선정한 *T. ferrooxidans*를 이용하여 실험을 진행하였다(Table 1). *T. ferrooxidans*는 금속 황화물이 존재하는 산성 환경을 가진 장소라면 어느 곳에서든지 발견할 수 있다. 편모로 운동을 하고 포자를 형성하지 않으며, 그람-음성균이고 간균(0.1 by 1.5 μm) 모양이며 단독 또는 종종 한 쌍으로 존재한다(정재준, 정영률, 1998; 배재근, 오종민, 1995; Preston Devasia, 1993). 세포 성장은 지체기, 지수기, 정체기, 사멸기를 거친다. 세포가 성장할 때는 세포 하나의 크기가 두 배 정도로 자라서 두 쌍으로 분열한다. 사멸기 세포에서의 메카니즘은 세포벽의 투과성을 규제하며 cytoplasmic membrane은 기능을 하지 않는다. 또한 세포는 원형질 분리를 일으키고 산성 배지의 영향 때문에 화학반응을 일으키게 된다(배재근, 오종민, 1995). 또한, 일반적으로 미생물들은 증식을 위하여 에너지원과 탄소, 질소, 인, 마그네슘, 황 등을 필요로 한다. *T. ferrooxidans*는 무기물만으로 구성된 배지에서 자랄 수 있는데, 황과 철(II)이 변형된 황 화합물의 산화작용으로부터 에너지를 얻는다.

균주는 *Thiobacillus ferrooxidans*(ATCC 19859)를 사용하였다. 초기 상태의 균주는 9 K medium(Table 2)에 철 이온을 15

Table 1. Microorganisms involved in bioleaching

- *Thiobacillus ferrooxidans*
- *Thiobacillus acidophilus*
- *Thiobacillus intermedius*
- *Thiobacillus novellus*
- *Thiobacillus thermosulfidoxidans*
- *Thiobacillus thiooxidans*
- *Leptospirillum ferrooxidans*
- *Metellogenium* sp.
- *Sulfolobus* sp.

Table 2. Composition of 9 K medium

Constituent	Concentration [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.00
KCl	0.10
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50
Ca(NO ₃) ₂	0.01
FeSO ₄ · 7H ₂ O	30.00
pH	2.3

g/L 첨가한 후 35°C, 200 rpm의 조건으로 10일간 진탕 배양하였다.

배지조성 중 인의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율 실험

인산염은 미생물의 ATP 생성 및 핵산과 막의 합성에 필요하다. 그러나 높은 농도의 인산염은 미생물의 성장에 저해 작용을 일으킬 수도 있다. 이에 본 연구에서는 미생물 배양액(9 K medium) 중 인 농도 변화가 중금속 용출효율에 미치는 영향을 알아보고, 중금속 용출효율에 가장 적절한 인의 농도를 조사하고자 실험을 수행하였다. 인의 형태는 K_2HPO_4 의 형태로 주입하였고 농도는 0 mM, 3.0 mM, 6.0 mM로 주입하였다. 실험 방법은 250 mL 삼각 플라스크에 인의 농도가 각각 다른 배양액 90 mL을 넣고 10일간 배양한 미생물 *T. ferrooxidans* 10 mL를 첨가하였다. 이 배양액에 조밀 광산에서 채취한 광미 5 g을 넣은 후 35°C, 200 rpm을 유지하며 Shaking incubator에서 교반하였다. 시료 채취는 광미가 함유된 플라스크를 1시간 정체시킨 다음, 상동액 2 mL씩을 취하여 원심분리 투브에 넣고 8 mL의 중류수를 섞은 후 1,500 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 각각의 원심분리된 시료에서 상동액 5 mL을 취한 후 중류수 5 mL을 첨가하여 원자흡광광도계로 구리와 아연을 분석하였다.

배지조성 중 질소의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율 실험

무기 질소를 함유하고 있는 가장 중요한 영양물질은 암모늄, 질산, 아질산 이온 등이다. 질소는 단백질 생성에 필요할 뿐만 아니라 암모늄이나 아질산염을 산화함으로서 일부 화학적 독립영양 미생물의 에너지 생성과정에도 기여한다(Arpad E. Torma, 1977). 이에 배지 조성 중 질소 농도의 변화가 중금속 용출 효율에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

질소의 형태는 $(NH_4)_2SO_4$ 의 형태로 주입하였으며 변화 농도는 0 mM, 45 mM, 90 mM로 주입하였다. 실험방법과 시료 채취방법은 위의 인의 농도변화에 따른 중금속의 용출 효율실험에서와 동일하다.

배지조성 중 에너지원의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율 실험

금속 광산에서 효과적인 중금속의 생물학적 용출에 영향을 미치는 것이 있는데, 이는 금속 용출에 중요한 역할을 하는 미생물의 활성을 촉진하기 위한 영양분의 적절한 공급과 용액에 침전되는 불용성 jarosites와 hydroxysulfates의 지표가 되는 용해성 염 농도의 축적을 방지하는 것이라고 하였다(R.G.L. McCready, 1986). 이에 *T. ferrooxidans*의 에너지원인 철의 농도를 변화시킴으로서 철의 농도가 중금속 용출에 미치는 영향과 최적 에너지원의 농도를 알아보고자 하였다.

에너지원의 형태는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 주입농도를 0 mM, 160

mM, 320 mM로 변화시켜 실험을 수행하였다. 실험방법과 시료 채취방법은 인의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율 실험에서와 동일하다.

미생물의 순응도가 중금속의 생물학적 용출에 미치는 영향에 대한 실험

미생물의 순응도가 중금속의 생물학적 용출에 미치는 영향을 관찰하고자 순응된 미생물을 주입하였을 때와 순응되지 않은 미생물을 주입하였을 때의 용출효율을 알아보고자 하였다.

실험 방법은 위의 배지조성 중 인, 질소, 에너지원 농도변화에 따른 중금속의 용출 효율 실험과 동일하게 하였다. 단, 미생물은 광미에 순응되지 않은 미생물 *T. ferrooxidans* 10 mL과 약 40일간 광미에 순응된 미생물 *T. ferrooxidans* 10 mL를 각각 첨가하여, 5일 후 구리와 아연의 농도를 원자흡광광도계로 측정하여 그 용출효율을 비교하여 보았다.

결과 및 고찰

X-Ray Diffractometer에 의한 결과 및 광미기초 분석 결과 선정된 광미의 광물 결합 형태 및 함유된 중금속 항목에 관한 기초 조사를 위해 X-Ray Diffractometer를 사용하였으며 시료분석 결과와 조밀 광산 광미의 대표적인 광물 형태를 Figure 2와 Table 3에 각각 나타내었다.

Table 3에 나타난 바와 같이, 조밀 광산의 광미는 주로 황철석, 황동석, 섬아연석, 방연석 등으로 구성되어 있으며 철의 용

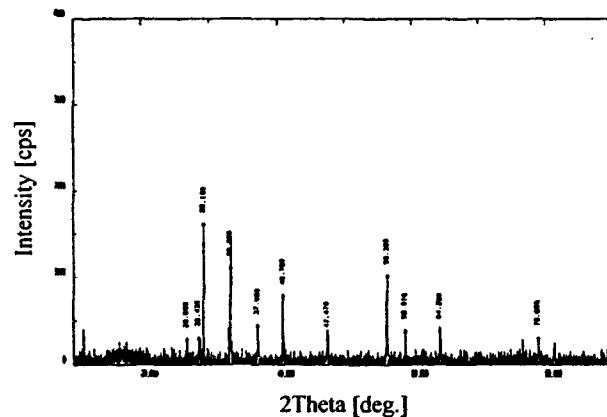


Figure 2. Peak search by X-ray diffractometer

Table 3. Mine Tailing Analysis of Cho-II

Formula	Name
FeS_2	Pyrite
FeS	Iron Sulfide
Cu_2FeSnS_4	Copper Iron Tin Sulfide
Cu_3SnS_4	Kuramite
PbO	Lead Oxide
$CdAgF_4$	Cadmium Silver Fluoride
ZnCoS	Cobalt Zinc Sulfide

출 농도는 31.7%로 상당히 많은 양의 철을 함유하고 있었다. 광미의 pH는 2.34로 강한 산성을 띠고 있어 그대로 방치할 경우, 산성 광산 배수(Acid Mine Drainage)로 인한 인근 토양이나 하천의 오염이 심각할 것으로 예상된다.

광미 기초조사 원소 분석 결과

광미의 원소 분석 결과를 살펴보면 탄소(C) 0.073%, 질소(N) 0%, 수소(H) 0.103%, 황(S) 51.84%로(Figure 3) 매우 많은 양의 황이 함유되어 있었고 질소성분이 불검출된 것으로 미루어 보아 광미 내 미생물의 활동이 매우 적음을 알 수 있다.

용출실험 결과

채취 지점별 중금속 오염도는 광미의 경우가 가장 심하였으며 특히 구리와 아연의 농도가 매우 높았다. 토양의 중금속 오염도는 광산 아래 부근에서 산 위 부근으로 올라갈수록 감소하는 현상을 보였지만(Table 4). 산 위 부근 토양에서도 중금속이 용출된 사실로 보아 이미 중금속 오염이 주변 토양까지 넓게 진행되어 있음을 알 수 있다.

배지조성 중 인의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율

배지조성 중 인의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율을 Figure 4와 Figure 5에 나타내었다. 인의 농도를 0, 3.0, 6.0 mM로 변화시켰을 때 아연의 경우는 각각 98.8%, 84.5%, 75.5%의 용출효율을 나타내었고, 구리의 경우는 각각 47.5%, 46.4%, 41.4%의 용출효율을 나타내었다.

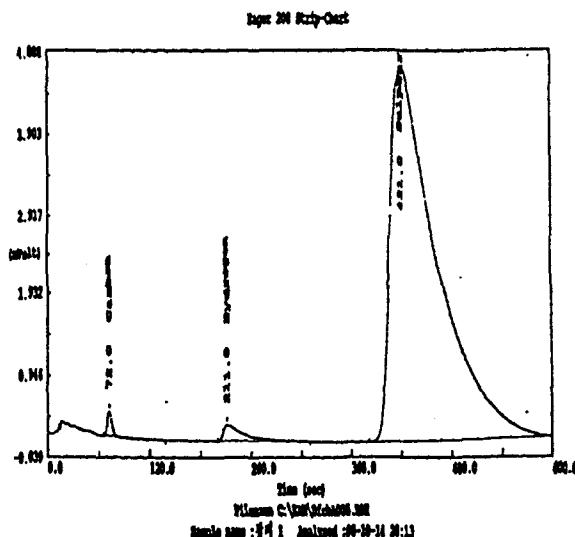


Figure 3. Element analysis of mine tailing

Table 4. Heavy Metal Contents of Sampling Sites in Cho-II mine (mg/kg)

Site	항목	Cu	Zn	Cd
입구토양		157.00	452.04	12.50
산중턱토양		222.00	463.30	10.00
산위토양		16.70	202.95	4.05
광미		280.00	7800.00	22.50

인 농도 변화가 중금속의 생물학적 용출에 미치는 영향을 보면, 본 실험조건 범위에서 인의 농도가 높은 경우에 오히려 구리와 아연의 용출효율이 낮았는데, 이는 산성조건에서는 인이 양이온과 안정한 결합을 하여 차염을 형성하므로(Vernon L. Snoeyink, 1980), 이것이 방해 요소로 작용하여 용출효율이 낮아진 것으로 판단된다. 또한 약 20일 정도까지는 구리와 아연의 용출효율이 저조하다가 20일 이후부터는 그 용출효율이 증가하였는데, 약 20일 정도까지는 미생물이 변화된 배지에 대한 적응기간으로 간주된다.

배지조성 중 질소의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율

배지조성 중 질소의 농도 변화에 따른 중금속의 생물학적 용출 변화를 Figure 6과 Figure 7에 나타내었다. 질소의 농도를 0, 45, 90 mM로 변화시켰을 때 아연의 경우는 각각 74.6%, 84.5%, 62.4%의 용출효율을 나타내었고, 구리의 경우는 각각 29.5%, 46.4%, 42.4%의 용출효율을 나타내었다. 또한, 인의 경우와 같이, 약 20일 이후에 중금속 용출이 활발히 진행되었으며, 질소 농도 변화에 대한 중금속 용출 효율은 45 mM 농도에서 아연, 구리 각각 84.5%와 46.4%로 가장 높은 효율을 보

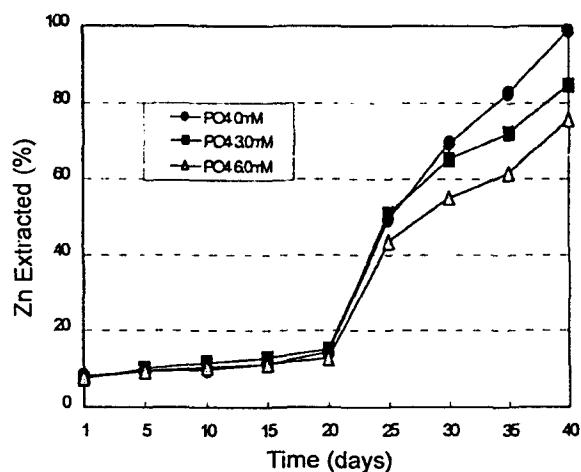


Figure 4. Bioleaching of Zn with varying phosphorus concentration.

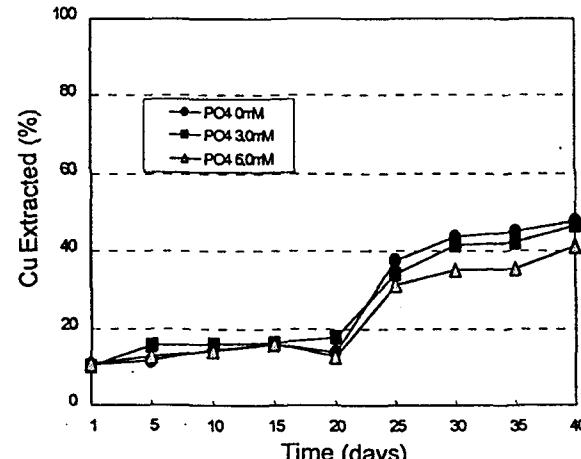


Figure 5. Bioleaching of Cu with varying phosphorus concentration.

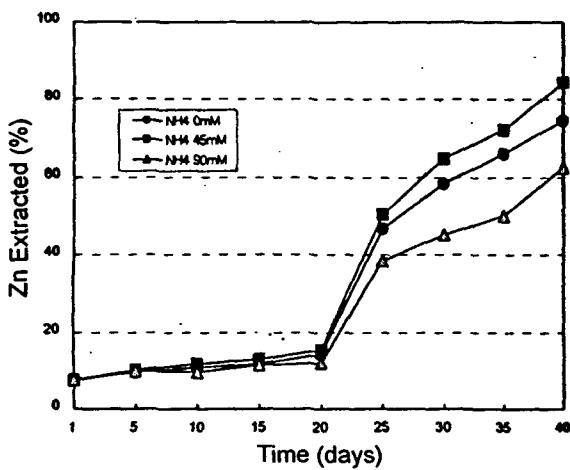


Figure 6. Bioleaching of Zn with varying nitrogen concentration.

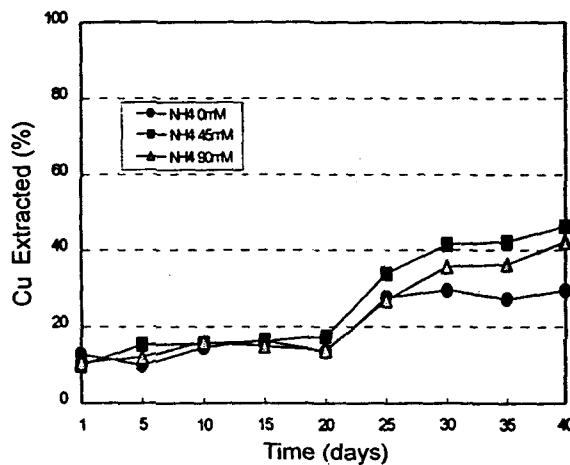


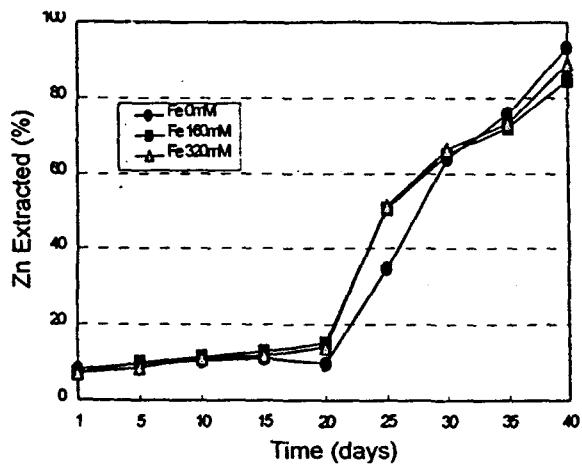
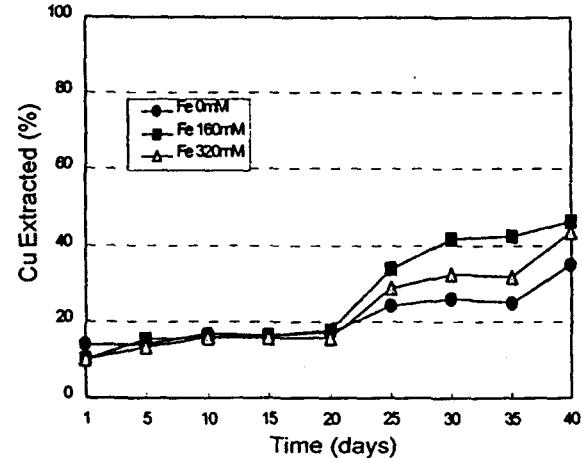
Figure 7. Bioleaching of Cu with varying nitrogen concentration.

따라서 미생물의 중금속 용출에 있어서 최적 질소농도조건이 있음을 알 수 있으며, 황아연(zinc sulfide) 농축액의 경우에서도 생물학적 용출시 암모늄 농도가 미생물의 산출량에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다(H.-J. Rehm, 1988). 이러한 질소성분의 영향은 미생물의 증식과 직접적으로 관련된 것으로 보이는데, 질소원이 부족한 경우 세포 분열의 자연과 생장 억제로 인하여 중금속의 용출효율에까지 영향을 미치는 것으로 판단된다.

배지조성 중 에너지원의 농도변화에 따른 중금속의 용출효율

*T. ferrooxidans*의 주 에너지원인 철 농도 변화에 따른 아연과 구리의 용출효율을 Figure 8과 Figure 9에 나타내었다. 철의 농도를 0, 160, 320 mM로 변화시켰을 때 아연의 경우는 각각 93%, 84.5%, 88.9%의 용출효율을 나타내었고, 구리의 경우는 각각 34.7%, 46.4%, 43.3%의 용출효율을 나타내었다.

이 결과로 미루어보아, 미생물의 에너지원을 변화시켰을 때 중금속의 용출효율에 미치는 영향이 인과 질소 농도의 변화시

Figure 8. Bioleaching of Zn with varying energy source concentration [FeSO₄ · 7H₂O].Figure 9. Bioleaching of Cu with varying energy source concentration [FeSO₄ · 7H₂O].

미치는 영향과는 다르다는 것을 알 수 있었다. 이는 배지의 특성, 광미의 기질 및 물리적 특성, 광물과 결합되어 있는 중금속의 용해도적 및 배지에 용해되어 있는 이온들의 특성에 의한 것으로 판단되며, 약 20일 경과 후에는 구리와 아연의 용출효율이 활발히 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

미생물의 순응도가 생물학적 용출에 미치는 영향

미생물이 새로운 환경에 순응하는데는 일정한 시간이 소요되며, 이 환경에 순응된 미생물 군을 이용한다면 순응기간을 단축시킬 수 있을 것이라고 하였다(강선흥, 최상일, 1995). 또한 구리와 아연의 적당한 농도에서 순응시킨 미생물을 이용하였을 때 지체기(lag time)가 감소하며, 같은 시간에 더 많은 구리와 아연이 용출되었음을 알 수 있었다(G. P. Brahmprakash, 1988).

따라서 순응된 미생물을 적용하였을 때 순응되지 않은 미생물을 적용하였을 때보다 같은 시간 안에 구리와 아연의 용출효율이 2~3배 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과

로 미루어보아 약 20일까지는 변화된 환경에 대한 미생물의 순응기간(지체기)으로 볼 수 있으며, 순응된 미생물을 적용할 때 생물학적 처리기법의 단점인 처리시간을 단축시킬 수 있으리라 판단된다.

결 론

본 연구는 생물학적 용출기법의 효율 증진을 위한 연구로서 배지 조건과 용출효율과의 관계를 비교 검토하여 최적 조건을 도출하고자 하였다. 본 연구의 결과를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 미생물의 ATP 생성과 혼산 및 막의 합성에 필요한 배지 조성 중 인과 질소의 농도는 미생물의 중금속 용출효율에 영향을 미쳤으며, 높은 농도조건에서 오히려 미생물의 활성이 저해되어 효율적인 중금속 용출을 위하여 이들 성분의 최적 농도조절이 필요함을 알 수 있었다.

2. 에너지원은 미생물이 증식하는데 있어 가장 직접적인 영향을 미치는 인자로서, 광물의 물리적 특성, 광물과 결합되어 있는 중금속의 용해도적 및 배지에 용해되어 있는 이온들의 산화·환원 전위차(정재춘, 정영륜, 1998) 등의 상호 작용이 미생물의 중금속 용출 효율을 좌우하는 주요 성분임을 알 수 있었다.

3. 일정 시간 후의 용출효율의 급격한 변화는 미생물의 환경을 변화시켰을 때 그 환경에 순응하기 위한 시간이라 판단되어지며, 순응된 미생물은 변화된 환경에 맞게 성장하고 증식하기 위해 필요한 영양분과 에너지원을 찾는 것으로 추측되어진다. 따라서 미생물의 순응도는 중금속의 용출효율 뿐만 아니라 용출시간 즉, 처리시간에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 1999년도 광운대학교 교내 학술연구비 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문현

- 강선홍·최상일, 1995, *Thiobacillus ferrooxidans*를 이용한 광산 폐기물내의 중금속 용해에 관한 기초연구, 한국수질보전학회, 11(2), p.123-128.
 정재춘·정영륜, 1998, 환경미생물학, 자유아카데미, 서울, p.311-317.
 배재근·오종민, 1995, 土壤汚染學, 신광문화사, 서울, p.141-149.
 H.-J. Rehm and G. Reed, 1988, Biotechnology, VCH Publishers, INC., New York, Vol. 6, p.368-399.
 Arpad E. Torma, 1977, The Role of *Thiobacillus ferrooxidans* in Hydrometallurgical Process, Adv. Biochem. Eng., p.1-37.
 Preston Devasia, K. A. Natarajan, D. N. Sathyamayana, and G. Ramananda Rao, 1993, Surface Chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* Relevant to Adhesion on Mineral Surface, Applied and Environmental Microbiology, 59(12), p.4051-4055.
 R.G.L. McCready, D. Wadden and A. Marchbank, 1986, Nutrient Requirements for the In- Place Leaching of Uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy, Vol. 17, p.61-71.
 Vernon L. Snoeyink and David Jenkins, 1980, Water Chemistry, JOHN WILEY & SONS, New York, p.298-312.
 G.P. Brahma Prakash, Preston Devasia, K. S. Jagadish, K. A. Natarajan and G. Ramananda Rao, 1988, Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strains tolerant to copper and zinc, Bull. Master. Sci., 10(5), p.461-465.