

Bioleaching에 사용되는 *Thiobacillus ferrooxidans*의 철산화 속도에 미치는 금속 이온의 영향

최 문 성 · †조 경 숙
이화여자대학교 국가지정 지하환경연구실
(접수 : 2000. 12. 6., 게재승인 : 2001. 2. 18.)

Effect of Metal Ions on Iron Oxidation Rate of *Thiobacillus ferrooxidans* Used in a Bioleaching Process

Moon-Sung Choi and †Kyung-Suk Cho
National Subsurface Environmental Research Laboratory, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
(Received : 2000. 12. 6., Accepted : 2001. 2. 18.)

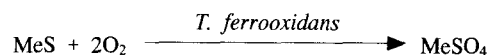
The activity of microorganisms is an important factor that determines the efficiency of the bacterial recovery of precious metals from low-grade ore. Metal-leaching microorganisms must have a tolerance, within the concentration levels encountered to leached metals. In this study, the tolerance levels of *Thiobacillus ferrooxidans* to the single and mixed metal ions systems, composed of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} were investigated. When single metal ions of Zn^{2+} (10~60 g/L), Cu^{2+} (1~6 g/L), Ni^{2+} (1~6 g/L), or Cd^{2+} (1~6 g/L) were added to the growth medium of *T. ferrooxidans*, the iron oxidation rate of this bacterium was not significantly inhibited. The maximum inhibition percentage observed on the iron oxidation rate of *T. ferrooxidans* was approximately 50% in the medium supplemented with two or three mixed metal ions of Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} . However, when Zn^{2+} was also added to the medium with the other metal ions, the inhibitory effect on the iron oxidation activity of *T. ferrooxidans* was remarkably increased.

Key Words : *Thiobacillus ferrooxidans*, metal ions, tolerance, bioleaching, iron oxidation

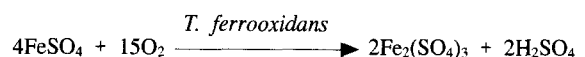
서 론

천연자원의 고갈문제가 대두됨에 따라, 지금까지는 기술적·경제적인 문제로 사용되지 않던 저품위 자원이나 폐기물로부터 자원을 회수할 수 있는 신기술이나 종래의 기술을 개선하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 금속 함량이 낮은 저품위 광석으로부터 유가금속을 경제적이고 환경친화적으로 회수할 수 있는 미생물 용출 공정이 개발되어 일부 몇몇 나라에서는 상용화되고 있다(1-4). 미생물 공정은 세균이나 곰팡이와 같은 생물학적 대사 작용을 이용하여 불용성의 고형물로부터 유가자원을 용해가능하고 추출가능한 형태로 용출해내는 공정이다(1). 미생물 용출 공정은 천연광석으로부터 유가금속을 회수하는데 이용될 뿐만 아니라, sewage sludge, slag, galvanic sludge, filter dust, fly ash와 같은 중금

속이 많이 함유된 산업폐기물로부터 금속을 제거·회수하는데 활용될 수 있다(5-7). 또한, 미생물 용출 공정을 활용하여 중금속으로 오염된 토양이나 sediment를 처리·복원하고자 하는 연구가 보고되고 있다(8-10). 미생물 용출 공정은 기존의 기술에 비해 조업비가 저렴하고 에너지가 적게 소요되는 청정 기술(clean technology)이다. 미생물 용출 공정에 사용되는 대표적인 균주는 *Thiobacillus thiooxidans*와 *T. ferrooxidans*이다(1-3,5). 특히, *T. ferrooxidans*는 환원형의 철과 황화합물을 산화할 수 있는 호산성의 독립영양세균으로, 이 균주의 직접 혹은 간접적인 산화반응으로 금속을 용출시킬 수 있다. 즉, 불용성의 metal sulfide를 *T. ferrooxidans*가 직접 산화하여 수용성의 metal sulfate로 용출해 낼 수 있다.



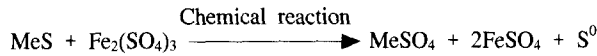
또한, Fe(II)를 *T. ferrooxidans*가 산화하여 생성된 Fe(III)에 의한 metal sulfide의 간접산화에 의해 금속이 용출될 수 있다.



†Corresponding Author : Laboratory of National Subsurface Environment, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea.

Tel : +82-2-3277-2393, Fax : +82-2-3277-3275

E-mail : kscho@mm.ewha.ac.kr



광물로부터 금속을 용출시키는 미생물 용출 공정에 있어 공정의 효율성을 좌우하는 인자로는 영양물질, O₂, CO₂, pH, 온도, 용출대상 기질 특성, 중금속 농도, 계면활성제 및 미생물 활성 등이 있다(1). 특히, 미생물 용출 공정과정에서 수용상 내에 광물로부터 용출된 금속이 고농도로 축적되기 때문에, 수용상의 금속 독성에 대해 어느 정도 내성을 지닌 미생물을 이용하는 것이 중요하다. 또한, 각종 금속에 대해 미생물이 활성을 발휘할 수 있는 임계 농도에 관한 정보는 미생물 용출 공정의 주요 조업 인자로 활용 가능할 것이다.

미생물 용출 공정에 주로 많이 사용되는 대표적인 균주인 *T. ferrooxidans*의 주요 금속에 대한 내성을 조사한 연구들이 보고 된 바 있다. Tuovine 등은 *T. ferrooxidans*의 금속에 대한 내성은 에너지원의 영향을 크게 받음을 밝혔다(11). 즉, 에너지원으로 thiosulfate를 이용할 때 보다 iron을 이용할 때 *T. ferrooxidans*의 Zn, Ni, Cu 등과 같은 금속에 대한 내성은 2000배 이상 증가하였다. 또한, Silver와 Torma도 생장기질 종류에 따라 *T. ferrooxidans*의 Pb, Ni, Cu와 같은 금속에 대한 내성이 다르게 나타남을 보고한 바 있다(12). 각 금속 종류별로 *T. ferrooxidans*의 내성범위를 조사한 결과에 의하면, Cd²⁺ 0.75 M(84.3 g/L), Ni²⁺ 1M(58.7 g/L), Zn²⁺ 1 M (65.9 g/L), Cu²⁺ 0.6 M(38.1 g/L)에서 내성을 가진다고 보고된 바 있다(13,14). Huber와 Stetter는 Cu²⁺와 Ni²⁺에 대한 *T. ferrooxidans*의 내성 범위는 각각 160 mM(10.2 g/L)와 170 mM(9.9 g/L)로, 전자의 경우보다 다소 낮게 보고하였다(15).

이와 같이 금속에 대한 *T. ferrooxidans*의 내성 범위에 대하여 일부 연구들이 선행되기는 하였지만(11-16), *T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 금속의 영향에 대한 체계적인 정보는 아직 미흡한 실정이다. 또한, 실제 미생물 용출 공정에서는 특정 금속이 단독으로 용출되는 것이 아니라, 여러 금속이 함께 용출되어 수용상에서는 혼합된 형태로 존재하게 된다. 그러므로, *T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 혼합 금속의 영향에 대한 정보도 중요하나, 아직 이에 대한 연구 결과는 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ 금속을 대상으로 하여, 이러한 금속이온이 *T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 각 금속이온의 2성분 혼합, 3성분 혼합 혹은 4성분 혼합 금속이온이 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도에 미치는 영향을 조사함으로써, 단독 금속이온과 혼합금속이온의 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서는 *T. ferrooxidans*(ATCC 19859)를 이용하였고, 이 균주 배양을 위해 9 K 배지를 사용하였다. 9 K 배지의 조성은 (NH₄)₂SO₄, 3.0 g/L; KCl, 0.1 g/L; K₂HPO₄, 0.5 g/L; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g/L; Ca(NO₃)₂, 0.01 g/L; FeSO₄ · 7H₂O, 45.0 g/L이다. 9 K 배지의 pH는 황산을 이용하여 2.0으로 조절하였다. 9 K 배지에 *T. ferrooxidans*를 접종하여 30℃에서

약 3일 동안 배양한 후, 이 배양액을 3,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 jarosite를 제거한 후, 상등액을 다시 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하여 pH 2인 무기염 배지에 현탁하여 금속영향을 조사하는 실험의 접종원으로 사용하였다. 무기염 배지의 조성은 9 K 배지 조성에서 에너지원인 FeSO₄ · 7H₂O를 제외한 것이다.

철산화 속도에 미치는 금속의 영향

250 mL 삼각플라스크에 9 K 배지를 100 mL씩 넣고, 실험 대상 금속이온을 sulfate염 시약으로 단독 혹은 혼합하여 첨가하였다. 첨가한 금속 화합물의 종류와 농도 범위는 Zn²⁺ (ZnSO₄ · 7H₂O), 10~60 g/L; Cu²⁺ (CuSO₄ · 5H₂O), 1~6 g/L; Ni²⁺ (NiSO₄ · 6H₂O), 1~6 g/L; Cd²⁺ (CdSO₄ · xH₂O), 1~6 g/L이다. 첨가된 금속시약이 완전히 녹을 수 있도록 9 K 배지를 충분한 시간동안 교반 해 준 후, 상기의 방법으로 준비한 *T. ferrooxidans* 접종액을 첨가하였다. 모든 조건의 실험에서 균주 접종 농도는 접종액 첨가 후 9 K 배지에서의 초기 흡광도가 600 nm에서 0.2가 되도록 하였다. 균주가 접종된 9 K 배지는 30℃에서 진탕배양(200 rpm)하면서, 12시간 간격으로 배양액을 채취하여 철농도를 분석하였다. 모든 실험은 2회 반복 수행하였다.

첨가 금속의 jarosite로 침전 여부 조사

250 mL 삼각플라스크에 9 K 배지를 100 mL씩 넣고, sulfate 형태의 금속염을 다음의 농도로 첨가하였다: Zn²⁺ 40 g/L, Cu²⁺ 4 g/L, Ni²⁺ 6 g/L, Cd²⁺ 6 g/L. 첨가된 금속염이 9 K 배지에 완전히 녹을 수 있도록 9 K 배지를 충분히 교반한 후, *T. ferrooxidans*를 접종하였다. 균주가 접종된 9 K 배지는 30℃에서 진탕배양(200 rpm)하면서, 배지중의 Fe²⁺의 농도가 0이 되었을 때, 배양액을 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 jarosite를 회수하였다. 회수된 jarosite는 증류수로 3회 세정하였다. 세정한 jarosite를 건조시킨 후 총 질량을 측정하였고, 건조된 jarosite는 산(염산, 질산, 과염소산, 불산)으로 digestion 한 후, 금속 농도를 측정하였다. 모든 실험은 2회 반복 수행하였다.

분석방법

Fe²⁺의 농도를 분석할 때는 배양액 중에 포함된 jarosite 입자들을 제거하기 위하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 이용하였으며 Muir에 의해 제안된 흡광도법으로 분석하였다(17). 즉, 시료 0.2 mL에 o-phenanthroline reagent 0.8 mL을 넣고, 황산을 이용하여 pH 2로 조절한 물을 첨가하여 총 부피를 5 mL로 만든 후 510 nm 파장(Milton-Roy Spectronic 20, USA)에서 흡광도를 측정하여 Fe²⁺의 농도를 측정하였다.

배양액으로부터 회수한 jarosite의 금속함량을 측정하기 위해, jarosite 일정량을 테플론 vessel에 넣고 여기에 불산, 질산, 과염소산을 4:4:1 비율로 혼합한 혼합산을 5 mL 가 하였다. Hot plate에서 열처리하여 완전 분해한 후, Wathman No.2 여과지로 여과하였다(18). 금속 농도를 atomic absorption spectrophotometer(AA100, Perkin Elmer, USA)로 분석하였다.

Table 1. Effect of Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ concentrations on iron oxidation rate of *T. ferrooxidans*.

Metal	Concentration (g · L ⁻¹)	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
No added	0	0.30
Zn	10	0.29
	20	0.21
	30	0.19
	40	0.18
	50	0.16
	60	0.15
Cu	1	0.30
	2	0.23
	3	0.23
	4	0.22
	5	0.21
	6	0.22
Ni	1	0.29
	2	0.24
	3	0.24
	4	0.24
	5	0.23
	6	0.25
Cd	1	0.29
	2	0.25
	3	0.24
	4	0.24
	5	0.27
	6	0.26

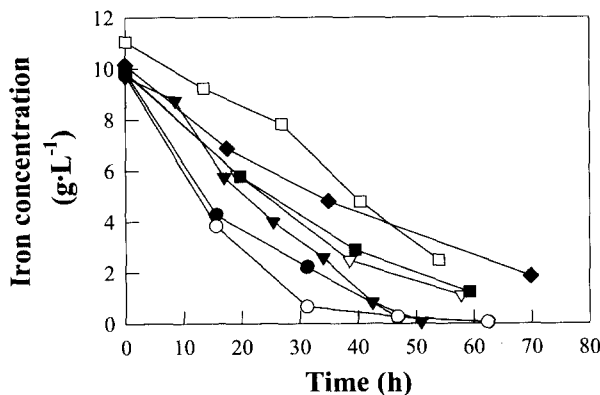


Figure 1. Iron oxidation by *T. ferrooxidans* in 9 K medium supplemented with Zn²⁺. Symbols : Zn²⁺ concentration (g/L) ●, 0 ; ○, 10 ; ▼, 20 ; ▽, 30 ; ■, 40 ; □, 50 ; ◆, 60

결과 및 고찰

철산화 속도에 미치는 단독 금속이온의 영향

Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ 및 Cd²⁺를 대상으로 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도에 미치는 각 금속 이온의 영향을 조사하였다. 9K 배지에 sulfate염의 형태로 Zn²⁺을 0~60 g/L 첨가하고 *T. ferrooxidans*에 의한 Fe²⁺의 산화속도를 측정된 결과를 Figure 1에

도시하였다. Zn²⁺의 첨가 농도가 증가할수록 Fe²⁺가 산화되는데 소요되는 시간이 증가하였다. Zn²⁺을 0~60 g/L 첨가한 조건에서 *T. ferrooxidans*에 의한 Fe²⁺의 철산화 속도를 구하여 Table 1에 정리하였다.

Zn²⁺을 10 g/L 첨가한 경우에는 균주에 의한 철산화 속도가 0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, Zn²⁺를 첨가하지 않은 배지에서의 철산화 속도(0.30 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)와 거의 유사한 속도를 나타내었다. 그러나, Zn²⁺의 첨가량이 10 g/L를 초과하는 조건에서는 Zn²⁺의 첨가량이 증가함에 따라 철산화 속도도 조금씩 감소하였다. Zn²⁺를 60 g/L로 고농도로 첨가한 조건에서의 균주의 철산화 속도는 0.15 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 Zn를 첨가하지 않았을 때와 비교하여 철산화 속도가 약 50% 정도 감소하였음을 알 수 있었다. *T. ferrooxidans* 활성화에 대한 Zn²⁺의 영향을 조사한 기존의 연구 결과에 의하면 *T. ferrooxidans*는 1 M의 Zn²⁺(약 65 g/L)에 대해 내성을 가진다고 보고하였다(13,14). 본 연구에서 9 K 배지에 60 g/L의 Zn²⁺를 첨가하면, *T. ferrooxidans*의 철산화 속도는 약 50% 정도 감소하지만, 이 균주는 고농도 Zn²⁺에 대해 내성을 가짐을 알 수 있었다.

9 K 배지에 sulfate염의 형태로 Cu²⁺, Ni²⁺ 및 Cd²⁺를 단독으로 각각 0~6 g/L씩 첨가한 조건에서 *T. ferrooxidans*에 의한 Fe²⁺의 철산화 속도를 Table 1에 정리하였다. 9 K 배지에 Cu²⁺를 0~6 g/L 첨가한 조건에서의 *T. ferrooxidans*에 의한 철산화 속도는 0.21~0.30 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 이 제련미생물의 철산화 속도는 Cu이온의 영향을 거의 받지 않았다. 일반적으로 광석으로부터 미생물 용출법에 의해 용출되는 수용액 중의 Cu²⁺를 비롯한 각 금속이온의 농도는 1~2 g/L의 범위에 속한다(19). 따라서, 본 연구에서 사용된 *T. ferrooxidans*의 철산화 활성은 6 g/L의 고농도 Cu²⁺에 의해 거의 저해받지 않았으며, 실제의 미생물 용출 공정에서 용출된 단독 Cu²⁺에 의한 균주 활성의 저해 가능성은 거의 없음을 예측할 수 있다.

Imai와 Tuovinen 등은 *T. ferrooxidans*는 각각 10 mM(0.6 g/L)과 70 mM(4.2 g/L)의 Cu²⁺에 의해 저해를 받는다고 하였다(12, 17). 그러나, 최근 들어 Brahmprakash등은 *T. ferrooxidans*의 native 균주는 Cu²⁺ 80 mM(4.8 g/L)까지 내성을 가지나, 고농도 Cu²⁺에 동일 균주를 적용시켜서 얻은 순치 균주의 Cu²⁺에 대한 내성범위는 470 mM(28.2 g/L)이었다고 보고한 바 있다(20). Huber와 Stetter는 thiobacilli에 속하는 2종의 균주에 대해 Cu²⁺의 내성 범위를 조사한 결과, *T. ferrooxidans*는 160 mM(9.6 g/L) Cu²⁺에 대해 내성을 보인 반면, *T. cuprinus*는 단지 8 mM(0.5 g/L)의 Cu²⁺에 대해 내성을 가짐을 밝혔다(15). 또한, Leduc과 Ferroni가 분리한 *T. ferrooxidans*는 160 mM(9.6 g/L)의 Cu²⁺에 전혀 저해 받지 않았다(21).

*T. ferrooxidans*의 경우, 고농도의 Cu²⁺에 대한 내성을 보이나, 일반적인 종속영양 세균의 경우, Cu²⁺에 대한 내성 범위는 1~2 mM(0.06~0.12 g/L)이다(22, 23). *E. coli*와 같은 종속영양세균의 Cu²⁺에 대한 내성 관련 유전자는 plasmid에 존재한다고 알려져 있으나(24), *T. ferrooxidans*의 경우 Cu²⁺ 내성 관련 유전자가 plasmid에 code되어 있다는 증거는 아직 없다.

Ni²⁺를 0~6 g/L 첨가한 경우에도 *T. ferrooxidans*에 의한 철산화 속도는 0.23~0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 Ni²⁺의 영향을

Table 2. Effect of binary metal ions on iron oxidation rate of *T. ferrooxidans*.

Metal concentration (g · L ⁻¹)		Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
Zn	Cu	
10	1	0.27
20	2	0.21
30	3	0.18
40	4	0.13
50	5	0.02
Zn	Ni	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
10	1	
20	2	0.18
30	3	0.18
40	4	0.19
50	5	0.03
Zn	Cd	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
10	1	
20	2	0.15
30	3	0.16
40	4	0.14
50	5	0.12
Cu	Ni	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
1	1	
2	2	0.26
3	3	0.24
4	4	0.24
5	5	0.15
Cu	Cd	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
1	1	
2	2	0.25
3	3	0.24
4	4	0.23
5	5	0.13
Ni	Cd	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
1	1	
2	2	0.26
3	3	0.24
4	4	0.24
5	5	0.15

거의 받지 않았다. *T. ferrooxidans*의 생육은 1 mM(0.06 g/L) Ni²⁺에 의해 완전 저해받았고, 0.1 mM Ni²⁺에 의해 부분적으로 저해 받는 것으로 보고된 바 있다(16). 또한, *T. ferrooxidans*의 철산화 활성은 0.1 mM Ni²⁺에 의해 저해 받았다고 보고되었다(11). 그러나, 최근 연구결과에 의하면 *T. ferrooxidans*는 160~170 mM 이상의 Ni²⁺에 대해 내성이 있는 것으로 보고되고 있다(15,21).

Cd²⁺의 경우도 0~6 g/L 첨가한 조건에서의 *T. ferrooxidans*에 의한 철산화 속도는 0.24~0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 Cd²⁺의 영향을 거의 받지 않았다. *T. ferrooxidans*의 철산화능과 생산 속도는 10 mM(1.1 g/L) Cd²⁺에 의해 저해받지 않음이 보고된 바 있다(16). 그러나 *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella aerogenes*와 같은 중속 영양세균의 Cd²⁺에 대한 내성 범위는 0.2~10 mM로 thiobacilli에 비해 낮다(25-27). *P. aeruginosa*와 *S. aureus*의 Cd²⁺에 대한 내성유전자는 plasmid에 있음이 밝혀졌으나, *T. ferrooxidans*의 Cd²⁺에 대한 분자

생물학적 연구는 아직 보고된 바 없다(25-27).

철산화 속도에 미치는 이성분 혼합 금속의 영향

*T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 이성분 금속이온의 첨가효과를 조사하여, 각 조건에서 얻은 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도를 Table 2에 정리하였다.

Zn²⁺과 Cu²⁺이온을 혼합하여 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화 속도는 Zn²⁺과 Cu²⁺의 농도 증가에 비례하여 급격하게 감소하였다. 즉, Zn²⁺ 10 g/L과 Cu²⁺ 1 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.27 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 금속을 첨가하지 않은 경우 (0.30 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)와 거의 유사하였다. 그러나 Zn²⁺ 20 g/L과 Cu²⁺ 2 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.21 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹, Zn²⁺ 30 g/L과 Cu²⁺ 3 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.18 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹, Zn²⁺ 40 g/L과 Cu²⁺ 4 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.13 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹이었다. Zn²⁺ 50 g/L과 Cu²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.02 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 *T. ferrooxidans*의 철산화능이 완전히 저해 받았다.

Zn²⁺과 Ni²⁺을 혼합하여 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화 속도는 Zn²⁺과 Ni²⁺의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향이 관찰되었다. Zn²⁺ 10 g/L과 Ni²⁺ 1 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 유사하였다. Zn²⁺ 20 g/L과 Ni²⁺ 2 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.18 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 70% 정도를 유지할 수 있었다. 이러한 철산화 활성은 Zn²⁺를 40 g/L, Ni²⁺를 4 g/L까지 증가시켜도 발휘되었다. 그러나, Zn²⁺ 50 g/L과 Ni²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.03 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 *T. ferrooxidans*의 철산화능이 거의 저해 받았다.

Zn²⁺과 Cd²⁺이온을 혼합하여 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도는 Zn²⁺ 10 g/L과 Cd²⁺ 1 g/L를 첨가한 경우 (0.25 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 동일한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Zn²⁺ 20~50 g/L과 Cd²⁺ 2~5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.12~0.16 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 56% 정도를 유지할 수 있었다. Zn²⁺과 Cd²⁺ 이성분 혼합의 경우, Zn²⁺과 Cu²⁺ 이성분, Zn²⁺과 Ni²⁺ 이성분 혼합 금속을 첨가한 경우에 관찰되었던 고농도 금속 이온 첨가(각각 50 g/L와 5 g/L)에 의한 *T. ferrooxidans*의 철산화 활성의 완전 저해 현상은 관찰되지 않았다.

Cu²⁺와 Ni²⁺이온을 혼합하여 Cu²⁺ 1~4 g/L과 Ni²⁺ 1~4 g/L의 범위로 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도 (0.24~0.28 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Cu²⁺ 5 g/L와 Ni²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.15 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 60% 정도를 유지할 수 있었다.

Cu²⁺와 Cd²⁺이온을 혼합하여 Cu²⁺ 1~4 g/L과 Cd²⁺ 1~4 g/L의 범위로 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도 (0.23~0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Cu²⁺ 5 g/L와 Cd²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속

Table 3. Effect of 3 mixed metal ions on iron oxidation rate of *T. ferrooxidans*.

Metal concentration (g · L ⁻¹)			Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
Zn	Cu	Ni	
10	1	1	0.26
20	2	2	0.13
30	3	3	0.10
40	4	4	0.10
50	5	5	0.03
Zn	Cu	Cd	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
10	1	1	
20	2	2	0.12
30	3	3	0.10
40	4	4	0.12
50	5	5	0.03
Cu	Ni	Cd	Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
1	1	1	
2	2	2	0.25
3	3	3	0.23
4	4	4	0.21
5	5	5	0.14

도는 0.13 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 52% 정도를 유지할 수 있었다.

Ni²⁺와 Cd²⁺이온을 혼합하여 Ni²⁺ 1~4 g/L과 Cd²⁺ 1~4 g/L의 범위로 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도 (0.24~0.29 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Ni²⁺ 5 g/L과 Cd²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.15 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 60% 정도를 유지할 수 있었다.

이와 같이 이성분 금속이온 첨가시 철산화 속도(Table 2)와 금속이온을 단독으로 첨가한 경우의 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도를 비교해보면(Table 1), 단독으로 첨가한 경우에는 거의 영향을 받지 않는 농도 범위에서도 2가지 금속이온을 혼합하여 첨가하면 저해를 받음을 알 수 있었다. 특히, Zn²⁺와 다른 한 성분을 혼합한 경우, 철산화 속도의 감소는 다른 금속에 비해 Zn²⁺ 농도의 영향을 우선적으로 받는 것으로 사료된다.

철산화 속도에 미치는 삼성분 혼합 금속의 영향

*T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 삼성분 금속이온을 첨가한 효과를 조사하여 각 조건에서 얻은 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도를 Table 3에 정리하였다.

Zn²⁺, Cu²⁺ 및 Ni²⁺의 3가지 금속이온을 혼합하여 9K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화 속도는 각 금속의 첨가량이 증가할수록 감소하였다. 즉, Zn²⁺ 10 g/L, Cu²⁺ 1 g/L 및 Ni²⁺ 1 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.26 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 금속을 첨가하지 않은 경우 (0.30 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)와 거의 유사하였다. 그러나, Zn²⁺ 20 g/L, Cu²⁺ 2 g/L, Ni²⁺ 2 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.13 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹, Zn²⁺ 30~40 g/L, Cu²⁺ 3~4 g/L 및 Ni²⁺ 3~4 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.10 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹이었다. Zn²⁺ 50 g/L, Cu²⁺ 5 g/L 및 Ni²⁺ 5 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는

Table 4. Effect of 4 mixed metal ions on iron oxidation rate of *T. ferrooxidans*.

Metal concentration (g · L ⁻¹)				Iron oxidation rate (kg-Fe · m ⁻³ · h ⁻¹)
Zn	Cu	Ni	Cd	
10	1	1	1	0.27
20	2	2	2	0.10
30	3	3	3	0.10
40	4	4	4	0.07
50	5	5	5	0.02

0.03 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 *T. ferrooxidans*의 철산화능이 거의 저해 받았다.

Zn²⁺, Cu²⁺ 및 Cd²⁺이온의 삼성분 금속이온을 혼합하여 9K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도는 Zn²⁺ 10 g/L, Cu²⁺ 1 g/L 및 Cd²⁺ 1 g/L 첨가한 경우 (0.28 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 동일한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Zn²⁺ 20~40 g/L, Cu²⁺ 2~4 g/L 및 Cd²⁺ 2~4 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.10~0.12 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 33~40% 정도를 유지할 수 있었다. Zn²⁺ 50 g/L, Cu²⁺ 5 g/L 및 Cd²⁺ 5 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.03 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 *T. ferrooxidans*의 철산화능이 거의 저해 받았다.

Cu²⁺, Ni²⁺ 및 Cd²⁺이온을 혼합하여 Cu²⁺ 1~4 g/L, Ni²⁺ 1~4 g/L 및 Cd²⁺ 1~4 g/L의 범위로 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화의 철산화 속도 (0.21~0.28 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)는 금속을 첨가하지 않은 경우와 거의 유사한 속도를 얻을 수 있었다. 그러나, Cu²⁺ 5 g/L, Ni²⁺ 5 g/L 및 Cd²⁺ 5 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.14 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로, 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 56% 정도를 유지할 수 있었다.

이성분 금속이온 첨가시 철산화 속도(Table 2)와 삼성분 금속이온 첨가시 얻어진 철산화 속도(Table 3)를 비교해 보면, 같은 농도 범위에서는 삼성분 금속이온 첨가가 이성분 금속이온 첨가의 경우보다 *T. ferrooxidans* 균주의 철산화능을 강하게 저해하는 경향이 있음을 알 수 있었다.

철산화 속도에 미치는 사성분 혼합 금속의 영향

*T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 미치는 사성분 금속이온을 첨가한 효과를 조사하여, 각 조건에서 얻은 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도를 Table 4에 정리하였다.

Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ 및 Cd²⁺의 4가지 금속이온을 혼합하여 9 K 배지에 첨가한 경우, *T. ferrooxidans*의 철산화 속도는 각 금속의 첨가량이 증가할수록 감소하였다. 즉, Zn²⁺ 10 g/L, Cu²⁺ 1 g/L, Ni²⁺ 1 g/L 및 Cd²⁺ 1 g/L를 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.27 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹로 금속을 첨가하지 않은 경우 (0.30 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹)와 거의 유사하였다. 그러나, Zn²⁺ 20~30 g/L, Cu²⁺ 2~3 g/L, Ni²⁺ 2~3 g/L 및 Cd²⁺ 2~3 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.10 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹으로 금속을 첨가하지 않은 경우의 철산화 속도의 약 40% 정도의 활성을 얻을 수 있었다. 또한, Zn²⁺ 40 g/L, Cu²⁺ 4 g/L, Ni²⁺ 4 g/L 및 Cd²⁺ 4 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 0.07 kg-Fe · m⁻³ · h⁻¹이었다. Zn²⁺ 50 g/L, Cu²⁺ 5 g/L, Ni²⁺ 5 g/L 및

Table 5. Metal ion concentrations in jarosite produced during incubation.

Metal added	Metal in jarosite	
	Metal added in to medium × 100 (%)	
Zn	1.9	
Cu	3.4	
Ni	0.1	
Cd	0.2	

Cd^{2+} 5 g/L 첨가한 경우의 철산화 속도는 $0.02 \text{ kg-Fe} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 *T. ferrooxidans*의 철산화능이 거의 저해 받았다.

첨가 금속의 jarosite로 침전 여부

본 연구에 사용된 균주인 *T. ferrooxidans*가 고농도의 금속에 대해 내성을 가지는 원인으로 Fe^{3+} 침전물 형태인 jarosite 속으로 첨가한 금속이 공침되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 따라서 이를 확인하기 위하여 배양 후 Fe^{2+} 농도가 0으로 떨어졌을 때 실험을 종료하고 배양 중에 생성된 jarosite 침전물 중의 금속 농도를 분석하였다(Table 5).

Jarosite내의 각 금속 농도는 초기에 첨가해 준 금속양의 아주 적은 양(0.1~3.4%)만이 존재함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *T. ferrooxidans*의 철산화 속도에 미치는 금속이온의 영향을 조사하는 과정에서 첨가한 금속이온이 jarosite로 침전되어 실제 수용상의 금속 농도가 감소하였을 가능성은 거의 없음을 의미한다.

*T. ferrooxidans*가 이같이 고농도의 금속에 대해서 내성을 가지는 기작에 대한 원인을 정확히 밝히고 있는 연구는 아직 없다. 그러나 현재 몇 가지 가능성이 제시되고 있다. 그 중 하나는 균주의 금속에 대한 내성 유전자가 extrachromosomal DNA나 plasmid에 code되어 있다는 것이다. 이 plasmid는 금속 저해 site의 변형시키거나 세포막의 금속 투과성 변화 혹은 금속 배출 기작을 만듦으로써 독성이 있는 금속을 불활성화 할 수 있는 특정 단백질을 encode함으로써 균주가 금속에 대해 내성을 갖게 한다고 알려져 있다(28). 그러나, 금속에 대해 내성을 갖는 세균들이 전부 plasmid를 가지고 있는 것은 아니므로, plasmid만 가지고 중금속 내성 기작을 설명하기에는 불충분하다. 특히, *T. ferrooxidans*의 경우, 금속 내성 기작을 밝히기 위해 plasmid DNA에 관한 연구들이 수행된 적이 있으나(29,30), 금속 내성 유전자가 plasmid에 code되어 있다는 결정적인 증거는 아직 없다. 따라서, *T. ferrooxidans*의 금속 내성 기작에 관한 분자 생물학적 연구는 향후 심도있게 수행되어야 할 것이다.

요 약

저품질 광석으로부터 유가 금속을 회수하기 위한 생물용출법의 적용에 있어 미생물의 활성은 매우 중요하며, 제련미생물은 금속이온에 대해 어느 정도 내성을 가지고 있어야 한다. 본 연구에서는 대표적인 제련미생물인 *Thiobacillus ferrooxidans*의 철산화속도에 미치는 단독 혹은 혼합 금속이온의 영향을 조사하여, *T. ferrooxidans*의 금속이온에 대한 내성 특성을 조사하였다. 생장 배지에 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} 및 Cd^{2+} 를 단독으로 첨

가한 경우(첨가농도범위, Zn^{2+} 60g/L이하; Cu^{2+} , Ni^{2+} 및 Cd^{2+} 6 g/L 이하)에는 *T. ferrooxidans*에 의한 철산화속도는 금속이온의 첨가량에 크게 저해 받지 않았다. Zn^{2+} 를 제외한 Cu^{2+} , Ni^{2+} 및 Cd^{2+} 의 2 성분 혹은 3 성분의 혼합금속이온을 첨가한 경우에는 *T. ferrooxidans*의 철산화 활성에 대한 혼합금속이온의 저해 효과는 최대 50% 정도로 크게 나타나지는 않았다. 그러나, Zn^{2+} 을 타 금속이온과 2 성분 혹은 3 성분을 혼합하여 생장 배지에 첨가한 경우에는 *T. ferrooxidans*의 철산화 활성 저해에 대한 혼합금속이온의 상승 효과가 큰 것을 밝혔다.

감 사

본 연구는 2000년도 과기부 국가지정연구실 지원 연구비와 1999년 과기부 기술용역개발과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bosecker, K. (1997), Bioleaching: Metal Solubilization by Microorganisms, *FEME Microbiol. Rev.*, **20**, 591-604.
2. Rawlings, D. E. (1998), Industrial Practice and the Biology of Leaching of Metals from Ores, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 268-274.
3. Agate, A. D. (1996), Recent Advance in Microbial Mining, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 487-495.
4. Torma, A. E. (1988), Leaching of Metals, In *Biotechnology Vol 66*, H. J. Rehm and G. Reed Eds., pp367-399, Verlag Chemie.
5. Krebs, W., C. Brombacher, P. P. Bosshard, R. Bachofen, and H. Brandl (1997), Microbial Recovery of Metals from Solids, *FEMS Microbiol Rev.*, **20**, 605-617.
6. Cho, K. S., H. W. Ryu, and H. S. Moon (1999), Effects of Sludge Solid and S^0 Amount on the Bioleaching of Heavy Metals from Sewage Sludge using Sulfur Oxidizing Bacteria, *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **21**, 433-442.
7. Cho, K. S., H. S. Moon, and I. S. Lee (1999), Characteristics of Heavy Metal Removal in Fly Ash by Sulfur Oxidation Bacteria *Thiobacillus thiooxidans*: Effect of Pulp Density, *Kor. J. Environ. Biol.*, **17**, 183-190.
8. Gadd, G. M. and C. White (1993), Microbial Treatment of Metal Pollution a Working Biotechnology, *Trends Biotechnol.*, **11**, 353-359.
9. Gourdon, R. and N. Funtowicz (1995), Bioleaching of Metals from Industrial Contaminated Soil Using Sulfuric Acid Produced by Bacterial Activity: A Feasibility Study, In *Contaminated Soils '95*, van der Brink, W. J., R. Bosman and F. Arendt Eds., pp1049-1056, Kluwer Academic, Dordrecht.
10. Atlas, R. M. (1995), Bioremediation, *Chem. Eng. News*, **73**, 32-42.
11. Tuovinen, O. H., S. I. Niemela, and H. G. Gyllenberg (1971), Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to Some Metals. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **37**, 489-496.
12. Sivel, M. and A. E. Torma (1974), Oxidation of Metal Sulfides by *T. ferrooxidans* Grown on Different Substrates. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 141-147.

13. Harahuc, L., M. Lizama, and S. Isamu (2000), Selective Inhibition of the Oxidation of Ferrous Iron or Sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1031-1037.
14. Magnin, J., F. Bailet, A. Boyer, R. Zlatev, M. Luca, A. Cheruy, and P. Ozil. (1998), Augmentation, par Regeneration Electrochimique du Substrat, de la Production d'une Biomasse(*Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583) pour un Procédé Biologique de Recuperation de Metaux. *Can. J. Chem. Eng.*, **76**, 978-984.
15. Huber, H. and K. O. Stetter (1990), *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., A Novel Facultative Organtrophic Metal-Mobilizing Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 315-322.
16. Imai, K., T. Sugio, T. Tsuchida, and T. Tano (1975), Effect of Heavy Metal Ions on the Growth and Iron-Oxidizing Activity of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1349-1354.
17. Muir, M. K. and T. N. Andersen (1977), Metallurgical Transactions, B, 8B.
18. Cho, K. S., H. W. Ryu, and Y. U. Chang (1996), Chemical Characteristics and Microbial Activity of Streams Contaminated by the Abandoned Coal Mine Drainage, *Kor. J. Ecol.*, **19**, 365-373.
19. Murr, L. E. (1980), Theory and Practice of Copper Sulfide Leaching in Dumps and in Situ, *Miner. Sci. Eng.*, **12**, 121-189.
20. Brahma Prakash, G. P., P. Devasia, K. S. Jagadish, K. A. Natarajan, and G. R. Rao (1988), Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 Strains Tolerant to Copper and Zinc, *Bull. Meter. Sci.*, **10**, 461-465.
21. Leduc, L. G. and G. D. Ferroni (1993), The Need for *T. ferrooxidans* Strain Selection in Applications of Bioleaching, In *Proceedings of the Tenth Annual Meeting of BIOMINET*, W.D. Gould, L. Lortie and D. Rodrigue Eds.; CANMET Special Publication SP94-1, Mississauga, Canada, pp25-42.
22. Zevenhuizen, L. P. T. M., J. Dolfing, E. J. Eshuis, and J. J. Scholten-Koerselman (1979), Inhibitory Effects of Copper on Bacteria Related to the Free Ion Concentration, *Microb. Ecol.*, **5**, 139-146.
23. Duxbury, T. and B. bicknell (1983), Metal-Tolerant Bacterial Populations from Natural and Metal-Polluted Soils, *Soil Bol. Biochem.*, **15**, 243-250.
24. Tetaz, T. J. and R. K. Luke (1983), Plasmid Controlled Resistance to Copper in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **154**, 1263-1268.
25. Chopra, I. (1971), Decreased Uptake of Cadmium by a Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 265-267.
26. Pickett, A. W. and A. C. R. Dear (1976), Antibiotic Resistance of Cadmium and Zinc Tolerant Strains of *Klebsiella(Aerobacter) Aerogenes* Growing in Glucose-Limited Chemostats, *Microbios Lett.*, **1**, 165-167.
27. Tynecko, Z., Z. Gos, and J. Zajac (1981), Energy-Dependent Efflux of Cadmium Coded by a Plasmid Resistance Determinant in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, **147**, 313-319.
28. Trevors, J. T., K. M. Oddie, and B. H. Belliveau (1985), Metal Resistance in Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 39-54.
29. Summers, A. O. and S. Silver (1978), Microbial Transformations of Metals, *Ann. Rew. Microbiol.*, **32**, 637-672.
30. Mao, M. W. H., P. R. Dugan, P. A. W. Martin, and O. H. Tuovinen (1980), Plasmid DNA in Chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **8**, 121-125.