

2011年 8月
석사학위논문

토착호산성박테리아를 이용한
황화광물의 용출 특성

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

김 봉 주

토착호산성박테리아를 이용한
황화광물의 용출 특성

The Characteristic of sulfide mineral
Using Indigenous Acidophilic Bacteria

2011 년 8 월 25 일

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

김 봉 주

토착호산성박테리아를 이용한 황화광물의 용출 특성

지도교수 박 천 영

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함.

2011 년 4 월

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

김 봉 주

김봉주의 석사학위 논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교 수 한 오 형 印

위 원 조선대학교 조교수 강 성 승 印

위 원 조선대학교 교 수 박 천 영 印

2011 년 5 월

조선대학교 대학원

목 차

List of tables	i
List of figures	ii
Abstract	iii
1. 서 론	1
2. 이론적 배경	4
3. 박테리아 시료 및 실험방법	6
3.1 토착박테리아 채취	6
3.2 성장-배양액 조성	6
3.3 황화광물-용출 배양액 조성	7
3.4 황화광물 시료	8
3.5 분석기기	8
4. 결과 및 고찰	9
4.1 황화광물-용출 배양액에서 pH 변화	9
4.2 황화광물 표면특성	12
4.3 박테리아 부착 특성	16
4.4 박테리아에 의한 증식작용	19
4.5 2차 생성물 형성	23
4.6 황화광물 용출 특성	27
4.7 용출에 따른 황화광물의 XRD 변화	37
5. 토 의	43
6. 결 론	44
참 고 문 헌	45

List of Tables

Table 1. Electron probe microanalysis of galena sample	14
Table 2. Electron probe microanalysis of sphalerite sample	15

List of Figures

Fig. 1. Evolution of pH during galena bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria at 42°C and 52°C	10
Fig. 2. Evolution of pH during galena bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria at 42°C and 52°C	11
Fig. 3. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the galena surface.	17
Fig. 4. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the sphalerite surface. ...	18
Fig. 5. SEM images of the corrosion pits on the surface of secondary minerals.	21
Fig. 6. SEM image of the corrosion pits and bacteria on the sphalerite.	22
Fig. 7. SEM images of the needle like minerals on the cubic form of galena	25
Fig. 8. SEM image of the secondary materials on the sphalerite.	26
Fig. 9. Changes in the concentration of Cu during the galena bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	29
Fig. 10. Changes in the concentration of Fe during the galena bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	30
Fig. 11. Changes in the concentration of Pb during the galena bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	31
Fig. 12. Changes in the concentration of Zn during the galena bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	32
Fig. 13. Changes in the concentration of Cu during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	33
Fig. 14. Changes in the concentration of Fe during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	34
Fig. 15. Changes in the concentration of Pb during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	35
Fig. 16. Changes in the concentration of Zn during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C and 52°C.	36
Fig. 17. X-ray diffraction patterns from galena leach residue after 16 days of contact with chemical control solution(a) and after 16 days of leaching in indigenous bacteria cultures solution at 42°C.	39

Fig. 18. X-ray diffraction patterns from galena leach residue after 16 days of contact with chemical control solution(a) and after 16 days of leaching in indigenous bacteria cultures solution at 52°C. 40

Fig. 19. X-ray diffraction patterns of sphalerite. The control and bacteria samples were analysed the XRD analysis after 16 days of leaching experiment at 42°C respectively(G; galena, S; sphalerite). 41

Fig. 20. X-ray diffraction patterns of sphalerite. The control and bacteria samples were analysed the XRD analysis after 16 days of leaching experiment at 52°C respectively(G; galena, S; sphalerite). 42

Abstract

The Characteristic of sulfide mineral Using Indigenous Acidophilic Bacteria

By Kim, Bong Ju

Adv. Prof. : Park, Cheon Young, Ph.D

Dept. of Energy Resource Engineering

Graduate School of Chosun University

This study was to investigate the viability of indigenous acidophilic bacteria at 42°C and 52°C, and to enhance the leaching of valuable elements from galena during the oxidation of the indigenous acidophilic bacteria with no addition of sulfuric acid. Even through the isoelectric point of the pH environment was higher, the indigenous bacteria were attached to the surface of the galena and sphalerite. In the bioleaching of galena at 42°C and 52°C, the rod-shaped bacteria ranged from 0.4×1.3 μm to 0.5×1.6 μm and were attached to the galena and sphalerite surface. When the indigenous bacteria oxidized the galena at 42°C and 52°C, an extracellular polymeric substance(EPS) formed and coated the surface of the galena and sphalerite grains. The EPS formation was probably secreted by the indigenous bacteria. Hexagonal column crystals were formed on the surface of the galena, and the numerous indigenous bacteria were attached to the surface of the hexagonal crystals. Corrosion pits were distinctly observed on the surface of the secondary mineral by the direct contact attachment of indigenous bacteria.

1. 서론

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 환경 친화적으로 회수할 수 있는 생물학적 용출 공정이 개발되어 일부 몇몇 나라에서는 상용화 되고 있다. 또한 황화광물의 정광(concentrate)을 높은 온도로 산화시키거나 회화(roasting)하는 과정에서 생성되는 SO₂ 가스가 대기오염을 일으키기 때문이다(Marsden and House, 1992). 그리고 방대한 양으로 방치되어 있는 저 품위광석, 광산폐석 및 광미에 미량으로 포함되어 있는 유용금속을 기존방법으로 회수하는 것은 사실상 불가능한 일이다. 그러나 미생물을 이용한다면 고 품위광석은 물론이고 저 품위광석, 광산폐석 및 광미로부터 유용금속 이온을 용출시켜 회수할 수 있다. 미생물을 황화광물에 적용하여 유용금속 이온을 회수할 때 대기오염은 물론이고 지표수나 토양 오염도 적게 발생한다. Heap leaching 혹은 dump leaching과 같이 미생물을 현장에 적용한다면 광석운반에 따른 경비가 절감되고, leaching 용액을 재순환시키기 때문에 지표수나 지하수는 물론이고 토양 오염 문제도 발생하지 않는다(Bruynesteyn and Duncan, 1971; Brierley, 1978b, 2003). 그러나 미생물을 황화광물에 적용하여 유용금속이온을 효과적으로 용출시켜 내기 위해서는 미생물에 대한 능력, 온도, pulp density 및 particle size 등의 인자들을 알아야한다. 특히 미생물체가 높은 온도에 생존할 수 있거나 고농도의 중금속 이온에 내성을 갖고 있다면 황화광물로부터 유용금속이온을 효과적으로 용출시킬 수 있다. 약 40℃까지 생존할 수 있는 중온성 박테리아(mesophile)를 황화광물에 접종하여 유용금속 이온을 용출시키는 것 보다 40℃에서부터 55℃까지 생존할 수 있는 중간고온성 박테리아(moderate thermophile)를 적용하면 더 많은 유용금속을 용출시킬 수 있다(박천영 등, 2009; 박천영과 조강희, 2010; 박천영 등 2010). 또는 55℃에서부터 약 80℃까지 적용할 수 있는 초고온성박테리아(extreme thermophile)를 황화광물을 적용한다면 더 많은 유용금속 이온을 용출시킬 수 있게 되었다(Schippers, 2007). 이와 같이 온도가 증

가하면 Arrhenius 공식에 의한 rate constant가 증가하고 박테리아의 배가시간이 감소함으로써 높은 온도로 황화광물에 박테리아를 적용하면 많은 양의 유용금속을 용출시킬 수 있기 때문이다. 즉 온도가 10°C 증가되면 금속이온 용출율은 약 2배가 증가한다(Torma, 1977; Ahonen and Tuovinen, 1989, 1990, 1991). 그리고 온도가 증가하면 유용금속 이온의 확산율이 증가되고 용해도가 증가된다. 즉 온도가 증가되면 물의 점성과 표면장력이 감소되기 때문에 낮은 온도에 비하여 황화광물의 금속이온 용출량이 증가된다. 온도가 증가되면 황화광물과 박테리아의 체류시간을 감소시켜 유용금속이온의 용출 효과를 향상시킬 수 있게 되고, 점성의 감소로 인하여 황화광물의 혼합이 잘 되어 동력비가 감소된다. 또한 온도가 증가되면 슬러지의 탈수가 용이해진다. 그러나 온도가 증가되면 CO₂와 같은 가스의 용해도가 감소되고, 높은 온도를 장시간 안정하게 유지하기 위해서는 많은 에너지가 소요된다는 단점도 있다(Brock, 1986). 한편, 박테리아에 의한 황화광물의 유용금속 용출은 직접접촉산화작용과 간접접촉산화작용에 의하여 일어난다(Silverman and Ehrlich, 1964; Sand et al., 1995, 2001; Boon, 2001). 직접접촉산화작용은 미생물체가 황화광물 표면에 부착하여 산화시키는 방법이다. 간접접촉산화방법은 미생물체가 황화광물 표면에 접촉하는 것이 아니고 ferric iron이 황화광물을 산화시키는 방법이다. Ferric iron이 황화광물을 산화시키면 Fe²⁺ 이온과 S⁰가 생성된다. 이때 미생물체가 Fe²⁺와 S⁰을 산화시켜 Fe³⁺와 SO₄²⁻을 생성한다. 미생물체에 의해 생성된 Fe³⁺ 이온이 다시 황화광물을 산화시키는 방법이 간접접촉산화이다. 물론 황화광물의 산화작용은 황화광물 표면에 접촉한 미생물체에 의해서 그리고 황화광물 표면에 접촉하지 않고 부유하는 박테리아에 의하여 Fe²⁺와 S⁰을 산화시키는 작용이 동시에 일어나는 협동적 용출(cooperative leaching)이 일어날 것이다(Tributsch, 2001). 직접접촉산화작용은 미생물체가 황화광물 표면에 직접 물리적으로 부착해야 한다. 미생물체가 부착된 황화광물 표면은 미생물체가 분비한 효소로 인하여 부식작용의 증식이 일어난다. 따라서 직접접촉산화작용이라 함은 많은 개체수의 미생물들이 황화광물 표면에 부착하여 부식작용을 일으키는 현장을 확인하거나 혹은 미생물체 크기의 증식 자국(corrosion pit)들이 황화광물 표면에 남아 있어야 할 것이다. 이때 황화광물 표면에 부착한 미생물체는 세포외중합체물질(extracellular polymeric

substance)을 분비하여 황화광물 표면을 효소적으로 공격한다(Sand et al., 1995, 2001; Tributsch, 2001). Rojas et al.(1995)는 박테리아를 황철석에 반응시킨 결과, 박테리아 세포 표면에 형성된 유기질 캡슐(organic capsule) 속에 무수히 많은 황 입자들이 포함된 것을 발견하였다. 이는 자신이 분비한 반응성의 유기질 캡슐 층(organic capsule layer)이 황철석 표면을 용해시키고 용해된 황철석으로부터 황 입자들을 유기질 캡슐에 저장하는 것으로 해석하였다. 역시 Sand et al.(1995)도 박테리아가 분비한 10 nm 두께의 유기질 층이 황화광물을 공격하는 장소로 해석하였다. Rodriguez-Leiva와 Tributsch(1988)는 박테리아가 분비한 유기질 필름을 pseudo capsule로 불리었으며, pseudo capsule과 접촉한 황화광물이 용해되어 부식이 일어나는 것으로 보고하였다.

미생물체의 산화작용에 의하여 황화광물에 포함되어 있던 *Fe*, *Pb*와 같은 유용금속이 용액 속으로 용해되어 들어간다. 이들 유용금속 이온은 물과의 가수분해로 혹은 SO_4^{2-} 와 결합하여 침철석(Bhatti et al., 1993), 원소 황(Bhatti et al., 1993; Tuovinen et al., 1994), jarosite(Bhatti et al., 1993; Tuovinen et al., 1994; Garcia et al., 1995a, 1995b) 혹은 anglesite(Garcia et al., 1995a, 1995b)와 같은 2차 생성물을 형성한다. 이들 2차 생성물은 황화광물 표면을 피복하기 때문에 미생물체의 직접접촉산화작용을 방해하여 유용금속용출을 감소시킨다. 그러나 2차 생성물이 유용금속 용출에 부정적인 영향을 미치지만 오히려 부식 효율을 향상시키는 경우도 있다. 예를 들면, anglesite와 같은 불용성의 2차 생성물이 방연석 표면에 피복되면 방연석의 부식(floatability)이 감소된다. 그러나 2차 생성물의 원소 황이 섬아연석 표면에 피복되면 섬아연석의 부식은 증가하게 된다. 즉, 원소 황은 소수성 특성이 있기 때문이다. 그러므로 anglesite 혹은 원소 황과 같은 2차 생성물은 방연석과 섬아연석을 분리하는데 효과적으로 이용된다(Yelloji Rao et al., 1992).

우리나라에서는 미생물을 이용하여 황화광물로부터 유용금속 이온을 용출시키는 연구는 미미하다. 고온성 박테리아를 이용해서 유용금속이온을 용출시키는 연구는 Park et al(2010)에 의해서 수행되었다. 이러한 기초연구가 더 지속적으로 필요함을 느낀다. 따라서 연구목적은 황화광물로부터 많은 양의 유용금속 이온을 용출시키기 위하여 42℃와 52℃의 중간고온성 온도에서 미생물 용출실험을 수행하였다. 방연석, 섬아연석의 미생물 용출실험에서 온도증가에 따른 유용금속이온의 용출 효율 증가, 2차 생성물의 형성 그리고 박테리아의 직접접촉산화작용에 의하여 형성된 층식에 대하여 고찰하고자하였다.

2. 이론적 배경

화학무기영양체의 박테리아가 대사 작용에 필요한 에너지를 Fe^{2+} 이온이나 환원형태의 황(S)이 산화될 때 방출되는 에너지를 활용한다. 이때 박테리아가 자신의 세포합성에 필요한 탄소는 대기 중의 CO_2 로부터 얻고, 질소, 칼륨, 마그네슘 및 미량 원소는 수용액으로부터 얻는다. 그러므로 화학무기영양체 박테리아가 생존하기 위해서는 산화에너지를 발생시켜주는 Fe^{2+} 나 환원형태의 황이 필요하다. Fe^{2+} 와 환원형태의 황이 광물형태로 결합된 것이 황철석(FeS_2)이다. 따라서 황철석의 Fe^{2+} 와 S가 산화되면서 발생하는 에너지를 박테리아가 활용하는 것이다. 황철석으로부터 방출된, Fe^{2+} 이온은 박테리아에게 산화에너지를 공급하고 황갈색의 철수산화물로 침전된다. 이때 황철석과 같이 황동석, 섬아연석, 방연광, 유비철석 등의 황화광물에 박테리아를 접종시켜 산화시키면 Cu, Zn, Pb 및 As 이온들이 수용액으로 방출된다. 따라서 박테리아에 의해 불용성의 황화광물로부터 수용액에 금속이온을 방출시키고 이들 이온을 회수하는 것이 미생물용출이다.

황화광물에 포함되어 있는 유용금속을 회수하기 위하여, 인위적으로 화학무기영양체가 잘 번식할 수 있는 영양액을 만들고 여기에 박테리아와 황화광물을 접종-반응시켜 황화광물로부터 유용금속이 방출되도록 유도한다. 이와 같이 박테리아의 대사 작용을 이용하여 황화광물 속에 포함되어 있는 유용금속이 수용액으로 방출되도록 유도하는 연구가 많이 진행되어 왔다(Torma et al., 1970, 1988; Omoike and Chorover, 2006; Seidel et al., 2001).

미생물체에 의하여 황화광물이 산화되는 방법은 직접접촉산화방법(direct contact oxidation mechanism)과 간접접촉산화방법(indirect contact oxidation method)이 연구되어 왔다(Sand et al., 2001). 직접접촉산화방법은 미생물체가 황화광물 표면에 직접 접촉하여 효소물질을 분비하여 산화시키는 방법이다. 간접접촉산화방법은 ferric iron과 같은 산화제가 황화광물을 산화시켜서 Fe^{2+} 와 S를 유리시키고 이때 미생물체가 Fe^{2+} 와 S를 활용하는 과정이다. Schippers와 Sand(1999)는 미생물체가 황화광물로부터 직접접촉으로 S를 활용하는 과정을 thiosulfate mechanism과 polysulfide mechanism으로 구분하였다, 황화광물의 S로부터 생성된 $S_2O_3^{2-}$ 를 박테

리아가 활용하여 $S_nO_6^{2-}$ 을 생성하고 다시 박테리아가 활용하여 최종적으로 SO_4^{2-} 를 생성하는 과정 그리고 황화광물로부터 형성된 H_2S^+ 를 박테리아가 활용하여 H_2S_n 를 생성하고 이를 다시 박테리아가 활용하여 최종적인 SO_4^{2-} 을 형성하는 것으로 해석하였다(Sand et al., 2001; Rohwerder et al., 2003). 그러나 직접접촉산화방법과 간접접촉산화방법을 완전하게 구명되지 못하고 또한 이들 방법을 명확히 구분하여 설명하기 어렵다.

Silverman과 Ehrlich(1964)는 박테리아에 의하여 황화광물이 산화작용이 일어날 때 결정화가 잘 이루어진 것 보다 결함(imperfection)이 있는 황화광물이 더 잘 일어난다는 것을 발견하였다. 그리고 미생물체는 에너지를 쉽게 얻을 수 있는 황화광물 표면을 선택하여 물리적으로 직접 접촉하여 부착하게 된다는 가설을 처음으로 Silverman(1967)이 제안하였다. 이는 미생물체가 산화작용이 잘 일어나는 황화광물 표면을 선택하여 물리적으로 접촉하여 산화작용을 촉진시킨다는 직접접촉산화방법인 메카니즘으로 발전하였다. 따라서 황화광물이 산화되면서 발생하는 에너지를 미생물체가 활용할 때, 에너지를 쉽게 얻을 수 있는 장소를 미생물체들이 선택한다는 연구들이 이루어져 왔다(Murr and Berry, 1976; Shrihari et al., 1991; Ohmura et al., 1993). 그리고 미생물체가 에너지를 쉽게 얻을 수 있는 장소는 황화광물 표면이 기계적 혹은 화학적으로 약하게 결정화가 이루어진 전위선(dislocation), 부식 장소(pits) 및 표면단층(surface fault)등이라는 것이 규명되었다(Berry and Murr, 1978; Bennett and Tributsch, 1978; Edwards et al., 2001).

3. 박테리아 시료 및 실험방법

3-1. 토착박테리아 채취

호산성박테리아는 일본, 하초바루(Hatchnobaru) 지열발전소 부근의 노천에서 뜨겁게 분출되는 산성 온천수에서 채취하여 배양하였다(Park et al., 2010b). 산성 온천수 10 ml를 미리 준비된 배양액(이하 성장-배양액) 150 ml에 접종시키고 32°C로 제어된 배양기(HB-201SFO)에서 성장시켰다. 32°C의 성장-배양액에서 배양된 박테리아를 6회 계대배양 하였으며 박테리아 10 ml를 채취하여 42°C와 52°C의 성장-배양액에서 각각 배양하였다.

3-2. 성장-배양액 조성

토착 박테리아가 배양될 성장-배양액(growth-medium) 조성은 basal salt와 energy source로 구성하였다. 성장-배양액(ATCC125, Thiobacillus medium)의 mineral salts medium(MSM)은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.25 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L 및 FeSO_4 5.0 mg/L를 증류수 1.0 L에 용해시켰다. 에너지원(energy source)은 원소 황(elemental sulfur) 1.0 g/L을 사용하였다. 토착박테리아를 접종하기 전 성장-배양액은 멸균기(SW-90AV100)에서 121°C, 1.4기압으로 15분간 고압 멸균하였다. 황철석, 500 ml 삼각플라스크, 기타 실험기구들을 멸균기(SW-90AV100)에서 121°C, 1기압으로 15분간 고압 멸균하였다. 6번째로 계대 배양된 토착박테리아의 성장-배양액 10 ml를 채취하여 150 ml의 성장-배양액에 각각 접종하고 32°C의 배양기(HB-201SFO)에서 교반 없이 배양하였다.

3-3. 황화광물-용출 배양액 조성

황화광물-용출 배양액의 조성은 성장-배양액에 사용하였던 무기성분 구성 비율과 동일하게 하였고 원소 황 대신 섬아연석 입자(-20 mesh=0.85 mm) 1.5 g을 에너지원으로 사용하였다. 비교시료(150 ml)도 황화광물-용출 배양액에 사용하였던 무기성분 구성 비율과 동일하게 제조하였고 황화광물(20 mesh=0.85 mm, 2 g/L) 양도 동일하게 첨가하였다. 박테리아가 접종된 황화광물 용출-배양액의 pH는 황산으로 조정하지 않았다. 황산으로 황화광물 용출-배양액의 pH를 조정하지 않은 이유는 최적의 pH 조건이 아니어도 박테리아가 고 온도에서 생존할 수 있는지, 황화광물 표면에 부착할 수 있는지 그리고 황화광물로부터 유용금속 이온을 용출시킬 수 있는지를 확인하기 위해서였다. 황화광물-용출 배양액과 비교시료를 배양기(HB-201SFO)를 사용하여 각각 42℃, 52℃에서 반응시켰다. 성장-배양액, 황화광물-용출 배양액, 500 ml 삼각플라스크, 실리스토퍼(sili stopper), 황화광물 입자 및 스파쿨라(spatulas) 등은 고압멸균기(SW-90AV100)에서 121℃, 1.4 기압으로 15분간 멸균하여 사용하였다. 황화광물 입자는 3차 증류수가 들어 있는 초음파세척기(Ultrasonic, Power Sonic 510)에서 15분간 3번 세척하고 고압멸균기에서 멸균하였다.

3-4. 황화광물 시료

토착 박테리아들에 반응시킬 섬아연석은 전남 광양읍 본정광산 폐석에서 채취하였다. 섬아연석은 파쇄 및 분쇄를 실시하여 20 mesh 체를 통과시키고 육안으로 석영을 제외시켰다. 그리고 방연광시료는 호주에서 구입하였다. 파분쇄는 섬아연석과 동일하게 실시하였다. 입자는 초음파세척기(Ultrasonic, Power Sonic 510)에서 15분간 증류수로 세척하여 건조시킨 후 멸균기에서 고압멸균 후 사용하였다. 황화광물을 연마편으로 제작하여 편광현미경(Leitz, OTHPLANPOL)에서 감정하고, EPMA 및 SEM분석을 실시하였다.

3-5. 분석기기

성장-배양액과 황화광물-용출 배양액의 pH와 Eh(산화환원전위)는 pH 메타(Eijelkam, 18.28, multi-parameter analyser, Belgium)와 ORP 메타(TOA RM-12P)를 각각 사용하여 측정하였다. 황화광물 입자의 구성성분을 EPMA(EPMA-1600, Shinadzwand Genesis XM2 EDX(EDAX))로 정량 분석하였다. 황화광물-용출 배양액에서 Zn, Pb, Fe, Cu 이온 함량을 시간별로 ICP-MS(Perkin Elmer, ELAM DRC II s/n i24050402 ICP-MS DRC II)로 분석하였다. 토착박테리아의 형태를 관찰하기 위하여 0.1 μm 의 필터 페이퍼와 황화광물을 Pt 혹은 Au로 코팅하여 SEM 및 EDS(Japan, Hitachi, S4800)분석을 실시하였다. 이때 EDS 분석은 100%의 Co 표준 시료로 영점조정하고 정량분석 하였다. 황화광물은 아게이트 몰탈에서 200mesh 이하로 미분쇄하여 XRD(Rigaku, Geigerflex D/max rA)분석을 실시하였다. 박테리아에 접종할 황화광물 입자의 구성성분을 EPMA(EPMA-1600, Shinadzwand Genesis XM2 EDX(EDAX))로 정량 분석하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 황화광물-용출 배양액에서 pH 변화

토착박테리아가 성장-배양액에서 성장할 때 나타나는 pH 및 Eh 변화를 Fig. 1에 나타냈다. 토착박테리아를 접종하기 전 성장-배양액 pH는 4.44(방연석), 4.52(섬아연석)이다. 성장-배양액에 토착박테리아를 접종 후 3일 후에는 pH가 3.32(방연석), 3.42(섬아연석)로 감소하고, 접종 후 21일에는 최대 1.96(방연석), 2.02(섬아연석)으로 감소하였다. 27일 이후의 pH는 대체적으로 2.45를 유지하였다. 이와 같이 성장-배양액의 pH가 감소하는 원인은 에너지원으로 첨가한 원소 황이 토착 박테리아에 의하여 황산염으로 되기 때문이다. 토착박테리아가 접종되기 전 성장-배양액의 Eh는 157 mV(방연석), 162 mV(섬아연석)이었다. 토착박테리아가 접종된지 3일 후에는 226 mV(방연석), 232mV(섬아연석)로 증가하고, 접종 후 18일에는 최대 268 mV로 증가하였다. 이와 같이 성장-배양액의 Eh가 증가하는 원인은 첨가한 원소 황이 토착 박테리아에 의하여 산화되어 황산염으로 될 때 전자를 발생하기 때문이다.

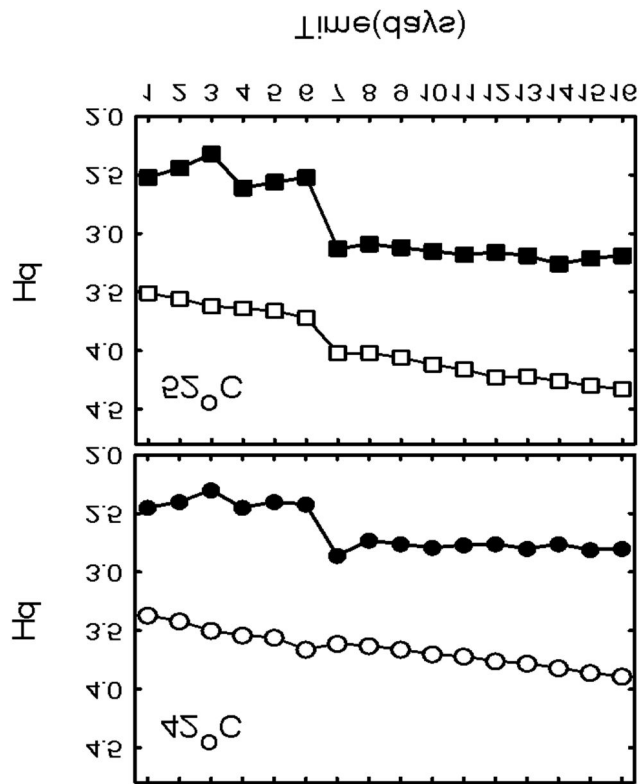


Fig. 1. Evolution of pH during galena bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control)

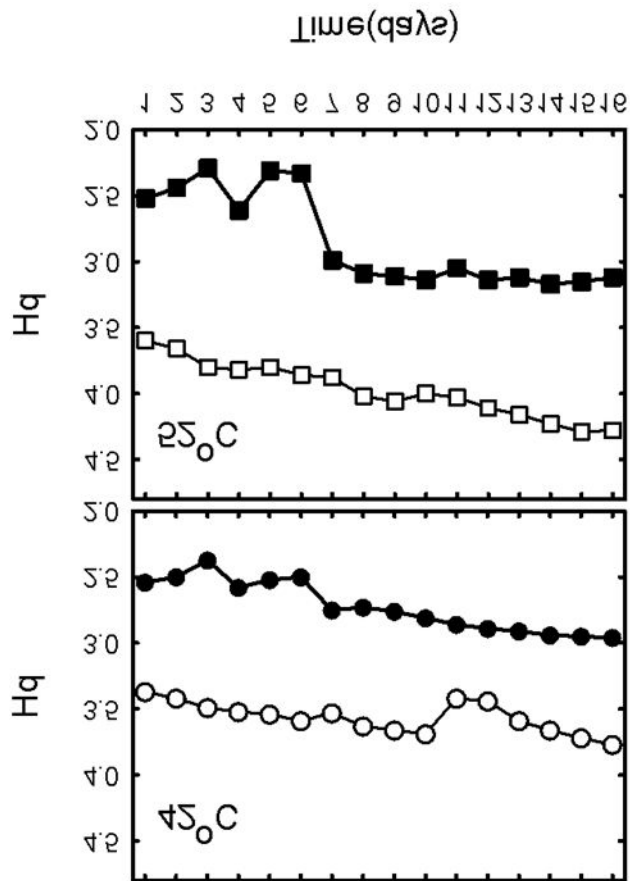


Fig. 2. Evolution of pH during galena bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control)

4-2. 황화광물 표면특성

방연석 시료에 대한 연마편을 제작하여 편광현미경 관찰한 결과 방연석(약 60%), 섬아연석(약 31%), 자류철석(약 5%), 황철석(약 2%) 및 황동석(약 0.7%) 등으로 구성되어 있었다. 방연석은 삼각형의 pit들과 직각의 벽개들이 잘 발달되어 있고(Fig. 1a), 섬아연석은 불규칙한 황동석 입자를 포함하는 용리구조(exsolution texture)가 잘 발달되어 있었다. 가끔은 방연석 입자를 포함하기도 한다. 자류철석은 복반사(bireflectance)와 이방성(anisotropy) 특징이 잘 나타난다. 황철석은 주로 반타형으로 나타나며 간혹 cubic 형태로도 산출된다(Uytenbogaardt and Burke, 1973; Craig and Vaughan, 1981). 방연석 시료의 연마편에서 관찰되었던 황화광물들을 전자현미분석기에서 다시 확인하고(Fig. 1b) 이들 황화광물들에 대한 EPMA 정량분석 결과를 Table 1에 정리하였다. 방연석, 섬아연석, 황철석에 대한 EPMA 정량분석 자료(n=5)를 이용하여 화학식으로 나타내면 각각 $Pb_{.58}S_{.42}$, $(Zn_{81.8}Fe_{18.09})S$, $(Fe_{99.71}As_{0.29})S_2$ 로 된다. 섬아연석과 방연석 사이에서 산출되는 자류철석(n=5)은 $Fe_{.46}S_{.53}$ 로 표현되고, 황철석 주변에 산출되는 자류철석(n=5)은 $Fe_{.46}S_{.53}$ 으로 표현된다. 방연석 시료를 왕수분해한 후 ICP-AES와 IC로 분석한 결과 Pb가 13.05%, Zn이 46.78%, Cu가 0.28%, Fe가 0.20% 그리고 S가 39.70%로 측정되었다.

연마편으로 제작된 섬아연석 시료를 편광현미경으로 관찰한 결과 섬아연석이 약 60%, 방연석이 25%, 황동석이 10%, 황철석이 약 5%로 구성되었다. 미세한 황동석 입자들이 섬아연석과 방연석에 용리구조로 발달되어 있었다. 방연석은 예각삼각형이 잘 발달되어 있는 (100)면이 주로 관찰되었다. 섬아연석 시료를 구성하고 있는 광석광물에 대한 EPMA 정량분석 결과를 Table 1에 정리하였다. EPMA 정량분석은 각 광석광물에 대하여 5 지점을 선택하여 분석하였다. EPMA 분석결과 섬아연석에는 Zn이 57.35 wt.%, Fe가 9.44 wt.%로 포함되어 있으며 미량성분으로 As(0.048 wt.%)와 Ag(0.002 wt.%)가 검출되었다. 섬아연석에 대한 EPMA 정량분석 자료를 이용하여 화학식으로 나타내면 $(Zn_{83.76}Fe_{16.14}As_{.1})S$ 으로 표현된다. 섬아연석에 Fe 성분이 약 9.44 wt.%로 포함되어 있다. 이와 같이 섬아연석에 Fe 함량이 많이 포함된 이유는 미세한 황동석 입자들이 섬아연석과 용리구조를 이루고 있기 때문이다. 방연석은 S가 평균 10.22 wt.%로 Pb가 86.19를 포함하고 있으며, 미량성분으로 Sb(0.17 wt.%), Cu(0.04), Ag(0.04), Zn(0.03) 등이 검출되었다. 방연석에 대한 EPMA 정량분석 결과를 이용하면 $(Pb_{99.29}Sb_{.33}Cu_{.16}Zn_{.12})S$ 로 표현할 수 있다. 황동석은 S가 33.42 wt.%, Fe가 29.1, Cu가 33.61가 포함되어 있으며, 미량성분으로 As(0.13 wt.%), Zn(0.04), Ag(0.012), Sb(0.002) 등이 검출되었다. EPMA 정량분석 결과를 이용하면 황동석은

$(Cu_{50.29}Fe_{49.52}As_{.16}Zn_{.07}Ag_{.01})S_2$ 으로 표현된다. 황철석은 S가 50.91 wt.%, Fe가 44.86로 포함되어 있고, 미량성분으로 As(0.21 wt.%), Zn(0.04), Cu(0.006), Sb(0.0018), Ag(0.0008) 등이 검출되었다. EPMA 정량분석 결과를 이용하면 황철석은 $(Fe_{99.63}As_{.35})S_2$ 으로 표현된다. 왕수로 분해한 섬아연석 시료를 IC를 이용하여 SO_4^{2-} 함량을 측정하였다. IC에서 측정된 SO_4^{2-} 농도를 S로 변환한 결과 S의 평균 함량은 32.43 wt.%로 측정되었다. -200 mesh의 섬아연석 시료에 대한 XRD분석에서 섬아연석과 방연석에 해당되는 X-선 회절 값들이 나타났다(Fig. 11). 섬아연석 시료에 대한 XRD분석 결과에서 황동석과 황철석에 해당되는 회절 값들은 관찰되지 않았다. 편광현미경이나 EPMA 분석에서 황동석과 황철석이 잘 관찰되지만 XRD분석에서 황동석과 황철석에 해당되는 회절 값들이 나타나지 않는 것은 XRD의 검출한계가 3~5 wt.%이기 때문에 사료된다(Marsden and House, 1992). -200 mesh 섬아연석 시료를 왕수분해 후 ICP-MS로 분석한 결과 Zn이 87.1%, S가 9.2%, Pb가 3.42%, Cu가 0.18% 그리고 Fe가 0.07%로 측정되었다.

Table 1. Electron probe microanalysis of galena sample

Fel.	Sphalerite(wt%)					mean
S	32.52	32.73	32.611	32.529	32.559	32.5898
Fe	10.73	10.768	10.168	10.869	10.757	10.6584
Cu	0	0	0	0	0	0
Zn	56.22	56.398	57.212	56.069	56.418	56.4634
As	0.057	0.048	0.032	0.021	0.054	0.0424
Ag	0.001	0.004	0	0.001	0	0.0012
Sb	0	0.016	0	0	0	0.0032
Pb	0	0	0	0	0	0
Total	99.5	99.9	100	99.4	99.78	99.716
Fel.	Pyrrhotite(wt%)					mean
S	38.415	38.166	38.003	38.001	37.344	37.9858
Fe	58.533	58.015	58.543	58.533	58.316	58.388
Cu	0	0.039	0	0.016	0	0.011
Zn	0.089	0	0.062	0	0.096	0.0494
As	0.227	0.231	0.233	0.252	0.187	0.226
Ag	0.039	0	0.03	0	0.011	0.016
Sb	0	0	0.019	0	0	0.0038
Pb	0	0	0	0	0	0
Total	97.3	96.4	96.8	96.8	95.9	96.64
Fel.	galena(wt%)					mean
S	10.008	10.262	10.215	10.008	10.215	10.1416
Fe	0.047	0.017	0.039	0.047	0.039	0.0378
Cu	0.016	0.05	0.03	0.016	0.03	0.0284
Zn	0	0	0	0	0	0
As	0	0	0	0	0	0
Ag	0	0	0	0	0	0
Sb	0.127	0.103	0.141	0.127	0.141	0.1278
Pb	91.06	92.364	91.852	91.06	91.852	91.6376
Total	101	102	102	101	102	101.6

Table 2. Electron microprobe analysis of sphalerite sample(units; weight percent)

	sphalerite						mean	galena						mean
S	32.76	32.34	32.57	32.17	32.30	32.43	10.36	10.19	10.21	10.25	10.07	10.22		
Fe	9.49	9.42	9.34	9.43	9.51	9.44	0.003	0.00	0.02	0.00	0.02	0.01		
Cu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02	0.02	0.01	0.08	0.04		
Zn	57.35	57.25	57.82	57.20	57.13	57.35	0.00	0.04	0.00	0.07	0.06	0.03		
As	0.04	0.05	0.04	0.06	0.05	0.05	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00		
Ag	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.08	0.04	0.10	0.00	0.04		
Sb	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.18	0.26	0.13	0.17		
Pb	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	87.27	86.11	86.29	85.72	85.55	86.19		
Total	99.64	99.06	99.77	98.80	99.00	99.25	97.73	96.70	96.76	96.41	95.91	96.70		
	chalcopyrite						mean	pyrite						mean
S	33.78	33.48	33.33	33.08	33.44	33.42	51.50	50.70	50.69	51.26	50.39	50.91		
Fe	29.45	29.47	28.95	28.80	28.83	29.10	45.06	44.92	44.38	45.10	44.83	44.86		
Cu	33.55	33.73	33.79	33.04	33.96	33.61	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01		
Zn	0.11	0.04	0.04	0.04	0.00	0.05	0.03	0.00	0.10	0.07	0.00	0.04		
As	0.15	0.1	0.14	0.12	0.12	0.13	0.23	0.23	0.23	0.16	0.19	0.21		
Ag	0.001	0.009	0.012	0.007	0.03	0.01	0.004	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Sb	0.003	0.00	0.00	0.00	0.006	0.00	0.00	0.00	0.009	0.00	0.00	0.00		
Pb	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Total	96.84	96.83	96.26	95.09	96.39	96.28	96.82	95.85	95.42	96.61	95.41	96.02		

4-3. 박테리아 부착 특성

황화광물-용출 배양액에서 방연석, 섬아연석 입자를 각각 채취하였다. Fig. 3b는 반응 10일 경과된 방연석의 표면이다. 많은 토착박테리아가 방연석 표면에 부착된 것이 관찰되었다. 이때 배양액의 pH는 2.40이므로, 즉 방연석의 등전위 2.43 보다 낮은 pH이므로 방연석의 표면은 양전하를 띠게 될 것이다. 이와 같이 양전하를 띠는 방연석 표면에 음전하를 띠는 토착박테리아가 부착하는 것은 정전기적 인력으로 해석할 수 있을 것이다. 역시 많은 토착박테리아가 부착된 것이 관찰되었다. 반응 10일 경과한 방연석-용출 배양액의 pH는 2.52이었다. 이는 방연석의 등전위 보다 높은 pH이다. 이 pH 환경이라면 방연석의 표면은 음전하를 띠게 되어 음전하를 띠는 박테리아와 반발력이 작용하였을 것이다. 그러나 Fig. 3d에서 보는바와 같이 많은 수의 막대 모양 박테리아들이 방연석 표면에 부착된 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3d에서 보는바와 같이 토착박테리아를 접종하고 10일 경과되었을 때 이미 많은 박테리아가 방연석 표면에 부착되었다. 호산성박테리아의 적응기는 대체적으로 16.6일(400시간)로 알려져 있다(Yu et al., 2001). 이와 같이 반응 10일(Fig. 3a) 경과되었을 때 박테리아가 방연석 표면에 부착할 수 있었던 것은 계대배양을 각각 2번 실시하였기 때문일 것이다. 즉 42°C와 52°C에서 계대배양을 6번 실시하는 동안 토착박테리아들이 이 온도에 잘 적응하였을 것으로 해석된다. 42°C에서 토착박테리아들의 크기는 0.4×1.3 μm에서 0.4×1.9 μm 범위로 나타났고, 52°C에서는 0.5×1 μm에서 0.5×1.6 μm 범위로 나타났다. 방연석의 등전위 2.43 보다 높은 pH 환경, 즉 박테리아와 방연석 사이에 음전하의 반발력이 발생해도 많은 토착박테리아들이 방연석 표면에 부착하는 것을 확인하였다. 섬아연석 표면에 부착한 박테리아의 특성을 SEM에서 관찰하였다(Fig. 4). Fig.4a에서 크기가 약 0.4×1.1 μm에서 0.5×1.8 μm 범위로 나타나는 막대 모양의 박테리아들이 섬아연석 표면에 부착하였다. 일부 박테리아들의 세포 표면은 심하게 수축되어 나타나고 있다. 박테리아 세포 표면이 수축되어 나타나는 것은 시료 처리 과정의 탈수에 의해서 혹은 전자현미경의 진공 조건에 의해서 형성되는 것으로 사료된다(Berry and Murr, 1978; Park et al., 2010a). 전체 길이가 약 0.5×2.0 μm로 나타나는 박테리아는 막대 모양의 중간 부분이 구분되어 있고, 이들 세포 표면은 수축되지 않은 것으로 보인다.

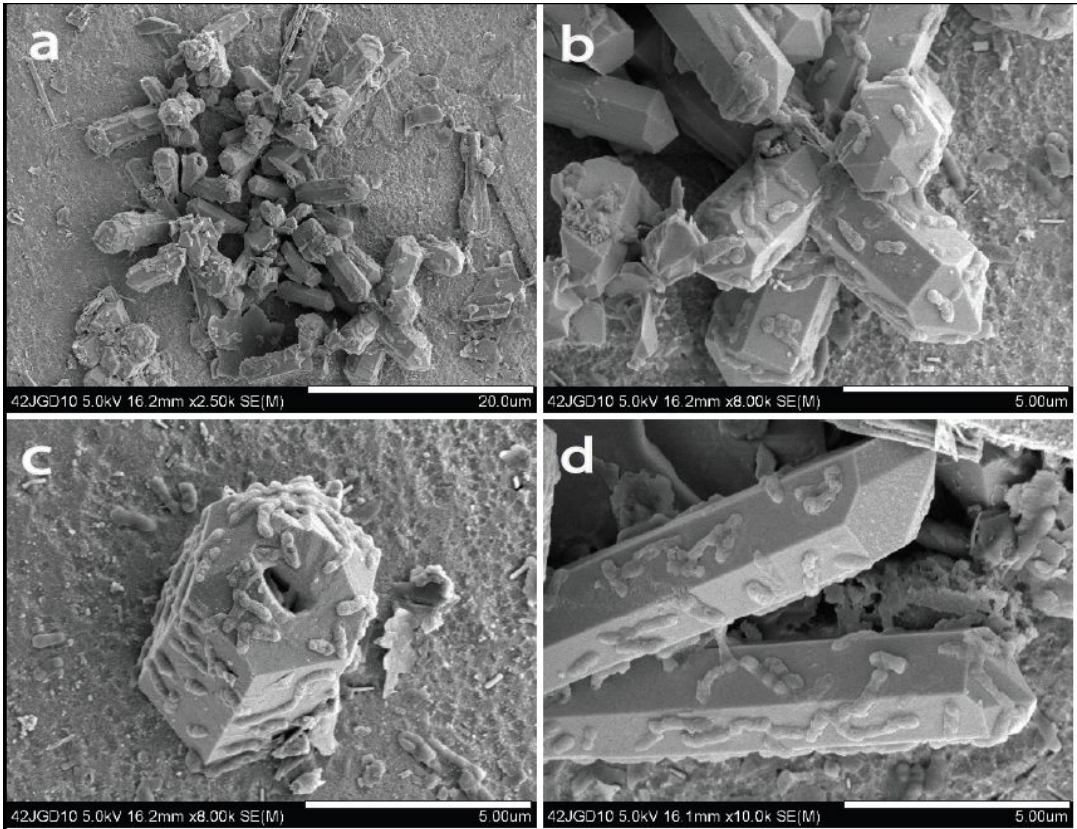


Fig. 3. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the galena surface.

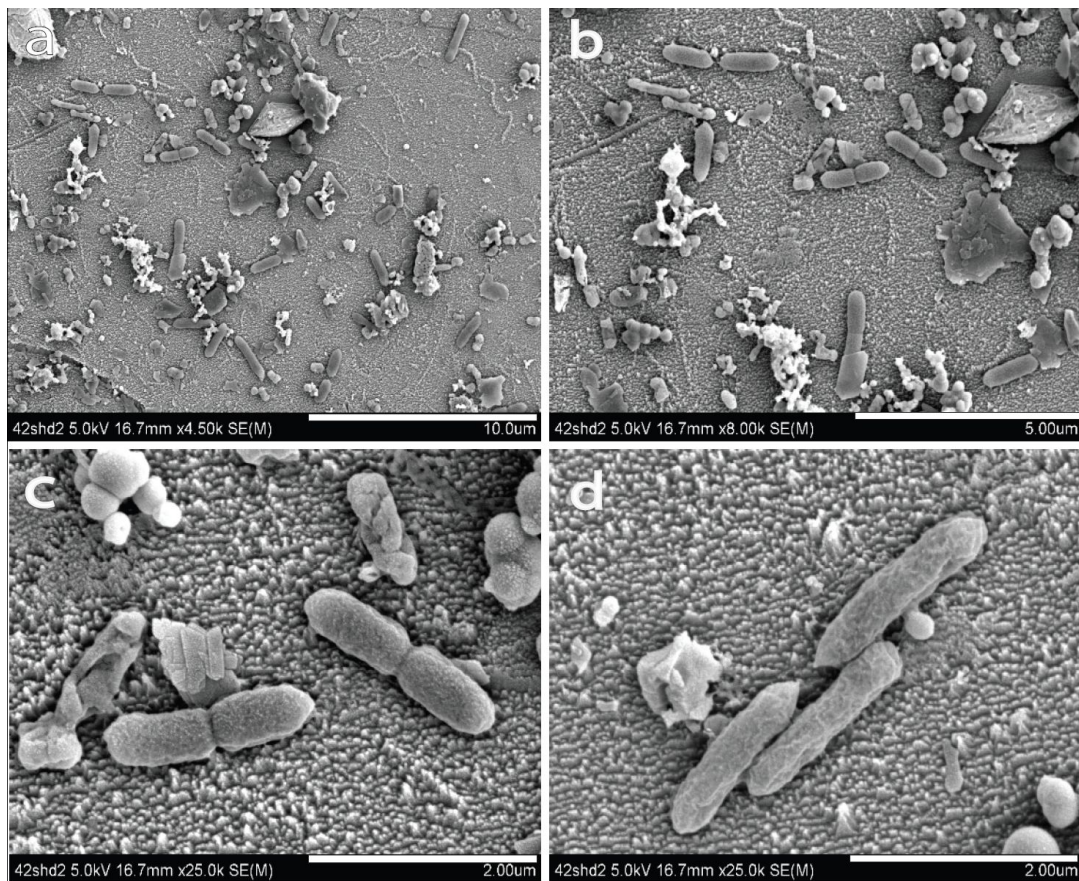


Fig. 4. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the sphalerite surface.

4-4. 박테리아에 의한 충식작용

토착박테리아의 직접접촉산화작용에 의해 부식작용이 일어난 것이 관찰되었다(Fig. 6,7). 수많은 막대 모양의 토착박테리아들에 의해 2차 광물 표면이 심하게 부식되고 있는 것이 관찰되었다. 2차 광물 표면에 부착되어 있는 박테리아들 그리고 2차 광물 표면 안쪽으로 상당한 깊이로 부식한 후 박테리아 자신이 용해되고 있는 모습들이 관찰되었다. 이와 같이 박테리아들에 의해 부식작용이 일어나고 있는 장소는 박테리아에 의한 직접접촉산화작용이 일어나고 있는 장소임을 설명할 수 있다. 황화광물 표면에 박테리아가 직접접촉하여 황화광물 표면이 산화된다는 직접접촉산화작용을 Silverman(1967)이 처음으로 제안한 이래 많은 연구자들이 직접접촉에 의한 산화메카니즘을 연구하여 왔다(Sand et al., 1995; Schippers and Sand, 1999). 즉, 박테리아가 황화광물 표면에 물리적으로 접촉하여 산화시킨다면 황화광물 표면은 박테리아 크기의 충식자국이 남아 있을 것으로 가정하였다. 따라서 Sand et al.(1995, 2001)와 Tributsch(2001)는 박테리아가 분비한 세포외중합체물질(extracellular polymeric substance)이 황화광물 표면을 효소적으로 산화시킨다고 제안하였고, Rojas et al.(1995)은 박테리아가 분비한 유기질 캡슐(organic capsule)이 반응성이 강해 황화광물 표면을 산화시킨다고 설명하였다. 또한 Rodriguez-Leiva와 Tributsch(1988)는 박테리아가 분비한 유기질 필름인 pseudo capsule이 황화광물 표면을 용해 부식하는 것으로 설명하였다. 그러나 이들 연구자들은 Fig. 6 과 Fig. 7 에서와 같이 무수히 많은 박테리아들이 동시에 부식작용을 일으키고 있는 충식 자국들을 명확히 제시하지는 못하였다. 이와 같이 황화광물 표면에 박테리아의 물리적 접촉에 의한 부식 공동들이 명확하게 형성되는 이유는 ferrous iron을 함유하지 않는 황화광물이 미생물에 의하여 산화작용을 받기 때문으로 생각된다. Ferrous iron을 함유하는 황화광물, 즉 황철석, 황동석 및 자류철석과 같은 황화광물들은 박테리아의 물리적 접촉에 의한 직접접촉산화작용과 ferric iron에 의한 간접적산화작용이 동시에 일어난다(Malouf and Prater, 1961; Fletcher, 1970; Torma and Habashi, 1972). 하지만 ferrous iron을 함유하지 않는 황화광물, 즉 방연석, 섬아연석 및 covellite와 같은 황화광물은 ferrous iron이 거의 함유하지 않기 때문에 혹은 매우 적은 양이 함유되어 있기 때문에 ferric iron에 의한 간접산화작용은 거의 일어나지 않는 것으로 생각된다(Dave et al., 1979; Poliani and Donati, 1999). Ferrous iron에 의한 간접적산화작용

이 거의 일어날 수 없기 때문에 상대적으로 박테리아의 직접접촉에 의한 직접접촉산화 작용이 우세하게 일어났을 것으로 사료된다(Rodriguez-Leiva and Tributsch, 1988; Poliani and Donati, 1999; Attia and Al Zeky, 1990).

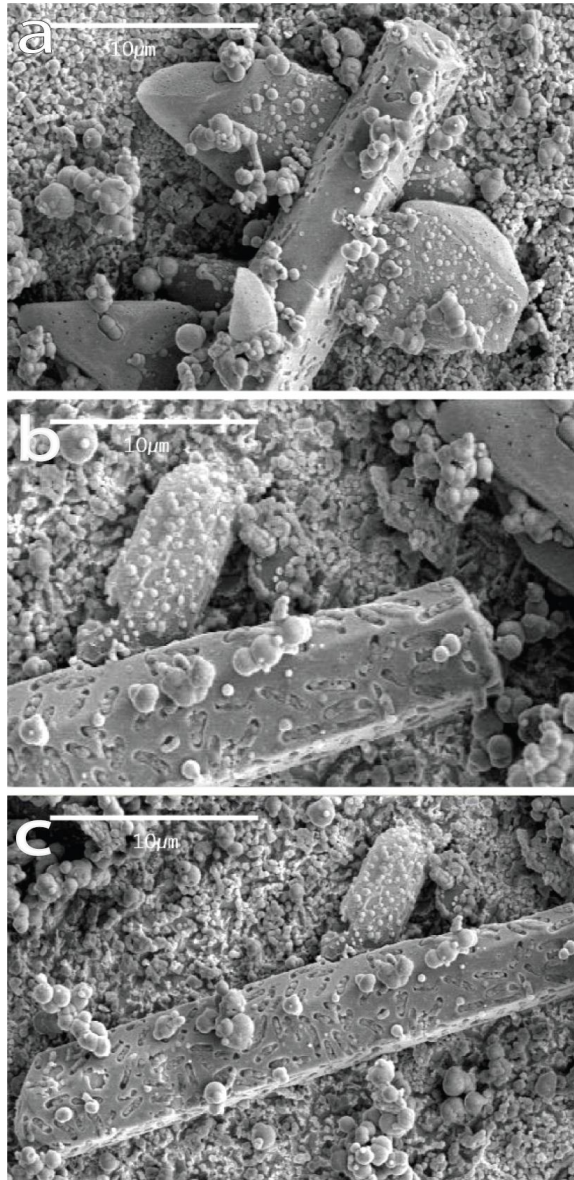


Fig. 5. SEM images of the corrosion pits on the surface of secondary minerals. The numerous rod-shaped bacteria are extensively corrode the surface of secondary mineral, which are formed from the galena dissolution.

a; 10 days after bioleaching at 52°C.

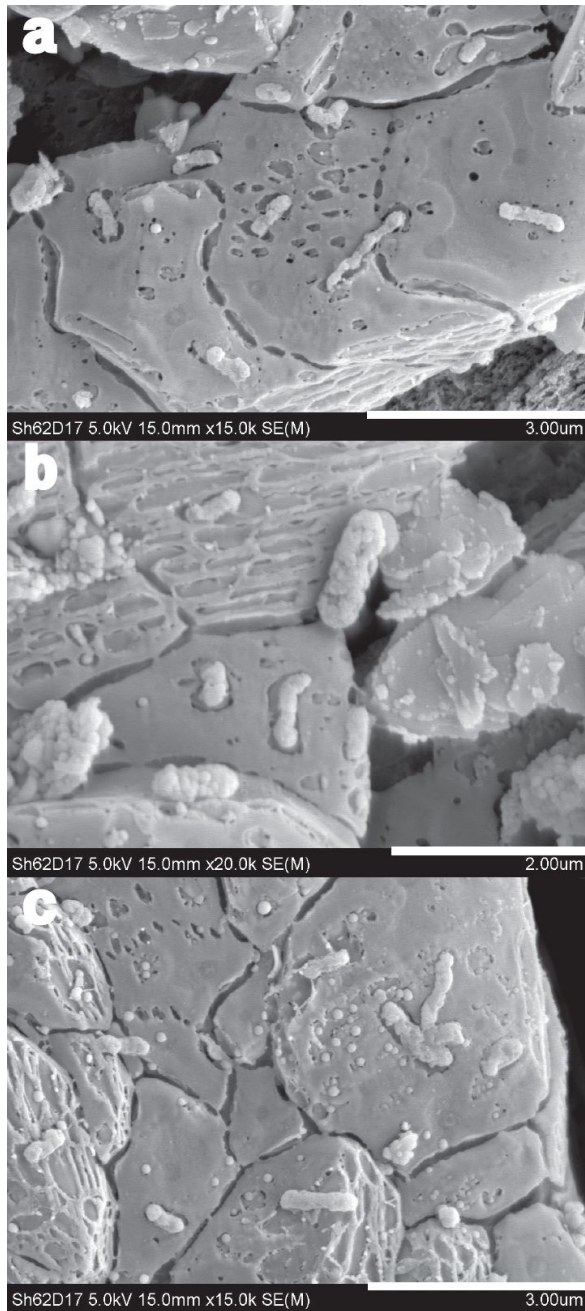
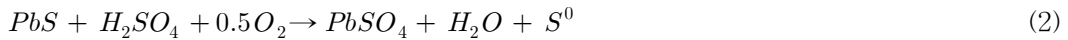


Fig. 6. SEM image of the corrosion pits and bacteria on the sphalerite.

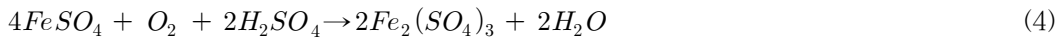
4-5. 2차 생성물 형성

방연석 입자 표면을 피복하고 있는 세포외중합체물질이 Fig. 7에서 관찰되었다. Fig. 5는 방연석 입자 표면을 피복한 세포외중합체물질이 관찰되고 이 세포외중합체물질 표면에 구형의 입자들이 부착된 것이 관찰되었다. 방연석(PbS)이 박테리아의 직접접촉산화작용에 의해 산화되면 Pb^{2+} 와 S^0 가 생성될 것이다(Garcia, et al., 1995a, 1995b; Bang et al., 1995; da Silva, et al., 2003; da Silva, 2004).

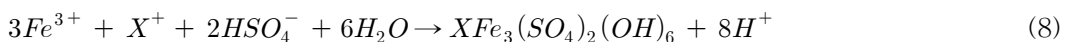


(2)식에서와 같이 원소 황과 황산연광(anglesite, $PbSO_4$)이 형성될 것이다.

또한 방연석과 함께 수반된 황철석(FeS_2)이 박테리아에 의해 산화되면 Fe^{3+} 와 S^0 가 생성되고 Fe^{3+} 는 물과의 가수분해로 철수산화물 혹은 침철석이 형성될 것이다 (Lottermoser, 2007; Konhauser, 2007).



Fe^{3+} 는 K^+ , Na^+ , NH_4^+ 혹은 H_3O^+ 와 결합하여 jarosite를 형성할 것이다(Grishin et al., 1988).



여기서 X^+ 는 K^+ , Na^+ , NH_4^+ 혹은 H_3O^+ 이다.

한편 방연석 입자 표면에 육각형 원주 결정들이 잘 형성된 것이 관찰되었다(Fig. 7b). 방연석 표면에 형성된 육각형 원주 결정 표면을 확대해 본 결과 수많은 토착박테리아가 부착된 것이 관찰되었다. 토착박테리아가 방연석의 표면 보다 육각형의 원주 표면에 더 많이 부착되었다. S가 포함된 방연석(*PbS*) 표면에 토착박테리아가 부착된 것은 방연석의 S를 활용하기 위해서 부착된 것으로 해석된다. 그러나 S 성분이 포함되어 있지 않은 육각형 원주 표면에 많은 박테리아가 부착된 것은 S를 활용하기 위한 박테리아의 부착으로 설명하기 어렵다. Fig. 7은 방연석 표면에 많은 침철석의 결정들이 형성된 것이 관찰되었다. 침상의 침철석 결정들은 (7)식에 의해 형성된 것으로 해석되며, 16일 동안 42°C와 52°C에서 용출실험이 종료된 방연석에 대하여 XRD 분석을 실시한 결과, 42°C의 박테리아 시료에서 침철석에 해당되는 $d=4.18\text{\AA}$ (110)이 나타났고 52°C 박테리아 시료에서는 역시 침철석에 해당되는 $d=2.4\text{\AA}$ (111)이 나타나는 것을 확인하였다.

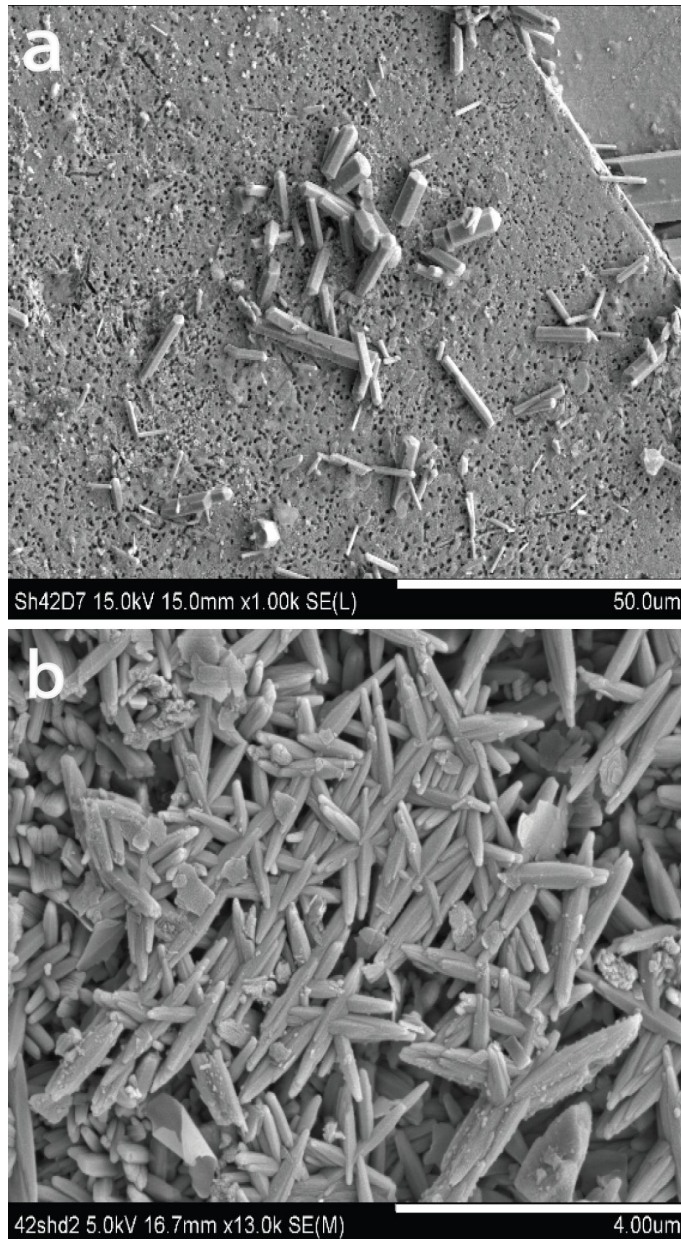


Fig. 7. SEM images of the needle like minerals on the cubic form of galena

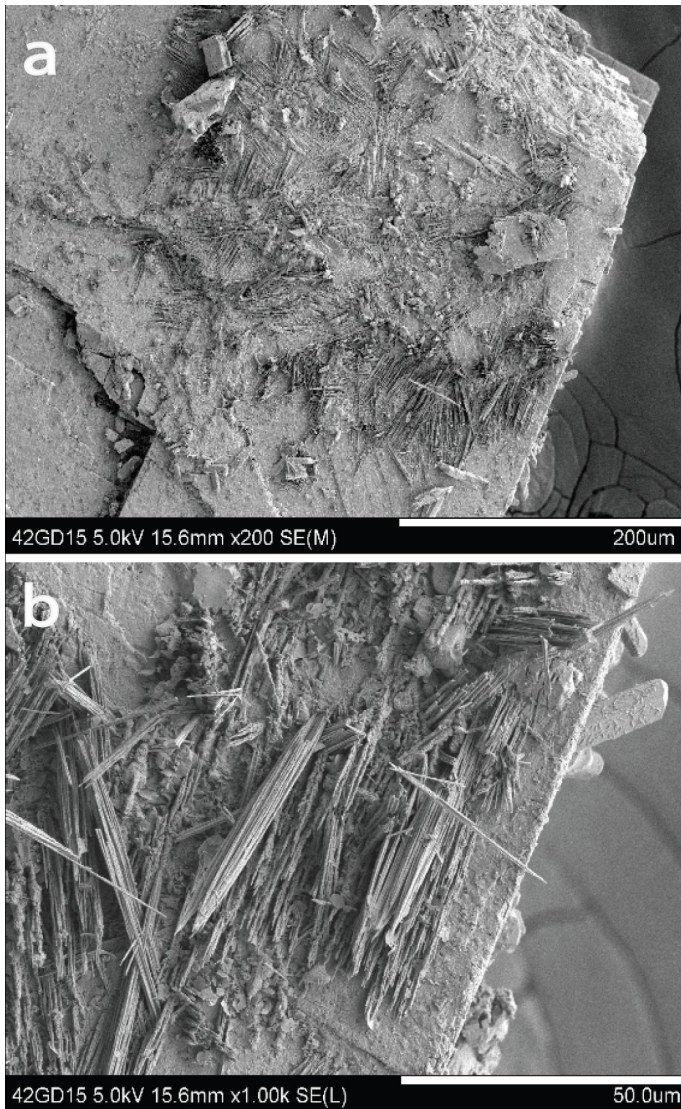


Fig. 8. SEM image of the secondary materials on the sphalerite.

4-6. 황화광물 용출 특성

고온성토착박테리아를 방연석에 접종하고 42°C와 52°C에서 각각 용출되는 유용금속 이온의 함량 변화를 반응 시간에 따라 나타내었다(Fig. 9, 10, 11, 12). 본 미생물용출실험은 박테리아를 방연석에 접종하고 황산을 첨가하지 않았다. 따라서 방연석으로부터 용출된 유용금속 이온의 함량은 순수하게 박테리아에의 산화작용에 의하여 용출된 것으로 설명할 수 있다. 반응 시간이 16일 경과한 Cu 이온 함량의 경우, 42°C의 비교시료에서 0.26 mg/l로 용출되었으나 토착박테리아가 반응한 박테리아 시료에서는 0.62 mg/l로 용출되었다. 52°C의 비교시료에 Cu 이온 함량은 1.26 mg/l로 측정되었으나 박테리아 시료에서는 2.34 mg/l로 용출되었다. 온도의 증가로 용출된 Cu 이온 함량을 42°C와 52°C의 비교시료에서 비교해보면 42°C에서 보다 52°C에서 4.8배 이상으로 높게 용출되었다. 박테리아 시료에서 용출된 Cu 함량을 42°C와 52°C에서 비교해보면 Cu 함량이 3.7배 이상 높게 용출되었다. 42°C에서 52°C로 10°C의 온도가 증가했을 때, 용출되는 Cu 함량은 박테리아 시료에서 보다 비교시료에서 더 높게 용출되었다. Fe 이온인 경우, 16일 동안 42°C 비교시료에서는 Fe 이온이 용출되지 않았고, 박테리아 시료에서는 0.39 mg/l이 용출되었다. 52°C의 비교시료에서 Fe 이온 함량이 0.2 mg/l로 용출되었으나 박테리아 시료에서는 2.06 mg/l로 용출되어 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 10.3배 이상으로 높게 용출되었다. 박테리아 시료에서 Fe 이온 함량은 42°C에서 보다 52°C에서 5.2배 이상으로 높게 용출되었다. Pb 이온인 경우, 42°C의 비교시료에서 7.8 mg/l로 용출되고 박테리아 시료에서는 87.24 mg/l가 용출되어 비교시료 보다 박테리아 시료에서 약 11배 이상 높게 용출되었다. 52°C의 비교시료에서 Pb 이온 함량은 1.02 mg/l로 용출되었고 박테리아 시료에서는 33.19 mg/l로 용출되었다. 52°C의 Pb 용출 실험에서 비교시료 보다 박테리아 시료에서 32배 이상으로 용출되었다. 그러나 온도 증가에 따른 Pb 용출 효율은 42°C에서 보다 52°C에서 낮게 용출되었다. Zn의 경우, 42°C의 비교시료에서 21.68 mg/l가 용출되었고 박테리아 시료에서 40.77 mg/l가 용출되어 비교시료에서 보다 박테리아 시료에서 1.8배 높게 용출되었다. 52°C에서 비교시료에서 21.33 mg/l가 용출되었고 박테리아 시료에서는 32.31 mg/l로 용출되었다. Zn 이온은 42°C와 52°C의 비교시료에서 용출되는 이온 함량은 거의 차이가 나타나지 않았고, 박테리아 시료에서는 오히려 52°C에서 보다 42°C에서 더 많은 Zn 이온이 용출되었다. Arrhenius 공식에 의하여 온도가 10°C 증가하면 반응이 2배 이상으로 증가한다(Ahonen and Tuovinen, 1989, 1990, 1991). 42°C에서 52°C로 용출온도가 10°C 증가했을 때 방연석으로부터 용출효과가 2배 이상으로 나타나는 이온은 Cu와 Fe 이온이었고, 반대로 용출효율이 감소되는 이온은 Pb 이온이었다. 온도증가에 따른 Zn 이온은 박테리아 시료에서

용출효율이 감소하였다. 이와 같이 온도가 10℃ 증가해도 용출 효율이 증가하지 않는 이유는 Fig. 7에서 관찰되는 2차생성물, Fig. 7에서 관찰되는 육각형 원주 그리고 Fig. 7b에서 관찰되는 침철석 등과 같은 2차 생성물에 의하여 박테리아가 방연석 표면에 직접 접촉하지 못하기 때문으로 해석된다.

섬아연석 시료를 42℃, 52℃온도에서 무기적 및 미생물학적 용출실험을 수행하였을 때, 온도 증가에 따른 용출액 중 유용금속 이온 함량의 변화를 나타내었다(Fig. 13,14,15,16). 비교시료로부터 10일 동안, 42℃에서 순수한 무기적 산화작용으로 용출된 Zn 이온 함량은 43.42 mg/l이고, 52℃에서는 55.94 mg/l 이었다. Zn 이온은 온도가 증가함에 따라 용출되는 함량도 함께 증가하였다. Pb 이온은 42℃에서 5.04 mg/l, 52℃에서는 8.07 mg/l 용출되었다. Pb 이온도 역시 온도가 증가함에 따라 용출되는 함량이 함께 증가하였다. Fe 이온은 42℃, 52℃비교시료에서 전혀 용출되지 않았다. 이는 온도를 증가시켜도 섬아연석 시료로부터 Fe 이온이 무기적 산화작용으로 용출되지 않음을 의미한다. . 42℃의 박테리아 시료에서 Zn 이온이 412.12 mg/l가 용출되어, 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 약 9.5배 이상으로 Zn이 높게 용출되었다. 52℃의 박테리아 시료에서는 Zn 이온이 158.4 mg/l가 용출되어, 비교시료에 비하여 박테리아시료에서 약 2.8배 이상으로 높게 용출되었다. Zn 이온은 비교시료에서 온도가 증가하면 Zn 이온 함량도 함께 증가하였지만, 박테리아 시료에서는 온도의 증가와는 관계 없이 용출되는 것으로 나타났다. Fig. 14는 섬아연석 시료로부터 용출된 Fe 함량을 비교시료와 박테리아시료를 함께 나타냈다. 42℃의 박테리아시료에서는 Fe 이온 함량이 2.04 mg/l가 용출되었고, 52℃의 박테리아시료에서는 13.65 mg/l가 용출되었다. Fe 이온 함량은 박테리아시료에서 온도가 증가하면 Fe 이온도 함께 증가하여 용출되었다. 박테리아 시료에서 42℃에서 보다 52℃에서 Fe 이온이 약 6.7배 이상으로 용출되었다. Fig. 15은 섬아연석 시료로부터 용출되는 Pb 이온 함량을 비교시료와 박테리아시료를 함께 나타냈다. 42℃의 박테리아 시료에서 용출된 Pb 이온 함량은 74.96 mg/l가 용출되었고, 이는 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 약 14.8배 이상으로 Pb가 높게 용출되었다. 52℃의 박테리아 시료에서 용출된 Pb 함량은 59.32 mg/l이었고 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 약 7.4배 이상으로 Pb 이온이 높게 용출되었다.

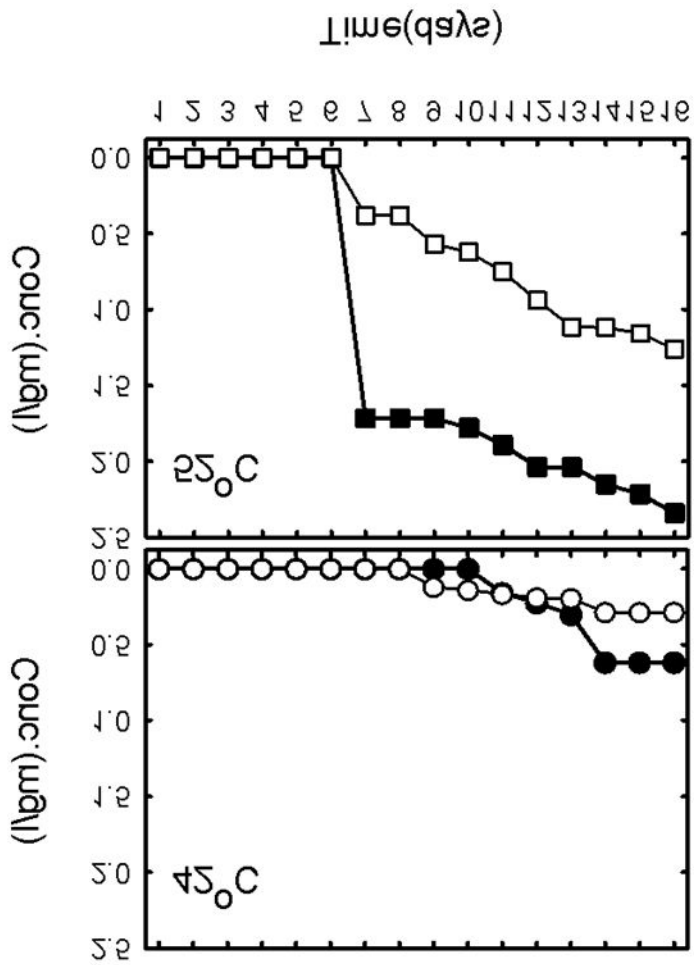


Fig. 9. Changes in the concentration of Cu during the galena bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

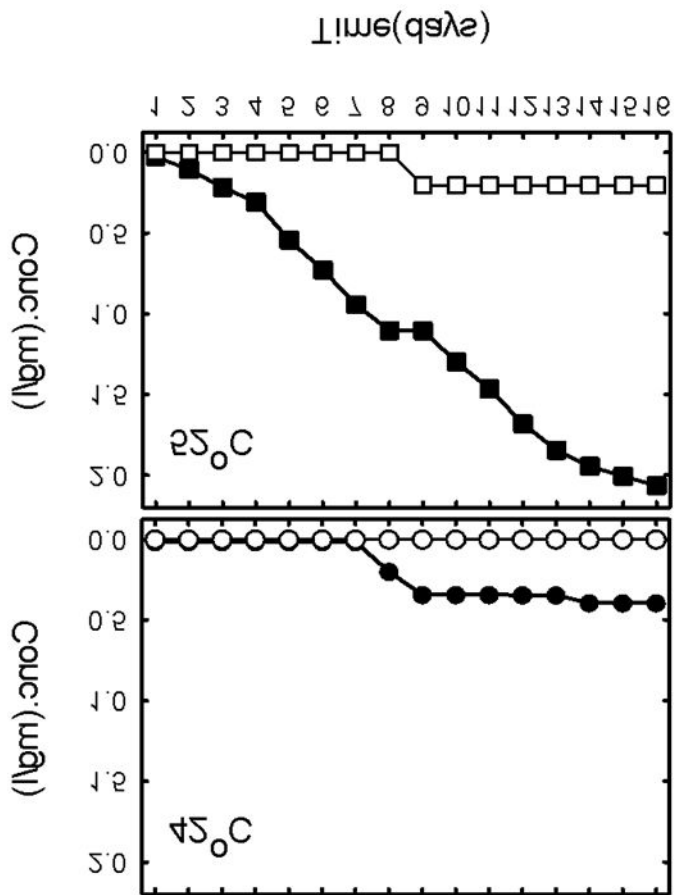


Fig. 10. Changes in the concentration of Fe during the galena bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

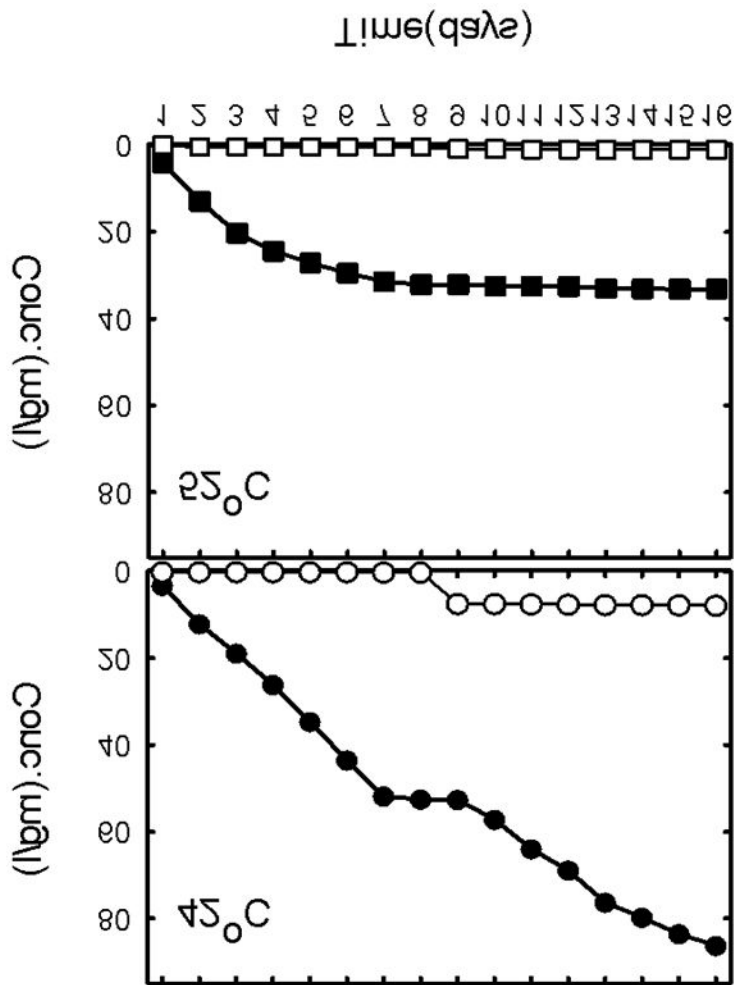


Fig. 11. Changes in the concentration of Pb during the galena bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

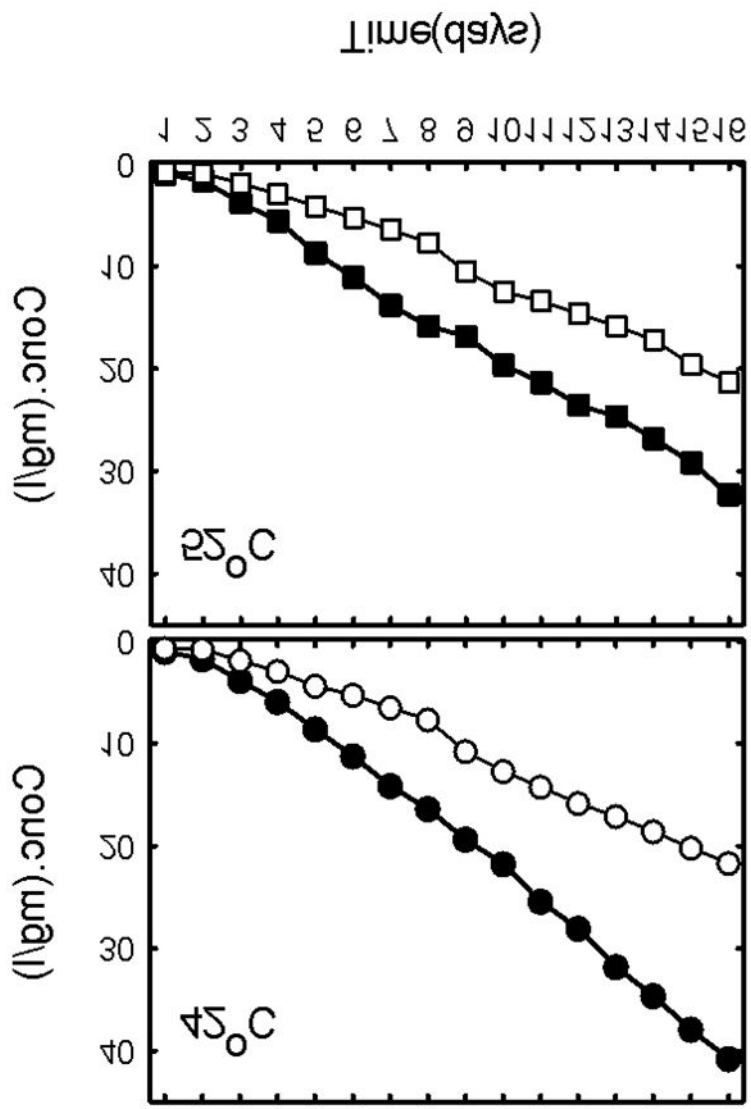


Fig. 12. Changes in the concentration of Zn during the galena bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

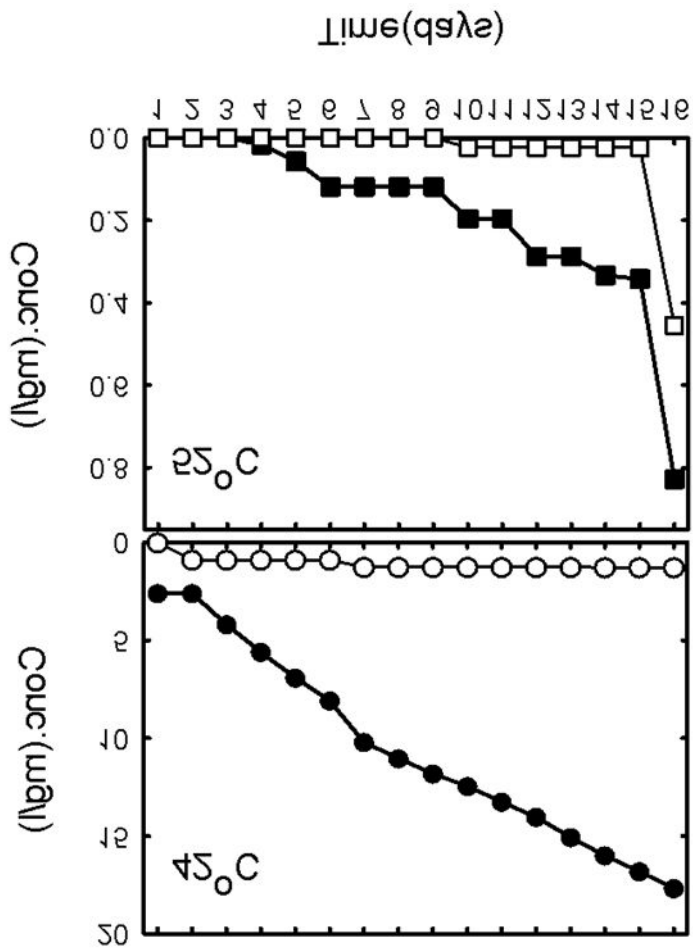


Fig. 13. Changes in the concentration of Cu during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

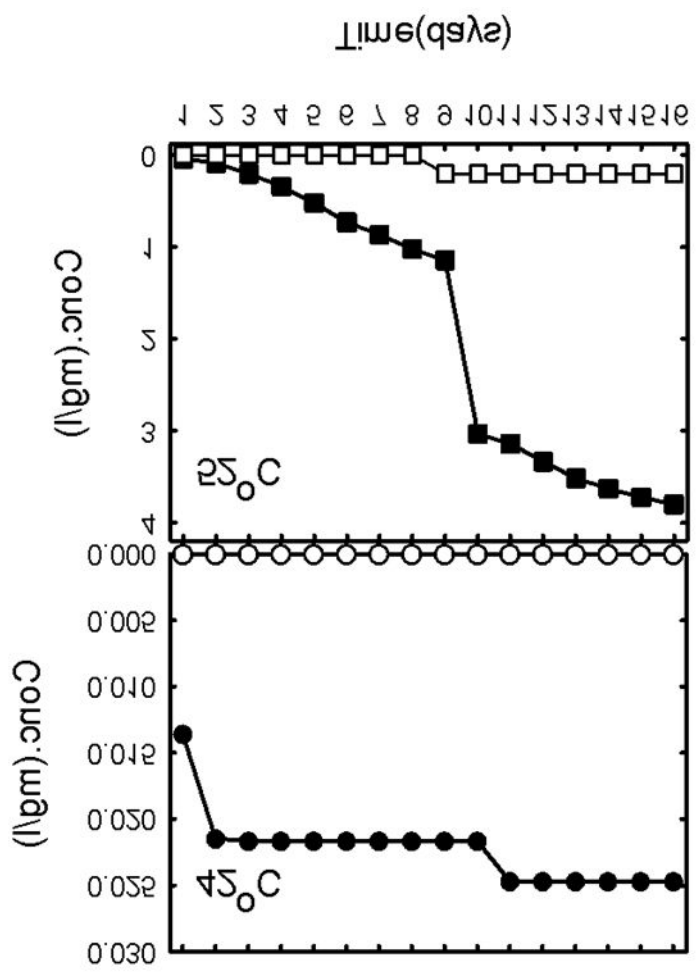


Fig. 14. Changes in the concentration of Fe during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

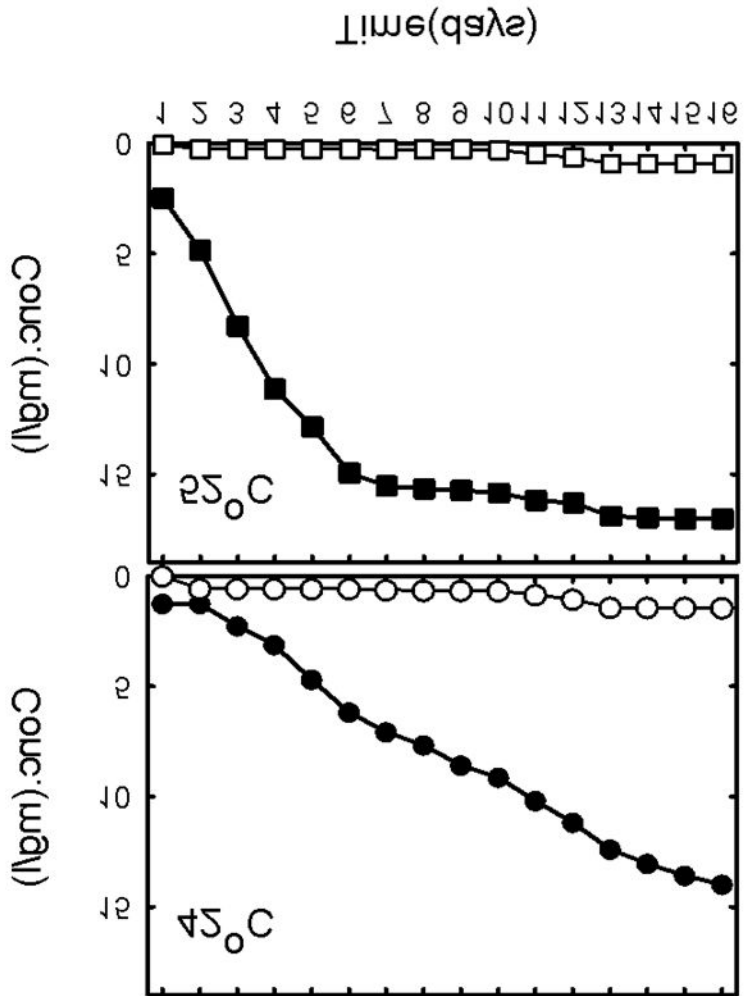


Fig. 15. Changes in the concentration of Pb during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

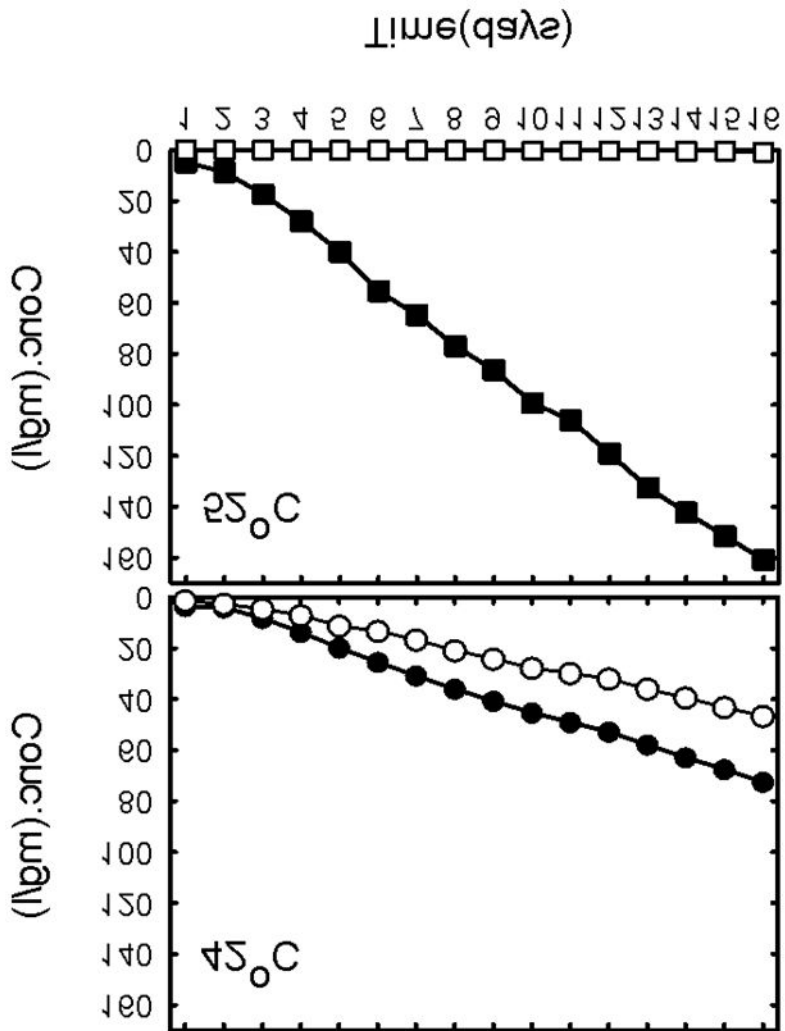


Fig. 16. Changes in the concentration of Zn during the sphalerite bioleaching experiment at 42°C (●; bacteria, ○; control) and 52°C (■; bacteria, □; control).

4.7. 용출에 따른 황화광물의 XRD 변화

42°C, 52°C 온도에서 무기적 및 미생물학적 용출실험을 16일 동안 수행하고 그 잔유물에 대하여 XRD분석을 수행하였다(Fig. 11). X-선 회절선의 강도를 비교하기 위하여 가속전압(40 kV)과 전류(30 mA)를 모두 동일한 조건에서 분석하였으며, 또한 Fig. 11에서 회절선의 상대강도를 비교할 수 있도록 동일한 강도 값(counts/s)을 비교시료와 박테리아 시료에 각각 표시하였다. 방연석, 섬아연석 시료에 대하여 XRD분석한 결과 방연석과 섬아연석의 회절선들이 나타났다. 무기적 산화작용이 진행된 비교시료와 미생물학적 산화작용이 진행된 박테리아 시료를 비교하면, 방연석에 해당되는 회절선 $d_{(200)}2.966\text{\AA}$ 의 강도(intensity)는 42°C, 52°C에서 모두 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 감소하였다. 섬아연석에 해당되는 회절선 $d_{(422)}1.106\text{\AA}$ 의 강도는 42°C와 52°C에서 모두 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 증가하였고, $d_{(220)}1.918\text{\AA}$ 과 $d_{(331)}1.243\text{\AA}$ 의 회절선 강도는 52°C에서 증가하였다. 이들 특정 회절선들의 강도가 상대적으로 감소하거나 증가하는 원인은 섬아연석의 방연석 혹은 섬아연석의 특정 결정면들이 무기적 혹은 미생물학적 용해작용에 따라 저항이 크거나 약하기 때문에 일어나는 현상으로 사료된다. 즉 광석광물 입자가 무기적 혹은 미생물학적 산화작용을 받으면 광물입자의 표면부터 용해된다. 광물의 표면이 용해되면 광물입자의 직경이 감소하고 결과적으로 표면적이 증가된다. 이와 같이 용해작용이 진행되어 황화광물 입자의 직경이 감소된다는 모델이 shrinkage core 모델(Chaudhury et al., 1985) 혹은 shrinkage particle 모델(Blancarte-Zurita et al., 1986)이다. 그러나 용액 속에서 광물 표면이 무기 혹은 미생물학적 산화작용으로 용해될 때, 모든 결정면이 균일하게 용해되지 않고 선택적으로 용해가 일어난다. 예를 들면, 황철석의 결정면 중 S와 Fe 결합이 약하게 결합하여 전위선(dislocations)이나 stacking faults가 존재하기 때문이다(Martello et al., 1994). 다시 말해, 결정화가 미약한 결정면, 즉 광물학적 결함(imperfection)이 존재하는 결정면은 결정화가 잘 이루어진 결정면 보다 용해가 잘 일어난다(Rojas-Chapana and Tributsch, 2004). 특히 박테리아는 결정화가 미약한 결정면에 선택적으로 더 많이 부착하게 되고 결과적으로 그 결정면을 더 많이 용해된다(Murr and Berry, 1976; Ohmura et al., 1993) 왜냐하면, 결정화가 미약한 결정면은 결정화가 잘 이루어진 결정면에 비하여 쉽게 산화작용이 일어나고, 더 많은 산화에너지가 발생하기 때문에 박테리아가 그 결정면에 선택적으로 더 많이 부착하게 된다(Solari et al., 1992). 따라서 결정화가 미약한 결정면은 더 많이 용해되어 그 결정면의 빈도수가 감소되고

반대로 결정화가 잘 이루어진 결정면은 용해작용에 저항성이 강해 결정면의 빈도수 분포가 상대적으로 증가하게 될 것이다. 무질서하게 분포하고 있는 섬아연석 결정 입자들 사이로 x-선 빔이 입사되어 회절이 일어나기 위해서는 Bragg 방정식의 λ 와 d 가 충족되어야 한다. Copper target의 $\lambda(1.5406\text{\AA})$ 가 고정되어 있기 때문에 회절선의 강도(intensity)는 결정면의 d 빈도수에 영향을 받게 된다. 무기 혹은 미생물학적 용해작용에 의하여 결정면의 빈도수 분포가 많아진 결정면은 보강간섭에 의하여 회절강도가 증가하게 되고 반대로 빈도수 분포가 감소한 결정면은 회절선의 강도가 감소하게 될 것이다.

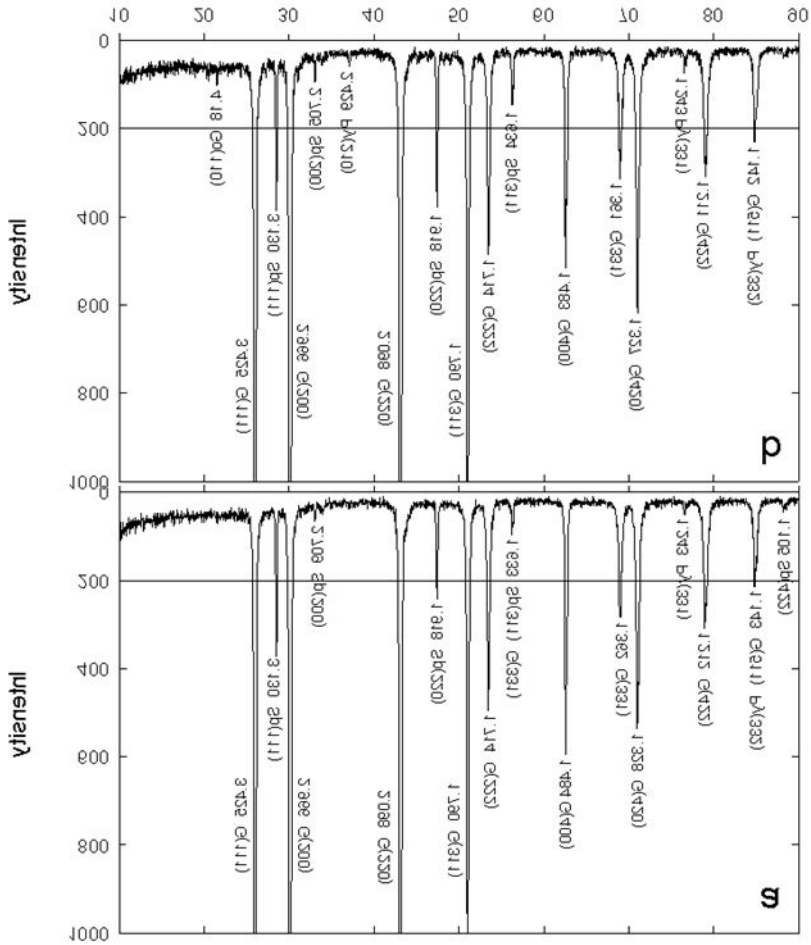


Fig. 17. X-ray diffraction patterns from galena leach residue after 16 days of contact with chemical control solution(a) and after 16 days of leaching in indigenous bacteria cultures solution at 42°C. Diagnostic XRD lines for galena, goethite, pyrite and sphalerite are designated with G, Go, Py and Sp, respectively. Miller indices and d values are given for each x-ray lines. Line spacings are given in Angstroms.

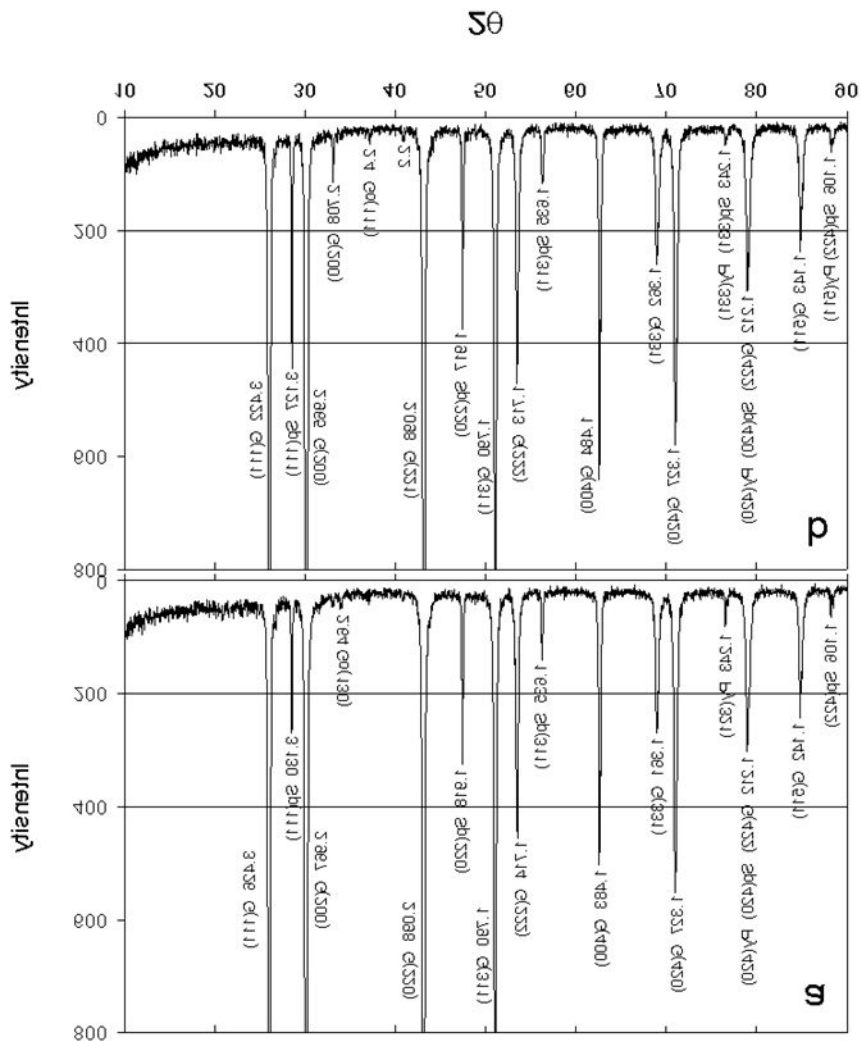


Fig. 18. X-ray diffraction patterns from galena leach residue after 16 days of contact with chemical control solution(a) and after 16 days of leaching in indigenous bacteria cultures solution at 52°C. Diagnostic XRD lines for galena, pyrite and sphalerite are designated with G, Py and Sp, respectively. Miller indices and d values are given for each x-ray lines. Line spacings are given in Angstroms.

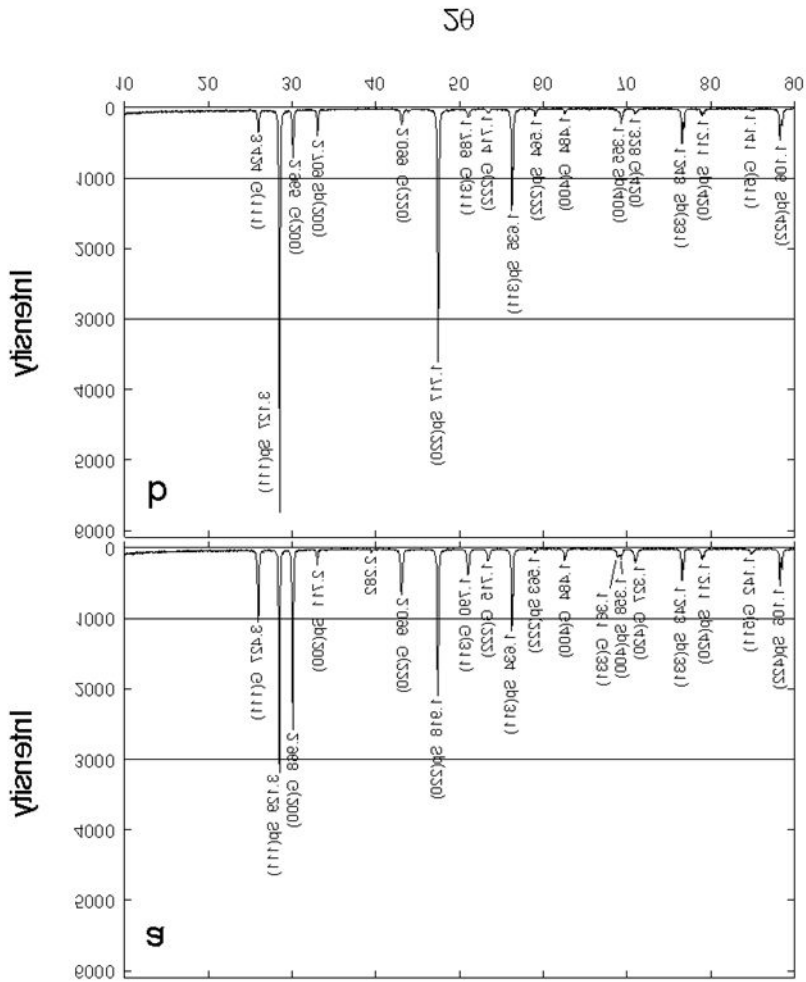


Fig. 19. X-ray diffraction patterns of sphalerite. The control and bacteria samples were analysed the XRD analysis after 16 days of leaching experiment at 42°C respectively(G; galena, S; sphalerite).

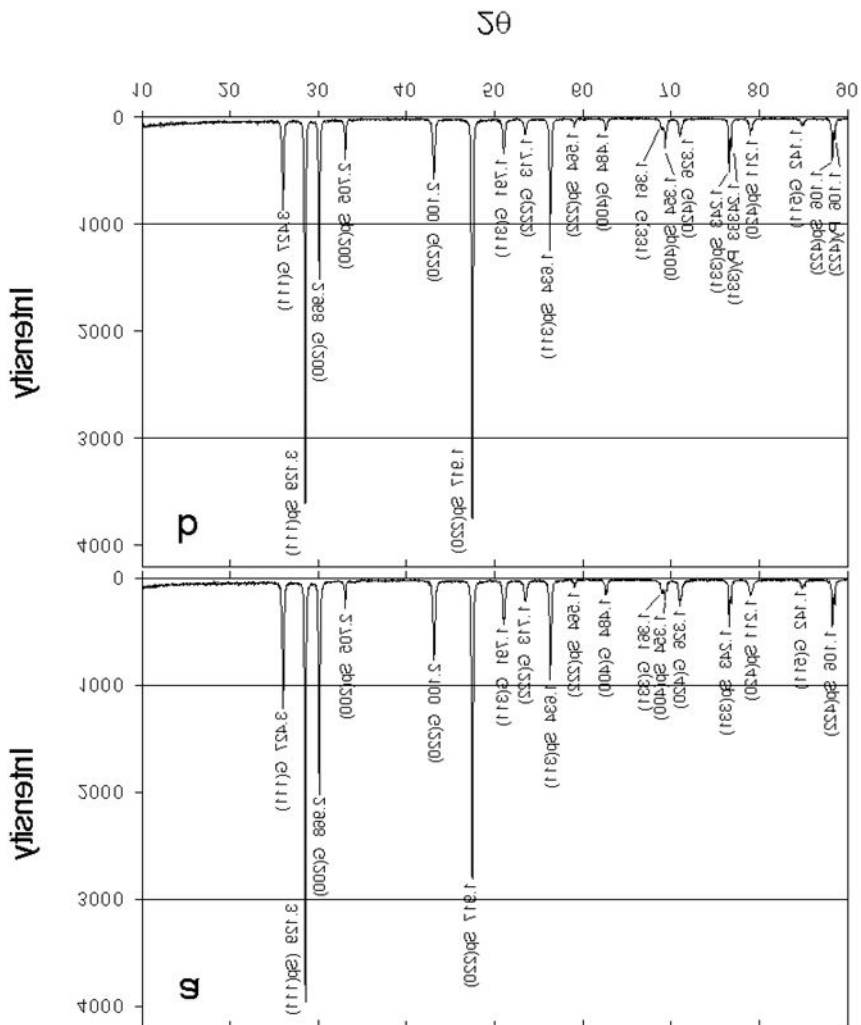


Fig. 20. X-ray diffraction patterns of sphalerite. The control and bacteria samples were analysed the XRD analysis after 16 days of leaching experiment at 52°C respectively (G; galena, S; sphalerite).

5. 토 의

용출실험이 진행되면서 유용금속이온이 용출되면서도 pH 변화가 잘 나타나지 않고 있다(Fig.1,2). 용출실험이 진행되는 16일 동안 용출액의 pH가 7일 이후부터 증가하였다. pH의 증가원인은 다음과 같은 요인에 의한 것으로 해석된다. 용출액 속에 포함되어 있는 황화광물이 화학적으로 산화되어 용출액의 수소이온이 소비되는데, 산소는 황화광물과 무기적으로 산화되어 물로 환원되고 동시에 수소이온이 소비된다. 그리고 적응실험을 하지 않은 박테리아를 사용하였기에 pH가 감소하지 못한 것으로 사료된다. 그리고 정지전압 차이가 나타나는 황화광물들이 용출액에 혼합되어 있을 때 갈바니 반응(galvanic interaction)이 일어난다. 이때 양극반응에서 수소이온이 소비되고, 동시에 음극반응이 일어나는 황화광물에서는 산소가 물로 환원되면서 역시 수소이온이 소비되기 때문이다. 본 섬아연석 시료에도 섬아연석과 황철석이 포함되어 있어서 갈바니 반응이 일어났을 것이다. 또한 박테리아들이 황화광물의 선택적으로 부착하였다. 이 결과로 미생물학적 산화작용이 매우 활발하게 일어났다고 볼 수 있다. 이는 황산을 첨가하고 공기를 투입하여 박테리아의 활동도를 높여준다면 더욱더 많은 유용금속이온이 회수될 수 있을 것으로 생각되어진다.

6. 결 론

고온성토착박테리아를 이용하여 42℃와 52℃에서 방연석과 섬아연석으로부터 유용금속이온을 용출실험을 수행하였다. 42℃에서 방연석 표면에 부착한 토착박테리아들의 크기는 0.4×1.3 μm에서 0.4×1.9 μm 범위로 나타났고, 52℃에서는 0.5×1 μm에서 0.5×1.6 μm 범위로 나타났다. 방연석 입자를 피복하고 있는 세포외중합체물질에 대하여 EDS분석을 실시한 결과 Mg, Al, Si, P, S, K 및 Pb 등이 검출되었다. 무수히 많은 육각형의 원주 결정들이 방연석 입자 표면에 형성되었다. 육각형의 원주 결정들은 방연석의 용해작용에 의하여 2차적으로 생성된 것으로 사료된다. 육각형 원주 표면에 무수히 많은 토착박테리아가 부착되었고, 수많은 토착박테리아가 기질물질 표면에 직접 접촉하여 산화작용을 일으키는 것을 확인하였다. 토착박테리아들에 의해 산화작용이 진행되어 기질물질 표면에는 부식적 층식 자국들이 형성되고 있었다. 이와 같이 박테리아에 의한 층식작용은 직접접촉산화작용의 메카니즘이 미생물용출실험에서 확실하게 진행되고 있음을 확인하는 증거가 된다. 유용금속이온의 용출을 향상시키기 위하여 고온성토착박테리아를 방연석에 접종하고 42℃와 52℃에서 각각 용출실험을 수행하였다. 고온성토착박테리아를 방연석에 접종하고 황산을 첨가하지 않았기 때문에 방연석으로부터 용출되는 유용금속 이온은 모두 순수하게 박테리아에 의한 용출로 설명할 수 있다. 42℃와 52℃ 미생물 용출실험에서 온도가 10℃ 증가하면 유용금속 이온 용출이 2배 이상으로 기대되었다. 42℃에서 52℃로 용출온도가 10℃ 증가했을 때 방연석으로부터 용출효과가 2배 이상으로 나타나는 이온은 Cu와 Fe 이온이었고, 반대로 용출효율이 감소되는 이온은 Pb 이온이었다. 온도가 10℃ 증가해도 용출 효율이 증가하지 않는 이유는 K와 S를 함유하는 구형의 2차 생성물들, 육각형 원주 그리고 침철석 등과 같은 2차 생성물이 형성되어 박테리아가 방연석 표면에 직접 접촉하는 것을 방해하기 때문으로 해석된다.

또한 42℃, 52℃의 비교적 높은 용출 온도임에도 불구하고 섬아연석 표면에 막대모양의 박테리아들이 부착하여 생존하고 있는 것이 확인되었다. 이는 고온성 박테리아를 황화광물에 이용할 수 있음을 지시하는 것이다. 비교시료에서 용출온도를 42℃, 52℃로 증가시켰을 때 함량이 증가하여 용출되는 이온은 Zn과 Pb이었다. 이는 무기적 산화작용에 의하여 Zn과 Pb가 용출되고 이들 이온은 온도효과에 영향을 받는 것이 확인되었다. 42℃, 52℃의 용출온도에서, Zn은 비교시료에 비하여 박테리아 시료에서 각각 약 9.5배, 2.8배 이상으로 높게 용출되었다. 이와 같은 용출온도에서 Pb는 비교시료 보다 박테리아 시료에서 각각 약 14.8배, 7.4배 이상으로 높게 용출되었다. 고온성 박테리아의 최적 용출 온도와 최적 pH 조건 등, 현장 적용에 필요한 최적 인자들을 앞으로 더 연구되어야 할 부분으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 박천영, 김순오, 김봉주, 2010, "42℃에서 토착호산성박테리아의 황철석 표면에 대한 선택적 부착과 용출 특성," *자원환경지질*, 제43권 2호, pp.109-121.
- 박천영, 윤정환, 박영석, 1989, "광양금은광상의 성인에 관한 연구," *한국자원공학회지*, 제26권 제 4호, pp. 249-263.
- 박천영, 정경훈, 김계민, 홍영의, 조강희, 2009, "화순 광산배수에 서식하는 토착 호산성 박테리아를 이용한 황철석의 용출 특성," *한국지구시스템공학회지*, 제46권 제2호, pp.521-535.
- 박천영, 조강희, 2010, "토착호산성박테리아의 황철석 표면 부착과 용출 특성," *한국지구시스템공학회지*, 제47권 제1호, pp.51-60.
- Ahonen, L. and Tuovinen, O.H., 1989, "Microbiology oxidation of ferrous iron at low temperatures," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.55, pp.312-316.
- Ahonen, L. and Tuovinen, O.H., 1990, "Kinetics of sulfur oxidation at suboptimal temperature," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.56, pp.560-562.
- Ahonen, L. and Tuovinen, O.H., 1991, "Temperature effects on bacterial leaching of sulfide minerals in shake flask experiments," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.57, pp.138-145.
- Attia, Y.A. and El-Zeky, M., 1990, "Effects of galvanic interactions of sulfides on extraction of precious metals from refractory complex sulfides by bioleaching," *International Journal of Mineral Processing*, Vol.30, pp.99-111.
- Bang, S.S., Deshpande, S.S. and Han, K.N., 1995, "The oxidation of galena using *Thiobacillus ferrooxidans*," *Hydrometallurgy*, Vol.37, pp.181-192.
- Bhatti, T.M., Bigham, J.M., Carlson, L. and Tuovinen, O.H., 1993, "Mineral products of pyrrhotite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.59, pp.1984-1990.
- Boon, M., 2001, "The mechanism of 'direct' and 'indirect' bacterial oxidation of sulfide minerals," *Hydrometallurgy*, Vol.62, pp.67-70.
- Brierley, C.L., 1978a, "Bacterial leaching," *Critical Reviews in Microbiology*, Vol.6, pp.207-262.
- Brierley, C.L., 1982, "Microbiological mining," *Scientific American*, Vol.247, pp.42-51.
- Brierley, J.A. and Brierley, C.L., 2001, "Present and future commercial applications of biohydrometallurgy," *Hydrometallurgy*, Vol.59, pp.233-239.

- Brierley, J.A., 1978b, "Thermophilic iron-oxidising bacteria found in copper leaching dumps," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.36, pp.523-525.
- Brierley, J.A., 2003, "Response of microbial systems to thermal stress in heap-biooxidation pretreatment of refractory gold ores," *Hydrometallurgy*, Vol.71, pp.13-19.
- Brock, T.D., 1986, "Introduction: an overview of the thermophiles," In Brock, T.D.(eds), *Thermophiles*, John Wiley & Sons, pp.1-16.
- Bruynesteyn, A. and Duncan, D.W., 1971, "Microbiological leaching of sulfide minerals," *Canadian Metallurgical Quarterly*, Vol.10, pp.57-63.
- Da Silva, G., 2004, "Kinetics and mechanism of the bacterial and ferric sulphate oxidation of galena," *Hydrometallurgy*, Vol.75, pp.99-110.
- Da Silva, G., Lastra, M.R. and Budden, J.R., 2003, "Electrochemical passivation of sphalerite during bacterial oxidation in the presence of galena," *Mineral Engineering*, Vol.16, pp.199-203.
- Dave, S.R., Natarajan, K.A. and Bhat, J.V., 1979, "Biooxidation studies with *T. ferrooxidans* in the presence of copper and zinc." *Trans. Inst. Min. Metall.*, Vol.88, pp.C234-C237.
- Escobar, B., Huerta, G. and Rubio, J., 1997, "Short communication: influence of LPS on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals," *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol.13, pp.593-594.
- Fletcher, A.W., 1970, "Metal winning from low-grade ore by bacterial leaching," *Trans. Inst. Min. Metall.*, Vol.79, pp.C247-C252.
- Garcia, O. Jr., Bigham, J.M. and Tuovinen, O.H., 1995b, "Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*," *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.41, pp.578-584.
- Garcia, O., Jr. Bigham, J.M. and Tuovinen, O.H., 1995a, "Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*," *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.41, pp.508-514.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. and Sand, W., 1998, "Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.64, pp.2743-2747.
- Grishin, S.I., Bigham, J.M. and Tuovinen, O.H., 1988, "Characterization of jarosite formed upon bacterial oxidation of ferrous sulfate in a packed-bed reactor," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.54, pp.3101-3106.

- Harden, V.P. and Harris, J.O., 1953, "The isoelectric point of bacterial cells," *J. Bacterial.*, Vol.65, pp.198-202.
- Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J. and Sand, W., 2003, "Bioleaching - a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances(EPS)," *Hydrometallurgy*, Vol.71, pp.83-88.
- Konhauser, K., 2007, *Introduction to geomicrobiology*, Blackwell Publishing, 425p.
- Lottermoser, B., 2007, *Mine wastes*, Springer, 304p.
- Malouf, E.E. and Prater, J.D., 1961, "Role of bacteria in the alteration of sulfide minerals," *Journal of Metals*, Vol.13, pp.353-356.
- Marsden, J. and House, I., 1992, *The chemistry of gold extraction*, Ellis Horwood, 597p.
- Marshall, K.C., 1976, *Interface in microbial ecology*, Harvard University Press, London, pp.27-52.
- Poliani, C. and Donati, E., 1999, "The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol.22, pp.88-92.
- Rodriguez-Leiva, M. and Tributsch, H., 1988, "Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite," *Archives of Microbiology*, Vol.149, pp. 401-405.
- Rodriguez-Leiva, M. and Tributsch, H., 1988, "Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite," *Archives of Microbiology*, Vol.149, pp. 401-405.
- Rojas-Chapana, J.A., Giersig, M. and Tributsch, H., 1995, "Sulfur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation," *Archives of Microbiology*, Vol.163, pp.352-356.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R. and, A., 1995, "Sulfur chemistry, biofilm, and the(in)direct attack mechanism-a critical evaluation of bacterial leaching," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.43, pp. 961-966.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G. and Schippers, A., 2001, "(Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs indirect bioleaching," *Hydrometallurgy*, Vol.59, pp.159-175.
- Santhiya, D., Subramanian, S. and Natarajan, K.A., 2001, "Bio-modulation of galena and sphalerite surface using *Thiobacillus thiooxidans*," *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 62, pp.121-141.

- Schippers, A, and Sand, W., 1999, "Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two in direct mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp.319-321.
- Schippers, A., 2007, "Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification," In Donati, E. R. and Sand, W.(eds), Springer, pp.3-33.
- Silverman, M. P., 1967, "Mechanism of bacteria pyrite oxidation," *Journal of Bacteriology*, Vol. 94, pp. 1046-1051.
- Silverman, M.P. and Ehrlich, H.L., 1964, "Microbial formation and degradation of minerals," *Advan. Appl. Microbiol.*, Vol.6, pp.153-206.
- Torma, A.E. and Habashi, F., 1972, "Oxidation of copper(II) selenide by *Thiobacillus ferrooxidans*," *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.18, pp.1780-1781.
- Torma, A.E., 1977, "The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical process," *Adv. Biochem. Eng.*, Vol.6, pp.1-37.
- Tributsch, H., 2001, "Direct versus indirect bioleaching," *Hydrometallurgy*, Vol.59, pp.177-185.
- Tuovinen, O.H., Bhatti, T.M., Bigham, J.M., Hallberg, K.B., Garcia, Jr., O. and Lindstrom, E.B., 1994, "Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.60, pp.3268-3274.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R. and Korber, D.R., 1999, "Functions of EPS," In Jost, W.(eds), *Microbial extracellular polymeric substance: characterization, structure, and functions* Springer, pp.171-200.
- Yelloji Rao, M.K., Natarajan, K.A. and Somasundaran, P., 1992, "Effect of biotreatment with *Thiobacillus ferrooxidans* on the floatability of sphalerite and galena," *Mineral & Metallurgical Processing*, Vol.9, pp.95-100.
- Yu, J. Y., McGenity, T. J. and Coleman, M. L., 2001, "Solution chemistry during the lag phase and exponential phase of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*," *Chemical Geology*, Vol.175, pp.307-317.

