2011年 8月
석사학위논문

토착호산성박테리아의 황철석 표면 부착과 용출특성

조선대학교 대학원
에너지자원공학과
조 강 희

[UCI]I804:24011-200000242096

토착호산성박테리아의 황철석 표면 부착과 용출특성

The characteristics of attachment and bioleaching for pyrite surface by indigenous acidophilic bacteria

2011 년 8 월 25 일

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

조 강 희

토착호산성박테리아의 황철석 표면 부착과 용출특성

지도교수 박 천 영

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함.

2011 년 4 월

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

조 강 희

조강희의 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

1. 서론 ····· 1
2. 박테리아 시료 및 실험방법 ····· 4
2-1. 토착박테리아 채취 ····· 4
2-2. 성장-배양액 조성 ····· 4
2-3. 계대배양 ····· 5
2-4. 황철석-용출 배양액 조성 ····· 7
2-5. 박테리아계수 및 분석 ····· 8
2-6. 황철석 시료 ····· 9
2-7. 분석기기 ····· 9
3. 결과 및 고찰 ····· 12
3-1. 성장-배양액에서 pH 및 Eh 변화 ····· 12
3-2. 성장-배양액에서 박테리아 개체수 변화 ····· 15
3-3. 황철석 표면특성 ····· 17
3-4. 세포외중합체물질 ····· 23
3-5. 박테리아 부착 특성 ····· 27
3-6. 황철석 표면의 부식공동 특성 ····· 32
3-7. 황철석 용출 특성 ····· 35
4. 토 의 ····· 40
5. 결 론 ····· 41
참 고 문 헌 ····· 42

List of Figures

Fig. 2-1. Polarization microscope (magnification ×300) analysis image of pyrite sample. ····· 10
Fig. 2-2. X-ray diffraction patterns of pyrite : A; pyrite(raw sample), B; after 71 days of control sample, C; after 71 days of bioleaching sample. ····· 11
Fig. 3-1. The variation of pH and Eh vs time(days) in the growth-medium. ····· 14
Fig. 3-2. The variation of bacterial population vs time(days) in the growth-medium. ····· 16
Fig. 3-3. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface. . ··· 21
Fig. 3-4. SEM images of corrosion cavitys on the pyrite surface. ····· 22
Fig. 3-5. SEM images of extracellular polymeric substance(EPS) and indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(17 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). ····· 25
Fig. 3-6. SEM images of extracellular polymeric substance(EPS) on the pyrite surface(61 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). ····· 26
Fig. 3-7. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(8 days after inoculation with bacteria at pulp density 16%, pH=3.21). ····· 29
Fig. 3-8. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(61 days after inoculation with bacteria at pulp density 16%). ····· 30
Fig. 3-9. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(113 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). ····· 31
Fig. 3-10. SEM images of corrosion cavity on the pyrite surface. ····· 34
Fig. 3-11. The variation of pH and Eh vs time(days) in the pyrite-leaching medium. ····· 38
Fig. 3-12. Variation for concentration of zinc with time(days) in pyrite-leaching medium. ····· 39

List of Table

Table. 1. The subculture for indigenous acidophilic bacteria in the growth-medium at 32℃ ····· 6

Abstract

The characteristics of attachment and bioleaching for pyrite surface by indigenous acidophilic bacteria

By Cho, Kang Hee
Adv. Prof. : Park, Cheon Young, Ph.D.
Dept. of Energy Resource Engineering
Graduate School of Chosun University

This study is to investigate the bioleaching of pyrite using indigenous acidophilic bacteria from the acid mine drainage. SEM was used to identify the morphology of the indigenous acidophilic bacteria and the corroded pyrite surface. When the indigenous bacteria oxidized the pyrite, the extracellular polymeric substance(EPS) was formed and coated surface of pyrite grain. The formation of the EPS was probably secreted by the indigenous bacteria and the EPS contributed to the bio-film function. In the EDS analysis, the elements C, O, P, S, K and Fe were detected in the EPS. Numerous indigenous bacteria of which size range between 1.19 to 1.42 ㎛ were attached along the cracks on the pyrite surface. These bacteria are able to actively select the sites from which is most ease to gain energy through oxidation. On the pyrite-leaching medium, the pH values were higher in the bacterial sample than the control sample, whereas the Eh values were lower in the bacteria sample than in the control sample. Because the indigenous acidophilic bacteria were capable of bioleaching the pyrite. The Zn content in the pyrite-leaching medium decreased with an increase in the pulp density.

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 유용금속을 경제적이고 환경 친화적으로 회수할 수 있는 생물학적 용출 공정이 개발되어 일부 몇몇 나라에서는 상용화 되고 있다. 이와 같이 광물을 박테리아에 반응시켜 유용금속이온을 용출시켜 회수하는 것이 bioleaching이다. Bioleaching을 실시하여 저품위 광석 및 폐석으로부터 유용금속이온을 용출시켜 회수하고자 하는 요구가 증가하고 있다. 이는 과거부터 계속된 광산개발로 인하여 고품위 광석의 자원이 고갈되고 있으며 고품위광석을 찾기 위해서 지하 심부로 굴진하기 때문에 막대한 경비가 필요하게 되었다. 고품위광석을 채광하는 과정에서 생성되는 저품위광석이 광산폐석장에 계속하여 적치되어 인근 환경이 심각하게 오염되고 있다. 또한 고품위광석을 회수하고 남은 광석찌꺼기인 광미로부터 발생하는 토양오염과 산성광산배수 문제가 광산활동의 제약요인으로 작용하고 있다(Brierley, 1978, 1982; Brierley and Brierley, 2001).

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).

미생물체가 황화광물을 분해시킬 때 온도, pH, 광액농도, 황화광물 입자 크기 및 표면적 및 배양액 농도 등 다양한 인자에 의하며 영향을 받는다(Torma et al., 1970). 이중 광액농도에 따라 황화광물로부터 방출되는 유용금속의 양이 달라진다. 광액농도가 낮은 경우, 광액농도와 방출되는 유용금속 양은 비례한다. 하지만 광액농도가 높은 경우, 용출되는 유용금속의 양은 광액농도와 비례하지 않고 오히려 감소한다. 광액농도가 높으면 박테리아가 대사 작용에 필요한 O_2와 CO_2와 같은 가스

이동이 제한을 받기 때문에 방출되는 유용금속의 양이 감소하게 된다(Torma et al., 1970).

박테리아에 의해서 황화광물이 용해되는 메카니즘은 직접방법(direct mechanism)과 간접방법(indirect mechanism)이 잘 알려져 있다(Silverman, 1967; Sand et al., 1995; Schippers and Sand, 1999; 김동진 등, 2003). 간접방법은 박테리아에 의해 생성된 ferric sulfate($Fe_2(SO_4)_3$)가 황화광물을 화학적으로 용해시키는 방법이다(유경근 등, 2008). 이 간접방법은 박테리아가 황화광물 표면에 부착할 필요가 없다. 그러나 직접방법은 박테리아가 황화광물 표면에 직접 접촉하여 효소적 으로 공격하여 황화광물을 용해시키는 방법이다. 그렇기 때문에 이 직접방법은 박테리아가 황화광물 표면에 직접 접촉해야 한다. 박테리아가 황화광물 표면에 직접 부착하는데 영향을 미치는 인자들은 황화광물의 표면 특성인 결정화학적 특성, 표면전하, 수용액과 고체 경계면에 발생하는 친수성 및 소수성의 특성은 물론 배양액의 pH 조건, 박테리아 세포 표면 특성 등이 있다.

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), 부식장소(pits) 및 표면단층(surface fault) 등이라는 것이 규명되었다(Berry and Murr, 1978; Bennett and Tributsch, 1978; Edwards et al., 2001).

따라서 저품위 광석이나 폐석으로부터 유용금속을 회수하기 위해서 또는 폐석이나 광미로부터 생성되는 산성광산배수를 통제하기 위해서는 우리나라 토착 환경에 적응된 박테리아를 황화광물에 접종시켜 황화광물의 표면 변화나 산화과정을 상세

히 연구해야할 필요가 있다. 우라나라에서 박테리아를 이용한 황철석 산화작용에 관한 연구들(오종기 등, 1999; 임명훈 등, 1999; 이인화와 박천영, 2001, 이인화 등, 2000; 이동진 등, 2003; 박천영 등 1997; 기민희 등, 1998)이 수행되어 왔으나, 이들 연구들은 상업적으로 분양받은 박테리아를 이용하였으며, 황철석으로부터 용출된 금속이온 함량의 증가변화에 초점을 맞추어 진행되었을 뿐, 박테리아가 황철석 표면에 물리적으로 접촉 부착하여 직접적인 산화작용(direct attack mechanism)을 수행하는 과정을 제시하지 못하였다.

따라서 본 연구의 목적은 계대배양에서 일어나는 pH, Eh 및 개체수 변화를 조사하고, 토착박테리아를 황철석에 반응시켜 광액농도 변화에 따른 용출되는 금속 함량 변화를 파악하고자 하였다. 또한 황철석 표면에 형성된 육각형 공동, 파단면에 부착하는 토착박테리아의 특성, 그리고 박테리아가 분비하여 형성된 세포외중합체 물질(extrcellular polymer substance, EPS)의 특성을 고찰하고자하였다.

2. 박테리아 시료 및 실험방법

2-1. 토착박테리아 채취

박테리아는 전남 화순군 한천면 오음리 한천폐탄광의 광산배수에 서식하는 토착 호산성 박테리아를 채취하였다. 광산배수 10ml를 채취하여 150 ml의 성장-배양액에 접종하여 32℃의 항온 배양기에서 토착 호산성 박테리아를 성장시켰다. 성장-배양액에 성장하는 토착 박테리아를 약 21일 주기로 새로운 성장-배양액으로 옮겨 배양하는 계대배양을 계속 실시하였다. 본 실험에 이용한 박테리아는 5번 계대 배양한 박테리아로서 성장-배양액(growth-medium)과 황철석-용출 배양액(pyrite-leaching medium)에 사용하였다.

2-2. 성장-배양액 조성

토착 박테리아가 배양될 성장-배양액(growth-medium) 조성은 basal salt와 energy source로 구성하였다. 성장-배양액의 mineral salts medium(MSM)은 $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $CaCl_2$ 0.25 g/L 및 KH_2PO_4 3.0 g/L 에 용해시켰다. 에너지원(energy source)은 원소 황(elemental sulfur) 1.0 g/L과 $FeSO_4$ 5.0 mg/L을 함께 사용하였다. 토착박테리아를 접종하기 전 성장-배양액은 멸균기(SW-90AV100)에서 121℃, 1기압으로 15분간 고압 멸균하였다. 황철석, 500 ml 삼각플라스크, 기타 실험기구들을 멸균기(SW-90AV100)에서 121℃, 1기압으로 15분간 고압 멸균하였다. 4번째로 계대 배양된 토착박테리아의 성장-배양액 10 ml을 채취하여 150 ml의 성장-배양액에 각각 접종하고 32℃의 배양기(HB-201SFO)에서 교반 없이 배양하였다.

2-3. 계대배양

화순 토착박테리아를 성장-배양액에서 32℃로 성장시켰다. 이 토착박테리아는 성장-배양액에 포함된 무기성분인 N, P, Mg 및 Ca 성분을 이용하고, 에너지원인 원소 황과 Fe^{+2} 이온의 산화에너지를 이용하여 성장한다. 박테리아가 성장함에 따라 성장-배양액 속의 박테리아는 적응기, 지수 성장기, 정체기 그리고 사멸기를 거쳐 사멸한다. 이와 같이 박테리아들이 사멸하는 원인은 성장-배양액 속에 포함된 영양성분의 고갈로 인하여 그리고 박테리아들에 의하여 생성된 노폐물의 축적에 의해서 일어난다. 그러므로 박테리아를 계속하여 성장시키려면 박테리아들에게 새로운 영양성분을 제공하고 노폐물을 제거해줘야 한다. 즉 박테리아를 새로운 성장-배양액에 옮겨 성장-배양하는 것을 계대배양이라 한다. 21일간 박테리아가 배양된 성장-배양액 10 ml를 채취하여 새로운 성장-배양액에 접종하고 32℃로 유지시켰다. 이와같이 박테리아를 계속하여 성장-배양하는 계대배양을 21일 주기로 실시하였다.

Table. 1. The subculture for indigenous acidophilic bacteria in the growth-medium at 32℃

Subculture	1		2		3		4		5	
Name	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)
Hwasun AMD	1.87	501	2.03	520	2.04	486	2.02	492	2.04	296

2-4. 황철석-용출 배양액 조성

토착박테리아들이 황철석을 산화시켜 금속이온들을 용출시키는 과정을 파악하기 위하여 황철석이 포함된 배양액을 만들었다. 토착호산성박테리아를 이용하여 황철석으로부터 용출을 유도하는 배양액을 황철석-용출 배양액(pyrite-leaching medium)으로 정의하였으며, 황철석-용출 배양액은 Mineral salt medium과 energy source로 구성하였다. Mineral salts medium(MSM)은 성장-배양액에서 사용했던 조성과 동일하게 하였고, 에너지원(energy source)은 황철석을 사용하였다. 역시 황철석-용출 배양액도 멸균기(SW-90AV100)에서 121℃, 1기압으로 15분간 고압 멸균하였다. 황철석-용출 배양액에 첨가하는 황철석은 1%, 4% 및 16% 광액농도로 하였고, 광액농도 조성은 다음 식으로 하였다.

$$Pulp\ density(\%) = \frac{W}{V+W} \times 100$$

여기서 W는 황철석 무게, V는 배양액 무게이다.

토착박테리아들이 성장하고 있는 4번째 계대배양액의 성장-배양액을 10 ml 채취하여 1%, 4% 및 16%의 광액농도 별로 준비된 150 ml의 황철석-용출 배양액에 각각 접종하고 32℃의 배양기(HB-201SFO)에서 교반 없이 배양하였다.

2-5. 박테리아계수 및 분석

토착박테리아가 5번째 계대배양 되는 성장-배양액에 일어나는 pH, Eh 및 개체수 변화를 파악하기 위하여 성장-배양액 10 ml를 채취하였다. 채취된 10 ml 성장-배양액은 직경 47 mm의 0.1 ㎛ 멤브레인 필터 페이퍼에서 필터링하였다. 필터링 된 직경 47 mm의 멤브레인 필터 페이퍼에 2.5%의 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 첨가하고 75%, 85%, 95% 및 100%의 에틸알콜(ethyl alcohol)로 탈수시켜 SEM 분석에서 토착박테리아의 개체수를 계수 하였다. 직경 47 mm, 즉 단면적이 1734.07 mm^2인 필테 페이퍼의 중앙 부분을 7 mm×7 mm 크기로 절단하여 SEM에서 박테리아를 관찰하였다. 7 mm×7 mm 단면적에 분포되어 있는 박테리아들을 배율 5,000배의 SEM 사진으로 촬영하였다. 5,000배의 동일한 배율로 3 장소를 선택하여 박테리아들을 SEM 사진으로 포착하였으며, 이 SEM 사진은 가로 길이가 15.4 ㎛, 세로 길이가 11.4 ㎛이다. 박테리아 개체수는 15.4 ㎛×11.4 ㎛의 단면적 SEM 사진에 포착된 박테리아를 계수하고 평균값으로 나타냈다.

필터링 된 10 ml의 배양액은 pH와 Eh를 pH 메타(Eijelkam, 18.28, multi-parameter analyser, Beigium)로 각각 측정하였다. 토착박테리아들에 의한 황철석 표면부착 특성, 황철석 용출특성을 파악하기 위하여 황철석-용출 용액에서 황철석 입자와 황철석-용출 배양액 10 ml를 채취하였다. 황철석은 2.5%의 글루타르알데히드를 첨가하고 75%, 85%, 95% 및 100%의 에틸 알코올로 탈수시켜 SEM 및 EDS분석을 실시하였다. 황철석-용출 배양액 10 ml는 0.1 ㎛ 멤브레인 필터 페이퍼에서 필터링하고 pH와 Eh를 측정하였다. pH와 Eh 측정이 끝난 10 ml 배양액에 진한 질산을 가해 산 처리하였다. 산 처리 된 10 ml 배양액은 Zn 이온 함량을 측정하였다. 분석을 위해 채취된 성장-배양액과 황철석-용출 배양액은 다시 동일한 양을 보충하였다. 황철석-용출 배양액에 대한 대조군 시료(control sample)는 150 ml의 ATCC 배양액에 황철석을 광액농도별로 넣고 32℃로 교반 없이 반응시켰다.

2-6. 황철석 시료

토착 박테리아들에 반응시킬 황철석은 전남 광양읍 본정광산 폐석에서 채취하였다. 황철석은 파쇄 및 분쇄를 실시하여 20 mesh 체를 통과시키고 육안으로 석영을 제외시켰다. 황철석 입자는 초음파세척기(Ultrasonic, Power Sonic 510)에서 15분간 증류수로 세척하여 건조시킨 후 멸균기에서 고압멸균 후 사용하였다. 황철석을 연마편으로 제작하여 편광현미경(Leitz, OTHPLANPOL)에서 감정하고, XRD, EPMA 및 SEM분석을 실시하였다.

2-7. 분석기기

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

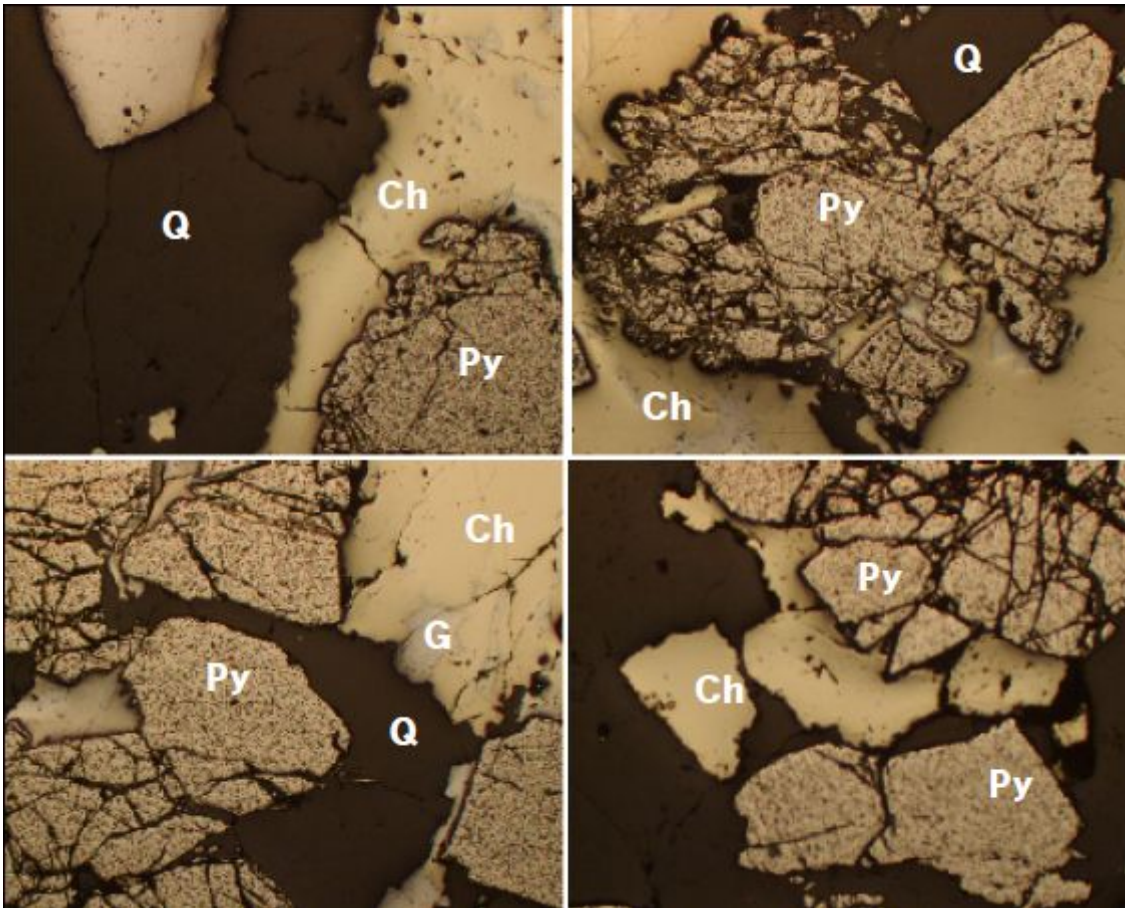

Fig. 2-1. Polarization microscope (magnification ×300) analysis image of pyrite sample(Ch; Chalcopyrite, G; Galena, Py; Pyrite, Q; Quartz).

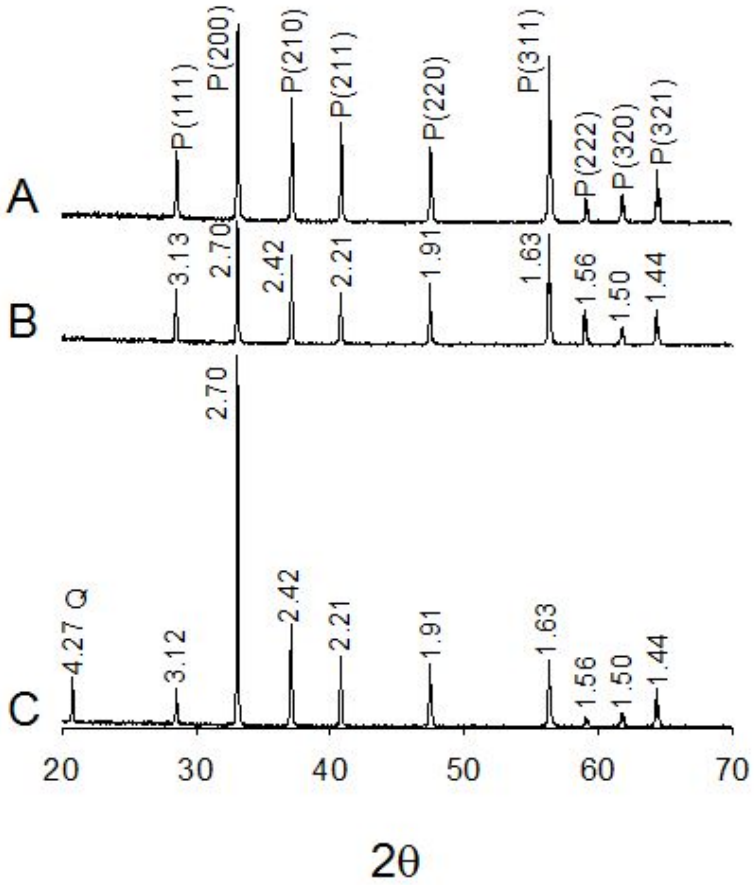

Fig. 2-2. X-ray diffraction patterns of pyrite : A; pyrite(raw sample), B; after 71 days of control sample, C; after 71 days of bioleaching sample(P; pyrtie, Q;quartz).

3. 결과 및 고찰

3-1. 성장-배양액에서 pH 및 Eh 변화

토착박테리아가 성장-배양액에서 성장할 때 나타나는 pH 및 Eh 변화를 Fig. 3-1에 나타냈다. 토착박테리아를 접종하기 전 성장-배양액 pH는 4.44이다. 성장-배양액에 토착박테리아를 접종 후 3일 후에는 pH가 3.32로 감소하고, 접종 후 21일에는 최대 1.96으로 감소하였다. 27일 이후의 pH는 대체적으로 2.45를 유지하였다. 이와 같이 성장-배양액의 pH가 감소하는 원인은 박테리아의 에너지원으로 첨가한 원소 황이 토착 박테리아에 의하여 (1)식과 같이 산화되어 황산염으로 되기 때문이다.

$$S^0 + 1.5O_2 + H_2O \rightarrow bacteria\ reaction \rightarrow SO_4^2 + 2H^+ \qquad (1)$$

배양액 속에 함유된 황(elemental sulfur, S^0)이 박테리아에 의하여 sulfate(SO_4^{2-}, S^{6+})로 산화되어 (2)식과 같이 황산(H_2SO_4)을 생성하였기 때문으로 생각된다 (Lundgren and Silver, 1980).

$$2S^o + 3O_2 + H_2O \rightarrow bacteria\ reaction \rightarrow 2H_2SO_4 \qquad (2)$$

또한 황(elemental sulfur)이 박테리아에 의해 산화되어 sulfite(SO_3, S^{4+}), thiosulfate(S_2O_3, S^{2+}), 혹은 tetrthionate(S_4O_6, $S^{2.5+}$)와 같은 황의 중간산물이 형성되고, 중간산물의 황은 또 박테리아가 산화시켜 (3)식과 같이 최종 산물인 H_2SO_4을 생성시키기 때문으로 생각한다(Leduc and Ferroni, 1994; Das and Mishra, 1996).

$$S^0 + O_2 + H_2O \rightarrow bacteria\ reaction \rightarrow H_2SO_3 + 0.5O_2 \rightarrow bacteria\ reaction \rightarrow H_2SO_4 \qquad (3)$$

실제로 원소 황 분말을 150 ml 배양액에 첨가했을 때, 배양액 표면에 부유되어 있던 황 분말이 5일 후부터 부분적으로 침전되기 시작하다가 배양 13일 후에는 완전히 배양액 바닥에 침전되었다.

토착박테리아가 접종되기 전 성장-배양액의 Eh는 157 mV이었다. 토착박테리아

가 접종 된지 3일 후에는 226 mV로 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.

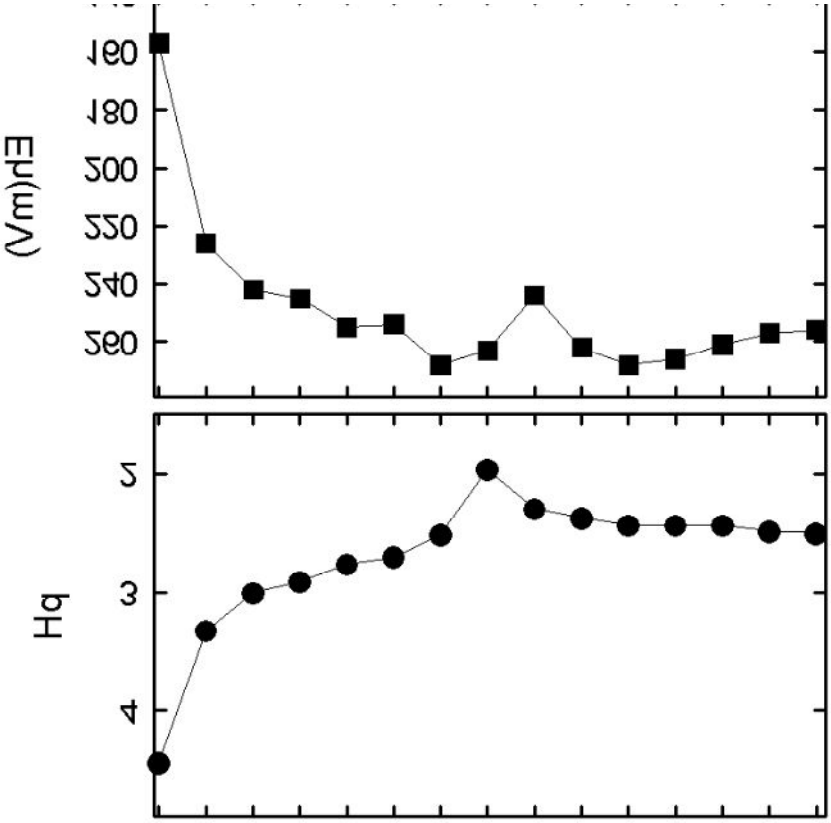

Fig. 3-1. The variation of pH and Eh vs time(days) in the growth-medium.

3-2. 성장-배양액에서 박테리아 개체수 변화

성장-배양액의 토착박테리아의 개체수를 Fig. 3-2에 나타냈다. Fig. 3-2는 SEM 사진에서 포착된 박테리아를 직접 계수한 것이다. 평판계수법이나 직접계수법으로 박테리아 개체수를 계수할 때, 배양용기 벽이나 배양 기질 물질 표면, 박테리아에 의해 생성된 물질 표면에 부착되기 때문에 정확한 박테리아 개체수 계수가 어렵게 된다. 즉 고체표면에 부착된 박테리아는 개체수 계산에 포함되지 않기 때문이다. 따라서 좀 더 정확한 박테리아 개체수를 파악하기 위해서, 박테리아를 용해시켜 질소를 측정하여 개체수로 추정하는 방법(McGoran et al., 1969), 박테리아 활동에 의해서 용해되어 증가되는 Fe^{2+}이온 함량을 측정하여 개체수로 추정하는 방법(MacDonald and Clark, 1970), 박테리아 대사 작용에 의해서 소비되는 용존산소 감소량을 측정하여 개체수로 추정하는 방법(Landesman et al., 1966), 박테리아 활동에 의해서 증가되는 산도(acidity)로 개체수를 추정하는 방법(McGoran et al., 1969), 박테리아 활동으로 생성되는 Fe^{3+} 이온 함량으로 개체수를 추정하는 방법(McGoran et al., 1969) 그리고 박테리아 활동에 의해서 황화광물로부터 방출되는 금속이온함량을 측정하여 개체수를 추정하는 방법(Torma et al., 1970) 등이 있다. 그러나 이들 방법들로 오차가 발생한다. Fig. 3-2의 박테리아-성장곡선에서 적응기가 나타나지 않고 지수성장기, 정체기 및 사멸기로 나타나는 것으로 해석된다. 일반적인 박테리아-성장 곡선에서 잘 나타나는 적응기가 Fig. 3-2에서 나타나지 않는 것은 아마 반복되는 계대배양에 의해서 토착 박테리아가 성장-배양액에 잘 적응하였기 때문으로 해석된다. 실제적으로 계대배양을 계속하여 진행 할 수 록 성장-배양액의 pH 감소속도 주기가 빨라지고 있었다.

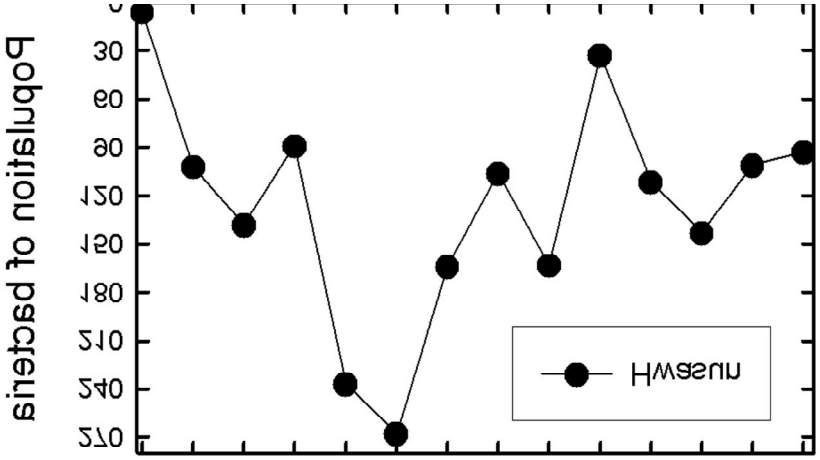

Fig. 3-2. The variation of bacterial population vs time(days) in the growth-medium.

3-3. 황철석 표면특성

토착호산성 박테리아에 접종시키기 전 황철석에 대하여 XRD 분석을 실시한 결과 황철석과 석영이 혼합되어 있음을 확인하였다. 황철석에 대한 연마편을 편광현미경으로 관찰한 결과 대부분 황철석 입자로 구성되어 있으며 황철석 표면은 작은 크랙과 hole들이 발달되어 있는 것을 확인하였다. 황철석의 구성성분은 EPMA로 분석한 결과 Fe가 45.64 wt.%, S가 50.34 wt.%, Zn이 0.03 w.t% 및 Cu가 0.01 wt.%로 나타났다. 연마편으로 제작한 황철석 입자 5개를 선정하여 한 입자에 대하여 각각 5 지점을 EPMA으로 정량분석하고 이들을 평균치로 나타낸 것이다.

150 ml의 ATCC 배양액에 에너지원인 황 대신 황철석 입자(20 mesh=0.85 mm, 0.15 g)를 넣고 17일(Fig. 3-3A), 31일(Fig. 3-3B), 63일(Fig. 3-3C), 81일(Fig. 3-3D), 101일(Fig. 3-3E) 및 111일(Fig. 3-3F) 동안 배양한 결과 황철석입자 표면에 막대모습의 토착 호산성 박테리아들이 부착되었다. Fig. 3-3A의 황철석 입자 표면에 부착된 박테리아의 크기는 길이가 1.64 ㎛이고 직경은 237 nm이다. Fig. 3-3B에서 막대모양의 토착 호산성 박테리아가 거의 원형에 가까운 구형입자들 그리고 불규칙한 구형입자들이 황철석 표면에 동시에 부착되어 나타난다. 황철석 표면에 부착된 원형의 구형입자들과 불규칙한 구형의 입자들은 토착 박테리아의 대사작용에 의해서 생성된 철수산화물 혹은 황 결정으로 판단된다.

토착 호산성 박테리아에 반응된 황철석 표면에 대한 EDS 분석결과 배양 17일(Fig. 3-3A, 2 point)은 S가 66.45(이하 atomic %) Fe가 33.55 그리고 배양 31일(Fig. 3-3B, 1 point)에는 S가 67 Fe가 33으로 검출되었으며, 17일과 31일의 황철석 표면의 S와 Fe의 비율이 거의 2:1로 나타났다.

Fig. 3-3C에서 육각형의 공동 안쪽에 구형입자들이 부착되어 있다. 박테리아에 의해 형성되는 것으로 생각되는 EPS 물질(Rodriguez-Leiva and Tributsch, 1988; Sand et al., 1995) 줄기 표면 위에도 막대모양의 박테리아들이 부착되어 있다(Fig. 3-3D). 또한 철수산화물로 생각되는 포도송이 구조 집합체들이 EPS 물질 줄기 주변에 형성된 것을 볼 수 있다. 박테리아에 의해 생성되는 것으로 생각되는 이 EPS 물질들은 박테리아가 들어 있지 않은 대조(control) 시료에서는 전혀 관찰되지 않았

다. Fig. 3-3E에서 막대모양의 수많은 토착 박테리아들이 황철석 표면에 군집을 이루어 부착되어 있다. 이들 박테리아들은 황철석 표면에 발달한 파쇄대 내에 밀집 부착하여 파쇄대를 부식시켜 확장시키고 있다. Fig. 3-3E에서와 같이 박테리아들이 황철석의 표면을 선택적으로 밀집 부착하여 군집체(colony)를 이루는 장소는 황철석의 결정구조가 불완전한 장소(imperfection), 화학적으로 결합이 약한장소, 또는 결정격자가 변위(dislocation)가 일어난 장소로 판단된다. 박테리아들을 이용하여 황철석들을 산화시킬때, 박테리아들은 황철석 표면에서 에너지를 쉽게 구할 수 있는 결함(imperfection), 화학적으로 결합이 약한장소, 또는 결정격자가 변위(dislocation)가 일어난 장소로 판단된다. 박테리아들을 이용하여 황철석 표면에서 에너지를 쉽게 구할 수 있는 결함(imperfection), 변위(dislocation), 미소파쇄대면(minute fracture plane), 연성 변형대(ductile defor-mation), 스크래치(scratches), 홈(grooves) 및 계단(steps) 등이 발달한 장소를 선호하는 것으로 알려져 있다(Keller and Murr, 1982; Bennett and Tributsch, 1978; Edwards et al., 2001). Fig. 3-3E에서와 같이 막대모양의 수많은 박테리아들이 배양 101일 만에 황철석 표면에 군집을 이루어 나타나는 이유는 이들 토착 호산성 박테리아들이 배양 101일 만에 황철석을 에너지 원으로 사용한 ATCC125 배양액에 적응하였기 때문으로 판단된다. 호산성 박테리아들의 적응기(lag phase)에 영향을 주는 요인들은 온도, pH, 영양물질의 농도, pulp density 및 기질물질의 표면적, 기질물질의 소수성과 친수성 그리고 기질물질의 표면전하 등 다양한 인자들이 있다(Toma et al., 1970, 1979; Silverman and Lundgren, 1959). 이들 중 pH 조건, 특히 접종 초기 pH 조정은 박테리아의 적응에 중요한 인자로 작용한다. 즉, Tomma 등(1970)에 의하면 접종 초기 pH를 2.3으로 조정하면 박테리아의 적응기가 가장 빠르고 pH 2.3 이하 혹은 이상으로 조정하면 적응기가 길게 나타나는 것을 발견하였다.

Fig. 3-3E에서와 같이 배양 101일 만에 박테리아들이 황철석 표면에 다량의 군집체로 부착하는 이유는 토착호산성 박테리아를 황철석 입자에 접종 반응시킬 때 초기 pH 조정을 하지 않았기 때문에 적응기가 길게 나타난 것으로 예측된다. 황철석의 영표면전하(point of zero charge, PZC)는 2.4(Widler and Seward, 2002)이다. 즉 배양액의 pH가 황철석의 PZC 보다 높으면 황철석의 표면전하는 음전하를 띄고, 반대로 배양액의 pH가 황철석의 PZC 보다 낮으면 황철석의 표면전하는 양전

하를 띄게 된다. 토착 호산성 박테리아들의 세포표면전하는 음전하를 띄고 있으므로 배양액의 pH가 황철석의 PZC 보다 높으면 박테리아가 황철석 표면에 부착하기 어렵게 된다. 하지만 본 실험에서 배양액에 황산을 가해 pH를 황철석의 PZC인 2.4보다 낮게 조정하였다면 황철석의 표면전하는 양전하를 띄게 되어 음전하를 띄는 박테리아가 잘 부착했을 것이다. 황철석 표면에 토착 호산성박테리아들이 부착하기 시작하는 배양 81일(Fig. 3-3D) 및 101일(Fig. 3-3E)의 배양액의 pH는 각각 3.32와 3.4로 측정되었다. 이와같이 배양액의 pH는 각각 3.32와 3.4가 되면 황철석의 영표면전하(PZC)보다 높아 황철석의 표면전하는 음전하가 되어 토착 박테리아가 부착하기 어려운 조건이 된다. 그러나 배양액의 pH가 황철석의 PZC보다 높아도 박테리아들이 황철석 표면에 군집체를 이루는 원인은 박테리아들이 분비한 EPS 물질(Fig. 3-3D)이 생성되고(Kinzler et al., 2003), 이물질은 소수성인 황철석 표면(Ohmura et al., 1993)에 잘 부착하고 또 이 EPS 물질 표면은 양전하를 띄게 되어(Sand et al., 1995; Kinzler et al., 2003) 박테리아들이 부착할 수 있는 정전기적 인력을 조성해 주기 때문으로 해석된다(Tributsch and Rojas-Chapana, 2007).

Fig. 3-3F에서 황철석 표면에 부착한 토착 호산성 박테리아들의 형태가 수축되어 나타난다. 이와 같이 수축된 모습의 원인은 박테리아를 탈수하는 과정이나 전자현미경의 진공에 의하여 일어나며, 박테리아를 전자현미경에서 관찰할 때 일반적으로 나타나는 모습이다(Murr and Berry, 1976; Berry and Murr, 1978).

Fig. 3-3의 황철석 표면에 막대모양으로 부착된 박테리아들의 종류는 S를 에너지로 활용하는 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 혹은 *Acidithiobacillus thiooxidans*에 해당되는 것으로 생각된다(Kelly and Wood, 2000). 왜냐하면 화순 광산배수의 토착 호산성 박테리아를 원소 황이포함된 ATCC 배양액에 성장시켰기 때문이다.

Fig. 3-4는 박테리아 시료로서 광액농도가 1%(반응실험 61일 경과)인 황철석 표면에 발달한 육각형의 공동(cavity)들이다. 이들 공동들은 거의 육각형의 형태로 나타나며 규칙적으로 배열되어 있다. 황철석의 표면에 규칙적으로 발달한 육각형의 공동들은 자연적으로 형성된 것으로 보인다. 황철석 입자 표면에 구형의 철수산화물들이 집합체로 침전되어 있는 것을 볼 수가 있다. Keller와 Murr(1982)는 2~3 cm 크기의 자형 결정 황철석(single-crystal cube)을 *Acidithiobacillus ferrooxidans*(30℃)와 고온성 박테리아(55℃)에 반응시킨 결과, 배양실험(30℃) 14일

만에 황철석의 (100)면에 그리고 배양(55℃) 18일 만에 황철석의 (110)면에 규칙적이고 대칭적인 부식공동(regular etch pits)들이 형성되는 것을 SEM으로 관찰하였다. 그러나 본 연구에서 황철석의 표면에 Keller와 Murr(1982)가 주장한 것처럼 규칙적이고 대칭적인 육각형의 부식공동이 발달되어 있는 것은 SEM분석에서 확인하였으나 토착박테리아에 의해 규칙적이고 대칭적인 육각형 공동이 형성되는 것은 확인되지 못하였다.

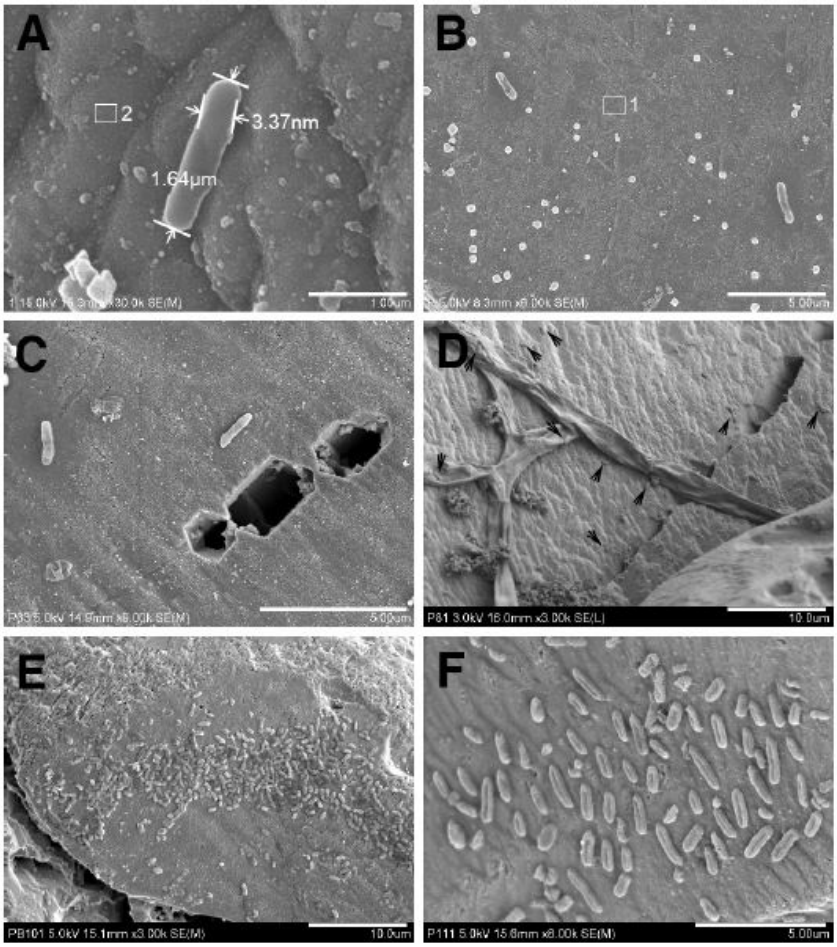

Fig. 3-3. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface. A; 17 days after inoculation, The EDS analysis point(□2) was positioned in A. B; 31 days after inoculation. C; 63 days after inoculation. The hexagonal corrosion cavity were developed on the pyrite surface. D; 81 days after inoculation. The arrowheads are indicate indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface. Note the enzyme stalk materials covered with pyrite surface. E; 101 days after inoculation. The numerous indigenous acidophilic bacteria were attached to the pyrite surface. F; 111 days after inoculation. the indigenous acidophilic bacteria cells is due to shrinkage of the cells during preparation for SEM. Scale var is 1 ㎛ (A), 5 ㎛(B, C, F) and 10 ㎛(D and E).

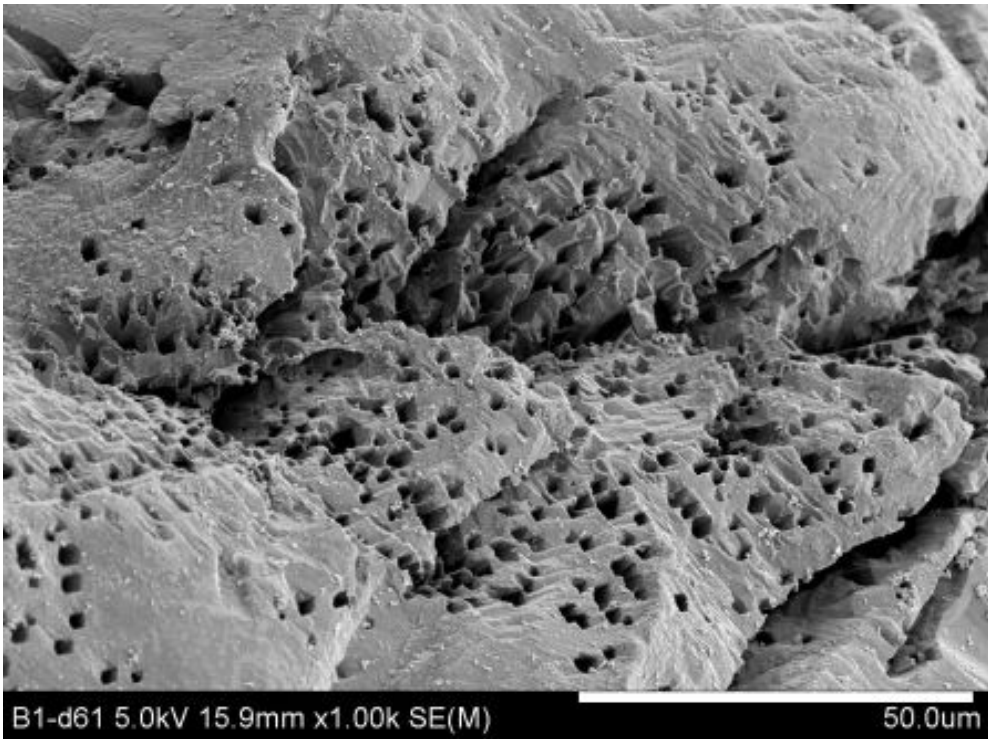

Fig. 3-4. SEM images of corrosion cavitys on the pyrite surface(61 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). Scale bar is 50.0 ㎛.

3-4. 세포외중합체물질

박테리아를 황철석에 반응시키면 황철석 표면에 세포외중합체물질(EPS) 혹은 lipopolysaccharide(LPS)(Edwards et al., 2001)와 같은 유기물 성분을 생성하는 것으로 보고하였다(Kinzler et al., 2003). Kinzler 등(2003)에 의하면 *Acidithiobacillus ferrooxidans*로부터 추출된 EPS 구성성분은 자연당(natural sugar)과 지질(lipid)로 되어 있으며, 질소와 인산염을 포함하고 있는 것으로 보고되었다. 특히 EPS는 Fe^{+3}와 복합물을 형성하여 황철석 표면을 간접적 방법(indirect mechanism)으로 용해시키는 것으로 알려져 있다(Fowler et al., 1999). 세포외중합체물질(EPS)은 박테리아 세포 표면을 둘러싸고 있는 유기물질 막(혹은 organic capsule, Tributsch, 2001)을 말하며, 이 세포외중합체물질에는 콜로이드입자상태의 황과 미세한 황철석 파편들이 함유되어 있는 것이 TEM분석에서 밝혀졌으며(Tributsch and Rojas-Chapana, 2000), 이 EPS 물질은 황철석 표면을 직접 산화시키는 기능과 박테리아의 부착을 돕는 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Sand et al., 1995).

박테리아는 여러 가지 목적으로 세포외중합체물질(EPS)을 분비하는 것으로 알려져 있다. 즉 세포외중합체물질은 일종의 유기물질로서 박테리아가 고체표면에 부착하는 것을 돕기 위하여, 높은 온도나 낮은 온도의 외부환경으로부터 자신을 보호하기 위하여, 자외선을 차단하기 위하여, 고농도의 중금속원소 독성을 완충시키기 위하여 그리고 생물막(biomass)의 기능을 얻기 위하여 생성하는 것으로 알려져 있다(Konhauser, 2007; Rojas-Chapana and Tributsch, 2004; Poliani and Donati, 1999; Escobar et al., 1997).

Fig. 3-5는 17일 경과한 황철석-용출 배양액에서 채취한 황철석 입자 표면이다. Fig. 3-5에는 막대 모양의 토착호산성 박테리아들이 황철석 표면에 부착되어 있는 모습이 관찰되었고, 토착박테리아에 의해 형성된 것으로 판단되는 세포외중합체물질이 관찰되었다. Fig. 3-5에서 관찰되는 이 세포외중합체물질은 토착박테리아들에 의하여 생성되는 초기 모습으로 생각된다. 황철석 표면(Fig. 3-5에서 2지점)에 대한 EDS분석결과 S가 63.18(atomic %) Fe가 36.82로 검출되었다. 세포외중합체물질(Fig. 3-4에서 1지점)에 대하여 EDS분석한 결과 C가 70.45(atomic %). O가 14.20,

P가 1.01, S가 9.54, K가 0.39 그리고 Fe가 4.41으로 검출되었다. Fig. 3-6은 61일 경과한 황철석-용출 배양액에서 채취된 황철석 입자 표면이다. 이 황철석 입자 표면을 얇은 줄기 모양의 세포외중합체물질들이 둘러쌓고 있는 모습이 관찰되었다. 이 얇은 줄기 모양의 세포외중합체물질(Fig. 3-6에서 2지점)에 대하여 EDS분석한 결과 O가 33.83(atomic %), P가 3.43(atomic %), S가 41.04 그리고 Fe가 21.43으로 검출되었다. Fig. 3-6에서 황철석 표면(1 지점)에 대하여 EDS분석한 결과 S가 65.86(atomic %) Fe가 34.14로 검출되었다. 세포외중합체물질에서 P가 검출되는 것은 Kinzler et al.(2003)에 의해 EPS 추출물 분석에서 자연당(natural sugar), 지질(lipid), 질소 및 인산염이 포함되었기 때문으로 해석된다. 또한 본 연구의 세포외중합체물질에서 S와 Fe가 검출되는 것은 Tributsch와 Rojas-Chapana(2000)가 주장한 것처럼 토착 박테리아가 황철석 파편을 자신이 분비한 세포외중합체물질에 포함시켰기 때문으로 해석된다. 본 세포외중합체물질들이 토착박테리아들과 함께 황철석 표면에 부착되어 있는 모습, 황철석 입자 표면을 둘러싸고 있는 모습 그리고 철수산화물들을 부착하는 모습 등을 종합하여 고려하면 본 세포외중합체물질은 생물막 기능(Rojas-Chapana and Tributsch, 2004; Poliani and Donati, 1999; Escobar et al., 1997) 기능이 있는 것으로 해석된다.

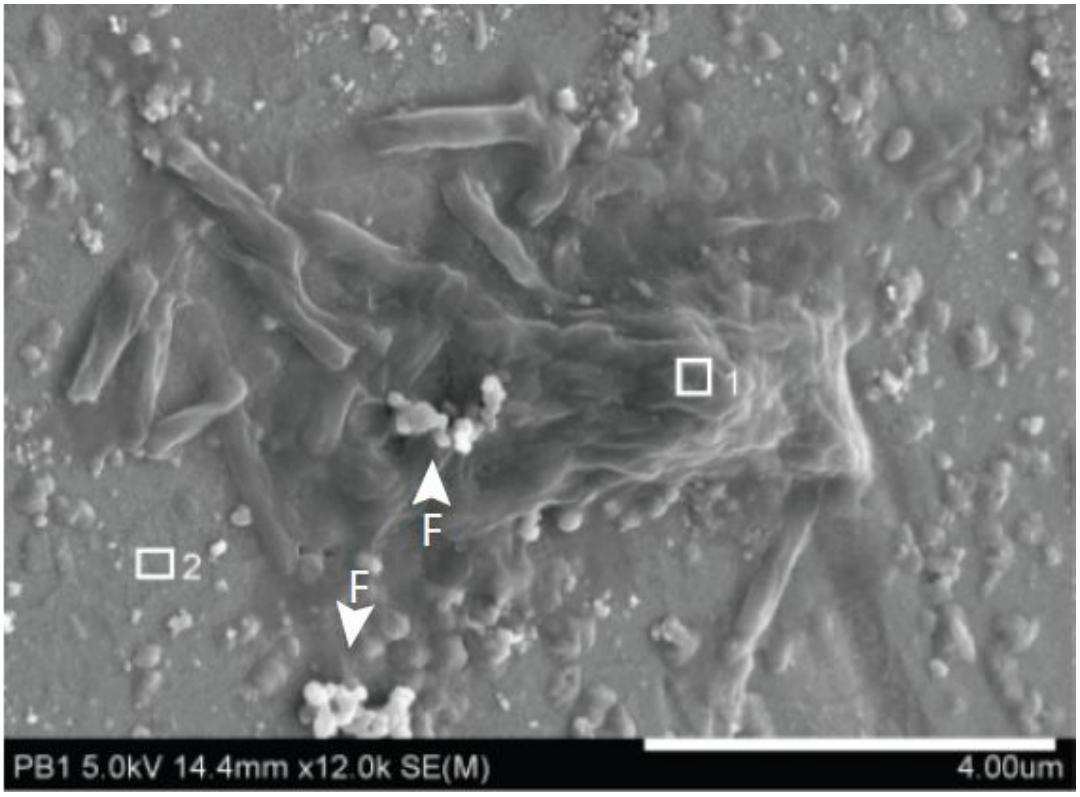

Fig. 3-5. SEM images of extracellular polymeric substance(EPS) and indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(17 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). F; Framboidal iron hydroxide. Scale bar is 4.0 ㎛.

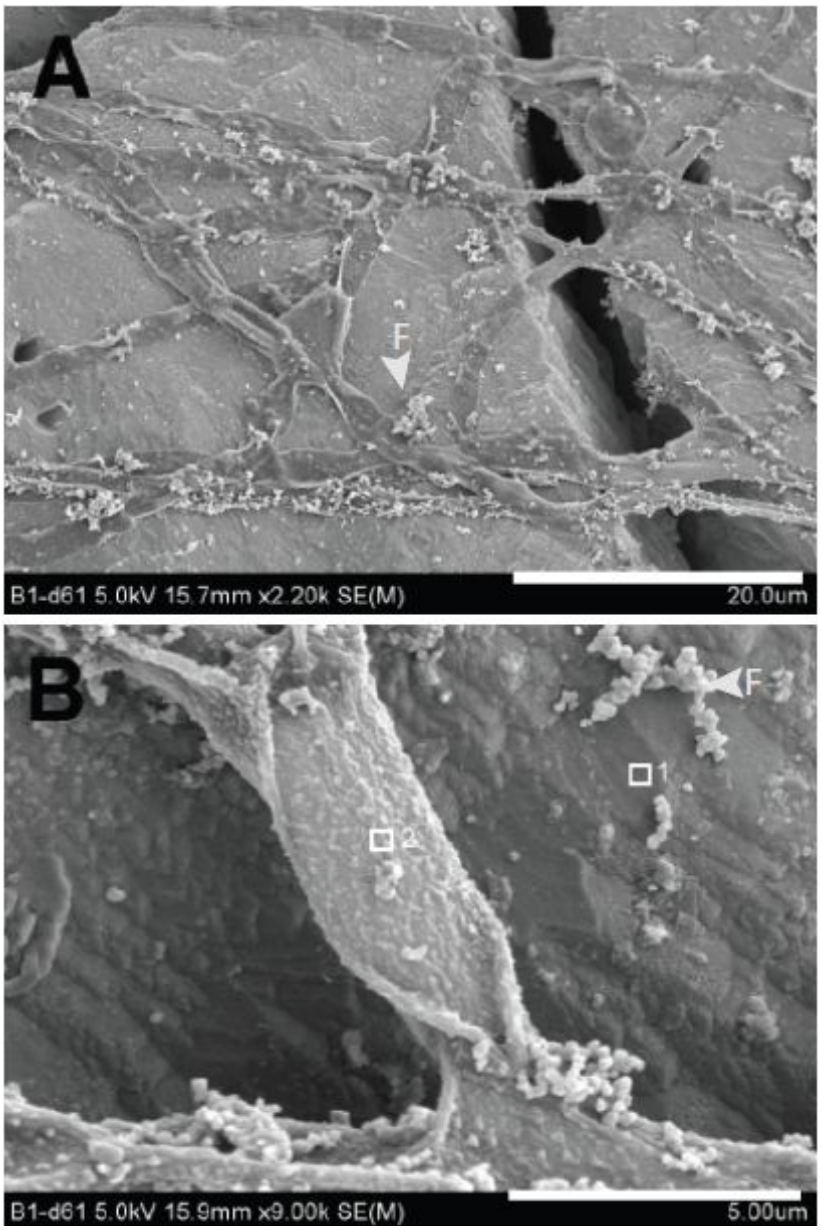

Fig. 3-6. SEM images of extracellular polymeric substance(EPS) on the pyrite surface(61 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). F; Framboidal iron hydroxide. Scale bar is 20.0 ㎛(A) and 5.0 ㎛(B).

3-5. 박테리아 부착 특성

Fig. 3-7은 토착 박테리아를 황철석-용출 배약액에 접종한지 8일 경과한 황철석 표면이다. Fig. 3-7에서 막대모양의 토착호산성 박테리아들이 황철석 표면에 군집을 이루어 부착되었다. 크기가 1.19~1.42 ㎛인 막대모양의 박테리아들이 황철석의 파쇄면(crack) 면에 집중적으로 부착되었다. Fig. 3-6에서 토착박테리아들이 군집으로 부착한 황철석 표면은 크랙(crack)이 발달한 부분이다. 이와 같이 토착호산성 박테리아들이 황철석 표면의 파쇄면에 군집을 이루어 부착하는 원인은 황철석의 결함이 있는 장소를 박테리아들이 선호하기 때문으로 해석된다. 호산성 박테리아들이 황철석의 결정구조가 불완전한 장소, 화학적으로 결합이 약한 장소, 또는 결정격자 구조에 변위가 일어난 장소를 선택하는 것으로 알려져 있다. 즉 이러한 장소들은 산화에너지를 쉽게 얻을 수 있는 장소들이다(Southwood and Southwood, 1986; Keller and Murr, 1982; Bennett and Tributsch, 1978; Edwards et al., 2001). 박테리아 부착 밀도와 결정면의 결함 밀도는 서로 상관성이 높으며(Brierley, 1978), 황화광물 표면에 결함이 있는 부분에 박테리아가 선택적으로 부착하는 것으로 알려져 있다(Berry and Murr, 1975; Murr and Berry, 1976).

이들 장소는 Fe와 S의 화학적 결합이 약하게 되어 있어 산화될 때 쉽게 Fe^{+2} 이온이나 S를 방출하기 때문에 박테리아들이 이들 장소를 선호하는 것으로 해석된다(Rojas-Chapana and Tributsch, 2004). 또한 박테리아들이 선택적으로 부착하는 이들 장소는 Fe^{+2}와 thiosulfate($S_2O_2^{2-}$)가 적게 방출되는 국지적 양극(anode)으로 그리고 철수산화물이 침전되는 장소는 국지적 음극(cathode)으로 작용하였기 때문일 수도 있다(Rohwerder et al., 2003). 황철석은 결정구조가 NaCl과 유사하여 Fe 원자 하나에 2개의 S가 서로 공유결합(covalent bond)으로 결합되어 있다(Martello er al., 1994). S-Fe-S로 결합된 결정면, 즉 Fe와 2개의 S가 서로 공유결합을 형성한 (111)결정면은 매우 강한 황철석을 형성한다. 그러나 Fe가 결여되어 S-S로 결합된 상태를 stacking fault라 하며 황철석 표면에 얇은 평행 결합선(thin planar defect)으로 나타난다. 황철석에 발달한 stacking fault 및 전위선(dislocation)의 밀도, 충식(etch pit)빈도는 황철석의 반응성(산화율)과 상관성이 매우 높은 것이 실험으로 밝

혀졌다(Martello et al., 1994).

Fig. 3-8은 토착박테리아를 황철석-용출 배양액에 접종한지 61일 경과한 황철석 표면이다. Fig. 3-8에서 토착 호산성 박테리아들이 황철석 표면에 특이하게 부착되었다. 이 특이하게 부착된 모습은, 박테리아들이 황철석 표면을 파고들어가는 모습인지 혹은 부드러운 황철석 침전물에 박테리아들이 매몰되는 모습인지는 분명하지 않다. 이들 박테리아들은 심하게 수축되었다. 이와 같이 수축된 모습을 보이는 원인은 박테리아를 탈수하는 과정이나 전자현미경의 진공에 의하여 일어나며, 박테리아를 전자현미경에서 관찰할 때 일반적으로 나타나는 모습이다(Murr and Berry, 1976; Berry and Murr, 1978). 박테리아와 경계를 이루고 있는 황철석 부분도 심하게 탈수된 것으로 보인다. 황철석 부분이 박테리아를 중심으로 동심원으로 균열이 발생한 원인은 탈수에 의한 결과로 해석된다. Fig. 3-9에서 막대모양의 토착호산성 박테리아들이 황철석 표면 안쪽으로 깊숙이 부착되었다. 이들 박테리아들과 황철석 경계는 매우 뚜렷하며 부드러운 경계로 나타났다. Fig. 3-9A에서 탈수로 인하여 박테리아들과 황철석 경계가 매우 뚜렷하게 나타나지만 Fig. 3-9B는 탈수로 인하여 박테리아가 분리되었다.

본 토착 박테리아들이 황철석 표면에 직접 부착된 모습(Fig. 3-7, Fig. 3-8 그리고 Fig. 3-9)은 황철석을 직접산화(direct attack mechanism)시키기 위해서 황철석 표면에 접촉하는 것으로 해석이 가능하다(Sand et al., 1995; Sand et al., 2001, Tributsch, 2001). 특히 Fig. 3-8과 Fig. 3-9에서와 같이 토착박테리아들이 황철석 표면을 파고 들어가는 것으로 해석된다면, Sand et al.(1995), Tributsch와 Rojas-Chapana(2000)가 연구한 것처럼, 본 토착박테리아들이 자신의 크기에 맞게 황철석 표면을 부식하는 것으로 설명할 수 있다. 토착박테리아들이 파고들어간 황철석 표면은 후에 부식에 의한 충식 자국으로 남을 것이다.

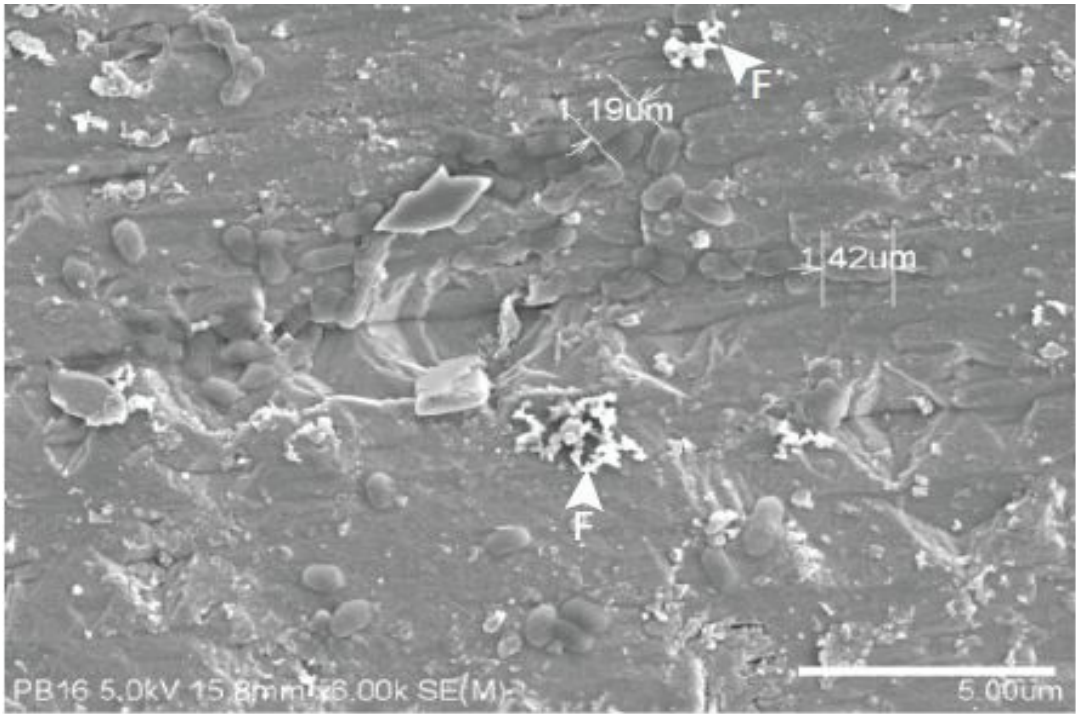

Fig. 3-7. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(8 days after inoculation with bacteria at pulp density 16%, pH=3.21). F; Framboidal iron hydroxide. Scale bar is 5.0 ㎛.

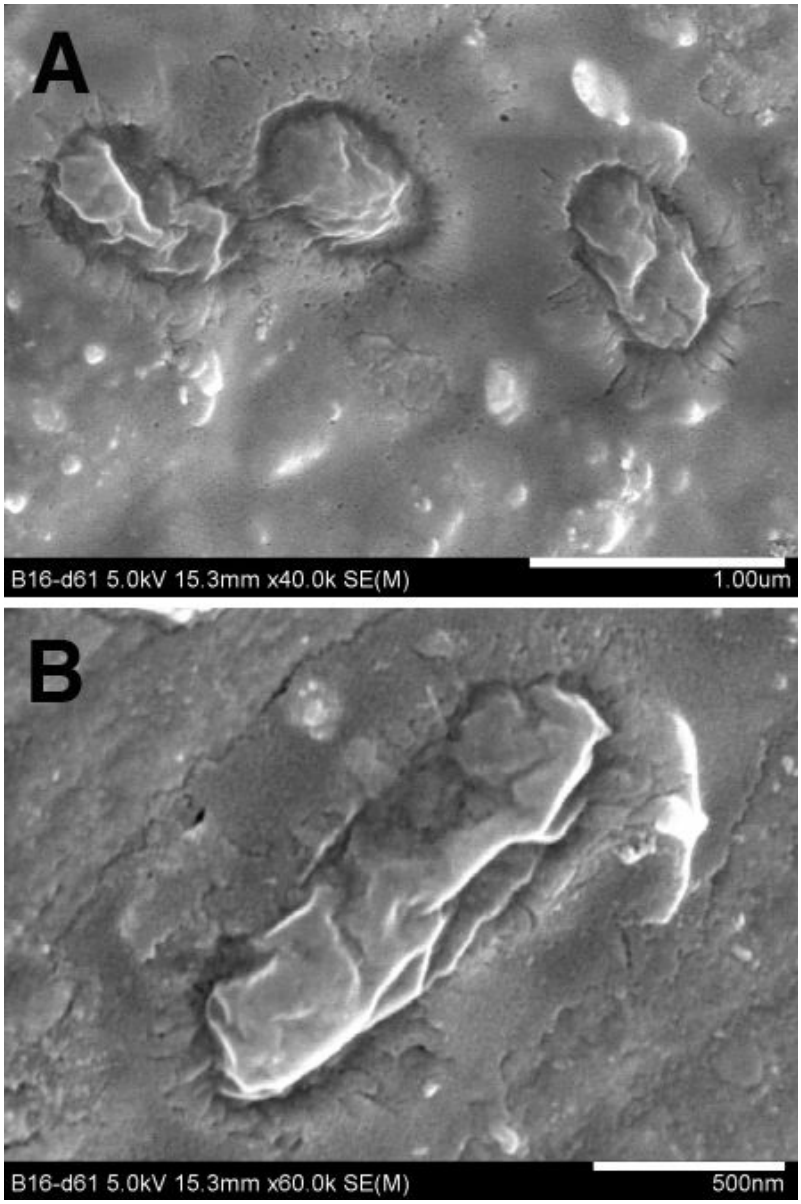

Fig. 3-8. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(61 days after inoculation with bacteria at pulp density 16%). Note that indigenous acidophilic bacteria were excavated in the pyrite surface. Scale bar is 1.0 ㎛(A) and 500 nm(B).

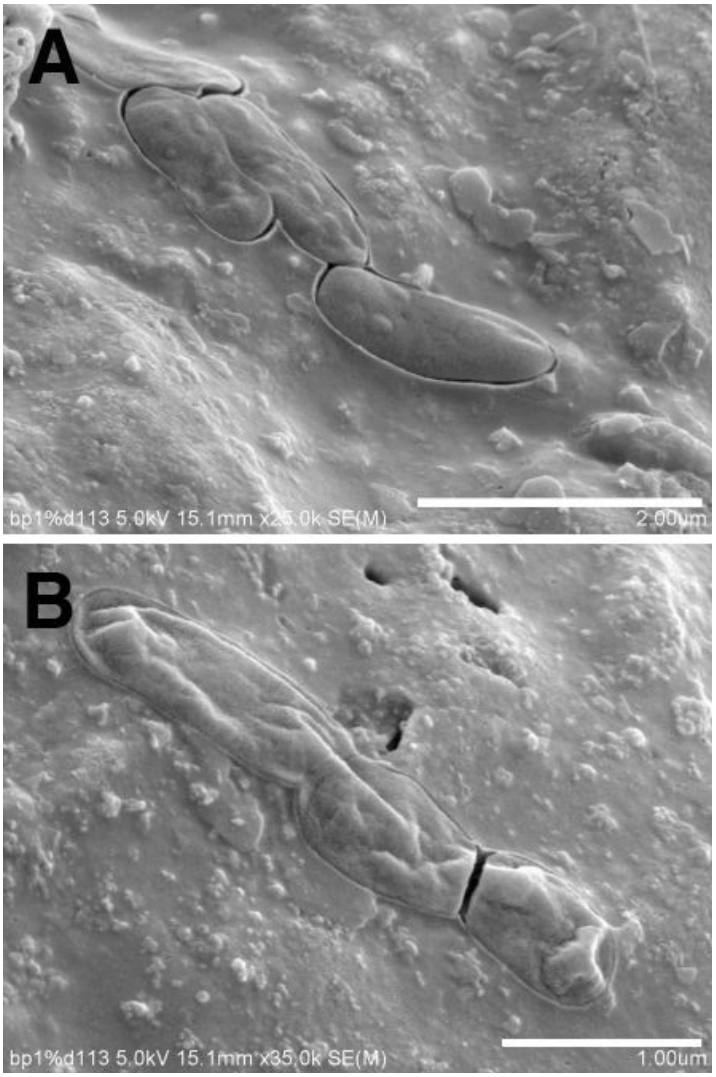

Fig. 3-9. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the pyrite surface(113 days after inoculation with bacteria at pulp density 1%). Note that the rod-shaped indigenous acidophilic bacteria were deeply excavated in the pyrite surface. The boundary between pyrite and bacteria was very smoothed. Scale bar is 2.0 ㎛(A) and 1.0 ㎛(B).

3-6. 황철석 표면의 부식공동 특성

Fig. 3-10A는 박테리아에 반응시키기 전 황철석 표면에 발달한 자연적인 공동(cavity)들이다. 이들 공동들은 거의 육각형의 형태로 나타나며 일정한 방향으로 배열되어 있다. Fig. 3-10B는 대조 시료에서 16일 간 반응된 황철석표면으로서 육각형의 공동들이 규칙적으로 발달되어 있다. Fig. 3-10B의 황철석 표면(C1 point)을 EDS 분석한 결과 O(23.59 이하 atomic %), S(47.88) 및 Fe(28.53)가 검출되고 있다. Fig. 3-10B의 황철석 표면(C1 point)에 대한 EDS 분석에서 O가 검출되는 것으로 보아 박테리아가 없는 배양액에서도 황철석이 산화되고 있음을 보여주고 있다. Fig. 3-10C는 토착 호산성 박테리아에 41일 간 반응시킨 황철석 표면으로서, 규칙적인 육각형의 공동들 주변에 혹은 공동 안쪽에 구형의 입자들이 부착되어 있다. 육각형의 공동 주변이나 안쪽에 부착되어 있는 구형의 입자들은 철수산화물로 생각한다. Fig. 3-10D는 토착 호산성 박테리아에 63일 간 반응 접촉시킨 황철석의 표면이다. Fig. 3-10D에는 황철석 표면에 막대모양의 박테리아가 부착되어 있고, 육각형의 규칙적인 공동들이 일정한 방향으로 분포하고 있다. 공동 안쪽 벽면에 구형의 입자들이 부착되어 있다. 일정한 방향성으로 배열된 육각형 공동들은 박테리아에 의해 생성된 황산이나 Fe^{3+} 이온에 의해 용해되거나 간접적 산화작용이 진행되어 각각의 육각형 공동이 서로 연결되어 결국 신장된 하나의 육각형 공동이 형성되는 것으로 판단된다. Fig. 3-10D에는 육각형의 형체가 나타나기 시작하는 초기 육각형의 공동, 완전한 형태의 육각형 공동, 그리고 한쪽 방향으로 신장된 육각형 공동이 나타나고 있다. Keller와 Murr(1982)는 2~3 cm 크기의 자형 결정 황철석(single-crystal cube)을 *Acidithiobacillus ferrooxidans*(30℃)와 고온성 박테리아(55℃)에 반응시킨 결과, 배양실험(30℃) 14일 만에 황철석의 (100)면에 그리고 배양(55℃) 18일 만에 황철석의 (110)면에 규칙적이고 대칭적인 부식공동(regular etch pits)들이 형성되는 것을 SEM으로 관찰하였다. Keller와 Murr(1982)는 규칙적이고 대칭적인 육각형의 부식공동이 한쪽 방향으로만 부식이 진행되어 결국 일정한 방향을 보이는 신장된 육각형의 부식공동이 형성된다 하였다.

Fig. 3-10E는 토착 호산성 박테리아에 81일 반응시킨 황철석 표면이다. Fig.

3-10E에는 일정한 방향성으로 발달된 공동들이 서로 연결되어 결국 파쇄대나 작은 틈으로 발달되는 것을 볼 수 있다. Fig. 3-10F는 토착 호산성 박테리아에 101일 동안 반응시킨 황철석 표면이다. Fig. 3-10F는 황철석에 발달한 파쇄대나 작은 틈이 산화-부식되어 확장되는 것을 볼 수 있다. 그러나 배양 51일 이후에는 박테리아 시료와 대조 시료의 함량증가는 나타나지 않고 있으며, 배양 101일에도 박테리아 시료가 대조시료에 비해 2배 이상으로 높게 나타났다.

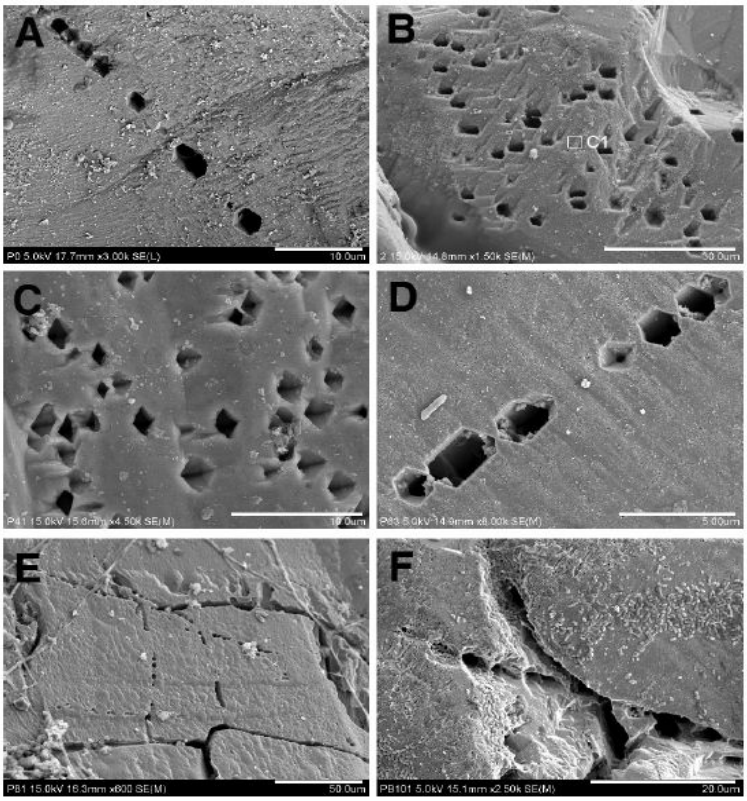

Fig. 3-10. SEM images of corrosion cavity on the pyrite surface. A; before in ATCC medium. The natural hexagonal cavitys were originally developed on the pyrite surface. B; 16 days after control medium. Note the refular patterns of hexagonal cavitys were distrivuted on the pyrite surface. C; 41 days after inoculation. Indigenous acidophilic bacteria and the Fe-hydroxides were attached to the around and inner hexagonal cavity. D; 63 days after inoculation. The hexagonal cavitys were corroded and were connected together. E; 81 days after inoculation. Note the enzymatic stalk materials were covered with the pyrite grain. The hexagonal cavitys were completely connected together and then formed cracks. F; 101 days after inoculation. The cracks were extensively corroded and greatly widen. The numerous indigenous acidophilic bacteria were attached to the pyrite surface and to the inner crackes.

3-7. 황철석 용출 특성

토착박테리아를 1%, 4% 및 16%의 광액농도에 반응시켰을 때 pH, Eh 및 Zn 함량 변화를 시간별로 각각 도시하였다(Fig. 3-11, Fig. 3-12). 대부분 황화광물에 박테리아를 접종하여 생물학적 용출실험을 실행할 때 접종 초기에 황산을 첨가하여 pH 2.7 이하로 조정하여 수행하지만(Bennett and Tributsch, 1978; Torma, 1970, 1988, Shrihari et al., 1990, Seidel et al., 2001) 본 연구에서는 pH 조정을 하지 않았다. pH 조정을 실시하지 않은 이유는 황철석-용출 배양액의 황철석 표면에 토착박테리아가 부착할 수 있는지를 알 기위함이었다. 즉 음전하(Schultze-Lam et al., 1996)를 띠고 있는 토착박테리아가 초기 pH가 3.35인 황철석-용출 배양액의 황철석 표면에 부착할 수 있을지를 알기 위해서다. 황철석의 영표면전하(point of zero charge)는 최대 pH 2.7이다(Widler and Seward, 2002). 따라서 황철석-용출 배양액의 초기 pH가 3.35이면 황철석의 표면전하는 음전하를 띠게 된다. Fig. 3-6은 박테리아 접종 후 8일 경과한 황철석-용출 배양액(pH=3.21)에서 채취된 황철석 표면이다. 배양액의 pH가 3.21이므로 배양액에 포함된 황철석의 표면전하는 음전하를 띠게 된다. 그러나 Fig. 3-3에서 보듯이 토착박테리아들이 황철석 표면에 무수히 부착된 것이 관찰되었다. 따라서 박테리아 접종 후 pH를 2.7 이하로 조정하지 않아도 황철석 표면에 박테리아가 부착되는 것을 확인하였다.

Fig. 3-5과 Fig. 3-6에서 보듯이 황철석 표면에 포도송이구조의 철수산화물들이 형성된 것을 볼 수 있다. 이는 황철석-용출 배양액을 pH 조정하지 않아서 철수산화물이 생성된 것으로 해석된다. 황철석-용출 배양액을 초기에 황산으로 pH 1.9~2.3으로 조정(Bennett and Tributsch, 1978, Torma, 1988)하면 철수산화물의 생성을 피할 수 있을 것이다.

Fig. 3-11은 황철석-용출 배양액의 pH 변화를 시간별로 나타낸 것으로서 비교시료에서 보다 박테리아 시료에서 pH 값이 낮게 나타났다. 비교시료에 비해 박테리아 시료에서 pH 값이 낮은 이유는 황철석으로부터 용출된 S이 SO_4로 산화되었기 때문이다. 또한 황철석으로부터 용출된 Fe^{2+}가 Fe^{3+}로 산화되고, 산화된 Fe^{3+}가 간접적으로 황철석을 산화시킬 때 발생한 수소이온 때문이다. Fig. 3-11에서 황철석-

용출 배양액의 Eh 변화를 시간별로 나타낸 것으로서 비교시료에서 보다 박테리아 시료에서 Eh 값이 모두 높게 나타났다. 이는 토착박테리아의 대사작용에 의해 황철석으로부터 방출된 S가 SO_4로 산화될 때, Fe^{2+}가 Fe^{3+}로 산화될 때 전자가 발생되기 때문이다. Fig. 3-12은 황철석-용출 배양액의 Zn 함량을 시간별로 나타낸 것으로서 비교시료에서 보다 박테리아 시료에서 Zn 함량이 모든 광액농도에서 높게 나타났다. 황철석-용출 배양액을 시간별로 Fe, As 및 Zn 이온의 함량을 시간별로 측정하였으나 Zn 함량만이 높게 용출되었다. 황철석-용출 -배양액에 박테리아를 접종하는 초기에 pH를 2.7 이하로 조정하여 Fe^{2+} 이온이 안정한 환경을 조성하였다면 철수산화물의 발생도 적게 발생하였을 것이고 Fe와 As 이온 함량도 높게 용출되었을 것으로 생각된다. 황철석-용출 배양액에서 Fe와 As 함량이 낮게 용출된 원인은 황철석으로부터 용출된 Fe^{2+} 이온이 산화되어 철수산화물로 침전되고 철수산화물에 As가 흡착 제거되기 때문에 Fe와 As 함량이 낮게 측정되었을 것으로 판단된다.

Fig. 3-12에서 대체적으로 반응 21일부터 Zn 함량이 비교시료에 비해 박테리아 시료에서 높게 용출되기 시작하였다. 광액농도에 비례하여 Zn의 함량이 높게 용출될 것으로 예상하였으나 광액농도에 비례하여 Zn 함량이 감소하여 나타나고 있다. Zn 함량을 접종 후 51일에서 1, 4 및 16%의 광액농도 별로 비교해보면 각각 1848.66, 1674.27 및 1424.01㎍/l로 나타났다. 또한 접종 후 71일에서 Zn 함량은 1, 4 및 16%의 광액농도 별로 각각 2957.96, 2490.08 및 2332.78㎍/l로 나타났다. 이와 같이 광액농도가 1, 4 및 16%로 증가할 수 록 용출되는 Zn의 함량이 감소하는 원인은 토착박테리아가 O_2나 CO_2를 활용 할 때 황철석에 의하여 제한을 받기 때문이다. 즉 박테리아가 황철석을 에너지원으로 활용할 때 증가된 황철석으로 인하여 O_2나 CO_2의 확산 공급이 방해 받기 때문이다(Torma et al., 1970). 따라서 O_2나 CO_2의 공급을 원활하게 공급해 준다면 광액농도에 비례하여 Zn의 용출을 증가시킬 수 있을 것으로 본다. 광액농도가 20%를 초과하지 않고 광석 입자 크기가 400 mesh인 경우 금속이온의 용출양은 광물의 표면적에 비례하여 증가하지만(Torma et al., 1972) 박테리아의 개체수가 1.8×10^6/ml를 초과하지 않으면 금속이온의 용출양은 광물의 표면적에 비례하여 증가하지 않는다(Ehrlich and Fox, 1967).

앞으로 최적의 pH 조건과 최적의 온도를 조성해준 환경에서 미생물 용출실험을

수행한다면, 보다 높은 용출률이 나타날 것으로 예상된다.

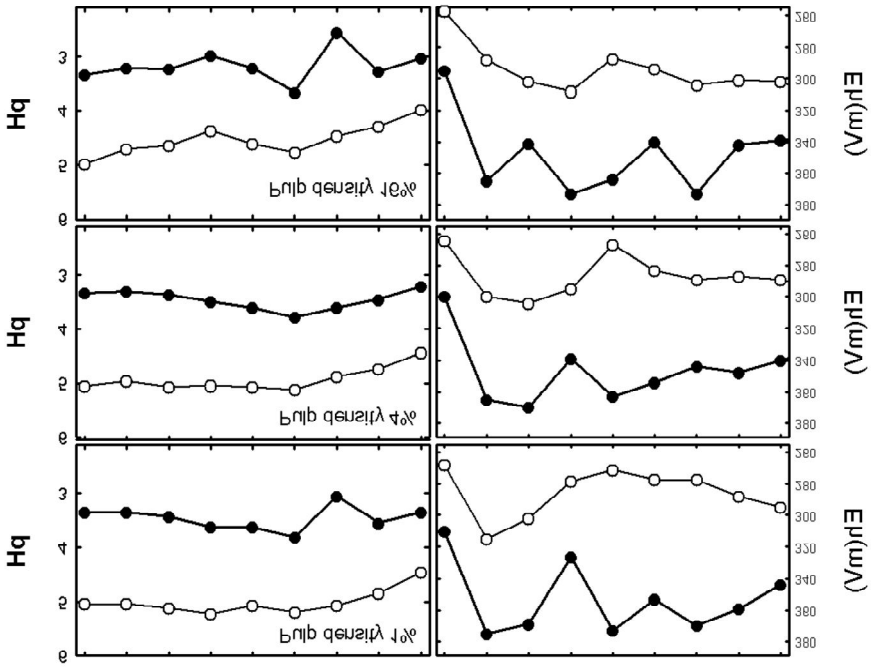

Fig. 3-11. The variation of pH and Eh vs time(days) in the pyrite-leaching medium(●; bacteria, ○; control).

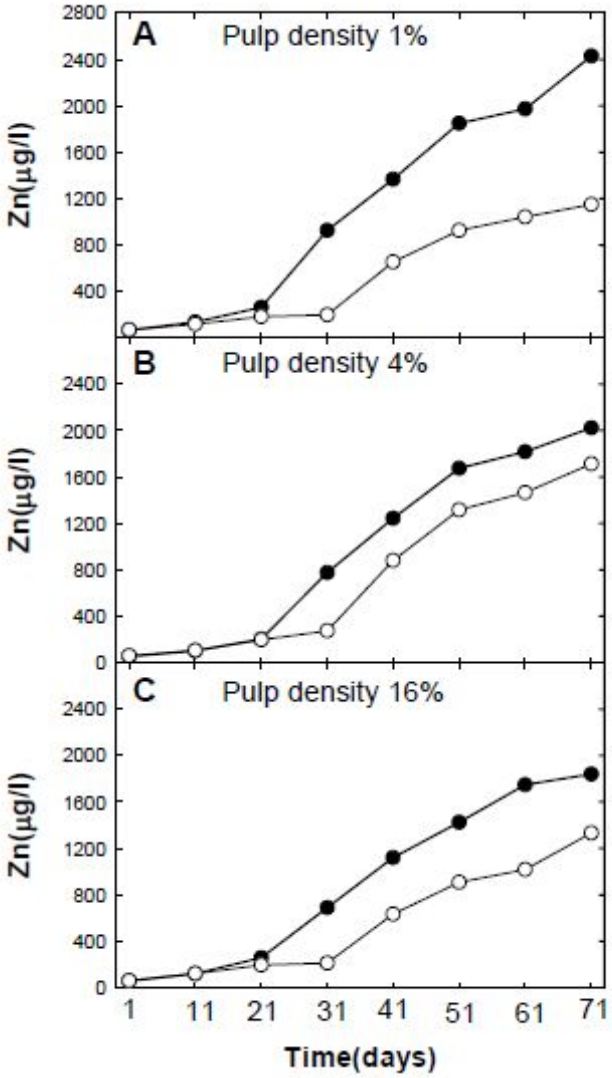

Fig. 3-12. Variation for concentration of zinc with time(days) in pyrite-leaching medium(●; bacteria, ○; control).

4. 토 의

미생물체가 황화광물을 분해시킬 때 온도, pH, 광액농도, 황화광물 입자 크기 및 표면적 및 배양액 농도 등 다양한 인자에 의하며 영향을 받는다. 본 연구에서는 광액농도에 따른 인자를 선택하여 연구를 하게 되었지만, 온도, pH, 황화광물 입자 크기 및 표면적 및 배양액 농도 등 다양한 인자의 영향을 받는 것으로 파악된다. 이 부분에 대하여 연구를 하지 못한 부분이 아쉽게 생각된다.

황화광물의 종류 및 영향 인자에 대하여 다양한 연구의 결과들이 응집된다면, 이를 통하여 Heap bioleaching 혹은 dump bioleaching과 같은 대규모의 Bioleaching을 현장에서 적용가능성을 확인할 수 있을 것으로 예상된다. 대규모의 Bioileaching을 실현하기 위해서는 다양한 변수를 Batch test 및 Column test 등의 실내실험을 통해서 확인하고 현장에서 적용한다면 저품위 광석에서 유용금속이온을 용출 시켜 광산 폐기물 및 저품위 광석의 재활용을 통한 부가가치 향상 뿐만 아니라 유해 광산 폐기물의 무해화라는 일석이조의 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

5. 결 론

본 연구에서는 상업적으로 분양받은 박테리아를 이용하지 않고 화순광산배수에서 생존하고 있는 토착호산성박테리아를 배양 후, 용출실험을 실시하였다.

토착박테리아가 황이 포함된 성장-배양액에서 잘 성장함을 pH의 감소 그리고 Eh의 증가로 잘 나타났으며, 개체수를 나타내는 성장곡선에서 적응기가 나타나지 않고 지수성장기, 정체기 및 사멸기로 나타나는 것으로 해석되었다. 적응기가 나타나지 않는 것은 아마 반복되는 계대배양에 의해서 토착 박테리아가 성장-배양액에 잘 적응하였기 때문이다.

토착 호산성 박테리아들이 황철석 표면 안쪽으로 자신의 크기에 맞게 부착된 모습은 직접접촉에 의한 충식이 진행되는 것으로 해석되며, 황철석 표면을 산화시킬 때 박테리아로부터 생성된 EPS 물질이 황철석 표면을 피복하는 것으로 나타났다.

토착박테리아를 황철석에 접종하여 시간별로 Fe, As 및 Zn 이온의 함량을 측정하였으나 Zn 함량만이 높게 용출되었다. 또한, 황철석의 광액농도를 증가시켜 생물학적 용출을 실시하였으나 용출되는 Zn 이온 함량이 감소하여 나타났다.

대부분의 미생물 용출 실험에서 박테리아가 최적으로 생존할 수 있는 pH 환경을 조성하기 위하여 황산을 첨가해준다. 하지만, 본 실험에서는 황산을 첨가하지 않고 실험을 실시하였다. pH 조정을 실시하지 않은 이유는 황철석-용출 배양액의 황철석 표면에 토착박테리아가 부착할 수 있는지를 알기 위함이었다. 실험결과 pH를 조정하지 않아도 황철석 표면에 박테리아가 부착되는 것을 확인하였다. 하지만, pH를 조정하지 않아 황철석-용출 배양액에 철수산화물이 형성되었다. 이는 황철석으로부터 용출되는 이온 함량도가 낮게나온 것으로 해석된다. 광물로부터 이온 함량을 높이기 위해서는 pH 환경을 조성해준다면, 이온 함량이 높게 나타날 것으로 기대된다.

황철석 접종 초기에 황산으로 pH 조정을 하지 않아도 토착호산성박테리아들이 황철석에 잘 부착하는 것으로 보아 앞으로 황화광물로부터 유용금속을 보다 쉽게 회수할 수 있을 뿐만 아니라 광석 및 광미 폐석장 으로부터 중금속 이온도 쉽게 제거할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

Bennett, J.C. and Tributsch, H., 1978, "Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces", *Journal of Bacteriology*, v. 134, pp. 310-317.

Berry, V.K. and Murr, L.E., 1975, "Bacterial attachment to molybdenite: an electron microscope study", *Metallurgical Transactions 6B*, pp.488-490.

Berry, V.K., and Murr, L.E., 1978, "Direct Observations of bacteria and quantitative studies of their catalytic role in the leaching of low-grade, copper-bearing waste", L.E. Murr, A.E. Torma and A. Brierley, (eds)., Merallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic press, New York, pp. 103-136.

Brierley, C.L., 1978, "Bacterial leaching", *Critical Reviews in Microbiology*, v.6, pp. 207-262

Chapelle, F., 2001, Ground-water microbiology and geochemistry, John Wiley & Sons, Inc., 477p.

Edwards, K.J., Hu,B., Hamers, R.J. and Banfield, J.F., 2001, "A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 34, pp.197-206.

Ehrlich, H.L, and Fox, S.L., 1967, "Environmental effects on bacterial copper extraction from low grade copper sulphide ores", *Biotechnology and Bioengineering*, v.9, pp.471-485.

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*, v.13, pp.593-594.

Keller, L., and Murr, L.E., 1982, "Acid-bacterial and ferric sulfate leaching of pyrite single crystals", *Biotechnology and Bioengineering*, v.24, pp.83-96.

Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J. and Sand, W., 2003, "Bioleaching - a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS)", *Hydrometallurgy*, v.71, pp.83-88.

Konhauser, K., 2007, Introduction to geomicrobiology, Blackwell Publishing, 425p.

Landesman, J., Duncan, D. W. and Walden, C.C., 1966, "Iron oxidation by washed cell suspensions of the chemoautotroph, *Thiobacillus ferrooxidans*", Canadian Journal of Microbiology, v.12, pp.25-33.

MacDonald, D.G. and Clark, R.H., 1970, "Oxidation of aqueous ferrous sulfate by

Thiobacillus ferrooxidans". *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.48, pp.669-676

McGoran, C.J.M., Duncan, D.W., and Walden, C.C., 1969, "Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on various substrates", *Canadian Journal of Microbiology*, v.15, pp.135-137

Murr, L.E. and Berry, V.K., 1976, "Direct observations of selective attachment of bacteria on low-grade sulfide ores and other mineral surfaces", *Hydrometallurgy*, v.2, pp.11-24.

Omoike, A. and Chorover, J., 2006, "Adsorption to goethite of extrcellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.70, pp.827-838.

Poliani, C., and Donati, E., 1999, "The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.22, pp.88-92.

Rojas-Chapana, J.A. and Tributsch, H., 2004, "Interfacial activity and leaching patterns of *Lptospirillum ferrooxidans* on pyrite", *FEMS Microbiology Ecology*, v.47, pp.19-29.

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*, v. 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*, v.59, pp.159-175.

Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S. and Beveridge, T. J., 1996, "Mineralization of bacterial surface", *Chemical Geology*, v. 132. pp.171-181.

Seidel, A., Zimmels, Y. and Armon, R., 2001, "Mechanism of bioleaching of coal fly ash by *Thiobacillus ferrooxidans*", *Chemical Engineering Journal*, v.83, pp.123-130.

Shrihari, Kumar, R, and Gandhi, K.S., 1990, "Modelling of Fe^{2+} oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*", *Applied and Microbiology Biotechnology*, v.33, pp.524-528

Southwood, M.J., and Southwood, A.J., 1986, "Mineralogical observations on the bacterial leaching of auriferous pyrite, In R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.E. Ebner (eds.), Fundamental and Applied Biohydrometallurgy, Elsevier, New York. pp.98-113.

Torma, A.E., Walden, C.C., and Branion, R.M.R., 1970, "Microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate", *Biotechnology and Bioengineering*, v.12, pp501-517

Torma, A.E., Walden, C.C., Duncan, D.W. and Branion, R.M.R., 1972, "The effect of carbon dioxide and particle surface area on the microbiological leaching of a zinc sulphide concentrate", *Biotechnology and Bioengineering*, v.14, pp.777-786.

Torma, A.E.,1988, "Leaching of metals", *Biotechnology*, Vol.6B, pp.367-399.

Tributsch, H. and Rojas-Chapana, J. A., 2000, "Metal sulfide semiconductor electrochemical mechanisma induced by bacterial activity", *Electrochimica Acta*, V.45, pp.4705-4716.

Tributsch, H., 2001, "Direct versus indirect bioleaching", *Hydrometallurgy*, v.59, pp.177-185.

Widler, A.M. and Seward, T.M., 2002, "The adsorption of gold(1) hydrosulphide complexes by iron sulphide surfaces", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.66, pp.383-402.