



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2013年 2月

석사학위논문

토착호산성박테리아의 적응기간에
따른 생물학적 용출 효율

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

위대응

토착호산성박테리아의 적응기간에 따른 생물학적 용출 효율

- The Bioleaching Efficiency on Adaptation Period
of Indigenous Acidophilic Bacteria -

2013 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

위 대 응

토착호산성박테리아의 적응기간에
따른 생물학적 용출 효율

지도교수 박 천 영

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함.

2012 년 10 월

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

위 대 응

위대응의 석사학위 논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교수 한 오 형 印

위 원 조선대학교 조교수 강 성 승 印

위 원 조선대학교 교수 박 천 영 印

2012 년 11 월

조선대학교 대학원

목 차

| | |
|---|----|
| List of Tables | i |
| List of Figures | ii |
| Abstract | iv |
| 1. 서론..... | 1 |
| 2. 시료채취 및 실험방법..... | 4 |
| 2.1. 토착박테리아 채취 및 폐광석 채취..... | 4 |
| 2.2. 계대배양 및 성장-실험의 배양액 조성..... | 5 |
| 2.3. 토착박테리아 동정..... | 5 |
| 2.4. 적응실험..... | 9 |
| 2.5. 용출실험..... | 9 |
| 2.6. 분석방법..... | 10 |
| 3. 결과 및 고찰..... | 11 |
| 3.1. 토착박테리아의 DNA 분석 | 11 |
| 3.1.1. 세포 배양액 내 균주 확인..... | 11 |
| 3.1.2. 세균 DNA의 분리..... | 11 |
| 3.1.3. Cloning 및 DGGE 분석을 통한 미생물 군집 분석..... | 14 |
| 3.1.4. 우점 세균의 특성..... | 23 |
| 3.2. 광석광물..... | 24 |
| 3.3. 적응-배양액에서의 pH 변화..... | 29 |
| 3.5. 박테리아 부착 특성..... | 37 |
| 3.5. 적응효과에 따른 용출량 변화 및 향상..... | 41 |
| 4. 토 의..... | 46 |
| 5. 결 론..... | 50 |
| 6. 참 고 문 헌..... | 51 |

List of Tables

| | |
|---|----|
| Table 1. The similarity of 16S rRNA sequence for cloning from the indigenous acidophilic bacteria. | 16 |
| Table 2. The distribution of dominants for acidophilic bacteria using denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE). | 21 |

List of Figures

- Fig. 1. SEM image of indigenous acidophilic bacteria, a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria. The scale bar is 5.0 μm (a and b) in length. 12
- Fig. 2. The photograph of electrophoresis for the genomic DNA from the separated samples(a) and for the amplification of 16S rRNA genes(b). 1; Goseong bacteria, 2; Yeonhwa bacteria. 13
- Fig. 3. The photograph of electrophoresis for the cones. G1-G10; Goseong bacteria, Y1-Y10; Yeonhwa bacteria. 15
- Fig. 4. Phylogenetic tree for strains of acidophilic indigenous bacteria. (G1-G10); Goseong bacteria, (Y1-Y10); Yeonhwa bacteria. 18
- Fig. 5. The photograph of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for acidophilic indigenous bacteria of 16S rRNA. A; Goseong bacteria, B; Yeonhwa bacteria, M; marker. Arrows indicate the cloning and analyzed sequence bands. 20
- Fig. 6. The similarity analysis (UPGMA) of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for acidophilic indigenous bacteria of 16S rRNA sequence. G-bacteria; Goseong bacteria, Y-bacteria; Yeonhwa bacteria, M1 and M2; marker. 22
- Fig. 7. Reflected photomicrograph of ore specimen from the Goseong abandoned mine waste(magnification \times 160). Ch; chalcopyrite, Py; pyrite, G; galena. 25
- Fig. 8. Reflected photomicrograph of ore specimen from the Yeonhwa abandoned mine waste (magnification \times 160). Ch; chalcopyrite, Pyr; pyrrhotite, Sp; sphalerite. 26
- Fig. 9. X-ray diffraction patterns of the Goseong abandoned mine waste. Q; quartz, P; pyrite, Ch; chalcopyrite. 27
- Fig. 10. X-ray diffraction patterns of the Yeonhwa abandoned mine waste. P; pyrite, Pyr; pyrrhotite, G; galena. 28
- Fig. 11. The evolution of pH in the adaptation-medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ with indigenous bacteria (a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria (●; 3 weeks, ■; 6 weeks ▲; 9 weeks, ◆; 12 weeks)). 30

- Fig. 12. SEM image of indigenous bacterial layer on the filter paper from the adaptation-medium. Goseong bacteria have been adapted in the adaptation-medium for 21 days with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (a; 3 weeks, b; 6 weeks). 32
- Fig. 13. SEM image of indigenous bacterial layer on the filter paper from the adaptation-medium. Yeonhwa bacteria have been adapted in the adaptation-medium for 21 days with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (a; 3 weeks, b; 6 weeks). 33
- Fig. 14. The evolution of pH in the leaching-medium with mine waste ore (a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks(●), 6 weeks(■), 9 weeks(▲), 12 weeks(◆) and non-adaptation(○), respectively. 35
- Fig. 15. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the Goseong abandoned mine waste surface. 42 days after incubation with bacteria at Goseong abandoned mine waste leaching-medium. The scale bar is 5.00 μm (a) and 4.00 μm (b) in length. 38
- Fig. 16. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the Yeonhwa abandoned mine waste surface. 42 days after incubation with bacteria at Yeonhwa abandoned mine waste leaching-medium. The scale bar is 10.00 μm (a and b) in length. 40
- Fig. 17. Changes in the concentration of Cu during the bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria. (●; without bacteria (N/D), ○; non-adaptation bacteria, ■; 3 weeks adaptation bacteria, □; 6 weeks adaptation bacteria, ◆; 9 weeks adaptation bacteria, ◇; 12 weeks adaptation bacteria) 42
- Fig. 18. Changes in the concentration of Fe during the bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria. (●; without bacteria, ○; non-adaptation bacteria, ■; 3 weeks adaptation bacteria, □; 6 weeks adaptation bacteria, ◆; 9 weeks adaptation bacteria, ◇; 12 weeks adaptation bacteria) 45

Abstract

- The Bioleaching Efficiency on Adaptation period of Indigenous Acidophilic Bacteria -

By Wi, Dae-woong

Adv. Prof. : Park, Cheon Young

Dept. of Energy Resource Engineering
Graduate School, Chosun University

This study was carried out to leach the valuable metal ions from the mine waste ore using the adapted indigenous bacteria. First, collecting the indigenous bacteria in Goseong and Yeonhwa mine. polymerase chain reaction and 16S rRNA sequence were investigated to identify the indigenous acidophilic bacteria. In comparison sequences with the type strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*(ATCC 23270), the similarity of Goseong and Yeonhwa bacteria were obtained the range of 96.99–97.79% and 97.59–97.90%, respectively. The similarity of these bacteria were found 98.5% with the type strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by using DGGE in the cluster analysis. Therefore, Goseong and Yeonhwa bacteria were considered *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

In order to tolerance the heavy metals, the indigenous bacteria were repeatedly subcultured in the adaptation-medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3, 6, 9 and 12 weeks, respectively. As the adaptation experiment processed, the pH was rapidly decrease in the adaptation-medium of 6, 9 and 12 weeks more than flat of the 3 weeks. The result of bioleaching use the adapted bacteria for 42 days, the pH value of the adaptation-medium in the 3 weeks tend to increased, whereas the pH of 6, 9 and 12 weeks tend to decreased. In decreasing the pH value in the

adaptation-medium and in the leaching-medium, it was identified that the indigenous bacteria were adapted the Cu^{2+} ion and the mine waste ores. The contents of Cu and Fe in the leaching solution were usually higher leached in 6 weeks than 3 weeks due to the adaptation. Considering the bioleaching rates of Cu and Fe from these leaching solution, the highest increasing the efficiency metal ion were found to be Fe. Accordingly, it is expected that the more valuable element ions can be leached out from any mine waste, if the adapted bacteria with heavy metals are applied in future bioleaching experiment.

1. 서론

현재, 우리나라에 존재하는 가행 광산에서 유용금속을 회수하는 방법으로 주로 물리적 공법과 화학적 공법이 이용되고 있다. 대표적인 물리적 공법으로는 고압산화법이 있으며, 이는 단기간에 높은 회수율을 가질 수는 있으나 설치 유지비용이 너무 고가라는 단점이 있고, 화학적인 공법으로는 침화법과 아말감법 등이 있으며, 물리적 공법에 비해 경제적이고 회수율 또한 우수하나 추후에 발생하는 폐기물 처리가 어려워 환경적인 측면에서 큰 문제를 야기 시킨다. 이를 방지하기 위해 몇몇 국가에서는 dump leaching 혹은 heap leaching 등과 같이 박테리아를 황화광물에 적용하여 황화광물에서의 유용금속이온을 회수하는 생물학적 공법이 상용화되고 있으며, 이 공법은 다른 물리·화학적 공법에 비해 공정이 매우 단순하고 경비가 저렴할 뿐만 아니라 환경적인 문제가 거의 발생하지 않는 친환경적이라는 장점이 있다. 여기에 주로 사용되는 미생물은 호산성박테리아로 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)는 Temple and Colmer(1951)에 의해 처음으로 배양에 성공한 이래 황동석, 섬아연석, 방연석, 황철석, 황비철석, 자류철석, 휘동석 등으로부터 유용금속이온을 용출시킬 뿐만 아니라 황철석 혹은 황비철석으로부터 금을 회수하는데도 활용되고 있다(Bhakta and Arthur, 2002). *A. ferrooxidans*는 화학무기자영양체이기 때문에 무기영양성분, 대기 중의 무기 탄소 그리고 ferrous iron과 환원상태의 황을 산화시켜 활용하는 생리학적 특성을 갖고 있어 여러 종류의 황화광물로부터 유용금속이온을 용출시키는데 이용되고 있다(Leduc and Ferroni, 1994). 그러나 박테리아(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)를 이용하여 황화광물로부터 유용금속을 용출시킬 경우, 용출효율이 뛰어나지 못하다는 단점이 있다. 원인은 황화광물로부터 용출된 중금속이온이 박테리아에게 독성(toxicity)으로 작용하기 때문이다(Norris and Kelly, 1978; Norris and Barr, 1985; Das et al., 1997). 박테리아는 환경에 선택 (selection)되고 적응 (adaptation)하면서 계속 진화 (evolution)하는 미생물이다 (Woese, 1987). 따라서 박테리아가 중금속 이온의 독성에 내성(tolerance)을 갖게 할 수 있는 유일한 방법은 박테리아를 독성 이온에 노출시켜 계속 계대배양(subculture)을 수행하는 것이며, 내성이 향상된 박테리아를 이용한다면 용출효율은 향상된다 (Tuovinen et al., 1971; Das et al., 1998).

박테리아의 내성을 향상시키는 방법으로는 동일한 농도의 단일 독성 이온 혹은 두 종류 이상의 독성 이온을 혼합하여 계대배양을 계속 수행하는 방법(Tuovinen et al., 1971; Attia and Elzeky, 1989; Kai et al., 1995), 독성이온의 농도를 증가시켜가면서 계대배양을 계속 수행하는 방법(Natarajan and Iwasaki, 1983; Natarajan et al., 1994)과 용출 대상광석 시료에 노출시켜 계속 계대배양을 수행하여 적응시키는 방법(Attia and Elzeky, 1990; Barr et al., 1992; Elzeky and Attia, 1995; Shahverdi et al., 2001; Shi and Fang, 2004; Astudillo and Acevedo, 2008; Haghshenas et al., 2009) 등 크게 3가지가 있으며, 독성이온을 이용하는 경우, 배양용액에 독성이온과 박테리아의 산화에너지를 동시에 첨가하지만(Tuovinen et al., 1971; Natarajan et al., 1994), 광석시료에 노출시키는 경우는 광석시료가 박테리아의 산화에너지원으로 작용하기 때문에 따로 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 혹은 원소 황(S^0) 같은 산화에너지원은 첨가하지 않는다(Shi and Fang, 2004; Shi et al., 2006). 박테리아는 중금속이온에 노출되면 이중반응(biphasic response)이 일어나서, 저 농도에서는 적응이 일어나지만 고 농도에서는 사멸, 선택 혹은 돌연변이가 발생한다(Sadler and Trudinger, 1967). 본 연구에서 사용하고자 하는 토착호산성박테리아들은 그 지역 환경에 이미 선택되고 적응이 완성된 일종의 생물자원이며, 광산배수의 화학적 특성은 그 지역에서 산출되는 광석광물의 지구화학적 특성이 그대로 반영되고(Lottermose, 2007), 또한 이 광산배수에 서식하는 토착호산성박테리아들은 그 지역 광석광물로부터 용출된 중금속 이온의 독성에 이미 내성이 형성된 것이다(Das et al., 1998). 따라서 광석광물로부터 유용금속이온을 용출하고자 하는 경우, 그 지역 광산배수나 토양에 적응된 토착호산성박테리아를 이용하면 유용금속이온을 효과적으로 용출시킬 수 있다(Shi et al., 2006; Astudillo and Acevedo, 2008).

우리나라에서 토착호산성박테리아를 이용하여 광산폐석으로부터 유용금속 용출 연구 등이 Park et al.(2009, 2010a, 2010b, 2011), Ko et al.(2009), Han et al.(2010)에 의하여 수행되었으나 중금속 이온으로 토착호산성박테리아를 주기적으로 적응시켜 용출효율을 향상시키고자하는 연구가 아직 미진할 뿐만 아니라 토착호산성박테리아에 대하여 중합효소연쇄반응과 16S rRNA를 이용하여 종(species) 분류를 시도한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 우리나라에서 산출되는 광석광물로부터 미생물을 이용하여 유용금속이온을 용출시켜내기 위해서는 그 환경에 적응된 토착호산성박테리아의 정확한 종 분류가 필요하다.

따라서, 본 연구의 목적은 고성 동 광산, 연화광산에서 서식하는 토착호산성박테리아를 채취하여 중합효소연쇄반응과 16S rRNA 염기서열을 이용하여 계통발생학적으로 우 점종의 종 분류를 규명하고 이들이 중금속에 내성이 형성되도록 중금속 이온에 주기적으로 적응실험을 수행하였다. 그리고 중금속 이온에 비-적응된 박테리아와 적응된 박테리아를 각각 적용하여 폐광석으로부터 유용금속이온의 용출효율을 고찰하고자 하였다.

2. 시료채취 및 실험방법

2.1. 토착박테리아 채취 및 폐광석 채취

고성 토착박테리아는 경상남도 고성군 삼산면 미룡리에 소재하는 삼산제일광산 폐광석적치장의 토양에서 채취하였다(이하 고성박테리아, Goseong bacteria; G). 고성박테리아는 토양 박테리아로 토양의 상태는 동 광석에 의해 심하게 오염되어 적갈색으로 변색되어 있었다. 채취방법은 토양 100 g을 증류수 100 ml에 혼합하여 30분 이상 진탕하였다. 그리고 1시간 이상 방치한 뒤 그 위의 상등액 (pH = 3.5) 10 ml를 채취하여 성장-배양액 150 ml에 접종하고 항온 배양기 (HB-201SFO)를 이용하여 32℃에서 배양하였다. 연화 토착박테리아는 강원도 삼척시 가곡면 풍곡리 연화제2광산 광산배수(pH = 2.96)에서 채취하여(이하 연화박테리아, Yeonhwa bacteria; Y) 10 ml를 미리 준비된 성장-배양액 150 ml에 접종시켜 고성박테리아와 같은 방법으로 항온 배양기를 이용하여 32℃에서 배양하였다. 폐광석은 토착박테리아를 채취한 지역과 동일한 지역으로 경상남도 고성군 삼산면 미룡리에 소재하는 삼산제일광산 폐광석적치장에서 채취하였고(이하 고성 폐광석), 강원도 삼척시 가곡면 풍곡리 연화제2광산에서도 폐광석을 채취하였다(이하 연화 폐광석). 이들 폐광석은 조크라샤와 디스크 밀로 크기 1 mm이하로 파쇄한 후 체(sieve)를 이용하여 입도사이즈 -20 mesh(약 0.85 mm)로 준비하였다.

2.2. 계대배양 및 성장-실험의 배양액 조성

토착박테리아가 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) 0.15 g/L를 사용하였다. 토착박테리아를 접종하기 전 성장-배양액은 멸균기(SW-90AV100)에서 121°C, 1.4기압으로 15분간 고압 멸균하였고, 뿐만 아니라 고성 폐광석, 연화 폐광석, 500 ml 삼각플라스크, 기타 실험기구들 121°C, 1.4기압으로 15분간 고압 멸균 처리하여 사용하였다. 고성박테리아는 17회, 연화박테리아는 11회 계대 배양된 토착박테리아의 성장-배양액 10 ml를 채취하여 위와 같은 조성의 성장-배양액 150 ml에 각각 접종하고 항온배양기에서 32°C로 교반 없이 배양하였다.

2.3. 토착박테리아 동정

(1) DNA 분리 방법

박테리아 배양액을 원심분리기를 이용하여 침전시킨 후 박테리아의 genomic DNA를 분리하였다. 박테리아 침전물에 SET(20% Sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 7.6]) 1.8 ml와 lysozyme solution(5 mg/ml in TE) 62 μl 을 첨가하고, 37°C에서 30분간 rotating oven에서 반응시킨 후 25% SDS 16 μl 을 첨가하여 동일한 온도에서 30분간 rotating oven에서 더 반응시켰다. 반응물에 proteinase K(20 mg/ml in D.W) 50 μl 을 넣고 55°C에서 2시간 rotating oven에서 더 반응시켰다. 이 반응물에 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액을 첨가한 후 원심분리하여 상등액을 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 용액이 들어있는 새로운 tube에 옮겼다. 상등액에 1/10 부피의 8 M LiCl₂와 2배 부피의 냉각된 ethanol을 첨가하고 -20°C 에서 overnight 시킨 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethanol로 washing 하였다. 건조된 DNA를 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)에 용해시킨 후 실험에 사용할 때까지 -20°C 에서 냉동

보관하였다.

DNA 순도측정을 위해 genomic DNA의 shearing 및 명도를 확인하기 위해 1% agarose에서 전기영동하여 확인하고, DNA 순수성은 specspectrophotometer(Ultro 2100 pro, Amersham Biosciences)로 정량하였다.

(2) 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 PCR반응

16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 세균에 특이적으로 부착하는 27F(E.colinumbering 8~27; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(E.colinumbering 1492~1510; 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하였다(Lane, 1991). PCR 증폭을 위한 반응액 구성은 주형 DNA 10 ng, 200 uM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, 3 mM MgSO₄, 20 µg BSA, 1U Taqpolymerase 그리고 forward와 reverse primer 각각 0.5 uM로 총 volume을 50 ul로 하였다.

PCR은 GenAmp™ PCR System9700(AppliedBiosystem)을 이용하였으며, PCR 반응 조건은 pre-denaturation 과정으로 94°C에서 3분간 수행하였고, denature(94°C, 30초), annealing(50°C, 30초), elongation(72°C, 5분)반응을 총 30회 반복하고 post-elongation(72°C, 10분)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 증폭산물을 확인하였다.

(3) Cloning 및 DGGE분석을 통한 미생물 균집 분석

Cloning은 증폭된 double-strand DNA에 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 단일 염기 서열을 가진 clone으로 분리하기 위해 pGEM-T easy vector system(Promega, USA)을 이용하였다. PCR 증폭산물과 vector의 농도를 3 : 1 비율로 첨가하고 2 × ligation buffer, T4 DNA ligase를 혼합 및 반응 후 E. col DH5α competent cell에 형질전환시켜 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside; Promega, USA), IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside; Promega, USA), ampicillin(50 mg/ml)이 포함된 LB agar 배지에서 blue/white colony 선별 방법에 의해 형질전환된 white clone을 선별하였다. 임의로 선정된 white colony를 direct reamplified PCR 방법으로 증폭하였다. 이때 사용한 primer는 vector 내에 존재하는 pGTf(5' -TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3)와 pGTr(5' -ACT CAA GCT ATG CAT CCA ACG C-3')primer를 사용하였고 (Chun et al., 1999), PCR 조건은 16S rRNA 유전자와 동일한 방법으로 하였다.

DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) PCR은 1차 PCR 산물을 주형(template)으로 사용하여, 2차 PCR 하였다. 2차 PCR은 16S rRNA 유전자의 V3 부분에 해당하는 primer에 GC-clamp를 부착한 341F(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518(5'-ATT ACC GCG GCK GCT G-3')를 제작하여 사용하였다. PCR 반응액은 1차 PCR와 동일하며, PCR 조건은 94℃ 5분간 초기 DNA 변성 후, 94℃ 30초, 65℃부터 56℃까지 2cycle 마다 1℃씩 온도를 내려가며 30초, 72℃ 30초 후 그리고 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초씩 10회 반복하며 마지막으로 72℃에서 7분간 반응하였다.

DGGE 전기영동 수행은 D-code system(Bio-Rad)을 이용하였다. 이때 사용한 polyacrylamide gel 농도는 8%이며 gel 크기는 20 cm × 16 cm(W × H)로 제작하였다. Gel은 두께 1 mm 로 하고, 40% polyacrylamide bis-solution 29 : 1(3.3%) 40% 와 60% 사이로 농도구배가 수직으로 일정하게 형성하도록 제작하였다. 이때 사용한 변성제로는 7 M urea와 40%(w/v) formamide이다. Running buffer로는 TAE buffer(20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)이며, loading dye(0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 70% glycerol)와 PCR 산물을 1 : 1로 혼합한 후 60 V로 12시간 전기영동 하였다.

염기서열 분석을 위해 증폭된 밴드를 오려 멸균된 2차 증류수 30 μ l에 하루 동안 냉장 보관 하였다. 16S rRNA 유전자의 V3 부분의 GC-Clamp를 제거하기 위해서 GC-Clamp가 없는 primer를 이용하여 재 증폭하였고, 증폭된 산물을 정제 과정을 거친 후 pGEM-T easy vector에 삽입하여 Escherichia coli DH5a에 형질 전환 하였다. 형질전환 된 클론을 선별하여 염기서열 분석하였다.

전기영동상 PCR 산물의 시료간 단편의 위치 분석은 Gelcompar II program(Applied Maths, Belgium)을 이용하였으며, similarity matrice의 cluster 분석은 UPGMA를 이용하였다.

(4) 16S rRNA 유전자의 염기서열 계통분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>)을 이용하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>)을 이용하여 Clustal X multiple alignment로 정렬하여 계통수(phylogenetic tree) 제작에 이용하였다. 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor distance model (Jukes & Cantor, 1969)로 사용하여 추정하였으며, Neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다. Neighbor-joining data의 bootstrap 분석 시 1,000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하고 (Felsenstein, 1985) 이를 토대로 계통수를 작성하였다 (Maidak et al., 1994).

2.4. 적응실험

토착박테리아 적응실험은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 성장-배양액에 10 g/L을 첨가시켜 3주(21일) 주기로 계대배양하였다(이하 적응-배양액). 적응실험이 종료되는 21일에 토착박테리아가 접종된 적응-배양액 10 ml를 다시 신선한 적응-배양액에 첨가하여 계대배양하였다. 물론 이 신선한 적응-배양액에도 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 용해시켰다. 이는 서론에서 언급했던 첫 번째 방법으로 박테리아가 Cu^{2+} 이온에 내성을 갖도록 3주(21일) 주기로 반복 계대배양하는 것이다(Tuovinen et al., 1971; Attia and El-Zeky, 1990b). 이 때 황산(H_2SO_4)을 이용하여 고성박테리아의 경우 초기 pH는 2.62로 조정하였고, 연화박테리아의 경우 초기 pH는 2.82로 조정하였다. 이는 계대배양하는 30일 동안 성장-배양액에서 박테리아를 배양시켰을 때 안정적으로 나타난 pH 값이다.

2.5. 용출실험

Factor로는 박테리아가 없는 대조시료, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 적응시키지 않은 박테리아, 3주, 6주, 9주, 12주 동안 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L의 Cu^{2+} 이온에 내성이 형성된 박테리아, 즉 고성박테리아, 연화박테리아가 포함된 적응-배양액 10 ml를 고성 폐광석, 연화 폐광석(0.85 mm)에 각각 접종시켜 용출실험을 수행하였다(이하 용출-배양액(leaching-solution, 150 ml)). 용출-배양액의 무기영양원은 계대배양에서 사용하였던 무기영양원과 동일하게 하였으며, 산화에너지원은 고성박테리아가 포함된 적응-배양액을 사용한 시료에는 고성 폐광석 1.5 g/L, 연화박테리아가 포함된 적응-배양액을 사용한 시료에는 연화 폐광석 1.5 g/L을 각각 사용하였다. 용출배양액의 초기 pH는 황산(H_2SO_4)을 첨가하여 각각 2.62, 2.82로 한번 조정하였고 42일 동안 미생물학적 산화가 일어나도록 32°C를 유지하였다.

2.6. 분석방법

고성 폐광석과 연화 폐광석을 연마편으로 제작하여 편광현미경(polarization microscope)으로 관찰하였다. -200 mesh로 분쇄된 고성 폐광석과 연화 폐광석에 대하여 XRD로 정성분석하였고, 화학분석은 수질공정시험법에 의해 30 ml 시험관에 -200 mesh로 미분쇄 된 고성 폐광석과 연화 폐광석을 0.75 g씩 각각 첨가한 뒤 heating block(model; DMB-2, 24 hole)을 70°C로 설정하여 왕수(질산(HNO_3) : 염산(HCl) = 1(1.8 ml) : 3(5.4 ml))를 7.2 ml를 첨가하여 분해한 후 1시간 동안 방치시켰다. 1시간 뒤에 증류수를 22.8 ml를 첨가하여 원자흡광분광기(atomic absorption spectrophotometer, AA-7000, Shimadzu, Japan)를 이용하여 화학분석하였다. 간접적으로 박테리아가 잘 적응하고 성장하였는지 알아보기 위해 3일 간격으로 적응-배양액, 용출-배양액의 pH(Horiba, Japan)를 측정하였다. 박테리아는 적응실험과 용출실험이 종료된 후 적응-배양액 10 ml를 0.2 μm 여과지로 여과하고 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 고정하고 에틸알코올(ethyl alcohol) 75%, 85%, 95%, 99%순으로 탈수하여 SEM(scanning electron microscopy, S4800, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 3일 간격으로 2 ml씩 채취한 용출-배양액의 유용금속함량은 원자흡광분광기(atomic absorption spectrophotometer, AA-7000, Shimadzu, Japan)로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 토착박테리아의 DNA 분석

3.1.1. 세포 배양액 내 균주 확인

세포 배양액을 원심 분리하여 농축된 배양액 10 μ l를 slide glass에 도말하여 광학현미경(optical microscope)을 통해 확인하였다. 고성 및 연화박테리아 배양액 내 세포의 형태는 짧은 막대형(short rod) 혹은 막대형(rod) 세균들이 SEM에서 관찰되었다(Fig. 1).

3.1.2. 세균 DNA의 분리

배양액 50 ml를 농축하여 genomic DNA를 추출한 결과, 고성 그리고 연화 박테리아시료의 DNA 농도는 각각 1.5 그리고 1.1 μ g로 확인되었다(Fig. 2a). 추출된 genomic DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자를 PCR 하여 2개 시료 모두 약 1.5kb에 해당하는 증폭 산물을 확인하였다(Fig. 2b).

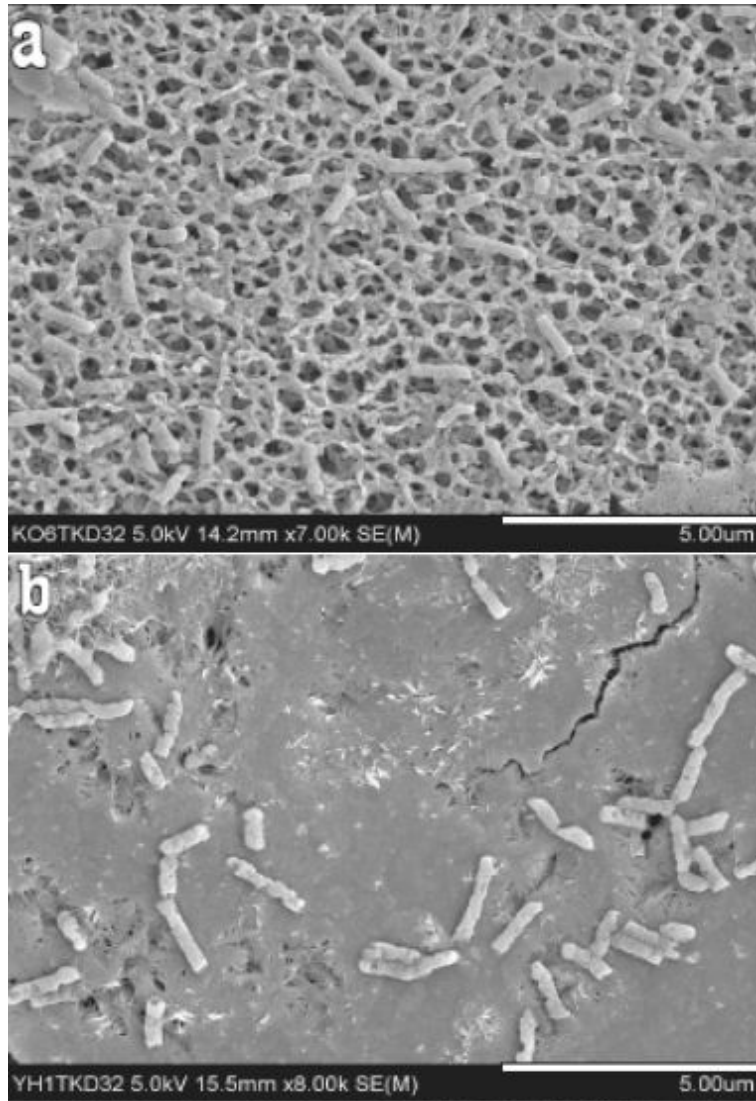


Fig. 1. SEM image of indigenous acidophilic bacteria, a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria. The scale bar is 5.0 μm (a and b) in length.

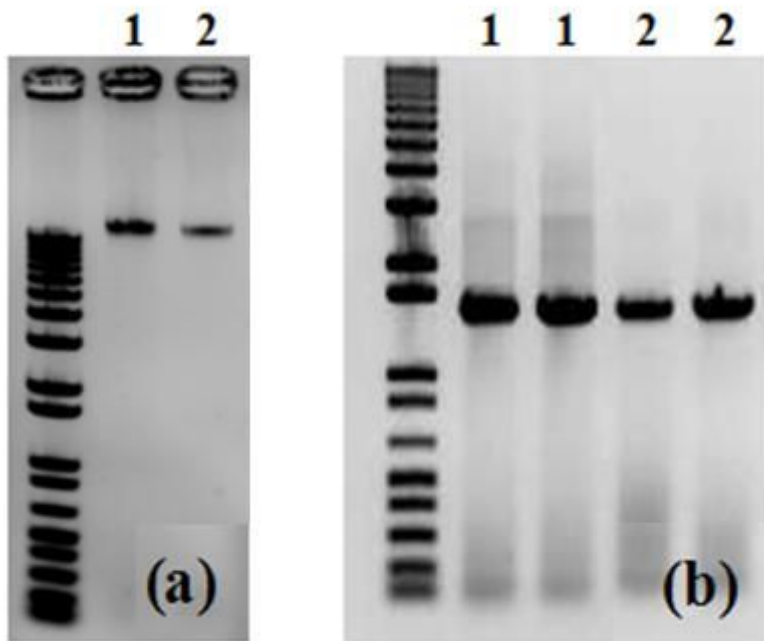


Fig. 2. The photograph of electrophoresis for the genomic DNA from the separated samples(a) and for the amplification of 16S rRNA genes(b). 1; Goseong bacteria, 2; Yeonhwa bacteria.

3.1.3. Cloning 및 DGGE 분석을 통한 미생물 군집 분석

(1) 16S rRNA cloning 을 이용한 세균들의 계통분석

토착호산성박테리아 내 세균의 군집을 분석하기 위해 세균에 특이적인 27F forward 와 1492R reverse primer를 사용하여 약 1,500 bp 크기에 해당하는 PCR 산물을 확인 하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자를 pGEM-T vector에 삽입한 후 *E. coli* DH5a competent cell에 형질 도입하여 얻어진 clone을 1개 시료 당 10개 클론을 무작위 적으로 선별하여 pGETf forward와 pGETr reverse primer로 재 증폭하여 삽입된 16S rRNA 유전자의 크기를 전기영동 결과 모두 1.5kb의 크기임을 확인하였다. 2 개의 샘플에서 얻어진 총 20개 clone이 전기영동에서 16S rRNA 염기서열이 분석 되었다(Fig. 3). 분석된 염기서열은 EzTaxon server를 이용하여 동정하였으며 그 결과에 따른 유사성 결과는 Table 1에 나타내었다.

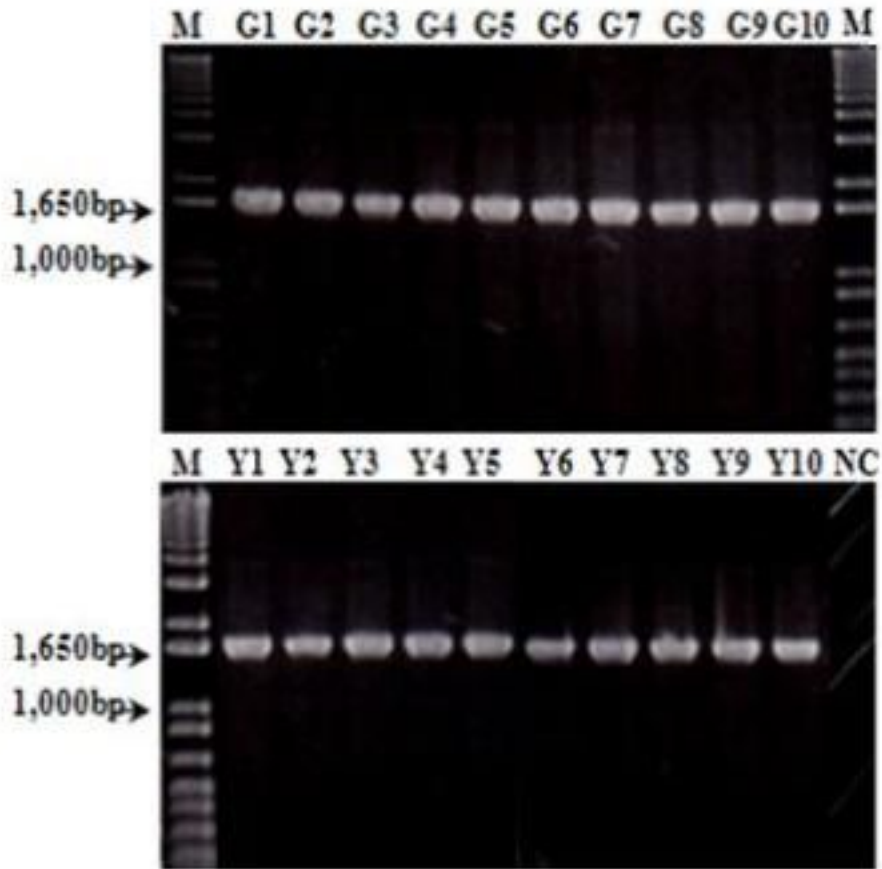


Fig. 3. The photograph of electrophoresis for the cones. G1-G10; Goseong bacteria, Y1-Y10; Yeonhwa bacteria

Table 1. The similarity of 16S rRNA sequence for cloning from the indigenous acidophilic bacteria.

| Sample Name | Clone No. | Nearest type strain | Strain No. (ATCC) | NCBI No. | Pairwise Similarity | Diff/Total nt* |
|-------------|-----------|---------------------------------------|-------------------|----------|---------------------|----------------|
| G-bacteria | G1 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.32 | 40/1494 |
| | G2 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 96.99 | 45/1494 |
| | G3 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.72 | 34/1493 |
| | G4 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.39 | 39/1494 |
| | G5 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.32 | 40/1494 |
| | G6 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.66 | 35/1494 |
| | G7 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.79 | 33/1494 |
| | G8 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.47 | 37/1461 |
| | G9 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.61 | 18/753 |
| | G10 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.20 | 41/1466 |
| Y-bacteria | Y1 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.59 | 36/1493 |
| | Y2 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.66 | 35/1494 |
| | Y3 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.59 | 36/1493 |
| | Y4 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.66 | 35/1494 |
| | Y5 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.79 | 33/1494 |
| | Y6 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.90 | 29/1383 |
| | Y7 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.83 | 31/1430 |
| | Y8 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.76 | 32/1431 |
| | Y9 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.90 | 29/1383 |
| | Y10 | <i>A. ferrooxidans</i> | 23270(T) | CP001219 | 97.83 | 30/1380 |

고성 박테리아에 존재하는 10개 클론들은 모두 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 표준균주(ATCC 23270)와 96.99 - 97.79%의 유사도 지수를 보였다. 또한 서로간의 염기서열 유사도 지수는 98.36 - 99.93% 범위로 매우 높게 분석되었다. 따라서 10개 클론 모두는 단일 종으로 사료되며, 진화적 유연관계를 나타내는 계통도에서도 이를 확인 할 수 있다(Fig. 4).

연화 박테리아에 존재하는 10개 클론들은 모두 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 표준균주와 97.59 - 97.90% 의 유사도 지수를 보였다. 또한 서로간의 염기서열 유사도는 지수는 99.57 - 100% 범위로 매우 높게 분석되었다. 따라서 10개 클론 모두는 단일 종으로 사료되며, 진화적 유연관계를 나타내는 계통도에서도 이를 확인 할 수 있다(Fig. 4).

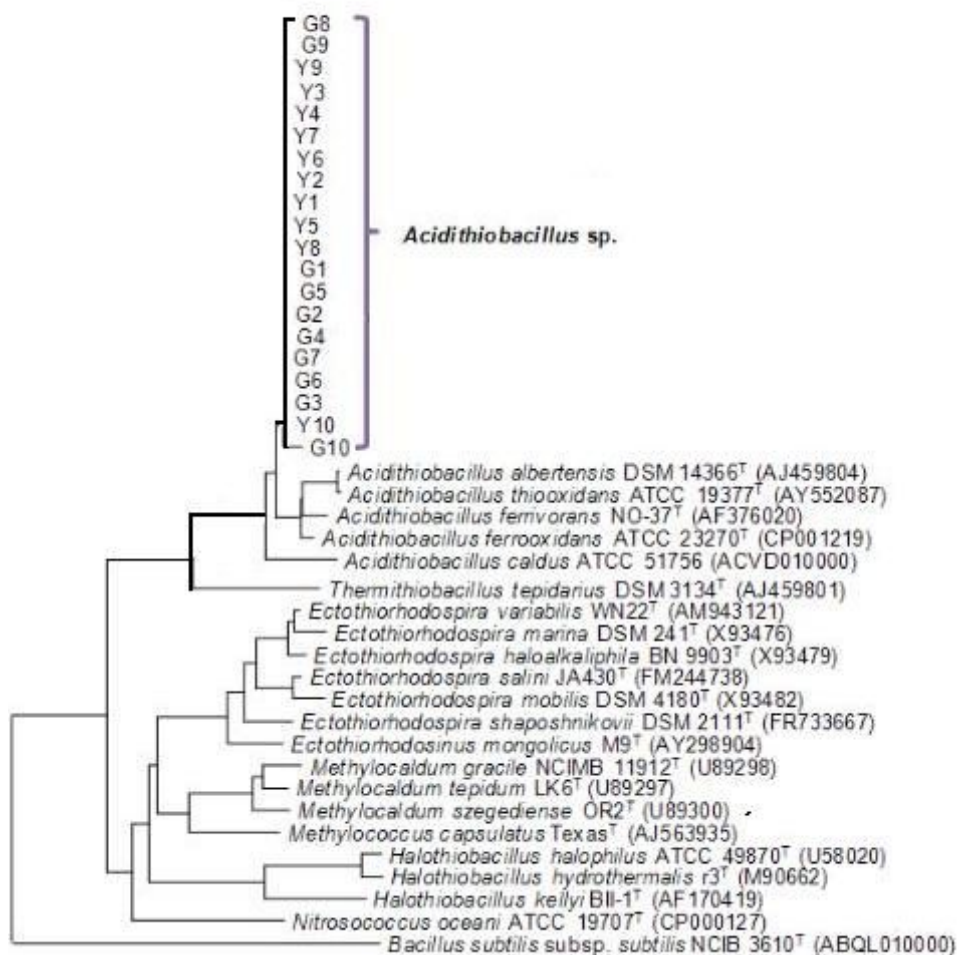


Fig. 4. Phylogenetic tree for strains of acidophilic indigenous bacteria. (G1-G10); Goseong bacteria, (Y1-Y10); Yeonhwa bacteria

(2) DGGE를 이용한 세균군집분석

DGGE 방법을 통해 16S rRNA 유전자의 V3 부분에 대한 패턴은 Fig. 5과 같다. 총 6개의 band(고성 박테리아, 4 band; 연화 박테리아, 2 band)를 선별하였다(Fig. 5). 선별 기준은 band의 진하기와 각 sample을 비교하여 서로 다른 위치에 나타난 band를 elution하였다. 각 밴드의 염기서열 분석 후 EzTaxon server를 통해 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. DGGE 밴드 상에서 증폭산물이 많을수록 그 환경 내 특정 균주가 우점 한다고 할 수 있다. 고성 박테리아, 연화 박테리아 시료 모두에서 가장 진하게 증폭 위치를 보이는 부분은 각각 2, 3번 밴드 위치였다. 이 세 밴드 모두는 동일한 위치로 판명되었고, 염기서열 분석결과 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 표준균주와 가장 가까운 유사도 지수로 나타났다. 또한 2개의 밴드는 염기서열이 100% 일치 하였다. 이 결과는 direct cloning으로 분석에서 2개의 클론을 제외한 18개의 클론이 *Acidithiobacillus ferrooxidans*와 가장 가깝게 분석된 것과 일치한다.

고성 박테리아 시료에서는 1, 5 = 4, 2번 순으로 밴드의 농도가 높은 것을 확인 할 수 있었다. 염기서열 분석결과 각각 *Acidithiobacillus ferrooxidans*(98.5%), *Luteibacteranthropi*(91.8%), *Deinococcusaquatilis*(98.3%), *Thermoflavimicrobiumdichotomicum*(93.6%)로 가장 가까운 유사도 지수를 보였다.

연화 박테리아 시료에서는 3, 6번이 농도가 높은 것을 확인 하였고, 염기서열 분석결과 각각 *Acidithiobacillus ferrooxidans*(98.5%)와 *Luteibacter anthropi*(91.8%) 균주와 가장 가까운 유사도 지수를 보였다.

2개의 샘플의 DGGE 밴드 패턴 간 상호 연관관계를 파악하고자 UPGMA 방법으로 분석하였다(Fig. 6). 분석 결과 고성 박테리아와 연화 박테리아가 상호 유사도가 높음을 확인 할 수 있었다.

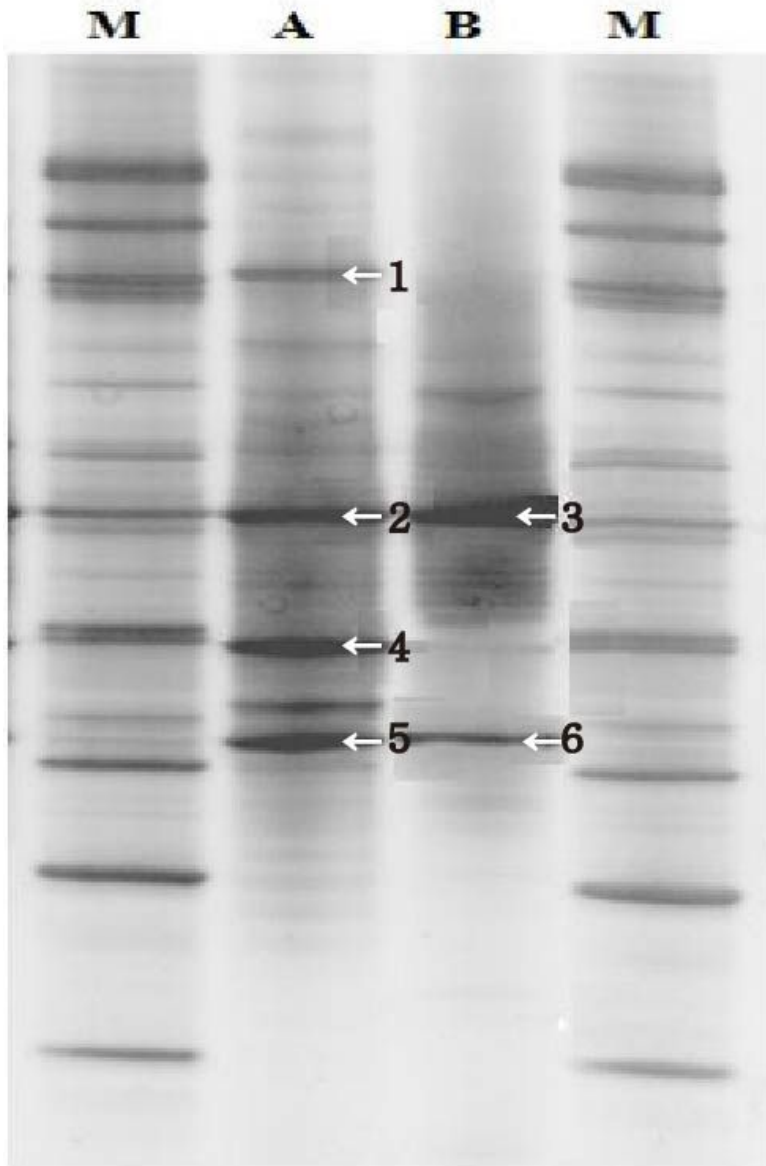


Fig. 5. The photograph of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) for acidophilic indigenous bacteria of 16S rRNA. A: Goseong bacteria, B: Yeonhwa bacteria, M: marker. Arrows indicate the cloning and analyzed sequence bands.

Table 2. The distribution of dominants for acidophilic bacteria using denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE).

| Band No. | Sources | Nearest type strain | Accession No. | Similarity | Diff/Total nt |
|----------|------------|---|--------------------------|------------|---------------|
| 1 | G-bacteria | <i>Thermoflavimicrobium dichotomicum</i> KCTC 3667(T) | AF138733 | 93.6 | 11/172 |
| 2 | G-bacteria | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270(T) | CP001219 | 98.5 | 3/194 |
| 3 | Y-bacteria | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270(T) | CP001219 | 98.5 | 3/194 |
| 4 | G-bacteria | <i>Luteibacter anthropi</i> CCUG 25036(T) | FM212561 | 91.8 | 16/194 |
| 5 | G-bacteria | <i>Deinococcus aquatilis</i> CCUG 53370(T) | AM940971 | 98.3 | 3/181 |
| 6 | Y-bacteria | <i>Acidiphilium organovororum</i> ATCC 43141(T) | D30775 | 99.4 | 1/168 |

G-bacteria: Goseng bacteria, Y-bacteria: Yeonhwa bacteria

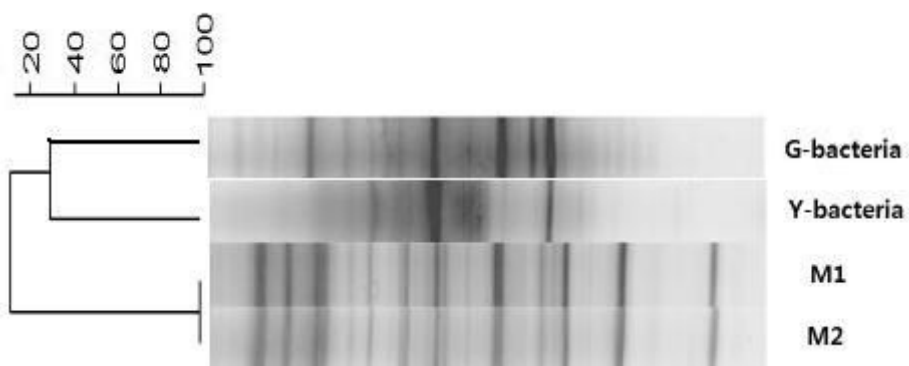


Fig. 6. The similarity analysis(UPGMA) of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) for acidophilic indigenous bacteria of 16S rRNA sequence. G-bacteria; Goseong bacteria, Y-bacteria; Yeonhwa bacteria, M1 and M2; marker.

3.1.4. 우점 세균의 특성

고성 박테리아 및 연화 박테리아 시료에 존재하는 세균 모두는 *Acidithiobacillus* 속(genus)에 속하는 종(species)으로 분석되었다. *Acidithiobacillus* 속은 분류학적 위치는 *Proteobacteria* 문(phylum), *Gammaproteobacteria* 강(class), *Acidithiobacillales* 목(order), *Acidithiobacillaceae* 과(family)에 속하며, *Acidithiobacillaceae* 과에는 유일하게 *Acidithiobacillus* 속만 존재한다. *Acidithiobacillus* 속은 Kelly와 Wood(2000)에 의해 *Thiobacillus* 속의 *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* 및 *Thiobacillus caldus* 종을 현재의 *Acidithiobacillus* 속으로 재분류 하였다. *Acidithiobacillus* 속의 표준 균주는 *Acidithiobacillus thiooxidans* 이며, 현재 5종이 존재한다.

(<http://www.bacterio.cict.fr/a/acidithiobacillus.html>)

3.2. 광석 광물

고성 폐광석과 연화 폐광석을 연마편으로 제작하여 반사편광현미경으로 관찰한 결과 고성 폐광석은 황철석(pyrite): 55.5%, 황동석(chalcopyrite): 10.5%, 방연석(galena): 5.1% 등이 함유되었고(Fig. 7), 연화 폐광석의 경우, 자류철석(pyrrhotite): 60.8%, 섬아연석(sphalerite): 20.4%, 황동석(chalcopyrite): 3.75% 등이 함유되어 있었다(Fig. 8). 고성 폐광석에서는 직사각형의 모양에 강도가 강하여 매끈하지 못하고 거친 표면들이 특징인 황철석들과 동 광산의 대표적인 광물인 황동석이 많이 관찰되었으며, 연화 폐광석에서는 황동석과 섬아연석은 용리구조로 나타나며, 자류철석은 황동석과 공생광물로 산출되었다.

본 실험에 사용되는 폐광석을 보다 더 자세히 알아보기 위해 -200 mesh로 미분쇄하여 XRD를 이용하여 정성분석을 실시하였다. 실시한 결과, 고성 폐광석의 경우 황철석, 황동석, 석영 등이 주요 광물임을 확인할 수 있었고(Fig. 9), 연화 폐광석의 경우 광물의 조성이 황철석, 자류철석, 방연석 등으로 이루어져 있었음을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 수질공정시험법에 의해 왕수분해한 뒤 원자흡광분석기를 이용하여 화학 분석한 결과 연화 폐광석은 Fe가 61.3%, Cu가 10.16%, Zn이 28.51%로 측정되었고, 고성 폐광석은 Fe가 44.86%, Cu가 33.82%, Pb가 14.67%, Zn이 6.55%로 과거에 동 광산이었던 삼산제일광산 폐석적치장에서 채취한 고성 폐광석이 연화 폐광석보다 Cu 함량이 더 높게 나타났다.

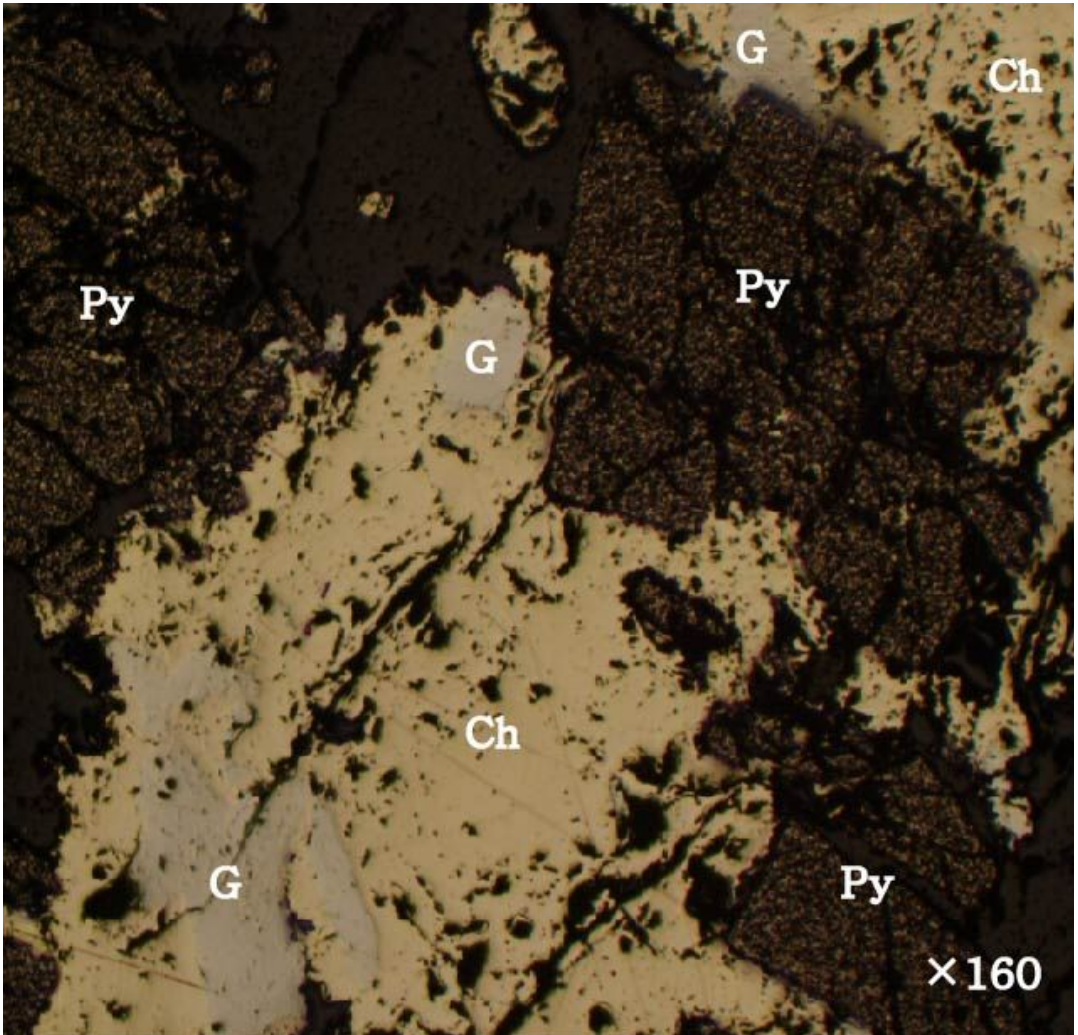


Fig. 7. Reflected photomicrograph of ore specimen from the Goseong abandoned mine waste(magnification×160). Ch; chalcopyrite, Py; pyrite, G; galena

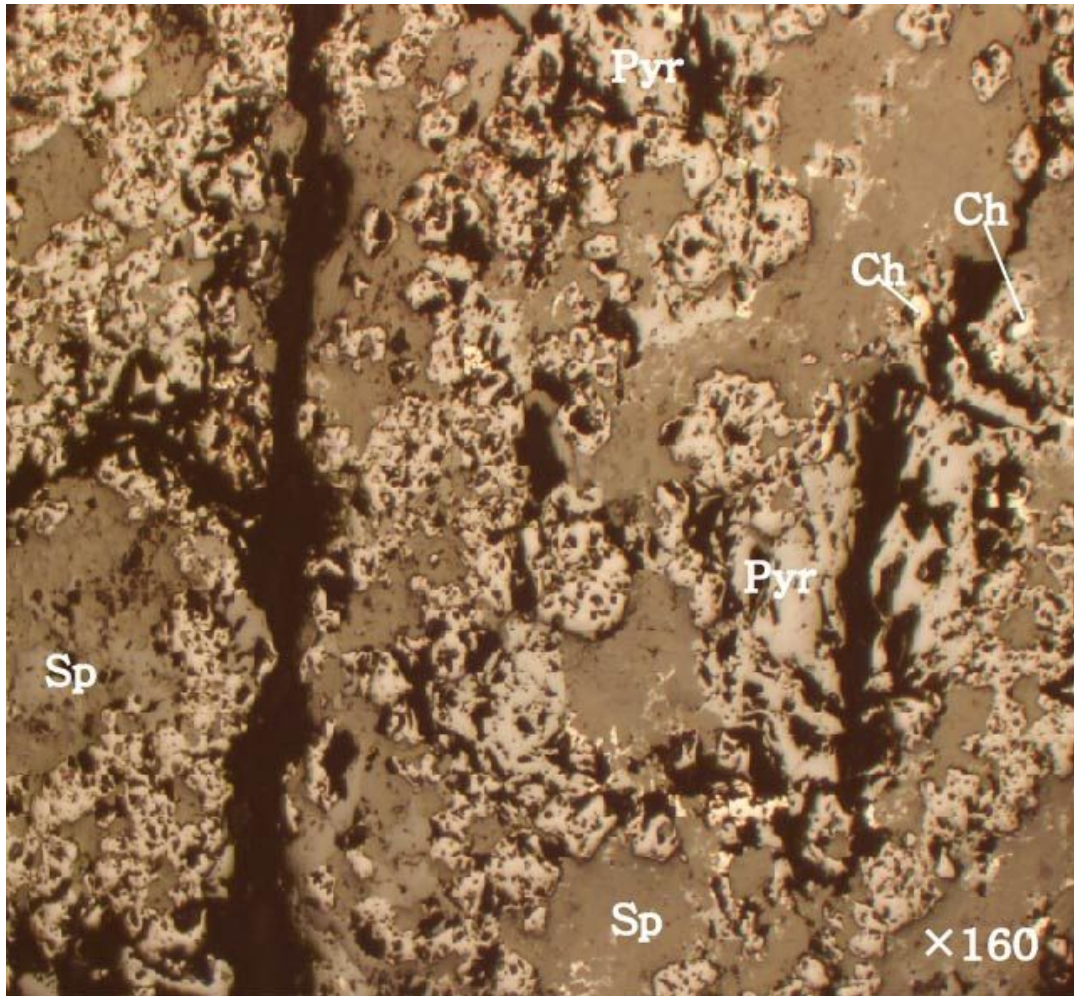


Fig. 8. Reflected photomicrograph of ore specimen from the Yeonhwa abandoned mine waste(magnification×160). Ch; chalcopyrite, Pyr; pyrrhotite, Sp; sphalerite

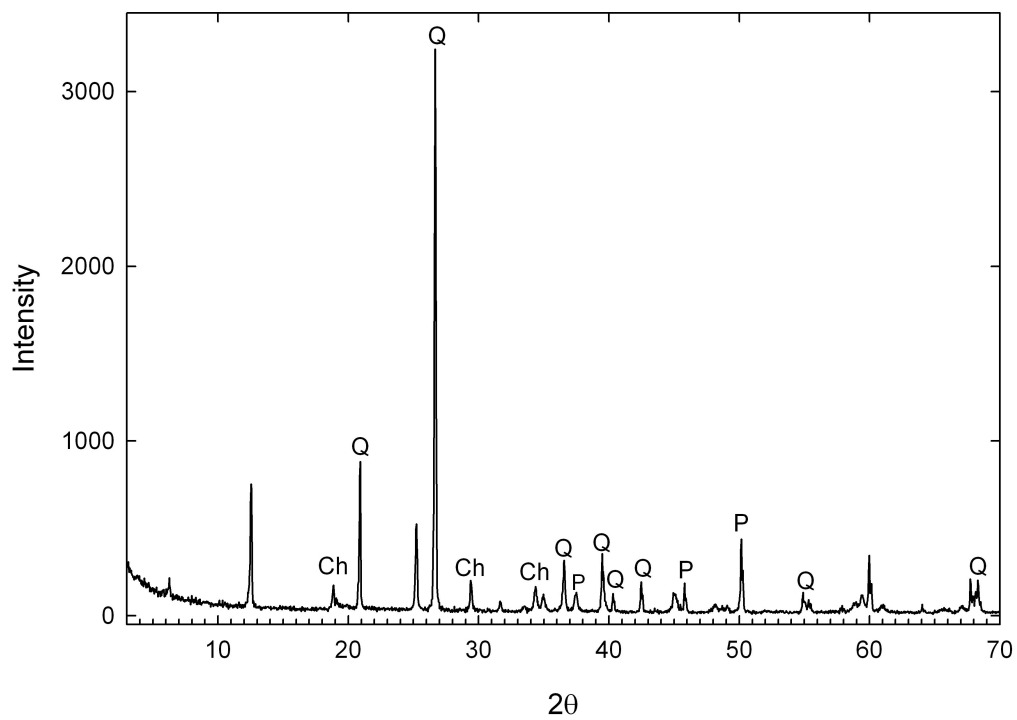


Fig. 9. X-ray diffraction patterns of the Goseong abandoned mine waste. Q; quartz, P; pyrite, Ch; chalcopyrite

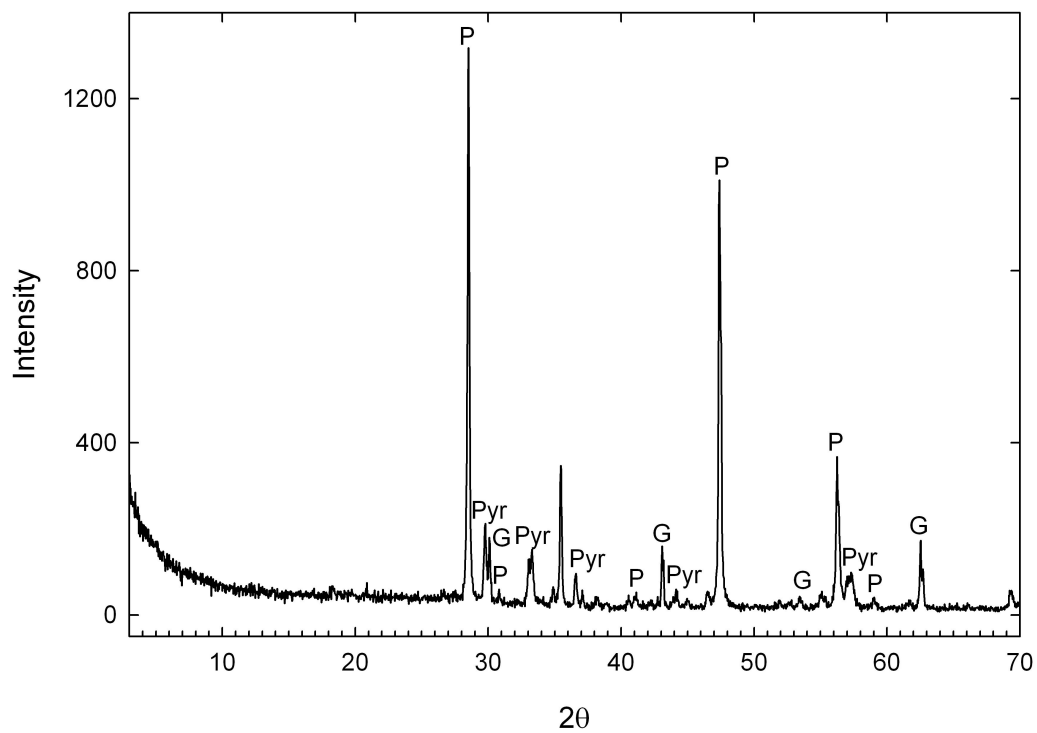


Fig. 10. X-ray diffraction patterns of the Yeonhwa abandoned mine waste. P; pyrite, Pyr; pyrrhotite, G; galena

3.3. 적응-배양액에서의 pH 변화

본 연구의 목적 중금속이온이 함유된 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 용해된 적응-배양액에서 고성 토착박테리아와 연화 토착박테리아가 성장함에 따라 pH가 감소하였다(Fig. 11). 적응실험이 진행되는 3주, 6주, 9주 및 12주 초기 pH는 황산을 사용하여 고성 토착박테리아가 접종된 적응-배양액은 2.62, 연화 토착박테리아가 접종된 적응-배양액은 2.82로 각각 조정하였다. pH 조정은 초기에 한 번 수행하였다. 고성 및 연화 토착박테리아 모두 3주 적응-배양액의 pH는 박테리아가 성장함에 따라 비교적 서서히 감소하였으나 6주 적응-배양액의 pH는 매우 빠르게 감소하였고, 6주 적응-배양액 보다 9주 적응-배양액의 pH가 더 빨리 감소하였으며, 9주 보다 12주 적응-배양액에서 pH가 가장 빠르고 많이 감소하였음을 확인하였다.

연화 토착박테리아가 접종된 3주 적응-배양액의 초기 pH는 2.82였으나 21일에는 2.33으로 감소하였고, 6주 적응-배양액의 초기 pH 역시 2.82에서 21일에는 1.69로 더 많이 감소하였다. 9주 적응-배양액에서는 6주 적응-배양액보다 더 낮은 1.44로 측정 되었고, 12주 적응-배양액에서는 9주 적응-배양액보다 더 낮은 1.4로 측정되었다(Fig. 11a).

고성 토착박테리아가 접종된 3주 적응-배양액의 초기 pH는 2.62였으나 21일에는 2.13으로 감소하였고, 6주 적응-배양액의 초기 pH 역시 2.62에서 적응실험 종료된 21일 후에는 1.61까지 감소하였으며, 9주 적응-배양액에서는 초기 pH 2.62에서 1.44까지 감소하였다. 4차 적응실험인 12주 적응-배양액에서는 3차 적응실험 즉, 9주 적응-배양액에서 보다 더 낮은 1.4까지 감소하였다(Fig. 11b).

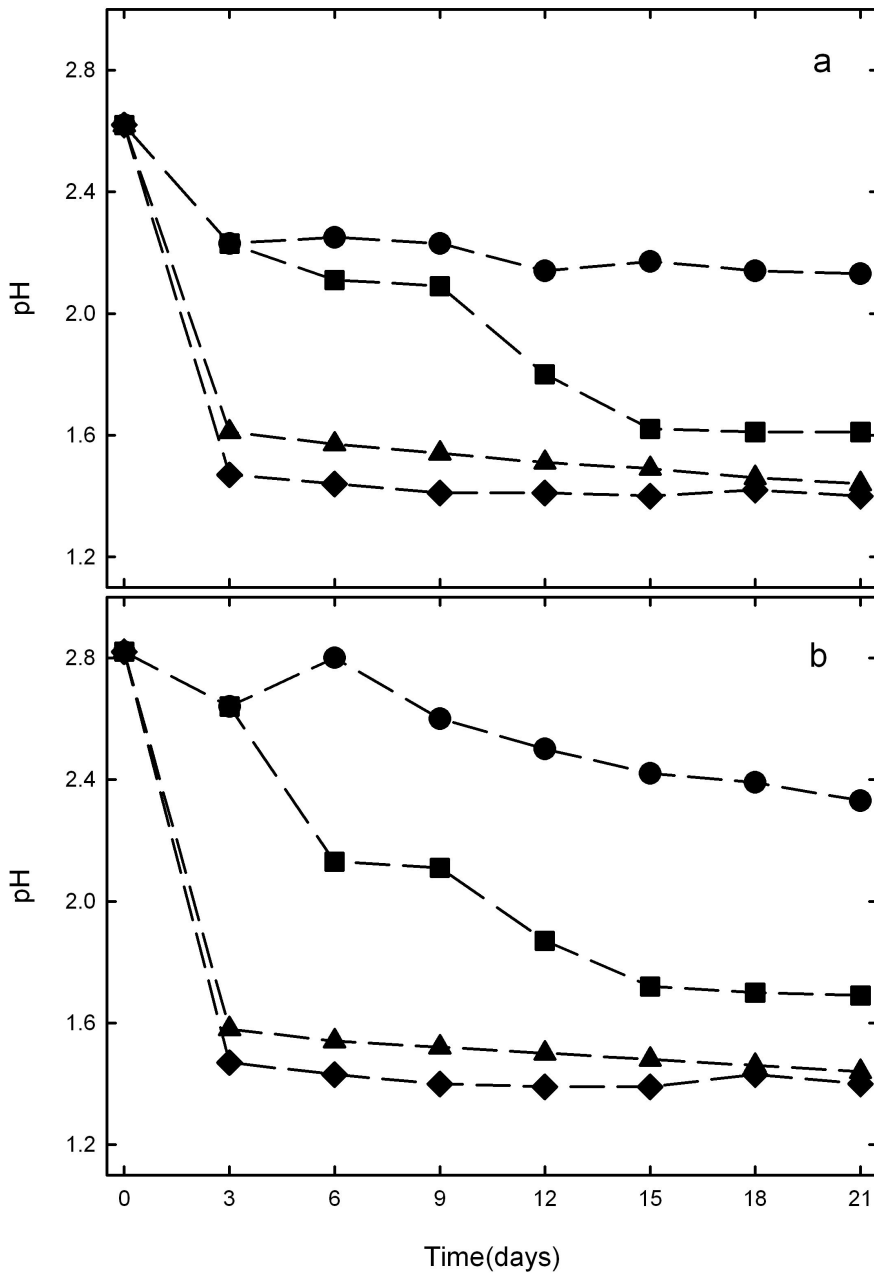


Fig. 11. The evolution of pH in the adaptation-medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ with indigenous bacteria(a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria(●; 3 weeks, ■; 6 weeks ▲; 9 weeks, ◆; 12 weeks)).

3주, 6주, 9주 및 12주 적응-배양액의 pH 감소는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 적응기간이 길수록 빠르고 더 낮게 감소하였다. 이와 같은 결과는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 고농도의 Cu^{2+} 이온이 박테리아에게 독성으로 작용하여 고성 및 연화 토착박테리아에 내성을 길러준 것으로 사료된다. 즉, 고농도의 Cu^{2+} 이온에 의해 적응실험 초기에는 토착박테리아의 대사활동에 장애를 받아 산화활동이 느리게 일어나게 되고 이로 인해하여 pH 감소가 서서히 일어난 것으로 사료된다.

Fig. 12은 3주와 6주 적응실험이 완료된 21일에 적응-배양액 10 ml(21일)를 여과지로 여과하여 SEM에서 관찰한 토착박테리아들의 모습이다. 수많은 박테리아들이 막대 모양으로 여과지에 층을 형성하였다. 적응-배양액에는 10 g/L의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 각각 용해되어 있어서 21일 동안 고농도의 Cu^{2+} 이온이 독성으로 작용하였을 것이다. 그러나 Cu^{2+} 이온의 독성에도 불구하고 Fig. 13과 Fig. 14와 같이 수많은 박테리아들이 관찰되었다는 것은 고성 및 연화 토착박테리아 모두 Cu^{2+} 이온에 어느 정도 내성이 형성되었음을 의미하는 것으로 생각한다(Rawlings and Kusno, 1994).

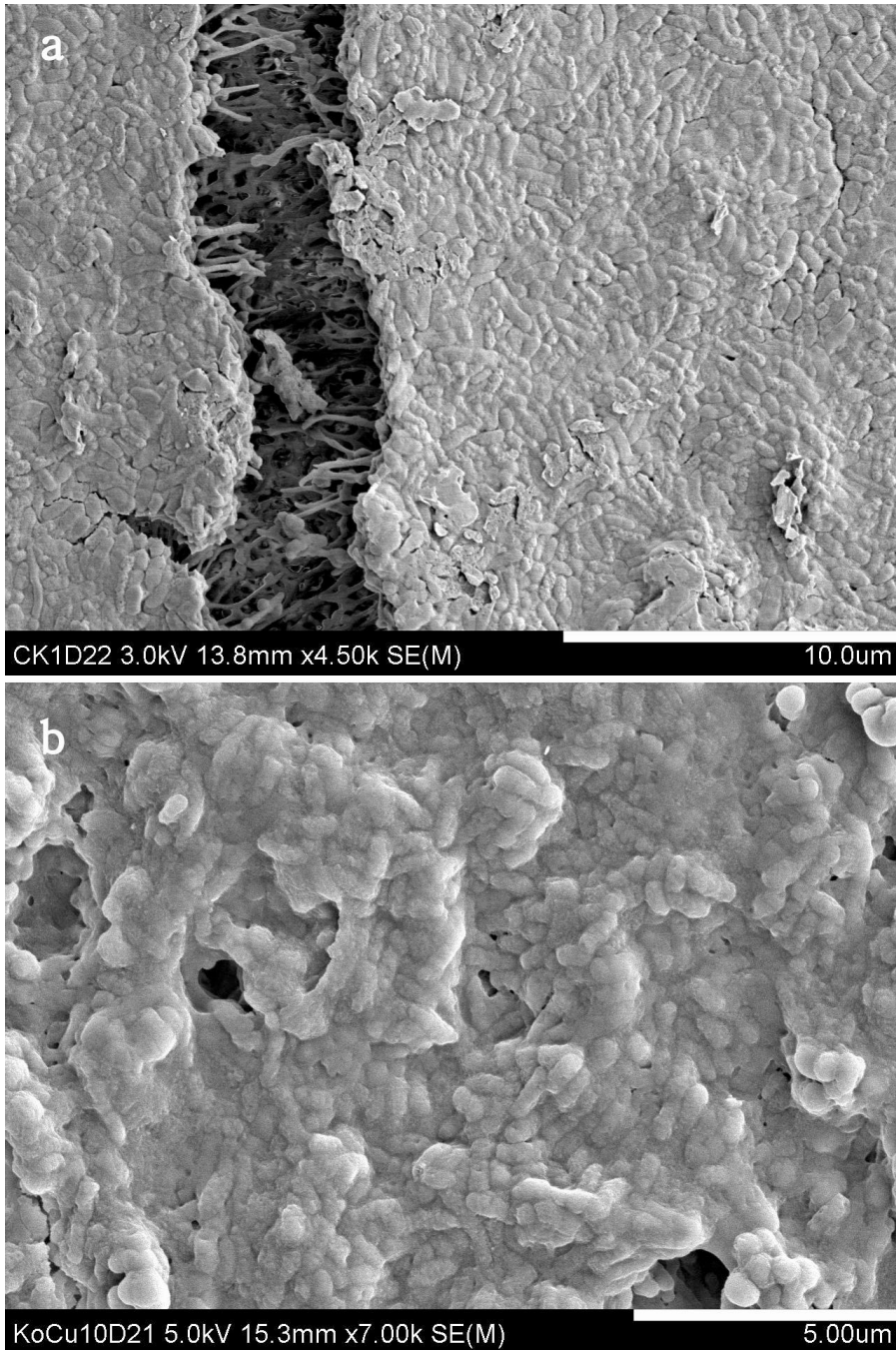


Fig. 12. SEM image of indigenous bacterial layer on the filter paper from the adaptation-medium. Goseong bacteria have been adapted in the adaptation-medium for 21 days with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (a; 3 weeks, b; 6 weeks).

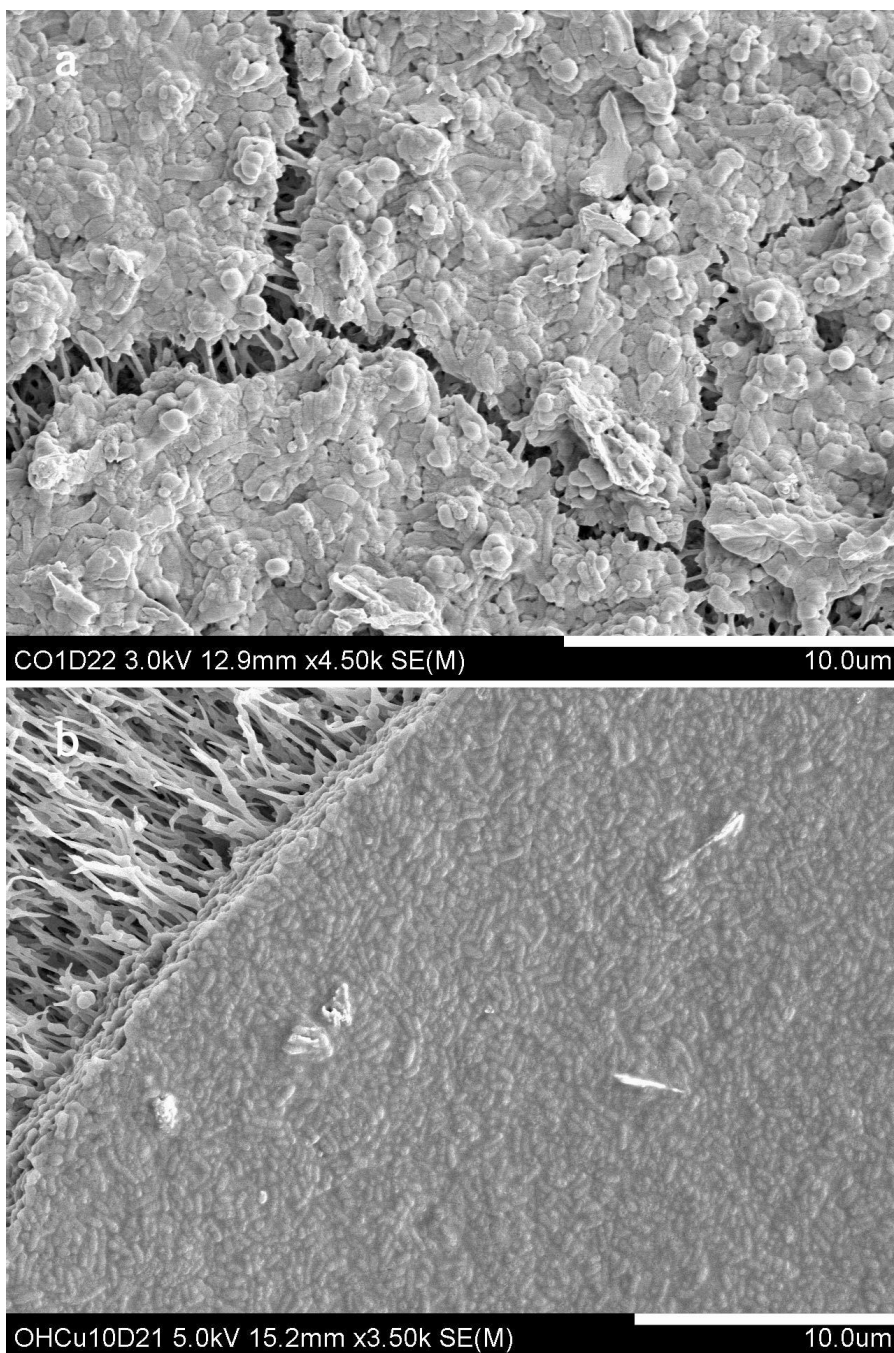
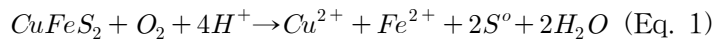


Fig. 13. SEM image of indigenous bacterial layer on the filter paper from the adaptation-medium. Yeonhwa bacteria have been adapted in the adaptation-medium for 21 days with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (a; 3 weeks, b; 6 weeks).

3.4. 용출-배양액에서의 pH 변화

Cu^{2+} 이온에 3주, 6주, 9주, 12주 동안 적응된 고성 박테리아와 연화 박테리아를 고성 폐광석 및 연화 폐광석에 각각 접종하였으며, 42일 동안 미생물용출이 일어나도록 $32^{\circ}C$ 를 유지하였다. 42일 동안의 pH 변화를 Fig. 14에 나타냈다. 적응 3주 박테리아들에 의한 용출-배양액의 pH들은 대체로 초기 pH 조정(고성박테리아 = 2.62, 연화박테리아 = 2.82) 이 후 감소하는 경향을 보였으나 용출 후기로 갈수록 증가하는 경향으로 나타났다. 이와 같이 적응 3주 박테리아가 포함된 용출-배양액에서 pH가 증가하는 경향을 보이는 것은 박테리아에 의한 생물학적 산화보다 무기적 산화작용이 우세하게 일어나기 때문이다(Sampson et al., 2005). 무기적 산화작용이 일어날 때 산소 반응에 의하여 다음과 같이 pH가 증가한다. 광석에 포함된 황동석이 산소에 의해 무기적 화학작용이 일어나며 수소이온이 소비되기 때문이다. 산소의 직접적인 산화작용으로 수소이온이 소비되는 반응은 다음과 같다(Mousavi et al., 2005).



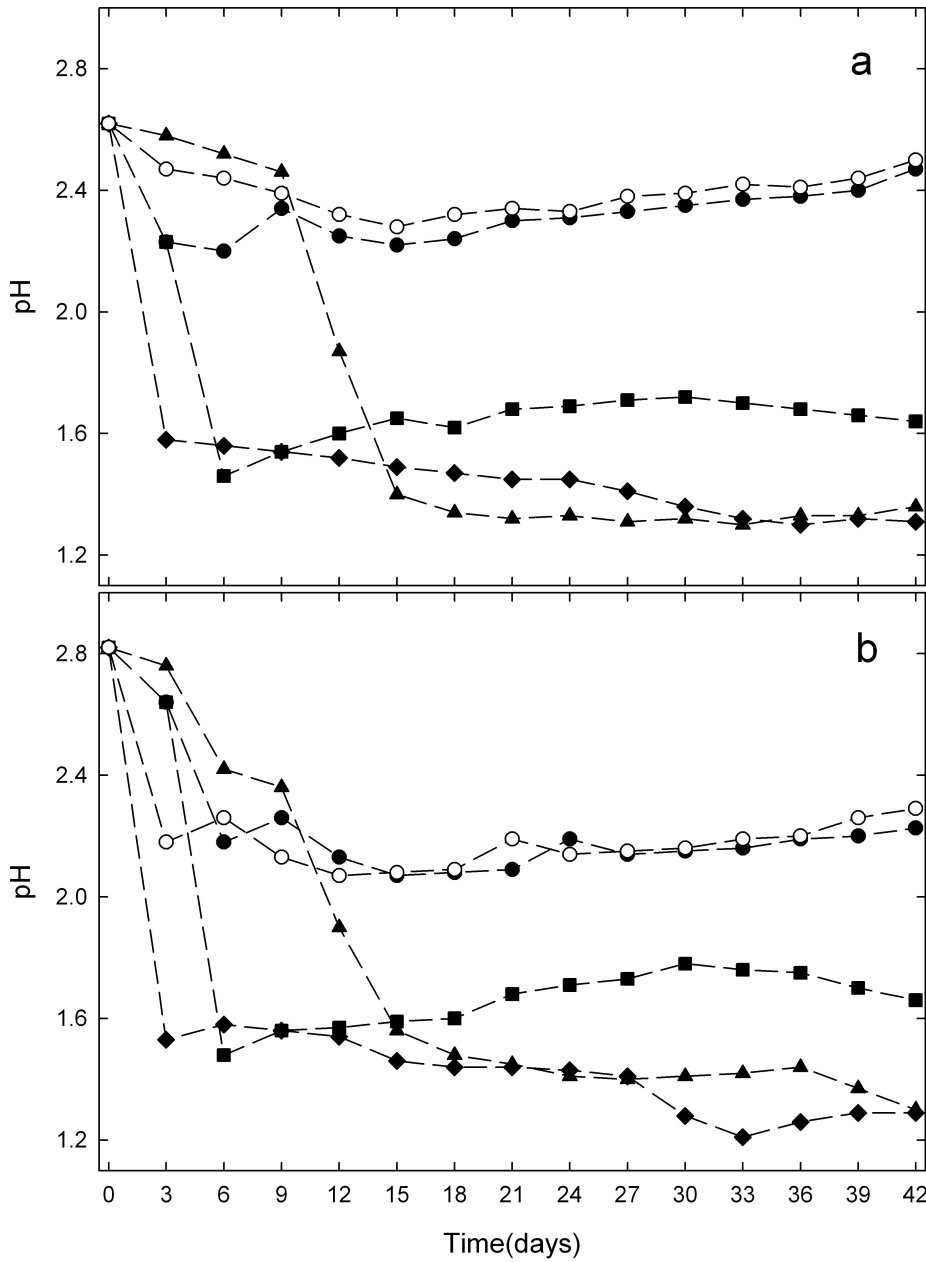
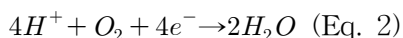
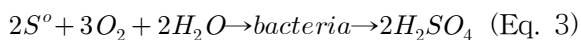


Fig. 14. The evolution of pH in the leaching-medium with mine waste ore (a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria). The bioleaching experiments were carried out by using the adapted bacteria with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks(●), 6 weeks(■), 9 weeks(▲), 12 weeks(◆) and non-adaptation(○), respectively.

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



본 연화 폐광석의 경우에는 자류철석이 상대적으로 제일 많이 산출된다(Fig. 8). 따라서 정지전압이 낮은 자류철석이 용출-배양액에서 양극(anode)으로 작용하고 황동석이나 섬아연석은 음극(cathode)으로 작용하였을 것이다(Ahonen et al., 1986). 그러므로 자류철석 표면에서 Fe^{2+} 가 용출되고 황동석이나 섬아연석 표면에서 H_2O 가 생성되었을 것이다(Mehta and Murr, 1982, 1983; Natarajan and Iwasaki, 1983; Ballester et al., 1989). 적응 6주, 9주 및 12주의 박테리아에 의한 용출-배양액의 pH들은 초기 pH 조정 이후 증가 경향을 보였으나 용출실험 말기에는 감소경향으로 나타났다. 용출실험 말기에 pH가 감소하는 원인은 박테리아에 의하여 미생물학적 산화작용이 우세하게 일어나기 때문이다. 이는 적응된 박테리아의 활동으로 인하여 황화광물에 포함되어 있던 원소 황이 산화되어 황산이 생성되기 때문이다 (Attia and El-Zeky, 1990a).



따라서 6주, 9주, 12주 적응 박테리아들에 의해서 생물학적 산화작용이 우세하게 일어나고, 또한 갈바니반응이 동시에 일어났을 것이다. 만약 갈바니 반응이 일어났다면, 정지전압이 낮은 자류철석 표면에서는 많은 양의 Fe^{2+} 가 방출되었을 것이고 음극으로 작용하는 황동석이나 섬아연석 표면에서는 상대적으로 적은 양의 Cu 이온이 용출되었을 것이다.

3.5. 박테리아 부착 특성

Fig. 15는 고성 토착호산성박테리아를 고성 폐광석 용출-배양액에 접종한지 42일 즉 용출실험이 종료된 후 고성 폐광석의 표면이다. Fig. 15에서 막대모양의 토착호산성박테리아들이 고성 폐광석 표면에 군집을 이루어 부착되었고(Fig. 15a), 토착호산성박테리아들이 부착한 고성 폐광석 표면은 크랙(crack)이 발달된 부분이다(Fig. 15b). 이와 같이 토착호산성박테리아들이 고성 폐광석 표면의 파쇄면에 군집을 이루어 부착하는 원인은 고성 폐광석의 결함이 있는 장소를 박테리아들이 선호하기 때문으로 사료된다.

토착호산성박테리아들은 광석의 결정구조가 불완전한 장소, 화학적으로 결함이 약한 장소, 또는 결정격자 구조에 변위가 일어난 장소를 선택하는 것으로 알려져 있다. 즉 이러한 장소들은 토착호산성박테리아들이 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(Brierly, 1978), 황화광물 표면에 결함이 있는 부분에 박테리아가 선택적으로 부착하는 것으로 알려져 있다(Berry and Murr, 1975; Murr and Berry, 1976).

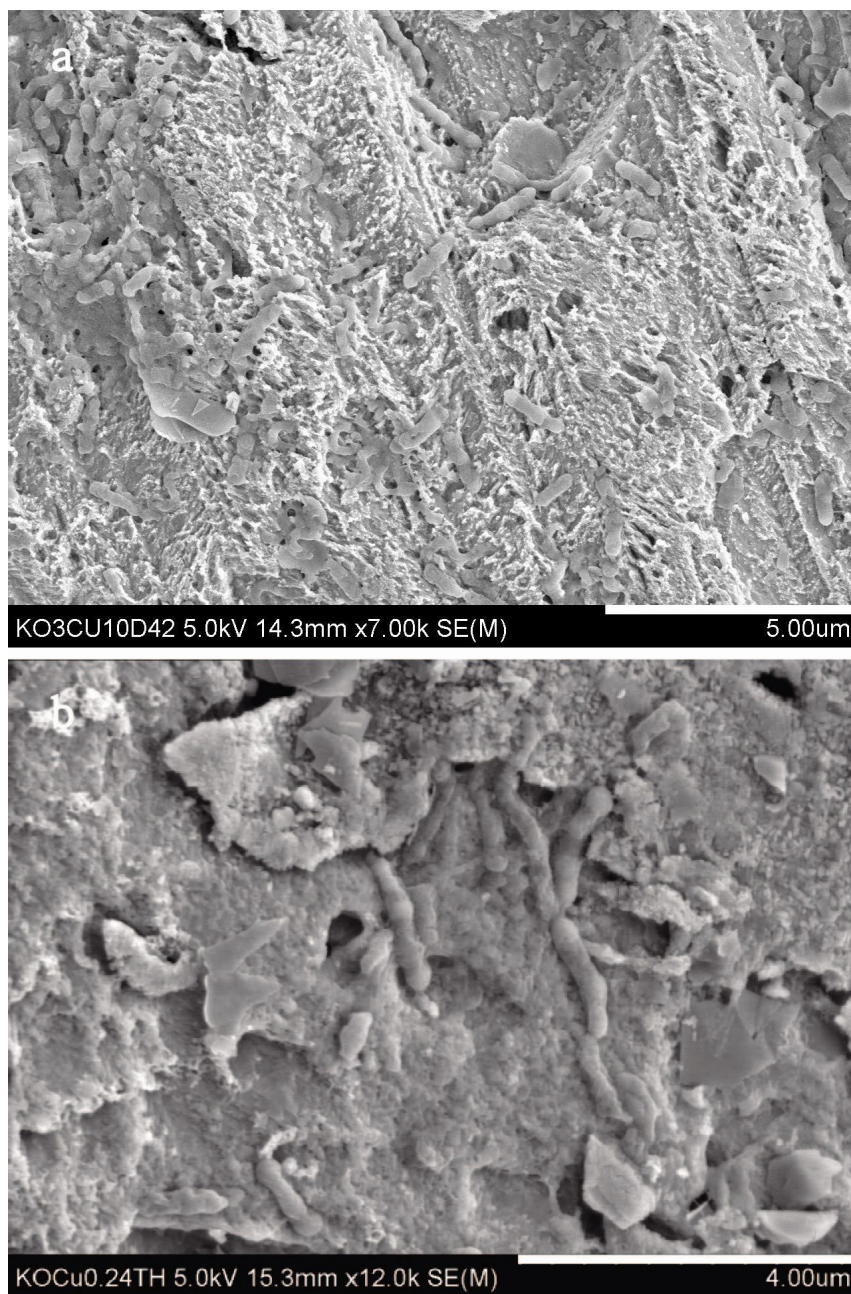


Fig. 15. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the Goseong abandoned mine waste surface. 42 days after incubation with bacteria at Goseong abandoned mine waste leaching-medium. The scale bar is 5.00 μm (a) and 4.00 μm (b) in length.

Fig. 16은 연화 토착호산성박테리아를 연화 폐광석 용출-배양액에 접종하여 용출 실험이 종료된 42일이 경과된 연화 폐광석의 표면이다. Fig. 16에서 보듯이 Fig. 15보다 Fig. 16에서 보다 더 많은 토착호산성박테리아들이 연화 폐광석 표면에 부착되어 있었다. 표면에 부착되어 있는 토착호산성박테리아들의 모양은 보통 알려진 막대모양 뿐만 아니라, 고리모양, S자모양 등의 형태학적으로 돌연변이로 추정되는 박테리아가 관찰되었다(Fig. 16a). 미생물체는 중금속이온에 노출되면 이중반응이 일어나서, 저 농도에서는 적응이 일어나지만 고농도에서는 사멸, 선택 혹은 돌연변이가 발생한다고 알려져 있다(Salder and Trudinger, 1967).

Fig. 16b는 Fig. 16a 보다 더 많은 곳의 크랙과 홀(hole)이 존재하였으며, 막대모양의 토착호산성박테리아들이 연화 폐광석 표면을 다 뒤덮고도 결함이 있는 크랙과 홀 속에 부착되어 있었다. 이는 고성 폐광석으로 용출 실험했을 때와 동일한 특성으로 박테리아가 산화에너지가 얻기 쉬운 결함이 있는 부분 즉, 광석 표면의 크랙이나 홀 속에 토착호산성박테리아가 선택적으로 부착한 것으로 사료된다.

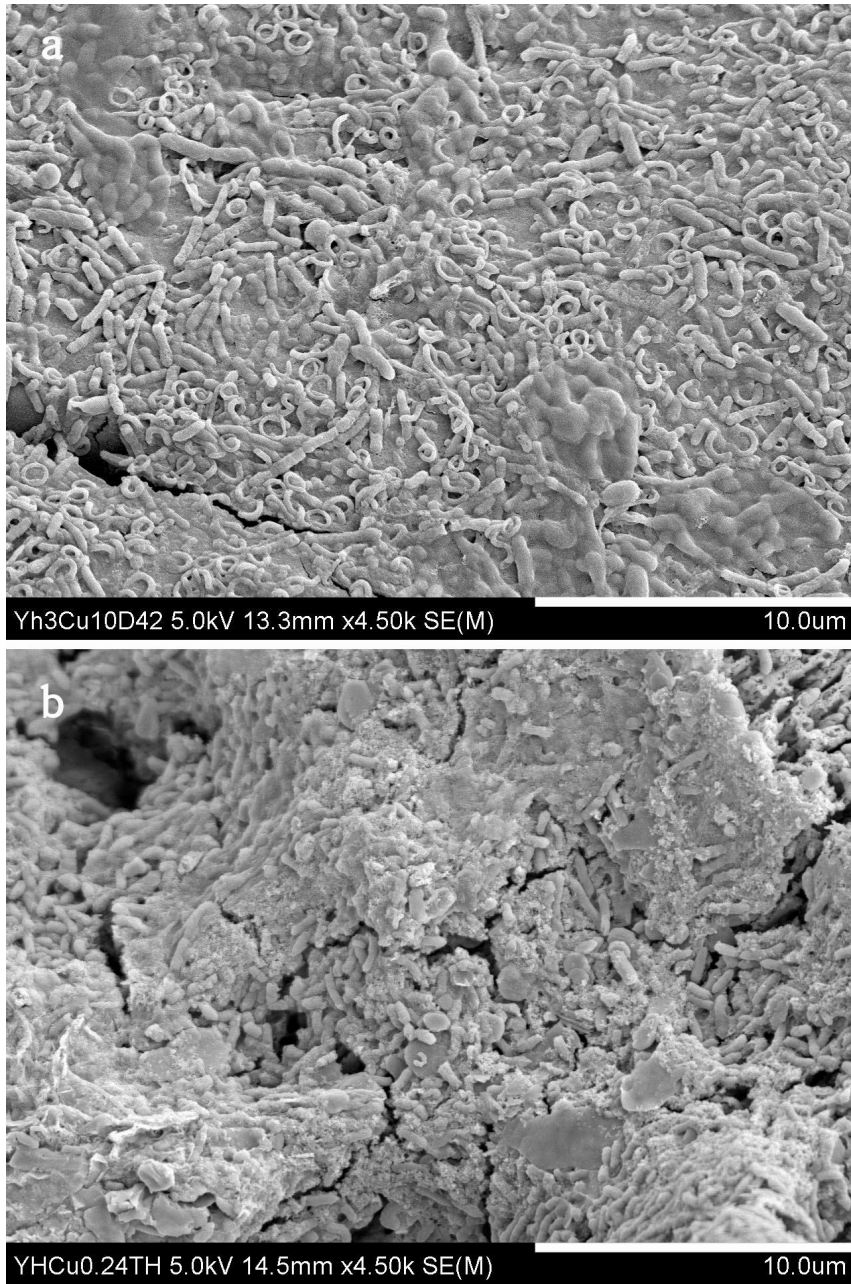


Fig. 16. SEM images of indigenous acidophilic bacteria on the Yeonhwa abandoned mine waste surface. 42 days after incubation with bacteria at Yeonhwa abandoned mine waste leaching-medium. The scale bar is 10.00 μm (a and b) in length.

3.5. 적응효과에 따른 용출량 변화 및 향상

Cu^{2+} 이온에 적응 3주, 6주, 9주 그리고 12주 된 고성 박테리아들을 고성 폐광석에 각각 접종하고 미생물용출이 일어나는 42일 동안의 Cu 함량을 3일 간격으로 그래프로 나타냈다(Fig. 17a). 3주, 6주, 9주, 12주 적응된 박테리아에 의하여 고성 폐광석 1.5 g/L로부터 용출된 평균 Cu 함량은 각각 44.98 mg/L, 61.03 mg/L, 103.98 mg/L, 133.18 mg/L이었다. 역시 중금속이온으로부터 적응 기간이 증가되면 Cu의 미생물 용출량이 증가하였다. 적응 3주 박테리아 보다 적응 6주 박테리아에서 용출된 Cu 함량이 약 1.35배 향상되었다. 적응 6주 박테리아 보다 적응 9주 박테리아에서 용출된 Cu 함량은 약 1.7배 향상되었고, 적응 3주 박테리아보다 약 2.31배 더 많은 양이 용출되었으며, 적응 12주 박테리아는 적응 9주 박테리아보다 약 1.28배 더 많은 양이 용출되었고 적응 3주, 적응 6주 박테리아보다 약 2.96배, 2.18배 더 많은 Cu 이온이 용출되었다(Fig. 17a).

연화 박테리아의 경우, 고성 박테리아들을 이용하여 용출했던 방법과 같은 방법으로 3주, 6주, 9주, 12주 적응된 박테리아를 연화 폐광석에 각각 접종하여 42일 동안 3일 간격으로 Cu 함량을 그래프로 나타냈다(Fig. 17b). 3주, 6주, 9주, 12주 적응된 박테리아에 의하여 연화 폐광석 1.5 g/L로부터 용출된 Cu 함량은 각각 74.38 mg/L, 109.85 mg/L, 116.75 mg/L, 149.34 mg/L로 측정되었다. 고성 박테리아와 같이 적응기간이 증가될수록 미생물에 의한 Cu 용출량이 증가되었고, 적응 3주 박테리아보다 적응 6주 박테리아가 1.47배, 적응 6주 박테리아보다 적응 9주 박테리아가 1.06배, 적응 9주 박테리아보다 적응 12주 된 박테리아가 1.27배 더 많은 양의 Cu 이온을 용출하였다(Fig. 17b).

적응 3주, 6주, 9주, 12주 박테리아에 의하여 용출된 Cu 함량을 누계함량으로 나타냈다(Fig. 17). 1.5 g/L의 고성 폐광석에서 용출된 Cu 함량은 적응 3주 박테리아에서 629.81 mg/L, 적응 6주 박테리아에서 854.52 mg/L, 적응 9주 박테리아에서 1455.75 mg/L, 적응 12주 박테리아에서 1864.57 mg/L로 나타났으며, 1.5 g/L의 연화 폐광석으로부터 용출된 Cu 함량은 적응 3주에서 1041.38 mg/L, 적응 6주에서 1537.99 mg/L, 적응 9주에서 1634.52 mg/L, 적응 12주에서 2090.85 mg/L이었다. 중금속이온의 노출시간 즉, 적응기간이 증가하면 용출되는 Cu 함량은 적응기간에 정비례하여 증가하였다(Fig. 17).

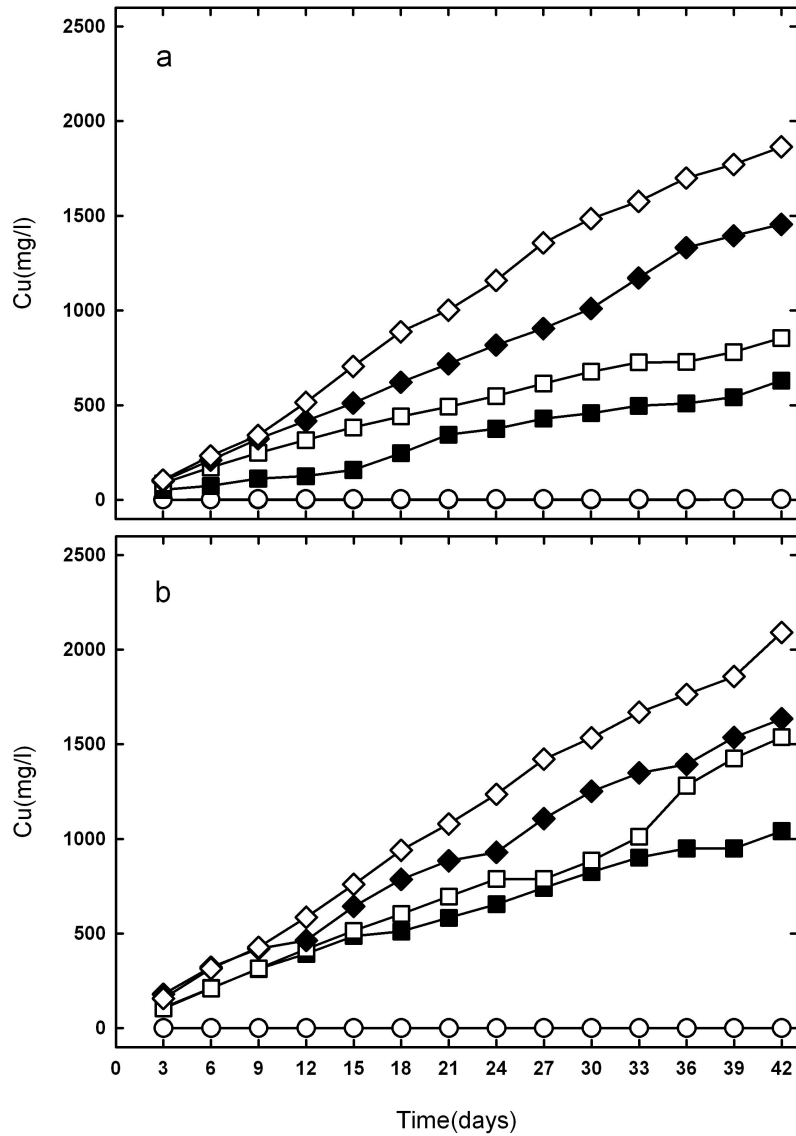


Fig. 17. Changes in the concentration of Cu during the bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria. (●; without bacteria (N/D), ○; non-adaptation bacteria, ■; 3 weeks adaptation bacteria, □; 6 weeks adaptation bacteria, ◆; 9 weeks adaptation bacteria, ◇; 12 weeks adaptation bacteria)

적용 3주, 6주, 9주 및 12주 박테리아에 의해 고성 폐광석으로부터 용출된 Fe 함량을 그래프로 나타내었다(Fig. 18a). 1.5 g/L의 고성 폐광석으로부터 용출된 Fe 평균함량은 적용 3주 박테리아에서 43.76 mg/L, 적용 6주 박테리아에서 111.689 mg/L, 적용 9주 박테리아에서 117.07 mg/L, 적용 12주 박테리아에서 199.22 mg/L 이었다(Fig. 18a). 그리고 적용 3주 박테리아 보다 적용 6주 박테리아가 2.55배 용출량이 많았고, 적용 6주 박테리아 보다 적용 9주 박테리아에서 1.04배 더 높았으며, 적용 9주 박테리아 보다 적용 12주 박테리아에서 1.7배 더 많은 양의 Fe 이온이 용출되었다(Fig. 18a).

1.5 g/L의 연화 폐광석으로부터 용출된 Fe 함량은 적용 3주에 40.63 mg/L이었고 적용 6주에 45.49 mg/L이었고 적용 9주에 147.91 mg/L이었으며, 적용 12주에서 223.19 mg/L로 측정되었다(Fig. 18b). 적용기간에 따라 용출 효율을 비교해보면 적용 3주 보다 적용 6주에서 1.12배, 적용 6주에 비해 적용 9주에서 3.25배, 적용 9주 보다 적용 12주에서 1.5배 더 용출효율이 좋았으며, 가장 높은 용출효율을 보인 적용 12주와 가장 낮은 용출효율을 보인 적용 3주를 비교해보았을 때, 적용 12주가 적용 3주 보다 5.49배 더 높은 용출량을 나타내고 있었다(Fig. 18b). 이는 용출하고자하는 목적 중금속이온으로 적용시키지 않아도 중금속이온이 포함된 환경에 노출되어 박테리아는 중금속이온인 Fe 이온에 대한 독성까지 내성이 형성되어 용출효율이 더 증가된 것으로 사료된다(Tuovinen et al., 1971).

이와 같은 용출 결과는 무기적 산화작용이 주로 적용 3주에 일어났고 적용 6주, 9주, 12주에서는 생물학적 산화작용이 우세하게 일어났기 때문인 것으로 사료된다. 42일 동안 용출된 Fe 함량을 누계함량으로 나타냈다(Fig. 18). 1.5 g/L의 고성 폐광석에서 적용 3주 박테리아에 의해서 용출된 Fe 함량은 612.74 mg/L, 적용 6주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 1563.64 mg/L, 적용 9주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 1639.03 mg/L이었고, 적용 12주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 2789.14 mg/L이었다(Fig. 18a).

1.5 g/L의 연화 폐광석의 경우, 적응 3주 박테리아에 의해서 용출된 Fe 함량은 568.81 mg/L, 적응 6주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 636.96 mg/L, 적응 9주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 2070.84 mg/L이었고, 적응 12주 박테리아에 의해서 용출된 Fe는 3124.79 mg/L이었다(Fig. 18b).

Fe 용출량이 적응 3주 보다 적응 6주에서, 적응 6주 보다 적응 9주에서, 적응 9주 보다 적응 12주 박테리아가 접종된 용출-배양액에서 높게 용출되었다. 이와 같은 용출량 향상은 두 가지 요인으로 해석할 수 있다. 우선 Cu 이온에 적응된 박테리아에 의해 생물학적 산화작용이 활발하게 진행되었기 때문이다. 또 하나는 갈바니반응에 의한 결과이다. 생물학적 산화작용이 진행된 것으로 해석할 수 있는 근거는 6주, 9주, 12주 박테리아를 접종한 경우 용출-배양액의 pH가 용출 후반부에서 감소 경향으로 나타났기 때문이다(Fig. 14). 자류철석이 포함된 용출-배양액에서, 무기적 갈바니 반응이 우세하게 일어나는 적응 3주에서 보다 생물학적 산화작용과 갈바니 반응이 동시에 일어나는 적응 6주, 9주, 12주에서 많은 양의 Fe가 용출되었기 때문이다. 특히 정지전압이 낮은 자류철석과 정지전압이 높은 황동석 혹은 섬아연석이 용출-배양액에서 서로 접촉하는 경우, 자류철석은 양극으로 작용하여 자류철석 표면에서 Fe^{2+} 이온이 부식되어 용출되고, 음극으로 작용하는 황동석이나 섬아연석 표면에서는 H_2O 가 생성되기 때문에 Cu 이온이 상대적으로 적게 용출된다 (Malouf and Prater, 1961; Hiskey and Wadsworth, 1975).

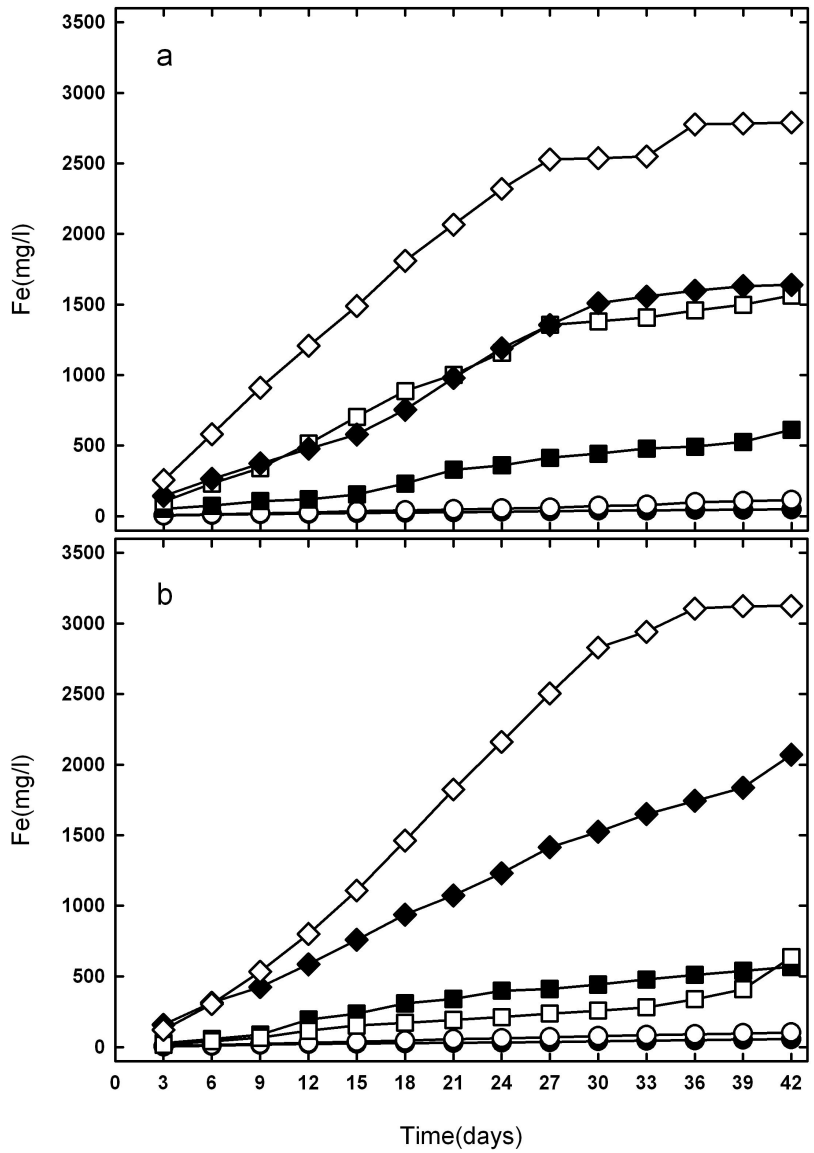


Fig. 18. Changes in the concentration of Fe during the bioleaching experiment using indigenous acidophilic bacteria a; Goseong bacteria, b; Yeonhwa bacteria.(●; without bacteria, ○; non-adaptation bacteria, ■; 3 weeks adaptation bacteria, □; 6 weeks adaptation bacteria, ◆; 9 weeks adaptation bacteria, ◇; 12 weeks adaptation bacteria)

4. 토 의

중합효소연쇄반응과 16S rRNA 염기서열 분석기술은 산성광산배수에 서식하는 박테리아에 대하여 직접적으로 종(species) 구분을 할 수 있는 기술이다. 특히 이 기술들은 환경시료에서 사전에 순수배양을 거치지 않고 미생물들의 종(species)을 감정(identification)할 수 있다. Bond et al.(2000)은 16S rRNA 염기서열 분석을 캘리포니아의 Richmond mine의 산성광산배수에 적용하여 *Leptospirillum sp.*과 *Sulfobacillus spp.*을 감정한 바 있으며, Lopez-Archilla et al.(2001)은 스페인의 Tinto 산성광산배수에 *Proteobacteria*의 γ group인 *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*와 α group인 *Acidiphilium sp.*, *Leptospirillum ferrooxidans* 그리고 Gram positive 박테리아인 *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. cerus* 등을 감정한바 있다. 또한, Yin et al.(2008)은 중국 동 광산의 광산배수에서 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospira*, *Firmicute*, *Chlorella* 등을 감정하였다.

고성 및 연화 박테리아 시료에 존재하는 세균은 모두 *Acidithiobacillus* 속(genus)에 속하는 종(species)으로 분석되었다. 이와 같이 서식환경이 다른 지역에서 채취된 박테리아임에도 불구하고 모두 *Acidithiobacillus* 속(genus)이 우점종으로 나타난 이유는 황(S^0)과 철(Fe^{2+})성분이 풍부한 배양액에서 계대배양을 오래동안 지속되어 왔기 때문으로 사료된다.

실험실에서 박테리아를 배양한다는 자체가 이미 자연환경의 조건을 제대로 반영하지 못하는 것이다(Head et al., 1998; Amann et al., 1995). 중합효소연쇄반응과 16S rRNA 염기서열 분석이 배양하기 까다로운 혹은 배양할 수 없는 박테리아에 대하여 감정할 수 있는 도구로 이용되었지만, 실은 여러 가지 측면에서 오해나 편견이 발생할 수 있다. 박테리아의 nucleic acid를 환경시료에서 추출하는 초기 단계에서 심각한 편견(bias)이 유발될 수 있다. 환경시료에 포함되어 있는 박테리아들의 nucleic acid를 추출하는 단계에서 물리적 혹은 화학적 방법을 적용한다.

그러나, 이 방법으로 환경시료에 포함되어 있는 모든 박테리아의 nucleic acid가 균등하게 용리(lysis)되지 않는다는 점 때문에 특정 박테리아의 nucleic acid가 선택적으로 용리된 추출물을 PCR로 증폭하면 심각한 오류가 발생할 수 있고(Amann et al., 1995; Head et al., 1998), 환경시료의 오염물질이 함께 추출되어 PCR 증폭을 방해하는 경우, PCR 증폭의 편차, PCR 증폭에서 키메라(chimera)와 같은 물질 생성 등에 의하여 심각한 오류의 함정에 빠질 수 있다(Wintzingerode et al., 1997). *A. ferrooxidans*는 ferrous iron 과 원소 황(S^0) 또는 환원형태의 황을 산화하는 능력을 갖고 있는 박테리아이다(Olson, 1991; Das and Mishra, 1996).

본 연구에 이용한 고정 및 연화 토착호산성박테리아에 대하여 16S rRNA 염기서열을 분석하여 ATCC(American type culture collection) 표준 균주인 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 23270과 비교한 결과 유사성(similarity)이 각각 96.99~97.79%, 97.59~97.90%로 나타났으며, 일반적으로 박테리아 유사성이 97%이상이면 같은 종으로 간주한다(Stackebrandt and Goebel, 1994). 따라서 본 용출 실험에 이용한 토착박테리아는 황화광물을 산화시켜 유용금속이온을 용출 시킬 수 있는 호산성박테리아임을 확인하였다. 토착박테리아가 Cu^{2+} 이온에 내성을 가질 수 있도록 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 가 용해된 적응-배양액에서 3주 주기로 되풀이하여 계대배양하였다. 적응 3주 동안 적응-배양의 pH는 매우 느리게 감소하였다(Fig. 11). 3주 동안 Cu^{2+} 이온에 적응된 박테리아를 용출-배양액에 접종하고 42일 동안 용출실험을 수행하였지만 pH 감소가 일어나지 못하였다(Fig. 14). 그러나 Cu^{2+} 이온에 3주 동안 적응시킨 박테리아를 다시 Cu^{2+} 이온에 3주 동안 총 6주 적응시킨 결과 적응-배양의 pH가 매우 빠르게 감소하였다. 또한 6주 적응 박테리아를 폐광석이 포함된 용출-배양액에 접종하자 pH가 감소경향으로 나타났으며, 6주 이후로 적응기간이 더 길어질수록 pH가 더 빨리 감소하였다. 이는 박테리아가 Cu^{2+} 이온에 내성이 길러지고 그리고 생물학적 산화작용으로 폐광석으로부터 유용금속이온이 용출될 수 있는 적응기간이 최소 6주 이상이 소요되는 것으로 생각된다.

특히 6주 적응 말기(22일)에 많은 박테리아들이 층을 이루어 나타나는 모습은 Cu^{2+} 독성 이온에 내성이 형성되었기 때문으로 해석된다(Fig. 13). 박테리아를 중금속이온에 노출시키면 이중반응(biphasic response)이 나타나는 것으로 알려져 있다(Sadler and Trudinger, 1967). 즉, 중금속이온의 농도가 낮은 경우, 박테리아는 이 중금속이온에 자극(stimulation)을 받아 내성이 형성된다. 그러나 중금속이온이 고농도인 경우, 박테리아는 중금속이온에 의하여 성장장애를 일으켜 사멸 혹은 선택(selection) 되거나 돌연변이(mutation)가 출현한다(Woese, 1987; Rawlings and Kusno, 1994). 수많은 박테리아가 중금속이온에 노출되었을 경우, 중금속이온에 대하여 내성인자를 가지고 있지 않은 대부분의 박테리아는 사멸한다. 그러나 내성인자를 갖고 있는 극소수의 박테리아는 중금속이온에 선택되어 증식하게 된다. 또한 내성인자를 갖고 있는 박테리아가 증식하는 과정에서 중금속이온의 독성에 더 잘 견디는 돌연변이가 계속하여 출현한다. 이 돌연변이들은 중금속이 포함된 환경에서 더 많이 증식하게 되고 결국 중금속이온에 내성인자를 갖는 우점 종으로 생존하게 된다(Silver and Phung, 1996). 실제적으로 Silver and Phung(1996)는 중금속이온에 내성이 형성된 박테리아 일수록 플라스미드(plasmid)가 증가하고 화학적 삼투력이 증가하는 것을 확인하였다.

Cu^{2+} 이온에 3주, 6주, 9주, 12주 동안 적응된 고성박테리아와 연화박테리아의 용출 효율을 알아보기 위해 1.5 g의 고성 폐광석과 연화 폐광석에 각각 접종하여 42일 동안 32°C에서 미생물 용출 실험한 결과, 고성박테리아의 경우, Cu 함량은 각각 44.98 mg/L, 61.03 mg/L, 103.98 mg/L, 133.18 mg/L로 적응 3주, 6주, 9주, 12주를 비교하였을 때, 각각 1.35배, 2.31배, 2.96배로 용출량이 더 증가되었고, Fe 함량은 각각 43.76 mg/L, 111.68 mg/L, 117.07 mg/L, 199.22 mg/L로 용출량을 비교하였을 때, 적응 3주, 6주, 9주, 12주 각각 2.55배, 2.67배, 4.55배 더 증가하였음을 확인할 수 있었다.

연화박테리아의 경우, Cu 함량은 적응 3주, 6주, 9주, 12주에서 각각 74.38 mg/L, 109.85 mg/L, 116.75 mg/L, 149.34 mg/L로 측정되었고 용출량을 비교한 결과, 각각 1.47배, 1.56배, 2.01배가 더 증가되었다. Fe 함량은 적응 3주, 6주, 9주, 12주에서 각각 40.63 mg/L, 45.49 mg/L, 147.91 mg/L, 223.19 mg/L로 측정되었고 측정된 결과를 이용하여 용출량을 비교한 결과, 각각 1.11배, 3.64배, 5.49배로 적응 기간이 길수록 증가되었다. 이는 적응기간이 길어질수록 용출효율 또한 증가되는 적응기간과 용출효율은 정비례관계인 것으로 사료된다.

본 연구를 실시하면서 아쉬운 점이 있다면, 목적 중금속 이온에 적응시키는 동안 SEM을 통해 수많은 미생물이 폐광석 표면에 부착되어 있는 것을 관찰하였지만, 미생물의 개체수를 세어보지 못해 미생물 개체수와 용출 효율을 직접 비교해보지 못하여 좀 더 질 좋은 data를 가지지 못해 아쉬웠다. 향후 실험 계획으로는 미생물 개체수를 측정하여 용출효율과의 관계를 규명할 것이며, 미생물을 적응시키는 방법들, 중금속의 종류, 농도 그리고 적응 온도 등으로 보다 더 다양한 factor를 설정하여 미생물의 내성을 극대화 시킬 수 있는 최적의 조건을 찾는다면 보다 더 효과적으로 유용금속을 용출시켜 낼 수 있을 것으로 사료된다.

5. 결 론

본 연구에서는 상업적으로 순수 배양된 박테리아를 분양받아 이용하지 않고 삼산 제일 광산, 연화 제2광산 등 각각의 폐광산 지역에서 생존하고 있는 토착박테리아를 채취하여 배양하였다. 표준균주와 유사도를 비교한 결과, 고성 및 연화 박테리아는 유사도가 각각 96.99 - 97.79%와 97.59 - 97.90%로 나타났다. 변성구배 겔 전기영동으로 2개 지역 박테리아들에 대한 군집분석을 수행한 결과 고성 및 연화 박테리아는 모두는 *Acidithiobacillus ferrooxidans*와 98.5%의 유사도를 보였으며, 고성 및 연화 폐광산에 방치되어 있는 폐광석으로부터 유용금속이온을 토착박테리아를 이용하여 효과적으로 용출시키고자 하였다. 중금속 이온에 내성이 형성될 수 있도록 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 적응-배양액에 첨가하여 주기적으로 적응실험을 수행하였다. 적응실험이 진행될수록 성장-배양액의 pH가 더 빠르게 감소하였으며, 적응 3주, 6주, 9주, 12주 박테리아를 이용하여 42일 동안 미생물용출을 수행한 결과, 연화 박테리아에서 적응 3주, 6주, 9주, 12주 모두 초기 pH 보다 감소하였으나, 고성 박테리아에서는 적응 3주에서 초기 pH보다 증가하는 경향으로 나타났지만 적응 6주에서부터 9주, 12주 모두 감소하였다. Cu 및 Fe 함량은 적응 3주 보다 적응 6주에서, 적응 6주 보다 적응 9주에서, 적응 9주보다 적응 12주 박테리아에서 높게 용출되었다. 적응 3주, 6주, 9주, 12주 박테리아에 의하여 용출된 Cu, Fe 함량 향상을 비교해 보면 Fe 가 Cu 보다 많이 향상되었다. 따라서 현장 환경에 적응된 토착박테리아를 이용하고 또한 목적중금속 이온으로 토착박테리아를 적응시켜 준다면 어떤 지역의 광산폐석에서라도 유용금속이온을 효과적으로 용출시킬 수 있을 것으로 기대된다.

6. 참 고 문 헌

- 고명수, 박현성, 이종운, 2009, “황산화균 *Acidithiobacillus thiooxidans*를 이용한 폐
금은광산 광미에서의 중금속 용출,” *한국지구시스템공학회지*, Vol. 46, pp.
239-251.
- 김봉주, 위대웅, 백근식, 성치남, 최낙철, 박천영, 2012, “중합효소연쇄반응과 16S
rRNA 염기서열을 이용한 토착호산성박테리아의 동정,” *한국지구시스템공학
회지*, Vol. 49, No. 4, pp. 507-520.
- 김봉주, 위대웅, 최낙철, 박천영, 2012, “Cu 이온에 적응된 토착호산성박테리아를 이
용한 폐광석으로부터 미생물용출 효율 향상,” *지하수도환경*, Vol. 14, No.
4, pp. 9-18.
- 김봉주, 조강희, 위대웅, 백근식, 성치남, 최낙철, 박천영, 2011, “16S rRNA 염기서
열을 이용한 고성, 연화 및 일본 토착호산성박테리아 동정,” *제97회 한국지구
시스템공학회지 추계학술발표회*, 강원랜드, pp. 18-20.
- 김윤수, 전효택, 이종운, 2011, “미생물학적 황 산화에 의한 오염토양 내 중금속 및
비소의 용출,” *한국지구시스템공학회지*, Vol. 48, pp. 294-308.
- 박천영, 김봉주, 2010, “토착박테리아에 의한 황동석의 등전위 변화와 표면 부착 특
성,” *한국지구시스템공학회지*, Vol. 47, pp. 823-833.
- 박천영, 김순오, 김봉주, 2010, “42°C에서 토착호산성박테리아의 황철석 표면에 대한
선택적 부착과 용출 특성,” *자원환경지질*, Vol. 43, pp. 109-122.
- 박천영, 정경훈, 김봉주, 위환, 이윤국, 2011, “고온성토착박테리아에 의한 방연석의
층식작용과 용출 향상,” *한국지구시스템공학회지*, Vol. 48, pp. 11-24.
- 박천영, 정연중, 이인화, 1997, “철 박테리아 *Thiobacillus ferrooxidans*에 의한 황철
석의 산화작용에 관한 연구,” *한국지구과학회지*, Vol. 18, pp. 321-331.
- 박천영, 조강희, 2010, “토착호산성박테리아의 황철석 표면 부착과 용출 특성,” *한국
지구시스템공학회지*, Vol. 47, pp. 51-60.
- 위대웅, 조강희, 김봉주, 최낙철, 박천영, 2011, “적용효과에 따른 폐광석으로부터 생
물학적 용출 향상,” *제97회 한국지구시스템공학회지 추계학술발표회*, 강원랜
드, pp. 21-23.
- 이동진, 조경숙, 안종관, 박경호, 손정수, 정현생, 2003, “*Thiobacillus ferrooxidans*에

- 의한 황동석 정광의 침출반응,” *한국지구시스템공학회지*, Vol. 40, pp. 89-96.
- Ahonen, L., Hiltunen, P., and Tuovinen, O.H., 1986, *The role of pyrrhotite and pyrite in the bacterial leaching of chalcopyrite ores*, In R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.G. Ebner (eds.), *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, Amsterdam, p. 13-22.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., 1995, “Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation,” *Microbiological Reviews*, Vol. 59, pp. 143-169.
- Astudillo, C. and Acevedo, F., 2008, “Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate,” *Hydrometallurgy*, Vol. 92, pp. 11-15.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M., 1989, “Bioleaching of gold pyrite tailings with adapted bacteria, *Hydrometallurgy*,” Vol. 22, pp. 291-300.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M.A., 1990a, “Bioleaching of non-ferrous sulfides with adapted thiophilic bacteria,” *The Chemical Engineering Journal*, Vol. 44, pp. B31-B40.
- Attia, Y.A. and Elzeky, M., 1990b, “Effects of galvanic interactions of sulfides on extraction of precious metals from refractory complex sulfides by bioleaching,” *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 30, pp. 99-111.
- Barr, D.W., Jordan, M.A., Norris, P.R. and Phillips, C.V., 1992, “An investigation into bacterial cell, ferrous iron, pH and Eh interactions during thermophilic leaching of copper concentrates,” *Minerals Engineering*, Vol. 5, pp. 557-567.
- Bhakta, P. and Arthur, B., 2002, “Heap bio-oxidation and gold recovery at Newmont mining: first year results,” *J Met*, Vol. 54, pp. 31-34.
- Bond, P.L., Druschel, G.K. and Banfield, J.F., 2000, “Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystem,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, pp. 4962-4971.
- Bryner, L.C. and Jameson, A.K., 1958, “Microorganisms in leaching sulfide

- minerals," *Applied Microbiology*, Vol. 6, pp. 281-287.
- Chun, J., Huq, A. and Colwell, R.R., 1999, "Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*," *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 2202-2208.
- Colmer, A.R., Temple, K.L. and Hinkle, M.E., 1950, "An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines," *Journal of Bacteriology*, Vol. 59, pp. 317-328.
- Das, A. and Mishra, A.K., 1996, "Role of *Thiobacillus ferrooxidans* and sulfur(sulphide)-dependent ferric-ion-reducing activity in the oxidation of sulphide minerals," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 45, pp. 377-382.
- Das, A., Jayant, M., Modak, M. and Natarajan, K.A., 1998, "Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance," *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 73, pp. 215-222.
- Das, A., Modak, J.M. and Natarajan, K.A., 1997, "Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*," *Minerals Engineering*, Vol. 10, No.7, pp. 742-749.
- Dugan, P.R., MacMillan, C.B. and Pfister, R.M., 1970, "Aerobic heterotrophic bacteria indigenous to pH 2.8 acid mine water: Microscopic examination of acid streamers," *Journal of Bacteriology*, Vol. 101, No. 3, pp. 973-981.
- Elzaky, M. and Attia, Y.A., 1995, "Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides," *The Chemical Engineering Journal*, Vol. 56, pp. B115-B124.
- Felsenstein, J., 1985, "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap," *Evolution*, Vol. 39, pp. 783 - 791.
- Groudev, S.N., and Groudeva, V.I., 1993, "Microbial communities in four industrial copper dump leaching operations in Bulgaria," *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 11, pp. 261-268.
- Haghshenas, D.F., Alamdari, E.K., Torkmahalleh, M.A., Bonakdarpour, B. and Nasernejad, B., 2009, "Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate," *Minerals Engineering*, Vol. 22, pp. 1299 -

1306.

- Han, O.H., Park, C.Y. and Cho, K.H., 2010, "The characteristic of bioleaching for chalcopyrite concentrate using indigenous acidophilic bacteria-column leaching at room temperature," *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, Vol.47, No. 5, pp. 678-689. (in Korean)
- Head, I.M., Sauners, J.R. and Pickup, R.W., 1998, "Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms," *Microbial Ecology*, Vol. 35, pp. 1-21.
- Hiskey, J.B., and Wadsworth, M.E., 1975, "Galvanic conversion of chalcopyrite," *Metallurgical Transactions B*, Vol. 6B, pp. 183-190.
- Johnson, D.B. and McGinness, S., 1991, "A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria," *Journal of Microbiological methods*, Vol. 13, pp. 113-122.
- Johnson, D.B., Macvicar, J.H.M. and Rolfe, S., 1987, "A new solid medium the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria," *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 7, pp. 9-18.
- Jones, R.A., Koval, S.F. and Nesbitt, H.W., 2003, "Surface alteration of arsenopyrite(FeAsS) by *Thiobacillus ferrooxidans*," *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 67, No. 5, pp. 955-965.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R., 1969, "Evolution of protein molecules," In Mammalian protein metabolism. (eds), H. N. Munro. New York: Academic Press, pp. 21 - 132.
- Kai, T., Nishi, M. and Takahashi, T., 1995, "Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* to nickel ion and bacterial oxidation of nickel sulfide," *Biotechnology Letters*, Vol. 17, No. 2, pp. 229-232.
- Karimi, G.R., Rowson, N.A. and Hewitt, C.J., 2010, "Bioleaching of copper via iron oxidation from chalcopyrite at elevated temperature," *Food and Bioproducts Preprocessing*, Vol. 88, pp. 21-25.
- Kelly, D.P. and Wood, A.P., 2000, "Reclassification of some species of

- Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen.nov., and *Thermithiobacillus* gen.nov.,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 50, pp. 511-516.
- Ko, M.S., Park, H.S. and Lee, J.U., 2009, “Bioleaching of heavy metals from tailing in abandoned Au-Ag mines using sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans*,” *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, Vol. 46, No. 2, pp. 239-251. (in Korean)
- Lane, D.J., 1991, “16S/23S rRNA sequencing,” In *Sequencing techniques in bacterial systematics* (eds), Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Jon Wiley & Sons Lts, pp. 115-174.
- Lane, D.J., Stahl, D.A., Olsen, G.J., Heller, D.J. and Pace, N.R., 1985, “Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequence,” *Journal of Bacteriology*, Vol. 163, pp. 75-81.
- Leduc, L.G. and Ferroni, G.D., 1994, “The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*,” *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 14, pp. 103-120.
- Lobos, J., Chisolm, T., Bopp, L. and Holmes, D., 1986, “*Acidiphilium organovorum* sp. nov., acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture,” *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 36, pp. 139-144.
- Lopez-Archilla, A.I., Marin, I. and Amils, R., 2001, “Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto river, Spain,” *Microbial Ecology*, Vol. 41, pp. 20-35.
- Lottermoser, B.G., 2007, *Mine wastes*, Springer, p. 304.
- Machemer, S.D. and Wildeman, T.R., 1992, “Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal process from acid mine drainage in a constructed wetland,” *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 9, pp. 115-131.
- Maidak, B.L., Larsen, N., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Olsen, G.J., Fogel, K., Blandy, J. and Woese, C.R., 1994, “The ribosomal database preject,”

- Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 3485–3487.
- Malouf, E.E., and Prater, J.D., 1961, “Role of bacteria in the alteration of sulfide minerals,” *Journal of Metals*, Vol. 13, p. 353–356.
- Manning, H. L., 1975, “New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage,” *Applied Microbiology*, Vol. 30, pp. 1010–1016.
- Mason, L.J. and Rice, N.M., 2002, “The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel-iron sulphide concentrate,” *Minerals Engineering*, Vol. 15, pp. 795–808.
- Mehta, A.P., and Murr, L.E., 1982, “Kinetic study of sulfide leaching by galvanic interaction between chalcopyrite, pyrite, and sphalerite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*(30°C) and a thermophilic microorganism(55°C),” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 24, pp. 919–940.
- Mehta, A.P., and Murr, L.E., 1983, “Fundamental studies of the contribution of galvanic interaction to acid-bacterial leaching of mixed metal sulfides,” *Hydrometallurgy*, Vol. 9, pp. 235–256.
- Mielke, R.E., Pace, D.L., Porter, T., and Southam, G., 2003, “A critical stage in the formation of acid mine drainage: colonization of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* under pH-neutral conditions,” *Geobiology*, Vol. 1, pp. 81–90.
- Miller, C.L., Landa, E.R. and Updegraff, D.M., 1987, “Ecological aspects of microorganisms inhabiting uranium mill tailings,” *Microbial Ecology*, Vol. 14, pp. 141–155.
- Mishra, A.K., Roy, P. and Mahapatra, S.S., 1983, “Isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium,” *Current Microbiology*, Vol. 8, pp. 147–152.
- Mousavi, S.M., Taghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A. and Hoseini, S.A., 2005, “Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopyrite concentrate in an airlift bioreactor,” *Hydrometallurgy*, Vol. 80, pp. 139–144.
- Natarajan, K.A., and Iwasaki, I., 1983, “Role of galvanic interactions in the

- bioleaching of Duluth gabbro copper–nickel sulfides,” *Separation Science and Technology*, Vol. 18, pp. 1095–1111.
- Natarajan, K.A., Sudeesha, K. and Ramananda Rao, G., 1994, “Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*,” *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 66, pp. 303–306.
- Norris, P.R. and Barr, D.B., 1985, “Growth and iron oxidation by acidophilic moderate thermophiles,” *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 28, pp. 221–224.
- Norris, P.R. and Kelly, D.P., 1978, Toxic metals in leaching systems, In L.E. Murr, A.E. Torma and J.A. Brierley,(eds), *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, pp. 83–102. London, New York: Academic Press.
- Olson, G.J., 1991, “Rate of pyrite bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans*: results of an interlaboratory comparison,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, pp. 642–644.
- Park, C.Y., Cheong, K.H. and Kim, B.J., 2010b, “The bioleaching of sphalerite by moderately thermophilic bacteria,” *Economic and Environmental Geology*, Vol. 43, No. 6, pp. 573–587. (in Korean)
- Park, C.Y., Cheong, K.H., Kim, B.J., Wi, H., Lee, Y.G., 2011, “The corrosion and the enhance of bioleaching for galena by moderate thermophilic indigenous bacteria,” *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, Vol. 48, No. 1, pp. 11–24. (in Korean)
- Park, C.Y., Cheong, K.H., Kim, K.M., Hong, Y.U. and Cho, K.H., 2009, “Bioleaching of pyrite from the abandoned Hwasun coal mine drainage using indigenous acidophilic bacteria,” *Journal of the Korean Society for Geosystem Engineering*, Vol. 46, No. 5, pp. 521–535. (in Korean)
- Park, C.Y., Kim, S.O. and Kim, B.J., 2010a, “The characteristic of selective attachment and bioleaching for pyrite using indigenous acidophilic bacteria at 42°C,” *Economic and Environmental Geology*, Vol. 43, No. 2, pp. 109–121. (in Korean)
- Petersen, J. and Dixon, D.G., 2002, “Thermophilic heap leaching of a chalcopyrite concentrate,” *Minerals Engineering*, Vol. 15, pp. 777–785.

- Rawlings, D. and Kusno, T., 1994, "Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*," *Microbiological Reviews*, Vol. 58, pp. 39-55.
- Rawlings, D.E., Tributsch, H. and Hansford, G.S., 1999, "Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores," *Microbiology*, Vol. 145, pp. 5-13.
- Rojas-Chapana, J.A. and Tributsch, H., 2004, "Interfacial activity and leaching patterns of *Lptospirillum ferrooxidans* on pyrite," *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 47, pp. 19-29.
- Sadler, W.R. and Trudinger, P.A., 1967, "The inhibition of microorganisms by heavy metals," *Mineralium Deposita*, Vol. 2, pp. 158-168.
- Sampson, M.I., Van der Merwe, J.W., Harvey, T.J. and Bath, M.D., 2005, "Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermaloloty during biooxidation heap leaching," *Minerals Engineering*, Vol. 18, pp. 427-437.
- Sampson, M.I., Van der Merwe, J.W., Harvey, T.J. and Bath, M.D., 2005, "Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermaloloty during biooxidation heap leaching," *Minerals Engineering*, Vol. 18, pp. 427-437.
- Sanmugasunderam, V. and Branion, R.M.R., 1985, "A growth model for the continuous microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 27, pp. 1173-1184.
- Shahverdi, A.R., Yazdi, M.T., Oliazadeh, M. and Darebidi, M.H., 2001, "Biooxidation of mouth refractory gold-bearing concentrate by an adapted *Thiobacullus ferrooxidans*," *J. Sci. I. R. Iran*, Vol. 12, pp. 209-212.
- Shi, S.Y., Fang, Z.H. and Ni, J.R., 2006, "Comparative study on the bioleaching of zinc sulphides," *Process Biochemistry*, Vol. 41, pp. 438-446.
- Silver, S. and Phung, L.T., 1996, "Bacterial heavy metal resistance: new surprises," *Annu. Rev. Microbiol.* V. 50, p. 753-789.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M., 1994, "Taxonomic note: a place for

- DNA-DNA hybridization and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition on bacteriology,” *International Journal of Systemic Bacteriology*, Vol. 44, pp. 846-849.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M., 1994, “Taxonomic note: a place for DNA-DNA hybridization and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition on bacteriology,” *Int. J. Syst Bacteriol* Vol. 44, pp. 846-849.
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. and Pace, N.R., 1984, “Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences,” *Science*, Vol. 224, pp. 409-411.
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. and Pace, N.R., 1985, “Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 49, pp. 1379-1384.
- Temple, K.L. and Colmer, A.R., 1951, “The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*,” *Journal of Bacteriology*, Vol. 62, pp. 605-611.
- Torma, A.E., Walden, C.C., and Branion, R.M.R., 1970, “Microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate,” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 12, pp. 501-517.
- Tuovinen, O.H. and Kelly, D.P., 1973, “Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*,” *Archives of Microbiology*, Vol. 88, pp. 285-298.
- Tuovinen, O.H., Niemela, S.I. and Gyllenberg, H.G., 1971, “Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals,” *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 37, pp. 489-496
- Visca, P., Bianchi, E., Polidoro, M., Buonfiglio, V. and Orsi, N., 1989, “A new solid medium for isolating and enumerating *Thiobacillus ferrooxidans*,” *Journal of General Applied Microbiology*. Vol. 35, pp. 71-81.
- Wintzingerode, F.V., Gobel, U.B. and Stackebrandt, E., 1997, “Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis,” *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 21, pp. 213-229.
- Woese, C.R., 1987, “Bacterial evolution,” *Microbiological Reviews*, Vol. 51, pp.

221-271.

Xia, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J. and Qiu, G., 2008, "Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite," *Hydrometallurgy*, Vol. 92, pp. 95-101.

저작물 이용 허락서

| | | | | | |
|----------|---|------------|-------------------|-----|----|
| 학 과 | 에너지자원공학과 | 학 번 | 20117080 | 과 정 | 석사 |
| 성 명 | 한글 : 위 대 응 | 한문 : 魏 大 雄 | 영문 : Wi Dae Woong | | |
| 주 소 | 광주광역시 북구 운암동 중흥아파트 105동 109호 | | | | |
| 연락처 | E-mail : parkourwi@naver.com | | | | |
| 논문제 목 | 한글 : 토착호산성박테리아의 적응기간에 따른 생물학적 용출 효율 | | | | |
| | 영문 : The Effect of Bioleaching for Adaptation times of Indigenous Acidophilic Bacteria | | | | |

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억 장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대()

2013 년 4 월

저작자 : 위 대 응 (인)

조선대학교 총장 귀하