

Thiobacillus ferrooxidans 에 의한 철의 산화반응 기구

김 승 섭 · 강 웅 기
고려대학교 공과대학 화학공학과
(접수 1981. 5. 15)

The Kinetics of Ferrous Ion Oxidation by Thiobacillus ferrooxidans

Seung-Sup Kim and Woong Ki Kang
Department of Chemical Engineering,
College of Engineering, Korea University, Seoul 132, Korea
(Received May 15, 1981)

요 약

Thiobacillus ferrooxidans 에 의한 Fe^{2+} 의 산화반응 kinetics 에 대하여 연구하였다. 비가역 자동촉매반응 모델을 제안하였고 다른 모델과 비교하였다. 제안된 모델의 적응성을 관찰하기 위해 초기 Fe^{2+} 의 농도가 0.035~0.217N 이고, Fe^{3+} 의 초기 농도는 0.00372~0.00745N 의 조건에서 실험하였다. 종래의 연구에서는 실험시간이 3 시간 이하였는데 본 연구에서는 50~100 시간 동안이었다. 실험치와의 비교분석은 적분법과 초기속도법을 이용하였다. 이 분석 결과, 비가역 자동촉매반응 모델이 다른 모델보다 우수함을 관찰했다.

ABSTRACT

The kinetic nature of Fe^{++} oxidation to Fe^{+++} by Thiobacillus ferrooxidans was studied. An irreversible autocatalytic model was proposed and compared with other models. The experiments were carried out to verify the proposed model.

The duration of a single experimental run was ranged from 50 hrs to 100 hrs(c.f. previously less than 3 hrs). Both the integral and the initial rate methods were used in analyzing the experimental results.

The analysis shows that the proposed irreversible auto-catalytic mechanism is best fitted to the experimental results among the various models.

1. 서 론

최근 금속광산 갱내수중에 서식하는 철산화 및 유황산화 독립영양형 박테리아가 발견됐고 이것을 이용하여 저품질 광석으로부터 유용금속을 침출하여 회수하는 세균 침출법¹⁾이 연구 개발되어 크게 각광을 받고 있다. 박테리아에 의한 철산화 kinetics에 관한 연구는 1969년 schnaitman 등²⁾에 의해 종래 생물학자들이 행하는 산소호흡 속도를 측정할 수 있는 Warburg manometry 대신에 Fe^{3+} 의 농도를 잴 수 있는 비색법을 사용함으로써 활발해 졌다. Schnaitmann 등²⁾은 *Ferrobacillus ferrooxidans*를 이용하여 반응초기의 10~50 분 사이의 분석치를 Michaelis-Menten 모델에 적용하여 k_m 값을 결정했다. 그리고 McGoran 등³⁾은 박테리아의 질소량을 결정할 수 있는 Micro-kjeldahl 법을 이용하여 위와 같은 분석을 행하였다. McDonald 등⁴⁾은 회분식 반응기와 연속흐름 반응기에서의 Monod 모델을 이용하여 μ 를 구한 후 최소제곱법으로 k_m 을 구하였다.

한편, 1974년 Torma 등⁵⁾은 고체인 Cadmium, Cobalt, Nickel, Zinc Sulfides의 침출에 Monod 모델과 유사한 모델을 제시했다. 한편, Wong 등⁶⁾은 Monot type의 4가지 모델 중에 Reilly 등⁷⁾이 제시한 통계적 방법을 이용하여 반응초기 2시간 이내의 실험치를 분석 잘 맞는 모델을 분별해냈다.

종래의 연구는 10분에서 2시간 이내의 짧은 반응에서 Michaelis-Menten 모델이나 Monod 모델의 박테리아의 성장과 관련된 모델을 검토하였는데, 본 연구에서는 종래의 모델이 잘 맞지 않는 점을 감안하여 철(II)의 산화반응에 관한 모델을 제시 검토하였다. 실험은 회분식 반응기에서 $KMnO_4$ 적정법과 초기의 연속적인 산화 속도를 구하기 위한 전위차법을 사용하여 산화 속도를 구하였다.

실험치의 분석은 초기속도법과 적분법에 의한 분석을 이용하였다.

2. 미생물에 의한 철산화반응 모델

모델 1. Michaelis-Menten 모델

Michaelis-Menten 모델로부터 Lineweaver-Burk plot를 할 수 있는 식은

$$1/V_0 = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_m} \quad (1)$$

기호를 바꾸어 쓰면

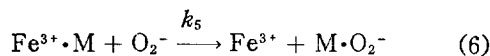
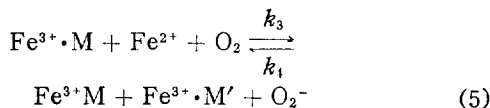
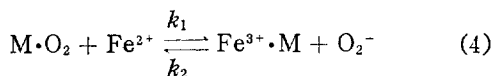
$$-1/\left(\frac{dC_A}{dt}\right)_{t=0} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{C_{A0}} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

적분하여 Conversion fraction으로 고치면

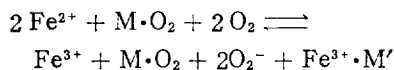
$$X_A = \frac{V_m}{C_{A0}} t + \frac{K_m}{C_{A0}} \ln(1 - X_A) \quad (3)$$

모델 2. 가역 자동촉매작용 모델

이 모델은 1976년 Park¹⁴⁾에 의해 제시되었다. 첫째, 박테리아 M은 산소와 복합체($M \cdot O_2$)를 이룬다 가정하고 그리고 Fe^{3+} 은 박테리아 M과도 복합체($Fe^{3+} \cdot M$)를 이룬다고 가정한다. 이 두과정은 미생물에 의한 산화과정에 미생물이 복합 가능한 물질과 복합형태에 대한 가정이다 그리하여 이것들에 의하여 Fe^{2+} 가 Fe^{3+} 로 산화된다. 그리고 또한 Fe^{2+} 가 공기중에 있는 산소에 의해 미생물 반응과 무관하게 Fe^+ 로 산화될 수 있으므로 가능한 단계반응으로 나누어 쓰면



철산화 반응을 전 반응으로 요약하면



Fe^{2+} 의 산화반응속도는

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_1 C_A C_M + k_2' C_N + k_3' C_N C_A - k_4' C_N^2 \quad (7)$$

산소 박테리아 복합체($M \cdot O_2$)의 생성속도는

$$\frac{dC_M}{dt} = k_2' C_N - k_1 C_A C_M + k_5' C_N \quad (8)$$

이것을 정상상태 근사법으로 Zero로 하면, Fe^{3+} 박테리아 복합체 ($Fe^{3+} \cdot M$)의 생성속도는

$$\frac{dC_N}{dt} = k_3' C_A C_N - k_4' C_N^2 \quad (9)$$

이것을 식 (7)에 대입하면,

$$-\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_N}{dt} + k_5' C_N \quad (10)$$

그런데 이식의 마지막 항 ($k_5' C_N$)은 두번째 항 $Fe^{3+} \cdot M$ 의 생성을 ($\frac{dC_N}{dt}$)에 비하여 매우 작다. 이것의 증명은 각 변수의 값을 구한 뒤 식 (7)과 식 (9)의 연립 미분방정식을 Euler 방법에 의한 digital computer로 풀었다.¹⁴⁾ 그 결과 $10^3 \sim 10^5$ 까지 앞항이 컸다. 그러므로 무시하면,

$$-\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_N}{dt}, \quad C_{A0} + C_{N0} = C_A + C_N = \text{Constant} \quad (11)$$

그래서, Fe^{3+} 의 산화율은 Conversion fraction으로 표시하면,

$$\begin{aligned} \frac{dX_A}{dt} = & -C_{A0}(k_3' + k_4')X_A^2 \\ & + C_{A0}[k_3'(1-B) - 2Bk_4']X_A \\ & + BC_{A0}(k_3' - Bk_4') = -p'X_A^2 \\ & + p''X_A + (p'B + p'')B \end{aligned} \quad (12)$$

여기서 $p' \equiv C_{A0}(k_3' + k_4')$, $p'' \equiv C_{A0}[k_3' - B(k_3' + 2k_4')]$, $B \equiv C_{N0}/C_{A0}$ 이다.

이것을 초기속도로 표시하면

$$\left(\frac{dX_A}{dt}\right)_{t=0} = (p'B + p'')B = k_3'BC_{A0} - k_4'B^2C_{A0} \quad (13)$$

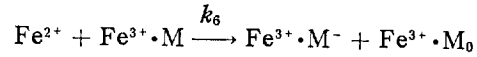
식 (13)을 적분하면

$$X_A = \frac{(1+s)(1-e^{-p''st})p''/2D'}{1 - \frac{1+s}{1-s}e^{-p''st}} \quad (14)$$

여기서, $s = [1 + (1 + p'B/p'') \times 4p'B/p'']^{1/2}$

모델 3. 비가역 자동촉매작용 모델

산화제 작용을 하고, 자신 (Fe^{3+})은 Fe^{3+} 로 되면 박테리아에 의해 산화한다는 메카니즘¹⁵⁾¹⁸⁾인데 여기에서는 후자의 메카니즘 속에 포함된다. 이렇게 하여 생성된 Fe^{3+} 은 다른 박테리아와 복합체를 이룬다.



M^- 은 cell mass이고 M_0 는 생성된 Fe^{3+} 와 복합체를 이루는 다른 cell mass를 지칭한다. 이것으로부터 Fe^{2+} 의 산화속도는 다음과 같이 된다.

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_6 C_A C_N \quad (16)$$

$$C_{A0} + C_{N0} = C_A + C_N \equiv Q$$

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_6 C_A (Q - C_A) \quad (17)$$

이를 Conversion fraction으로 표시하면,

$$\frac{dX_A}{dt} = k_6 C_{A0} (-X_A^2 + (1-B)X_A + B) \quad (18)$$

초기속도는

$$\left(\frac{dX_A}{dt}\right)_{t=0} = k_6 C_{A0} \cdot B \quad (19)$$

식 (19)를 적분하면

$$\ln \frac{B(1-X_A)}{B+X_A} = -k_6 Q t \quad (20)$$

$$X_A = \frac{B(e^{k_6 Q t} - 1)}{1 + B e^{k_6 Q t}} \quad (21)$$

3. 실험장치 및 측정방법

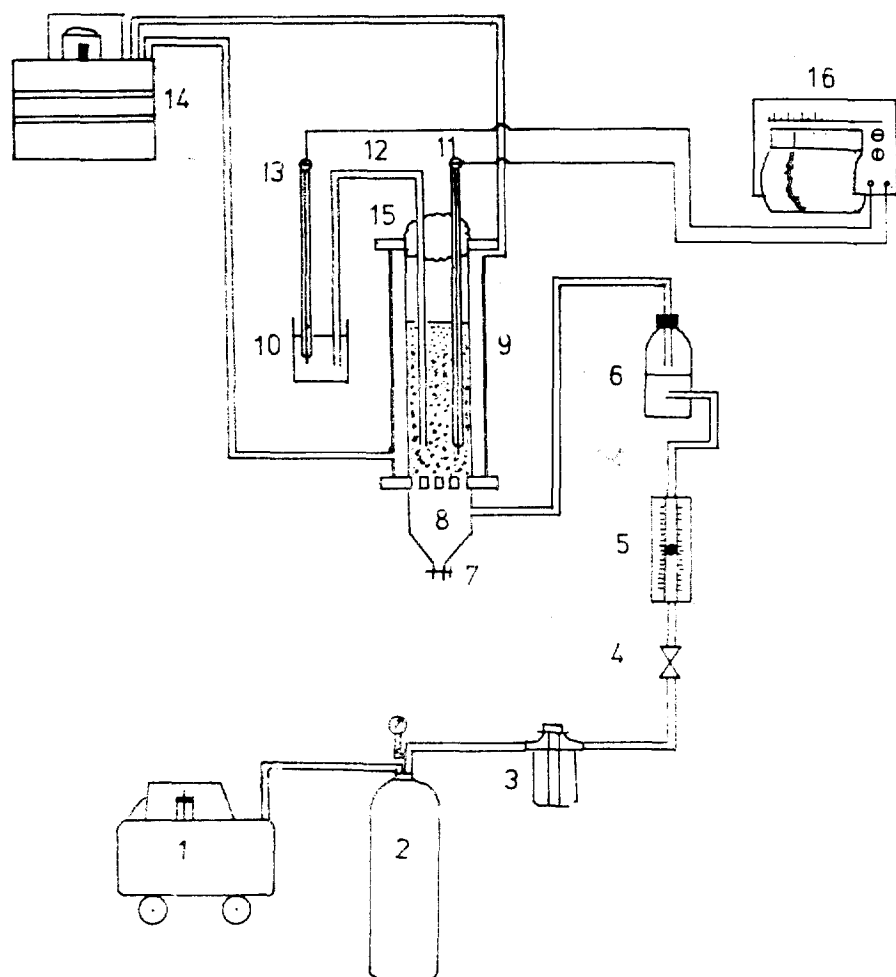
(1) 시료 배양

본 실험에 사용된 *Thiobacillus ferrooxidans*는 McDonald 등⁴⁾이 사용한 종인 ATCC 13598이다.

이것을 포함한 용액 30 cc 정도를 Leathen 등¹⁶⁾과 같은 9K 배지 1 l에 접종시켰다. 배양온도.

Table 1. Composition of 9K Media

| Component | Concentration [g/l] |
|---|---------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3.0 |
| KCl | 0.1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 0.01 |
| Conc. H ₂ SO ₄ | q.s. |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | q.s. |



- | | | |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1. Air Compressor | 2. Air storage tank | 3. Air filter |
| 4. Needle valve | 5. Rotameter | 6. Saturation Bottle |
| 7. Drainage Tap | 8. Air Box | 9. Reactor |
| 10. Reference Cell | 11, 13. Pt. Electrode | 12. Salt Bridge |
| 14. Thermostat and Pump | 15. Cotton plug | 16. Recorder |

Fig. 1. Schematic Diagram of Experimental Apparatus

는 30°C로 하고 1 : 8 H₂SO₄로 pH 2로 맞추어 3~4 일간 유지시켰다. 배양이 끝난 후의 Fe²⁺의 농도와 처음 농도와의 물질수지에 의해 Fe³⁺·M 농도가 0.149 N 인 세포 현탁액을 이 실험 전체의 접종액으로 사용했다.

(2) 실험 장치

본 실험에서 사용된 장치는 Fig. 1 과 같다.

우선 공기는 압축기에서 나오는 것을 공기트랩을 통과하며 공기여과기를 거친 다음, 침상밸브를 통하여 보정된 로우터미터로 통하여 공기를 공급한다. 반응기의 재료는 아크릴수지이고, 내관의 직경 5 cm 외관 7 cm 이다. 반응기 밑에 부착된 공기상자의 다공질판은 아크릴판에 0.5mm의 구멍을 점대칭적으로 뚫어서 사용했다. 그리고, 백금전극에 부착된 도선은 Potentiometric

Recorder에 연결하여 전위차를 기록했다.

(3) 실험 및 농도측정 방법

1:8 H₂SO₄를 pH 2로 맞춘 후, Fe₂⁺의 농도가 다른 9 K배지에 시료 배양된 세균 현탁액을 부피 %로 각각 5~25%를 넣어 실험했다. Fe²⁺의 농도는 초기치를 전 후, 매 5시간마다 5 ml씩을 취하여 pH를 낮추어 세균에 의한 산화를 멈추게 한 후에 표정된 0.1N KMnO₄로 적정을 행하였다. 포화공기병을 통하여 공기를 공급하였으나, 공기유량이 67.1ml/sec일 때 비말동반된 물이 있어 이것을 보정하여 농도를 결정했다. 초기의 속도는 적정한 것과 기록계에 의해 기록한 것을 비교하여 Nernst Equation에 의하여 초기치를 결정했다.

Table 2. Initial concentration and Initial rate data

| RUN No. | Inoculum percent(%) | C _{A0} [eq/l] | C _{N0} [eq/l] | Ent. rate [ml/hr] | Initial rate [convesion/hr] |
|---------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | 5 | 0.151 | 0.0075 | 1.485 | 0.00365 |
| 2 | 10 | 0.141 | 0.0149 | 1.65 | 0.0049 |
| 3 | 20 | 0.124 | 0.0298 | 1.8 | 0.0063 |
| 4 | 5 | 0.078 | 0.0075 | 1.485 | 0.0037 |
| 5 | 10 | 0.072 | 0.0149 | 1.65 | 0.0064 |
| 6 | 15 | 0.068 | 0.0224 | 1.7 | 0.0011 |
| 7 | 20 | 0.065 | 0.0298 | 1.8 | 0.0044 |
| 8 | 10 | 0.217 | 0.0149 | 1.65 | 0.007 |
| 9 | 20 | 0.192 | 0.0298 | 1.8 | 0.0066 |
| 10 | 25 | 0.181 | 0.0373 | 1.92 | 0.0135 |
| 11 | 25 | 0.047 | 0.0373 | 1.92 | 0.0014 |
| 12 | 20 | 0.035 | 0.0298 | 1.8 | 0.0033 |
| 13 | 20 | 0.163 | 0.0298 | 1.8 | 0.0037 |

4. 실험결과 및 고찰

우선 Michaelis-Menten 모델은 식 (2)에 의한 매개변수(V_m , K_m)을 Fig. 2와 같이 Lineweaver-Burk plot로 구했다.

이 plot로 부터 균주의 농도가 20%(V)인 경우, $V_m = 0.0025(N/hr)$ 이고, $K_m = 0.4(N)$ 이

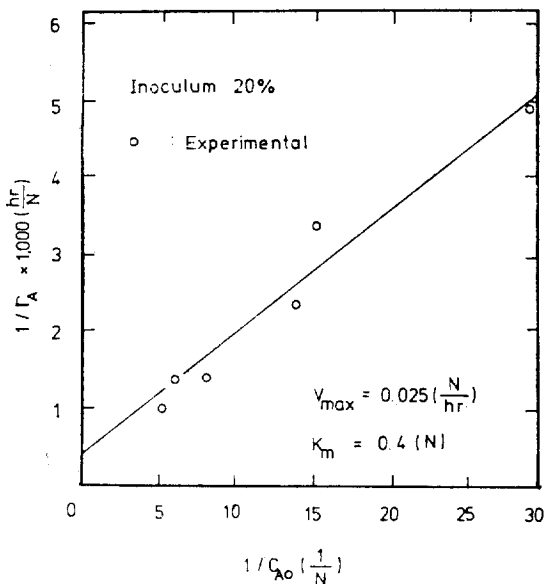


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot

었다. 이 매개변수로 부터 식 (3)에 의해 시간에 따른 X_A 를 계산하여 이 모델의 이론치를 산출했다. 모델 2는 식 (13)에 Table 2의 초기치와 초기 속도를 대입하여 매개변수 k_3' , k_4' 를 계산했다. 모델 3은 식 (19)에 Table 2의 초기치와 초기속도를 대입하여 k_6 를 계산했다. 그리고 적분법은 식 (20)에 실험치를 대입하여 k_6 를 계산했다. 그런데 적분법에 의한 해석을 하기 위해서는 모두 130개의 Data가 대입되었다. 그리고 초기 속도법에 의한 해석을 하기 위해서는 regression법을 사용하였는데, 본 고려대학교 전자계산소의 "TSPOLD"라는 프로그램을 사용하였다. 매개변수의 계산결과는 Table 3과 같다.

Table 3의 값을 모델 2는 식 (14)에 대입하여 시간에 따른 이론치를 산출해냈다. 실험치와 이론치와의 비교는 Fig. 3과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 모델 1은 일차반응에 가까우므로 박테리아의 population이 증가함에 따라 산화속도가 커져야 하는데 일정하다. 또한, 이 모델은 긴 시간의 실험에서는 잘 맞지 않음을 k_0 ¹⁷⁾와 Park¹⁹⁾에 의해 밝혀졌고 Wong 등⁶⁾에 의해서도 지적되었다. 모델 2는 시간에

Table 3. Estimated Parameters by Initial Rate and Integral Method

| | Estimated Parameters | Standard Error of Regression | Sum of Residuals |
|---------|---|------------------------------|------------------|
| Model 2 | $k_3' = 0.2948, k_4' = 0.3175$ (Initial rate method) | 0.00808 | 0.0133 |
| Model 3 | $k_6 = 0.1864$ (Initial rate method) | 0.00565 | 0.02578 |
| | $k_6 = 0.1848$ (Integral Method) | 1.066 | 32.334 |

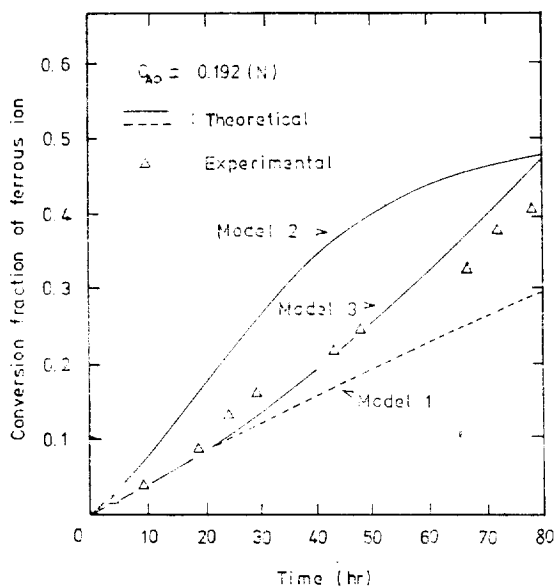
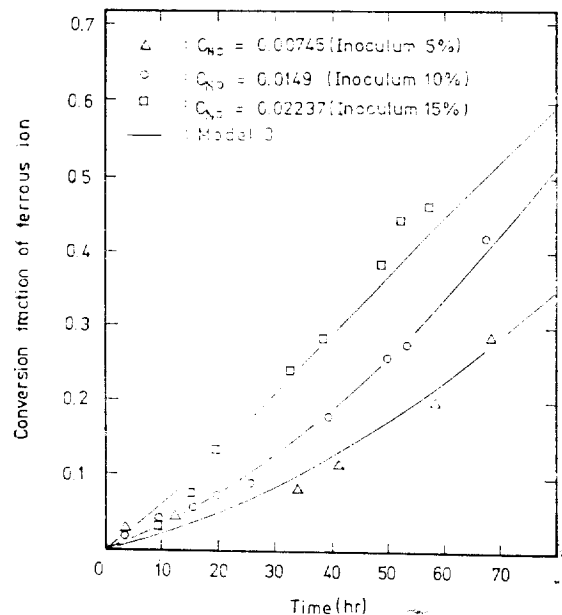


Fig. 3. Comparison of 3 Models by conversion vs. time Curves

증가함에 따라 산화속도가 증가하여야 하는데 처음에는 증가하다가 나중에는 감소함으로써 실험치와 일치하지 않았다. 그리고 모델 3은 초기율법과 적분법의 parameter 계산치가 일치함을 보여 주었다. 모델 3을 더 고찰해 보면 식 (16)에 의하여 C_{N_0} 가 늘어남에 따라 초기속도도 커지고 같은 시간의 Conversion fraction도 커짐을 알 수 있다. 이를 Fig. 4에 모델 3의 이론치와 실험치로 나타내었다.

또한 식 (16)에서 초기 박테리아 Fe^{3+} 복합체의 농도가 일정할 때 초기의 Fe^{2+} 의 농도를 변

Fig. 4. Conversion vs. Time Curve by variation of C_{N_0}

화시키면 초기 Fe^{2+} 의 농도가 커짐에 따라 초기 속도로 Conversion fraction도 커짐을 알 수 있다. 이를 Fig. 5에 나타내었다.

그런데 Fig. 4와 Fig. 5의 현상은 Wong 등에 의한 결과와도 일치한다. Fig. 6에서는 같은 초기조건(C_{N_0} , C_{A_0})에서의 같은 실험을 5일간격으로 했을 때의 재현성을 식 (20)을 plot 함으로서 나타내었다. 그러나 같은 실험을 2주일 이상의 간격으로 다시 했을 때는 k_6 값이 매우 작아짐을 알 수 있었다.

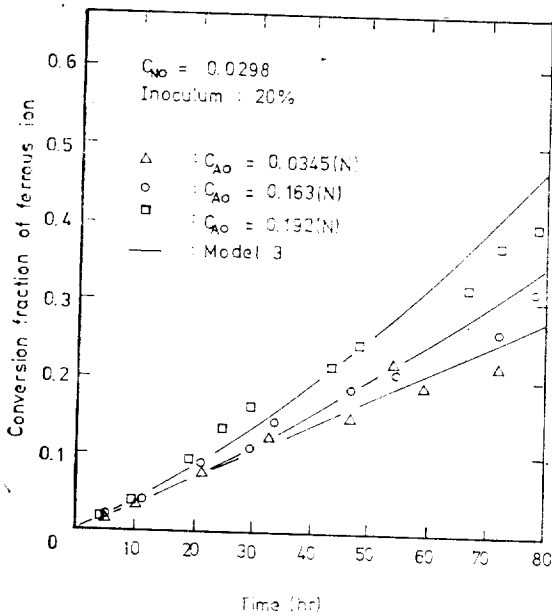


Fig. 5. Conversion vs. time curve by variation of C_{A0}

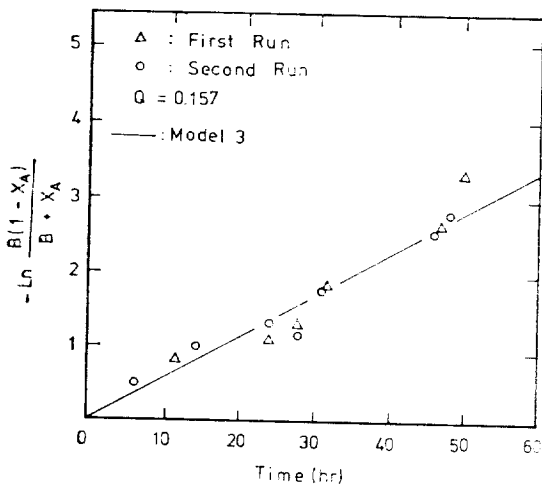


Fig. 6. Comparison of Duplicate Run

5. 결 론

(1) 초기 실험조건이 pH = 2.0 이고 온도 30°C 이며 Fe^{2+} 의 농도가 0.035~0.217N이며, Fe^{3+} 의 농도가 0.00372~0.00745N의 범위에서 Thi-

obacillus ferrooxidans에 의한 직접, 간접 산화 메카니즘인 비가역 자동촉매반응 모델이 초기율법에 의한 분석과 적분법에 의한 분석으로 다른 모델보다 실험치와 잘 부합하였다.

(2) Fe^{3+} 박테리아의 초기농도가 증가하고 초기 Fe^{2+} 의 농도가 일정할 때 초기속도와 같은 시간의 Conversion fraction이 커진다. 그리고 같은 Fe^{3+} 박테리아 복합체의 초기농도에서도 Fe^{2+} 의 초기농도가 증가함에 따라 초기속도와 Conversion fraction도 커진다.

Nomenclature

B : Ratio of ferric ion-bacteria complex concentration to ferrous ion concentration at initial state

C_A : Ferrous ion concentration (N)

C_N : Concentration of ferric ion-bacteria complex (N)

C_M : Concentration of bacteria-oxygen complex (M)

E : Concentration of enzyme

K_i : Reaction rate constant

K_i' : Product of concentration of oxygen and reaction rate const.

K_m : Michaelis-Menten constant

S : Concentration of essential substrate (M)

t : Reaction time (hr)

V_m : Rate of product(maximum) (M/hr)

V : Rate of product (M/hr)

X_A : Conversion fraction of ferrous ion

Subscript

o : Initial state, $t = 0$

참 고 문 헌

1. S.R. Zimmerly, & D.G. Wilson, U.S. Pat., "Cyclic leaching process Employing iron oxidation bacteria," 2,829,964(1958).
2. C.A. Schnaitman, M.S. Korchynski, &

- D.G. Lundgren, J. Bacteriol., **99**(1969), 552.
- 3) C.J.M. McGoran, D.W. Duncan, & C.C. Walden, Can. J. Microbiol. **15**(1969), 135.
4. D.G. McDonald, & R.H. Clark, Can. J. Chem. Eng. **48**(1970), 669.
5. A.E. Torma, G. Legault, D. Kougioumoutzakis, & R.Ouellet, Can. J. Chem. Eng. **52**(1974), 515.
6. C.W. Wong, J.M. Sharer, & P.M. Reilley Can. J. Chem. Eng. **52**(1974), 645.
7. P.M. Reilley, Can. J. Chem. Eng. **48**(1970), 168.
8. R.E. Buchanan, et al., "Bergey's manual of determinative bacteriology," The Williams & Wilkins Company. 8th, Ed. (1974).
9. W.W. Leathen, N.A. Kinsel, & S.A. Braley, J. Bacteriol. **72**(1956), 700.
10. N.A. Kinsel, J. Bacteriol. **80**(1960), 628.
11. M. Silver, Can. J. Microbiol., **16**(1970), 845.
12. J.V. Beck, & F.M. Shafia, J. Bacteriol., **88**(1964), 850.
13. M. Silver, & A.E. Torma, Can. J. Microbiol., **20**(1974).
14. Pack Chan-Young, Dep. of Chem. Eng. Korea Univ., Thesis for Ph.D. (1976).
15. P.R. Dugan, & D.G. Lundgren, J. Bacteriol., **89**(1965), 825.
16. W.W. Leathen, L.D. McIntyre, & S.A. Braley, SR., Science **114**(1961), 280.
17. Ko Ki-Soo, Dep. of Chem. Eng. Korea Univ. Thesis for M.S. (1976).
18. M.P. Silverman, J. Bacteriol. **94**(1967), 1046.