

## 점토로부터 철불순물의 생물학적 제거에 미치는 탄소원의 영향

이은영 · 조경숙<sup>1</sup> · 류희욱<sup>2\*</sup> · 배 무

이화여자대학교 생물학과, <sup>1</sup>이화여자대학교 환경공학과, <sup>2</sup>숭실대학교 화학공학과

**Effect of Carbon Sources on Biological Removal of Iron Impurities from Kaolinite. Eun Young Lee, Kyung-Suk Cho<sup>1</sup>, Hee Wook Ryu<sup>2\*</sup> and Moo Bae.** Department of Biological Science, Ewha Womans University, <sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, <sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Soong Sil University, Seoul 156-743, Korea - Fe (III) impurities in clay could be microbially removed by inhabitant dissimilatory Fe (III) reducing microorganisms. Insoluble Fe (III) in clay particles was leached out as soluble reductive form, Fe (II). The microorganisms removed from 10 to 45% of the initial Fe (III) when each sugar was supplemented to be in ranges of 1~5% (w/w; sugar/clay). The microorganisms reduced 2.1~12.8 mol of Fe (III) per 100 mol of carbon in sugars metabolized when sugars such as glucose, maltose, and sucrose were used as sole carbon source. *Bacillus* sp. IRB-W and *Pseudomonas* sp. IRB-Y were isolated from the enrichment culture of the clay. The isolates were considered to participate in metabolizing organic compounds to fermentative intermediates with relatively little Fe (III) reduction at initial Fe (III) reduction process. By the microbial treatment, the whiteness of the clay was increased from 63.20 to 79.64, whereas the redness was obviously decreased from 13.47 to 3.55. This treatment did not cause any unfavorable modifications in mineralogical compositions of the clay.

점토 광물은 도기·자기제조와 같은 요업, 화장품 산업과 같은 화학공업, 제지산업 및 핵폐기물 처리공정 등 광범위한 분야에 이용되는 기초 원료이다. 국내의 점토 매장량은 풍부하나, 대부분 철 성분이 많이 함유되어 있는 저품위 점토들이다. 점토내에 함유된 철 성분은 점토 상품의 적색화와 내화도의 저하를 가져와 상품으로서의 가치를 떨어뜨린다(1-4). 국내에서는 값싼 저품위의 점토를 매년 수백톤씩 수출하고, 저품위 점토보다 3~5배 정도 비싼 철 성분이 적은 점토를 수백톤씩 수입하는 실정이다(5). 만일 저품위의 점토로부터 철을 효과적으로 제거하여 고품위화 할 수 있다면, 수입대체 효과뿐만 아니라 수출단가를 3~5배 올릴 수 있을 것이다.

고령토로부터 철불순물을 제거하기 위해 여러 가지 방법들이 시도되어왔다. 가장 많이 사용되어 온 방법은 부유선광법, 자력선광법 및 화학처리법이다(6-11). 부유선광법은 철 제거에 있어서 효율이 낮고, 자력선광법은 고령토 중의 철분이 단체분리가 안된 미립으로 고령토에 녹과 같이 치밀하게 부착되어 있거나 고령토에 포획된 형태이므로 탈철의 효과가 낮으며, 화학처리의 경우 고령토의 가소성의 주요 인자인 유기물의 함량이 저하되어 가소성 저하를 가져올 수 있다는 단점이 있다. 또한, 이들

공정의 가장 큰 단점은 조업비가 많이 들고 철 제거 효율이 나쁘다는 점이다.

점토로부터 철불순물을 제거하기 위한 새로운 방법으로 철을 산화 혹은 환원 가능한 미생물을 이용하는 방법을 생각할 수 있다(4, 12-14). 미생물에 의한 철의 산화 혹은 환원 작용은 철화합물의 생물지구화학적 분포에 중요한 영향을 미친다. 특히, 산화철(Fe<sup>3+</sup>)이 전자수용체로 작용하는 유기물의 산화와 더불어 진행되는 이화적 철환원(dissimilatory iron reduction) 작용은 혐기적인 토양, 침전물 및 지하수환경에서 유기물의 산화적 분해를 지속적으로 유지시켜주는 중요한 기작으로 철, 망간, 인 및 미량금속 등의 생태계내의 분포에 직접적으로 영향을 미친다(15).

미생물의 이화적 철환원 대사 능력은 환경 및 공학적인 측면에서도 응용이 가능하다. 일반적으로 산화형의 철화합물은 불용성이지만, 이것이 환원되면 가용성 화합물이 된다(15). 즉, 미생물을 이용하여 불용성의 철화합물을 가용성의 철화합물로 용출해냄으로써 철의 제거가 가능하다. 예를 들면, 이화적 철환원작용은 광석으로부터 철을 추출하는 광업분야(16), 철과 유해유기물(phenol, toluene, *p*-cresol)로 오염된 토양이나 지하수의 정화(17) 및 혐기성 미생물군집에 대한 독성도 평가 등의 분야에 응용된 적이 있다(18).

미생물의 철환원 기술의 응용분야 중 산업적 공정 가능성이 가장 높은 분야 중의 하나가 점토로부터 불용성

\*Corresponding author

Tel. 82-2-820-0611, Fax. 82-2-812-5378

E-mail: hwryu@saint.soongsil.ac.kr

Key words: Microbial iron removal, Iron-reducing bacteria, Clay refinement, Ferric iron, Ferrous iron.

의 철불순물을 용출하여 제거하는 공정이다. 그러나, 지금까지는 이 분야에 관한 연구가 미비하고 생물지구화학적 관점에서의 몇몇 연구들이 진행되었다(12-14). 점토 내에서 철환원과정은 유기물의 산화와 연계되어 진행되는데, 자세한 대사과정에 관해서는 거의 알려져 있지 않다(12-13). 철환원 미생물이 점토표면의 산화철은 용이하게 환원시킬 수 있으나, 점토 광물의 구조적인 철성분을 환원 가능한 지는 아직 밝혀지지 않았다(13). Stucki (13)는 점토에 영양배지를 첨가하고 혐기적 조건하에서 배양했을 때, 멸균하지 않은 점토나 멸균한 점토에 P-5라는 균주를 접종하였을 때 철환원이 일어나는 것을 관찰하였으나, 대조군에 의한 실험이 불충분하여 P-5균주가 철환원 미생물인지는 확인할 수 없었다. 또한, Wu 등 (19)은 nontronite에 sucrose를 첨가한 토양추출액을 넣고 배양하였을 때 철환원이 관찰되었다고 보고했으나, 이 결과 역시 대조군에 의한 실험이 없었고 그 기작이 미생물에 의한 것인지를 밝히지 못하였다. 국내에서도 *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. 및 *Aspergillus niger* 등을 이용해 점토로부터 철불순물을 제거하고자 시도하였으나 효율이 낮아서 경제성이 낮은 것이 단점으로 지적되었다(20). 따라서, 철환원 미생물을 이용하여 저품위의 점토로부터 철불순물을 제거하여 고품위화 시키는 공정을 개발하기 위해서는 점토내의 철환원 기작을 밝히고, 철환원 미생물로 처리한 점토의 품질을 과학적으로 평가하는 연구가 절실하게 필요하다.

본 연구에서는 철환원미생물 혼합배양액을 이용하여 저품위 점토로부터 철불순물을 제거하는데 미치는 탄소원의 영향을 조사하였다. 또한, 철환원미생물 혼합배양액으로부터 철환원 반응을 수행하는 미생물을 분리하여 동정하였다. 생물학적 처리 전·후의 점토를 고온에서 구운 후 색도와 주요 광물 조성비를 비교함으로써 철환원 미생물로 처리한 점토의 품질을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 고령토로부터 철불순물 제거

본 연구에 사용한 점토는 경남 산청군 소재의 D사에서 취급하는 제품 중 적점토로 분류되는 고령토로 총 철함량(Fe)이 2.6 wt% 이었다. 점토는 일광에 의해 건조시킨 후, 분쇄기로 파쇄한 다음 실험에 사용하였다. 500 ml의 용기에 점토 50 g, 수돗물 300 ml 및 glucose 2 g을 넣고 뚜껑을 닫은 후 30°C에서 배양하여 핑크 빛의 점토색이 점점 흐려져 더 이상 색이 변하지 않으면, 그 배양액의 일부를 새 배지에 접종하여 순치시킨 철환원 미생물의 혼합액을 접종원으로 사용하였다.

모든 실험은 배양용기에 질소가스를 불어넣어 상부 공기를 질소가스로 치환 시킨 후, butyl 고무마개를 이용하

여 밀폐시킨 후 수행하였다. 발효가스를 포집하기 위해 butyl 고무마개에 30 ml의 주사기를 꽂은 채로 30°C에서 배양하였다. 고령토의 탈철에 미치는 점토의 농도의 영향을 조사하였다. 120 ml 용량의 혈청병에 수돗물 50 ml와 maltose를 2 g 첨가한 후 점토를 각각 10%, 30%, 60% 첨가하고, 철환원 미생물의 혼합 배양액을 1 ml씩 첨가하여 정치 배양하였다. 정치배양과 진탕배양에 따른 탈철효율에 대한 영향을 점토 농도가 10%일 때 조사하였고, 진탕 배양은 150 rpm, 30°C의 교반 배양기에서 수행하였다. 또한, 고령토로부터 철불순물의 제거에 미치는 유기물의 영향은 120 ml의 혈청병을 이용하여 조사하였다. 점토 10 g, 수돗물 50 ml 및 철환원 미생물 혼합액 1 ml를 넣은 배양용기에 glucose, galactose, sucrose, maltose 및 starch를 각각 점토 중량의 1~5%(w/w, sugar/clay) 농도가 되도록 첨가하였다. 배양하는 동안 1-2일에 1회씩 배양용기 바닥에 침전된 점토를 약 1분 가량 흔들어 주었다. 철환원력은 점토로부터 배양액으로 용출된 환원철( $Fe^{2+}$ )농도를 측정함으로써 평가하였는데, 주사기를 이용하여 배양용기의 상등액 1 ml을 주기적으로 채취하여 철농도를 측정하였다.

### 철환원균의 분리 및 동정

철환원 혼합배양액으로부터 FePPi배지를 이용하여 철환원 균주를 분리하였는데, FePPi 배지는  $NaHCO_3$  2.5 g/L,  $NH_4Cl$  1.5 g/L,  $KH_2PO_4$  0.6 g/L, KCl 0.1 g/L, ferric pyrophosphate 3 g/L, citric acid 20 mM, vitamin solution 10 ml(21), trace element solution 10 ml(21)로 구성되어 있다.

철환원 혼합배양액을 멸균 생리 식염수로 희석한 후, 희석액 0.1 ml씩을 FePPi 평판 배지에 도말한 후 30°C에서 배양하였다. FePPi 평판배지는 공기의 양을 최소화하기 위하여 직경 8.5 cm인 Petri dish에 FePPi배지를 10 mm 정도로 두껍게 부어서 agar 배지 표면과 petri dish 뚜껑과의 간격이 최소가 되도록 준비하였다. FePPi 평판배지위에 생육한 colony를 다시 FePPi 액체 배지로 옮겨서 질소 치환 후 철환원능을 확인하였다. 이러한 조작은 반복적으로 수행하여 두 종류의 순수 배양액을 얻을 수 있었다. 분리한 두 종류의 균주는 National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (Torry Research Station, Aberdeen, United Kingdom) 기관에 의뢰하여 동정하였다.

### 분석법

배양액중의 철농도를 분석하기 위해서 Muir의 spectrophotometric법을 이용하였다.  $Fe^{2+}$ 농도는 Sample 0.1 ml에 o-phenanthroline 시약 0.4 ml를 섞고, 증류수로 2.5 ml까지 채운 후 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다

(22). 점토내의 철농도를 분석하기 위해 점토를 6N HCl 용액에 담구어 15~20분간 가열하여 점토내의 철을 수용액상으로 용출시켰다. 그 용출액에 환원제인 10% hydroxylamine hydrochloride를 0.1 ml씩 첨가하여 Fe<sup>3+</sup>를 Fe<sup>2+</sup>으로 환원시킨 후 상기에 서술한 방법으로 측정하였다.

생물학적으로 처리하기 전·후의 점토의 색도를 비교하기 위해, 각각의 점토를 1050℃에서 2시간 구운 후 색도계(ND-300A, Rigaku goniometer, Tokyo, Japan)를 이용하여 색도를 측정하였다. 또한, 점토를 구성하고 광물의 원소 분석은 에너지 분산 분석기(EDAX 3000, Horiba, Tokyo, Japan)가 장착되어 있는 주사형 전자현미경(S-2100, Hitachi, Ibaraki, Japan)을 이용하여 수행되었다.

### 결과 및 고찰

#### 철제거에 미치는 탄소원의 영향

점토의 철 환원을 위한 반응조건을 최적화 하기 위하여 점토의 농도 변화에 따른 영향을 조사하였다. 전형적인 점토의 탈철 과정을 살펴보면, 배양 초기에는 유기물의 발효가 우선적으로 진행되어 발효가스가 대량으로 발생되었다. GC 분석 결과에 의하면 발효가스의 주성분은 이산화탄소와 수소이었고, 소량의 메탄이었다. 이러한 발효가스가 생성되기 시작하면 점토의 철환원이 일어나면서 점토의 색이 점점 옅어지기 시작하고, 반응기의 하단에 침전되어 있는 점토층이 약 1.3배 가량 팽창이 진행되면서 탈색이 본격적으로 진행되었다. 탄소원이 완전 고갈되어 발효가스의 발생이 생기지 않게 되면 더 이상의 철환원이 이루어지지 않았다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 점토의 탈철이 진행되었다. 11일 배양후의 점토의 탈

철율을 Fig. 1에 도시 하였다. 철제거율은 점토에 함유된 총철농도(26 mg Fe/g clay)와 배양액으로 용출된 Fe<sup>2+</sup> 농도를 이용하여 계산하였다. 철제거율은 점토의 농도가 증가함에 따라 현저하게 감소하였다. 10%와 30% 점토농도에서는 약 37%와 33%의 철 제거율을 얻었고, 60%농도에서는 10%의 약 30%에 불과한 11%의 낮은 제거율을 얻었다. 이와 같이 점토의 농도가 증가함에 따라 탈철율이 감소하는 것은 점토 입자의 침강과 응집 때문에 침강된 점토층으로 첨가한 배지와 대사산물들의 물질전달이 용이하지 않기 때문으로 사료된다. 가라앉은 점토를 주기적으로 혼합해 주지 않으면 점토 표면층의 아래 부분에서만 탈철이 약간 진행되었다. 따라서, 1~2일에 일회 정도 주기적으로 가라앉은 점토의 혼합이 필요하며, 일단 발효가스가 생성되면서 점토층이 팽창을 시작하면 더 이상의 교반없이도 탈철이 원활히 진행되었다. 따라서, 향후 연구에서는 이러한 결과를 기초로해서, 점토의 탈철 실험 조건을 설정하였다.

점토에 탄소원으로 단당류인 glucose와 galactose를 점토무게의 1~5%(w/w)를 각각 첨가하여 배양하였을 때 배양시간에 따른 점토로부터 용출된 Fe<sup>2+</sup>농도와 철제거율을 조사하였다(Fig. 2와 Fig. 3). 모든 실험조건에서, 배양초기 약 3일간은 철환원은 관찰되지 않았으나, 발효가스가 생성되는 것으로 보아 당의 발효는 진행되는 것

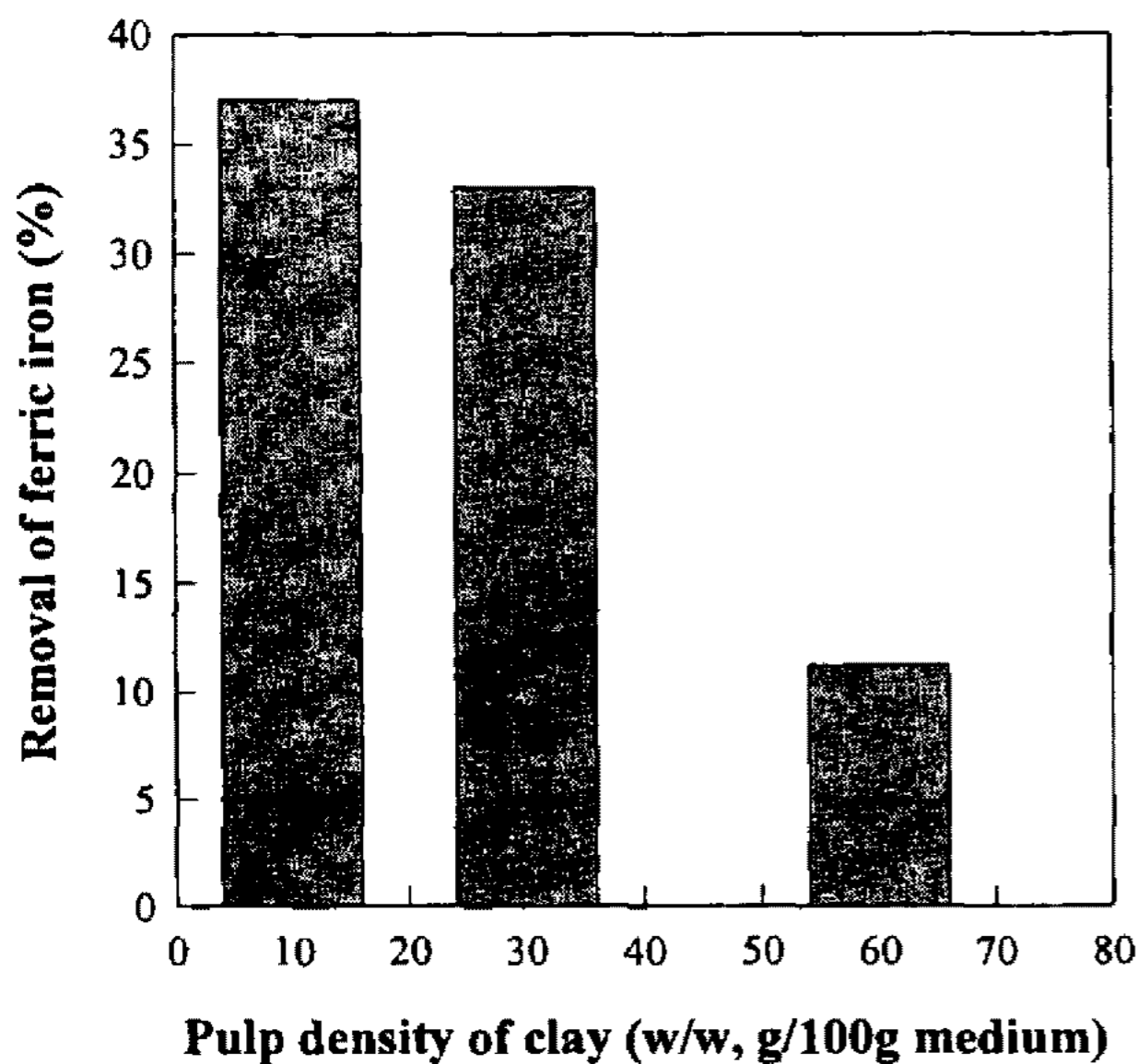


Fig. 1. Effect of pulp density of clay on removal of iron from a clay.

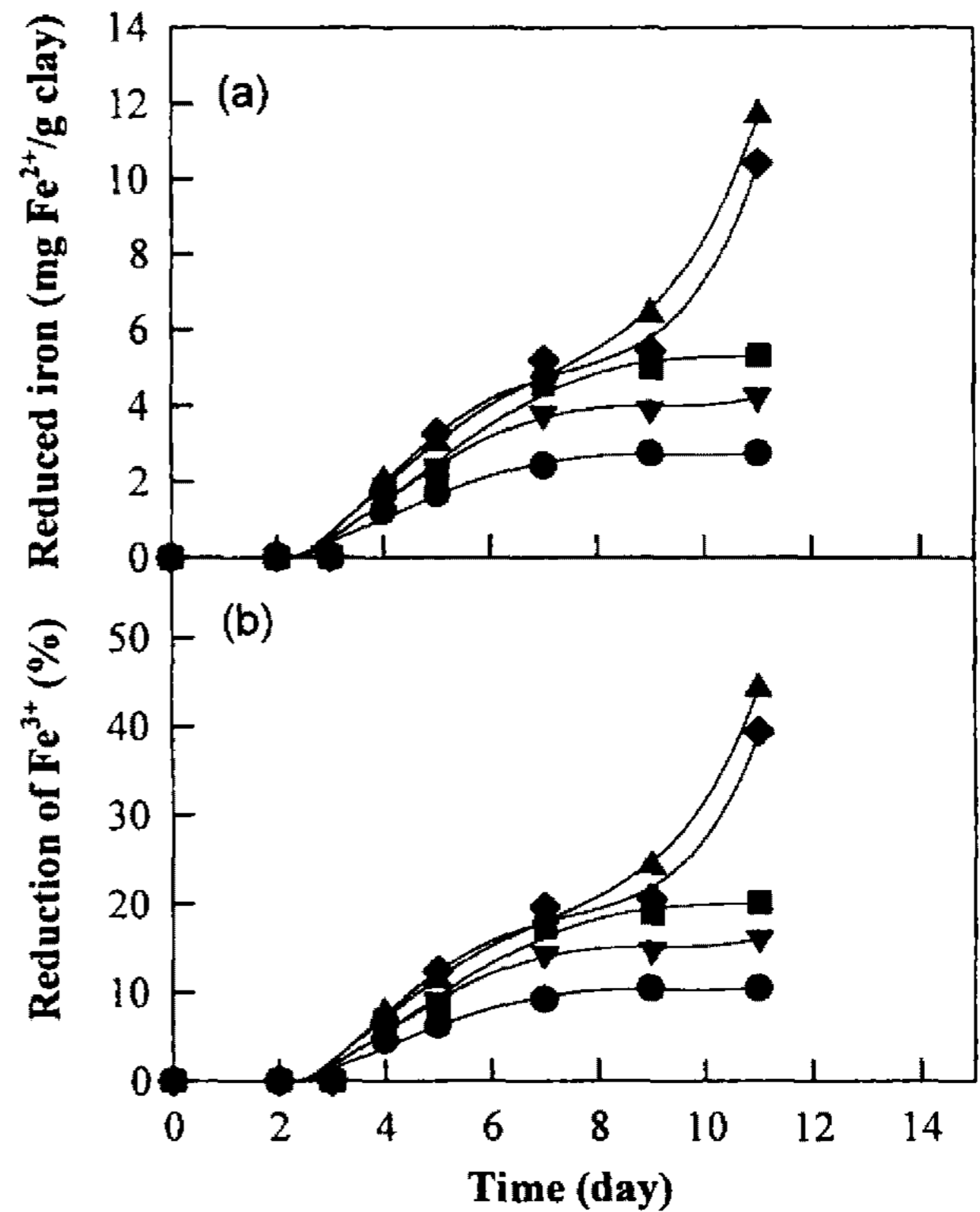
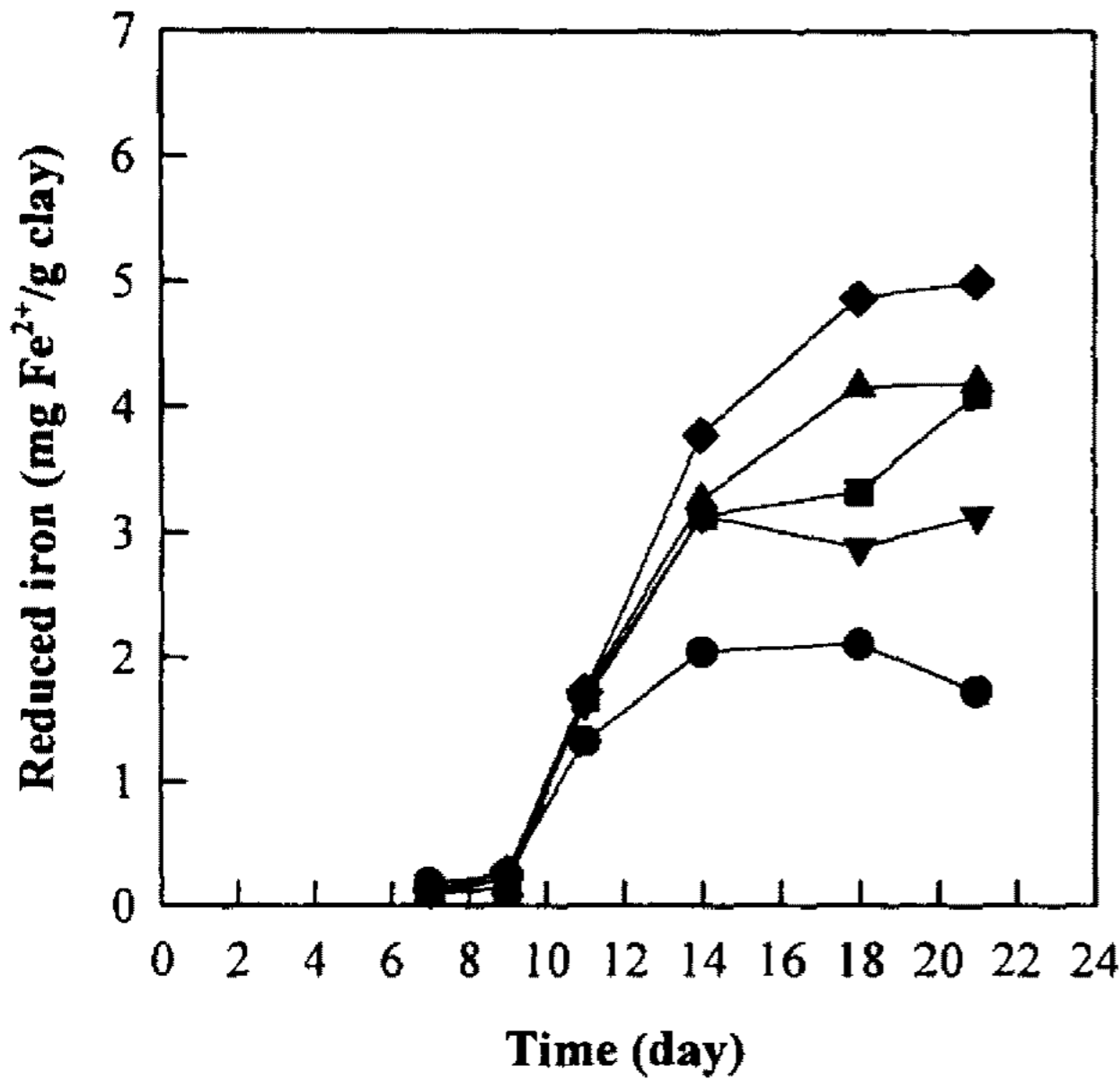


Fig. 2. Time profiles of concentration of reduced iron and percentages of iron reduction at different glucose concentration. The cultures were carried out at 20 % clay pulp density. Glucose concentration (w/w, g sugar/100 g clay): ●, 1%; ▼, 2%; ■, 3%; ◆, 4%; ▲, 5%.

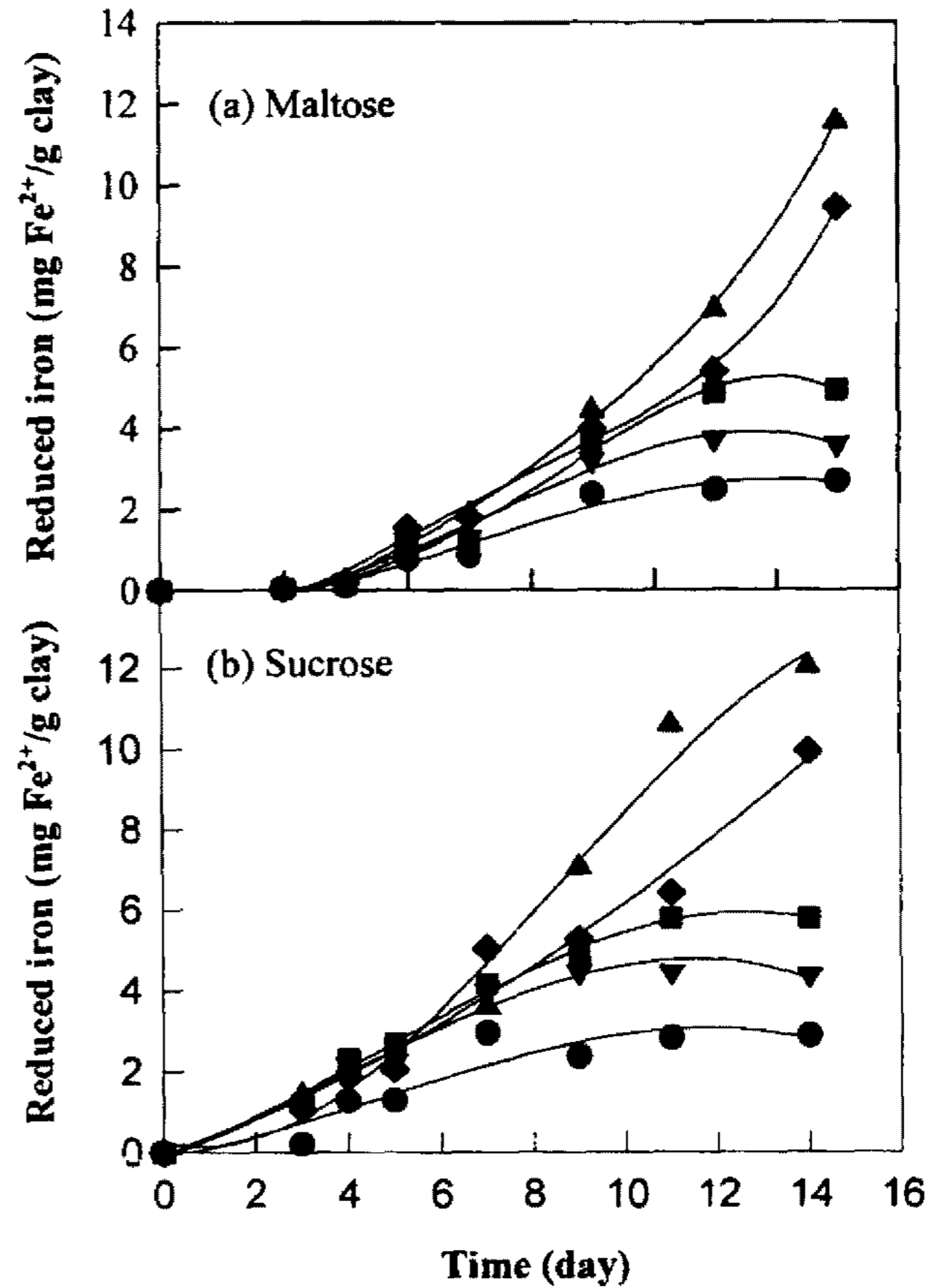


**Fig. 3. Time profiles of concentration of reduced iron at different galactose concentration.**  
The cultures were carried out at 20 % clay pulp density. Galactose concentration (w/w, g sugar/100 g clay): ●, 1%; ▼, 2%; ■, 3%; ◆, 4%; ▲, 5%.

을 알 수 있었다. 배양 4일째부터부터 철환원반응이 관찰되기 시작하였다. Glucose를 1~2% 첨가한 경우에는 배양 약 7일경부터 철환원 반응이 더 이상 진행되지 않았고, glucose를 4~5% 첨가한 경우에는 11일 배양할 때까지 철환원이 진행되었다. 액상에 용출된 환원철( $Fe^{2+}$ )의 양과 철환원율은 glucose 첨가량이 증가함에 따라 증가하였다. Glucose를 5% 첨가했을 때 최대 44.2%의 탈철율을 얻을 수 있었다. Galactose를 첨가한 경우에는 약 9일 동안의 lag phase를 보였고, 철 환원이 9일 경과후에야 진행되기 시작했으며, 22일 경과후에 첨가한 양에 따라 2~5 mg Fe/g clay의 적은양의 철환원이 일어났다.

이탄당인 maltose와 sucrose를 탄소원을 이용한 경우 점토의 철환원 특성을 조사하였다(Fig. 4) Maltose와 sucrose 모두 glucose를 첨가한 경우와 마찬가지로 초기 3일간의 lag phase를 보인후 철환원이 진행되었다. 배양 4일 이후부터 배양시간에 따라 용출된 철의 농도가 점점 증가하였고, 탄소원의 첨가량이 증가할수록 환원된 철의 양이 증가하였다. 두 탄소원을 사용하여 얻은 환원된 철의 양은 거의 유사한 값을 얻었고, 5%에서 가장 많은 양의 철환원이 일어났다.

탄소원으로 glucose, galactose, maltose 및 sucrose를 첨가했을 경우와는 달리 전분을 탄소원으로 사용할 경우 철환원이 거의 진행되지 않았다. 철환원에 필요한 전자공여체로 다당류인 전분이 사용되기 위해서는 발효과정을 거쳐 단당류나 이당류로 가수분해 되어야 한다. 그러나, 본 연구에 사용된 철환원 혼합배양액은 단당류인 glucose로 순치시킨 배양액이므로 다당류를 가수분해 할



**Fig. 4. Time profiles of concentration of reduced iron at different sugars concentration.**  
The cultures were carried out at 20 % clay pulp density. Sugar concentration (w/w, g sugar/100 g clay): ●, 1%; ▼, 2%; ■, 3%; ◆, 4%; ▲, 5%.

수 있는 미생물이 거의 존재하지 않기 때문에 전분을 탄소원으로 이용했을 경우에는 발효가스도 거의 발생되지 않았으며 철환원도 진행되지 않은것으로 사료된다.

탄소원으로 glucose, galactose, maltose 및 sucrose를 1~5% 농도로 점토에 첨가했을 때 점토로부터 수용상으로 용출된  $Fe^{2+}$ 양을 기준으로 계산한 철제거율을 Table 1에 정리하였다. 단당류인 glucose와 이당류인 maltose와 sucrose를 첨가했을 경우에는 탄소원의 종류에 상관

**Table 1. Comparison of removal ratio of ferric iron from the clay at different sugars**

Substrate conc. (g/100 g-clay)	Removal ratio (%)			
	Glucose <sup>a)</sup>	Galactose <sup>b)</sup>	Maltose <sup>a)</sup>	Sucrose <sup>a)</sup>
1	10.4	7.9	10.2	10.6
2	15.1	11.8	13.6	20.6
3	20.1	15.4	18.6	22.2
4	39.3	18.8	35.7	45.4
5	44.2	15.8	43.6	

All cultures were incubated at 20% clay density. <sup>a)</sup>Cultures were incubated for 11 day. <sup>b)</sup>Cultures were incubated for 21 day.

없이 첨가량에 따라 거의 유사한 제거율을 나타내었으며, 각각의 탄소원을 5%를 첨가했을 때 11일간 배양하여 약 44~45%의 최대철제거율이 얻어졌다. 그러나, galactose를 첨가했을 경우에는 22일 배양후에 겨우 15-18% 정도만이 점토로부터 철이 제거되었다. 점토내의 철불순물의 형태는 구조적인 결정물로서 환원이 잘 안된다고 알려져 있다(23). 대표적인 점토내의 철화합물의 형태는  $Fe_2O_3$ 로 알려져있는데, 미생물에 의한 철이 환원되는 정도는 ferric hydroxide( $Fe(OH)_3$ ) > goethite( $FeOOH$ ) > hematite( $Fe_2O_3$ )의 순으로 진행되며, 결정화 정도가 낮을 수록 환원되기 쉬운 것으로 밝혀져 있다(23). 즉, 점토내에는 철불순물이 미생물에 의해 가장 어려운 형태인 hematite로 존재하기 때문에 제거율이 50%를 초과하지 않는 것으로 사료된다(14).

소비된 탄소원의 양과 환원되어 수용상으로 용출된  $Fe^{2+}$ 의 양과의 관계를 Fig. 5에 도시하였다. 탄소원의 종류에 관계없이 소비된 탄소원이 양이 증가함에 따라 환원된 철의 양이 선형적으로 증가하였다. Fig. 5의 기울기로부터 포도당 100 mole 당 환원된 철의 양은 약 75 mole 이었고, 이당류인 sucrose와 maltose는 100 mole을 소비할 경우 약 145 mole의 철을 환원시켰다. 소비된 탄소원으로 환산할 경우 위 세 탄소원의 종류에 관계없이 100 mole의 탄소당 12.1~12.8 mole의 일정한 양의 철이 환원되었다. 반면에 galactose는 100 mole당 40 mole의 철을 환원 하였고, 소비된 탄소 100 mole 당 6.7 mole의 철을 환원시키는데 그쳤다. 따라서, 본 연구 결과를 기초로 할 때, 점토 탈철을 위한 탄소원으로 포도당, sucrose, maltose 등이 적합한 것으로 사료된다.

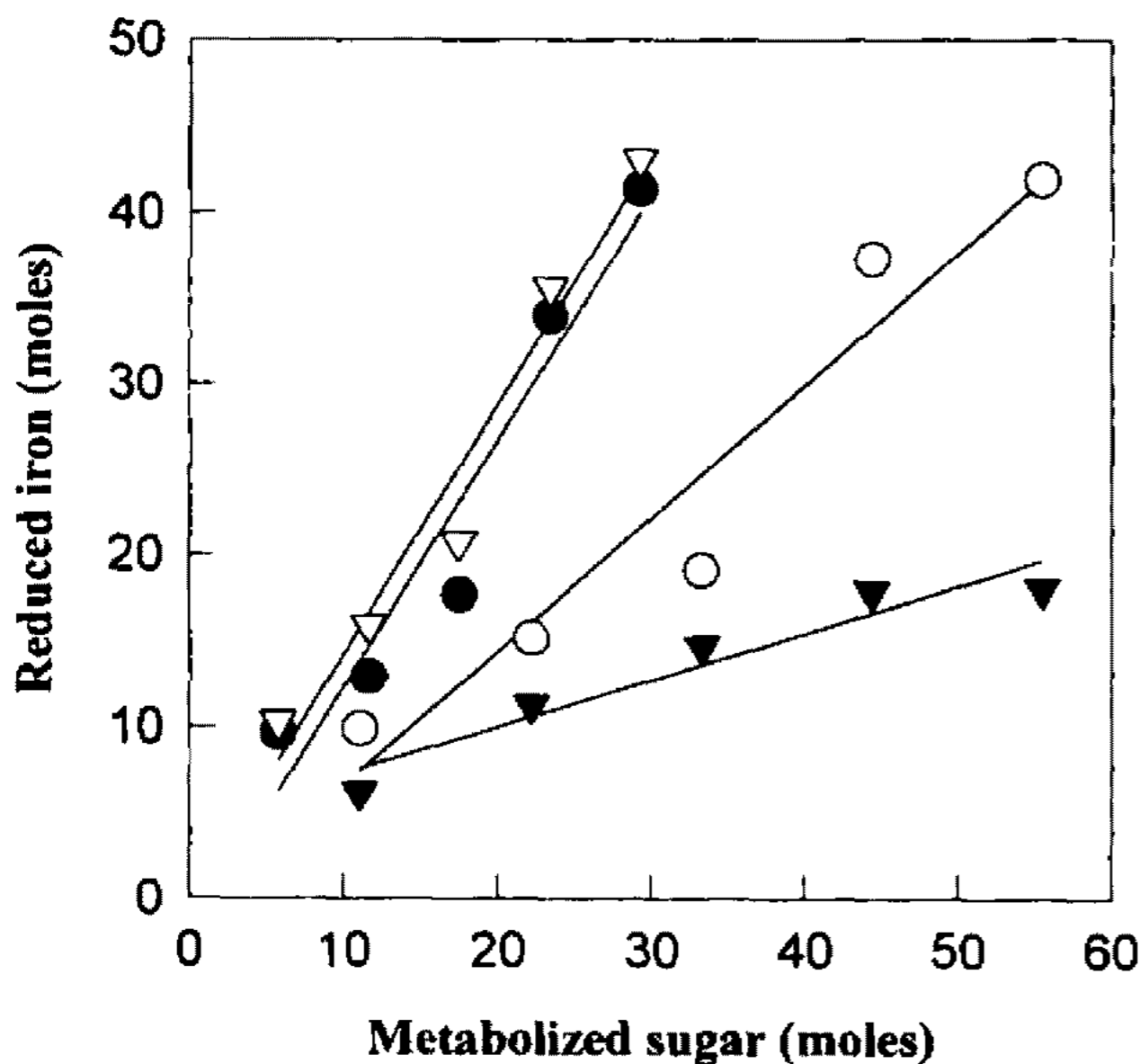


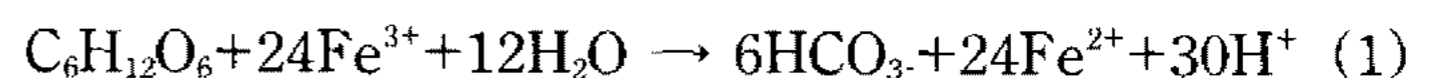
Fig. 5. Relationships between metabolized sugar and reduced iron.

Carbon source: ○, glucose; ▼, galactose; ●, maltose; ▽, sucrose.

### 점토로부터 분리한 철환원균주의 특성

철환원 혼합배양액을 FePPi배지에 접종하였을 때 노란색을 띠는 FePPi배지는 철환원반응이 진행되면서 초록색으로 변화되고, 약 배양 2주일이 지나면 배지가 투명해지면서 흰색의 침전물이 바닥으로 가라 앉는다. 즉, FePPi 배지중의 ferric pyrophosphate가 완전히 환원되면 흰색침전물인 vivianite( $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ )가 생성되는데, 이 흰색침전물의 생성여부로 분리 균주의 철환원능을 확인할 수 있다(24). 본 연구에서는 점토로부터 FePPi배지에서 ferric pyrophosphate의 환원에 의해 흰색의 침전을 생성할 수 있는 두 종류의 균주를 분리하였다. 두 분리 균주는 통성 혐기성 균주로 FePPi의 고체배지에서 생성된 colony들은 배지표면에 불투명하게 생성되지 않고, 배지속으로 오목하게 들어가는 특징이 있었다. 분리 균주중 한 균주는 IRB-W로 명명하였는데, 이 균주의 형태학적 특징은 그람 양성의 포자형성 간균으로 운동성이 있다. 배양학적 특성은 ferric pyrophosphate배지에 생긴 colony가 시간이 경과함에 따라 불투명한 흰색이었고, 37~45°C의 온도범위에서 생장이 가능하다. 생리학적 특징은 catalase 활성은 양성이었으나, oxidase 활성은 음성이었다. 이러한 특성으로부터 IRB-W는 *Bacillus* sp.로 동정되었다. 다른 한 균주는 IRB-Y로 명명하였는데, 형태학적인 특성은 운동성이있는 그람 음성 간균이었다. 이 균주의 colony는 반투명한 크림색을 띠었고 직경이 1~2 mm인 원형으로 성장하였다. IRB-Y 균주는 37~41°C에서 성장 가능 하였으며, catalase 활성은 양성, oxidase 활성은 음성을 보였다. 이 균주는 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 이 두 균주의 배양액을 단독으로 혹은 혼합하여 점토에 접종하고 탄소원을 첨가하였을 경우, 발효가스는 대량 생성되었으나, 점토로부터 철환원은 거의 진행되지 않았다.

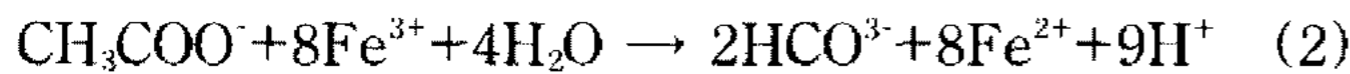
점토에서 glucose, maltose 및 sucrose와 같은 당류의 산화와 더불어 진행되는  $Fe^{3+}$  환원반응은 여러 가지 형태의 대사경로를 가진 이화적 철환원 미생물의 협동 작용에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다(15). 초기단계에서는 발효미생물에 의해 당류는 유기산, alcohol 및 수소가스로 분해되며, 이때 적은 양의 전자만이  $Fe^{3+}$ 에 전달되기 때문에 철환원반응은 미미하게 진행된다. 즉,  $Fe^{3+}$ 로 전달되는 대부분의 전자는 당류의 발효산물이 산화되면서 생성된 것이다. 반응식 (1)과 같이 glucose가 이산화탄소로 완전히 산화되며 이때 전자수용체로 이용되는 대사는 상당히 드물게 일어나는 경로로 알려져 있다(25).



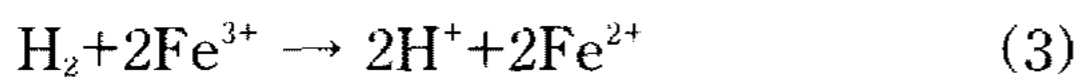
이론적으로는 glucose 1 mole당 24 mole의  $Fe^{3+}$ 가  $Fe^{2+}$ 로 환원될 수 있다. 그러나, 발효세균인 *Bacillus polymyxa*는 대사한 glucose 100 mole당 41 mole의  $Fe^{3+}$ 만이

환원되었고, 환원된 철의 양이 이론치의 1.7%에 불과하였다(26). 즉, *B. polymyxa*는 glucose를 산화하는 과정에서  $Fe^{3+}$ 는 전자수용체로 거의 이용하지 못하고, glucose의 발효 대사산물이 전자수용체로 작용하여 ethanol, 2, 3-butylene glycol, lactic acid, formic acid 및 수소 등과 같은 발효산물을 생성한다(26). 또다른 발효세균인 *Vibrio sp.*의 경우에도, 대사된 glucose 100 mole당 이론치의 0.03~0.13%에 불과한 0.72~3.12 mole의  $Fe^{3+}$ 가 환원되는 것으로 보고된 바 있다(27). 따라서, 본 연구에서 분리한 두 종의 균주를 점토에 접종하였을 때 발효가스는 발생하였으나, 철환원이 거의 진행되지 않은 것은 이 균주들은 점토의 철환원과정에서 탄소원으로 첨가한 당류를 유기산이나 수소로 분해하는 발효세균이기 때문으로 판단되었다. 즉, IRB-W 및 IRB-Y 균주는 점토로부터 철을 용출해내는 과정에서 초기에 작용하는 철환원균주로 사료된다.

철환원이 진행되는 혐기성 조건하에서 당류의 대표적인 발효산물은 acetate와 수소이다. *Geobacter metallireducens*는 acetate를 이산화탄소로 산화하며 이 과정에서 방출되는 전자의 수용체로  $Fe^{3+}$ 를 이용하는(반응식 (2)), acetate 산화 철환원세균으로 알려져 있다(21).



한편, 반응식 (3)과 같이 수소의 산화와 더불어 철을 환원할 수 있는 균주로는 *Pseudomonas sp.*(28), *Shewanella putrefaciens*(29) 및 BrY(30) 등이 알려져 있다.



이와 같이 유기물의 산화와 함께 진행되는 철환원반응은 독특한 대사 특성을 가진 여러종의 세균에 의해 총체적으로 수행되는 반응이다. 본 연구에서 혼합균주를 사용하여 얻은 결과는 100 mole의 대사된 glucose 당 환원된

철의 양은 75 mole로 *Bacillus polymyxa*와 *Vibrio sp.*의가 환원된 철의 약 1.8~100배 가량 높다(Fig. 5). 이러한 연구 결과는 혼합균들에 의해 반응식 (1) 뿐만 아니라 철 환원 효율이 좋은 식 (2)와 (3) 등 여러 반응들에 의해서 철환원 반응이 진행되었기 때문으로 사료된다. 본 연구에서는 점토로부터 철환원 반응 초기에 관여할 것으로 사료되는 두 균주만이 분리 되었지만, 전자공여체로 acetate나 수소와 같은 다양한 기질을 이용하는 철환원균을 분리하여 점토 탈철에 활용한다면 기질의 효율을 증진시킬수 있을 것이다.

### 생물학적 처리에 의한 점토의 색도 비교

도기나 자기등 요업분야에서 점토자체가 가지고 있는 색은 유약을 바른 후에도 제품의 색에 직접적으로 영향을 미친다. 점토내에 철산화물이 많이 함유될수록 점토 자체의 색은 적색을 강하게 나타내며, 철산화물은 소성 과정에서 균열을 야기시켜 제품의 내구성을 저하시키는 불순물이기도 하다(1-4). 그러므로 점토자체가 띠는 색도는 점토의 품질을 결정하는 중요한 요소로 작용하며, 백색도가 높을수록 고품질의 점토로 분류된다(1-4). 본 연구에서 철환원미생물에 의해 처리한 점토 시료의 색도를 처리하기 전의 점토 시료와 비교한 결과를 Fig. 6에 도시하였다. 생물학적으로 철제거 처리를 하지 않은 점토시료를 1050℃ 구운 후의 적색도는 13.49이었고, 백색도는 63.20이다. 그러나, 생물학적으로 철제거 처리를 한 점토시료의 적색도는 3.55로 처리전 시료와 비교하여 상당히 낮아졌다. 또한, 백색도는 79.64로 처리전 시료보다 백색도가 증가하였음이 검증되었다.

철환원 미생물을 이용하여 저품위 점토를 개질 하는 생물학적인 처리에 의해서 점토의 고유 성질을 결정하는 중요 광물들의 조성비가 변화해서는 곤란하다. 점토의 생물학적인 철제거 처리에 의해 점토의 광물조성비를

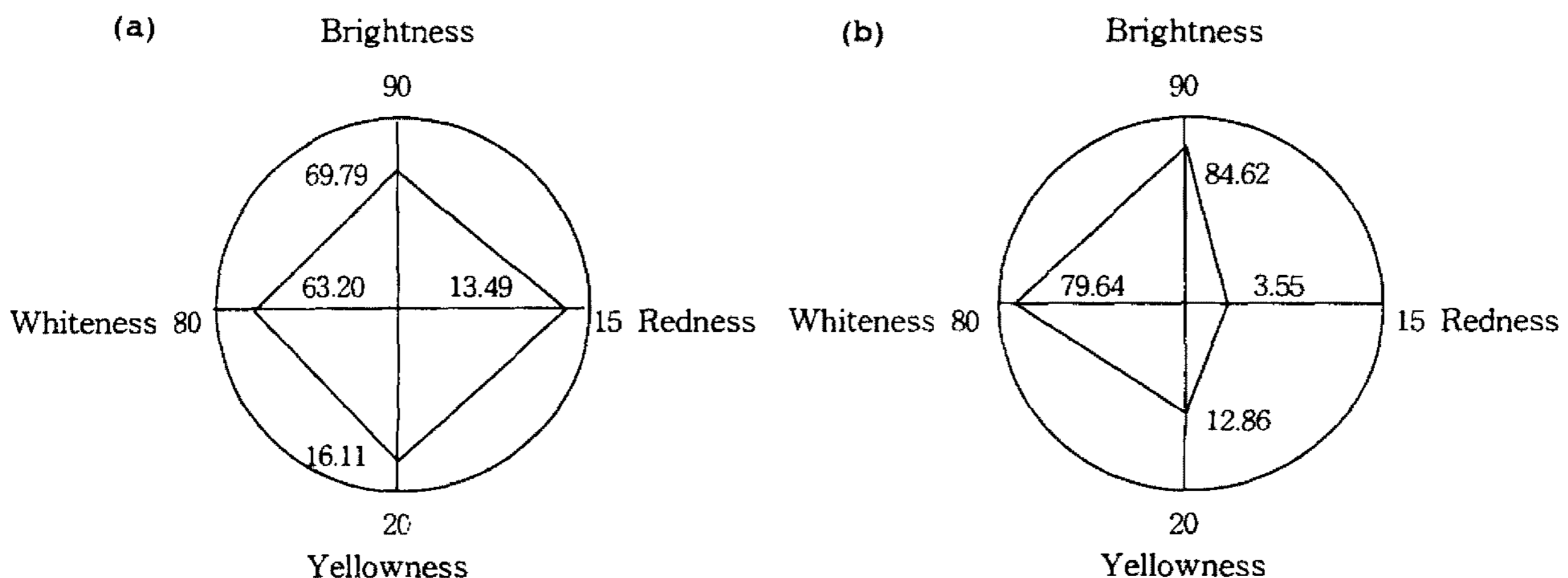


Fig. 6. Chromaticity diagram of clay samples after firing at 1050 °C for 2 hours. (a) Raw clay, (b) refined clay.

Table 2. Comparison of mineral compositions of clay before and after microbial treatment (the clay was treated at 5 g glucose/100 g clay)

Minerals	Weight percentage (%)	
	Before treatment	After treatment
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	42.09	42.41
SiO <sub>2</sub>	53.28	54.24
K <sub>2</sub> O	0.50	0.46
CaO	0.15	0.11
TiO <sub>2</sub>	0.18	0.26
Others	3.80	2.09

EDAX를 이용하여 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 점토의 주요 광물조성비는 소성 과정에서 뿐만 아니라, 생물학적 철제거 처리에 의해서 거의 영향을 받지 않고, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>가 42~43 wt%, SiO<sub>2</sub>가 53~54 wt%로, 일정한 조성비를 나타내었다. 이는 철환원 미생물이 점토로부터 철불순물만을 선택적 수용상으로 용출시키는 기질 특이성에 의한 결과로 판단된다. 즉, 철환원 미생물을 이용한 점토의 고품위화 기술은 점토자체의 타 성분의 손실 혹은 변질 없이 선택적으로 철불순물만이 제거됨을 알 수 있었다.

## 요 약

적색의 점토로부터 철불순물을 제거하여 양질의 백색 점토를 얻기 위하여 철환원 미생물을 이용하는 생물학적 철제거 효율에 미치는 탄소원의 영향을 조사하였다. 탄소원으로 단당류인 glucose와 이당류인 maltose와 sucrose를 1~5%(w/w)농도로 첨가하여 철환원 효율을 조사한 결과, 탄소원의 첨가량이 증가할수록 철제거율도 증가하였다. 각 탄소원을 5% 첨가했을 때 최대 44.2~45.4%의 철을 제거할 수 있었다. 점토로부터 탄소원으로 당류를 산화하여 주로 발효대사산물을 생성하는 발효 철환원 세균 두 종을 분리하였으며, *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 철환원 미생물에 의한 점토의 철제거 처리에 의해 점토의 백색도는 63.20에서 79.64로 증가하였으며 적색도는 13.47에서 3.55로 감소하여 저질의 점토가 양질의 점토로 개량이 가능하였다. 또한, 에너지 분산 분석법에 의해 점토내의 주요 광물의 조성비를 조사한 결과, 철환원 미생물은 점토 광물의 조성비에는 거의 영향을 미치지 않고, 선택적으로 철불순물만을 제거하였음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 연구는 1996년도 생물공정연구센터 연구비(96-K4-10-05-02-00-3)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Povlov, V. F. and V. Meshcheryakova. 1983. Reducing the coloring effects of iron oxides in porcelain bodies, *Glass and Ceramics*, **40**: 50-152.
- Ratzenberger, H. 1988. The influence of the mineralogical composition of structural ceramics and heavy clay materials on kiln scumming and efflorescence, *Ziegelind Int.*, **41**: 99-105.
- Stepkowska, E. T. and S. A. Jefferis. 1992. Influence of microstructure on firing color of clays, *Appl. Clay Sci.*, **6**: 319-342.
- Ryu, H. W., K. S. Cho, Y. K. Chang, S. D. Kim, and T. Mori. 1995. Refinement of low-grade clay by microbial removal of sulfur and iron compounds using *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Ferm. Bioeng.*, **80**: 46-52.
- 대한광업진흥공사. 1994. 광업요람, 서울.
- Ido, T. 1965. *Powder engineering*, Asakurashoten, Tokyo.
- Inoue, K. and A. Yoshida. 1984. Iron leaching of Shirasu by acid treatment, *J. Ceram. Soc. Japan*, **92**: 520-524.
- Japan Ceramic Society. 1969. *Ceramic handbook*, Giboudou, Tokyo.
- Kimura, K. and H. Tateyama. 1989. Refinement of the low-grade Amakusa pottery stone by hydrothermal treatment, *J. Ceram. Soc. Japan*, **97**: 439-446.
- Otsuka, N., T. Hayashi, K. Okanishi, and Y. Shiraki. 1974. The removal of iron oxide from clay by sodium dithionite-sulfuric acid system (III), *Nendo Kagaku*, **14**: 45-57.
- Suzuki, T. and S. Tomizaki. 1954. Study on the removal of iron from ceramic materials by chloride treatment, *Kyogyokagaku*, **57**: 29-31.
- Curtis, C. D. 1985. Clay mineral precipitation and transformation during burial diagenesis, *Phil. Trans. K. Soc. London*, **315**: 91-105.
- Stucki, J. W. 1988. Structural iron in smectites, Pp 625-675. In J. W. Stucki, B. A. Goodman, and U. Schwertmann (eds.), *Iron in soils and clay minerals*, D. Reidel Publishing Co., Boston.
- Hints, I., S. Kiss, P. Papacostea, D. Radulescu, and M. Dragan-Bularda. 1977. Application of microbiological method for diminution of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> content of kaolins, Pp 387-391. In 4th Symposium of soil biology, Rumanian National Society for soil Science, Bucharest.
- Nealson, K. H. and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation, *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**: 311-343.
- Torma, A. E. 1988. Leaching of metals, Pp 368-399. In G. Reed and H. J. Rehm (eds.), *Biotechnology*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Lovley, D. R. and D. J. Lonergan. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1858-1864.

18. Zelles, L., I. Scheunert, and F. Korte. 1986. Determination of the effect of pentachlorophenol on the bioactivity of soils by the iron-reducing test. *Chemosphere*, **15**: 309-315.
19. Wu, J., C. B. Roth, and P. F. Low. 1988. Biological reduction of structural iron in sodium-nontronite, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52**: 275-296.
20. 국립공업시험원. 1991. 장석 및 점토의 정제기술개발 (III), 상공부, 서울.
21. Lovley, D. R. and E. J. P. Phillips. 1988. Manganese inhibition of microbial iron reduction in anaerobic sediments, *Geomicrobiol. J.*, **6**: 145-155.
22. Furman, N. H. 1975. *Standard methods of chemical analysis*, 6th ed., R. E. Krieger Publishing Co., Huntington, New York.
23. Phillips, E. J. P., D. R. Lovley, and E. E. Roden. 1993. Composition of non-microbially reducible Fe(III) in aquatic sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2727-2729.
24. Caccavo, F. Jr., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz, and M. J. McInernery. 1994. *Geobactor sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3752-3759.
25. Lovley, D. R. 1991. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction, *Microbiol. Rev.*, **55**: 259-287.
26. Robert, J. L. 1947. Reduction of ferric hydroxide by strains of *Bacillus polymyxa*, *Soil Sci.*, **63**: 135-140.
27. Jones, J. G., S. Gardener, and B. M. Simon. 1983. Reduction of ferric iron by heterotrophic bacteria in lake sediments, *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 45-51.
28. Balashova, V. V. and G. A. Zavarzin. 1980. Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria, *Microbiol.*, **48**: 635-639.
29. MacDonell, M. T. and R. R. Colwell. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*, *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 171-182.
30. Caccavo, F. Jr., R. P. Blakemore, and D. R. Lovley. 1992. A hydrogen-oxidizing, Fe (III)-reducing microorganism from the Great Bay estuary, New Hampshire, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3211-3216.

(Received 10 July 1997)