The Korean Journal of Microbiology, Vol. 45, No. 4, December 2009, p. 411-415
Copyright©2009, The Microbiological Society of Korea

단 보

Bacillus sp. MR2에 의한 망간단괴의 생물용출

최성찬[1]* · 이가화[1] · 이홍금[2]
[1]한림대학교 환경생명공학과, [2]한국해양연구원 부설 극지연구소

비황화광물인 망간단괴에서 일부 미생물은 비효소학적 과정을 통해 간접적으로 망간(II)을 용출시킬 수 있다. 이때 환원적 용해를 일으킬 수 있는 대사산물의 생성을 위해 제공되는 탄소 및 에너지원인 glucose, sucrose, galactose 등은 생물용출 기술의 장점인 경제성을 저하시키는 원인이 되고 있다. 본 연구에서는 저렴한 탄소 및 에너지원으로 corn starch를 이용하면서 망간(II) 용출능력을 지닌 종속영양 미생물로서 *Bacillus* sp. MR2에 의한 망간(II)의 용출 특성을 알아보았다. 망간(II)의 용출은 MR2의 생장에 수반되어 일어났으며[25.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}], 24시간 이후에는 생성된 망간(II)의 일부가 망간단괴 입자에 다시 흡착되는 경향을 보였다. 분쇄물을 dialysis tube (MWCO 12,000)에 넣어 MR2와의 접촉을 막았을 때도 유사한 정도의 결과[24.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}]를 보여 세포와 망간단괴의 직접적 접촉이 필요 없이 세포의 분비물질에 의해 환원적 용해가 일어남을 알 수 있었다. 실험에 적용된 영향요인들의 범위에서 최적 용출조건을 분석한 결과, 25~35°C, pH 5~7, 접종밀도 1.5~2.5% (v/v), 분쇄물의 농도 2~3 g/L 및 입자크기 <75 μm일 때가 가장 효율이 높았다. 비록 입자의 크기가 작을수록 망간(II) 용출속도가 증가했지만 분쇄에 더 많은 에너지가 요구되므로 경제성을 고려한다면 <212 μm가 적절한 수준으로 제시될 수 있었다. 이상의 효율적인 망간단괴의 용출 조건 규명은 기존의 물리화학적 금속 회수 기술에 비해 적은 비용과 에너지가 요구되는 환경친화적 생물용출 기술의 진보에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Key words □ ***Bacillus*, bioleaching, manganese nodule, reductive dissolution**

망간은 종종 강철 산업의 아킬레스건이라 불리는데 그것은 미량의 망간 첨가만으로도 강철의 질을 상당히 향상시키므로 강철 생산에 필수적인 물질이기 때문이다(2). 또한 망간은 건전지 제조뿐만 아니라 탈황, 탈산화, 주물성형과정 등에서 첨가제로 쓰이는 등 산업적으로 널리 사용되는 중요한 금속 중의 하나이다. 망간은 지구 표층을 이루는 금속원소 중 중량비율 0.1%로서 그 함량이 다섯 번째로 많으며, 바위, 토양, 담수, 해수, 퇴적토 등 다양한 곳에 분포되어 있다. 그 중 해저면에서 발견되는 망간단괴(manganese nodule)에서 망간은 주로 [+4]가의 형태인 산화망간(MnO_2)의 형태로 존재하면서 망간(II) 뿐만 아니라 주위의 양이온을 강하게 흡착하고 있다(7). 특히 산화망간은 구리, 코발트, 니켈 등의 고부가가치 금속이온과 다량 결합되어 있어 망간산화물이 환원되는 경우 이러한 금속들이 망간과 함께 효과적으로 용출 회수될 수 있다.

일반적으로 고온 건식제련(pyrometallurgy)에 의한 유용금속의 회수 방법들은 부수적으로 독성 금속분진의 대기 중 확산을 초래할 뿐만 아니라, 화석연료의 연소에 따른 황산화물과 질소산화물로 인한 대기오염 및 CO_2를 포함한 많은 양의 온실가스를 배출한다는 점에서 환경적으로 매우 불리하다(6). 습식제련(hydrometallurgy) 기술에 포함되는 다양한 물리화학적 회수방법인 화학적 용출법, 용매추출법, 이온교환법, 전기투석법, 침전법 등도 역시 많은 양의 폐액과 폐슬러지 등 2차 처리가 필요한 폐기물이 생성된다는 점과 에너지 소비가 크다는 점에서 주로 고품위 광석을 대상으로 제한적으로 적용된다. 하지만 미생물을 활용한 유용 금속의 생물학적 회수기술은 물리화학적 기술에 비해 환경에 미치는 위해성이 상대적으로 작고 특히 저품위 광석을 대상으로 할 때 비용적인 측면에서 유리한 것으로 평가받고 있다(9).

망간단괴로부터 생물용출(bioleaching)에 의한 망간의 회수가 일부 미생물에서 보고 되었으며 주로 망간의 함량이 상대적으로 낮은(<35%) 저품위 광석을 대상으로 연구되었다. 망간(IV)을 최종 전자수용체로 이용하는 경우 망간(IV)의 환원은 에너지 생성과 수반되어 나타나며, 이러한 직접적 기작에 의한 망간(IV)의 환원은 *Geobacter metallireducens* (11), *Shewanella putrefaciens* (12), *Desulfuromonas acetoxidans* (15) 등에서 보고되었다. 이와는 달리 일부 미생물에서는 망간(II)의 용출이 에너지 생성과 관계없이 비효소학적 과정에 의해 간접적으로 일어난다는 사실이 알려졌는데, 이러한 환원과정에서는 환원적 용해(reductive dissolution)를 일으킬 수 있는 화합물, 즉 pyruvate, oxalate, acetate와 같은 유기산 등이 대사과정을 통해 생성되어야 한다(8, 9, 14). 하지만 간접적 기작에 의한 경우 미생물에게 제공되는 탄소 및 에너지원이 주로 고가의 glucose, sucrose, galactose 등으로서 생물용출 기술의 장점 중의 하나인 경제성을 저하시키는 원인이 되고 있다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-248-2151, Fax: 82-33-242-9300
E-mail: scchoi@hallym.ac.kr

본 연구에서는 저렴한 탄소 및 에너지원으로 corn starch를 이용하면서 망간 용출능력을 지닌 종속영양 미생물을 자연계로부터 분리하고, 이 균주를 이용하여 망간단괴 분쇄물로부터 망간(II)의 용출 특성을 밝히고자 하였다. 최적 용출조건의 확인은 배양온도, pH, 균주의 접종밀도, 망간단괴 분쇄물의 농도 및 입자크기 등을 대상으로 하였다. 또한 dialysis tube를 이용하여 세포와 망간단괴 분쇄물의 직접적 접촉을 차단한 상태에서도 용출이 일어나는지 확인함으로써 분리된 균주의 망간(II) 용출 기작을 알아보고자 하였다.

망간환원 세균의 분리는 다양한 토양과 하수에서 채취한 시료를 합성된 MnO_2가 덧 씌어진 modified AMR 한천배지(peptone 5 g, corn starch 10 g, KH_2PO_4 0.25 g, K_2HPO_4 0.5 g, agar 15 g, 1 L DW)에 접종하고, 망간(IV) 환원에 따라 콜로니 주변에 나타나는 clear zone 형성을 확인하여 분리하였다. 이때 MnO_2의 합성은 magnetic bar로 20 mM의 $KMnO_4$ 용액을 혼합하는 동안 30 mM의 $MnCl_2$ 용액을 첨가하여 준비하였다. 분리된 균주는 그람양성의 호기성 간균으로서 API 50CH kit (bioMrieux Corp.) 분석과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 균주는 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168^T와 99.1% similarity (1,348/1,360 bp)를 나타내었으며, 이에 기초하여 *Bacillus* sp. MR2 (accession number GU138100)로 명명하였다. 액체배지에 망간단괴 분쇄물이 첨가된 경우 입자의 표면에 흡착되어 생장하는 막대형의 세균들을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1A), 한천배지에서 흑갈색의 MnO_2로부터 망간(II)을 용출시켜 clear zone을 형성하였다(Fig. 1B). 사용된 망간단괴는 한국해양연구원으로부터 제공 받았으며 ICP (PS950, Teledyne Leeman Labs)로 분석하여 kg당 평균 279 g의 망간과 더불어 소량의 철, 구리, 아연, 크롬 등을 함유한 전형적인 저품위 망간단괴임을 확인하였다.

생물용출 기술 공정의 최적화는 용출반응 속도와 해당 미생물의 생장 속도 측면에서 이루어져야 한다. MR2 균주의 생장은 coomassie blue를 이용한 dye-binding 방법에 기초하여 단백질량의 증가로 측정하였으며, 용출된 망간(II)은 다음과 같은 방법으로 확인하였다. 균체 접종 후 적절한 시간간격으로 1 ml의 시료를 취하여 최종농도 0.5 N이 되도록 HCl을 첨가하고 10분 후 원심분리(10,000×g, 10분)하여 상등액을 얻었다. 이러한 조건에서는 배지에 넣어준 망간단괴 분쇄물이 거의 용해되지 않는 반면 환원산물 중 백색의 침전물로 존재할 수 있는 $MnCO_3$에서 망간(II)을 효과적으로 용해시킨다(17). 상등액은 Brewer (4)의 방법에 준하여 0.8 ml의 배양액 당 0.2 ml의 formaldoxime 시약을 첨가하고 발색시킨 후 30분 이내에 흡광광도계(UV-1601PC, Shimadzu)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 표준 망간(II) 용액으로 얻어진 검량선을 이용하여 정량 분석하고 망간(II)의 용출 속도를 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}의 단위로 나타내었다. 이때 동일한 조건하에서 균주를 접종하지 않은 비생물학적 대조군의 결과 값을 보정하여 나타내었다.

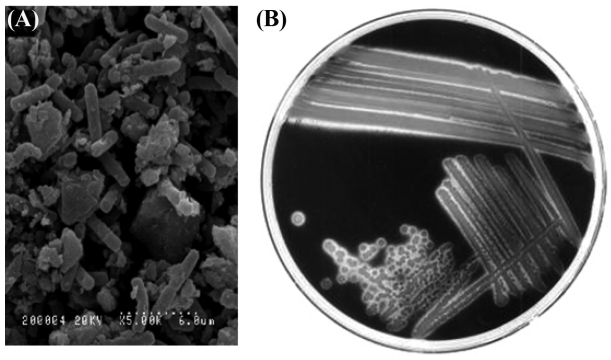

Fig. 1. Reductive dissolution of manganese oxide by *Bacillus* sp. MR2 that grows on manganese nodule (A) caused a clearing in a black MnO_2 overlay around the colonies (B) on a typical streak plate.

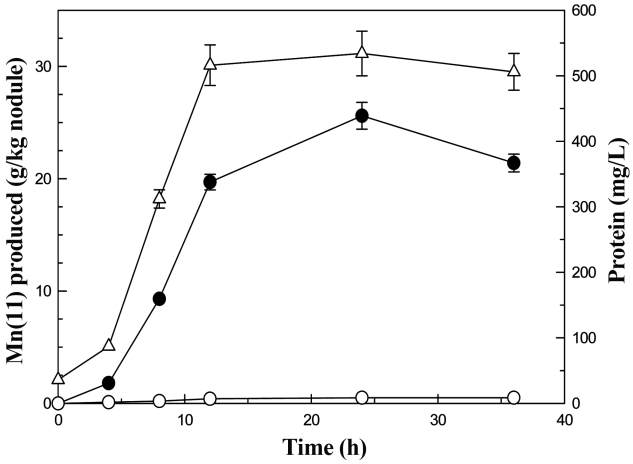

Fig. 2. Mn(II) production (●) during the growth (△) of *Bacillus* sp. MR2. Modified AMR medium control (○) without cells produced only a marginal amount of Mn(II).

망간(II)의 생성은 MR2 균주의 생장에 수반되어 일어났으며 정체기에 도달한 12시간 이후 24시간까지 망간단괴 분쇄물 kg당 25.6 g day^{-1}의 속도로 망간(II)을 생성하였다(Fig. 2). 동일한 실험조건에서 같은 양의 분쇄물을 dialysis tube (MW cutoff 12,000)에 넣어 MR2 균체와의 직접적 접촉을 막았을 경우에도 격리시키지 않았을 때와 유사한 정도인 24.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}의 속도로 망간(II)이 용출되었다. 이러한 결과는 망간(II)의 용출이 dialysis tube를 통과할 수 있는 세포외 분비물질에 의해 환원적 용해(1, 8)인 간접적 기작에 의해 일어난다는 사실을 제시해 준다. 만약 MR2에 의한 망간(II)의 용출이 산소 대신 Mn(IV)를 최종 전자수용체로 이용하는 호흡에 의한 작용이라면 세포와 망간단괴 분쇄물의 직접적 접촉이 필수적이므로 dialysis tube를 이용한 실험에서 망간(II)의 용출이 현저히 낮아졌을 것이다. 한편 종속영양 미생물에 의한 환원적 용해에는 주로 acetic, citric, oxalic, keto-gluconic acid 등의 유기산이 관여하는 것으로 알려져 있지만(8), 일부 연구에서는 세포외다당류(exopolysaccharides), 아미노산, 단백질 등도 다양한 기작을 통해 금속 용출을 일으킬 수 있는 것으로 알려졌다(18). 이상의 실험에서 균주 MR2의 접종 없이 동일한 배지에서 측정된 대조군에서는 망간(II)의 생성이 매우 낮아[0.3 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}] 비

생물학적 반응에 의한 망간(II)의 용출은 미미했다(Fig. 2).

배양 24시간 경과 후 망간(II)의 생성량이 다소 감소하는 것으로 나타났는데(Fig. 2), 산소가 존재하면서 pH 8 이상인 조건에서는 생성된 망간(II)이 MnO_2로 재산화되는 반응이 자발적으로 일어나는 것으로 알려졌다(7). 그러나 본 연구에 사용된 균주의 생장기간 동안 pH를 측정한 결과 pH 7.0(초기)~6.0(36시간 후)의 범위로 나타나 pH 8에 미치지 못하므로 재산화 가능성은 희박하다. 또한 망간(II)이 CO_2와 반응하여 생성되는 백색 침전물인 $MnCO_3$로 제거되는 가능성 역시 알칼리성 pH에서만 가능하므로 배제될 수 있다. Acharya 등(1)에 따르면 pH 5 이상의 조건에서는 생성된 망간(II)이 MnO_2의 표면에 흡착될 가능성이 있으며 이로 인해 생물용출의 효율이 제한될 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 시간대별로 채취한 시료에 HCl (최종농도 0.5 N)을 첨가하여 흡착된 망간(II)을 회수하였으나 비생물학적 용출을 최소화하는 범위에서 결정된 임계 농도임을 감안할 때, 망간단괴 분쇄물의 결정구조 내부로 흡착 격리된 망간(II)에 의한 손실일 가능성이 높다.

본 연구에서 얻어진 망간(II) 용출속도는 다른 연구 결과와 비교할 때 사용된 망간단괴의 망간 함량, 제공된 탄소 및 에너지원과 각종 배양 및 용출조건 등이 상이하므로 단순하게 비교하기는 어려우나, sucrose (10%)가 제공된 배지에서 *Penicillium citrinum*이 생산한 oxalic acid와 citric acid에 의해 1.14 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1} (1), molasses (10%)가 제공된 종속영양 혼합균주에서 48.3 g kg^{-1} day^{-1} (17)의 용출 속도가 보고된 바 있다. 후자의 경우 corn starch를 1%로 제공한 본 연구의 MR2 균주[25.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}]에 비해 2배에 가까운 용출속도를 보였지만, 상대적으로 고가인 molasses (40% sucrose, 2~5% glucose 및 기타 탄수화물 함유)를 높은 농도(100 g/L)로 첨가했을 때 얻어진 결과로서 논문의 저자들(17)도 언급한 바와 같이 scale-up 단계에서는 경제성이 문제가 될 것으로 평가된다. 한편 황원소가 용출대상 광물과는 별도로 제공된 배지에서 화학무기독립영양(chemolithoautotrophic) 미생물인 *Acidithiobacillus ferrooxidans*가 생성한 황산에 의해 7.23 g Mn(II)kg^{-1} day^{-1}의 망간(II) 용출속도가 보고되었다(13). 화학무기독립영양 미생물과는 달리 종속영양 미생물을 이용한 망간(II)의 용출에서 유기물 첨가가 필수적이지만, *A. ferrooxidans*의 경우와 같이 2차 처리가 요구되는 많은 양의 황산 폐액 발생을 회피할 수 있으므로, 상대적으로 저렴한 기질을 이용한다면 경제적이며 환경친화적인 생물용출 기술로 응용될 수 있을 것이다.

생물용출 공정을 최적화하기 위해서는 반응 속도에 영향을 미칠 수 있는 요인들에 대한 검토가 필요하며, 이러한 영향 요인에는 미생물의 특성, 물리화학적 조건 및 용출 대상 광물의 특성 등이 포함된다(3). 본 연구에서는 *Bacillus* sp. MR2에 의한 망간(II) 용출에 영향을 줄 수 있는 요인으로서 배양온도, pH, 균주 접종밀도, 망간단괴 분쇄물의 농도 및 분쇄물의 입자크기 등의 조건을 달리하면서 용출속도를 비교 분석하였다(Table 1). 배양온도는 미생물의 생장 속도를 조절할 뿐만 아니라 종속영양 미생물에 의한 금속용출에서 중요한 역할을 하는 유기산의 생성을 조절하는 중요한 인자이다(20). MR2 균주의 경우 망간(II) 용출의 최적온도는 최적생장 온도인 30°C와 일치하였지만, 25~35°C의 범위에서 용출속도에 큰 차이가 없음(Table 1)과 상온 이상으로의 온도조절이 처리비용 증가를 초래할 수 있다는 점을 고려할 때 25°C가 최적 용출 온도로 평가된다. 망간(II)은 산화환원전위와 pH가 낮은 조건에서 열역학적으로 안정되어 있으므로 pH는 생성된 망간(II)의 화학종 상태 결정에 있어서 중요한 요소 중의 하나이다. 본 연구에서는 배양 초기 pH가 5~7의 범위에서는 망간(II) 용출속도에 큰 차이가 없었으나 pH 7.5와 pH 8에서는 pH 7에 비교하여 각각 19%와 78% 이상 급격히 낮아지는 결과를 보였다(Table 1). 이러한 결과는 혐기성 농후배양을 이용한 Lee 등(10)의 망간단괴 생물용출 실험에서 초기 pH 6.5 보다 pH 7인 경우 망간(II) 용출효율이 35% 정도 낮아진 결과와 비교할 때, 중성 pH에서의 망간(II) 용출 경향은 다르지만 약산성의 pH에서 망간(II) 용출이 최대로 일어난다는 점에서는 유사하다. 이와 같이 약간의 pH 상승에도 불구하고 망간(II) 용출 효율이 현저히 낮아지는 결과는 MnO_2로의 재산화(7), $MnCO_3$로의 침전(14), 또는 망간(II)의 흡착률 증가(1)로 인한 손실 등이 중성에서

Table 1. Effects of various factors that affect on the leaching of manganese nodule by *Bacillus* sp. MR2

Factors	Experimental settings[a] [Mn(II) production (g kg^{-1} nodule day^{-1})]					
Temperature (°C)	20 [18.8±0.9]	25 [25.1±0.8]	30 [26.5±1.1]	35 [24.8±0.5]	40 [21.4±0.5]	45 [19.2±0.7]
Initial pH	4 [11.2±0.6]	5 [26.3±0.7]	6 [26.1±1.0]	7 [25.2±0.5]	7.5 [20.4±1.3]	8 [5.5±0.1]	9 [5.4±0.1]
Inoculum density (%)	0.5 [18.7±1.1]	1 [19.2±0.9]	1.5 [25.6±0.9]	2 [25.4±1.2]	2.5 [25.6±0.6]	
Pulp density (g/L)	0.5 [13.7±0.6]	1 [19.8±1.0]	2 [25.7±0.4]	3 [25.5±0.8]		
Particle size (μm)	<75 [25.3±0.5]	75~150 [22.1±0.9]	150~212 [21.0±1.2]	212~300 [8.8±0.2]		

[a] Standard experimental setting of 1% corn starch, 30°C, pH 7, 2% inoculum, 2 g/L pulp density, and particle size <75 μm was varied on each factors subjected to test

알칼리성 pH로 전환되면서 급격히 증가하기 때문으로 추측된다.

한편 균주의 접종밀도는 초기 용출속도의 유지와 일부 광물에서 나타날 수 있는 독성을 극복하는데 있어서 중요하다. *Penicillium simplicissimum*의 경우 접종 spore의 밀도를 배지 ml 당 2×10^6에서 4×10^6으로 2배 증가시킴에 따라 아연의 용출속도가 50% 정도 증가함을 확인하였다(5). 본 연구의 MR2 균주는 12시간 전배양한 배양액을 접종원으로 사용했을 때, 접종밀도를 1%에서 1.5% (v/v)로 증가시킴에 따라 망간(II) 용출속도가 33% 증가하였지만 그 이상의 접종밀도에서는 더 이상 증가하지 않았다(Table 1).

이상과 같은 요인들 못지않게 광물질 자체의 특성 또한 생물용출에서 중요한데, 예를 들어 광물질의 농도, 입자 크기, 광물학적 조성, 전처리 유무, 표면적 및 입자의 소수성(hydrophobicity) 등이 포함된다(9). 망간단괴 분쇄물의 농도와 입자 크기에 따른 망간(II) 생성속도를 비교한 결과, 분쇄물의 농도가 2 g/L 이상일 때 망간(II) 생성은 큰 차이를 보이지 않았지만(Table 1), 광물질 농도의 증가에 따라 *P. simplicissimum*의 생장이 완전히 멈추거나(5), 보크사이트에서 Ca의 생물용출 속도가 낮아진 연구결과(16) 등을 감안한다면 지나치게 높은 망간단괴 분쇄물 농도는 생물용출에 저해 요인으로 작용할 수도 있다. 한편 분쇄물 입자의 크기에 따른 실험에서는 예상대로 입자크기가 작을수록 높은 효율로 망간(II)이 용출되었다. 생물용출에 관련된 많은 연구에서 입자크기와 추출효율은 반비례하는 것으로 나타났지만(9), 입자의 크기를 작게 하기 위해서는 광물질 분쇄에 더 많은 에너지를 소모해야 한다. 따라서 입자크기가 212 μm 이상인 경우 망간(II) 용출속도가 급격히 감소하지만, 212 μm 미만인 경우 구간별 용출속도 증가율이 상대적으로 크지 않은 결과(Table 1)를 고려한다면, 212 μm 미만 정도의 입자크기가 경제성을 고려한 적절한 망간단괴의 분쇄 수준이 될 것으로 판단된다.

*Acidithiobacillus thiooxidans*나 *A. ferrooxidans*와 같은 화학무기독립영양 미생물에 의한 황화광물에서의 생물용출은 매우 잘 알려져 있으며(19) 구리, 금, 우라늄, 코발트, 니켈, 아연의 회수에서 이미 상업화가 된 바 있다(9). 하지만 망간단괴와 같은 비황화광물에서의 미생물학적 금속 용출은 상대적으로 관심을 적게 받아 왔다. 비황화광물은 주로 oxide, carbonate 또는 silicate의 형태로 존재하는데 이들은 광물질 자체에 미생물이 이용할 수 있는 에너지원을 함유하고 있지 않다. 따라서 이러한 광물들에 생물용출을 적용하기 위해서는 유기물을 탄소 및 에너지원으로 이용하는 종속영양 미생물에 의한 작용을 기대해 볼 수 있다. 생물용출 공정의 규모를 크게 할 때 본 연구에서와 같이 순수배양 체제를 유지하는 경우 오염에 취약한 단점이 있지만, 생물용출 기작이 상대적으로 단순하므로 복합배양 체제보다 유지 관리가 쉬운 장점이 있다. 따라서 망간(II)의 용출이 활발히 일어나는 것으로 확인된 복합배양 체제에서 개별 균주로 순수분리를 시도하는 경우가 많으나 기대한 만큼의 효율이 얻어지지 않는 경우(10)가 흔히 나타난다.

생물용출 기술은 생태계에서 일어나고 있는 다양한 물질의 생지화학적 순환의 일종인 금속의 자연적 순환과정에 기초한 기술이다. 이 기술은 환경에 존재하는 독성물질을 안정화 시키거나, 에너지/유용금속류에 대한 요구를 충족시키고, 산업폐기물에 포함되어 있는 다양한 금속들을 회수하여 고부가가치 자원을 재활용하는 중요한 산업과정으로 응용될 수 있다. 본 논문에서 제시된 신규 분리 종속영양 미생물과 이들의 생장에 필요한 저렴한 에너지 공급원의 조합을 이용한 망간단괴에서 망간(II)의 효과적인 용출 조건 규명은 기존의 물리화학적 금속 회수기술에 비해 적은 비용과 에너지가 요구되는 환경친화적 생물용출 기술의 진보에 도움을 줄 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 2004년도 한림대학교 교비 학술연구비(HRF-2004-33)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Acharya, C., R.N. Kar, and L.B. Sukla. 2003. Studies on reaction mechanism of bioleaching of manganese ore. *Miner. Engineer.* 16, 1027-1030.
2. Bosecker, K. 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 591-604.
3. Brandl, H. 2001. Microbial leaching from metals, pp. 191-224. *In* H.J. Rehm (ed.), Biotechnology, 2nd ed. Wiley-VCH, Germany.
4. Brewer, P.G. 1971. Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnol. Oceanogr.* 16, 107-110.
5. Burgstaller, W., H. Strasser, H. Wobking, and F. Schinner. 1992. Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and stoichiometry. *Environ. Sci. Technol.* 26, 340-346.
6. Cheng, Z., G. Zhu, and Y. Zhao. 2009. Study in reduction-roast leaching manganese from low-grade manganese dioxide ores using cornstalk as reductant. *Hydrometallurgy* 96, 176-179.
7. Ehrlich, H.L. 2000. Ocean manganese nodules: biogenesis and bioleaching possibilities. *Miner. Metallur. Process* 17, 121-128.
8. Gadd, G.M. 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. Microb. Physiol.* 41, 47-92.
9. Jain, N. and D.K. Sharma. 2004. Biohydrometallurgy for nonsulfidic minerals-a review. *Geomicrobiol. J.* 21, 135-144.
10. Lee, E.Y., S.R. Noh, K.S. Cho, and H.W. Ryu. 2001. Leaching of Mn, Co, and Ni from manganese nodules using an anaerobic bioleaching method. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 354-359.
11. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
12. Myers, J.M. and C.R. Myers. 2001. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 260-269.
13. Nakazawa, H. and H. Sato. 1995. Bacterial leaching of cobalt-rich ferromanganese crusts. *Int. J. Miner. Process* 43, 255-265.
14. Pak, K.R., O.Y. Lim, H.K. Lee, and S.C. Choi. 2002. Aerobic reduction of manganese oxide by *Salmonella* sp. strain MR4. *Biotechnol. Lett.* 24, 1181-1184.

15. Roden, E.E. and D.R. Lovley. 1993. Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 734-742.
16. Vasan, S.S., J.M. Modak, and K.A. Natarajan. 2001. Some recent advances in the bioprocessing of bauxite. *Int. J. Miner. Process* 62, 173-186.
17. Veglio, F., F. Beolchini, A. Gasbarro, L. Toro, S. Ubaldini, and C. Abbruzzese. 1997. Batch and semi-continuous tests in the bioleaching of manganiferous minerals by heterotrophic mixed microorganisms. *Int. J. Miner. Process* 50, 255-273.
18. Welch, S.A., W.W. Barker, and W.W. Banfield. 1999. Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 1405-1419.
19. Xia, L., S. Dai, C. Yin, Y. Hu, J. Liu, and G. Qiu. 2009. Comparison of bioleaching behaviors of different compositional sphalerite using *Leptospirillum ferriphilum, Acidithiobacillus ferrooxidan*s and *Acidithiobacillus caldus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 845-851.
20. Xu, D.B., C.P. Madrid, M. Roehr, and C.P. Kubicek. 1989. The influence of type and concentration of the carbon source on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 553-559.

(Received September 26, 2009/Accepted December 2, 2009)

ABSTRACT : Bioleaching of Mn(II) from Manganese Nodules by *Bacillus* sp. MR2

Sung-Chan Choi[1]*, Ga-Hwa Lee[1], and Hong-Keum Lee[2] ([1]Department of Environmental Sciences and Biotechnology, Hallym University, Chuncheon 200-702, Republic of Korea, [2]Polar Biocenter, Korea Polar Research Institute, KORDI, Incheon 406-840, Republic of Korea)

Some microorganisms are capable of leaching Mn(II) from nonsulfidic manganese ores indirectly via non-enzymatic processes. Such reductive dissolution requires organic substrates, such as glucose, sucrose, or galactose, as a source of carbon and energy for microbial growth. This study investigated characteristics of Mn(II) leaching from manganese nodules by using heterotrophic *Bacillus* sp. strain MR2 provided with corn starch as a less-expensive substrate. Leaching of Mn(II) at 25.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1} was accompanied with cell growth, but part of the produced Mn(II) re-adsorbed onto residual MnO_2 particles after 24 h. Direct contact of cells to manganese nodule was not necessary as a separation between them with a dialysis tube produced similar amount [24.6 g Mn(II) kg^{-1} nodule day^{-1}]. These results indicated an involvement of extracellular diffusible compound(s) during Mn(II) leaching by strain MR2. In order to optimize a leaching process we tested factors that influence the reaction, and the most efficient conditions were 25~35°C, pH 5~7, inoculum density of 1.5~2.5% (v/v), pulp density of 2~3 g/L, and particle size <75 μm. Although Mn(II) leaching was enhanced as particle size decrease, we suggest <212 μm as a proper size range since more grinding means more energy consumption. The results would help for the improvement of bioleaching of manganese nodule as a less expensive, energy-efficient, and environment-friendly technology as compared to the existing physicochemical metal recovery technologies.