

低品位 銅鑛石의 細菌浸出에 關한 研究

—II. *Ferrobacillus ferrooxidans* 의 生理的 特性에 關하여—

李 康 淳 · 閔 鳳 熙 · 張 正 淳

(原子力研究所 生物學 研究室)

A Study on Bacterial Leaching of Low-grade Copper Mineral

II. The physiological characteristics of *Ferrobacillus ferrooxidans*

RHEE, Kang Soon, Bong Hee MIN and Chung Soon CHANG

(Biology Division, Atomic Energy Research Institute)

ABSTRACT

This experiment was carried out to investigate the physiological characteristics of isolated bacteria, *Ferrobacillus ferrooxidans* from copper mine water in Korea. The results obtained were as follows:

1. The optimum pH range for the growth of these bacteria was 2.0—3.0 and optimum temperature was 20°C—30°C.
2. The oxidation curves of ferrous iron to the ferric iron ran parallel with the growth curves.
3. The optimum nitrogen concentration was 400—800 ppm and the minimal flow rate of air for the maximal growth of the bacteria was 70 ml air/min./200ml medium.
4. The growth of these bacteria was inhibited by the absence of ferrous iron and by the addition of sulfur.
5. Ferrous iron at a concentration of 9000 ppm, appeared to be optimum for the most rapid growth of *Ferrobacillus ferrooxidans*.

緒 論

最近 外國에서는 低品位鑛石으로부터 有用金屬을 浸出하는 細菌에 關한 研究가 活潑하게 進行되고 있다.

Silverman 및 Erhlich (1964)는 鑛物과 같은 無機物質에 關與하는 細菌으로 數 10 種을 報告하고 있으나 Bergey's manual(Bread et al., 1957)에 依하면 鑛山과 같은 特殊環境에 棲息하는 細菌으로는 *Thiobacillus thiooxidans* (以下 *T. thiooxidans* 라 略함), *Thiobacillus*

concretivorus(以下 *T. concretivorus* 라 略함), *Thiobacillus ferrooxidans*(以下 *T. ferrooxidans* 라 略함), *Ferrobacillus ferrooxidans*(以下 *F. ferrooxidans* 라 略함) 및 *Ferrobacillus sulfooxidans*(以下 *F. sulfooxidans* 라 略함) 등 數種類에 不過하다는 報告도 있다.

Bryner(1954) 등은 Bingham Canyon 銅鑛床의 坑內水로부터 分離한 *T. ferrooxidans* 를 利用하여 黃鐵鑛 및 硫化銅鑛의 浸出 實驗을 實施하였으며 Zimmerley(1958) 등은 Chino 鑛山坑內水에서 分離한 細菌을 利用하

여 低品位 鑛石으로부터 銅, molybdenum 및 亞鉛을 抽出하는 bacterial leaching process를 系統的으로 研究하였고 실제로 外國에서는 이들 細菌에 依한 硫化鑛物의 酸化로서 生成되는 黃酸第2鐵 및 黃酸 등을 浸出劑로 作用시켜 低品位 鑛石으로부터 有用金屬을 浸出시켜 回收하는 細菌浸出法을 產業的으로 많이 利用하고 있는 反面 基礎的인 研究도 積極的으로 이루어지고 있다. 即 Cook(1964) 및 Barghoorn(1953) 등이 이들 細菌의 培養條件 및 培養液에 關하여 報告하였고 Beck(1960) 및 渡邊(1964) 등은 이 細菌의 性狀 및 生理的 特性에 關하여 報告한 바 있다.

우리나라에 있어서 이와 같은 細菌浸出法에 關한 研究는 거의 없으며 李(1968) 등이 처음으로 浸出에 關與하는 細菌 *F. ferrooxidans*를 分離하여 報告한 바 있을 뿐이다.

著者들은 우리나라 銅鑛山 坑內水로부터 分離 同定한 *F. ferrooxidans*에 關한 生理的인 여러 特性을 實驗하였던 바 若干의 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

(1) 菌株: 慶北 達城郡 所在 達城鑛山坑內水로부터 分離 同定한 鐵酸化細菌 *F. ferrooxidans*를 9K 培養液에 繼代培養하여 4°C 冷蔵庫에 保管한 菌株을 實驗 5日前에 그 一部를 取하여 9K 培養液에 接種하여 5日間 培養한 細菌溶液을 最終 接種 溶液(Table 1)으로 使用하였다.

Table 1. Analysis of Inoculum

pH	Component (mg/ml)				Cell No. ($\times 10^7$ cell/ml)
	Cu ⁺	Fe ⁺	Fe ³⁺	Fe total	
2.20	0	0	8.9	8.9	7.1

(2) 培養液: 細菌培養液으로는 9K 培養液(Silverman *et al.*, 1959) 및 Leathen 培養液(Leathen *et al.*, 1951) (Table 2)을 使用하였다.

培養液의 調製에 있어서는 salt media를 高壓蒸氣滅菌한 후 A 溶液에 細菌濾過器로

Table 2. Composition of culture media(gm)

Media	Solution	(NH ₄) ₂ SO ₄	FeSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	K ₂ HPO ₄	Ca(NO ₃) ₂	MgSO ₄ ·7H ₂ O	D.W.
9K	A	3.00	—	0.10	0.50	0.01	0.5	700
	B	—	44.3	—	—	—	—	300
Leathen	A	0.15	—	0.05	0.05	0.01	0.5	1000
	B	—	1.0	—	—	—	—	1

滅菌한 B 溶液을 無菌的으로 加하여 使用하였으며 conc. H₂SO₄ 溶液으로 培養液의 pH를 2.5~3.0으로 調整하여 使用하였다.

(3) 培養方法: 調製 滅菌한 9K 및 Leathen 培養液 200 ml을 250 ml容 滅菌 flask에 넣고 細菌接種溶液 2 ml 接種한 것을 接種群으로 하고 同一한 細菌溶液을 滅菌하여 接種한 것을 對照群으로 하여 28°C 恒溫培養室에서 通氣連續培養(100 ml air/min/200 ml media)하였다.

(4) 測定方法: pH의 測定은 Beckman pH meter, model G type를 使用하여 測定하였고 Fe³⁺의 測定은 Beck(1960)의 比色法에 依하여 Beckman spectrophotometer model B type으로 測定하였으며 菌體數는 Thoma의 計算盤을 使用하여 450 倍 顯微鏡下에서 計測하였다.

結果 및 考察

1. *F. ferrooxidans*에 의한 黃酸 第1鐵의 酸化.

分離 同定한 *F. ferrooxidans*의 黃酸第1鐵酸化能을 觀察코자 9K 및 Leathen 培養液에 接種하여 通氣連續培養하면서 培養 日數에 따른 各 培養液의 黃酸第1鐵 酸化率을 測定한 結果는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

Leathen 培養液 接種群에 있어서는 培養 3日째에, 9K 培養液 接種群에 있어서는 培養 4日째에 黃酸第1鐵酸化率은 各各 100%로서 對照群에 比하여 顯著하게 높은 酸化率을 나타내었다.

Leathen, Kinsel 및 Braley(1956) 등이實驗한 바에 의하면 200 ppm의 Fe^{2+} 를 함유하

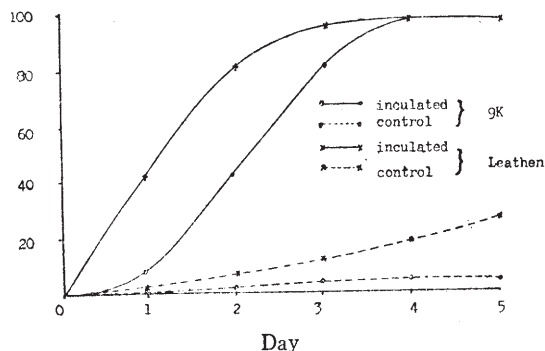


Fig. 1. The percentage of Fe^{2+} oxidation in 9K and Leathen medium during the growth of *F. ferrooxidans*.

는 Leathen 培養液을 細菌 없이 大氣中 酸化로서 完全히 Fe^{2+} 로 酸化시키는데 2년이 消要되지만 細菌의 存在下에서는 3日밖에 消要되지 않았다고 한다.

이와 같이 著者들이 實驗한 細菌接種群이 對照群에 比하여 현저하게 黃酸第1鐵의 酸化率이 높은 것은 鐵을 酸化하는 細菌 즉 *F. ferrooxidans*의 存在에 依한 bacterial oxidation에 依한 것으로 解釋되며 또 9K 培養液보다 Leathen 培養液에서 酸化率이 빠른 것은 培養液組成(Table 2)에 있어서 後者が 前者에 比하여 Fe^{2+} 源으로서의 黃酸第1鐵을 少量 含有하기 때문이라 생각된다.

渡邊(1967)등이 分離 同定한 *F. ferrooxidans*의 黃酸第1鐵 酸化 實驗에서 얻은 成績에 依하면 前者는 2日째, 後者は 3日째에 各各 100%의 酸化率을 報告하고 있어 著者들의 成績과는 若干 差異가 있으나 渡邊등은 培養液 100 ml에 細菌接種量 2 ml를 使用했음에 比하여 著者들은 培養液 200 ml에 細菌接種量 2 ml씩을 使用한데 起因하는 것으로 생각된다.

그리고 9K 培養液 製造 直後에는 透明 靑淡色이었던 것이 細菌을 接種한 培養 2日째에는 黃褐色으로 混濁되었고 培養 4日째에는 flask 器底에 赤褐色 沈澱物이 生成되었다.

이 沈澱物은 細菌에 의한 黃酸第1鐵의 酸

化로서 生成된 黃酸第2鐵이 加水分解를 일으켜 水酸化第2鐵이 形成되어 沈澱(Silverman 및 Lundgren, 1959)한 結果라고 생각된다.

培養日數에 따른 9K 및 Leathen 培養液의 pH變化는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 9K 및 Leathen 培養液 接種群의 pH는 培養 1日째에 若干 上昇하는 傾向으로 前者는 後者に 比하여 현저하였다. 그 後 9K 培養液 接種群의 pH는 下降하기 始作하여 培養 5日째에는 pH 2.3까지 低下하였으나 Leathen 培

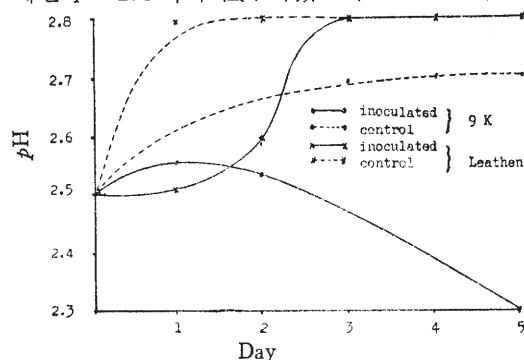


Fig. 2. Changes in pH of the 9K and Leathen medium during the growth of *F. ferrooxidans*.

養液 接種群은 繼續 上昇하여 培養 5日째에는 pH 2.8로 上昇하였다.

한편 9K 및 Leathen 培養液 對照群에 있어서의 pH變化는 培養時日이 經過함에 따라 繼續 上昇하였으며 後者は 前者에 比하여 急激한 上昇率을 나타냈다.

Silverman 및 Lundgren(1959) 등은 9K 培養液 接種群에 있어서의 pH의 低下는 細菌增殖에 따라 生成된 黃酸第2鐵이 加水分解되어 黃酸을 生成하기 때문이며 그 밖의 다른 培養液에 있어서의 pH上昇은 黃酸第1鐵의 酸化로서 黃酸을 소모하기 때문이라 報告한 바 있으며 本實驗의 結果 pH의 上昇 및 下降도 이같은 黃酸의 生成 및 消耗의 結果로 생각된다.

한편 9K 및 Leathen 培養液에 있어서의 培養期間동안의 菌體數의 變化는 Fig. 3에서와 같이 兩培養液에서 培養 4日째 前後하여

菌體數는 最高에 이르러 9K 培養液에 있어서는 7.2×10^7 cell/ml, Leathen 培養液에 있어서는 0.5×10^7 cell/ml로 前者는 後者에

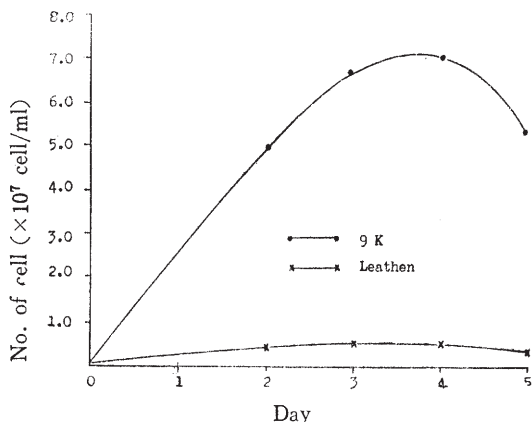


Fig. 3. Growth of *F. ferrooxidans* in 9K and Leathen medium.

비하여 細菌의 增殖數가 월등히 높았으며 그後 培養日數가 經過함에 따라 菌體數는 漸次 減少하였다.

Leathen 및 Braley(1954) 등에 의하면 이 細菌은 에너지 source로서 Fe^{2+} 를 酸化하여 生長하며 Fe^{2+} 가 Fe^{3+} 로 完全酸化되었을 때에는 細菌의 增殖은 中止된다고 하였다.

培養液의 組成으로 보아 9,000 ppm의 Fe^{2+} 를 含有하는 9K 培養液에서 보다 旺盛한 細菌의 增殖을 나타낸 것으로 보아 이 細菌은 黃酸第1鐵의 存在下에서는 Fe^{2+} 를 Fe^{3+} 로 迅速히 酸化하여 旺盛한 增殖을 나타내지만, 200 ppm의 Fe^{2+} 를 含有하는 Leathen 培養液에서는 Fe^{2+} 의 缺乏으로 9K 培養液보다 增殖이 抑制되었음을 알 수 있었다.

2. *F. ferrooxidans* 增殖에 미치는 pH의 影響

培養液의 pH가 細菌增殖에 미치는 影響을 究明할 目的으로 conc. H_2SO_4 및 10 N K_2HPO_4 溶液을 利用하여 9K 培養液의 pH를 各各 1.2, 1.8, 2.5, 3.0, 3.5, 4.2, 4.6 및 4.8로 調節 製造하여 各各의 培養液에 *F. ferrooxidans* 菌株을 接種하여 培養 4日째 各 培養液의 黃酸第1鐵의 酸化率 및 菌體數의 變化를 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 培養液의 pH가 2.0~3.0範圍內에서 細菌의 增殖은 旺盛하였고 培養液中の 黃酸第1鐵이 完全히 黃

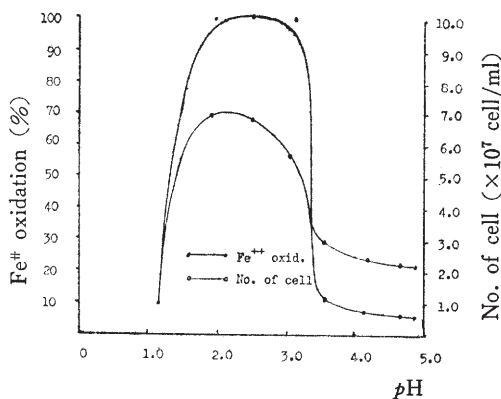


Fig. 4. The effect of pH on the growth of *F. ferrooxidans*.

酸第2鐵로 酸化되었지만 그 前後의 pH範圍에서는 菌體數 및 黃酸第1鐵의 酸化率이 顯著히 減退되는 成績이었다.

특히 pH 1.0 程度의 強酸性인 培養液에 있어서는 細菌의 增殖을 認識할 수 있었으며 이들 細菌의 增殖曲線은 Fe^{2+} 의 酸化曲線과 거의 一致함을 알 수 있었다.

Leathen(1956) 등은 이 細菌의 最適 pH值를 3.5라 하였으며 奧積(1965) 등은 pH 1.0附近에서 잘 增殖한다고 報告한 바 있으나 著者들이 우리나라에서 分離한 細菌으로 實驗한 結果에 의하면 pH 2.0~3.0範圍에서 細菌의 增殖이 顯著的 것으로 보아 渡邊(1967) 등의 報告와 一致하였으며 本 實驗 結果 이 細菌은 酸에 對하여 相當한 耐性을 가지며 普通의 細菌들은 棲息할 수 없는 強酸性 培養液에서 잘 發育 增殖함을 알 수 있었다.

3. *F. ferrooxidans* 增殖에 미치는 溫度의 影響

培養溫度에 따른 細菌의 增殖 및 黃酸第1鐵의 酸化率을 觀察코자 細菌을 接種한 9K 培養液을 6°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 및 50°C의 恒溫 培養器에서 培養하였다. 培養 4日째의 各各의 成績

은 Fig. 5 와 같이 培養溫度가 20°C~30°C 일 때 黃酸第1鐵의 酸化率은 100% 였으며 그 前後의 溫度에 있어서는 酸化率이 顯著히 緩

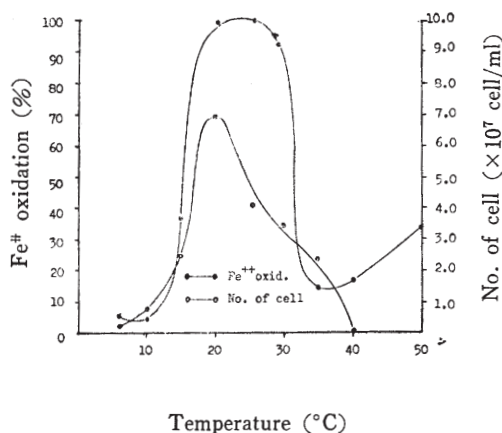


Fig. 5. The effect of temperature on the growth of *F. ferrooxidans*.

慢하였고 15°C에 있어서는 培養 10日째에 100% 酸化率을 나타내었다.

菌體數에 있어서는 黃酸第1鐵의 酸化가 促進되는 20°C~25°C에서 旺盛하였고 40°C以上에서는 細菌의 增殖을 認識할 수 없었다.

특히 培養溫度 35°C以上에 있어서 菌體數의 低下와는 相反하여 黃酸第1鐵의 酸化率이 多少 增加하는 傾向이었으나 이와 같은 成績은 細菌에 依한 酸化라기 보다는 溫度 上昇에 따라 化學反應이 促進되어 黃酸第1鐵이 酸化하는데 起因하는 成績이라 생각된다.

Marchlewitz(1961) 등이 培養溫度를 달리 하여 32種의 *T. ferrooxidans*의 發育을 實驗한 結果 其中 12種은 25°C에서, 13種은 31°C에서, 4種은 35°C에서 잘 發育하나 50°C에서는 全然 發育하지 않았다고 報告한 바 있다.

Leathen(1956) 등은 20°C~25°C가 細菌의 最適溫度라 하였고 Palmer(1961)에 依하면 低溫培養에서는 細菌이 死滅하지는 않는

다 하더라도 活動力은 極히 低下된다고 報告하였다.

또한 Silverman(1959) 등은 37°C 培養에서 細菌의 增殖은 없었다고 報告한 바 있으나 渡邊(1967) 등은 같은 培養溫度에서 細菌의 增殖을 認識할 수 있었다는 여러 報告 등으로 보아 같은 種類의 無機營養細菌에 있어서는 菌株를 달리함으로서 培養溫度의 差異가 있는 것으로 解釋되며 著者들이 分離 同定한 *F. ferrooxidans*가 20°C~25°C에서 잘 發育하는 點등으로 보아 Leathen(1956)이 報告한 成績과 一致되었다.

4. *F. ferrooxidans*의 增殖에 미치는 通氣量의 影響

通氣量에 따른 細菌의 增殖을 實驗코자 micro control valve로 通氣量을 調節하여 培養液 200 ml當 通氣量 5 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 70 ml, 150 ml 및 250 ml/min.를 각 9 K 培養液에 注入하면서 通氣培養하여 培養 4日째 各 培養液의 黃酸第1鐵 酸化率 및 菌體數의 變化를 實驗한 成績은 Fig. 6과 같이 通氣量 70 ml/min.까지는 大體로 供給한 通氣量에 比例하여 細菌의 增殖 및 黃酸第1鐵의 酸化는 顯著히 增加하였으나 그 以上の 通氣量에 있어서는 兩者 다 같이 큰 增加없이 直線的인 成績이었다.

Ljalikova(1958)가 報告한 *F. ferrooxidans*의

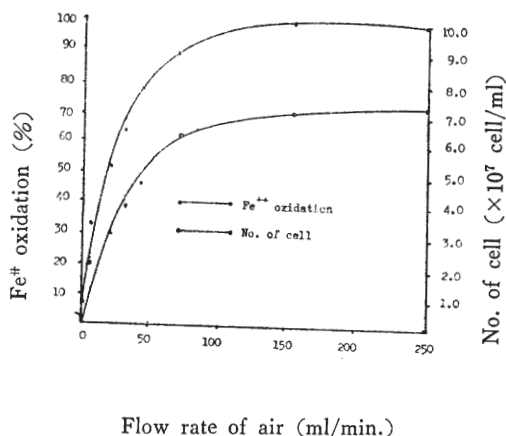


Fig. 6. The effect of flow rate of air on the growth of *F. ferrooxidans*.

CO₂ 吸着實驗에 依하면 3 日間 培養에서는 24~34%, 14 日間 培養에서는 13%~15%의 CO₂ 吸着率로서 培養初期에는 末期보다 CO₂ 를 많이 消耗한다고 하였고 Silverman 및 Lundgren(1959) 등은 靜置培養과 攪拌培養을 比較實驗하여 CO₂ 의 供給이 充分한 攪拌培養에서 더욱 旺盛한 細菌의 增殖을 얻었다고 報告하고 있는 點들로 미루어 *F. ferrooxidans* 는 空氣中の CO₂ 를 攝取하여 炭素源으로 利用하는 것으로 생각된다.

著者들이 使用한 通氣培養法은 Lundgren 이 實驗한 攪拌培養法과 같은 原理로 細菌 增殖에 必要한 CO₂ 를 供給하였으며 그 適當한 供給量은 培養液 200 ml 當 70 ml air/min. 라 생각된다.

5. *F. ferrooxidans* 의 增殖에 미치는 培地の 窒素濃度の 影響

培養液의 窒素濃도에 따른 細菌의 增殖을 實驗코자 黃酸암모니움의 量을 增減하여 0~1400 ppm N(窒素以外的 性分 및 濃도는 9K 培養液과 같음)을 製造하여 培養日數에 따른 各 培養液에 있어서의 菌體數를 測定하였던 바 Fig. 7에서 보는 바와 같이 窒素濃도

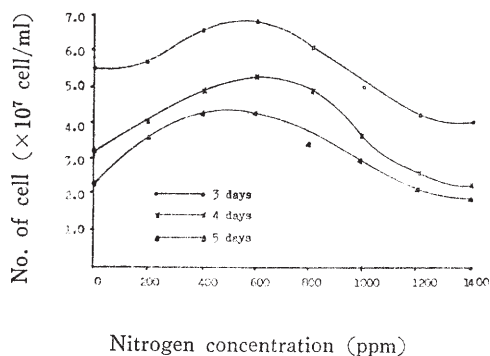


Fig. 7. The effect of nitrogen concentration in medium on the growth of *F. ferrooxidans*.

400~800 ppm N의 培養液에서 細菌의 增殖이 旺盛하였고 窒素源을 含有하고 있지 않은 對照群이나 800 ppm N 以上の 培養液에서의 細菌의 增殖은 크게 抑制되었다.

Leathen *et al.*(1956)에 依하면 이 細菌은 窒素源으로 NH₄⁺를 必要로 하며 NO₃⁻ 나

NO₂⁻ 등은 크게 利用하지 않는다고 하며 必須的으로 要하는 窒素濃도는 41 ppm N 이라고 報告한 바 있다.

그러나 本 實驗에 있어서는 窒素源을 添加하지 않은 對照群에서도 細菌의 增殖이 있는 것으로 보아 이 細菌은 窒素를 必須的으로 要하지는 않는 것으로 나타났으며 이는 渡邊 壓美(1961) 등의 實驗結果와 一致하였다.

한편 各 培養液에 있어서의 黃酸第1鐵의 酸化率은 窒素濃도에 따라 크게 影響을 나타내지 않았으나 1000 ppm N 以上の 培養液에 있어서 黃酸第1鐵의 酸化가 若干 抑制되었다.

6. *F. ferrooxidans* 의 增殖에 미치는 培地の 硫黃濃度の 影響

粉末硫黃 變量에 따른 細菌의 增殖, 黃酸第1鐵 酸化 및 pH의 變化를 測定한 結果는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 硫黃을 添加하지 않은 接種群에서는 培養 4日째에 黃酸第1鐵이 100% 酸化되었으나 硫黃添加接種群은 硫黃添加量이 많을수록 黃酸第1鐵의 酸化率 및 菌體數가 減少하였으며 또한 pH도 上昇하는 것으로 보아 硫黃의 添加로서 細菌의 增殖은 抑制됨을 알 수 있었다.

F. ferrooxidans 는 Fe²⁺를 Fe³⁺로 酸化하여 이때 생기는 energy를 生活 energy로 하여 生長 增殖하며 다른 黃化物은 利用할 수 없는 것으로 報告되고 있지만(Breed *et al.*, 1957) Unz 및 Lundgren(1961) 등은 元素硫黃을 含有하는 9K 培養液에 鐵酸化細菌을 接種한 結果 細菌의 增殖은 抑制되었으나 培養時日이 經過됨에 따라 黃酸鹽을 生成하고 따라서 培地の pH가 低下하였다는 사실로서 이 細菌의 硫黃酸化能을 報告한 바 있다.

또한 渡邊(1960) 등의 硫黃酸化能實驗에서도 硫黃의 添加로서 培養初에는 細菌의 增殖이 抑制되었으나 培養時日이 經過함에 따라 細菌이 元素硫黃을 酸化하는 能力을 갖게 된다고 報告하였다.

그러나 本實驗에 있어서는 硫黃添加群의 黃酸第1鐵 酸化 및 菌體數가 對照群에 比하

여 顯著히 低下하였으며 培養液의 pH가 上昇한 것으로 보아 4日間 培養으로서는 硫黃의 添加가 細菌의 增殖을 抑制한다는 사실을 알 수 있을 뿐 細菌의 硫黃酸化能을 斷定할 수 없었다.

Table 3. The effect of sulfur concentration in medium on the growth *F. ferrooxidans*.

Incubation period (days)	0			3		4			
	pH	Fe ⁺		Fe ⁺		pH	Fe ⁺		No. of cell ($\times 10^7$ cell/ml)
		mg/ml	%	mg/ml	%		mg/ml	%	
1.0(inoculated)	2.50	0.364	4.16	2.508	28.57	2.85	6.271	71.67	2.1
0.1(inoculated)	2.50	0.364	4.16	4.141	47.33	2.92	6.446	73.67	2.6
0(inoculated)	2.50	0.364	4.16	6.325	72.29	2.40	8.750	100.00	6.5
1.0(control)	2.50	0.364	4.16	0.568	6.49	3.00	0.788	9.01	—
0.1(control)	2.50	0.364	4.16	0.560	6.40	3.00	0.796	9.09	—

摘 要

우리나라 銅鑛山 坑內水로부터 分離, 同定한 *F. ferrooxidans*의 黃酸第 1 鐵酸化和 細菌增殖에 미치는 培地의 pH, 溫度, 通氣量, 窒素濃度 및 硫黃濃度등의 影響을 實驗하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

(1) *F. ferrooxidans*는 pH 2.0~3.0 範圍에서 增殖이 가장 旺盛하였고 黃酸第 1 鐵의 酸化도 顯著하였다.

(2) *F. ferrooxidans*의 最適 增殖 溫度는 20°C~30°C 로서 이 溫度 前後에 있어서는 增殖이 크게 抑制되었다.

(3) *F. ferrooxidans*의 最適 增殖 窒素濃度는 400~800 ppm 이었다.

(4) 通氣量 70 ml air/min./200 ml 培養液 以上에서는 細菌의 增殖이 旺盛하였으며 그 以下에서는 細菌의 增殖이 抑制되었다.

(5) *F. ferrooxidans*는 200 ppm 의 Fe⁺를 含有하는 Leathen 培養液보다 9000 ppm 의 Fe⁺를 含有하는 9 K 培養液에서 더욱 旺盛하게 增殖하였다.

(6) 硫黃添加로서 *F. ferrooxidans*의 增殖 및 黃酸第 1 鐵 酸化는 抑制되었다.

引 用 文 獻

1. Beck, J.V., 1960. A ferrous-ion-oxidizing bacterium. I. Isolation and some general physiological characteristics. *Jour. of Bacteriol.*, **79**, 502-509.
2. Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N. R., 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., p. 83-88.
3. Bryner, L.C., Beck, J.V., Davis, D.B., and Wilson, D.G., 1954. Microorganisms in leaching sulfides minerals. *Ind. Eng. Chem.*, **46**, 12, 2587-2591.
4. Cook, T.M., 1964. Growth of *Thiobacillus thiooxidans* in shaken culture. *Amer. Soc. for*

Microbiol., **88**, 3. 620-623.

5. Kingsbury, J.M., and Barghoorn, E.S., 1953. Silica gel as a microbiological medium potentialities and a new method of preparation. *Appl. Microbiol.*, **2**, 5-8.
6. Leathen, W.W., Kinsel, N.A., and Braley, S.A., 1954. A solid medium for the study of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Bacteriol. Proc.*, **46**.
7. Leathen, W.W., Kinsel, N.A., and Braley, S.A., 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. *Jour. of Bacteriol.*, **72**, 700-704.
8. Leathen, W.W., McIntyre, L.D., and Braley, S.A., 1951. A medium for the study of the bacterial oxidation of ferrous iron. *Science*, **114**,

- 280-281.
9. Ljalikova, M.N., 1958. A study of the process of chemosynthesis by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiologiya* 27, 556-559.
10. Marchlewitz, B. and Schwartz, W.Z., 1961. *Thiobacillus ferrooxidans*. *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 1, 100.
11. 渡邊堅美, 内田武司, 古谷進, 1967. 金属鑛山坑内水中の鉄, 硫黄酸化バクテリアの同定および鉄酸化バクテリアの特性について, 醸酵協會誌, 25, 4, 155-165.
12. Rhee, K.S., J.H. Oh and B.H. Min, 1971. Studies on the bacterial leaching of low-grade copper minerals. I. Isolation and identification of special bacteria from mine water. *Kor. J. Microbiol.*, 9, 3, 121-129.
13. Silverman, M.P., and Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemosynthetic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedures for securing high cell yields. *Jour. of Bacteriol.*, 77, 642-647.
14. Silverman, M.P., and Ehrlich, H.L., 1964. Microbial formation and degradation of metals. *Adv. in Appl. Microbiol.*, 6, 153-206.
15. Unz, R.R., and Lundgren, D.G., 1961. A comparative nutritional study of these chemoautotrophic bacteria, *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Soil Sci.*, 92, 5, 302-313.
16. 奥積昌世, 今井和民, 1965. 硫黄細菌の生化学的研究 (第5報) *T. thiooxidans*の生理學的検討, 醸工, 43, 1, 10-17.
17. Zimmerley, S.R., Wilson, D.G., and Prater, J.D., 1958. Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria. 2, 829,964 Patented Apr., 8.