

## 공장냉각수에서 Biocide (NaOCl)가 생물막 형성 및 금속 부식에 미치는 영향

강용호\* · 박대규<sup>1</sup>

\*영남대학교 생물산업공학부, <sup>1</sup>포항산업과학기술연구원

**Effect of Biocide (NaOCl) in Industrial Cooling Water on Biofilm Formation and Metal Corrosion. Khang, Yong-Ho\* and Dae-Kyu Park<sup>1</sup>.** School of Biotechnology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea and <sup>1</sup>Pohang Research Institute of Science and Technology, Pohang, Korea – Cooling water sampled at Pohang Steel Company, Korea, was used to study the effect of biocide (NaOCl) on biofilm formation and metal corrosion. Planktonic microorganisms were killed in the presence of biocide (0.2% NaOCl) within 1.5 h, but not sessile microorganisms in biofilms even after one week. Black color of biofilms, possibly due to the activity of sulfate reducing bacteria, were made with the natural cooling waters, while orange color of biofilms were formed when cooling waters were autoclaved or when 0.2% NaOCl was added to the natural cooling waters. Microbially influenced corrosion rate in black color of biofilms was 2.3 fold higher than that in orange color of biofilms.

**Key words:** Biocide, Biorrosion, Biofilm, Biofouling, Cooling water

공장 냉각수는 열 교환이 공기와 접촉하면서 이루어지기 때문에 항상 산소 공급이 가능하고, 대기에 있는 미생물이 쉽게 유입되며, 또한 일정한 범위의 pH와 온도를 유지하고 있어서 미생물의 생육에 매우 양호한 조건을 갖추고 있다 [1]. 냉각수에 존재하는 부유성 박테리아(planktonic bacteria) 중 일부는 배관이나 열 교환기의 금속표면에 흡착하여 고착성 박테리아(sessile bacteria)로 생육한다. 고착성 박테리아는 세포밖으로 exopolysaccharide를 분비하여 glycocalyx라고 하는 생물막을 형성한다. Glycocalyx의 99%는 물 성분이나 fibrous polysaccharides나 globular glycoproteins으로 구성되어 막상 구조를 하고 있다[5]. 이런 막상 구조는 음이온을 띤 고분자 물질이어서 이온화 되어있는 유기물이나 무기물이 쉽게 흡착되어서 더욱 튼튼한 생물막을 형성한다. 일단 생물막이 형성되면 고착성 미생물들은 주변의 영양원을 포집하기가 쉬울 뿐 아니라, 먹이연쇄에 노출되지도 않으며, 다른 공생균과의 세포 대사산물을 용이하게 이용할 수 있는 장점이 있다[6,11]. 또한 생물막은 미생물에 유해한 독성물질들을 광범위하게 중화시킬 수 있는 물질들이 포함되어 있어서 살균제(biocide)와 같은 화학약품에 대해서 미생물들을 보호해주는 역할도 한다[4,8].

생물막 내부에는 산소가 부족하여 혐기성 미생물들이 생육하게 되는데 sulphate-reducing bacteria(SRB) 같은 혐기성 균은 금속부식에 영향을 미친다[3,10]. *Desulfovibrio* 균주와 같은 황환원균은 황화합물을 환원하여 S<sup>2-</sup>을 만들

고 이는 다시 Fe<sup>2+</sup>와 결합하여 흑색의 침전물인 FeS를 생성한다. 금속표면에 침전한 FeS는 음극 역할을 하고, 금속 표면은 양극 역할을 하기 때문에 전류의 흐름은 Fe<sup>0</sup> → Fe<sup>2+</sup>로 계속적으로 진행이 되어서 금속부식이 촉진된다[6, 9]. SRB는 수용액상에 산소가 전혀 없는 완전한 혐기적인 조건보다 호기적과 혐기적인 조건이 반복될 때 금속부식 속도가 100배 정도 더 증가한다. 그 이유는 산소농도가 증가하면 금속부식의 부산물인 황이나 pyrite의 성분도 함께 증가하기 때문이다[2,6].

냉각수 시스템에 존재하는 생물막은 금속부식 뿐만 아니라 배관에서의 파울링 형성의 원인이 된다. 특히 Ca<sup>++</sup>은 생물막의 polysaccharides의 carboxylate functional groups이나 phosphate anions 등과 쉽게 반응해서 carbonate와 같은 결정체를 형성한다. 이런 결정체의 형성은 열교환이나 유속을 떨어뜨려서 생물막 형성이나 파울링의 진행을 도와 주는 결과를 낳는다. 공장 냉각수 시스템에서는 미생물에 의한 파울링 형성 및 금속부식을 억제하기 위하여 대부분 살균제(biocide)를 첨가한다. 그러나 이러한 살균제가 생물막 형성이나 금속부식 억제에 어떤 효과가 있는지에 관한 정량적인 자료는 잘 알려지지 않았다. 따라서 본고는 국내의 포항제철소에서 사용하는 공장냉각수와 현장에서 사용하는 살균제(NaOCl)가 미생물의 생물막 형성과 금속부식에 미치는 효과에 대한 연구 결과를 제시하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물 분리 및 동정

포항제철소에서 가열된 철관의 온도를 낮추는 데 사용하

\*Corresponding author  
Tel. 053-810-2398, Fax. 053-811-4319  
E-mail: ykhkhang@yu.ac.kr

는 직접 냉각수(1600ml)를 멸균한 병에 채취하였다. 이를 멸균 생리식염수(0.9% NaCl)에 희석한 후 nutrient agar (Scharlau Chemie, S.A, Barcelona) 배지에 도말하였다. 박테리아의 균주 동정은(경상대학교 공동실험실습관)에 의뢰하여 세포벽 지방산 분석으로 실시하였다. 황환원균(SRB)의 분리는 상업용 sulfate reducing medium(pH7.6, Scharlau Chemie, Spain)을 사용하였다. SRB의 균수는 microbiological test kit(Betzdearborn, USA)를 사용하여 측정하였다.

**생물막 형성**

생물막 형성장치는 2개의 carbon steel coupon(L×W×H=68×13×1 mm, Betzdearborn, USA)이 직렬로 들어가도록 플라스틱으로 제작하였다(L×W×H=260×80×30 mm, 베스트코리아, 대전). 공장냉각수는 peristaltic pump를 이용하여 생물막 형성장치를 통과하여 유속 0.1 ml/min 으로 순환되도록 설치하였으며, 냉각수 순환입구에는 microfilter를 설치하여 공기 중의 미생물 유입을 차단하였다. 냉각수에는 다른 영양원을 첨가하지 않고 자연 상태의 냉각수를 실온에서(25°C) 7일간 순환시키면서 carbon steel coupon에 생물막이 형성되도록 하였다. 생물막에 있는 미생물의 형태는 전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)을 사용하여 관찰하였다.

**Biocide 효과**

Biocide는 포항제철소 현장에서 사용하는 NaOCl 용액을 사용하였다. 직접냉각수에 NaOCl을 0.2%(w/v, 2 ppm)를 첨가하여 carbon steel coupon에 형성된 생물막 및 금속부식을 관찰하였다. 금속부식은 carbon steel coupon을 액체 세제가 첨가된 Ultrasonicater(Branson Ultrasonics Corporation, USA)로 2시간 동안 처리하여 생물막을 완전히 제거한 다음 carbon steel coupon의 생물막 생성 전후의 무게를 전자저울(Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하여 금속부식 속도를 결정하였다.

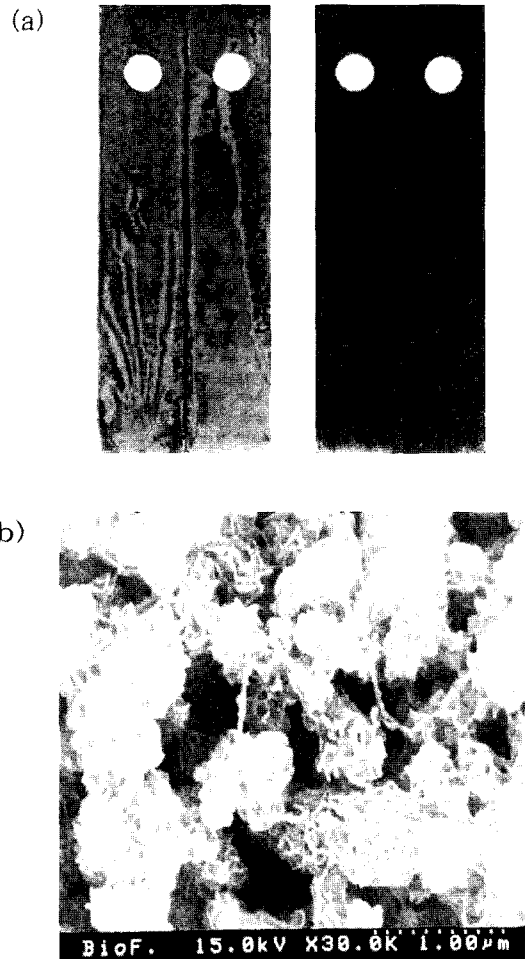
**결과 및 고찰**

**공장냉각수의 미생물**

포항제철 공장냉각수에 있는 부유성 박테리아의 수는 봄(4월)과 겨울(12월)철에는 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cfu/ml, 여름(7월)과 가을(9월)철에는 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> cfu/ml 정도로 나타났다. 황환원균은 봄(4월)과 겨울(12월)철에는 10 cfu/ml 이하이었으며, 여름(7월)과 가을(9월)철에는 100 cfu/ml 이하를 유지하였다. 생물막 형성은 포항제철소 현장에서 채취한 공장냉각수를 실험실의 생물막 장치에 연결하였다. 대조군으로는 같은 공장냉각수를 고압고온으로 멸균하여 사용하였다. 공장냉각수를 7일 동안 생물막 형성 장치에서 순환시킨 후에 carbon steel coupon에 형성된 생물막을 관찰하였다. 대조군으로 멸균한

공장냉각수를 사용한 곳에서는 오렌지색의 생물막이 형성되었으며, 멸균하지 않고 채취한 시료를 그대로 사용한 냉각수를 사용한 곳에서는 흑색의 생물막이 형성되었다(Fig. 1). 오렌지색이나 적갈색의 생물막은 주로 철이나 망간 성분이 많이 있는 호기성 조건에서 발생하며, 흑색의 생물막은 혐기성 조건에서 SRB 활성화에 의하여 생성된 FeS 때문에 발생한다. 흑색의 생물막을 형성하고 있는 고착성 미생물들을 전자현미경으로 관찰한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 다양한 미생물 군락이 형성되어 있었다.

생물막을 7일 동안 형성하는 동안 냉각수의 pH는 6.5에서 7.0으로 증가하였으며, SRB 균주 수는 생물막 형성전에는 10<sup>2</sup> cfu/ml 이었다가 이후에는 10<sup>7</sup> cfu/ml로 증가하였다. 흑색의 생물막에서 우점종인 SRB 균주를 분리한 결과, Fig. 2에서와 같이 curved shape이며, pH 7-8, 온도 30-40°C에서 최적의 성장을 보여서 *Desulfovibrio* sp.와 같은



**Fig. 1. Biofilms on the carbon steel coupon.**  
 (a) Left: Orange color biofilms were made when cooling waters were autoclaved. Right: Black color biofilms were made when cooling waters were not autoclaved.  
 (b) Electron micrograph of black color biofilms (30,000×)

특성을 보였다.

포항제철소 공장 냉각수는 계절에 관계없이 pH 범위가 6-8이고, 수온이 30-45°C 정도이어서 *Desulfovibrio* sp.와 같은 SRB 균주 생육에는 양호한 조건을 갖추고 있었다. SRB 외에 공장냉각수에서 분리한 일부의 부유성 및 고착성 미생물들의 동정 결과는 Table 1에 제시하였다.

**부유성 미생물에 대한 biocide 효과**

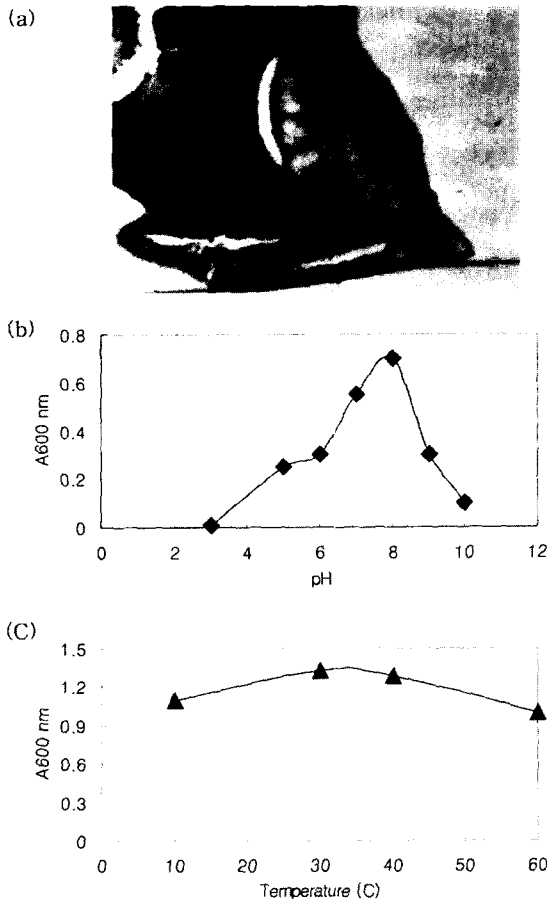
염소화합물의 살균제(NaOCl)는 미생물의 세포질 막을 산화시켜서 막 구성을 변경시키고, 세포질 막에 존재하는 효소의 sulfhydryl groups을 산화시켜서 세포 호흡을 저해하는 것으로 알려졌다. Biocide(NaOCl)가 부유성 미생물들에 대한 영향을 조사하기 위하여 흑색의 생물막을 제거하여 영양배지(nutrient broth)에 현탁한 다음, 30°C에서 2-4시간 동안 배양하여 부유성인 혼합균을 제조하였다. 일정한 균 밀도( $2 \times 10^4$  cfu/ml)로 준비된 배양액에 NaOCl을 농도별로 첨가하여 호기적 및 혐기적 조건에서 배양하였다. 배양시간

에 따른 혼합균의 생존수를 측정된 결과 Table 2에서와 같이 NaOCl을 0.1%(w/v)이상 첨가한 배지에서는 1.5시간 이내에 모든 균들이 사멸하였다.

따라서, NaOCl 농도에 따른 미생물들의 사멸속도를 측정하기 위해서는 NaOCl 농도를 100배로 낮추고, 배양시간도 30분 이내로 단축하는 것이 필요하였다. 초기균수를  $N_0$ , 생존수를  $N$ , 사멸속도 상수를  $k$ , 배양시간을  $t$ 라 하면,  $\ln(N/N_0) = -kt$  식을 사용하여 사멸속도 상수  $k$  값을 구하였다. NaOCl 농도에 따른 미생물들의 사멸속도는 Fig. 3에서와 같이 NaOCl 농도와  $\ln k$  값이 양의 직선상관 관계가 있음을 발견하였다.

**고착성 미생물에 대한 biocide 효과**

생물막을 형성하고 있는 고착성 미생물에 대한 biocide 효과를 측정하기 위해서 공장냉각수에 NaOCl을 0.2%(w/v, 2 ppm) 첨가한 것과, 첨가하지 않은 것을 구분하여 일주일 동안 생물막을 만들었다. NaOCl을 첨가한 carbon steel coupon에서는 오렌지색의 생물막이 형성되었으나, NaOCl을 첨가하지 않은 carbon steel coupon에서는 흑색의 생물막



**Fig. 2. Sulfate reducing bacterium isolated from biofilms.**  
 (a) Transmission electron micrograph.  
 (b) PH effect on cellular growth.  
 (c) Temperature effect on cellular growth.

**Table 1. Bacterial strains isolated in cooling waters and biofilms**

Bacteria in cooling waters	Bacteria in biofilms
<i>Actinomadura viridis</i>	
<i>Bacteriodes ureolyticus</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Bacillus cereus,</i>
<i>Clostridium malenominatum</i>	<i>Bacillus globisporus,</i>
<i>Compylobacter coli</i>	<i>Bacillus laterosporus,</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus megaterium,</i>
<i>Fusobacterium russii</i>	<i>Bacillus pumilus,</i>
<i>Gardenerella vaginalis</i>	<i>Cellulomonas turbata,</i>
<i>Lactobactillus vaginalis</i>	<i>Micrococcus luteus,</i>
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>Micrococcus lylae,</i>
<i>Methylobacterium organophilum</i>	<i>Pseudomonas mendocina,</i>
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Staphylococcus vitulus,</i>
<i>Ochrobacterium anthropi</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	
<i>Phodbacter capsulatus</i>	
<i>Phodbacter sphaeroides</i>	

**Table 2. Effect of biocide (NaOCl) on the planktonic microorganisms**

NaOCl (%)	Aerobic Condition (CFU/ml)		Anaerobic Condition (CFU/ml)	
	0 h	1.5 h	0 h	1.5 h
0.0	$2.0 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$
0.1	$2.8 \times 10^4$	0	$2.0 \times 10^4$	0
0.2	$2.0 \times 10^4$	0	$2.2 \times 10^4$	0
0.4	$2.1 \times 10^4$	0	$2.2 \times 10^4$	0

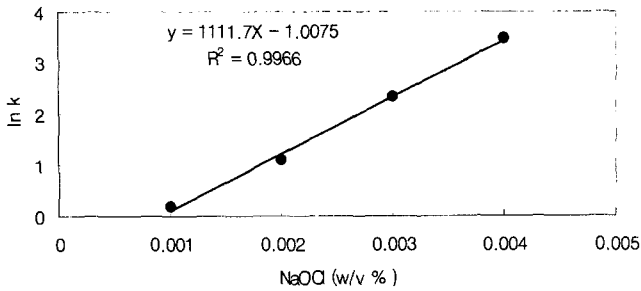


Fig. 3. Effect of biocide (NaOCl) on the cellular death rate constant of planktonic microorganisms.

이 형성되었다(data not shown). 흑색의 생물막은 SRB 활성화에 의한 FeS의 생성에 따른 결과임을 고려할 때, NaOCl을 첨가한 곳에서는 SRB균의 생육이 억제되었음을 알 수 있다. 이들 두 생물막의 균락 형태를 전자현미경으로 관찰하면 동일한 공장냉각수를 사용하였음에도 불구하고 Fig. 4와 같이 서로 다른 형태의 미생물 균락이 존재하였다. NaOCl을 사용하지 않은 생물막이, NaOCl을 사용한 생물막보다 더욱 다양한 종류의 미생물 균락이 관찰되었으며, exopolysaccharide로 보이는 고분자 필름(glycocalyx)도 더 두텁게 형성되었다. 따라서, 냉각수에 biocide를 첨가하면 고착성

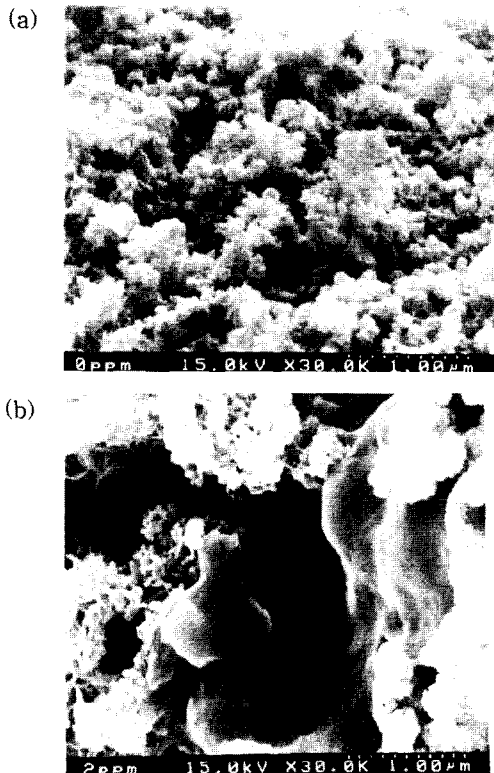


Fig. 4. Scanning electron micrographs of biofilms made on carbon steel coupons with cooling waters.

- (a) In the absence of NaOCl (30,000x)
- (b) In the presence of 0.2%(w/v) NaOCl (30,000x)

미생물들은 이에 저항하기 위하여 더욱 많은 exopolysaccharide를 생성하는 것으로 보인다.

문헌에 의하면 생물막에 있는 고착성 미생물은 부유성 미생물보다 biocide로 사용하는 hypochlorous acid에 대하여 150-3000배 더 저항성이 있다[4]. 이런 이유는 생물막을 덮고 있는 extracellular polysaccharides가 음이온을 띠는 고분자이어서 biocide를 이 막에 흡착하여 생물막을 침투하는 농도를 낮게 하거나, 생물막내에 있는 박테리아 세포의 소수성이 증가하여 biocide 효과가 떨어지기 때문으로 추정하고 있다 [4,6]. 본 연구의 결과에서도 생물막을 형성하고 있는 미생물을 현탁하여 부유성 미생물로 만들었을 때는 0.1% NaOCl 농도에서 1.5 시간내에 모두 사멸하였으나, 이들을 생물막 상태로 두었을 때는 0.2% NaOCl 농도에서 일주일 이상의 기간 동안에도 전혀 사멸되지 않았다.

Biocide가 금속부식에 미치는 효과

상기한 바와 같이 biocide(NaOCl)을 첨가한 경우에는 주황색의 생물막이 형성되었으나, biocide(NaOCl)을 첨가하지 않은 경우에는 흑색의 생물막이 형성되었다. 생물막을 형성하는 미생물군이 다를 때 미생물에 의해서 발생하는 금속부식 속도도 달라질 수 있다[7,9]. 이런 차이를 정량적으로 비교하기 위하여 각 조건에서의 생물막 생성 전후의 carbon steel coupon의 무게변화량을 측정하였다. Carbon steel coupon에 형성된 생물막은 초음파를 사용하여 생물막내의 미생물을 모두 제거하였다. 무게 변화량의 측정 결과는 Table 3에서와 같이 NaOCl를 사용하지 않은 생물막에서의 금속부식속도가 NaOCl를 사용한 생물막에서의 금속부식 속도보다 2.3배 더 빠르게 진행되었다.

부식된 금속표면을 전자현미경으로 관찰하였을 때 Fig. 5에서와 같이 NaOCl를 첨가하지 않았을 때는(0 ppm) 금속부식이 매우 심각하였으나, NaOCl를 첨가했을 때는(2 ppm) 일부분의 표면만 금속부식이 진행되고 있었다.

일반적으로 금속부식에 영향을 미치는 미생물은 *Desulfovibrio* 같은 황환원균 뿐만 아니라, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Microoccus*, *Pseudomonas*와 같은 철환원균이나, *Siderococcus*, *Lepthothrix*, *Sphaerotilus*, *Gallionella*, *Crenothrix*와 같은 철산화균이나, *Clostridia* sp, *Thiobacillus* sp., *Nitrobacter*와 같은 산생성균도 금속부식의 원인이 된다[9]. 생물막을 형성한 고착성 미생물은 NaOCl과 같은 oxidizing

Table 3. Effect of biocide (NaOCl) on the corrosion of carbon steel coupons

NaOCl (% w/v)	Corrosion rate per unit time and unit area of carbon steel coupons (mg/day)	Relative corrosion rate (%)
0.0	0.147	100
0.2	0.063	43

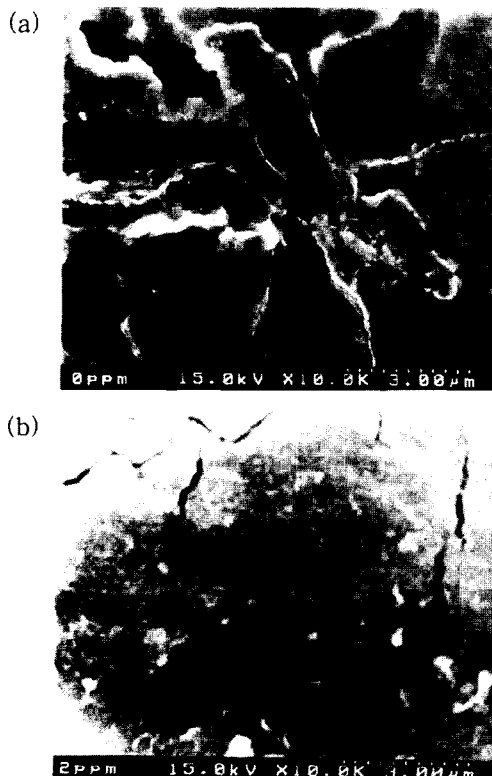


Fig. 5. Scanning electron micrographs of microbially influenced corrosion on the carbon steel coupons.

(a) In the absence of NaOCl (10,000 $\times$ )

(b) In the presence of 0.2%(w/v) NaOCl (10,000 $\times$ )

biocide를 polyquat 같은 non-oxidizing biocide나, 계면활성제, 생물막을 제거하는 효소, 생물막의 구조를 약하게 하는 EDTA나 EGTA 등을 혼합하여 사용하면 polysaccharides의 생물막 침투를 도와줄 수 있어서 biocide의 효과를 좀더 증진시킬 수 있는 것으로 보고되었다[4]. 본 연구의 결과도 biocide를 적절히 사용하면 이러한 미생물들의 생육을 억제하여 금속부식의 진행을 효과적으로 억제할 수 있음을 증명하고 있다.

## 요 약

포항제철소에서 사용하는 살균제와 공장냉각수를 사용하여 실험실에서 생물막 형성과 금속부식에 대한 연구를 수행하였다. 부유성 미생물은 biocide (NaOCl, 0.2% w/v)을 첨가하면 1.5 시간 내에 모두 사멸하였으나, 생물막에 있는 고착성 미생물은 일주일도 지나도 사멸이 되지 않았다. 생물막 형성은 공장냉각수를 고온고압으로 멸균하거나, biocide(NaOCl)를 첨가하였을 경우에는 주황색의 생물막이 형성되었으나, 공장냉각수를 그대로 사용하였을 경우에는 SRB

활성에 의한 흑색(FeS)의 생물막이 형성되었다. 흑색의 생물막이 형성된 곳에서의 금속부식 속도는 주황색의 생물막이 형성된 곳의 금속부식 속도보다 2.3배 더 빨리 진행되었다.

## 감사의 말

본 연구는 2000년도 포항 산업과학기술연구원의 연구비 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Almeida, M. and F. P. de Franca. 1998. Biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 38-44.
- Angell, P. and K. Urbanic. 2000. Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys. *Corr. Sci.* **42**: 897-912.
- Batista, J. F., R. F. Pereira, J. M. Lopes, M. F. Carvalho, M. J. Feio, and M. A. Reis. 2000. In situ corrosion control in industrial water systems. *Biodegradation.* **11**: 441-448.
- Bott, T. R. 1992. The use of biocides in industry. pp567-582. In L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, B. Capdeville (eds.), *Biofilms-Science and Technology*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Flemming, H. C. and J. Wingender. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Sci. Technol.* **43**: 9-16.
- Hamilton, W. A. 1995. Biofilms and microbially influenced corrosion, pp171-182. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (eds.), *Microbial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jayaraman, A., F. B. Mansfeld, and T. K. Wood. 1999. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 167-175.
- McFeters, G. A., F. P. Yu, B. H. Pye, and P. S. Stewart. 1995. Physiological methods to study biofilm disinfection. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 333-338.
- Potekhina, J. S., N. G. Sherisheva, L. P. Povetkina, A. P. Pospelov, T. A. Rakitina, F. Warnecke, and G. Gottschalk. 1999. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 639-646.
- Rao, T. S., T. N. Sairam, B. Viswanathan, and K. V. K. Nair. 2000. Carbon steel corrosion by iron oxidizing and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. *Corr. Sci.* **42**: 1417-1431.
- Tanji, Y., Y. Morono, A. Soejima, K. Hori, and H. Unno. 1999. Structural analysis of a biofilm which enhances carbon steel corrosion in nutritionally poor aquatic environments. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 551-556.

(Received Dec. 1, 2001/Accepted Feb. 19, 2002)