

港湾海水界面微型生物膜表征研究

马士德¹, 刘欣^{2*}, 康宁², 韩文³, 郇余³, 段继周¹

¹中国科学院海洋研究所, 山东 青岛

²青岛科技大学材料科学与工程学院, 山东 青岛

³青岛东启机械设备有限公司, 山东 青岛

收稿日期: 2023年6月22日; 录用日期: 2023年8月28日; 发布日期: 2023年9月12日

摘要

微型生物膜是污损生物群落形成的初期阶段, 会左右金属腐蚀和生物污损过程, 给人类海事活动和海中设施正常运转带来严重危害。研究微生物膜的形成是海洋防腐防污研究的热点之一。本文利用SEM、EDS、XRD和FTIR等测试分析方法对青岛港湾工业纯钛表面微型生物膜进行了初步的表征, 通过塔菲尔极化曲线对微生物膜电化学行为进行了分析。结果表明仅有硅藻的完整形貌和Na、Ca、Si及有机物质; 载玻片的微生物膜较钛板上的硅藻密度高, 微生物膜对钛的电化学性能影响不明显; 讨论了膜中微型生物的分析方法, 对微生物膜的研究及钛在海水中的应用有一定启示。

关键词

钛, 微生物膜, 海洋污损, 表征

Research on Characterization of Micro-Biofilm at the Interface of Harbor Water

Shide Ma¹, Xin Liu^{2*}, Ning Kang², Wen Han³, Yu Tai³, Jizhou Duan¹

¹Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao Shandong

²College of Materials Science and Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong

³Qingdao Dongqi Machinery Equipment Co., Ltd., Qingdao Shandong

Received: Jun. 22nd, 2023; accepted: Aug. 28th, 2023; published: Sep. 12th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 马士德, 刘欣, 康宁, 韩文, 郇余, 段继周. 港湾海水界面微型生物膜表征研究[J]. 海洋科学前沿, 2023, 10(3): 194-204. DOI: 10.12677/ams.2023.103021

Abstract

Micro-biofilm is the initial stage of the formation of fouling biological community, to control the metal corrosion and biological fouling process, and bring serious harm to human maritime activities and the normal operation of marine facilities. Exploring the formation of micro-biofilm is the key to the research of marine anticorrosion and antifouling. In this paper, the micro-biofilm on the surface of industrial pure titanium in Qingdao Harbor was preliminarily characterized by SEM, EDS, XRD and FTIR. The electrochemical behavior of micro-biofilm was analyzed by Tafel polarization curve. The results show that only the complete morphology of diatoms, Na, Ca, Si and organic matter are present. The density of micro-biofilm on the slide is higher than that on the titanium plate, and the effect of micro-biofilm on the electrochemical performance of titanium is not obvious. The analysis method of micro-organisms in the membrane was discussed, which provides some implications for the research of micro-biofilm and the application of titanium in seawater.

Keywords

Titanium, Micro-Biofilm, Marine Fouling, Characterization

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

海洋微型污损生物通常指海工设施/海水界面上繁衍的个体小于 20 μm 的附着生物(fouling), 包括单细胞的原核和真核微生物, 是人类利用海洋, 开发海洋而得名的底栖生物的特殊类群[1] [2] [3]。微型生物膜是污损生物群落形成的初期阶段, 它给人类海事活动和海中设施正常运转带来严重危害[4] [5] [6], 是当今海洋微生物学、海洋地球化学、海洋腐蚀学、海洋污损生物学等多种学科的交叉和研究热点[7] [8] [9]。本世纪以来的研究表明生物膜的生物成分和非生物成分及其形成历程均受所处环境影响[2] [5], 不同的海域、不同季节膜的组成和形成历程是不同的。目前较多地引用了膜形成的四个阶段[10] [11] [12]及基膜[13]条件膜[14]的论法均有前提条件的。随着近代电子显微影像技术和分子生物学研究进展, 人们对微型生物膜研究逐步深入[10]-[18], 利用红外光谱和原子力显微镜, 表征了海藻酸和蛋白质的吸附成膜, 利用负染色电镜法观察到海藻胶的链状结构及海藻酸钙和海藻酸铜蛋白状三维构像[14] [19] [20]; 更多的对膜中的微型生物物种的数量、生物多样性进行了研究[21] [22] [23] [24], 及膜的化学组成和表征研究[25]。目前还缺乏广泛的基础海洋调查, 从长期、多次的实海试验资料对普遍规律的系统分析。

钛材是当今耐蚀性最强、抗磁性最高的涉海材料, 是海洋开发、海防工程极为重要的材料。海水/材料界面同时存在着材料腐蚀和生物污损两个重要过程。海洋腐蚀是这两个过程共同作用的结果。耐蚀性差的材料如碳钢, 其腐蚀过程压倒生物附着过程, 在碳钢表面不能形成完整的微型生物膜, 而工业纯钛则相反, 表面极为稳定, 只有单一生物附着过程, 故而是研究海洋微型生物膜理论的适宜材料。

胶州湾是一个半封闭的港湾, 青岛港湾为胶州湾内的避风港, 近年已成为国际邮轮母港, 是中国海洋科学的“摇篮”, 它为我国腐蚀科学和污损生物学的实验研究基地[26] [27]。每年 12 月到次年的三月, 海水温度在 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 无大型生物繁殖, 可形成较厚的微型生物膜, 故而本研究采用工业纯钛和载玻片在本港湾冬季进行为期 3 个多月的生物膜试验。

2. 试验

2.1. 海港挂片试验

2.1.1. 试验材料及前处理

取载玻片(25 × 75 mm)、工业纯钛(25 × 75 mm)各 10 片, 经除油、清洗后组装成试架框(如图 1 所示), 装袋待用。



Figure 1. Harbour test rack
图 1. 海港试验架

2.1.2. 海港挂片

2016 年 12 月, 在青岛中港海鸥浮码头进行海港挂片(海水温度 $\leq 10^{\circ}\text{C}$)。首先把装试片的框架固定在尼龙绳上, 然后尼龙绳一端栓热浸锌锚链作沉锤, 沉入海中约一米左右, 尼龙绳的另一端则固定在浮码头上。

2.1.3. 海港取片

2017 年 3 月, 将海鸥码头投放过冬的载玻片和工业纯钛试片框架取出, 分别装入灭菌处理的离心管中, 同时灌入经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过的海水(海水温度 $\leq 10^{\circ}\text{C}$), 将离心管编号后密封保存。

2.2. 微生物膜的测试和表征

2.2.1. 扫描电镜测试

利用 SEM 电镜(JSM-6700F, 日本电子公司)对试样表面的腐蚀产物形貌进行了表征。将各样板在 60°C 下进行干燥, 然后截取尺寸为 $10\ \text{mm}^2$ 的小样进行 SEM 测试。

2.2.2. 无机成分测试

利用电子能谱 EDS (JSM-6700F, 日本电子株式会社)和 X 射线衍射仪 XRD (D/max-rA 型, 日本理学株式会社)对腐蚀产物进行了元素分析和物相组成分析, 其中 XRD 扫描范围为 $10^{\circ}\sim 80^{\circ}$, 扫描速度为 $10^{\circ}/\text{min}$ 。测试的试样为干燥后的样板表面轻轻刮取的腐蚀产物粉体。

2.2.3. 有机成分测试

利用德国布鲁克公司生产的 BRUKER TENSOR 27 型傅立叶变换红外光谱(FTIR)仪分析了腐蚀产物中污损生物的有机组成。具体参数设置如下, 光源光谱范围为 $500\sim 4000\ \text{cm}^{-1}$, 光源波数精度为 $0.01/2000\ \text{cm}^{-1}$, 分辨率参数为 $0.4\sim 1\ \text{cm}^{-1}$, 信噪比参数为 4000:1 (p/p 值), 吸收精度参数为 0.01% T。腐蚀产物的取样方式与无机成分测试方式相同。

2.2.4. 电化学测量

对干燥后的样板进行了环氧树脂绝缘处理, 留取 $10\ \text{mm}^2$ 的工作面积, 利用 CS350 电化学工作站(武汉科思特仪器有限公司)测试了污损生物膜的极化曲线。

3. 结果分析

3.1. 生物膜形貌

3.1.1. 生物膜宏观形貌

海港挂片经 60℃干燥处理后的宏观形貌如图 2 所示。其中非金属基体载玻片试样表面有明显的生物污损, 1-3 号试样表面污损产物层最厚, 颜色最深。钛板试样 1-1 和 1-2 表面污损相对轻微。载玻片试样生物污损严重的原因在于玻璃透光性好, 两面均利于向光的单胞藻生长, 原生动物亦有利于生物膜的快速发展, 而工业纯钛则不具备这样的条件, 故而载玻片和工业纯钛表面生物膜附着情况差异明显。

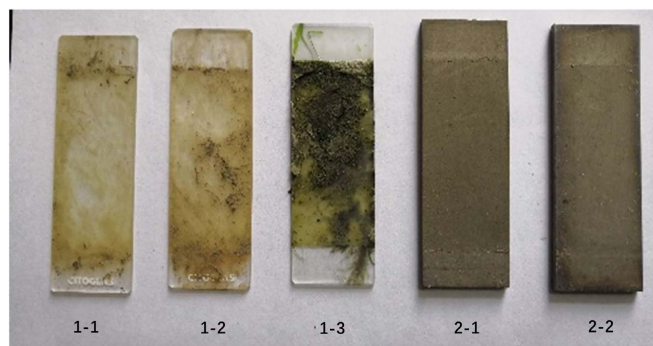


Figure 2. Surface fouling of the test plate. (1. Slide; 2. Industrial pure titanium)
图 2. 试板表面污损情况。(1. 载玻片; 2. 工业纯钛)

3.1.2. 生物膜的微观形貌

在载玻片表面表层产物的 SEM 电镜中(图 3)可观察到腐蚀产物中有大量椭圆形微型生物出现, 根据其形貌可初步判定其主要组成为卵形硅藻(图 3)。

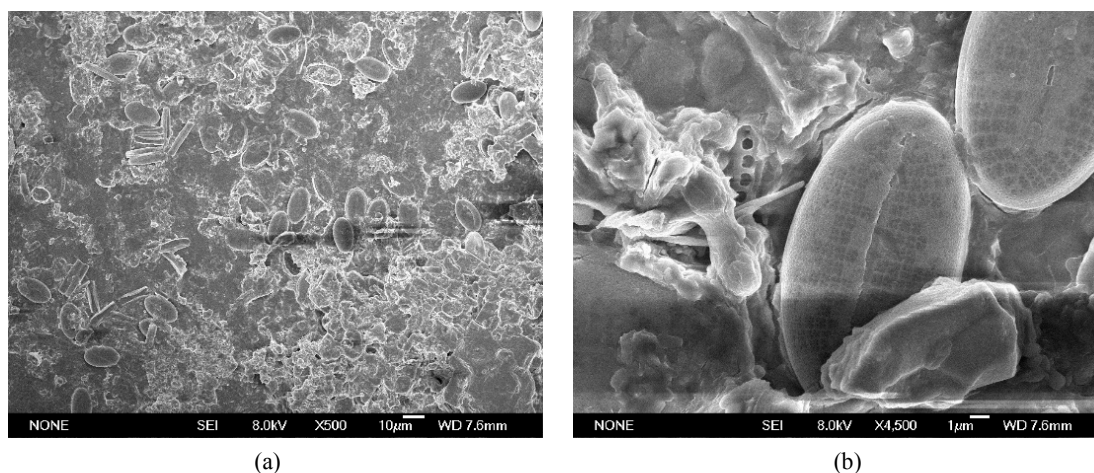


Figure 3. Surface products of a slide containing a large number of ellipsoidal diatoms
图 3. 含有大量椭圆形硅藻的载玻片表面表层产物

而在载玻片表面底层产物的 SEM 电镜中(图 4 和图 5)则观察到了纤维状和球形藻类的出现。以上生物均为青岛海岸海域常见的微生物群落。

钛板表面(图 6)的 SEM 结果表明, 其表面生成了相对致密的氧化物层, 并有少量海水溶解盐类(如钠盐、钙镁盐类等)、硅藻类死亡机体等代谢产物。

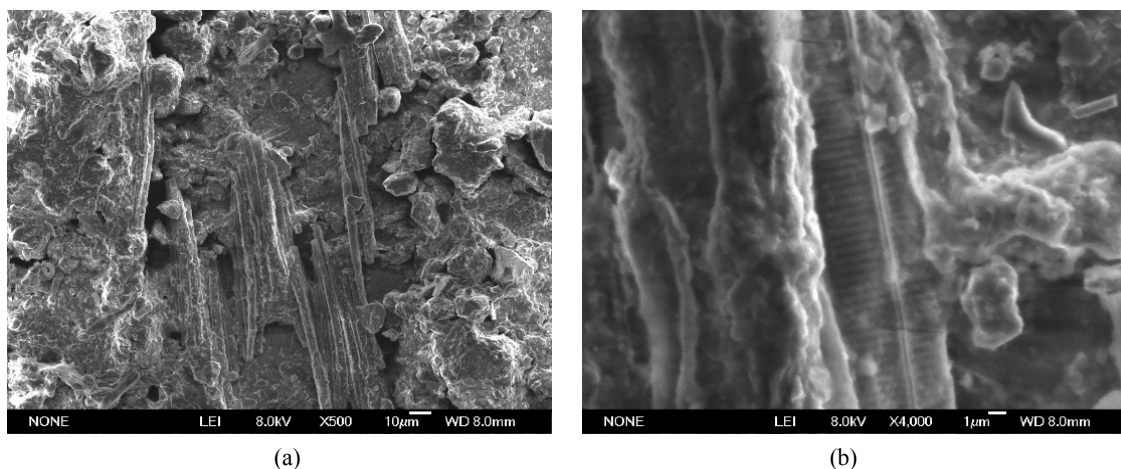


Figure 4. Substrate product of a slide containing fibrous algae
图 4. 含有纤维状藻类的载玻片底层产物

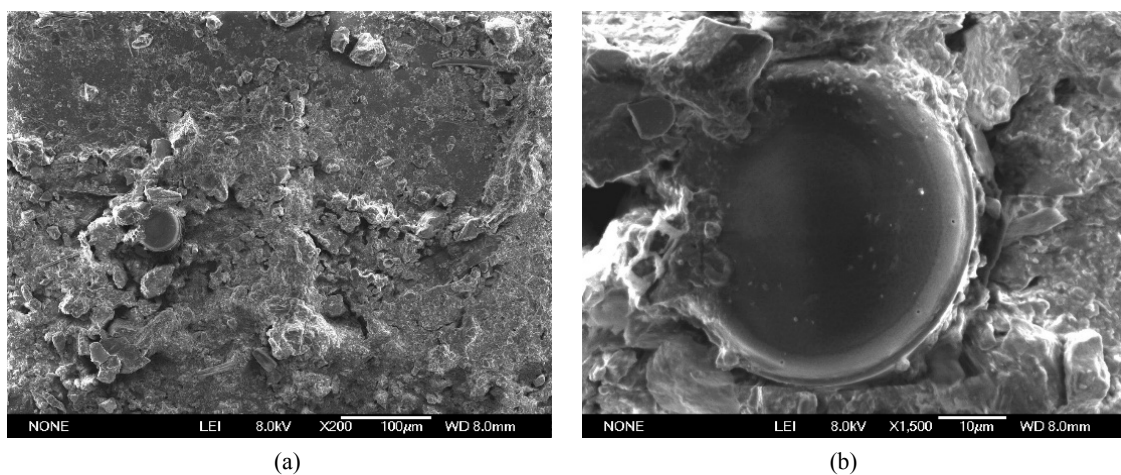


Figure 5. Substrate of a slide containing spherical algae
图 5. 含有球形藻类的载玻片底层产物

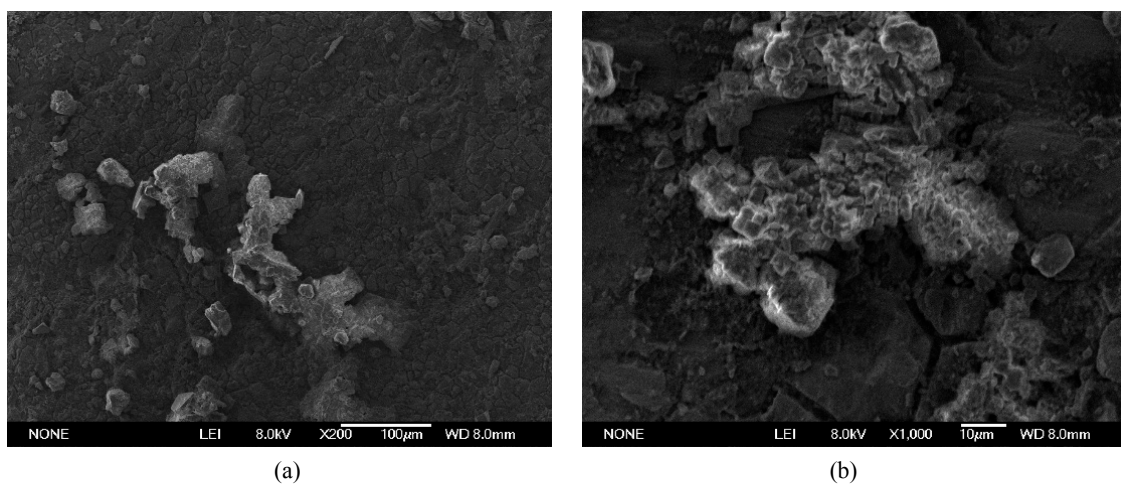


Figure 6. Titanium plate surface product composed of dense oxide layer, a small amount of inorganic salt and diatom dead body
图 6. 由致密氧化层和少量无机盐及硅藻死亡机体构成的钛板表面产物

3.2. 污损生物膜无机成分分析

3.2.1. 污损生物膜的物相组成分析

图 7 和图 8 分别为载玻片表面的表层和底层产物的 XRD 图谱。结果表明, 载玻片表面无机产物主要为 NaCl 和少量 SiO_2 。此外, 在 $10^\circ\sim 40^\circ$ 的范围内 XRD 图谱均出现了不同程度的面包峰, 体现了产物中可能存在大量有机非晶产物, 即细菌、单胞藻及原生动物的。 SiO_2 则为死亡硅藻的遗骸所提供。

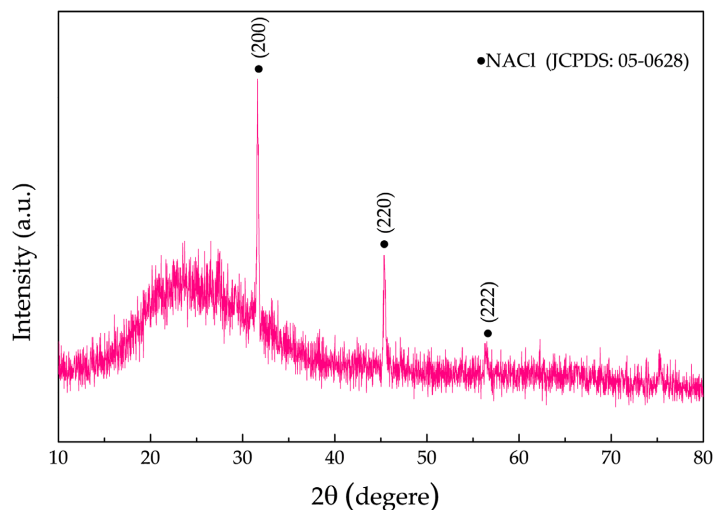


Figure 7. XRD pattern of surface products on the surface of the slide, in which three crystal faces of NaCl corresponding to the three strong peaks are (200), (220) and (222)

图 7. 载玻片表面表层产物 XRD 图谱: 图谱中三强峰对应的 NaCl 的(200)、(220)、(222)三个晶面

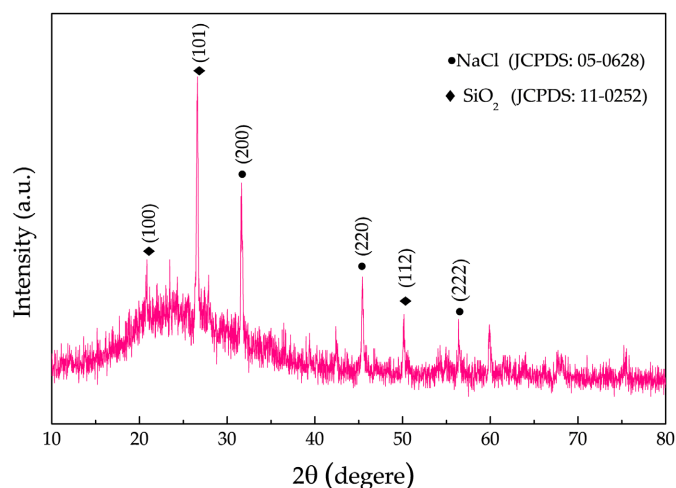


Figure 8. The XRD pattern of the bottom product on the surface of the slide shows that the peaks of SiO_2 are (101), (112) and (100) crystal faces

图 8. 载玻片表面底层产物 XRD 图谱: 与表层相比多出的峰为 SiO_2 的(101)、(112)和(100)晶面

钛板表面的 XRD 测试结果如图 9 所示, 由于钛板表面的腐蚀产物膜较薄, 所测得的主要成分仍为基体钛板的成分 Ti, 没有观察到明显的 TiO_2 等氧化产物对应的衍射峰。

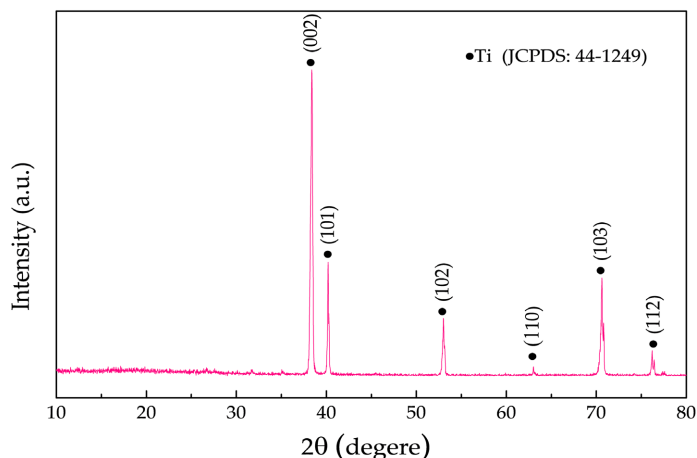


Figure 9. XRD pattern of titanium surface products, phase composition is pure titanium

图 9. 钛板表面产物 XRD 图谱：物相组成为纯钛

3.2.2. 污损生物膜的元素分析

图 10 和图 11 为载玻片表面产物的 EDS 测试，二者相比较，表层产物中(图 11)检测到大量的 S、Na、Mg、Ca、K 等元素，表明大量海水盐物质的析出以及微生物的附着，而底层产物中主要检测到了载玻片基体的 Si 和 O 元素，以及少量的 Na、Cl、Mg 和 K 等盐物质的元素组成，没有发现 S 等元素，表明微生物的污损附着停留在表面，没有深入至底层。

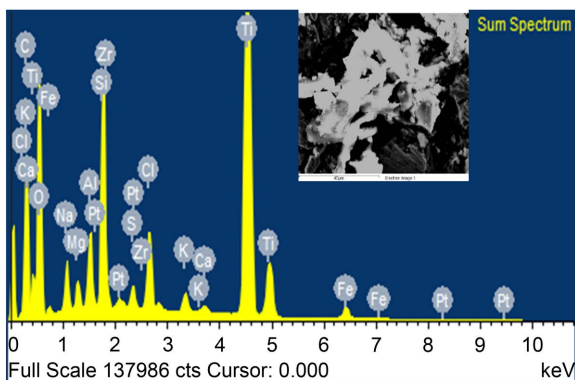


Figure 10. EDS spectrum of the surface product of the slide surface

图 10. 载玻片表面表层产物能谱图

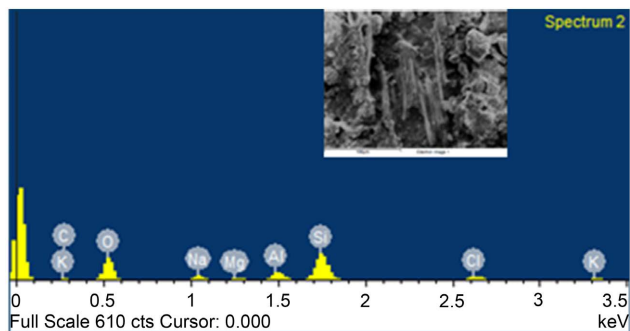


Figure 11. EDS spectrum of the substrate product on the surface of the slide

图 11. 载玻片表面底层产物能谱图

利用 EDS 对钛板表面腐蚀产物的元素组成进行了分析, 如图 12 所示, 钛板表面产物中的元素组成主要为 Ti、O、Na、Cl, 结合衍射分析可知为 Ti、TiO₂ 和 NaCl, 元素 Fe、Al、Zr 为金属钛板中的合金成分, 元素 K、Ca、Mg 则为海水中析出盐的组成, S 的出现暗示钛板表面也有少量微生物附着。C、Pt 元素为 EDS 测试仪器的基准元素, 可以忽略。

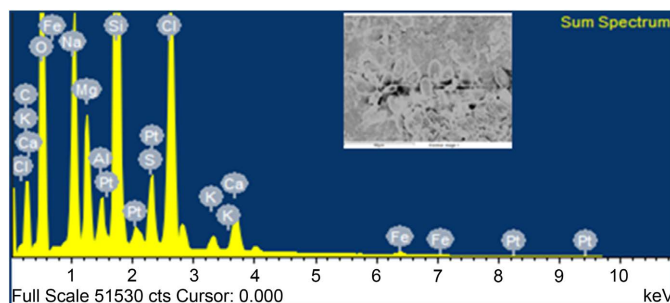


Figure 12. EDS spectrum of substrate products on the surface of titanium plate
图 12. 钛板表面底层产物能谱图

3.3. 污损生物膜有机成分分析

利用 FTIR 测试了生物膜有机成分。由图 13 可知, 3400~3200 cm⁻¹ 对应的吸收峰, 其峰形圆而钝, 说明存在 O-H 的伸缩振动, 具有羟基(-OH)。2500~3000 cm⁻¹ 的两个小而尖锐的峰为甲基(-CH₃)和亚甲基(-CH₂)的吸收峰, 这两个基团含量很少。此外, 在 1640~1600 cm⁻¹ 出现的较尖锐的吸收峰为碳碳双键(-C=C), 可以看出该基团含量较多。小于 1500 cm⁻¹ 的峰为指纹区, 一般不作为判断依据, 可忽略。

载玻片表面底层产物(图 14)的谱图与图 13 相似, 不再赘述。

3.4. 电化学测量

电化学性能能够反应电化学腐蚀过程, 揭示污损生物附着的电化学机理, 图 15(a)为未污损的工业纯钛极化曲线, 其自腐蚀电流为 3.0×10^{-6} A/cm², 自腐蚀电位为 -0.13 V。污损后工业纯钛的极化曲线如图 15(b)所示, 其自腐蚀电位为 -0.13 V, 腐蚀电流密度为 5.8×10^{-8} A/cm²。与污损前相比, 工业纯钛的自腐蚀电位基本不变, 极化率减小, 说明氧成分滋养藻类微生物, 所形成的微生物膜导电性好、离子渗透性和透气性较好, 故生物污损对于工业纯钛电化学稳定性影响不大。

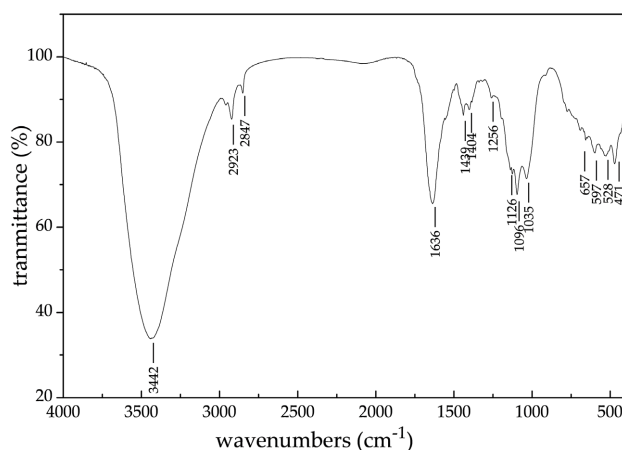


Figure 13. FTIR spectrum of surface products on slide surface
图 13. 载玻片表面表层产物 FTIR 图谱

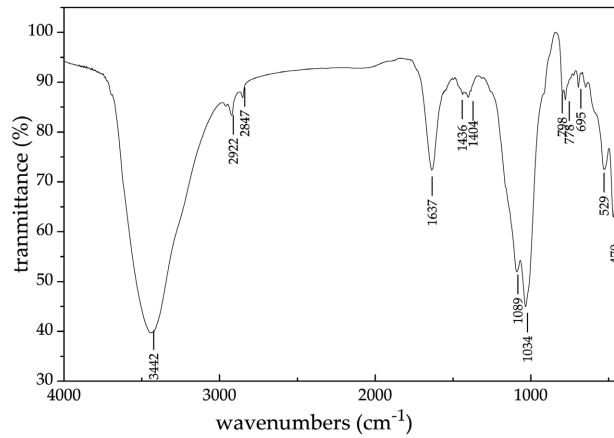


Figure 14. FTIR spectrum of substrate products on the surface of the slide
图 14. 载玻片表面底层产物 FTIR 图谱

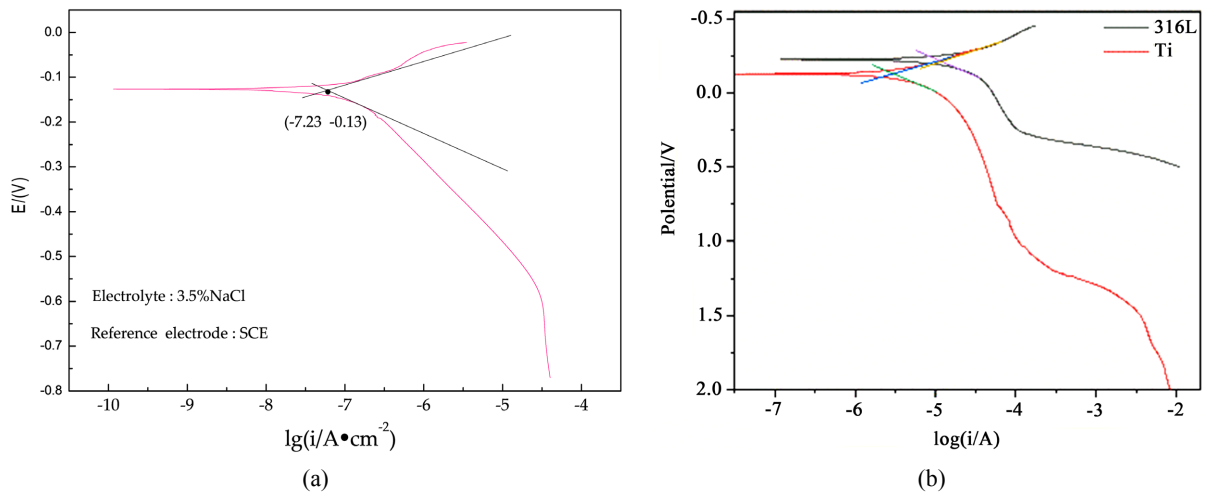


Figure 15. Tafel polarization curve on the surface of a metal specimen
图 15. 金属试样表面的塔菲尔极化曲线

4. 讨论

1) 海洋污损生物膜微生物表征

“表征”本义为把物体表面各种信息快速直接暴露。海洋污损生物膜系为海水中物体表面微生物繁衍形成的微生生态。一旦失去海水微生生态被破坏，所有微生物死成一团，加之膜中除微生物之外还有海水中无机盐(NaCl、CaCl₂ 等)、有机质(溶解性有机质、颗粒有机质)其粒径从离子的纳米级到微生物的微米级差别巨大。本研究是取 10 mm² 试片后 50℃干燥，直接进行电镜测试仪观察到硅藻，要进行菌类分析，样品需特别加工处理[28]。同样对于微生物的单胞藻、原生动物，则需要取样分离培养，用生物显微镜即可定种定量[24]。本研究通过扫描电镜检出冬季胶州湾优势微型生物种为卵型硅藻，原生动物在冬季还没有繁殖。

2) 海洋污损生物膜无机和有机的表征

生物膜的研究大都认为是细菌膜、硅藻膜、微生物膜等微型生物体构成，但在海水环境中形成的膜均含有海水中的有机物或无机物。用红外光谱仪(FTIR)表征出海洋污损生物膜中有机物主要为碳氢化合物，其中有多元醇和含双键活性物质；能谱分析(EDS)和 X 射线衍射仪(XRD)表征出生物膜中的无机成分

有 K、Na、Ca、Mg 等离子的海水无机盐成分。本研究用实验证实了海洋生物膜中的有机物和无机物的存在。

3) 海洋污损生物膜电化学测试

为了探明海洋污损生物膜对钛板表面电化学的影响,对钛板污损前后自腐蚀电位和自腐蚀电流密度变化不大,说明钛板表面的海洋污损生物膜对钛板表面电化性能影响甚微。电化学结果表明该生物膜应有良好的透水性,并未阻碍海水/钛板界面双电层的电子转移和离子扩散。

5. 结论

钛合金韧性强、耐酸碱、抗腐蚀、稳定性高,且比一般金属轻 48%,已成为现代海洋科学和海防工程中不可缺少的材料。本文在青岛中港海鸥浮码头对工业纯钛和载玻片进行了为期 3 个月的海港实验,并对其表面的生物污损情况和电化性能等进行了系统表征和分析,结果表明:

1) 载玻片和工业纯钛表面生物膜明显差异,载玻片表面有大量卵形、球形和纤维状藻类,钛板表面仅有藻类残骸和少量含 K、Na、Ca、Mg 等元素无机盐类。本研究通过扫描电镜检出冬季胶州湾优势微型物种为卵型硅藻,该研究方法可以对于一个海域优势种群变化快速跟踪,对评价环境有一定的启示意义。

2) 实验证实了海洋生物膜中含有的有机物主要有碳氢化合物其中存在少量多元醇以及含双键活性物质的有机物质和 K、Na、Ca、Mg 等元素无机盐类颗粒。

3) 钛板电化极化曲线结果表明其生物污损前后自腐蚀电位和自腐蚀电流密度变化不大,说明钛板表面的生物膜透水性较好,故电化影响小。

基金项目

国家自然科学基金(59471054 和 59071040)。

参考文献

- [1] 类彦立,徐奎栋.海洋微型底栖生物调查方法与操作规程[J].海洋与湖沼,2011,42(1):157-164.
- [2] Ma, S., Li, Y.H., Guan, F., *et al.* (2022) Variations in Microbial Community on Different Materials in Sanya Marine Environment Experimental Station, China. *Canadian Journal of Microbiology*, **68**, 447-455. <https://doi.org/10.1139/cjm-2022-0009>
- [3] 尹衍升.海洋材料的微生物附着腐蚀[M].北京:科学出版社,2012.
- [4] 黄宗国.海洋污损生物及其去除:上册[M].北京:海洋出版社,1984.
- [5] 马士德,董续成,康宁,等.青岛港湾微型污损生物群落研究——不同涂层的碳钢/海水界面生物膜初探[J].科技导报,2021,39(18):101-110.
- [6] 马士德,黄修明,谢晓波,等.舰船的生物附着与腐蚀调查[J].海洋学报,1996,18(1):80-83.
- [7] 张晓华,等.海洋微生物学[M].北京:科学出版社,2016:1-18,58-62.
- [8] 焦念志,等.海洋微生物生态学[M].北京:科学出版社,2006.
- [9] 张传伦.微型生物碳泵——海洋生物地球化学研究的新模式[J].中国科学(地球科学),2018,48(6):805-808.
- [10] Kirschner, C.M. and Brennan, A.B. (2012) Bio-Inspired Antifouling Strategies. *Annual Review of Materials Research*, **42**, 211-229. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070511-155012>
- [11] Gatenholm, P., Holmström, C., Maki, J.S. and Kjelleberg, S. (1995) Toward Biological Antifouling Surface Coatings: Marine Bacteria Immobilized in Hydrogel Inhibit Barnacle Larvae. *Biofouling*, **8**, 293-301. <https://doi.org/10.1080/08927019509378282>
- [12] Rosenhahn, A., Schilp, S., Kreuzer, H.J. and Grunze, M. (2010) The Role of “Inert” Surface Chemistry in Marine Biofouling Prevention. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **12**, 4275-4286. <https://doi.org/10.1039/c001968m>

- [13] Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- [14] 贺小燕. 海洋生物污损条件膜和生物膜的形成及调控机制研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [15] Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. and Vaulot, D. (1997) Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Picoplankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I. *American Society for Microbiology*, **63**, 186-193. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>
- [16] 焦会志, 杨燕辉. 四类海洋超微型浮游生物的同时检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 506-511.
- [17] 白春礼, 田茂, 罗克. 扫描力显微术[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [18] 鲁哲学, 张志凌, 庞代久. 原子力显微镜技术及其在细胞生物学中的应用[J]. 科学通报, 2005, 50(12): 1161-1166.
- [19] Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **74**, 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- [20] Cole, J.R., Wang, Q., Chai, B.L. and Tiedje, J.M. (2011) The Ribosomal Database Project: Sequences and Software for High-Throughput rRNA Analysis. In: de Bruijn, F.J., Ed., *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, Wiley-Blackwell, Hoboken, 294-296. <https://doi.org/10.1002/9781118010518.ch36>
- [21] 薛超波, 王国良, 金珊, 等. 海洋微生物多样性研究进展[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(3): 377-384.
- [22] 马士德, 修鹏远, 马岩, 等. 三亚海洋环境试验站海洋细菌污损群落初探[J]. 中国涂料, 2017, 32(12): 54-58.
- [23] 翟晓凡, 管方, 王楠, 等. 光催化复合锌基镀膜的设计及其抗海洋微生物膜机制研究[C]//第十一届全国腐蚀与防护大会论文摘要集. 沈阳: 中国腐蚀与防护学会, 2021: 879-880. <https://doi.org/10.26914/c.cnkihy.2021.016319>
- [24] 马士德, 张林林, 修鹏远, 等. 青岛港湾防污涂料/海水界面细菌污损群落变化初探[J]. 中国涂料, 2019, 34(1): 52-57.
- [25] 黄丽文. 复合生物膜物理形态测试及参数表征[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- [26] 王秋, 黄美尹, 芦澄清, 等. 海洋微型污损性生物初步探讨[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 1981(1): 46-52.
- [27] 马士德. 海洋微生物与金属腐蚀的初步探讨[C]//腐蚀与防护论文集. 北京: 科学出版社, 1982: 376-380.
- [28] 胡春辉, 徐青, 孙璇, 等. 几种典型扫描电镜生物样本制备[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402.