海洋污损细菌分离纯化及金属离子抑菌研究

夏苏杭[1], 全艳玲[1], 周艳文[1], 陈东旭[1], 康宏伟[1], 吕　哲[1], 陈　爽[1], 高乙宁[1], 李　娜[1], 解生权[3], 高　鹏[2]

(1. 辽宁科技大学 化学工程学院 表面工程研究所, 辽宁 鞍山 114051; 2. 海洋装备用金属材料及其应用国家重点实验室, 辽宁 鞍山 114000; 3. 辽宁经济职业技术学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: 为了研究海洋生物污损对船体和海洋工程的影响, 作者将热喷涂镀钴基、镍基及含铜氧化钛基膜的船用厚钢板试样片放置在海水中, 利用振荡培养箱模拟海洋环境, 进行晃片培养。分离纯化镀膜钢片表面上的细菌, 研究早期污损细菌的生长规律, 通过革兰氏染色、生理生化实验对细菌进行鉴定, 伯杰氏系统细菌学手册查证。采用纸片法测定抑菌圈, 研究铜、钴、镍 3 种金属离子对污损细菌的影响, 观察不同离子浓度的抑菌圈。研究结果表明: 早期海洋污损细菌有 G^+芽孢杆菌属(*Bacillus*)、G^+芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、G^+无芽孢杆菌(*Bacilli*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、G^+无芽孢丝状菌、假单胞菌属(*Pseudomonas*)6 类; 其中 G^+细菌首先吸附; Cu^{2+}的最佳抑制质量浓度为 30 g/L, Co^{2+}的最佳抑制质量浓度为 80 g/L, Ni^{2+}的最佳抑制质量浓度为 110 g/L。

关键词: 海洋污损; 早期污损细菌; 金属离子; 抑菌作用

中图分类号: Q938.8　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2020)01-0075-06

DOI: 10.11759/hykx20190620001

海洋生物污损给海洋产业、海洋工程以及海洋装备造成了一系列不利的影响[1]。生物污损一般分为污损微生物和大型污损生物[2], 过程如下: 材料表面被一些有机物和无机物吸附, 改变材料表面特征, 如电荷的电性、亲水疏水性等形成生物膜的条件, 从而形成条件膜[3]。条件膜起到了促进细菌、微型藻类的附着的作用[4]。黏附污损微生物附着后, 不断生长繁殖, 黏附污损微生物表面分泌出胞外聚合物(EPS), EPS 是大分子黏性物质, 能够改变细胞表面的物理化学性质, 这些大分子黏性物质对黏附污损微生物细胞之间的吸附、聚集等起有利作用[5], 最终形成一层具有一定厚度的微生物膜[2, 6]。微生物膜为大型污损生物提供了丰富的营养物质和良好的生长环境, 它们的幼虫或孢子黏附在微生物膜上, 并不断地发育生长, 分泌各种高强度黏附胶附着在物体表面, 最终发展形成大型生物污损层[7]。拟分离鉴定模拟海水环境中镀钴基、镍基及含铜氧化钛基膜的船用厚钢板试样片在海水中吸附的早期污损细菌[8], 研究钴、镍及铜金属离子浓度对早期污损细菌的影响, 对研究一种新型防污涂层具有重要意义[9]。

1　材料与方法

1.1　试验材料

钢样: 来自海洋装备用金属材料及其应用国家重点实验室, 钢片基体是 AH32 海工钢, 采用等离子喷涂技术处理钢样[10], 在钢样表面镀钴基、镍基及含铜氧化钛基涂层, 圆柱体钢片直径 24 mm, 厚度 8 mm。正方体钢片边长 20 mm, 厚度为 5 mm。

药品: 分离细菌采用的营养琼脂、生理生化鉴定实验所用培养基试剂主要来自国药集团化学试剂有限公司和北京奥博生物技术有限责任公司。

仪器: HZQ-F160 振荡培养箱, JD3000-3 电子天平, LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, SW-CJ-2FD 双人单面垂直洁净工作台, LRH-250A 生化培养箱, BM1000 数码生物显微镜。

收稿日期: 2019-06-20; 修回日期: 2019-08-08

基金项目: 辽宁省科技厅资助项目(No. SKLMEA-USTL-201709)

[Foundation: Project: Funded by the Science and Technology Department of Liaoning Province, No. SKLMEA-USTL-201709]

作者简介: 夏苏杭(1996-), 男, 辽宁新民人, 在读硕士研究生, 主要从事微生物污损研究, E-mail: 1076780589@qq.com; 全艳玲, 通信作者, E-mail: qyl590@163.com; 高鹏, 联合通信作者, E-mail: neugp@126.com

1.2 钢片吸附早期污损细菌分离纯化

将钢样放入 250 mL 锥形瓶内, 倒入足以没过钢样的海水, 塞紧棉塞, 放入振荡培养箱内, 调节振荡培养箱内温度为 25℃、振荡频率为 120 rpm, 以此模拟海水中的温度和振荡频率, 分别培养 10、20、30、40 min、1、5、9、13、16、20、24 h, 培养结束后, 将锥形瓶取出, 无菌滤纸吸钢样表面海水, 将钢样放入无菌水中, 冲洗干净吸附细菌, 菌悬液倾倒营养琼脂平板, 37℃培养 2 d, 将培养好的细菌按照菌落的颜色、大小、形状进行分离纯化[11-13]。

1.3 早期污损细菌的鉴定

将分离纯化的细菌进行革兰氏染色, 糖类分解实验, V-P 实验, 甲基红实验, 柠檬酸盐利用实验, 硝酸盐还原实验, 淀粉水解实验, 吲哚实验, 接触酶实验, 记录结果[14]。

1.4 金属离子对早期污损细菌生长的影响

采用滤纸片法实验[15], 配置不同浓度的 $CuSO_4$、$CoCl_2$、$NiCl_2$ 溶液, 确定金属离子溶液对一株早期海洋污损细菌抑菌效果[16]。含铜氧化钛基膜模拟海水中振荡 10 min, 分离吸附 1 株革兰氏阳性杆状菌作为待测菌株。

2 结果与分析

2.1 早期污损细菌生长特征

依据菌落形态, 细胞形态, 革兰氏染色, 糖类分解实验, V-P 实验, 甲基红实验, 柠檬酸盐利用实验, 硝酸盐还原实验, 淀粉水解实验, 吲哚实验, 接触酶实验结果, 3 种膜上分离纯化出 42 株细菌, 经伯杰手册查证[17], 共分为 6 类: G^+芽孢杆菌、G^+芽孢乳杆菌、G^+葡萄球菌、G^+诺卡氏菌、G^-假单胞菌、G^+无芽孢杆菌类, 分离到代表性细菌鉴定结果见表 1、图 1。

表 2 表明, 革兰氏阳性细菌最先出现在钢样上, 30 min 后, 在 Ni 基膜发现革兰氏阴性菌。应与细菌细胞壁结构有关, 革兰氏阳性细菌的细胞壁由 N-乙酰葡糖胺和 N-乙酰胞壁酸两种单糖相互间隔连成长链聚糖, 磷壁酸结合在革兰氏阳性细菌细胞壁上, 一种与肽聚糖分子进行共价结合, 另一种是跨越肽聚糖层与细胞膜的脂质层共价结合, 而革兰氏阴性菌的细胞壁厚度比革兰氏阳性细菌薄, 肽聚糖层很薄, 埋藏在外膜脂多糖(LPS)内[18], 革兰氏阴性细菌不含有磷壁酸。磷壁酸的主要成分甘油磷酸和核糖醇磷酸使革兰氏阳性细菌细胞表面整体带负电, 而钢片中铁离子带正电, 利于和金属膜结合, 故革兰氏阳性细菌先附着在金属表面(图 2)。

2.2 Cu、Co、 Ni 3 种金属离子对细菌生长的影响

Cu、Co、 Ni 3 种金属离子对海洋污损细菌生长的影响见表 3、图 3。

由图 3 可见: Cu^{2+}溶液质量浓度为 10 g/L~30 g/L, 抑菌圈的直径慢慢变大, 当质量浓度达到 30 g/L 时, 抑菌圈的直径达到最大, 此时的抑菌圈直径 2.8 cm, 30 g/L 之后抑菌圈的直径开始变小, 当质量浓度> 50 g/L 之后无抑菌圈。当Co^{2+}溶液浓度<60 g/L 时, 没有抑菌圈, 当质量浓度在 60 g/L~80 g/L 时抑菌圈的直径逐渐变大, 在 80 g/L 达到最大, 抑菌圈直径为 1.9 cm, 在 80 g/L 之后抑菌圈的直径逐渐变小, 最后

表 1 代表性细菌生理生化实验结果

Tab. 1 Results of physiological and biochemical identification of bacteria

钢样分离到代表性细菌	糖类发酵产酸	糖类发酵产气	淀粉水解实验	柠檬酸盐利用实验	硝酸盐还原实验	吲哚实验	V-P 实验	甲基红实验	接触酶实验
1(Ni 20 min①)	+	–	–	–	+	–	–	+	+
2(TiO_2 10min③)	+	–	+	–	+	–	–	+	–
3(Ni 40min④)	+	–	–	–	+	–	–	–	+
4(TiO_2 16h ③)	+	–	–	–	–	–	–	–	+
5(Ni 30min④)	+	–	+	+	–	–	–	+	+
6(Co 30min⑥)	+	–	–	+	+	–	–	+	+

1(Ni 20 min①): 杆状, 革兰氏阳性菌, 菌落较大, 呈白色不规则状、表面干燥褶皱、边缘不整齐、呈半透明状; 2(TiO_2 10min③): 杆菌, 革兰氏阳性菌, 菌落表面粗糙边缘不规则, 呈白色, 干燥有褶皱, 菌落较小; 3(Ni 40 min④): 球状, 革兰氏阳性菌, 菌落小, 呈灰色规则状、表面光滑湿润、边缘整齐; 4(TiO_2 16 h③): 丝状, 革兰氏阳性菌, 菌落大, 呈白色不规则状, 表面干燥褶皱、边缘整齐; 5(Ni 30 min④): 杆状, 革兰氏阴性菌, 菌落较小, 呈白色规则状、表面光滑湿润、边缘规则; 6(Co 30 min⑥): 杆菌, 革兰氏阳性菌, 菌落表面光滑湿润且边缘规则, 菌落呈白色小点状; "+". 阳性, "–". 阴性

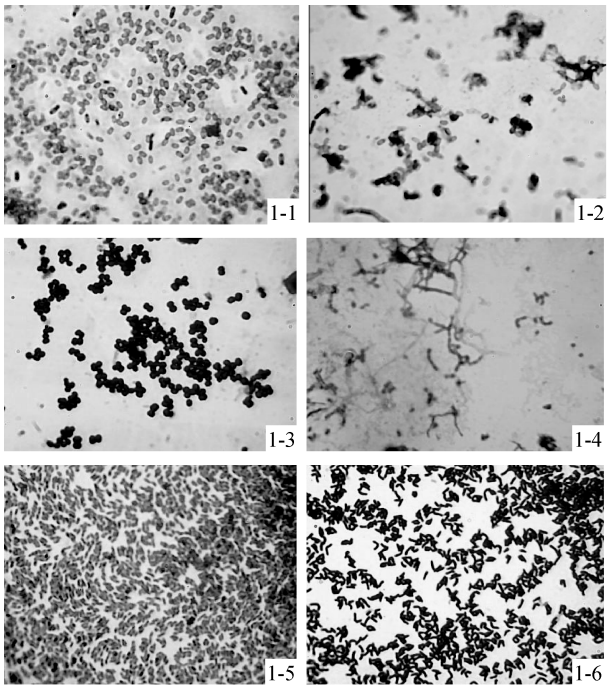


图 1　代表性细菌形态

Fig. 1　Representative bacterial morphology

1-1. G^+芽孢杆菌; 1-2. G^+芽孢乳杆菌; 1-3. G^+葡萄球菌; 1-4. G^+无芽孢丝状菌; 1-5. G^-假单胞菌; 1-6. G^+无芽孢杆菌(BM1000 数码生物显微镜 1 000 倍)

1-1. G^+ *Bacillus*, 1-2. G^+ *Sporolactobacillus*, 1-3. G^+ *Staphylococcus*, 1-4. G^+ no spore filamentous bacteria, 1-5. *Pseudomonas*, 1-6.G^+*bacilli* (BM1000 biomicroscopy 1000 times)

表 2　早期钢样污损细菌

Tab. 2　Early steel stain bacteria

镀膜钢样与时间	G^+芽孢杆菌	G^+芽孢乳杆菌	G^+葡萄球菌	G^+无芽孢丝状菌	G^-假单胞菌	G^+无芽孢杆菌类
Ni 10 min	*	*	*			
TiO_2 10 min	*	*	*	*		
Co 10 min	*					
Ni 20 min	*					
TiO_2 20 min	*					
Co 20 min	*					
Ni 30 min	*		*	*	*	*
TiO_2 30 min	*	*				*
Co 30 min	*		*			*
Ni 40 min	*		*	*		*
TiO_2 40 min	*		*	*		*
Co 40 min	*		*	*		*
Ni 1 h		*				
TiO_2 1 h	*					
Ni 5 h	*				*	
TiO_2 5 h	*					*
Co 5 h	*					
Ni 9 h	*					*
TiO_2 9 h	*	*				*

续表

镀膜钢样与时间	G^+芽孢杆菌	G^+芽孢乳杆菌	G^+葡萄球菌	G^+无芽孢丝状菌	G^-假单胞菌	G^+无芽孢杆菌类
Co 9 h	*					
Ni 13 h	*	*				
TiO_2 13 h	*					
Co 13 h	*					*
Ni 16 h	*					
TiO_2 16 h				*		
Co 16 h	*					*
Ni 20 h	*					*
TiO_2 20 h	*					*
Co 20 h	*					*
Ni 24 h	*					*
TiO_2 24 h	*					*
Co 24 h	*					*

注: *代表有细菌出现

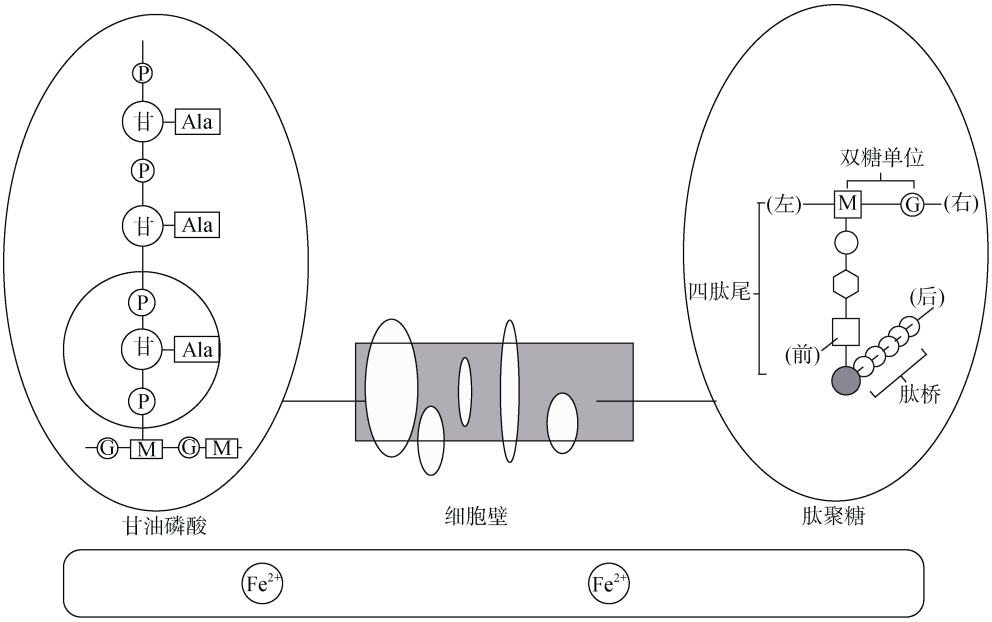


图 2　细菌吸附机制图

Fig. 2　Diagram of bacterial adsorption mechanism

表 3　3 种离子抑菌圈

Tab. 3　Three kinds of ionic bacteriostatic circles

	3 种离子抑菌圈(cm)																	
	金属溶液质量浓度(g/L)																	
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cu/d	1.0	1.2	1.8	2	2.8	2.5	1.2	1.8	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co/d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.9	0.9	1.3	1.4	1.5	1.7	1.6	1.6
Ni/d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.9	1.2	1.3	0	0	0	0

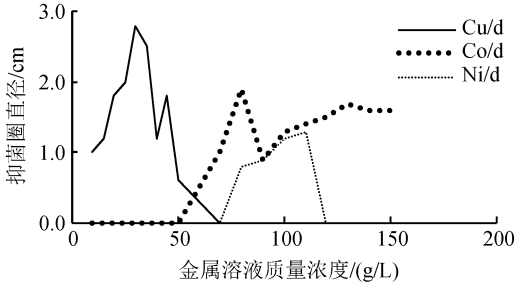


图 3　3 种金属离子抑菌圈趋势图

Fig. 3　Trends in the bacteriostasis circles of three metalions

趋于平稳。当 Ni^{2+}溶液质量浓度<70 g/L 时，抑菌圈的直径为 0，当浓度>70 g/L 时，开始出现抑菌圈，质量浓度 110 g/L 时，抑菌圈直径达到最大，抑菌圈直径为 1.3 cm，当质量浓度>110 g/L 后抑菌圈消失。

3　结论

分离纯化出早期海洋污损细菌，依据伯杰手册第八版，10 min~20 min，吸附细菌为 G^+芽孢杆菌属、G^+芽孢乳杆菌属、G^+无芽孢杆菌中乳杆菌、G^+葡萄球菌属、G^+无芽孢丝状菌。30 分钟，出现 G^-假单胞菌属、G^+无芽孢利斯特菌属，1 h 芽孢杆菌出现荚膜，9 h 后荚膜加厚。革兰氏阳性细菌中磷壁酸携带负电荷，与金属离子所携带的正电荷相结合，率先附着在金属表面，G^+细菌表面的磷壁酸更容易与金属离子吸附。Co 基膜在 10 min~9 h 之间对细菌的抑制能力逐步降低，到 9 h 时对细菌的抑制力最弱，9 h 之后抑制能力逐步增强。Ni 基膜在 10 min~5 h 之间对细菌的抑制能力逐步减小，到 5 h 时抑制能力最弱，5 h~9 h 之间细菌的抑制能力基本不变，9 h~16 h 抑制能力逐步提高，16 h 之后抑制能力变开始变强。TiO_2 基膜在 10 min~5 h 之间对细菌的抑制能力逐步减弱，5 h~9 h 细菌的抑制能力保持不变，9 h~16 h 抑制能力增加，16 h 之后对细菌的抑制能力再次减弱。24 h 抑制污损细菌生长能力监测，Ni 基膜>TiO_2 基膜>Co 基膜。Cu^{2+}溶液达到 30 g/L 时，Co^{2+}溶液浓度在 80 g/L，Ni^{2+}溶液浓度 110 g/L 时，抑菌圈直径分别达到最大，相同浓度下铜离子对污损细菌影响显著。

参考文献:

[1] Coutts A D, Taylor M D, Hewitt C L. Novel method for assessing the en route survivorship of biofouling organisms on various vessel types[J]. Marine Pollution Bulletin, 2007, 54(1): 1-13.

[2] 许萍，任恒阳，汪长征，等. 金属表面混合微生物腐蚀及分析方法研究进展[J]. 表面技术，2019，48(1): 216-224.
Xu Ping, Ren Hengyang, Wang Changzheng, et al. Research progress on mixture microbial corrosion and analytical method on metal surface[J]. Surface Technology, 2019, 48(1): 216-224.

[3] 杨宗澄，白秀琴，姜欢，等. 船体表面海洋污损生物附着规律分析[J]. 船舶工程，2016，38(2): 29-33+79.
Yang Zongcheng, Bai Xiuqin, Jiang Huan, et al. Analysis of the law of marine fouling organism attachment on hull surface[J]. Ship Engineering, 2016, 38(2): 29-33+79.

[4] Liu Y, Tay J H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment[J]. Biotechnol Adv, 2004, 22(7): 533-563.

[5] Wingender J N, Thomas R, FlemmingHans-Curt. Microbial extracelluar polymeric substance; characterization, structure, and function[M]. Berlin, Germany: Springer, 1999.

[6] 田丰，白秀琴，贺小燕，等. 海洋环境下金属材料微生物腐蚀研究进展[J]. 表面技术，2018，47(8): 182-196.
Tian Feng, Bai Xiuqin, He Xiaoyan, et al. Research progress on microbial corrosion of metallic materials in marine environment[J]. Surface Technology, 2018, 47(8): 182-196.

[7] 王祥. 海洋防污功能菌株的筛选及其活性物质的研究[D]. 厦门：厦门大学，2014.
Wang Xiang. Screening of marine antifouling strains and study of active substances[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014.

[8] 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.
Ma Shide, Xiu Pengyuan, Ma Yan, et al. Preliminary study on marine bacterial fouling community in Sanya marine environmental experiment station[J]. China Paint, 2017, 32(12): 54-58.

[9] 张占平，齐育红，刘德良. 海洋底栖硅藻在电气石涂层上的附着行为[J]. 中国表面工程，2011，24(6): 53-57.
Zhang Zhanping, Qi Yuhong, Liu Deliang. Adhesion behavior of marine benthic diatoms on tourmaline coatings[J]. China Surface Engineering, 2011, 24(6): 53-57.

[10] 邹莉. 等离子喷涂技术及其应用[J]. 昆明冶金高等专科学校学报，2005，5: 52-55.
Zou Li. Plasma spraying technology and its application[J]. Journal of Kunming Metallurgy College, 2005, 5: 52-55.

[11] 俞思羽. 一株海绵共生芽孢杆菌的抗硅藻附着活性物质的分离与鉴定[D]. 扬州：扬州大学，2015.
Yu Siyu. Isolation and identification of anti-diatom at-

tachment active substance of a sporozoite[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
[12] 王祥. 海洋防污功能菌株的筛选及其活性物质的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
Wang Xiang. Screening of marine antifouling strains and study of active substances[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014.
[13] 张晓. 海洋产蛋白酶菌的分离、培养及其防污活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Zhang Xiao. Isolation, culture and antifouling activity of marine protease-producing bacteria[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
[14] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 220-224.
Zhou Deqing. Microbiology experiment course[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 220-224.
[15] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.
Tan Caideng, Zhu Meijuan, Du Shuxia, et al. Comparative study of inhibition zone method in bacteriostatic test[J]. The Food Industry, 2016, 37(11): 122-125.
[16] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 100-102.
Shen Ping, Chen Xiangdong. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 100-102.
[17] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏系统细菌学手册(第八版)[M]. 北京: 科学技术出版社, 2004.
Buchanan R E, Gibbons N E. The eighth edition of Berger's system bacteriology handbook[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2004.
[18] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 16-19.
Zhou Deqing. Microbiology Course[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 16-19.

Separation and purification of marine fouling bacteria and inhibition of metal ions

XIA Su-hang[1], QUAN Yan-ling[1], ZHOU Yan-wen[1], CHEN Dong-xu[1], KANG Hong-wei[1], LV Zhe[1], CHEN Shuang[1], GAO Yi-ning[1], LI Na[1], XIE Sheng-quan[3], GAO Peng[2]

(1. College of Chemical Engineering, Surface Engineering Institute, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China; 2. State Key Laboratory of Marine Equipment Steel and its Application, Anshan Iron and Steel Research Institute, Anshan 114000, China; 3. LiaoningVocational Institute of Economics, Shenyang 110122, China)

Received: Jun., 20, 2019
Key words: Marine fouling; early fouling bacteria; metal ions; bacteriostasis

Abstract: Marine biofouling has dramatic impacts on hull and ocean engineering. Samples of thick marine steel plates hot sprayed with cobalt-, nickel-, and copper-titanium-containing film coatings were placed in sea water. The sea environment was simulated by a shaking incubator. The bacteria on the surface of the coated steel sheet were separated and purified, and the growth curve of early fouling bacteria was studied. The bacteria were identified by Gram staining and physiological and biochemical experiments. Bacteria were also identified according to Berger's systematic bacteriology manual. The inhibition zone was determined by the paper method; the effects of three metal ions, copper, cobalt, and nickel, on one strain of bacteria were studied, and the inhibition zone at different ion concentrations was observed. The results showed that in the early marine fouling stage, the bacteria included G^+ *Bacillus*, G^+ non-*Bacillus*, *Staphylococcus,* G^+ nonspore-forming filamentous fungi, and *Pseudomonas*; G^+ bacteria were adsorbed first. The optimal inhibitory concentrations of Cu^{2+}, Co^{2+}, and Ni^{2+} were 30, 80, and 110 g/L, respectively.

(本文编辑: 谭雪静)