

青岛中港海水全浸初期不锈钢表面生物膜的细菌多样性分析*

陈永伟^{1,2} 栾鑫^{1,2} 段继周² 池振明¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 为了研究全浸 15 天不锈钢表面生物膜的形成情况, 首先采用 SEM 及荧光显微镜进行观察, 显示全浸 15 天不锈钢表面已有大量微生物及其腐蚀产物附着, 表明其表面生物膜已经形成; 进一步通过 EDS 对不锈钢表面进行元素分析, 发现实海全浸 15 天的 316L 不锈钢表面出现了大量组成生物体的 C、P 等基本元素, 并且还出现了不锈钢基体中所不存在而存在于生物膜及其代谢产物中 O 等元素, 进一步证明了不锈钢表面生物膜的形成。采用 16S rRNA 基因结合 PCR-RFLP 技术分析手段对实海全浸 15 天的 316L 不锈钢表面生物膜细菌群落的多样性进行了研究, 发现 316L 不锈钢表面附着细菌的 OTU 数为 24, 分别属于变形菌门和拟杆菌门, 其中 α -变形菌的 OTU 数是 18, 占总克隆数的 72.3%, 为绝对优势种群。

关键词 生物膜; 316L 不锈钢; 细菌多样性; PCR-RFLP; 生物腐蚀

中图分类号 P734 **doi:** 10.11693/hyhz20130700105

316L 不锈钢具有较强的耐腐蚀性和良好的机械加工性, 常应用于海洋设施中的关键部件。在天然海水环境中, 不锈钢表面会形成一层由微生物及其代谢产物所组成的生物膜, 该生物膜可能包含多种腐蚀微生物, 如铁氧化菌, 硫酸盐还原菌和锰氧化菌等 (Newman *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 2008), 从而会对不锈钢产生微生物腐蚀, 导致巨大的经济损失 (Beech *et al.*, 1999)。

已有许多研究发现, 316L 不锈钢在淡水和天然海水中都有开路电位变正现象, 即开路电位正向移动现象 (Motoda *et al.*, 1990; Dickinson *et al.*, 1996), 但是在灭菌海水以及某些单一菌株或混合菌株菌液中却出现开路电位负向移动的现象 (Xu *et al.*, 2007, 2008)。目前比较普遍的观点是, 上述开路电位变正现象是由微生物在不锈钢表面的生长繁殖造成的, 但具体是哪种微生物, 其机理是什么尚不清楚。因此, 研究天然海水中的 316L 不锈钢表面的微生物群落结

构具有重要意义, 可为进一步研究微生物腐蚀机理和寻找腐蚀微生物提供参考依据。

有研究表明, 在一般情况下, 生物膜的形成与发展会在 14—20 天内达到成熟阶段 (黄宗国, 2008)。Jones 等 (2007) 对暴露于天然海水中的 316L 不锈钢表面所形成生物膜的细菌群落结构进行了研究, 表明主要的细菌群体在 2—20 天内的相对丰度基本没有发生变化。有关学者对饮用水系统中不锈钢表面生物膜进行了研究, 结果表明, 不锈钢表面细菌种类明显多于 PVC 材料, 不锈钢的腐蚀导致不锈钢表面粗糙度增加, 有利于生物膜的再生。因此, 他们认为导致这种现象发生的原因之一是不锈钢腐蚀造成的 (Lin *et al.*, 2013)。然而, 国内缺乏对海水中 316L 不锈钢表面生物膜的细菌多样性方面的研究。为了了解青岛近海 316L 不锈钢表面微生物膜的细菌群落组成, 本实验选择夏季在青岛海域实海全浸 316L 不锈钢来分析研究其表面生物膜中细菌的多样性。

*国家自然科学基金项目, 40976046 号; 国家重点基础研究发展计划 (973 计划), 2014CB643304 号。陈永伟, 硕士研究生, E-mail: today521328@163.com

通讯作者: 段继周, 研究员, E-mail: duanjz@qdio.ac.cn

收稿日期: 2013-07-02, 收修改稿日期: 2013-11-29

1 材料与方 法

1.1 挂片与取 样

本实验所选用的 316L 不锈钢材料购自山东信阳晟鑫科技有限公司。按照国标《金属材料在表面海水中常规暴露腐蚀试验方法》(GB5776-1986)进行处理, 然后用 SiC 水磨砂纸将试样逐级打磨至 2000#, 放入无水乙醇中超声清洗 10 min, 最后放入干燥器内, 备用。处理好的试样在青岛中港实验站(119°58'E, 35°52'N)开展实海全浸挂片实验。取样时将不锈钢片放入灭过菌的 50mL 离心管中, 然后放入冰盒中带回实验室, -20°C 保存备用。

1.2 生物膜表面观察与分析

1.2.1 扫面电子显微镜观察(SEM) 为了观察不锈钢表面附着微生物随时间的变化规律, 分别在第 1、3、5、7、10 和 15 天取回不锈钢片, 先用灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗不锈钢表面, 然后试片用 5%戊二醛(用灭菌 PBS 稀释)固定 2h。后用 50%、75%、90%和 100%的乙醇梯度脱水各 30min, 真空临界点干燥, 喷金后进行扫描电镜观察(KYKY-2800 扫描电子显微镜, 北京中科科仪技术发展有限责任公司)。

为了观察不锈钢全浸 15 天以后的腐蚀形貌变化, 分别用扫描电镜观察不锈钢片第 0 天的初始形貌和 15 天后去除表面腐蚀产物后的表面形貌。

1.2.2 X 射线能谱分析(EDS) 对 SEM 观察后的第 15 天的不锈钢片不做任何处理, 直接进行 EDS 分析, 来研究不锈钢表面组成元素的变化。

1.2.3 荧光显微镜观察 用 4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)溶液对全浸 15 天的不锈钢进行染色以观察其表面细菌附着情况。DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 其穿过生物膜后与双链 DNA 结合, 在紫外线(365nm)照射下会显示蓝色荧光。将 15 天取回的不锈钢片先用灭菌 PBS 溶液冲洗掉其表面, 后用 0.01mg/mL 的 DAPI 染色 30min, 然后荧光观察其表面附着微生物的数量。

1.3 PCR-RFLP 技术表面附着微生物多样性分析

1.3.1 总 DNA 的提取以及 16S rRNA 基因的扩增 利用 Power Soil DNA Isolation Kit (Mobio, USA)试剂盒来提取不锈钢表面微生物的总 DNA, 从-20°C 冰箱中取出全浸 15 天的不锈钢片, 用数片灭菌纱布擦拭其表面后, 将擦拭后的纱布放入试剂盒中的 Power Bread Tubes 中, 然后按试剂盒说明进行 DNA 提取。以总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因保守引物

Bac8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 Bac1492R: 5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3'进行 PCR 扩增。50μL 反应体系为: DNA 模板 2μL, 正反引物(2mmol/L)各 5μL, 10 × Buffer 5μL, dNTP (2.5mmol/L) 4μL, dH₂O 补充至 50μL。反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 进行 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。

1.3.2 16S rRNA 基因文库构建及测序 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(华舜 W5211, 上海)纯化回收 PCR 产物, 将纯化的 16S rRNA 基因连接到载体 pMD19-T (Takara, 大连)上, 转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α 中, 涂布在含有 x-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上, 于 37°C 培养约 12h, 选择具有氨苄抗性的白色转化子 96 株进行划线培养。然后用水煮法快速提取细胞中的基因组 DNA, 采用 T 载体通用引物 RV-M: 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'和 M13-D: 5'-AGGGTTTCCAGTCACGACG-3' (Dang *et al.*, 2008)进行 PCR 验证。再先后用 *Msp*I (NEB R0106, 北京)与 *Hha*I (NEB R0139, 北京)限制性内切酶进行酶切。根据酶切所得的 RFLP 带型对克隆子进行初步划分, 相同带型归为同一个 RFLP 带型, 每个带型挑选出一株代表性菌株送测序(上海鼎安生物技术有限公司)。

1.3.3 系统进化分析 测得的序列用 DOTUR 软件进行处理, 相似性在 97%以上的被归为同一个操作分类单元(OTU)。将所得结果分别与 NCBI GenBank 数据库进行比对, 确定最相似的核酸序列, 用 Clustal X 软件比齐, 然后用 MEGA4.0 程序通过邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.3.4 统计学分析 以覆盖率 *C* 来评价所构建的 16S rRNA 基因文库对环境微生物多样性的体现, 公式为: $C=[1-(n/N)] \times 100\%$, 其中 *n* 指文库中只包含一个克隆的 OTU 数, *N* 指文库的克隆总数。并计算其香浓-威纳(Shannon-Wiener)指数(*H*)、辛普森(Simpson)指数(*D*)和均匀度(*J*)等多样性指数(栾鑫等, 2013)。

2 实验结果与分析

2.1 不锈钢表面观察分析结果

2.1.1 扫描电镜观察 经过扫面电镜的观察, 得到全浸海水 1、3、5、7、10、15 天的 SEM 照片(图 1), 结果显示: 不锈钢片在海水中浸泡 1 天后就发现其表面出现细菌附着及圆形附着物形成; 在第 3 天表面的微生物明显增多, 且有细菌胞外絮状物形成; 在

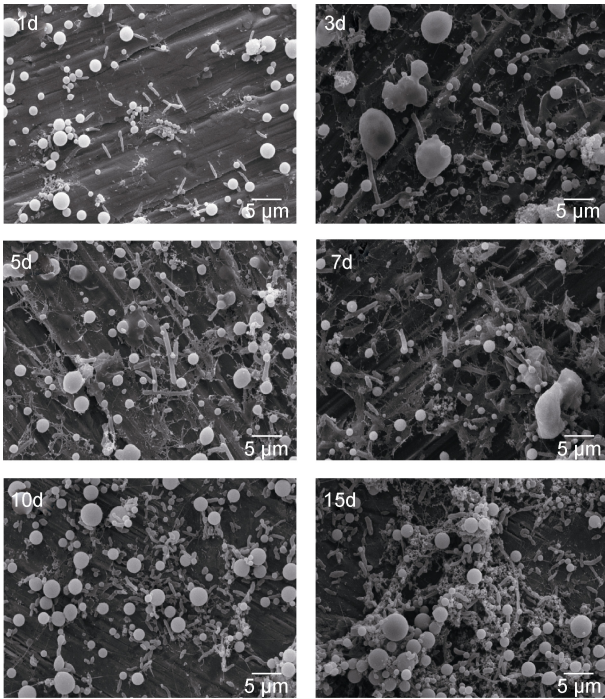


图 1 实海全浸 1、3、5、7、10、15 天的不锈钢挂片 SEM 观察结果(放大 2500 倍)

Fig.1 SEM image of the surface of 316L stainless steel immersed in the seawater for 1d, 3d, 5d, 7d, 10d, and 15d

第 5 天附着的微生物和絮状物继续增多, 但第 7 天和第 5 天比较变化不太明显; 到了第 15 天絮状物厚度进一步增加, 形成比较明显的微生物群落。

2.1.2 荧光显微镜分析结果 为了观察实海全浸 15 天的 316L 不锈钢表面微生物附着情况, 对其进行进行了荧光显微镜观察, 结果如图 2 所示。在不锈钢表面

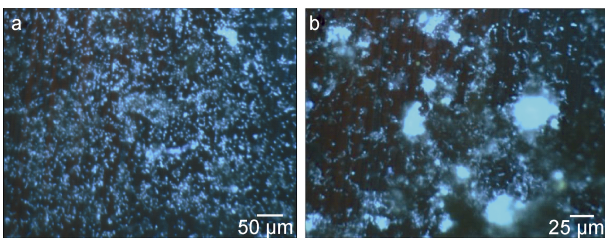


图 2 实海全浸 15 天的不锈钢钢片表面附着微生物的荧光照片

Fig.2 Fluorescence image of 316L stainless steel immersed in the sea for 15 days
a. 放大 200 倍荧光照片; b. 放大 400 倍荧光照片

发现有大量的蓝点(图 2a), 部分位置蓝点极度聚集形成一片蓝色光区(图 2b)。微生物已在不锈钢表面形成较均匀的微生物膜。

2.1.3 X 射线能谱分析结果 为了进一步分析不锈钢表面形成的生物膜, 分别对全浸海水之前和全浸海水之后的 316L 不锈钢片进行了 X 射线能谱分析(EDS), 结果如图 3 所示。将全浸海水前、后 EDS 结果进行对比, 结果如表 1 所示。结果发现, 构成生物体的基本元素 C、O 元素含量明显增高, 并且发现了不锈钢中不存在的 P 元素。另外, 在生物膜中未发现不锈钢中存在的 Mn 元素和 Mo 元素。

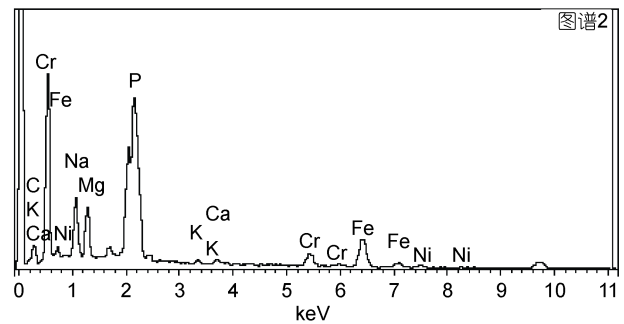
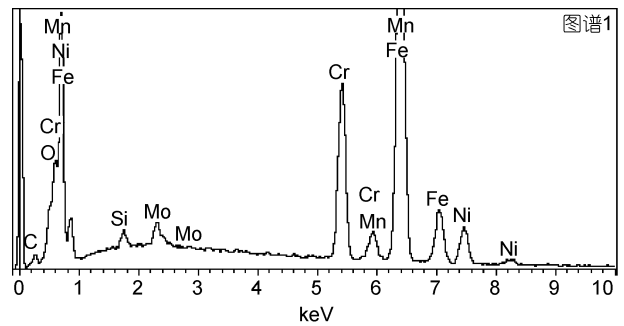


图 3 全浸海水前后的 316L 不锈钢的局部能谱分析图谱
Fig.3 EDS graph of local area of 316L stainless steel before and after seawater immersion

图谱 1 为全浸海水前不锈钢能谱图; 图谱 2 为全浸海水后不锈钢能谱图

2.2 细菌多样性分析结果

从筛选的 96 个克隆子中获得的 RFLP 带型为 47 个, 经测序所得序列经 3% cut off 后得到的 OTU 数为 24, 其样品覆盖率 C 为 88.2%, 香浓-威纳指数 H 为 3.81, 辛普森指数 D 为 0.90, 均匀度 J 为 0.83, 三

表 1 316L 不锈钢基体与表面生物膜成分 EDS 分析结果
Tab.1 Result of EDS analysis of 316L stainless steel with biofilm

	C	P	Cr	Fe	Ni	O	Si	Mn	Mo
	Atomic %	Atomic %	Atomic%	Atomic%	Atomic%	Atomic%	Atomic%	Atomic%	Atomic%
全浸海水前	9.88	—	16.25	60.01	10.11	2.30	1.02	0.76	1.11
全浸海水后	21.50	3.37	1.95	6.52	0.75	50.53	—	—	—

个多样性指数都比较高,说明不锈钢表面具有丰富的细菌多样性。进一步分析细菌 16S rRNA 基因文库的 Rarefaction 稀释度曲线(图 4)也表明当克隆数在渐近于 93 时,稀释度曲线逐渐接近平台期,说明本研究建立的 16S rRNA 基因文库基本能够反映全浸不锈钢中细菌的群落结构。

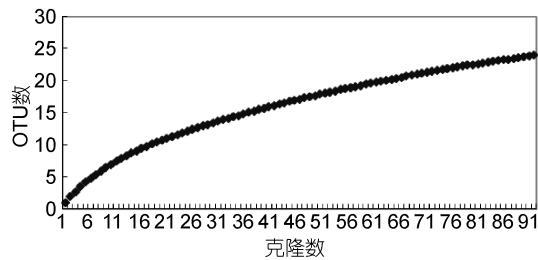


图 4 细菌 16S rRNA 克隆文库稀释度曲线分析
Fig.4 Rarefaction curves of the bacteria 16S rRNA clones libraries

各门克隆数占总克隆数的比例,如图 5 所示。在不锈钢表面占据绝对优势的是 α -变形菌,占到总克隆数的 72.3%,其中占据到绝对优势的单株菌是序列 HSY.CS.25 所代表的红细菌科的一种暂时不可分离菌,占到整个基因文库的 20.4%。同时在不锈表面还有 2.1%的 γ -变形菌,18.1%的 ε -变形菌以及 7.4%的拟杆菌。在整个文库中所占比例超过 10%的菌种还包括: *Thalassobacter*、*Loktanellamaricol* 以及序列 HSY.CS.1 和 38 所代表的暂时不可分离菌,其中前三者所占比例为 10.8%, HSY.CS.38 所占比例为 14.0%。根据所得的 24 个 OTU,构建不锈钢表面附着微生物的系统发育进化树(图 6)。分析发现 α -变形菌(Alphaproteobacteria)占到 18 个 OTU 数, γ -变形菌(Gammaproteobacteria)占到了 1 个,拟杆菌门(Bacteroidetes)占到了 2 个, ε -变形菌(Epsilonproteobacteria)占 3 个。

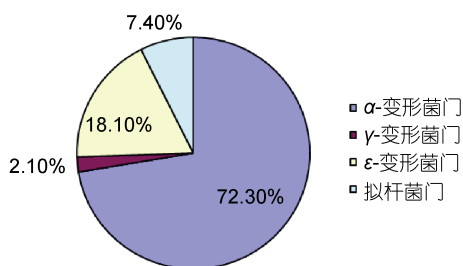


图 5 316L 不锈钢表面附着微生物中各分支菌占总菌数的比例

Fig.5 Composition of clone library of the 316L stainless steel

经过比对, α -变形菌中已知序列有 7 个,分别为 *Thalassobius gelatinovor*, *Pseudoruegeria aquimaris*, *Thalassobacter*, *Phaeobacter arcticus*, *Litoreibacterjanthinus*, *Loktanella maricola*, *Hoeflea alexandrii*。其中前 6 者属于红杆菌目(Rhodobacterale)且均属于红杆菌科(Rhodobacteraceae)。仅有的一种 γ -变形菌为 *Thiomicrospira crunogena*。 ε -变形菌中已知序列仅一种为 *Sulfurospirillum arcachonense*。拟杆菌已知序列有两种,均属于黄杆菌科(Flavobacteriaceae),分别为 *Polaribacter*、*Dokdonia donghaensis*。

3 讨论

3.1 不锈钢表面生物膜的形成

SEM 分析结果表明,随着挂片时间的延长,全浸于海水中的不锈钢片表面细菌数量逐渐增加,并且细菌胞外产物越来越厚,与第 1 天相比,全浸 15 天以后,不锈钢表面细菌大量聚集在一起,并且有大量的细菌胞外物质分布在细菌聚集区周围。另外,不锈钢全浸 15 天以后,经 DAPI 染色,在荧光显微镜下出现了大量蓝点(图 2a),说明不锈钢表面有大量细菌附着,片状蓝色区域(图 2b)的形成,是由于大量细菌聚集在一处造成的。EDS 分析结果发现构成生物体的基本元素 C 元素和 O 元素含量明显增加,同时还有不锈钢基体中不存在的 P 元素存在,进一步说明在不锈钢表面存在大量微生物及其代谢产物。因此,经过 15 天实海全浸挂片,316L 不锈钢表面已经形成了较为丰富的由微生物及其代谢产物组成的生物膜。另外,根据不锈钢 SEM 照片观察,作者发现在不锈钢表面存在着不同形状细菌,因此对 316L 不锈钢表面生物膜进行了进一步的细菌多样性分析。

3.2 细菌多样性分析

根据结果,作者发现,不锈钢表面具有丰富的细菌多样性,其中 α -变形菌门中的红杆菌目为优势菌群。*Thalassobius gelatinovor* 是一种需氧的能动棒状菌,具有氧化酶和过氧化酶活性(Muramatsu *et al*, 2007)。*Phaeobacter arcticus* 是生长在 2%—9%浓度 NaCl 条件下的一种需氧的能动杆状菌,具有过氧化氢酶和细胞色素酶活性(Zhang *et al*, 2008)。*Loktanella maricola* 是一种附着在不锈钢表面的需要低浓度 NaCl 才能生长的非能动杆状菌(Yoon *et al*, 2007)。*Litoreibacter janthinus* 和 *Pseudoruegeria aquimaris* 都是能在 8% NaCl 浓度下生长的异养非能动性杆状需氧菌(Yoon *et al*, 2007; Lyudmila *et al*, 2011)。

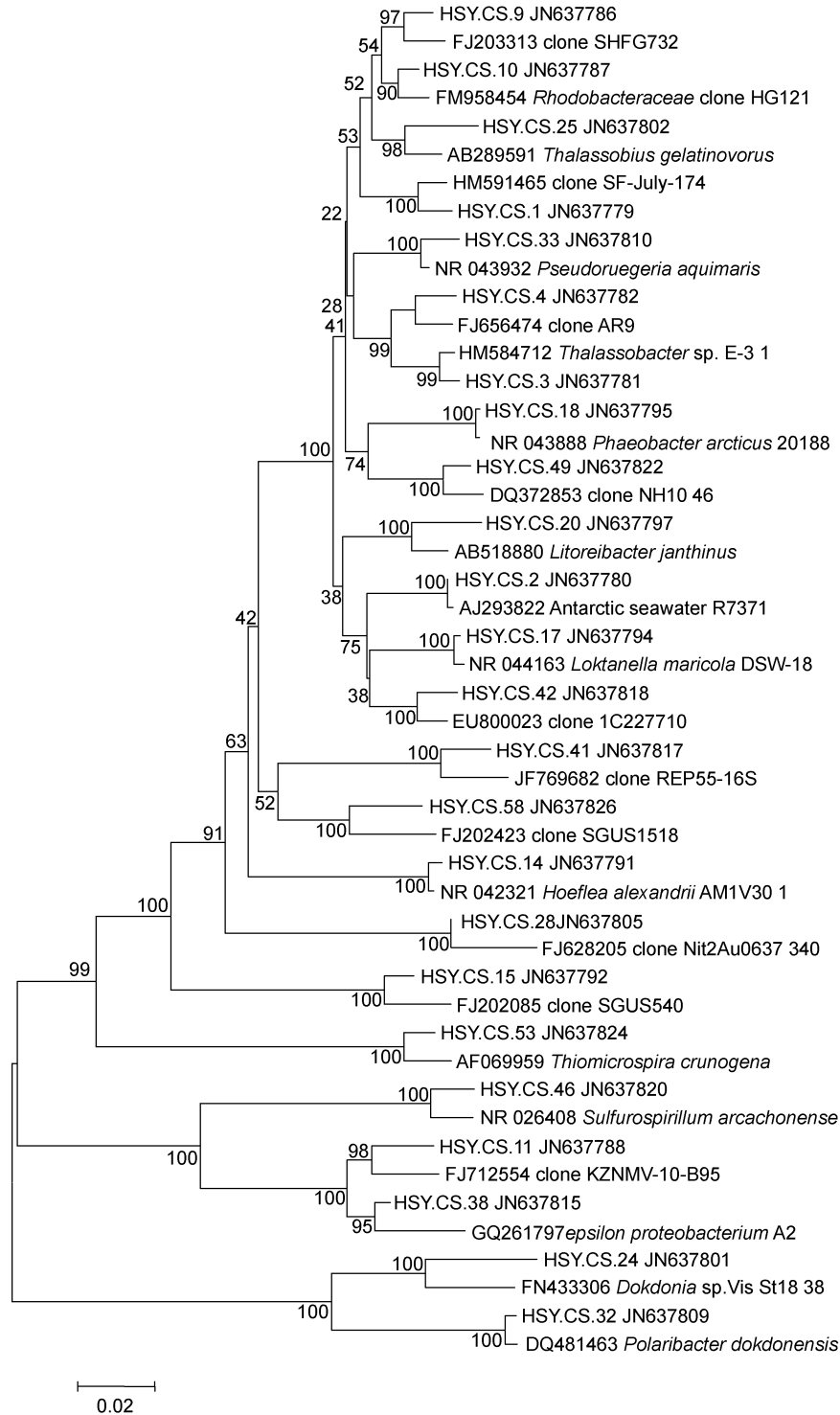


图 6 不锈钢表面细菌系统发育分析

Fig.6 Phylogenetic tree of the bacteria on surface of the stainless steel

在实海全浸初期不锈钢 316L 表面还附着有一种重要的可以加速腐蚀的细菌 *Sulfurospirillum arcachonense*, 这是一种微需氧的具有能动性的硫酸盐还原菌, 是一种典型的金属腐蚀菌, 在无氧条件下可

以利用醋酸盐生成氢和甲酸, 具有氧化酶, 过氧化酶和脲酶活性, 可以以元素硫作为电子受体, 生成 H_2S (Finster *et al*, 1997)。 *Thiomicrospira* 是不锈钢表面存在的一种化能自养细菌, 它是一种能动的杆状菌, 能

降解含硫化合物, 如硫化物、硫代硫酸盐以及元素硫, 作为能量来源。它可以利用不锈钢中的硫元素, 加速不锈钢的腐蚀(Wirsen *et al*, 1998)。

Dokdonia sp.是广泛存在于海洋中的一种没有能动性的微嗜盐的需氧异养菌, 属于黄杆菌科, 它会附着在各种基质的表面进行生长(Laura *et al*, 2007)。*Hoeflea alexandrii* 也是存在于不锈钢表面的一种好氧非共生菌, 可以依靠单极鞭毛运动到达附着基质表面, 具有过氧化酶活性, 不能利用硝酸盐, 但可以消耗生物膜内其他微生物代谢产生的硝酸, 生成吡啶, 可以起到延缓不锈钢腐蚀的作用(Lucia *et al*, 2006)。

通过对已知细菌的分析发现, 不锈钢表面的细菌几乎都是革兰氏阴性菌, 其中 60%以上的细菌具有能动性。作者对全浸海水 15 天不锈钢表面细菌的种类研究发现, 不锈钢表面附着有大量的好氧细菌, 其中包括一种抑制腐蚀的 *Hoeflea alexandrii* 菌, 这些细菌及其代谢产物的出现初步形成了一层生物膜, 从而改变了界面的电化学性质, 起到抑制腐蚀的作用; 然而随着生物膜厚度的增加, 氧气的传递受到阻碍, 因此到达不锈钢介质表面的氧气减少, 结果导致了厌氧细菌, 如 *Sulfurospirillum marcachonense* 的出现, 这些厌氧菌是重要的腐蚀性细菌, 从而会加速不锈钢的腐蚀, 这可能是开路电位发生正移的一个重要原因。不锈钢在天然海水中的耐腐蚀性先变大后变小, 这与刘彬等(2012)研究结果相符。

4 结论

全浸 15 天的 316L 不锈钢表面形成了丰富的由细菌及其代谢产物组成的生物膜, 并且根据 SEM 照片对附着细菌的形状进行初步观察, 可以发现 316L 不锈钢表面附着的细菌种类较多。全浸 15 天的 316L 不锈钢表面生物膜具有丰富的细菌多样性, 优势菌群为红杆菌目, 并且还发现了一株对钢铁有腐蚀作用的硫酸盐还原菌存在。

参 考 文 献

刘 彬, 段继周, 侯保荣, 2012. 天然海水中微生物膜对 316L 不锈钢腐蚀行为的研究. 中国腐蚀与防护学报, 32(1): 48—53

栾 鑫, 段继周, 陈永伟等, 2013. 两种船用防污涂层实海挂片表面细菌群落多样性分析. 应用与环境生物学报, 19(3): 471—477

黄宗国, 2008. 海洋污损生物及其防除(下册). 北京: 海洋出版社, 187—218

Beech I B, Gaylarde C C, 1999. Recent advances in the study of biocorrosion-an overview. *Revista de Microbiologia*, 30: 177—190

Dang H Y, Li T G, Chen M N *et al*, 2008. Cross-ocean distribution of rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1): 52—60

Dickinson W H, Caccavo F, Lewandowski Z, 1996. The ennoblement of stainless steel by manganic oxide biofouling. *Corrosion Science*, 38(8): 1407—1422

Finster K, Liesack W, Tindall B J, 1997. *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4): 1212—1217

Gomez-Consarnaul L, Gonzalez J M, Coll-Llado M, 2007. Light stimulates growth of proteorhodopsin containing marine Flavobacteri. *Nature*, 445: 210—213

Jones P R, Cottrell M T, Kirchman D L *et al*, 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microbial Ecology*, 53: 153—162

Jung-Hoon Y, So-Jung K, Soo-Young L *et al*, 2007. *Loktanella maricola* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1799—1802

Lin W F, Yu Z S, Chen X *et al*, 2013. Molecular characterization of natural biofilms from household taps with different materials: PVC, stainless steel, and cast iron in drinking water distribution system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 8393—8401

Lucia Palacios, David R Arahal, Beatriz Reguera *et al*, 2006. *Hoeflea alexandrii* sp. nov., isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* AL1V. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1991—1995

Lyudmila A R, Naoto T, Galina M F *et al*, 2011. *Litoreibacteralbidus* gen. nov., sp. nov. and *Litoreibacter janthinus* sp. nov., members of the class Alphaproteobacteria isolated from the seashore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 148—154

Motoda S, Suzuki Y, Shinohara T *et al*, 1990. The effect of marine fouling on the ennoblement of electrode potential for stainless steels. *Corrosion Science*, 31: 515—520

Muramatsu Y K, Uchino Y, Kasai H *et al*, 2007. *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the Alphaproteobacteria isolated in Japan and Palau. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1304—1309

Newman R C, Wong W P, Garner A, 1986. A mechanism of microbial pitting in stainless steel. *Corrosion Science*, 42(8): 489—491

Palacios L, David R A, Reguera B *et al*, 2006. *Hoeflea alexandrii* sp. nov., isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* AL1V. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1991—1995

Washizu N, Katada Y, Kodama T, 2004. Role of H₂O₂ in microbially influenced ennoblement of open circuit potentials for type 316L stainless steel in seawater. *Corrosion Science*, 46: 1291—1300

Wirsen C O, Brinkhoff T, 1998. Comparison of a new *Thiomicrospira* strain from the mid-Atlantic ridge with known hydrothermal vent isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 4057—4059

Xu C M, Zhang Y H, Cheng G G *et al*, 2007. Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-

- reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Science and Engineering: A*, 443(1—2), P 235—241
- Xu C M, Zhang Y H, Cheng G G *et al*, 2008. Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Characterization*, 59(3): P245—255
- Yoon J H, Lee S Y, Kang S J *et al*, 2007. *Pseudoruegeria aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 542—547
- Zhang D C, Li H R, Xin Y H *et al*, 2008. *Phaeobacter arcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1384—1387

DIVERSITY OF BACTERIA COMMUNITY OF BIOFILM ON STAINLESS STEEL SURFACE IMMERSED IN SEAWATER

CHEN Yong-Wei^{1,2}, LUAN Xin^{1,2}, DUAN Ji-Zhou², CHI Zhen-Ming¹

(1. *College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*;

2. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*)

Abstract We studied the microbial community and its metabolites of the biofilm on 316L stainless steel after 15d-immersion in seawater by scanning electronic microscope and fluorescence microscope. The EDS (energy dispersive spectroscopy) shows that on the stainless steel surface, it generated a large number of elements C and P, and other basic elements of organisms, and some new elements, such as oxygen, indicating evidence of biofilmformation. We applied 16S rRNA gene clone library technique and PCR-RFLP analysis to generate a comprehensive view of the diversities and compositions of the biofilms. The results show that the number of bacteria OTUs on 316L stainless steel is 24, belonging to Proteobacteria and Bacteroidetes. Among them, the OTU number of α -proteobacteria is 18, accounting for 72.3% of the total number of clones, as a dominant population.

Key words biofilm; 316L stainless steel; bacterial diversity; PCR-RFLP; microbiologically influenced corrosion