

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2018.02.012

培养基对海洋微生物在水泥石表面附着的影响

张凤臣,程沁灵,许 鹏,周建利,王珠银

(河海大学力学与材料学院,江苏 南京 210098)

摘要:为研究培养基类型对海洋微生物在水泥石表面附着的影响,将水泥净浆试件分别浸泡在 3 种不同的模拟海水培养基中 3 h、10 h、24 h,并采用平板菌落计数法和显微分析法研究水泥石表面的微生物附着量。结果表明:水泥石表面附着的微生物主要为革兰氏阴性菌,形态多呈圆棒状;培养基组成不同,微生物在水泥石表面附着量也不同,24 h 的附着过程中存在可逆附着阶段和不可逆附着阶段,每种培养基中水泥石表面 10 h 微生物附着量最低。
关键词:海洋微生物;培养基;水泥石;微生物附着量;平板菌落计数法;显微分析法
中图分类号:TU503 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1980(2018)02-0171-06

Marine microbe adhesion on hardened cement paste surface in different culture medium

ZHANG Fengchen, CHENG Qinling, XU Peng, ZHOU Jianli, WANG Zhuyin
(College of Mechanics and Materials, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: By the plate colon-counting method and scanning electron microscopy, the influence of culture mediums on the marine microbe adhesion of hardened cement paste surface was discussed through immersing the hardened cement paste in three different culture mediums simulating sea water for 3 h, 10 h and 24 h. Results show that the main marine microbe adhered on hardened cement paste surface is the gram-negative bacteria with rodlike shape, and adhesion amounts are different depending on the culture medium. Meanwhile, the 10 h adhesion amount is the lowest among three time points of each culture medium. For hardened cement paste immersed in each culture medium for 24 h, there are reversible adhesion stage and irreversible adhesion stage.
Key words: marine microbe; culture medium; hardened cement paste; microbe adhesion; plate colony-counting method; scanning electron microscopy

海洋经济的兴起必然带动海洋工程的建设与发展。海洋工程所使用的材料中,大宗用量的是钢材和钢筋混凝土。海水中富含多种降低钢筋混凝土耐久性的盐类,同时海洋微生物种类繁多,盐类侵蚀和微生物腐蚀共同作用下,钢筋混凝土结构耐久性问题更为复杂^[1]。

放入海水中 1 h 后,浸海材料表面就会有微生物的附着和有机物质的沉淀,24 h 后微生物在浸海材料表面大量繁殖,并最终形成微生物膜^[2-4]。

目前,关于海洋微生物附着对金属材料的影响已有大量研究,而海洋微生物附着对水泥基材料影响的研究较少,且集中在微生物、微生物膜的存在对水泥基材料性能的影响。一些研究表明,微生物膜会释放表面活性物质,导致离子和水蒸汽等进入水泥内部的方式改变,微生物膜的存在对混凝土起到了保护作用^[5-6]。LYU 等^[7]研究表明,菌株可以在砂浆表面形成致密的微生物膜,并对 Cl⁻ 和 Mg²⁺ 渗透起到抑制作用,同时显著减少了 OH⁻ 的渗漏。刘虎城等^[8]研究发现在微生物膜完全形成后,混凝土碳化速率有所下降,氯离子侵

基金项目: 国家自然科学基金(51109073)
作者简介: 张凤臣(1971—),女,副教授,博士,主要从事水泥基材料耐久性研究。E-mail:fczhang@hhu.edu.cn
引用本文: 张凤臣,程沁灵,许鹏,等. 培养基对海洋微生物在水泥石表面附着的影响[J]. 河海大学学报(自然科学版),2018,46(2):171-176. DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2018.02.012.

蚀减慢,故微生物膜对混凝土碳化和氯离子的侵蚀起到了抑制作用,且有活性微生物膜比失去活性的微生物膜抗渗能力强。谭智军^[9]的研究表明,生物膜具有生物活性时对混凝土抗氯离子渗透影响优于失去活性后,且经碳化检测和微生物种属鉴别表明生物膜中不存在硫氧化、硫还原腐蚀,微生物未对混凝土中性化造成不利影响。

研究表明,微生物在水泥内部穴居并高度繁殖,且部分微生物菌丝能够钻入水泥基材料内部^[10-11],微生物新陈代谢产生的无机酸和有机酸会腐蚀水泥基材料,且在 pH 相同的情况下,生物酸的腐蚀作用强于化学酸^[12-19]。目前,对于微生物在水泥石表面附着的研究多为定性分析,其附着规律、机理仍未阐明,限制了对微生物对水泥石性能的影响和防污措施的研究。因此,笔者将展开对微生物在水泥石表面附着的定量研究以及在实验室条件下,培养基对微生物附着的影响,为微生物对水泥基材料耐久性影响的研究提供一些思路 and 基础。

1 试 验

1.1 水泥净浆试件

采用普通硅酸盐水泥P·O42.5,水灰比为0.4,成型40 mm×40 mm×2 mm 水泥净浆试件,置于温度(20±2)℃、相对湿度95%以上的标准养护条件下养护3 d 取出。

1.2 菌种及培养

取自海南某近海海域的天然海水,pH 为8.03,用海水中获得的微生物作为试验用微生物。以30 g/L 氯化钠、5.0 g/L 酵母提取物、10 g/L 胰蛋白胨、0.8 g/L 氯化钾、1.3 g/L 氯化钙、6.6 g/L 无水硫酸镁配制出①号培养基,用碳酸钠调节培养基 pH 至8.03。②号培养基组成与①号培养基相同,不同的是采用 Tris 缓冲液调节培养基 pH 至8.03。以37.4 g/L 2216E 液体培养基配制③号培养基。以10 g/L 氯化钠、5.0 g/L 酵母提取物、10 g/L 胰蛋白胨配制 LB 液体培养基。称取57.64 g 2216E 固体培养基,加入蒸馏水1 000 mL,灭菌后倒入平皿中,静置至2216E 固体培养基凝固。

1.3 试验过程

培养基及各种试验仪器均采用高压蒸汽灭菌(121℃,20~30 min),然后将培养基静置至室温,将试验仪器放入(70±0.5)℃烘箱中烘干。

由于在70℃以上的环境中,水泥水化产物钙矾石相会分解,因此,水泥净浆试件采用的灭菌步骤是:将试件在75%酒精中浸泡20 min 取出,放入(60±0.5)℃烘箱中至恒重。

当3种模拟海水培养基降温至室温时,进行接菌,接菌量为培养基溶液体积的0.1%。将灭菌后的试件浸泡在3种模拟海水培养基中,均置于20℃环境中,转速为120 r/min。在3 h、10 h、24 h 3个时间点,取出试件。

将试件放入(60±0.5)℃烘箱中烘至恒重,喷金处理后采用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察。

取灭菌水200 mL 于灭菌烧杯中,将取出的试件放入其中漂洗,此操作重复3次。量取50 mL 的LB 液体培养基于灭菌器皿中,用灭菌镊子夹取漂洗后的试件放入器皿中,用灭菌棉签刮取其表面附着的微生物于培养液中,轻晃器皿,使其中的溶液混合均匀。

将试件在漂洗过程中得到的絮状物和试件表面的附着物分别干燥后,用中性树胶封片,置于显微镜下观察。

采用平板菌落计数法(colony forming units, CFU)确定水泥净浆试件上附着的微生物量。用LB 液体培养基,将器皿中的菌液分别稀释10倍、100倍、1 000倍、20 000倍,分别取50 μL 稀释后的菌液置于装有2216E 固体培养基的平皿中,用涂布棒将菌液涂开,将培养皿置于隔水培养箱中,培养24 h 后取出计数。

2 试验结果及讨论

2.1 显微镜观察

图1是油镜下观察到的水泥石表面絮状物和附着物。图1(a)

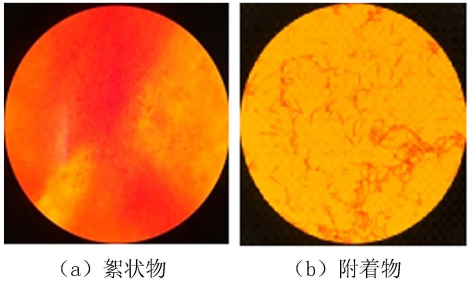


图1 水泥净浆试件表面的微生物
Fig.1 Marine microbe on the cement paste surface

中大面积絮状物是菌丝密集分布、缠绕成团所致,图 1(b)中可见细丝状聚集的微生物。经革兰氏染色后,微生物呈红色,可确定微生物为革兰氏阴性菌。

2.2 SEM 分析

在不同培养基中分别浸泡 3 h、10 h、24 h 后,海洋微生物在水泥净浆试件表面的附着情况见图 2~4。

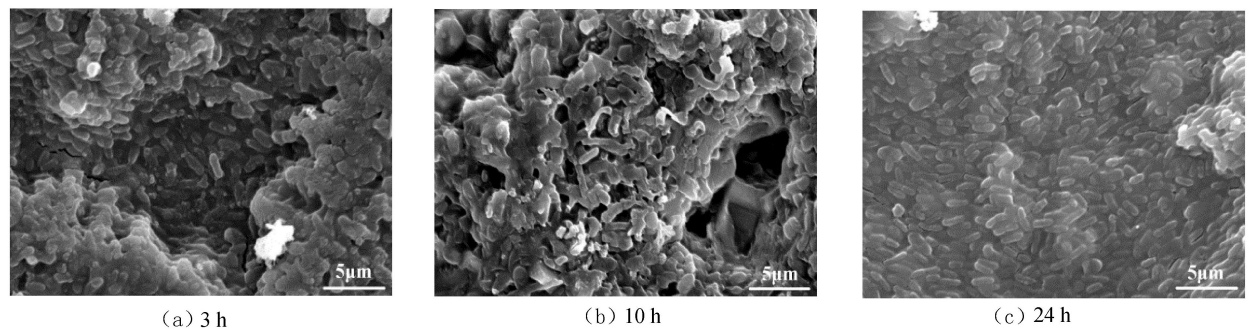


图 2 ①号培养基中水泥净浆试件表面微生物附着

Fig. 2 Marine microbe on the cement paste surface in No. 1 culture medium

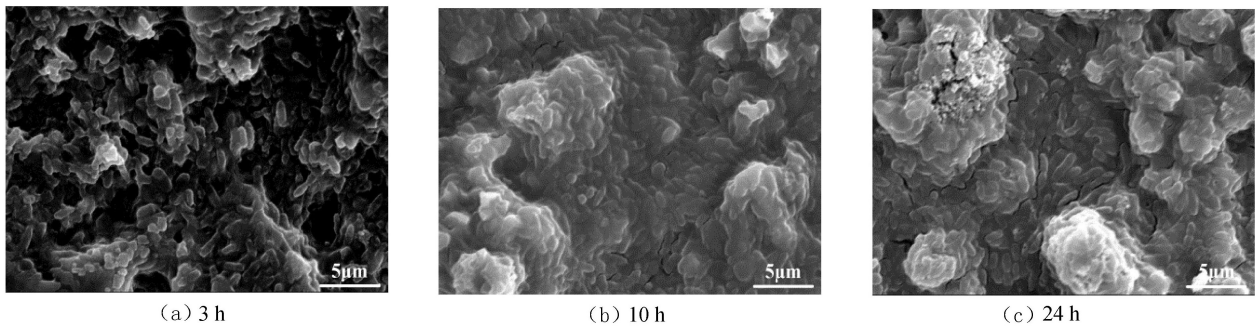


图 3 ②号培养基中水泥净浆试件表面微生物附着

Fig. 3 Marine microbe on the cement paste surface in No. 2 culture medium

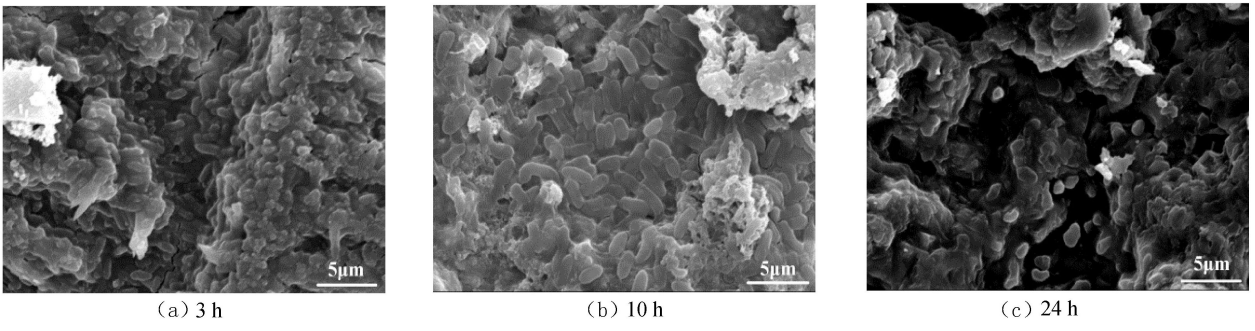


图 4 ③号培养基中水泥净浆试件表面微生物附着

Fig. 4 Marine microbe on the cement paste surface in No. 3 culture medium

从图 2~4 可以看到,微生物主要呈短圆棒状,少数呈长圆棒状,说明此混合菌群在水泥净浆试件表面附着的优势菌种为短棒状。随着在 3 种培养基中浸泡时间的延长,微生物在试件表面的聚集程度增大;3 h 后,微生物主要在水泥净浆试件表面凹处附着,分布在孔隙边缘;10 h 后,微生物在凹处的附着量增多,聚集成膜;24 h 后,附着在表面凹处的微生物覆盖住基材。

由于水泥净浆试件表面状态并不均匀一致,因此微生物在水泥石表面的附着呈现不均匀的变化,不能根据 SEM 图中的微生物附着量判断水泥石表面的微生物附着量。

2.3 微生物附着量

以②号培养基中水泥净浆试件表面附着微生物平皿为例(图 5),水泥净浆试件的浸泡时间为 3 h、10 h 和 24 h,②-10、②-100、②-1 000、②-20 000 分别表示②号培养基中的水泥净浆试件表面的微生物稀释倍数为 10 倍、100 倍、1 000 倍、20 000 倍。将待测样品适当稀释后,取适量稀释液涂于平皿中,其中的微生物被充分

分散成单个细胞,经过培养,单个细胞成长为一个菌落,图5中,平皿上的一个白点代表一个菌落。菌落是由最初的单个微生物通过生长繁殖成数以万计的相同的微生物集合而成,即一个单菌落代表原溶液中的一个微生物,根据平皿中的菌落数和溶液的稀释倍数,即可得出水泥净浆试件表面附着的微生物数量。采用多个稀释倍数,是为了准确地测出微生物在试件表面的附着量。考虑到3h、10h的附着量可能会较少,24h的附着量可能会较多,因此,将浸泡3h、10h后的试件表面微生物稀释10倍、100倍、1000倍,将浸泡24h后的试件表面微生物稀释100倍、1000倍、20000倍。

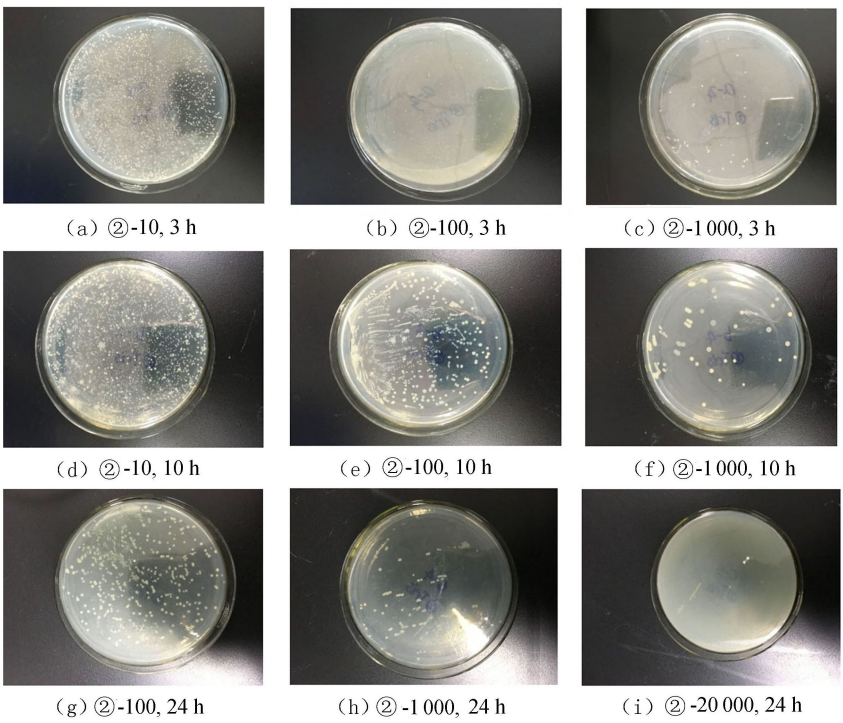


图5 ②号培养基中水泥净浆试件表面附着微生物平皿

Fig. 5 Colony counting plate of marine microbe on the cement paste surface in No.2 culture medium

图5表明,浸泡3h、10h后的试件表面微生物稀释10倍后,微生物菌落密集,甚至部分菌落相连,难以确定菌落数量;而将浸泡24h后的试件表面微生物稀释20000倍后,菌落个数过少,会增大计数误差。

浸泡在3种不同培养基中,微生物在水泥净浆试件表面的附着量随时间的变化如图6所示。

在每种培养基中,微生物附着量均出现了下降趋势,10h微生物附着量均低于3h、24h附着量。由此可见,在每种培养基中,10h前后微生物的附着是可逆附着阶段,由于微生物在水流等的外力作用或其自身作用下,附着在水泥石表面的微生物脱落,导致微生物附着量减少。进入不可逆附着阶段后,只有在水泥石表面附着牢固的微生物才能继续繁殖生长,微生物的附着量又开始缓慢增长。

在初始阶段,不同培养基中,水泥石表面3h微生物附着量比较结果是:③号培养基>①号培养基>②号培养基;进入可逆附着阶段后,水泥石表面10h微生物附着量:③号培养基>②号培养基>①号培养基,①号、②号培养基中水泥石表面10h微生物附着量较为接近;不可逆附着阶段,水泥石表面24h微生物附着量:②号培养基>③号培养基>①号培养基。

①②号培养基组成相同,初始pH相同,只有调节pH不同,但其对微生物附着的影响仍然存在明显差异,说明海洋混合菌群在水泥石表面的附着对培养基组成相当敏感。天然海水实测pH为8.03,③号培养基pH为 7.6 ± 0.2 ,早期可逆附着阶段,低pH③号培养基有利于微生物在水泥石表面的附着,后期不可逆附着阶段,③号培养基已无此优势。3种培养基,只有②号培养基中,水泥石表面24h微生物附着量大于3h附着

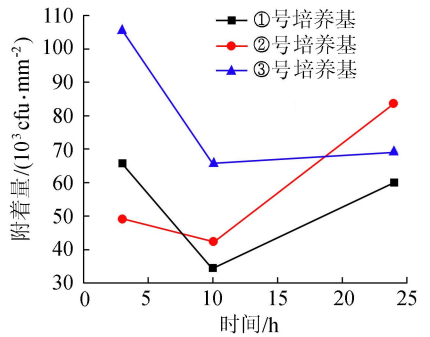


图6 微生物附着量

Fig. 6 Marine microbe adhesion amounts

量,说明在后期的生长与附着中,②号培养基有利于微生物的附着和生长。

3 结 论

a. 在不同培养基中,附着在水泥石表面的海洋微生物主要是革兰氏阴性菌,优势菌种呈短棒状,初始附着在水泥石凹处、孔隙边缘。

b. 培养基对海洋菌群的附着过程没有影响,海洋混合菌群在水泥石表面 24 h 附着均可分为可逆附着阶段和不可逆附着阶段,可逆附着阶段附着在水泥石表面的微生物会脱落,进入不可逆附着阶段后,水泥石表面微生物附着量随时间逐渐增加。

c. 水泥石表面海洋混合菌群的附着量对培养基组成、pH 均相当敏感。不可逆附着阶段,采用 Tris 缓冲液调节 pH 与海水相同的培养基中,水泥石表面 24 h 混合菌群附着量最高;其次是低 pH 的 2216E 液体培养基;附着量最低的是采用碳酸钠调节 pH 的培养基。

参考文献:

- [1] 韩恩厚,陈建敏,宿彦京,等. 海洋工程结构与船舶的腐蚀防护:现状与趋势[J]. 中国材料进展,2014(2):65-76,113. (HAN Enhou, CHEN Jianmin, SU Yanjing, et al. Marine engineering structure and ship corrosion protection: status and trend [J]. Materials China,2014(2):65-76,113. (in Chinese))
- [2] MABBOUX F, PONSONNET L, MORRIER J J, et al. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials:an in vitro study[J]. Colloids & Surfaces B:Biointerfaces, 2004, 39(4):199-205.
- [3] JR R F B. A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings[J]. Progress in Organic Coatings, 2001, 43(1/2/3):188-192.
- [4] 张明明, 赵文, 于世超. 我国海洋污损生物的研究概况[J]. 水产科学, 2008, 27(10):545-549. (ZHANG Mingming, ZHAO Wen, YU Shichao. Research overview of marine pollution damage in China[J]. Fisheries Science,2008,27(10):545-549. (in Chinese))
- [5] KIRCHMAN D, MITCHELL R. A biochemical mechanism for marine biofouling[J]. Oceans, 1981, 13: 537-541.
- [6] 吕建福,巴恒静,谭忆秋. 海洋黏细菌对砂浆渗透性和微观结构影响[J]. 建筑材料学报,2013,16(4):694-698. (LYU Jianfu, BA Hengjing, TAN Yiqiu. Effect of marine mucus bacterium on permeability and microstructure of mortar[J]. Journal of Building Materials, 2013,16(4):694-698. (in Chinese))
- [7] LYU Jianfu, MAO Jize, BA Hengjing. Influence of marine microorganisms on the permeability and microstructure of mortar[J]. Construction and Building Materials,2015,77:33-40.
- [8] 刘虎城,李猛,徐学斌,等. 海洋生物膜对混凝土耐久性影响[J]. 四川理工学院学报,2015,28(2):74-77. (LIU Hucheng, LI Meng, XU Xuebin, et al. The effect of marine biofilms on concrete durability[J]. Journal of Sichuan University of Science and Engineering,2015,28(2):74-77. (in Chinese))
- [9] 谭智军. 海洋生物膜对海洋混凝土抗氯离子渗透性的影响[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2008.
- [10] HIRSCH P, ECKHARDT F E, PALMER R J. Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms: a mini review[J]. International Biodeterioration and Biodegradation,1995,23(2):143-167.
- [11] HUGHES P, Fairhurst D, Sherrington I, et al. Microscopic study into biodeterioration of marine concrete[J]. International Biodeterioration and Biodegradation,2013,79:14-19.
- [12] ROBERTSD J, NICA D, ZUO G, et al. Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies [J]. International Biodeterioration and Biodegradation,2002,49(4):227-234.
- [13] GAYLARDE C, RIBAS S M, WARSCHER D T. Microbial impact on building materials: an overview[J]. Materials and Structures,2003,36(5):342-352.
- [14] WARSCHER D T, BRAAMS J. Biodeterioration of stone: a review[J]. International Biodeterioration and Biodegradation,2000, 46(4):343-368.
- [15] BREHM U, GORBUSHINA A, MOTTERSHEAD D. The role of microorganisms and biofilms in the breakdown and dissolution of quartz and glass[J]. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology,2005,219(1/2):117-129.
- [16] 张玉宝,高彦国. 微生物在大黑汀大坝坝基中的腐蚀作用[J]. 海河水利,2000(6):15-16. (ZHANG Yubao, GAO Yanguo. The corrosion of microorganisms in the dam foundation of large black ting dam[J]. Haihe Water Resources,2000(6):15-16. (in Chinese))

[17] 段继周,侯保荣. 海洋工程设施生物腐蚀、污损和防护技术研究进展[J]. 公路交通科技,2010,27(增刊1):118-121.
(DUAN Jizhou, HOU Baorong. Progress in research on biological corrosion, pollution and protection of marine engineering facilities[J]. Journal of Highway and Transportation Research and Development,2010,27(Sup1):118-121. (in Chinese))

[18] 王甲春,阎培渝. 海洋混凝土污损生物腐蚀机理的研究进展[J]. 混凝土,2009(10):24-26. (WANG Jiachun, YAN Peiyu. Literature review of corrosion mechanism of marine fouling organisms of concrete [J]. Concrete, 2009 (10): 24-26. (in Chinese))

[19] 马士德,王在东,赵杰,等. 海洋污损生物对海工混凝土工程腐蚀性分析[J]. 广西科学院学报,2015,31(3):209-213.
(MA Shide, WANG Zaidong, ZHAO Jie, et al. Effects of fouling organisms on the corrosion of marine concrete[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences,2015,31(3):209-213. (in Chinese))

(收稿日期:2017-09-14 编辑:刘晓艳)

.....

· 简讯 ·

河海大学获 2 项 2017 年度高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)一等奖

2018 年 2 月 11 日,教育部公布了 2017 年度高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)获奖项目。我校王沛芳教授主持的“农田退水系统有机农药高效降解关键技术及应用”获技术发明奖一等奖,高玉峰教授主持的“河谷场地土坝地震灾变理论与抗震加固技术”成果获科技进步奖一等奖。

“农田退水系统有机农药高效降解关键技术及应用”项目从提高农田退水系统中有机农药降解净化能力入手,研发了高效降解水体农药的新材料、新方法、新工艺和新产品,发明了多孔载体成形、纳米材料镀膜光催化、土著微生物驯化附着等核心技术,获得了农田退水沟河湿地系统有机农药高效降解去除的整装成套装备和产品。

“河谷场地土坝地震灾变理论与抗震加固技术”项目得出不同形态、不同介质河谷场地地震动传播的解析解,形成了河谷场地地震波传播理论,揭示了河谷场地地震动放大效应;建立了河谷场地非一致地震作用下坝坡稳定性分析方法与土坝液化分析方法,揭示了河谷场地土坝地震滑坡及液化机理;提出了病险土坝抗震加固设计方法及抗震加固技术。

(本刊编辑部供稿)

.....

2018(第六届)中国水利信息化技术论坛将在深圳召开

由河海大学主办的 2018(第六届)中国水利信息化技术论坛将于 2018 年 4 月 14—15 日在深圳召开。论坛旨在提升运用新技术对海量水信息进行挖掘、分析和管理的能 力,提高水资源管理水平。论坛主题为智慧水利:创新与发展,主要内容为探讨全面加强信息化管理、积极推进新技术应用,促使产学研研究深度融合,搭建行业合作与交流平 台,积极促进多方资源对接和深度合作,助力“互联网+”现代智慧水利建设。

会议电子文件请浏览网站:www.sinowbs.com

(本刊编辑部供稿)