

# 原子力显微镜在微生物腐蚀研究中的应用

苑维双<sup>1</sup>, 李进<sup>1</sup>, 张飒<sup>2</sup>, 杜一立<sup>1</sup>

(1. 北京交通大学土木建筑工程学院, 北京 100044; 2. 军事医学科学院仪器测试中心, 北京 100850)

**[摘要]** 利用原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM) 研究硫酸盐还原菌 (Sulfate Reducing Bacteria, SRB)、微生物膜和腐蚀前后铜合金材料 BFe30-1-1 的表面形貌, 得到了高分辨率的表面形貌图, 测得 SRB 的大小、点蚀坑的深度和直径, 分析了腐蚀后 BFe30-1-1 的表面粗糙度参数。结合电化学参数说明, 浸蚀 14d 的铜合金表面形成了不均匀的微生物膜, 加速了试片表面的局部腐蚀。AFM 作为一种具有纳米级分辨成像能力的工具, 是观察材料的表面特征和腐蚀形貌及测量材料表面纳米粗糙度的理想仪器。

**[关键词]** 原子力显微镜; 硫酸盐还原菌; 微生物膜; 腐蚀

**[中图分类号]** TG115.21; TG172.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1001-3660(2007)06-0030-03

## Applications of Atomic Force Microscopy to Microbiologically Induced Corrosion

YUAN Wei-shuang<sup>1</sup>, LI Jin<sup>1</sup>, ZHANG Sa<sup>2</sup>, DU Yi-li<sup>1</sup>

(1. School of Civil Engineering and Architecture, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China;

2. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

**[Abstract]** Atomic force microscopy (AFM) was applied to obtain high-resolution topographical images of sulfate-reducing bacteria, and to observe the biofilms developed on the BFe30-1-1 copper alloy. The use of AFM image analysis software allowed estimation of the width and height of bacterial cells, and the characterization of the surface roughness of the copper alloy, including measurements of depth and diameter of individual pits. Following the removal of biofilms, the copper alloy surfaces were profiled using AFM to determine the degree of copper alloy deterioration.

**[Key words]** Atomic force microscopy; Sulfate-reducing bacteria; Biofilm; Corrosion

## 0 引言

在电力行业循环冷却水系统中, 微生物腐蚀 (Microbiologically Induced Corrosion, MIC) 引起极大的关注。MIC 是指由微生物引发或加速的腐蚀, 是通过微生物膜作用而引起的。在发电厂冷却水介质中, 细菌和微生物可以在凝汽器管材的表面形成一层由细菌及其代谢产物组成的微生物膜。当金属管材表面存在微生物膜时, 金属表面/微生物膜界面的 pH 值、溶解氧的浓度、有机和无机物的种类及其浓度都大大有别于本底溶液。微生物生命活动的结果间接地对金属腐蚀的电化学过程产生影响, 促使腐蚀增加, 其关键就在于金属表面微生物膜内的微生物及其与金属基体间的相互作用<sup>[1-2]</sup>。普通的电化学方法虽然能研究微生物腐蚀的详细过程及其腐蚀机理, 监测微生物腐蚀的发生和发展, 但它不能很好地表征微生物膜的形成和发展、材料的表面特征和腐蚀形貌等<sup>[3]</sup>。

原子力显微镜作为一种新型的分析技术, 为微生物膜的研究提供了良好的手段, 它可以分析表面的纳米数量级结构<sup>[4-5]</sup>, 具有独特的高分辨率成像能力, 能观察到腐蚀表面的微观形貌及细微变化, 并且被观察样品不受样品导电性限制, 可在各种环

境条件下成像, 在生物医学<sup>[6-7]</sup>、纳米材料及表面科学<sup>[5]</sup>等领域都具有广泛的应用。利用 AFM, 可以观察 SRB 在不锈钢表面形成的微生物膜, 测量细菌细胞的宽度、高度及细菌鞭毛和胞外聚合物膜的厚度, 同时还可以鉴别基底的表面粗糙度, 了解腐蚀裂隙的宽度和直径等<sup>[8]</sup>。Bremer Philip J 等<sup>[9]</sup>利用 AFM 观察铜表面形成的微生物膜, 发现细菌与铜表面的点蚀密切相关。通过 AFM 探测力-距离曲线来分析和比较细菌在固体表面动态和静态粘附时侧向和垂直向相互作用力, 发现细菌分泌的细菌胞外聚合物和鞭毛结构在粘附过程和微生物膜形成中均具有重要作用<sup>[10]</sup>。因此, 利用 AFM 观察细菌吸附到固体表面形成微生物膜的过程, 并结合电化学研究能够更好地说明微生物腐蚀的各种因素的影响。

在自然水环境中, SRB 引起 MIC 最为普遍, 占腐蚀的 20% 左右<sup>[11]</sup>。为研究 SRB 对发电厂凝汽器管材的腐蚀, 本文利用 AFM 观察 SRB 在凝汽器管材铜合金 BFe30-1-1 表面吸附形成微生物膜的特性, 以及 BFe30-1-1 表面局部腐蚀的形貌; 并利用 AFM 分析软件对图像进行量化分析, 得到试片表面的粗糙度参数。

## 1 试验方法

### 1.1 细菌、培养基及培养条件

本试验菌种取自某火电厂冷却塔塔底粘泥, 分离富集纯化

**[收稿日期]** 2007-09-16

**[作者简介]** 苑维双 (1981-), 女, 山东招远人, 在读研究生, 研究方向: 循环冷却水处理。

之后用于试验。培养基采用 Postgate C 培养基<sup>[12]</sup>。其组成为: 0.5g/L  $K_2HPO_4$ 、1.0g/L  $NH_4Cl$ 、2.26g/L  $Na_2SO_4$ 、0.1g/L  $CaCl_2$ 、2.0g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、20g/L  $NaCl$ 、0.1g/L 维生素 C、5.0mL/L 乳酸钠、1.0mL/L 酵母浸汁;用 HCl 和 NaOH(0.05mol/L)调节 pH 至 7.3,在 0.14MPa 灭菌锅中消毒 20min,冷却后加入经紫外线消毒的维生素 C,在  $(37 \pm 1)^\circ C$  下恒温培养。

## 1.2 试片及电极的制备

试验材料采用 BFe30-1-1 凝汽器铜管。BFe30-1-1 的主要成分(质量分数)为:29% ~ 33% Ni、1.2% Mn、0.9% Fe, Cu 为余量。

将铜管加工成面积为  $1cm^2$  的圆片,制成试片及电极。使用水砂纸将试片及电极进行逐级打磨,试片采用  $2\mu m$  和  $1\mu m$  的金刚石研磨膏抛光,用丙酮和无水乙醇擦洗清洁。将处理完毕的试片浸入接种 SRB 的培养基中,于不同的时间从培养基中取出试片,无菌蒸馏水轻轻冲洗后,在  $4^\circ C$  下用 2.5% 戊二醛固定试片表面的 SRB 细胞 2h,再先后用磷酸盐缓冲溶液和无菌水轻轻冲洗试片表面,观察试片表面的生物膜。按照 GB/T 16545-1996<sup>[13]</sup>规定的方法除去试片表面的腐蚀产物后,观察试片表面的腐蚀状况。电极用丙酮和无水乙醇擦洗清洁后用于电化学测试。

## 1.3 原子力显微镜测量方法

试验采用日本岛津(SHIMADZU)公司的 SPM-9500J3 型原子力显微镜。

把试片置于原子力显微镜的样品室内,用 SPM-online 2.45 软件控制,进行接触式(Contact Mode)连续扫描。微悬臂由氮化硅( $Si_3N_4$ )制成,弹性系数为 0.16N/m,水平最大扫描范围为  $125\mu m \times 125\mu m$ ,扫描频率为 0.5Hz。所得图像参数应用 SPM-offline2.2 软件进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 试片表面的微生物膜形貌

浸蚀前经过抛光的试片表面较为平滑,其 AFM 图像如图 1 所示。材料的表面状况在早期微生物膜形成中起关键性作用,它影响到细菌吸附速度及微生物在材料表面的分布<sup>[14]</sup>。细菌的吸附受重力影响,重力易达到平衡的位置,细菌优先吸附,如金属表面较粗糙的部位。因此,材料的表面粗糙度对细菌粘附到金属表面及后续的生物膜发展都有重要影响<sup>[15]</sup>。

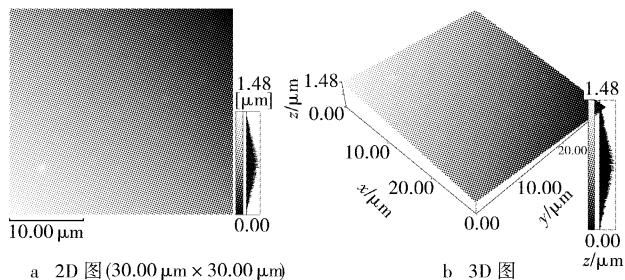


图1 浸蚀前抛光过的试片表面 2D 图和 3D 图  
Figure 1 AFM images of 2-D display and 3-D display of polished test plate before immersing

在培养基中分别浸蚀 3d 的试片表面,可以发现有个别的 SRB,如图 2 所示。从图 2 中可以看到 SRB 形貌清晰可见,其长约  $1.6\mu m$ 、宽约  $0.6\mu m$ 、高约  $0.6\mu m$ 。细胞表面有明显的胞外聚合物(Extracellular Polymer Substance, EPS)分布,利用傅立叶红外光谱分析可知,其主要成分为多糖及蛋白质类物质。EPS 的一个重要性质就是它具有与金属离子络合的能力<sup>[16]</sup>,这对于 MIC 非常重要。EPS 中的阴离子官能团(例如:—NH、—COOH、—OH等)能够与金属离子络合,形成 EPS 与金属的络合物( $EPS-Me^{n+}$ )<sup>[17]</sup>,金属原子可能会从晶体点阵中溶解,导致结构的弱化,从而加速阳极反应,导致点蚀。

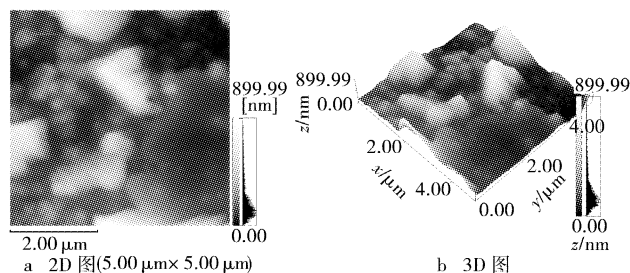


图2 浸蚀 3d 的试片表面生物膜 2D 图和 3D 图  
Figure 2 AFM images of the biofilm on the sample surface immersed in the culture medium for 3d in 2-D display and 3-D display

SRB 不断从培养基中摄取营养物质,通过 EPS 使得细菌结合在一起形成菌落,开始在试片表面形成微生物膜,如图 3 所示。此后,细菌不断聚集吸附在试片表面,微生物膜持续生长直至覆盖整个试片。微生物膜在金属材料表面的分布及其本身结构的不均匀性、腐蚀产物的局部堆积等导致形成富氧区和贫氧区,形成氧浓差电池,造成孔蚀和缝隙腐蚀<sup>[18]</sup>。

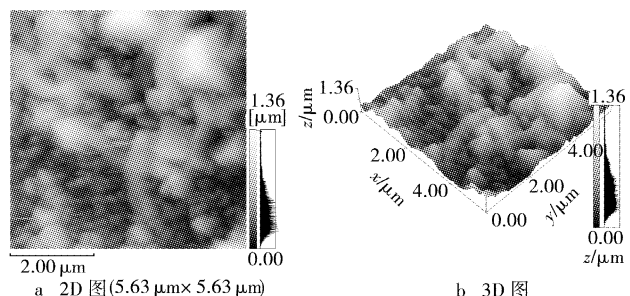


图3 浸蚀 14d 的试片表面生物膜 2D 图和 3D 图  
Figure 3 AFM images of the biofilm on the sample surface immersed in the culture medium for 14d in 2-D display and 3-D display

### 2.2 腐蚀后试片的表面形貌及其量化分析

清除试片表面的腐蚀产物后,AFM 观察的试片表面形貌如图 4 所示。浸蚀 3d 时,试片腐蚀较轻,开始出现小蚀坑,整个表面呈现出均匀腐蚀状态;浸蚀 14d 的试片表面凹凸不平,蚀坑深度增加,面积增大,更为明显。利用 SPM-offline2.2 软件得到图像的截面结构如图 4c、图 4d 所示。浸蚀 3d 的试片表面产生的蚀坑直径为  $0.51\mu m$ ,其深度为  $0.30\mu m$ ;浸蚀 14d 的试片表面蚀坑直径为  $3.68\mu m$ ,其深度为  $1.34\mu m$ 。可见随浸泡时间的延长,试片表面蚀坑的直径和深度均有显著增加。

利用 SPM-offline2.2 软件对图 4a、图 4b 进行量化分析,可得到其表面粗糙度参数值,如表 1 所示。表中各个参数所代表

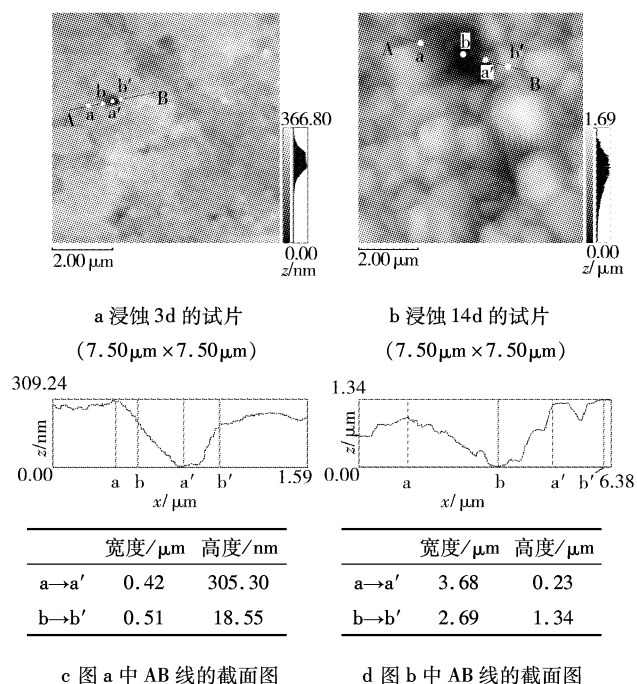


图4 浸蚀3d及14d的试片表面清除腐蚀产物后AFM图像和截面图  
Figure 4 AFM images of corroded sample surface immersed in the culture medium for 3d(a) and 14d(b) after removal of SRB biofilm (c) Section profile along line AB in (a); (d) Section profile along line AB in (b)  
的意义如下:  $R_a$  为轮廓算术平均偏差, 即试片表面各点相对于零平面的高度数值绝对值的算术平均值,  $R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_i|$ ;  $RMS$  为均方根粗糙度 (Root Mean Square,  $RMS$ ), 即试片表面各点相对于零平面的高度数值的均方根,  $RMS = \sqrt{\sum_{i=1}^N Z_i^2 / N}$ ;  $R_z$  为微观不平度十点高度, 即试片表面最高的5个峰点与最低的5个谷点相对于平均高度平面偏差的平均值;  $R_y$  为轮廓最大高度, 即试片表面峰顶线与谷底线之间的距离。上述参数能够从不同方面反应试片表面的粗糙程度<sup>[19]</sup>。

表1 清除腐蚀产物后试片表面粗糙度比较

Table 1 Roughness comparison of the sample surface without biofilm

浸蚀时间/d	$R_a$ /nm	$RMS$ /nm	$R_z$ /nm	$R_y$ /nm
3	27.60	34.99	137.8	366.5
14	269.4	338.0	661.7	1743

由表1可以看出, 面积为  $56.25 \mu\text{m}^2$  的试片, 浸蚀14d的表面粗糙度明显大于浸蚀3d的, 即浸蚀14d的试片腐蚀效果更为明显。

### 2.3 SRB生长对铜合金电化学特性的影响

从电化学参数的变化来看, 浸泡前3天, BFe30-1-1铜合金的自腐蚀电位大幅度下降, 同时极化电阻也迅速下降, 如图5所示。此时SRB处于对数生长阶段, SRB菌量呈指数增长, 代谢旺盛, 产生大量的代谢产物 ( $\text{H}_2\text{S}$  或  $\text{S}^{2-}$ 、有机酸等), 使电极表面局部区域pH降低很多。电极表面的酸化, 对氧化膜保护层产生破坏, 造成合金表面局部腐蚀, 引起自腐蚀电位快速负移, 极化电阻迅速下降。随着浸泡时间的延长, 铜合金表面微生物膜逐渐形成, 由于存在传质阻力, 吸附在金属表面的细菌很难得到溶液中硫酸盐和其它基质供给, 阳极位的细菌活性下降; 同时

由于微生物膜的阻挡作用, 去极化剂  $\text{H}_2\text{S}$  的供给也变得困难, 阴极过程受到抑制, 最终引起腐蚀速率降低<sup>[20]</sup>, 体现为铜合金电极的自腐蚀电位和极化电阻均呈缓慢下降趋势。但由于微生物膜中代谢产物的富集, 铜合金表面腐蚀仍不断进行, 因此浸蚀14d试片表面的蚀坑明显大于浸蚀3d的试片。

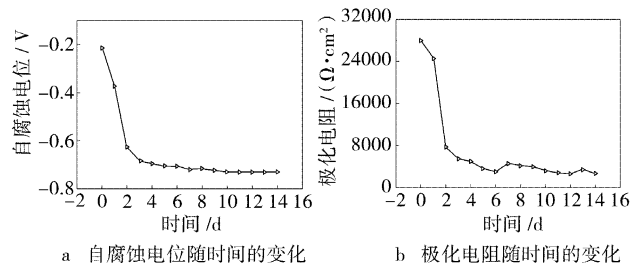


图5 铜合金电极自腐蚀电位和极化电阻随时间的变化

Figure 5 Corrosion potential and polarization resistance of copper alloys in the SRB inoculated culture medium

## 3 结论

1) AFM是研究微生物腐蚀的有力工具, 它不仅能够获得高精度的清晰的表面形貌, 还能够对得到的图像进行量化分析, 能够从微观角度研究微生物腐蚀。

2) 利用AFM可以观察到SRB及其微生物膜的表面形貌, 其三维图像可以直观地了解其微观结构。浸蚀14d的试片表面形成不均匀的微生物膜, 加剧了试片的腐蚀。

3) 对AFM图像的量化分析可以获取有关试片表面的粗糙度参数。去除微生物膜以后, 浸蚀3d的试片的表面粗糙度为  $34.99 \text{ nm}$  (以  $RMS$  计), 浸蚀14d的试片为  $338.0 \text{ nm}$ , 后者明显大于前者。

4) 浸泡前3d, BFe30-1-1铜合金的自腐蚀电位大幅度下降, 同时极化电阻也迅速下降。随着浸泡时间的延长, 其自腐蚀电位和极化电阻均呈缓慢下降趋势。

## [参考文献]

- [1] Jones D A, Amy P S. A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion [J]. Corrosion, 2002, 58(8): 638-645
- [2] Reza, Favaherdashti. Review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: past, present and future [J]. Anti-Corrosion Methods and Materials, 1999, 46(3): 173-180
- [3] Mansfeld F, Little B. A technical review of electrochemical techniques applied to microbiologically influenced corrosion [J]. Corrosion Science, 1991, 32(3): 247-272
- [4] Binning G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope [J]. Phys. Rev. Lett., 1986, 56(9): 930-933
- [5] 白春礼, 林璋. 扫描探针显微镜在材料表面纳米级结构研究中的新进展[J]. 物理, 1999, 28(1): 27-30
- [6] 王莉娟, 张英鸽, 张飒, 等. 原子力显微镜对生理溶液中活细胞成像条件的研究[J]. 电子显微学报, 2005, 24(1): 79-84
- [7] 张德添, 张飒, 何昆, 等. 原子力显微镜在生物医学中的应用[J].

(下转第35页)

40min 后进入稳定磨损阶段,相对减重量增加得很小,130min 后磨损失重为 34mg 左右。而涂层试样由于表面硬度高,且层状结构使得涂层有良好的结合力,磨损减重量很小,磨损时,经很短时间即进入稳定磨损阶段,随磨损时间延长,磨损失重也未见明显增加。130min 磨损后,减重仅为 2.6mg,抗磨损能力提高了 13 倍。

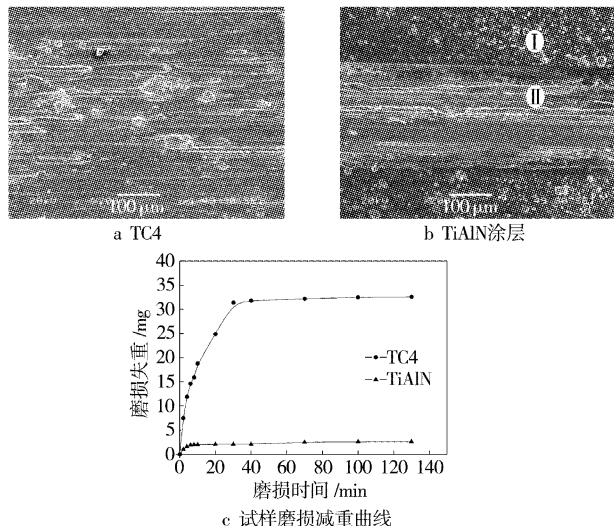


图3 试样磨痕微观形貌及磨损减重曲线

Figure 3 The microstructure of the grinding crack and the curve of wear-out.

### 3 结论

1) 采用独立 Ti、Al 靶,在 TC4 钛合金试样表面制备了 TiAlN 涂层,总厚度大约为 6.5 $\mu\text{m}$ ,涂层组织均匀, Ti、Al 元素在涂层内呈梯度分布,涂层表面 Ti、Al 原子比为 0.93:1。

2) 电弧离子镀 TiAlN 涂层后,涂层表面存在粒子撞击时产

生的凹坑和液滴碰撞表面而铺平、凝固形成的层片状组织。涂层表面粗糙度有升高的趋势,本试验中试样的表面粗糙度  $R_a$  值由原始的 0.049 $\mu\text{m}$  上升到 0.585 $\mu\text{m}$ 。涂层试样表面显微硬度为 23000MPa。

3) 涂层试样磨损时,脱落的涂层微粒对涂层产生划伤,是涂层破坏的主要形式。由于涂层表面硬度高,且层状结构使得涂层有良好的结合力,抗磨损能力提高了 13 倍。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 汝强,胡社军,陈俊芳,等. TC11 钛合金表面电弧离子镀 TiAlN 涂层防护性能的研究[J]. 金属热处理,2006,31(7):33-36
- [2] 吴小梅,李伟,陆峰. 钛合金叶片防护涂层研究[J]. 装备环境工程,2006,3(3):116-129
- [3] 王宝云,李争显,马东康. 钛及钛合金表面强化技术[J]. 稀有金属快报,2005,24(7):6-10
- [4] 李争显,周廉,徐重,等. 钛表面等离子冶金技术的研究[J]. 真空,2004,41(3):15-17
- [5] 李争显,杜继红,周慧,等. 钛表面处理技术的发展现状[J]. 钛工业进展,2003,20(4/5):41-45
- [6] 汝强,胡社军,黄拿灿,等. 钛合金表面电弧离子镀 TiAlN 涂层的抗高温氧化性能研究[J]. 材料保护,2007,40(1):28-31
- [7] 顾艳红,王成彪,刘家俊,等. 氮化钛铝薄膜的制备及其摩擦学性能的研究[J]. 中国表面工程,2004,(5):33-37
- [8] 李成明,孙晓军. 过滤电弧抑制薄膜中颗粒机理的实验分析[J]. 材料科学与工艺,2004,12(3):268-271
- [9] 王海东,童洪辉. Al 含量对电弧离子镀共沉积 Ti-Al-N 涂层性能的影响[J]. 热加工工艺,2006,35(8):4-6
- [10] 吕数国,李玉海,张昱. 电弧离子镀制备 TiAlN 膜工艺研究[J]. 沈阳理工大学学报,2006,25(1):78-82
- [11] 张皓扬,周兰英,田建朝. 基体偏压对 TiAlN 涂层性能的影响[J]. 表面技术,2006,35(6):15-16

(上接第32页)

现代仪器,2004,10(4):1-5

- [8] Beech J B, Cheung C W S, Johnson D B, et al. Comparative studies of bacterial biofilms on surfaces using atomic force microscopy and environmental scanning electron microscopy [J]. Biofouling, 1996, 10(2):65-67
- [9] Bremer Philip J, Geesey Gill G, Drake B. Atomic force microscopy examination of the topography of a hydrated bacterial biofilm on copper surface [J]. Current Microbiology, 1992, 24(4):223-230
- [10] Busscher H J, Poortinga A T, Bos R. Lateral and perpendicular interaction forces involved in mobile and immobile adhesion of microorganisms on model solid surfaces [J]. Current Microbiology, 1998, 37(5):319-323
- [11] Flemming H C. Economical and technical overview [A]. Heitz E, Flemming H C. In: Microbially influenced corrosion of materials [C]. Springer-Verlag, Berlin: Heidelberg, 1996. 5-6
- [12] Postgate J R. The Sulfate-reducing bacteria [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 32
- [13] GB/T 16545-1996, 金属和合金的腐蚀——腐蚀试样上腐蚀产物的清除[S].

- [14] Marszalek D S, Gerchakov S M, Udey L R. Influence of substrate composition on marine microfouling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(5):987-995
- [15] 刘宏芳. 硫酸盐还原菌生物膜下碳钢腐蚀机理研究[D]. 武汉:华中理工大学,2000. 93-94
- [16] 刘靖. 硫酸盐还原菌的腐蚀规律及其腐蚀电化学行为研究[D]. 武汉:华中科技大学,2001. 12-19
- [17] Beech I B, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15(3):181-186
- [18] Dirk de Beer, Paul Stoodley, Frank Roe, et al. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport [J]. Biotechnology and bioengineering, 1994, 43(11):1131-1138
- [19] GB/T 1031-1995, 表面粗糙度参数及其数值[S].
- [20] Keresztes Z, Telegdi J, Beczner J, et al. The influence of biocides on the microbiologically influenced corrosion of mild steel and brass [J]. Electrochimica Acta, 1998, 43(1/2):77-85