

我国沿海港口的微生物初期污损调查

郑纪勇, 孙智勇, 邱日, 侯健, 王利, 张金伟, 蔺存国

(中国船舶重工集团公司第七二五研究所 海洋腐蚀与防护重点实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: **目的** 对我国渤海、黄海、东海和南海海域的港口进行微生物污损调查。**方法** 在天津、青岛、宁波、湛江和三亚的港口进行实海挂样试验, 通过染色、封装、显微观察、计数等方法, 对我国沿海从北到南五个港口微生物的初期污损进行调查。**结果** 通过玻片实海浸挂和荧光显微观察法, 建立了一种生物污损初期附着状况的试验调查方法。微生物污损主要以细菌和硅藻为主, 在样片浸入海水后的数小时内, 表面即附着微生物。不同港口的挂片表面所附着的生物量存在差异, 实海挂片 24 h 后, 样片表面附着的细菌数量约为 $100\sim 300$ cells/mm², 微藻数量约为 $10\sim 60$ cells/mm²。在相同试验周期内, 水温较高海域收集到的样片表面的生物量较大。随港口纬度的升高, 样片表面的生物量减少。**结论** 我国沿海海港的微生物污损生物均以细菌和硅藻为主, 初期生物附着量受港口所处纬度影响, 五个港口一天内的微生物附着量均大于 10 cells/mm²。

关键词: 微生物污损; 海生物污损; 港口; 生物调查

DOI: 10.7643/issn.1672-9242.2019.04.001

中图分类号: Q178.531

文献标识码: A

文章编号: 1672-9242(2019)04-0001-07

Investigation on Initial Fouling of Microscopic Organisms in Several Harbors of China

ZHENG Ji-yong, SUN Zhi-yong, QIU Ri, HOU Jian, WANG Li, ZHANG Jin-wei, LIN Cun-guo

(State Key Laboratory for Marine Corrosion and Protection, Luoyang Ship Material Research Institute, Qingdao 266237, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the microscopic biofouling of representative ports in the Bohai Sea, Yellow Sea, East China Sea and South China Sea. **Methods** In the ports of Tianjin, Qingdao, Ningbo, Zhanjiang and Sanya, the field exposure experiment of samples was carried out. The initial biological pollution of coastal ports from north to south was studied by staining, encapsulation, microscopic observation and counting. **Results** A new test method for investigation of the initial attachment status of biofouling was established by field immersion of slide and microscopic observation of fluorescence. Microscopic biofouling was dominated by bacteria and diatoms. Microscopic organisms were attached to the surface within a few hours after the samples were immersed in seawater. The biomass attached to the surface of the hanging slices of different ports was different. The number of bacteria and microalgae on the surface of the samples was about $100\sim 300$ cells/mm², and $10\sim 60$ cells/mm² respectively after 24 hours of immersion in the sea. In the same exposure period, the biomass attached to the surface of the hanging slices in seawater with higher temperature was higher. As the latitude of the port increased, the biomass on the surface of the slices decreased. **Conclusion** Bacteria and diatoms are the main initial fouling of microorganisms in the coastal seaports in China. The biomass attached in the early stage is affected by the latitude of the port. The bioaccumulation of microorganisms in the five seaports within one day is more than 10 cells/mm².

收稿日期: 2018-10-25; 修订日期: 2018-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(21301161); 国家重点基础研究发展计划项目(2014CB643305); 科工局技术基础科研项目(JSHS2016207B004)

作者简介: 郑纪勇(1978—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为海洋生物污损及仿生防污材料。

通讯作者: 蔺存国(1973—), 男, 研究员, 主要研究方向为海洋仿生功能材料。

KEY WORDS: micro-fouling organisms; marine biofouling; port; biological survey

海洋中生物繁多,其中一类生物营固着生活,在固体表面摄食和繁衍。如果固体表面是人工设施,如渔网渔具、船舶、海上石油平台等,此类生物即被称为污损生物,其附着将影响人工设施的性能和安全。就海洋船舶而言,由于长期航行于海洋环境,不可避免地面临着海洋附着生物的着陆和侵袭。若是在船体表面、螺旋桨以及海水管系等部位大量附着了污损生物,则会使船舶航行阻力增大、机动性降低、管道堵塞等,进而带来严重危害^[1]。如果不进行防护,船舶下水几天即可附着微生物,形成初期污损生物膜,航行阻力提高 20%。当藤壶等硬质污损产生后,航行阻力提高 50%,能源消耗增加 40%,航运成本增加 77%^[2]。

海水中微生物、植物和动物在材料表面的附着和繁殖,并带来危害的现象,即为海洋生物污损(marine biofouling)^[3]。全球报道的污损生物种类超过 4000 种,一般生活在浅水区或者可以提供营养的海湾。污损生物种类多样,因海域和水文状况的不同,污损生物的种类组成、附着季节和附着量存在很大差异。常见的污损生物(fouling organism)大约有 200 种,有藻类、尤介虫、藤壶、海鞘、水螅、外肛动物、双壳类等。

船舶表面的生物污损主要发生在停泊期间及航速较低时。船舶航行时,处于运动状态,受水流冲刷作用,生物附着需要克服更大的剪切力,即便附着也容易在水流冲刷下脱落。在港口中停泊的船舶更容易附着污损生物,一方面,因为船舶停止时,生物不受水流的冲击,更容易附着牢固;另一方面,港口内营养丰富,生物量大,更容易形成生物群落。因此,对港口区海水中的生物污损行为进行调查研究具有重要意义。

生物污损过程通常分为两个阶段,即微生物污损阶段和大型污损生物污损阶段。在微生物污损阶段,固体表面先被蛋白质等有机质分子覆盖,在数分钟的短时间内即可形成最初的条件膜。随后,微生物的胞外产物分泌,并且粘附,附着不可逆,且较为牢固。接着,微生物繁殖扩增,逐步形成较厚生物膜,随着膜系统发育并逐步成熟,牢固吸附在基底材料表面。微生物膜形成后,附着生物种类增加,并逐步变厚,达到大型污损生物污损阶段。大型藻类的孢子、无脊椎动物的幼虫等开始附着,并逐渐长成成体,形成一种垂直分布的复杂生态系统,各种污损生物混合在一起,大型和小型污损生物繁殖,并随季节交替演变,形成污损生物群落。在生物污损发生和发展过程中,微观污损生物的附着对整个污损生物群落的形成具有重要奠基作用,很大程度上影响着后续其他污损生

物附着和生长^[4-9]。

由此,调查微观污损生物附着发生过程对掌握生物污损的进程具有重要意义。微观污损生物是指一群个体微小、结构简单、生理类型多样的单细胞或多细胞低等生物在固体材料表面的附着。这类生物包括属于原核生物类的细菌、放线菌、支原体、立克次体、衣原体和蓝细菌,属于真核生物类的真菌(酵母菌和霉菌)、原生动物和显微藻类,以及属于非细胞生物类的病毒、类病毒和朊病毒^[10]。现有微观污损生物的观测主要采用 GB/T 12763.6 中微生物调查及相关方法^[11],包括表面采样、扩增培养、显微观察、染色计数、平板计数等步骤和方法。

文中分别在天津、青岛、宁波、湛江和三亚的港口,进行样片的实海暴露实验,通过染色、封装、显微观察、计数等方法,对我国沿海从北到南几个港口的初期生物污损进行调查,探讨不同港口中的固体表面初期生物污损情况。

1 实验方法

1.1 样品染色

固定液:固定剂为戊二醛,用 pH7.2 的 PBS 缓冲液稀释至 3%。PBS 冲洗液:NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.42 g、KH₂PO₄ 0.27 g,定容到 1L。染色剂:DAPI(蓝色荧光染料,340~364 nm 激发,454~488nm 发射,染细胞核,与双链 DNA 结合后产生比强 20 倍的荧光)。采用蒸馏水配备 1 mg/mL 的储备液,用冻存管分装,一管 1 mL, -20 ℃ 保存。工作液质量浓度为 1~10 μg/mL,在 4 ℃ 避光保存。用一次性过滤器过滤,按 1~2 mL 量分装于 1.5~2 mL 小离心管中,在 -20 ℃ 冷冻保存,备用。临用前取小管储存液解冻后稀释成 10 μg/mL(1 mL 储备液加入 20 mL 蒸馏水),并用 0.2 μm 一次性过滤器过滤,配置成工作溶液。

1.2 实海挂样

实验方法参照标准:GB/T 12763.6—2007《海洋调查规范第 6 部分:海洋生物调查》微生物调查和污损生物调查^[11]。试验主要分为两部分:海上采样和室内分析。采样方式为挂片定点连续观测法,基本过程如下:海上挂样—定期取样—样品处理—鉴定计数—室内分析—样品保存—计算统计、资料整理和调查报告编写。

微观污损生物附着过程试验方法:每组试样装配如图 1 所示,每个最小单元由 3 个载玻片组成,并排放置,用防水胶带和固定夹固定,用尼龙线垂直悬挂在浮体上,距离水面 1 m 处放样。挂放 96 h,期间定

期取出挂片上的载玻片,封样待测。每次取 4 个单元,共处理 12 个载玻片。

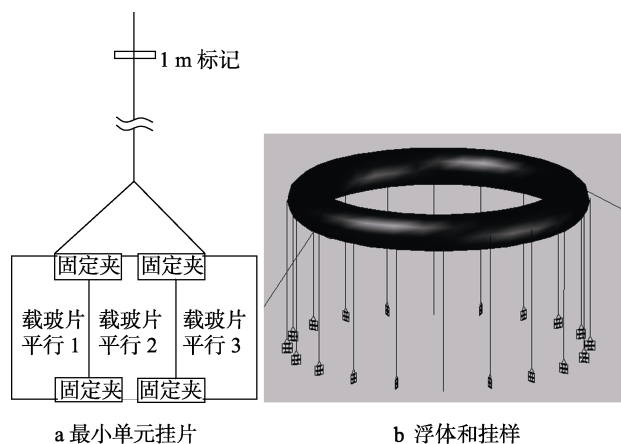


图 1 挂片组装图

1.3 显微观察和计数

采样每次取 3 片单元挂片,用现场海水轻漂洗。采用戊二醛固定液固定 30 min。样品应在采样后 2 h 内处理、分析,若暂存在冰箱保存,不超过 24 h。用注射器吸取 DAPI 工作液,套上 0.2 μm 无菌滤器,滴加 1 mL 染色液,使其盖满载玻片,并染色 5~10 min。然后用 PBS 冲洗液漂洗。在载玻片表面加一滴无荧光镜油,盖上载玻片,两片之间不能有气泡,用指甲油密封盖玻片四周,制片在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下可保存数月,但以立即计数为宜。

1) 细菌总数计数:采用 DAPI 染色直接计数法,在荧光显微镜 (Leica DM2500) 下使用紫外光激发,400 倍放大,随机取 20 个视野。计算具有细菌形态并呈亮绿色的细胞数,每个样品至少计数 300 个菌体。每次加测空白制片,视野中不得出现 1 个以上细菌。

2) 微藻总数计数:在荧光显微镜下使用紫外、绿光或蓝光激发,400 倍放大,随机取 20 个视野。具有光亮桔黄色荧光的是含藻红蛋白的聚球藻细胞,呈砖红色荧光的是含叶绿素的光合真核生物细胞,计算单位面积的数量。

3) 微生物覆盖度:以细菌和微藻在视野中所占面积比例作为微生物覆盖度,以作为反映微生物附着或聚集的状态。

1.4 调研方法

调研港口由北向南依次为:天津港、青岛港、宁波大榭岛港口、湛江港、三亚港口。调研时间为 5—6 月份。微生物附着调查实海挂片照片如图 2 所示。制样时,采用载玻片,3 个一组,用防水自粘胶带固定。挂样时,用尼龙线穿过样品,悬挂在水下 1 m 处。封样时,采用指甲油密封盖玻片四周,防止附着

的微生物泄漏和变干。

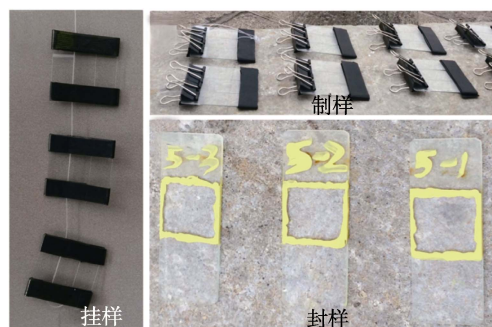


图 2 微生物附着调查实海挂片照片

2 结果及分析

2.1 典型微生物及其附着过程

在青岛港进行了实海挂样试验,并按照 1、2、3、4、5、6、26、96 h 进行了定期取样。经染色和显微观察计数,获得了不同挂样时间的微生物附着量。建立的微生物附着调查方法行之有效,样品表面附着的微生物可以很好地保持原貌。经固定和封存后,2 天内观察没有损失,这样就保证了不同海域的样品经实海挂片取样后的运输时间,确保了试验的稳定性和准确性。镜检发现,样品上主要为细菌和微藻两类微生物,其中微藻以硅藻为主,同时还发现有少量原生动物,如图 3 所示。

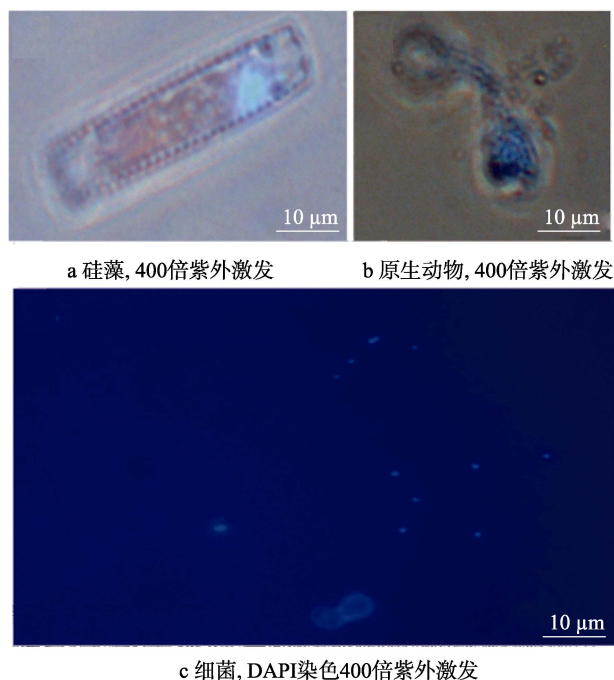


图 3 青岛港实海挂片 96 h 后表面附着的典型生物荧光显微照片

青岛港中实海挂片 1、2、3、4、5、6、26、96 h

后分别取样,经显微计数后发现,即便仅在海水中浸泡1 h的样品表面,也附着了微观污损生物。由此可见,生物附着在样片浸海1 h内就已发生,这与实海环境中生物种类和数量多有关。种类多则不缺乏固体表面附着适应性强的种类,数量多则单位空间中的密度大,因此在挂样后不久就有适应快、附着性强的微生物进行附着。之后,随着时间的延长,样片表面附着的生物数量逐渐由少量增长到快速增多,特别是6 h后,样片表面的附着量增加1倍左右。一方面与新附着生物的数量增多有关,一方面与最初附着的微生物开始分裂繁殖有关,因此数量增多,达到一定的稳定状态。直到96 h时,生物量达到最初的1倍以上,如图4所示。

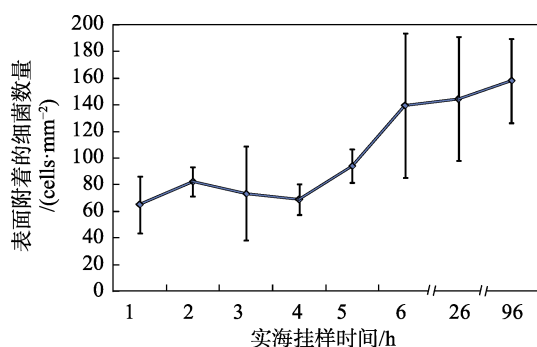


图4 青岛港实海挂片表面附着的细菌数量
随时间变化曲线

2.2 不同港口的微观污损情况

对天津、青岛、宁波、湛江、三亚五个不同海域

的港口,分别进行了微观污损生物调查。发现不同港口的微生物状态存在较大差异。天津港实海挂片24 h后(如图5所示),样片表面附着有大量细菌,有少量的微藻,细菌以球形菌为主,也发现有少量长杆菌。细菌数量平均为113 cells/mm²,微藻数量平均为14 cells/mm²,微观生物覆盖度为11.6%。

青岛港实海挂片24 h后(如图6所示),样片表面附着有大量细菌,有少量的微藻。细菌以球形菌为主,细菌数量平均为140 cells/mm²,微藻数量平均为22 cells/mm²,微观生物覆盖度为12.5%。

宁波大榭岛海域实海挂片24 h后(如图7所示),样片表面附着有大量细菌和微藻。细菌以球形菌为主,微藻以舟形硅藻为主,也有链状藻。同时发现样片表面有大量不规则颗粒物,经荧光染色后不发光,为泥沙微粒沉积在样品表面,这与宁波大榭岛海域泥沙较多有关。细菌数量平均为220 cells/mm²,微藻数量平均为51 cells/mm²,微观生物覆盖度为17.1%。

湛江港口实海挂片24 h后(如图8所示),样片表面附着有大量细菌和微藻。细菌有球形菌、弧菌和丝状菌,微藻主要为舟形藻、球形藻和丝状藻,也发现有螺旋状藻,并呈现一定的聚集状态,种类较多。细菌数量平均为241 cells/mm²,微藻数量平均为24 cells/mm²,微观生物覆盖度为22.5%。

三亚实海挂片24 h后(如图9所示),样片表面附着有大量微藻和细菌。微藻主要为舟形藻、链状藻,种类较多,数量大,细菌主要有球形菌。细菌数量平均为297 cells/mm²,微藻数量平均为84 cells/mm²,微观生物覆盖度为37.6%。

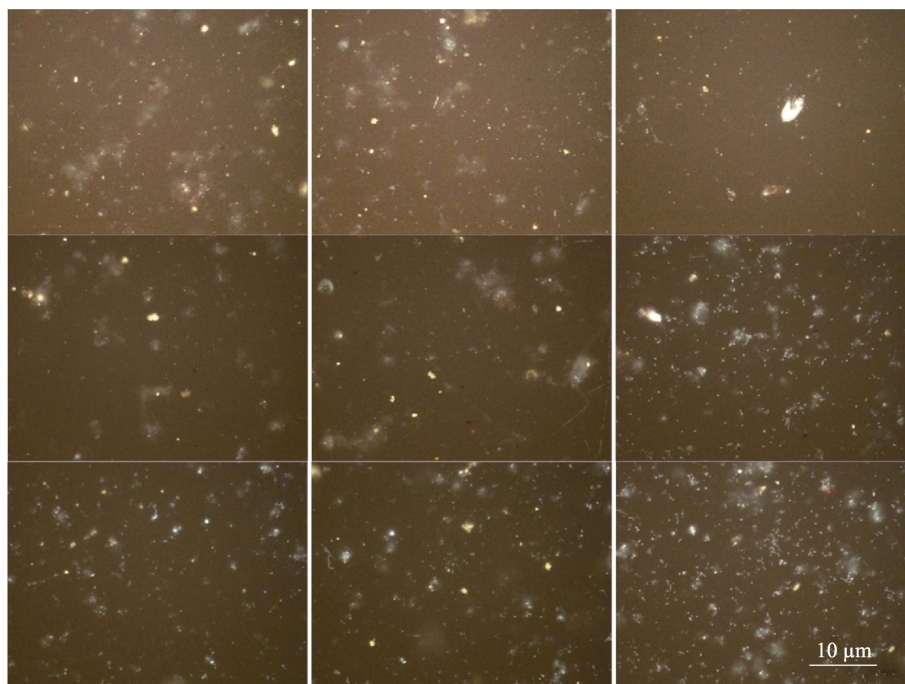


图5 天津港实海挂片24 h后微观污损生物荧光显微照片(400倍紫外激发)

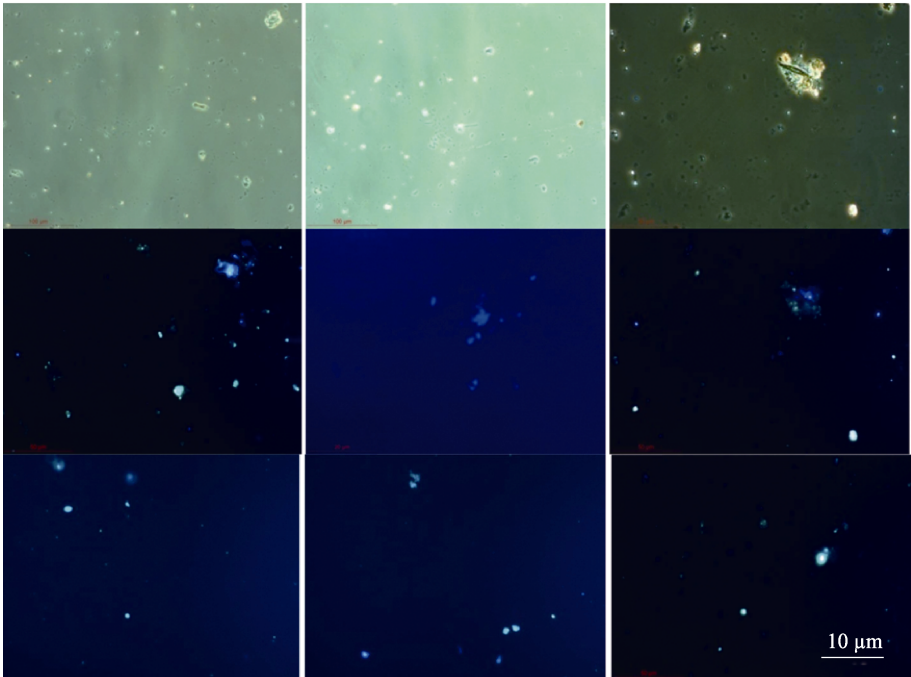


图 6 青岛港实海挂片 24 h 后微观污损生物荧光显微照片

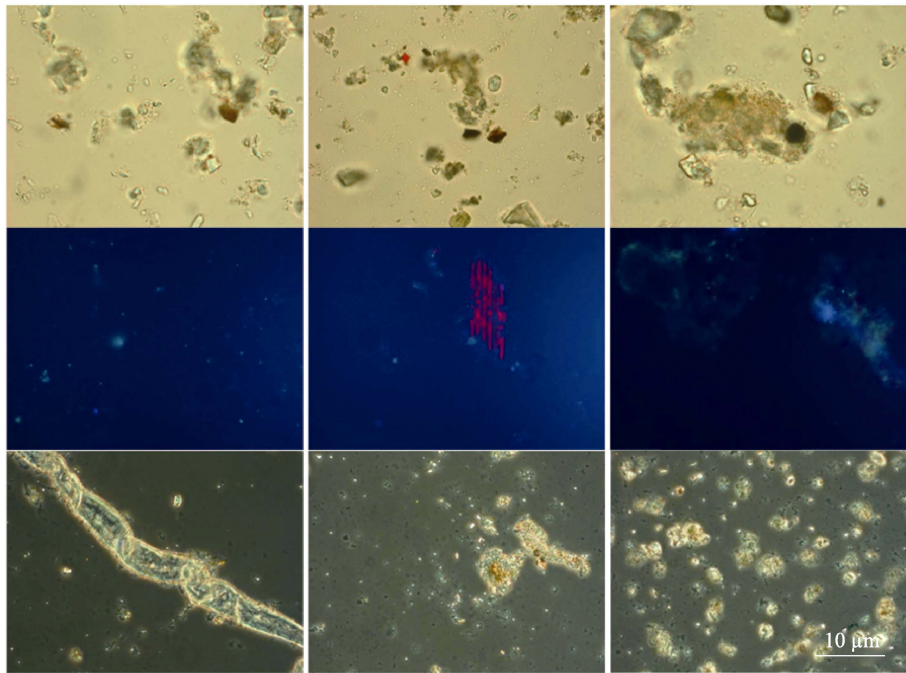


图 7 宁波大榭岛海域实海挂片 24 h 后微观污损生物荧光显微照片

进行实海港口调查试验的五个选点，分布于我国沿海，自北向南，代表了我国渤海、黄海、东海、南海四大海域的不同港口，也代表了我国温带、亚热带、热带的不同分布港口。调查试验的港口分布较广，对比分析不同港口的微观污损生物数量。从图 10 可以看出，在试验的周期内，实海挂片 24 h 后，样片表面附着的细菌数量约为 $100\sim300\text{ cells/mm}^2$ ，微藻的数量约为 $10\sim60\text{ cells/mm}^2$ ，微观生物覆盖度约为

$10\%\sim40\%$ 。随着纬度的减少，生物量有增加的趋势。这与海水温度的增加有一定关系，海水温度高的港口，微观污损生物的生长和繁殖速度更快，相同时间内，观测到的生物量也会更多。可见海水温度对污损生物的附着量有一定的相关性，这与观测到的宏观污损生物附着情况一致，即温度高的南海海域港口的污损生物量相对温度低的渤海海域港口具有更高的生物量。



图8 湛江港实海挂片 24 h 后微观污损生物荧光显微照片

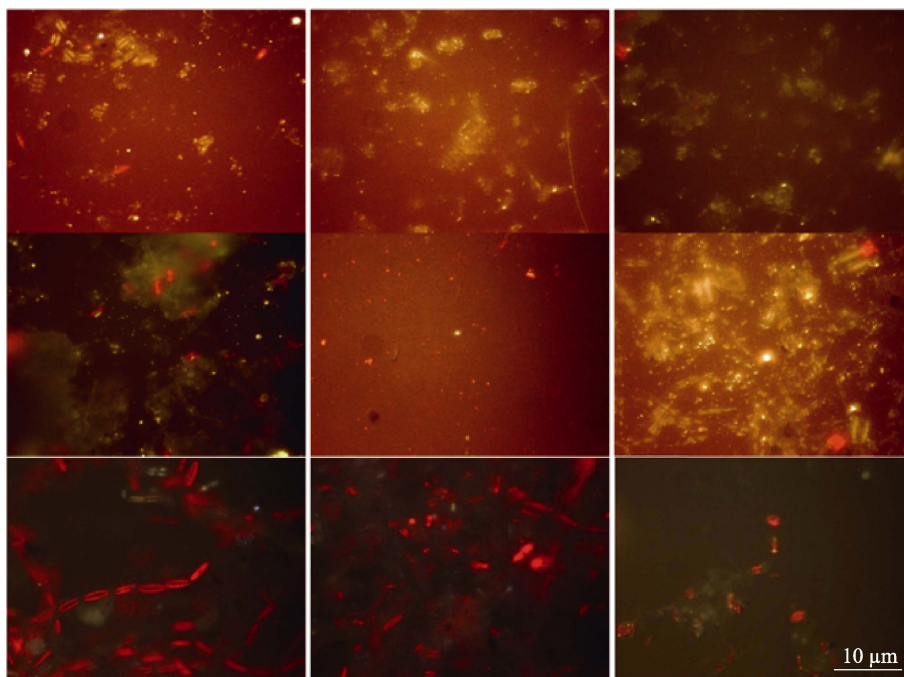


图9 三亚海域实海挂片 24 h 后微观污损生物荧光显微照片

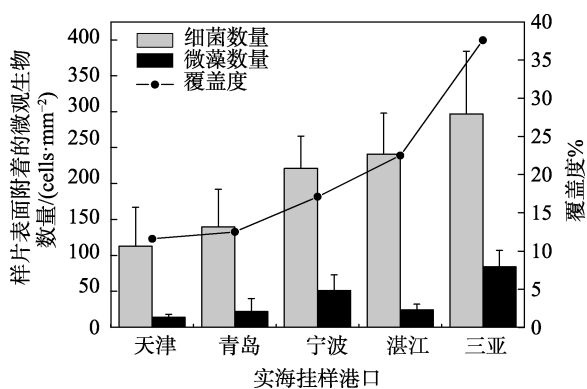


图10 不同海域港口微观污损生物附着量对比

3 结论

1) 对我国由北向南五个港口的微观污损生物初期附着进行了实海挂片调查,发现微生物污损主要以细菌和硅藻为主。

2) 实海挂片 24 h 后,样片表面附着细菌数量约为 100~300 cells/mm²,微藻的数量约为 10~60 cells/mm²,微生物覆盖度约为 10%~40%。

3) 不同港口的挂片表面所附着的生物量存在差异,随港口纬度的升高,样片表面的生物量减少。

4)建立了一种生物污损初期附着状况调查的试验方法,可有效固定和封存,保持微观污损生物初期附着状态。

参考文献:

- [1] 黄宗国,蔡如星.海洋污损生物及其防除(上册)[M].北京:海洋出版社,1984.
- [2] YEBRA D M, KIIL S, JOHANSEN K D, Antifouling Technology—Past, Present and Future Stepstowards Efficient and Environmentally Friendly Antifouling Coatings[J]. Progress in Organic Coatings, 2004, 50: 75-104.
- [3] 李赫,蔺存国,陶琨.海洋防污涂层和防污技术[M].北京:机械工业出版社,2017.
- [4] MOLINO P J, CHILDS S, EASON HUBBARD M R, et al. Development of the primary Bacterial Microfouling Layer on Antifouling and Fouling Release Coatings in Temperate and Tropical Environments in Eastern Australia[J]. Biofouling, 2009, 25(2): 149-62.
- [5] MCKENZIE J D, GRIGOLAVA I V, The Echinoderm Surface and Its Role in Preventing Microfouling[J]. Biofouling, 1996, 10(1/3): 261-272.
- [6] FINLAY J A, BENNETT S M, BREWER L H, et al. Barnacle Settlement and the Adhesion of Protein and Diatom Microfouling to Xerogel Films with Varying Surface Energy and Water Wettability[J]. Biofouling, 2010, 26(6): 657-666.
- [7] FAY F, LINOSSIER I, CARTEAU D, et al. Booster Biocides and Microfouling[J]. Biofouling, 2010, 26(7): 787-798.
- [8] D'SOUZA F, BHOSLE N B, Analysis of Microfouling Products Formed on Metallic Surfaces Exposed in a Marine Environment[J]. Biofouling, 2003, 19(2): 95-107.
- [9] COWIE P R, COWIE P R, SMITH M J, et al. The Prevention of Microfouling and Macrofouling on Hydrogels Impregnated with Either Arquad 2C-75 or Benzalkonium Chloride[J]. Biofouling, 2006, 22(3/4): 173-185.
- [10] NANDAKUMAR K, MATSUNAGA H, TAKAGI M, Microfouling Studies on Experimental Test Blocks of Steel-Making Slag and Concrete Exposed to Seawater off Chiba, Japan[J]. Biofouling, 2003, 19(4): 257-267.
- [11] GB/T 12763.6—2007, 海洋调查规范第6部分:海洋生物调查[S].