

水库中致腐蚀微生物杀菌剂的筛选 及抗腐蚀涂料的检测¹

崔恒林¹ 仓一华¹ 陆 玲¹ 孙延涛¹
孙红尧² 李 震² 朱秀娟²

(1: 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097;

2: 南京水利科学研究院, 南京 210024)

提 要 采用多管发酵培养法检测水样中致腐蚀菌并富集出测试菌群. 设置杀菌剂浓度梯度, 筛选出有效的杀菌剂. 对不同配比及含不同杀菌剂的树脂涂层进行耐腐蚀及杀菌效果检测. 并对其中效果最好的 22 号杀菌剂涂层进行了长效性实验和耐菌性实验. 结果表明含 22 号杀菌剂的抗菌涂料是一种很好的抗水库中微生物腐蚀的材料.

关键词 微生物腐蚀 杀菌剂 好氧异养菌 铁细菌 硫酸盐还原菌 抑菌圈

分类号 Q939.98

微生物腐蚀水电站结构产生的危害近期才引起较多注意^[1]. 微生物的生命活动可以使金属遭到破坏, 称为微生物腐蚀. 参与腐蚀作用的微生物类群主要有铁细菌, 硫酸盐还原菌, 好氧异养菌, 氨化细菌, 硝化细菌, 硫细菌, 真菌八大类^[2]. 其中铁细菌, 硫酸盐还原菌, 好氧异养菌是导致水下钢结构微生物腐蚀的主要元凶^[3-5]. 防止微生物腐蚀, 主要有施用微生物抑制剂、除去代谢物质、避免缺氧条件、控制 pH、使用保护性涂料、阴性保护、自然保护^[4]. 抗微生物腐蚀涂料的研制就是从施用微生物抑制剂和使用保护性涂料这两方面考虑的. 这是涉及高分子材料和微生物学的新领域. 作者从水库水样中富集分离了铁细菌、硫酸盐还原菌和好氧异养菌这三类水库中致腐蚀菌群, 并摸索出一套杀菌剂筛选及抗菌涂料杀菌效果检测的方法. 希望对水下钢结构的保护工作有所帮助.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 杀菌剂样品 由南京水利科学研究院材料结构研究所提供.

1.1.2 EA 型、MPU 型抗菌涂料涂层薄膜及涂有 MPU 型抗菌涂料马口铁薄片 由南京水利科学研究院材料结构研究所提供.

1.1.3 试验菌种 铁细菌群、硫酸盐还原菌群、好氧异养菌群(均从水库水样中富集分离).

1.1.4 水库水样 采自湖南东江电厂.

1.1.5 培养基 铁细菌的培养采用中华人民共和国国家标准 GB/T 14643.6-93 中所规定的铁细菌培养基^[6]、硫酸盐还原菌的培养采用中华人民共和国国家标准 GB/T 14643.5-93

中所规定的硫酸盐还原菌培养基^[7],好氧异养菌的培养采用中华人民共和国国家标准 GB/T 14643.1-93 中所规定的牛肉膏蛋白胨培养基^[8]。

1.2 实验方法

1.2.1 水中铁细菌群、硫酸盐还原菌群和好氧异养菌群的分布测定 按照中华人民共和国国家标准 GB/T 14643.6-93、GB/T 14643.5-93、GB/T 14643.1-93 中所规定的方法测定水库水样中铁细菌群、硫酸盐还原菌群和好氧异养菌群。

1.2.2 三类试验菌的分离与富集培养 无菌条件下,取 1.2.1 中呈阳性反应的试管,吸取一定量的菌液重新接种到相应的液体培养基中,再取呈阳性反应的试管保种。

1.2.3 水中好氧异养菌群的初步鉴定 取 1.2.1 中好氧异养菌群呈阳性反应的试管,无菌条件下,吸取少量菌液涂布于牛肉膏蛋白胨平板,37℃ 培养,24h 后,挑取单菌落经划线分离、培养、直至出现纯的单菌落。挑取不同的单菌落保种。再进行形态观察、革兰氏染色、过氧化氢酶反应、芽孢染色^[9]。

1.2.4 22 种杀菌剂的筛选 无菌条件下,将经活化的三类菌,分别接入含不同浓度杀菌剂的液体培养基中,30℃ 培养,观察生长情况。用 $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $250\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度对 22 种杀菌剂的杀菌效果进行“粗选”,再用 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度对其中效果较好的杀菌剂进行“精选”。

1.2.5 含不同配比杀菌剂的树脂涂层的耐腐蚀及杀菌效果的检测 将含不同杀菌剂的树脂涂层制成 1.2cm 的圆片,在无菌条件下,将涂层圆片置于含芽孢杆菌平板上,30℃ 培养,24h 后,观察并记录结果。

1.2.6 抗菌涂层的长效性实验 选择杀菌效果最佳的 22 号杀菌剂涂层制成 0.5cm、1.2cm 圆片,在无菌条件下,将涂层圆片置于含芽孢杆菌平板上,20℃ 培养。每隔一周转接到新的含菌平皿中,连续培养。

1.2.7 涂有 MPU 型抗菌涂料马口铁薄片的耐菌性试验

(1)活化铁细菌,并将其接于 100mL 铁细菌培养基中,待用。

(2)活化硫酸盐还原菌,并将其接于 100mL 硫酸盐还原菌培养基中,待用。

(3)活化芽孢杆菌,并将其接于 100mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,待用。

(4)在无菌操作下,将涂有抗菌涂料的马口铁薄片分别置于上述铁细菌培养基硫酸盐还原菌培养基中,30℃ 培养。同时,设置对照组,即将涂有普通涂料的马口铁薄片分别置于上述含铁细菌培养基和硫酸盐还原菌培养基中,30℃ 培养。

(5)在无菌操作下,将涂有抗菌涂料的马口铁薄片分别置于上述含芽孢杆菌牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃ 培养。同时,设置对照组,即将涂有普通涂料的马口铁薄片分别置于上述含芽孢杆菌牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃ 培养。

(6)连续培养,1000h 以上,记录结果。

2 结果和讨论

2.1 水样中三种菌的分布情况

东江电厂的水库水样检测结果表明,这三类菌的分布情况与其对氧气的需求是符合的。

表 1 东江电厂水库水中三种菌的分布情况*

Tab.1 Distribution of three groups of microbes in reservoir water from Dongjiang power station

培养基	重复管数	水样序号				
		1	2	3	4	5
铁细菌培养基	1	+	+	-	+	-
	2	+	+	-	+	-
	3	+	+	-	+	-
硫酸盐还原菌培养基	1	-	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	-
	3	-	-	+	-	-
牛肉膏蛋白胨培养基	1	+	+	-	+	-
	2	+	+	-	+	-
	3	+	+	-	+	-

* 1号——接表层水,2号——接门库水,3号——接深水(10m以下),4号——接尾水,5号——接无菌水,“+”——有菌生长,“-”——无菌生长。

2.2 水中好氧异养菌群的初步鉴定

经初步鉴定,水样中的优势菌群为好氧性的芽孢杆菌(*Bacillus* sp).由于此类菌的生长速率快,易在金属表面形成粘液,导致差异腐蚀电池,造成沉积物下腐蚀(垢下腐蚀)^[10].因此,本文中对好氧异养菌的杀菌实验主要选取此类芽孢杆菌为试验菌。

2.3 22种杀菌剂的筛选

表2、3、4的结果表明,8、11、18、20、22都是针对性很强的杀菌剂,尤其是22号在很低的浓度($5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)下对三类菌有强的杀菌效果。

表 2 第一组梯度浓度下杀菌测试*

Tab.2 The growth of three groups of microbes in different media with high concentration germicides

试验菌	杀菌剂浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	杀菌剂序号											
		4	5	6	8	11	15	16	17	18	19	20	22
铁细菌	100	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	250	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	500	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硫酸盐还原菌	100	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
	250	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	500	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
芽孢杆菌	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	250	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	500	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	1000	*	*	*	+	+	*	*	*	+	+	+	+

* 表中只列出有杀菌现象的杀菌剂,“*”表示该杀菌剂有一定的抑菌作用,“+”表示杀菌,“-”表示无杀菌作用,下同。

表 3 第二组梯度浓度下的杀菌测试结果

Tab. 3 The growth of three groups of microbes in different media with low concentration germicides

试验菌	杀菌剂浓度	杀菌剂序号				
		8	11	18	20	22
铁细菌	5	-	-	-	-	+
	25	-	+	-	-	+
	50	+	+	-	-	+
硫酸盐还原菌	5	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	+
芽孢杆菌	5	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	+

表 4 五种杀菌剂对三种实验菌的最低杀菌浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tab. 4 The minimum bactericidal concentration of five germicides on three groups of microbes

试验菌	杀菌剂序号				
	8	11	18	20	22
铁细菌	50	25	200	100	3
硫酸盐还原菌	>200	100	100	100	3
芽孢杆菌	150	>600	>600	200	5

从 8、11、18、20、22 对三类菌的最低杀菌浓度可见, 11、18、20、22 这四种杀菌剂对芽孢杆菌的最低杀菌浓度都高于其它两种试验菌. 因此, 可利用芽孢杆菌为代表菌进行长效性试验.

2.4 不同配比杀菌树脂的耐腐蚀及杀菌效果

抗菌涂料的耐腐蚀能力及杀菌效果取决于树脂本身的性质、杀菌剂含量及树脂与杀菌剂之间的配伍性. 根据文献^[11]报道, 天然聚合物易被生物降解, 合成聚合物不易被生物降解. 半互穿网络聚合物(如 MPU 型树脂)既能较好的控制杀菌剂的释放速度又能耐微生物降解. 配置抗菌涂料采用的树脂就是 MPU 型(渗透型)树脂. 同时也选用 EA 型(非渗透型)树脂制成的抗菌涂料薄膜作为 MPU 型树脂的杀菌能力及渗透性的对照. 在实验过程中, 采用涂布平板法, 既有利于通过抑菌圈的大小来验证杀菌效果, 同时通过观察放置前后涂膜状态来检测耐腐蚀性能.

表 5 不同杀菌剂涂层在含好氧异氧菌平板上的抑菌圈大小*

Tab. 5 Size of the zone of inhibition surrounding different antiseptic paint discs

涂层序号	22 _①	22 _②	8 _①	8 _②	11	18	20
抑菌圈直径/cm	4.2	4.0	2.6	2.0	1.2	1.1	2.8
涂膜状态	完好	完好	完好	完好	完好	完好	完好

* 22_①和 8_①表示两种杀菌剂在各涂料中的浓度为 20%, 22_②和 8_②表示两种杀菌剂在各涂料中的浓度为 10%.

11、18、20 的抗菌涂料中各杀菌剂的浓度均为 20%.

(1)EA 型抗菌涂料薄膜在含芽孢杆菌平板上无明显的抑菌圈.

(2)MPU 型抗菌涂料薄膜在含芽孢杆菌平板上的抑菌圈大小见表 5. 表中数据可知, 22_①

杀菌效果最好,并且其涂膜状态完好.它能维持多久的杀菌能力,需进行长效性杀菌效果检测.

2.5 22₀MPU 型杀菌树脂的长效性试验的结果

每周测量涂层周围抑菌圈,结果如图 1.

图 1 表明,含 22 号杀菌剂的涂层有持久的杀菌效果,从第四周开始,抑菌圈大小已开始稳定,说明该杀菌涂料为缓释型杀菌涂料.

2.6 耐菌性试验结果

在三种含菌培养基中的涂有 MPU 型普通涂料的马口铁薄片表面均出现不同程度的鼓泡,而在三种含菌培养基中的涂有 MPU 型抗菌涂料的马口铁薄片表面光洁、完整如初,未出现鼓泡现象,说明杀菌剂的掺入并不影响 MPU 型涂料与马口铁的结合能力,反而由于杀菌剂的加入能够抑制微生物的侵蚀.

3 结语

抗菌涂料的抗腐蚀性能主要取决于杀菌剂的杀菌能力、保护性涂料的渗透性能及其与钢结构表面的结合能力.高效低毒且与保护性涂料配伍性好的杀菌剂应为杀菌剂的首选,不因掺入杀菌剂而影响其附着性能且具一定渗透性的涂料为保护性涂料的首选.

本文所选 22 种杀菌剂均为高效广谱的杀菌灭藻剂,其中 22 号杀菌剂的杀菌效果最佳且与 MPU 型涂料的配伍性好.因此,由 22 号杀菌剂和 MPU 型涂料制成的抗菌涂料是一种很好的抗水库中微生物腐蚀的材料.

当然,本文所述实验均在实验室内模拟野外条件进行的,在野外条件下,水体的温度、pH、营养物质在一年中的变化较大,微生物在其中的生长情况也不尽相同.因此,抗菌涂料的抗腐蚀性能还有待到野外实际现场进一步的施用、检测.

参 考 文 献

- 1 中国腐蚀与防护学会.三峡工程中金属结构的防腐蚀问题的调查研究与分析报告(摘要).腐蚀防护学报,1996,101:1-2
- 2 冯骏编著.工业用水处理微生物分析.广东:广东科技出版社,1989.109-134
- 3 赵书培.循环冷却水系统冷态运行杀菌灭藻的处理.工业水处理,1988,8(5):54-55
- 4 郑士民,颜望明,钱新民等.自养微生物.北京:科学出版社,1983.179-183
- 5 刘魁元.硫酸盐还原菌抑制剂的研究与应用概况.工业水处理,1984,4:19-23
- 6 GB/T14643.6-93.工业循环冷却水中铁细菌的测定,MPN法.1994.69-75
- 7 GB/T14643.5-93.工业循环冷却水中硫酸盐还原菌的测定,MPN法.1994.62-68
- 8 GB/T14643.1-93.工业循环冷却水中粘液形成菌的测定,平皿计数法.1994.55-61
- 9 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978
- 10 周本省主编.工业水处理技术.北京:化工工业出版社,1999.102-130
- 11 W. L. HAWKINS 著.吕世光译.聚合物的稳定化.北京:轻工业出版社,1981.514-545

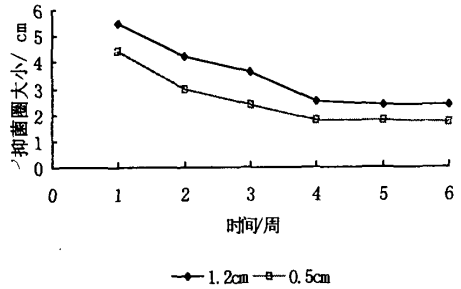


图 1 两种直径的涂层在含芽孢杆菌平板上的持续抑菌圈大小

Fig.1 Size of the zone of inhibition of two size antiseptic paint discs (from first week to sixth week)

Screening of Germicides to Kill Microbes from Reservoirs that can Corrupt Steel and Testing of Antiseptic Paints

CUI Henglin¹ CANG Yihua¹ LU Ling¹ SUN Yantao¹
SUN Hongyao² LI Zhen² ZHU Xiujuan²

(1: College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China;

2: Nanjing Hydraulic Research Institute, Nanjing 210024, P. R. China)

Abstract

We examined the microorganisms in reservoir water and obtained some corrupted the steel in reservoir, with multi-tube fermentation method. Incubating these microbes in different media in which there are different germicides with different concentrations, we screened more effective germicides to produce antiseptic paints. Discs made of the antiseptic paints were used to do bacteriostatic experiments. Long-time experiments were also done. The result showed that the No.22 germicide and its antiseptic paint are more effective materials, which can prevent the steel in reservoir from being corrupted.

Key Words microbiological corruption, germicide, aerobic bacteria, sulfate-reducing bacteria, siderophilic bacteria, zone of inhibition