

# AFM技术在微生物腐蚀研究中的应用

陈光章<sup>1,2</sup>, 林晶<sup>1,2,3</sup>, 阎永贵<sup>1</sup>, 王军<sup>1</sup>

1. 海洋腐蚀与防护国防科技重点实验室, 青岛 266071; 2. 哈尔滨工程大学机电学院 哈尔滨 150001;  
3. 哈尔滨商业大学轻工学院, 哈尔滨 154001

**摘要:**介绍了原子力显微镜(AFM)的工作原理、操作模式以及在微生物腐蚀研究中的应用,包括原位观察细菌和微生物膜形貌、测量力-距离曲线研究微生物在材料表面的粘附力、测量材料表面电位的不同得知生物膜厚度和腐蚀程度.同时还介绍了电化学原子力显微镜的应用.

**关键词:**原子力显微镜;原位观察;微生物腐蚀;电化学原子力显微镜

**中图分类号:**TG172.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-6495(2006)06-0426-03

## APPLICATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPE IN STUDY OF MICROBIOLOGICALLY INFLUENCED CORROSION

CHEN Guang-zhang<sup>1,2</sup>, LIN Jing<sup>1,2,3</sup>, YAN Yong-gui<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory for Marine Corrosion and Protection, Qingdao 266071;

2. Harbin Engineering University, Harbin 154001; 3. Harbin University of Commerce, Harbin 154001

**ABSTRACT:** Recently, atomic force microscope (AFM) has been applied in microscopical characterization of material surface. The principle, operating mode and application of atomic force microscopy (AFM) in microbiologically influenced corrosion (MIC) are introduced in this paper. The topography of bacteria and biofilms may be observed in situ. Adhesion force may be studied by measuring the force versus distance curve. Thickness of biofilms and degree of corrosion may be revealed by surface potential. Some application is discussed in corrosion field of EC-AFM.

**KEY WORDS:** atomic force microscopy; in situ; microbiologically influenced corrosion; electrochemical atomic force microscopy

原子力显微镜(AFM)是80年代初问世的扫描探针显微镜(SPM)的一种.1986年,Dr.Binnig因发明扫描探针显微镜而获得诺贝尔物理学奖.光学显微镜的放大倍数一般都不超过1000倍;电子显微镜的放大倍数极限为100万倍;而原子力显微镜的放大倍数能高达10亿倍,比电子显微镜分辨率高1000倍,可以直接观察物质的分子和原子,为人类进一步探索微观世界提供了理想的工具<sup>[1]</sup>.

在水环境中微生物的腐蚀(MIC)很普遍,MIC是通过一层微生物薄膜作用而引起的.水体中的细菌和微生物可以在金属表面形成一层由细菌、藻类等水生生物及其代谢产物组成的微生物黏膜,称为生物膜.生物膜的主要成分是水(占70%~95%)和细菌黏液物质(由高聚糖、蛋白质、糖蛋白和脂蛋白组成,又称胞外高聚物,简称EPS)<sup>[2]</sup>.据估计大约

20%的腐蚀来自微生物膜的作用<sup>[3]</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制、监测微生物腐蚀的发生和发展,但它对于生物膜的形成、发展、材料的表面特征和腐蚀形貌等不能很好表征<sup>[4,5]</sup>.AFM不仅能在分子级水平上观察试样,而且能量化材料的表面特征信息.AFM本身的优势是其在微生物学中得以迅速发展的主要原因.首先,AFM技术的样品制备简单,无需对样品进行特殊处理,因此,其破坏性较其它生物学常用技术(如电子显微镜)要小得多;第二,AFM能在多种环境(包括空气、液体和真空)中运作,生物分子可在生理条件下直接成像,也可对活细胞进行实时动态观察;第三,AFM能提供生物分子和生物表面的分子/亚分子分辨率的三维图像;第四,AFM能以纳米尺度的分辨率观察局部的电荷密度和物理特性,测量分子间(如受体和配体)的相互作用力;第五,AFM能对单个生物分子进行操纵<sup>[6]</sup>;另外,由原子力显微镜(AFM)获得的信息还能与其他的分析技术和显微镜技术互补.

## 1 原子力显微镜(AFM)的原理

将一个对微弱力极为敏感的微悬臂(Cantilever)的一端

收稿日期:2005-09-09 初稿;2005-11-16 修改稿

基金项目:国家自然科学基金“十五”项目(50499332-02)

作者简介:陈光章(1943-),男,研究员,主要从事舰船的腐蚀与防护研究.

Tel:0532-88639530 E-mail:annie154007@sina.com

固定,另一端接一个微小针尖,针尖与样品表面可轻轻接触.针尖尖端的原子与样品表面原子间存在着极微小的吸引力或排斥力,将这种力控制为恒定,带有针尖的微悬臂在垂直于样品表面的方向上起伏运动,利用光学的检测方法可记录下悬臂对应于扫描各点的位置变化,从而获得样品表面形貌的信息<sup>[7,8]</sup>.在 AFM 中利用斥力与吸引力的方式发展出两种操作模式:(1)利用原子斥力的变化而产生表面轮廓为接触式原子力显微镜(contact AFM),探针与试片的距离约为数个 Å.(2)利用原子吸引力的变化而产生表面轮廓为非接触式原子力显微镜(non-contact AFM),探针与试片的距离约数十个 Å 到数百个 Å.(3)轻敲模式(Tapping Mode, TM)成像技术在使用 AFM 观察柔软、粘连、易碎的样品方面, TM 成像术的出现是一个关键性进步. TM-AFM 在空气中扫描时,探针通常以 50000 次/s~500000 次/s 的频率交替接触和离开表面.由于针尖接触表面造成能量损失,悬臂振荡减弱,这种振幅的减小可以用来鉴别、测量表面状态.当针尖通过表面隆起部分时,悬臂在较小空间内振荡,振荡的振幅同时变小;相反,当针尖通过凹陷处时,悬臂在较大范围振荡,振幅变大.数字反馈回路用来调整针尖-样品间距以维持恒定的振幅和作用于样品上的力. TM-AFM 在液体介质中扫描时,为了避免使整个液体细胞在悬臂振荡驱使下进入上下运动状态,必须选择一个合适的振荡频率(通常在 5000 次/s~40000 次/s 的范围内).这种方法的特点是:当针尖沿 X 方向进行扫描时,周期性的使针尖在 Z 方向上撤离样品表面然后再接近,并保持每次撤离的距离相等,如果针尖撤离足够远,那么针尖对样品的横向作用力就不会被累积,从而可减少针尖对样品的破坏作用. TM-AFM 成像的优点在于,它既可以防止针尖与表面粘连和扫描过程中造成的样品破坏,又能接触表面并获得高分辨图像.而且 TM-AFM 成像具有广阔的线性范围,允许常规样品的重复测试.

## 2 AFM 在微生物腐蚀上的应用

### 2.1 力-距离曲线的测量

除了描述表面形貌特征, AFM 提供了材料表面纳米级的物理化学和机械特征,力-距离曲线测量力对探针-样品距离的关系曲线.它几乎包含了所有关于样品和针尖间相互作用的必要性<sup>[9]</sup>.对于微生物膜的形成细菌在固体表面的吸附过程和吸附程度是一个关键的步骤.通过力曲线可以获得很多信息:1)针尖和样品接触的要素;2)不同针尖-样品结合时,粘附和长程吸引力间的大小以及函数关系;3)长程相互作用力的机理;4)接触模式力显微镜中针尖-样品接触面积与成像机理的关系;5)不同厚度膜的弹性模量和塑性;6)脱离力与最大负载力间的变化关系.

文献[1]给出了典型力曲线特征.微悬臂开始不接触材料表面,如果微悬臂感受到的长程吸引或排斥力的力梯度超过了弹性系数  $c$ ,它将在同表面接触之前,向下或向上弯曲.当针尖被带到非常接近样品表面而且感受到足够的吸引力,它就可能突然跳跃式地同样品接触.一旦针尖同表面接触,并且微悬臂的固定端也继续接近样品表面时,微悬臂形变量将增加.如果微悬臂刚性很大,针尖就有可能刻压入表面.此时,力曲线在接触部分的形状和斜率能提供关于样品表面的弹性信息.在微悬臂受力达到预定值之后,过程将反转即微悬臂被提起并后退.由于探针同表面接触过程中有可能形成

粘附或化学键,引起微悬臂被粘附在样品一段距离,超过接近曲线中的初始接触点.而微悬臂继续被提起一段距离后,粘附就可能被打破,微悬臂在表面双方重新达到自由状态(针尖和样品间没有可测量的雄厚资源),这是 AFM 力曲线测量中的一个关键点.此时可以测量出断裂键或粘附所需要力的大小. Hu 等<sup>[10,11]</sup>第一次使用 AFM 观察液体,他们通过力和距离之间的关系,成功地观察到云母在 35% RH 时水膜的情况. Xu 等<sup>[12]</sup>使用 Nanoscope III 接触模式,通过力和距离曲线测量了 SRB 形成的生物膜在云母上吸附力. Herbert<sup>[13]</sup>使用力曲线测量了针尖和细菌表面的吸附力范围为 -3.9 nN~-4.3 nN.细菌对基体的吸附力范围为 -5.1 nN~-5.9 nN.细胞之间的力范围为 -6.5 nN~-6.8 nN.到目前为止,这方面已经开展了较多的工作<sup>[14]</sup>.

### 2.2 表面电位测量原理

使用 AFM 技术测量表面电位的方法称为 KFM (Kelvin Force microscopy) 或者 EFM (Electric force microscopy). Hiroyuki S<sup>[15~17]</sup>等使用了该方法,其原理是:在导电针尖上作用到接近导电的表面上的静电力  $F$

$$F = -\frac{V^2}{2} \frac{\partial C}{\partial z}$$

式中  $V$ —针尖和试样之间的电位,  $C$ —针尖和试样之间的电容,  $Z$ —针尖和试样之间的距离,  $V = V_{dc} + V_{ac} \sin(\omega t)$ ,  $\omega$ —所施加的电压频率.针尖的振幅为

$$A = 2 \frac{\partial C}{\partial z} V_{dc} V_{ac}, V_{dc} = V_{tip} - V_{sample}$$

如果控制 dc 的水平到针尖的 ac 振动为零,这样就可以测量试样的电位.

表面电势成像技术是采用二次扫描系统,同电场梯度成像相同:分别扫描获得表面形貌和表面电势,之后同时显示出来.不同的电位分布显示不同的生物膜厚度和腐蚀程度.

### 2.3 原位观察微生物膜

由于 AFM 能在多种环境(包括空气、液体和真空)中运作,生物分子可在生理条件下直接成像,所以其可对活细胞进行实时动态观察<sup>[18,19]</sup>. Xu<sup>[12,13]</sup>等使用 Nanoscope III 轻敲模式,扫描探针由  $Si_3N_4$  制成,弹性系数为 45 N/m~61 N/m,原位观察硫酸盐还原菌在云母片上的形状,测得细菌的大小为  $2.10 \mu m \times 0.68 \mu m \times 0.10 \mu m$ .从图象中可以看到细胞外高聚物分布于细胞表面周围,同时观察到细菌在富有营养物质的海水介质中的生长和菌落的形成.微生物膜的形成,测得了细菌大小为 Caldwell 等<sup>[20]</sup>估计细菌细胞占据微生物膜体积的 5%~25%. Xu 和 Fang 等还应用 AFM 研究了碳钢在微生物环境中的腐蚀,微生物膜是由微生物细胞,细胞外高聚物和腐蚀产物等组成.测量了碳钢在不同的硫酸盐还原菌中的点蚀深度、蚀孔的大小和腐蚀后的表面光洁度.微生物膜在材料表面与溶液之间起了扩散屏障的作用,引起溶液的 pH 值,氧溶解度、硫酸盐、氯化物浓度的变化,导致局部腐蚀.因此,微生物膜的结构和组成在微生物腐蚀中起了重要作用. AFM 对于微生物最大的优点是在水环境中能给活的微生物成像,所以它能最有效的原位测量细菌的吸附、微生物膜的形成和伴随着的微生物腐蚀.

## 3 电化学原子力显微镜在腐蚀研究中的应用

电化学原子力显微镜(EC-AFM)自从 1991 年问世,它将原子力技术扩展到电化学领域,它多采用接触式模式,在

电解质溶液中成像. Bertrand 等<sup>[21]</sup>曾利用这一技术研究了平整的 Cu 电极在硫酸溶液中的阳极化, 推测金属溶解的优先区域与金属颗粒的结晶学取向有关. 而在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中, Cu 电极的腐蚀过程是不可逆的, 即先将电极阳极化, 再阴极化, 电极表面得不到初始的平整度. Li 等<sup>[22]</sup>发现 Cu 上腐蚀产生的凹坑有两种. Hirai N 等<sup>[23]</sup>观察 Fe 在 NaSO<sub>4</sub> 溶液中的腐蚀, 这是第一次得到没有钝化的铁在水溶液中原子级别的图象. Tschinkel 等在动态的傅里叶变换红外光谱中观察到, 150 圈氧化还原循环后才能形成铁磁体, 而 EC-AFM 图显示仅第二圈氧化还原循环时就形成了, 可见 EC-AFM 图象为 Fe 的腐蚀过程提供了新的信息. Williford 等<sup>[24]</sup>观察了 Type 304SS 上的腐蚀, 为提高成像质量将 EC-APM 中的电极加以改进: 把卢金探测器或  $\mu\text{m}$  电极作为参比电极; 把对电极铂丝接近样品来减少氢气的产生. Nobumitsu 等<sup>[25]</sup>发现 Ag(100) 表面的自扩散系数在  $-50\text{ mV} \sim 350\text{ mV}$  的范围内与电压呈指数关系, 以此可以猜想表面扩散的活化能由于表面的过电势而下降到 1.2 V, 溶解速度也随之增长.

EC-AM 也被应用到生物样品的研究, Wu 等<sup>[26]</sup>观察吸附在 HOPG 电极上的双链 CT DNA, Shana 等<sup>[27]</sup>用 EC-AFM 观察到固定在金电极上的紧密排列的巯基 DNA 的厚度与所加的电压有关. Boussaad 等<sup>[28]</sup>用 EC-AFM 的轻敲模式观测肌球蛋白在 HOPC 和自组装 DDAB(双十二烷基二甲基浪化铵)膜上的吸附, Boussaad 还用此方法研究了一种氧化还原蛋白——细胞色素 C 在石墨电极上的吸附.

EC-AFM 在微生物腐蚀的研究应用上还少见报道, 从微观角度揭示微生物腐蚀的电化学反应的本质以及研究细菌在电化学反应中的变化将是 EC-AFM 的新研究领域.

## 4 结语

微生物腐蚀涉及到微生物的吸附繁殖、电化学腐蚀和界面化学等复杂过程, 其影响因素很多. 目前没有建立统一的标准来对生物膜及其腐蚀进行控制和定量报导, 虽然获得了一些微生物影响腐蚀过程中的共同特征, 但尚未发现更完善的微生物腐蚀作用机理. 研究方法还有局限性.

AFM 对于研究微生物腐蚀的微观方面是一个有力的工具, 像生物膜的形成、细菌和细菌之间、细菌的界面之间的吸附力、表面形貌等. 在应用 AFM 方法研究微生物腐蚀时, 要仔细分析所获得的数据, 最好是联合使用电化学方法以确定其腐蚀过程, 测得其对应关系. 才能探清微生物腐蚀机理.

## 参考文献:

- [1] 白春礼, 田芳, 罗克. 扫描力显微镜[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 7.
- [2] B J Little, F Mansfeld. Microbiologically Influenced Corrosion [J]. NACE International, Houston, Texas, 1977, 85.
- [3] Flemming HC. Microbially influenced corrosion of material[J]. Economical and technical overview. 1996, 5.
- [4] Mansfield F, Little B. A technical review of electrochemical techniques applied to microbiologically influenced corrosion [J]. Corros. Sci. 1991; 32: 247.
- [5] Dexter S C, Duquette D J, Siebert OW, et al. Use and limitation of electrochemical techniques for investigating microbiological corrosion[J]. Corrosion 1991, 47: 308.
- [6] G Binnig, C F Quate, C Gerber. Atomic force microscopy[J]. Phys. Rev. Lett., 1986, 56: 930.
- [7] S Morita. All about Scanning Probe Microscope, Kogyo-Chosakai, 1992.
- [8] M P O'Boyle, T T Hwang, H K Wickramasinghe. Atomic force microscopy of work functions on the nanometer scale [J]. Applied physics letters, 1999, 74(18): 2641.
- [9] T Sulchek, R Hsieh, J D Adams, et al. High-speed tapping mode imaging with active Q control for atomic force microscopy[J]. Applied Physics Letter, 2000, 76(11): 1473.
- [10] J Hu, X D Xiao, M Salmeron. Structure of molecularly thin films of water on mica in humid environments[J]. Surface Science, 1995, 344(3): 221.
- [11] J Hu, X D Xiao, D F Ogletree, et al. Imaging the condensation and evaporation of molecularly thin films of water with nanometer resolution[J]. Science, 1995, 268: 267.
- [12] Xu L C, Fang H P, Chan K Y. Atomic force microscopy study of microbiologically influenced corrosion[J]. Materials Characterization, 2000, 48: 195.
- [13] Herbert H P Fang, Chan K Y. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40: 89.
- [14] Hiroyuki Sugimura, Kazuyuki Hayashi, Nagahiro Saito, et al. Surface Potential Images of Microstructured Organosilane Self-assembled monolayers acquired by kelvin probe force microscopy [J]. Japanese Journal of applied physics, 2001, 40 (2B): L174.
- [15] Vatel, Olivier, Tanimoto, et al, Kelvin probe force microscopy for potential distribution measurement of semiconductor devices [J]. Applied Physics, 1995, 77(6): 2358.
- [16] Kanan P, Puntambekar, Paul V. Surface potential profiling and contact resistance measurements on operating pentacene thin-film transistors by Kelvin probe force microscopy [J]. Applied Physics Letters 2003, 83(26): 5539.
- [17] Florin E L, Moy V T, Gaub H E. Adhesion force between individual ligand-receptor pairs [J]. Science, 1994, 264: 415.
- [18] Goddard D T, Steel A, Beech I B Towards in situ atomic force microscopy imaging of biofilm growth on stainless steel [J]. Scanning Microscopy, 1996, 10: 983.
- [19] Telegdi J, Kerezles Zs, Palinkas G, et al. Microbiologically influenced corrosion visualized by atomic force microscopy [J]. Appl Phys A, 1998, 66: S639.
- [20] Caldwell DE, Korber DR, Lawrence JR. Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy [J]. J Microb Methods, 1992, 15: 249.
- [21] Bertrand G, Rocca E, Savall C, et al. In-situ electrochemical atomic force microscopy studies of aqueous corrosion and inhibition of copper [J]. Electroanal. Chem, 2000, 489: 38.
- [22] Li Jun, Lampner D. In-situ AFM study of pitting corrosion of Cu thin films [J]. Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999, 154: 227.
- [23] Hirai N, Hara S, Okada H. In situ electrochemical atomic force microscopy with atomic resolution of Fe(110) in sodium sulfate aqueous solution [J]. ISIJ International, 2000, 40: 7.
- [24] Williford R E, Windisch C F, Jones R H. In situ observations of the early stages of localized corrosion in Type 304SS using the electrochemical atomic force microscopy [J]. Materials Science and Engineering A, 2000, A288: 54.
- [25] Nobumitsu H, Hiroaki T, Shigete H. Enhanced diffusion of surface atoms at metal/electrolyte interface under potential control [J]. Appl. Surf. Sci., 1998, 130(132): 506.
- [26] Wu Lingling, Zhou Jianzhang. Oxidation and adsorption of deoxyribonucleic acid at highly ordered pyrolytic graphite electrode [J]. Electrochem, Acta, 2000, 45: 2923.
- [27] Shana O K, Jacqueline K B. Orienting DNA helices on gold using applied electric fields [J]. Langmuir, 1998, 14(24): 6781.
- [28] Boussaad S, Tao N J. Electron Transfer and Adsorption of Myoglobin on Self-Assembled Surfactant Films: An Electrochemical Tapping - Mode AFM Study [J]. Chem. Soc., 1999, 121: 4510.