304 不锈钢表面聚吡咯纳米结构的构建及其抗细菌粘附性能

聂铭[1]，黄丰[1]，王珍高[2]，宁成云[2]

（1.广东电网有限责任公司 电力科学研究院，广州 510080；2.华南理工大学，广州 510641）

摘 要：目的 在 304 不锈钢表面制备抗细菌粘附的聚吡咯涂层。**方法** 采用电化学无模板方法，在 304 不锈钢表面构建具有超疏水性能的纳米锥结构聚吡咯涂层，实现抗细菌粘附的功能。利用扫描电子显微镜、傅里叶红外光谱分析了聚吡咯涂层的表面形貌和化学成分，同时采用 X 射线光电子能谱技术表征了涂层的元素组成，采用接触角仪测试了涂层的亲疏水性，采用原子力显微镜的 Kelvin 探针力显微镜模块研究了涂层的表面电势，通过平板计数法研究了聚吡咯涂层的抗细菌粘附特性，并进一步通过扫描电子显微镜观察了细菌在涂层表面的粘附情况。**结果** 通过两次电化学聚合在 304 不锈钢表面构建了萘磺酸掺杂的纳米锥结构聚吡咯涂层，该涂层的接触角为 121.1°，具有较强的疏水性，平滑结构聚吡咯和纳米锥结构聚吡咯的表面电势分别为(136±3) mV 和(335±3) mV。大肠杆菌粘附实验结果表明，大肠杆菌几乎不粘附于纳米锥结构聚吡咯表面，纳米结构的聚吡咯涂层具有抗细菌粘附的性能。**结论** 纳米锥结构聚吡咯具有较强的疏水性，同时具有高的表面电势，从而使细菌与表界面的相互排斥力大于吸引力，因此纳米锥结构聚吡咯具有抗细菌粘附的性能。

关键词：304 不锈钢；聚吡咯；细菌粘附；纳米结构；润湿性；表面电势

中图分类号：TQ630；O633 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-3660(2019)04-0196-07

DOI：10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2019.04.028

Construction and Anti-bacteria Adhesion Properties of Polypyrrole Nanostructures on 304 Stainless Steel Surface

NIE Ming[1], *HUANG Feng*[1], *WANG Zhen-gao*[2], *NING Cheng-yun*[2]

(1.Electric Power Research Institute, Guangdong Power Grid Co., Ltd, Guangzhou 510080, China;
2.South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

ABSTRACT: The work aims to construct a polypyrrole coating with the anti-bacteria adhesion performance on 304 stainless steel. Electrochemical free-template method was used to construct a polypyrrole coating with super-hydrophobic nano-cone structure on the surface of 304 stainless steel to achieve anti-bacteria adhesion. The surface morphology and chemical composition of the coating of polypyrrole were analyzed by scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy,

收稿日期：2018-10-08；**修订日期：**2018-12-26

Received：2018-10-08；**Revised：**2018-12-26

基金项目：国家自然科学基金资助（51772106）；中国南方电网有限责任公司科技项目（GDKJXM00000017）

Fund：Supported by the National Natural Science Foundation of China (51772106) and the China Southern Power Grid Co., Ltd Science and Technology Project (GDKJXM00000017)

作者简介：聂铭（1973—），男，硕士，教授级高级工程师，主要研究方向为输变电金属材料防腐。

Biography：NIE Ming (1973—), Male, Master, Professor-level senior engineer, Research focus: preservation of transmission and transformation metal materials.

通讯作者：宁成云（1971—），男，博士，教授，主要研究方向为金属材料表面改性。邮箱：ning_lab@hotmail.com

Corresponding author：NING Cheng-yun (1971—), Male, Doctor, Professor, Research focus: surface modification of metal materials. E-mail: ning_lab@hotmail.com

respectively. Meanwhile, the elemental composition of the coating was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy. The wettability of coating was tested by contact angle meter. The Kelvin module of the atomic force microscope was used to study the surface potential of the coating. The anti-bacterial adhesion of polypyrrole coating was studied by plate counting method, and the adhesion of bacteria on the coating surface was further observed by scanning electron microscope. Polypyrrole coating with a naphthalene sulfonic acid doped nano-cone structure was constructed on the surface of 304 by twice electrochemical polymerizations. The contact angle of the coating was 121.1°, which was highly hydrophobic. The surface potential of polypyrrole with nano-cone structure and smooth polypyrrole was (136±3) mV and (335±3) mV, respectively. *E.coli* adhesion experiments showed that *E.coli* hardly adhered to the surface of the nanoarray structure and the nanostructured polypyrrole coating had anti-bacteria adhesion properties. Nanoarray structure has stronger hydrophobicity and higher surface potential so that the repulsive force between bacteria and the surface interface is greater than the attractive force and the nano-cone structure polypyrrole has the performance of resisting bacteria adhesion.

KEY WORDS: 304 stainless steel; polypyrrole; bacterial adhesion; nanostructure; wettability; surface potential

304 不锈钢广泛应用于医疗器械、食品加工等领域。在使用过程中，材料表面容易出现细菌粘附等现象，常常导致手术失败或食品感染[1-2]。一般地，细菌粘附伴随生物膜形成[3]，生物膜形成可能导致细菌的耐药性，常规的杀菌、消毒手段很难彻底清除生物膜[4]，导致手术感染等严重后果。因此，防止细菌在 304 不锈钢等材料表面粘附是非常重要的。

目前大量的研究聚焦于抗菌粘附涂层的设计[5-6]，抗细菌粘附涂层能有效地防止生物膜的形成，从而降低金属材料的腐蚀和感染等问题[7]。已有研究者从粗糙度或者疏水性方面设计了具有抗细菌粘附和防止生物膜形成的耐蚀性功能涂层[8-9]。超疏水表面涂层的构建是一种抗细菌和生物膜形成的很好方法[10]。Privett 等[11]研究了一种超疏水干凝胶涂层，有效地降低了细菌粘附，这种降低细菌粘附的方法主要是通过降低蛋白与材料表面的相互作用，从而降低细菌膜表面与材料表面的相互作用，但是没有杀死溶液中的细菌。尽管在粗糙度和疏水性方面如何影响细菌和生物膜的形成方面没有统一的结论，但是粘附力的性质对细菌及其表面相互作用有影响[3]。细菌粘附是一系列物理、化学和生物过程。与细菌粘附相关的物理力包括范德华力，空间相互作用和静电（双层）相互作用，如果排斥力大于吸引力，细菌将从表面脱离[12]。因此，有研究者通过控制材料表界面与细菌的相互作用力，实现控制细菌的粘附[13]。导电聚吡咯具有无毒、易制备、表面性质可控、氧化还原可逆等特性，在超级电容器、传感器和防腐涂料方面具有广泛应用[14]。通过改变聚吡咯的物理化学性质，可以调控其对细菌的粘附性质。研究者在喷金的硅片表面通过调控聚吡咯的合成参数，实现其厚度、粗糙度和润湿性等物理性质的调控，从而实现抗细菌粘附[15]。聚吡咯的电化学合成具有绿色环保、快捷、可控等优势。因此聚吡咯在改性 304 不锈钢抗细菌粘附性方面具有较强的应用前景。

本文采用了电化学方法在 304 不锈钢表面构建了具有疏水性的纳米锥结构导电聚吡咯涂层，研究了该涂层的抗细菌粘附特性，并通过表面电势，解释了纳米锥结构聚吡咯抗细菌粘附的机理。

1　试验

1.1　聚吡咯涂层的制备

通过两次电化学聚合反应在 304 不锈钢表面制备纳米锥结构聚吡咯，如图 1 所示。首先，采用砂纸逐级打磨 304 不锈钢表面，去除表面的氧化物后分别在乙醇和丙酮中超声清洗。然后在不锈钢表面电沉积聚吡咯预成核层。电解质溶液为 0.01 mol/L 的萘磺酸（NSA）和 0.2 mol/L 的吡咯水溶液，恒电流方法控制电化学反应，反应电流为 0.9 mA/cm^2，反应时间为 30 min。最后在材料表面制备纳米锥结构聚吡咯，电解质溶液为 0.01 mol/L 的萘磺酸（NSA）和 0.2 mol/L 的吡咯 PBS 溶液。恒电流方法控制电化学反应，反应电流为 0.9 mA/cm^2，反应时间为 10 min。为了得到超疏水特性的界面，采用 0.5 V 氧化电压，氧化聚吡咯。

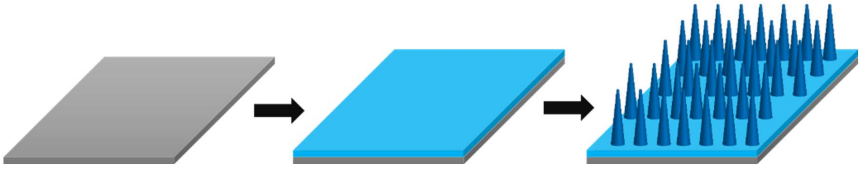


图 1　通过电化学聚合方法在 304 不锈钢表面制备纳米锥结构聚吡咯的过程

Fig.1 Process of preparing nano-cone polypyrrole on the surface of 304 stainless steel by electrochemical polymerization: a) 304 stainless steel; b) smooth structure polypyrrole; c) nano-cone polypyrrole

1.2　细菌抗粘附实验

本研究采用大肠杆菌验证抗菌粘附性能。大肠杆菌培养在液体培养基中，培养条件是在 37 ℃下，12 h 左右传代一次。细菌悬浮在 pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中，通过平板计数法确定溶液中细菌的浓度。进一步稀释菌液制备细菌浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液。用于细菌粘附的实验样品是直径为 1 cm 的未处理的 304 不锈钢、平滑结构的聚吡咯涂层的不锈钢和纳米结构的聚吡咯涂层的不锈钢圆片。首先将灭菌的样品置于 48 孔培养板中，取 0.5 mL 金黄色葡萄球菌悬液（10^6 CFU/mL）滴加于样品表面，将培养板置于 37 ℃生化培养箱中共培养 24 h，然后取出样品，采用灭菌水清除样品表面没有粘附的细菌，将处理的样品放入 5 mL 的无菌的 PBS 试管中，超声震荡 30 s 后，采用梯度稀释方法将其稀释至 1/1000，利用平板法计算菌落总数。细菌粘附率通过公式（1）计算：

$$R_{样品}(\%)=CFU_{样品}/CFU_{304} \quad (1)$$

其中，$R_{样品}(\%)$为细菌粘附率，$CFU_{样品}$为平板计数法中菌落数，CFU_{304}为未处理的 304 不锈钢实验组的菌落数。

通过扫描电子显微镜观察未处理的 304 不锈钢、平滑结构的聚吡咯涂层和纳米结构的聚吡咯涂层材料表面的细菌粘附情况。电镜样品制备方法如下：将与菌液共培养的样品取出，采用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次，利用 2.5%戊二醛溶液固定细菌，浸泡 2 h。然后分别加入 30%、50%、70%、90%、100%的乙醇溶液和乙酸异戊酯，对材料表面粘附固定的细胞进行梯度脱水，每次浸泡 10 min。最后使用 CO_2 临界点干燥器干燥，以去除乙酸异戊酯，获得细胞样品。

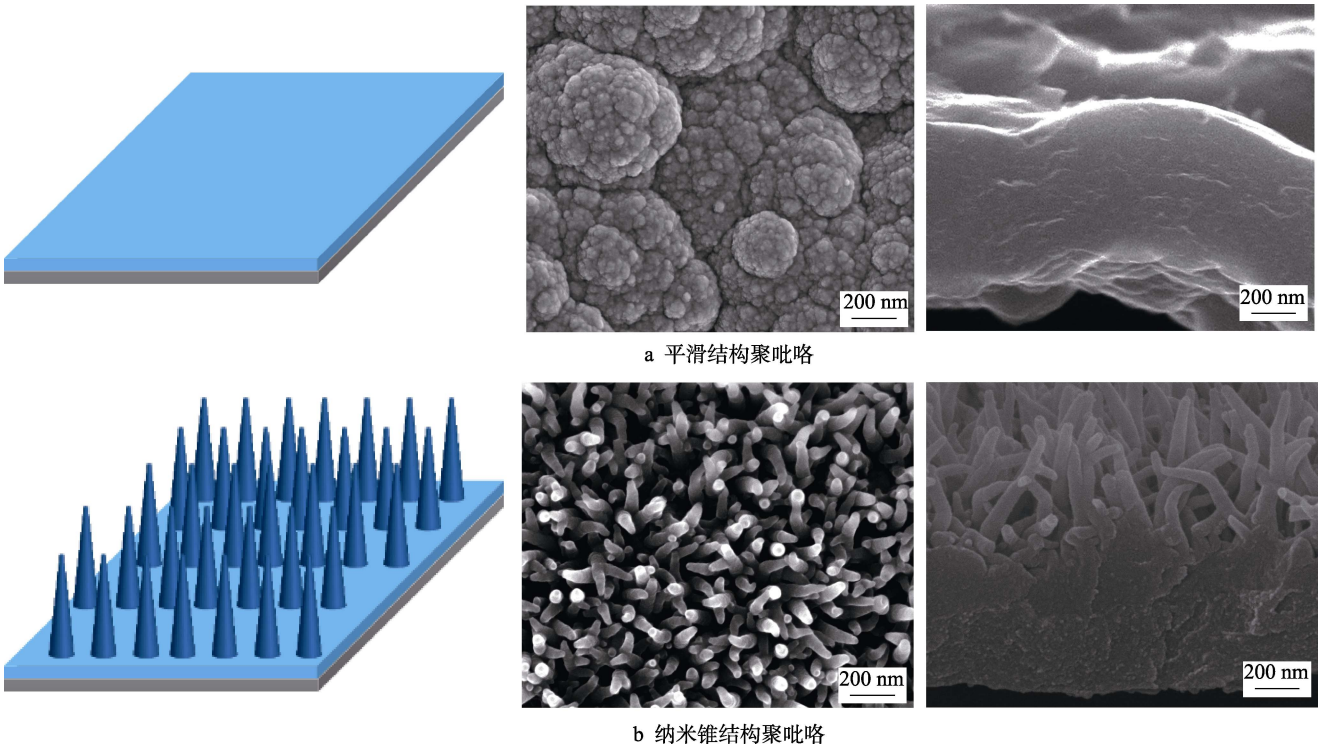
1.3　性能表征

采用场发射扫描电子显微镜（FE-SEM，Merlin，德国）表征材料的表面形貌。通过傅里叶红外光谱（FTIR，Bruker VERTEX 33，德国）和 X 射线光电子能谱（XPS，Oxford MAO-15AC，英国）分析涂层的化学成分。用表面接触角分析仪（Filderstadt INCA X-act，德国）分析此样品的润湿性。用原子力显微镜（AFM，Shimadzu SPM-9600，日本）的 Kelvin 探针力显微镜模块分析样品的表面电势。

2　结果及分析

2.1　表面形貌分析

聚吡咯涂层的俯视图和截面图如图 2 所示。结果显示，高密度的纳米锥结构垂直于表面生长，纳米锥结构顶端直径 75 nm 左右，垂直高度 500 nm 左右。根据 Cassie-Baxter 模型，材料表面的微观结构的高度、宽度和微结构之间的距离，对材料表面的润湿性能有重要的影响。通过电化学方法制备的垂直、均匀、致密的纳米锥结构对于材料的疏水性能起着至关重要的作用。



a 平滑结构聚吡咯

b 纳米锥结构聚吡咯

图 2　304 不锈钢表面电化学沉积聚吡咯涂层的场发射扫描电子显微镜图

Fig.2 Field emission scanning electron micrograph of electrochemically deposited polypyrrole coating on 304 stainless steel surface: a) smooth structure polypyrrole; b) nano-cone polypyrrole

2.2　成分分析

如图 3 所示，通过傅里叶红外光谱分析了平滑结构的聚吡咯涂层和纳米锥结构聚吡咯涂层的分子结构。平滑的聚吡咯的 1544 cm^{-1} 和纳米锥结构聚吡咯的 1529 cm^{-1} 归属于 C═C 伸缩振动，平滑结构聚吡咯的 1472 cm^{-1} 和纳米锥结构聚吡咯的 1452 cm^{-1} 归属于 C—N 伸缩振动[16]。由于掺杂度不同，吡咯骨架质子化程度存在差异，相对于纳米锥结构聚吡咯，平滑结构的聚吡咯有红移现象。768 cm^{-1} 归属于聚吡咯的 C—H 面外环变形。1032 cm^{-1} 和 1088 cm^{-1} 归属于由双极化结构引起的 C—H 面内伸缩振动，964 cm^{-1} 归属于由极化结构引起的吡咯环的变形振动[17]。基于此，在 304 不锈钢表面成功合成了聚吡咯涂层。

为了进一步确定萘磺酸掺杂于聚吡咯形成纳米锥结构，采用 X 射线光电子能谱技术（XPS）分析纳米锥结构的涂层表面的元素组成，如图 4 所示。结果显示，涂层表面由 C、N、O 和 S 组成。其中，C、N、O 元素来源于聚吡咯和萘磺酸，S 元素是萘磺酸的特征元素。由此可知，纳米结构聚吡咯成功掺杂了萘磺酸分子。

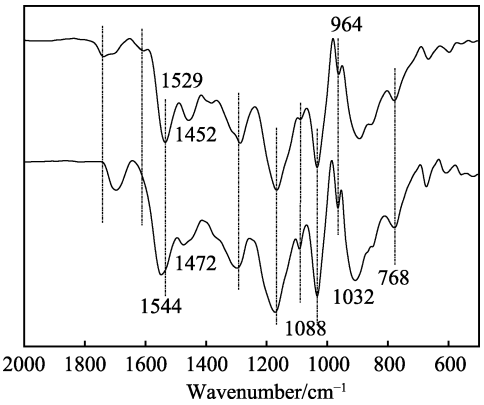


图 3　304 不锈钢表面的纳米锥结构聚吡咯和平滑聚吡咯的傅里叶红外吸收光谱图（上：纳米锥结构聚吡咯，下：平滑结构的聚吡咯）

Fig.3 Fourier infrared absorption spectrum of nanopyram structure polypyrrole and smooth polypyrrole on 304 stainless steel surface (above: nano-cone polypyrrole, below: smooth structure polypyrrole)

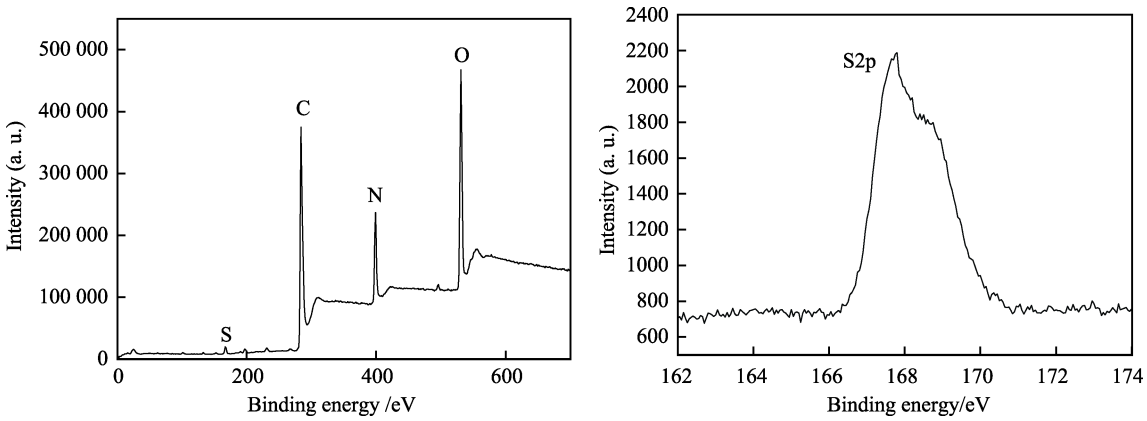


图 4　304 不锈钢表面纳米锥结构聚吡咯的 X 射线光电子能谱图

Fig.4 X-ray photoelectron spectroscopy of polypyrrole with nano-cone structure on 304 stainless steel surface

2.3　润湿性分析

由于固液气三相的相互作用，液体在固体表面铺展，液体与固体之间形成一定的角度，即接触角。如图 5 所示，未改性的 304 不锈钢、平滑的聚吡咯和纳米锥结构聚吡咯涂层的接触角分别为 62.1°、73°和 122.1°。因此纳米结构的聚吡咯具有疏水特性。一般地，材料表面浸润性由材料表面的化学组成和微观几

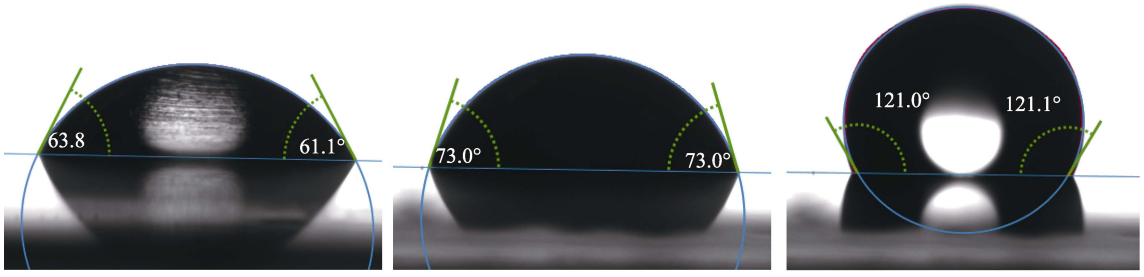


图 5　304 不锈钢、304 不锈钢表面平滑结构聚吡咯涂层和纳米锥结构聚吡咯涂层的接触角

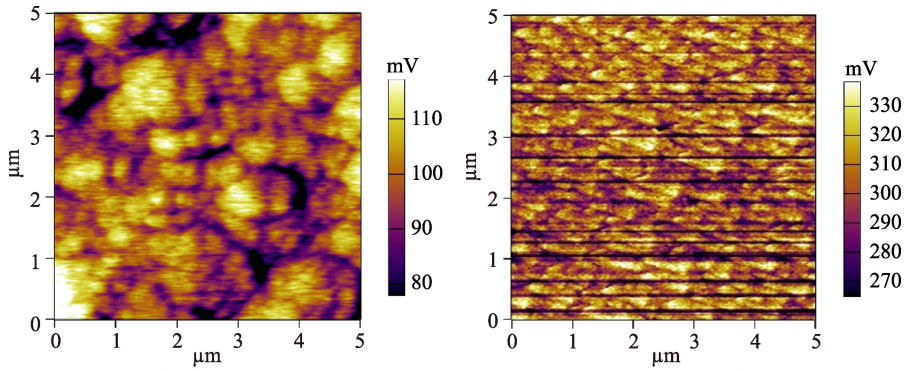
Fig.5 Contact angle of polypyrrole coating on 304 stainless steel, 304 stainless steel surface smooth-structured polypyrrole coating and polypyrrole coating with nano-cone structure

何结构共同决定[18]。研究表明，通过构建具有类似荷叶或者阵列结构的聚吡咯或者掺杂低表面能物质，可以实现聚吡咯的超疏水性[19-20]。一般地，疏水性材料表面不利于微生物粘附。

如图 6 所示，采用原子力显微镜的 Kelvin 探针力显微镜模块表征材料表面电势。材料表面电势与表面电荷浓度相关。结果显示，平滑聚吡咯和纳米锥结构聚吡咯的表面电势分别为(136±3) mV 和(335±3) mV。纳米阵列结构的聚吡咯的表面电势相对平滑结构的聚吡咯高很多，这可能是因为一方面，聚吡咯的掺杂度不一样，使聚吡咯分子链的质子化程度不同，表面带电情况有明显的区别；另一方面，表面形貌影响表面电荷分布。

2.4　抗细菌粘附性能

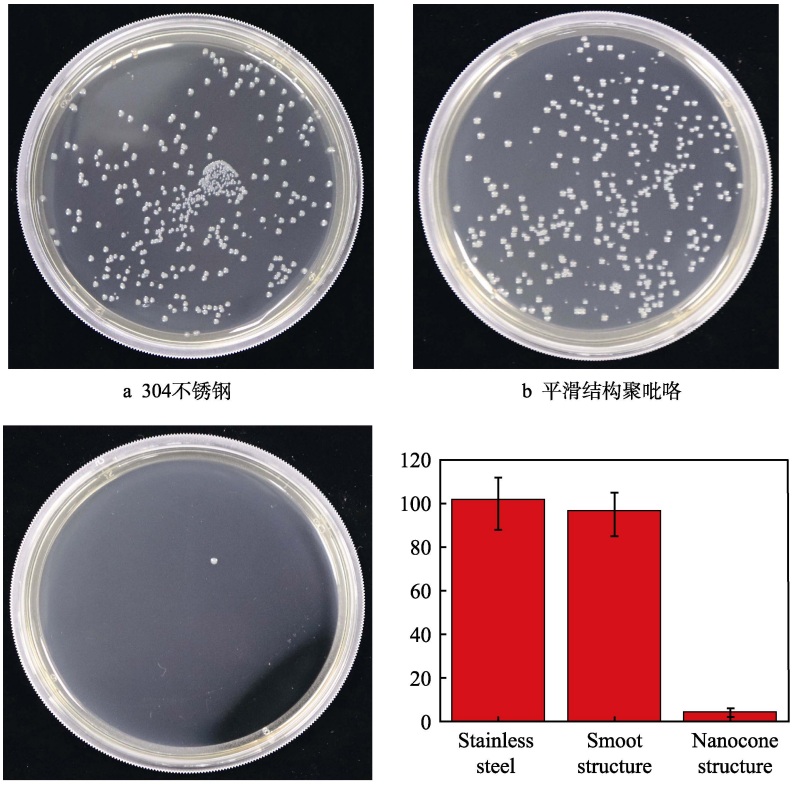
如图 7 所示，通过平板计数法实验，采用大肠杆菌为模型验证纳米锥结构聚吡咯涂层的抗细菌粘附性能。以未改性的不锈钢样品作为空白对照组，平滑的聚吡咯和纳米锥结构聚吡咯粘附细菌的比例分别为(95±10)%和(4±2)%。由此可见，纳米锥结构聚吡咯



a 平滑结构聚吡咯　　b 纳米锥结构聚吡咯

图 6　304 不锈钢表面平滑结构聚吡咯和纳米锥结构聚吡咯的表面电势

Fig.6 Surface potential of the smooth-structured polypyrrole and polypyrrole coating with nano-cone structure on 304 stainless steel surface: a) smooth structure polypyrrole; b) nano-cone polypyrrole



a 304不锈钢　　b 平滑结构聚吡咯

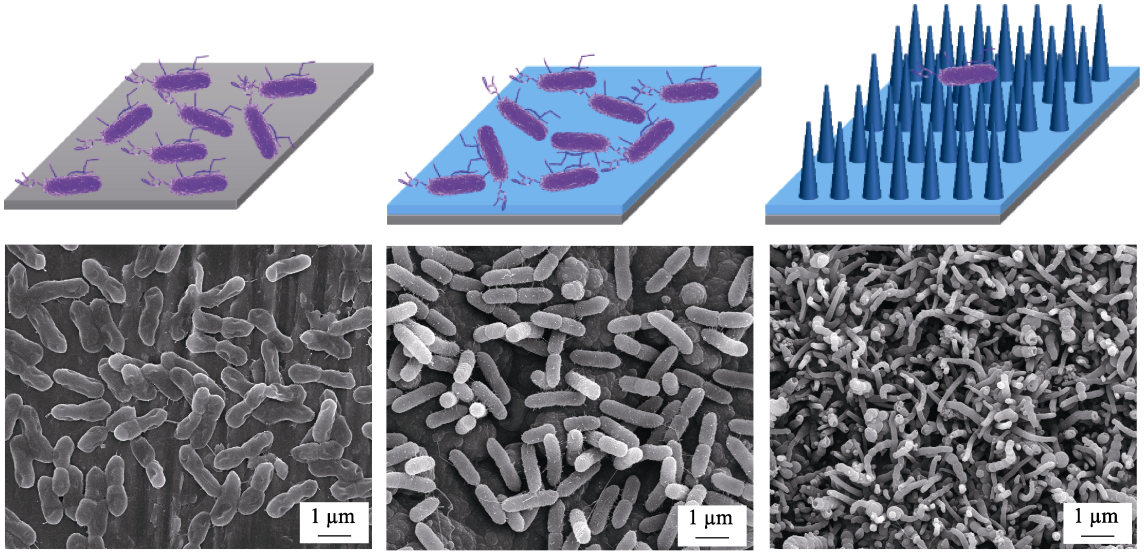
c 纳米锥结构结构聚吡咯　　d 细菌粘附统计结果

图 7　大肠杆菌在 304 不锈钢、平滑结构的聚吡咯涂层和纳米锥结构聚吡咯涂层表面的细菌粘附情况

Fig.7 Adhesion of *escherichia coli* on the surface of 304 stainless steel, smooth-structured polypyrrole coating and polypyrrole coating with nano-cone structure: a) 304 stainless steel; b) smooth structure polypyrrole; c) polypyrrole with nano-cone structure; d) statistical results of bacterial adhesion

相对平滑结构的聚吡咯和未改性的不锈钢表面，具有较强的抗细菌粘附性能。前文已有这段话的描述，多余表面电势分析结果显示，纳米锥结构聚吡咯相对于平滑结构聚吡咯，具有较高的表面电势，这有可能导致细菌与纳米锥结构聚吡咯之间具有较大的排斥力，从而导致细菌很难粘附于纳米锥结构聚吡咯表面。此外，微生物粘附强烈依赖于相互作用表面的疏水-亲水性质。这样的性质影响细菌粘附的热力学过程。

图 8 所示为采用电子显微镜研究细菌在材料表面的粘附情况。结果显示，大量的细菌粘附于不锈钢表面和平滑的聚吡咯表面，但是在纳米锥结构聚吡咯表面几乎不粘附细菌。表面形貌观察结果与平板计数法一致。因此纳米阵列结构的聚吡咯具有抗细菌粘附的性能。



a 304不锈钢　　b 平滑结构聚吡咯　　c 纳米锥结构聚吡咯

图 8　304 不锈钢、平滑聚结构的吡咯和纳米锥结构聚吡咯涂层表面粘附的大肠杆菌的形貌结构

Fig.8 Morphological structure of *escherichia coli* adhering to the surface of polypyrrole coating of 304 stainless steel, smooth polypyrrole and polypyrrole coating with nano-cone structure: a) 304 stainless steel; b) smooth structure polypyrrole; c) polypyrrole with nano-cone structure

3　结论

1）通过简易环保的电化学方法，在 304 不锈钢表面构建了萘磺酸掺杂的纳米锥结构聚吡咯涂层。

2）纳米锥结构聚吡咯涂层具有超疏水性，同时纳米阵列结构的聚吡咯相比于平滑结构的聚吡咯具有更高的表面电势。

3）细菌平板计数法实验说明，沉积纳米锥结构聚吡咯的 304 不锈钢具有抗细菌粘附的性能。同时，电子显微镜结果说明，纳米阵列结构聚吡咯极少粘附大肠杆菌。

参考文献：

[1] HORI K, MATSUMOTO S. Bacterial adhesion: From mechanism to control[J]. Biochemical engineering journal, 2010, 48(3): 424-434.

[2] WEI J, RAVN D B, GRAM L, et al. Stainless steel modified with poly (ethylene glycol) can prevent protein adsorption but not bacterial adhesion[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2003, 32(4): 275-291.

[3] GARRETT T R, BHAKOO M, ZHANG Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces[J]. Progress in natural science, 2008, 18(9): 1049-1056.

[4] 温绍霞，孙竞. 细菌生物膜形成及相关耐药性治疗研究进展[J]. 海南医学, 2014, 25(9): 1331-1333.
WEN Shao-xiao, SUN Jing. Advances in Bacterial Biofilm Formation and Related Drug Resistance Therapy[J]. Hainan Med, 2014, 25(9): 1331-1333.

[5] 万昌秀，段友容，乐以伦，等. 生物材料表面改性抗细菌粘附的方法研究[J]. 四川大学学报(工程科学版), 1999, 32(6): 67-70.
WAN Chang-xiu, DUAN You-rong, YUE Yi-lun, et al. Study on methods of biomaterial surface modification for improving the antibacterial adhesion[J]. Journal of Sichuan University (engineering science edition), 1999, 32(6): 67-70.

[6] 石恒冲，殷敬华. 医用高分子材料抗菌表面构建及在医疗器械中应用[J]. 高分子通报, 2016(9): 196-202.
SHI Heng-chong, YIN Jing-hua. Surface construction of antibacterial property on biomedical polymer material[J]. Chinese polymer bulletin, 2016(9): 196-202.

[7] WANG Z, SU Y, LI Q, et al. Researching a highly anti-corrosion superhydrophobic film fabricated on AZ91D

magnesium alloy and its anti-bacteria adhesion effect[J]. Materials characterization, 2015, 99: 200-209.

[8] HILBERT L R, BAGGE-RAVN D, KOLD J, et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2003, 52(3): 175-185.

[9] BEECH I B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the art methods of study[J]. International biodeterioration and biodegradation, 2004, 53(3): 177-183.

[10] LIU T, DONG L, LIU T, et al. Investigations on reducing microbiologically-influenced corrosion of aluminum by using super-hydrophobic surfaces[J]. Electrochimica acta, 2010, 55(18): 5281-5285.

[11] PRIVETT B J, YOUN J, HONG S A, et al. Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces[J]. Langmuir, 2011, 27(15): 9597-9601.

[12] FOSS B L, GHIMIRE N, TANG R, et al. Bacteria and osteoblast adhesion to chitosan immobilized titanium surface: A race for the surface[J]. Colloids & surfaces B biointerfaces, 2015, 134: 370-376.

[13] DUFRENE Y F. Sticky microbes: Forces in microbial cell adhesion[J]. Trends in microbiology, 2015, 23(6): 376-382.

[14] LI C, BAI H, SHI G. Conducting polymer nanomaterials: Electrosynthesis and applications[J]. Chemical society reviews, 2009, 38(8): 2397-2409.

[15] GOLABI M, TURNER A P F, JAGER E W H. Tuning the surface properties of polypyrrole films for modulating bacterial adhesion[J]. Macromolecular chemistry and physics, 2016, 217(10): 1128-1135.

[16] WANG Z, ZHOU L, YU P, et al. Polydopamine-assisted electrochemical fabrication of polypyrrole nanofibers on bone implants to improve bioactivity[J]. Macromolecular materials and engineering, 2016, 301(11): 1288-1294.

[17] LI Y, BOBER P, TRCHOVÁ M, et al. Polypyrrole prepared in the presence of methyl orange and ethyl orange: Nanotubes versus globules in conductivity enhancement[J]. Journal of materials chemistry C, 2017, 5(17): 4236-4245.

[18] ZHANG J, HAN Y. A topography/chemical composition gradient polystyrene surface: Toward the investigation of the relationship between surface wettability and surface structure and chemical composition[J]. Langmuir, 2008, 24(3): 796-801.

[19] XU L B, CHEN W, MULCHANDANI A, et al. Reversible conversion of conducting polymer films from superhydrophobic to superhydrophilic[J]. Angewandte chemie international edition, 2005, 44(37): 6009-6012.

[20] CHANG J H, HUNTER I W. A superhydrophobic to superhydrophilic in situ wettability switch of microstructured polypyrrole surfaces[J]. Macromolecular rapid communication, 2011, 32(9): 718-723.