DOI: 10.12442/j.issn.1002-185X.20220928

一步热分解法形成的 MoO₃ 在无光条件下的 抗菌性能

王艺卓^{1,2},张欢欢²,赵 惠¹,赵 颖²

(1. 西安石油大学 材料科学与工程学院,陕西 西安 710065)

(2. 中国科学院 深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055)

摘 要: 生物污损是威胁海工材料安全高效服役的重要因素,因此开发环保、成本低廉的防污材料非常必要。通过一步热分解法分别在 450 和 750 ℃制备 α-MoO₃ 粉末材料,即 S450 和 S750。采用 XRD、SEM、FTIR 对样品进行表征。 结果显示,450 和 750 ℃获得的 α-MoO₃ 分别表现为纳米级板状结构和微米级长板状结构。利用平板计数法评价 2 种材 料在无光条件下对铜绿假单胞菌(P. aeruginosa)的抗菌性能。结果显示,S450 和 S750 在浓度为 0.25、0.5、0.75,和 1 mg/mL 时,其抗菌率分别为 27.3%、99%、100%、100%和 16.1%、30.1%、52.3%、73.6%。表明 2 个条件下获得的 α-MoO₃ 在无光条件下均表现出良好的抗菌性能,并且溶液 pH 值随 α-MoO₃ 浓度的升高而降低,Mo 离子溶出量随 α-MoO₃ 浓度 的升高而增加。α-MoO₃ 在无光条件下的抗菌活性源于 H₃O⁺和 Mo 离子溶出的协同作用影响。与 S750 相比,S450 表现 出更高的抗菌率,这可能源于 S450 在溶液中具有更高的溶解度,因而导致更多的 H₃O⁺和 Mo 离子溶出。

关键词: MoO₃; 抗菌性能; 铜绿假单胞菌

中图法分类号: TB34 文献标识码: A 文章编号: 1002-185X(2023)12-4200-05

由于海洋环境的复杂性,海洋工程装备设施在服役 过程中不可避免地受到海水腐蚀和海洋生物污损的威 胁。研究表明,海洋生物污损的形成与早期微生物的附 着密切相关^[1]。因此,如何抑制微生物的附着和生物膜 的快速形成是解决海工钢生物污损问题的关键。目前, 广泛认为解决生物污损最经济、有效的方法是在材料表 面涂覆具有抗菌功能的涂料涂层。其中非常具有代表性 的是将 Ag NPs^[2]、Cu₂O^[3]、ZnO^[4]、TiO₂^[5]等具有抗菌 功能的材料加入到低表面能、仿生、天然产物涂层中制 备复合防污涂料涂层^[6]。然而,这些抗菌材料在应用过 程中也表现出一定的局限性,例如 Ag NPs 成本高; Cu₂O 毒性强,污染环境;TiO₂只有在紫外光照射下才 能发挥较高的抗菌活性,限制了其广泛应用。因此,亟 需开发一种成本低廉、无毒、能广泛应用的纳米抗菌涂 料来满足海洋工程发展的需要。

MoO₃ 为过渡族金属氧化物,具有正交相 (α-MoO₃)、单斜相(β-MoO₃)和六方相(h-MoO₃) 晶体结构^[7],由于具有低毒性、低成本、高稳定性和良 好的抗菌活性等特点,使得其在抗菌领域引起关注^[8-9]。 众多研究表明 MoO₃ 良好的抗菌性能可能源于其可 见光催化抗菌以及溶出的金属 Mo 离子和 H₃O⁺的影 响^[10-13],但无光条件下 MoO₃ 是否仍然具有抗菌性能, 以及溶出的 Mo 离子浓度、溶液 pH 值如何影响抗菌 性能尚未见深入分析和报道。

本研究以四水合钼酸铵为前驱体,通过一步热分 解法分别在 450 和 750 ℃制备 α-MoO₃粉末材料。对 α-MoO₃材料的形貌、微观结构、化学组成等进行系统 地分析,研究在不同热分解温度且全程无光条件下获 得的 MoO₃ 对海洋环境典型微生物铜绿假单胞菌的抗 菌活性的影响,并分析其抗菌机制。

1 实 验

首先称取一定量的四水合钼酸铵 (H₂₄Mo₇N₆O₂₄·4H₂O, 上海麦克林)放入电热恒温干燥箱 (DHG-9055A)中65 ℃ 干燥 24 h,使其脱水。然后将材料置于箱式高温炉 (KSL-1200X-M)中,一部分以 2.5 ℃/min 升温至 450 ℃,

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 广东省自然科学基金(2022A1515011339); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金(2019A1515110631); 深圳市基础研究项目(JCYJ20210324120009026, JCYJ20210324101809026, JCYJ20210324102013036); 陕西省自然科学基础研究计划 (2021JM-403); 陕西省教育厅科研计划项目 (21JC027); 西安石油大学大学生创新创业训练计划 (YCS21212139)

作者简介: 王艺卓, 女, 1998 年生, 硕士, 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055, 电话: 0755-86585229, E-mail: ying.zhao@siat.ac.cn

保温 5 h,随后炉冷至室温;另一部分以 5 ℃/min 升温至 750 ℃,保温 1.5 h,随后炉冷至室温。取出研磨、密封保 存备用。以上 2 个条件下所制备的粉末材料分别命名为 S450 和 S750。制备及保存过程全程避光。

采用 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD, ULTIMIV, Japan)分析制备材料的物相结构。采用场 发射扫描电镜(scanning electron microscope, SEM, ZEISS SUPRA, Germany)观察材料的微观形貌,测试前粉末喷金以增加其导电性能。采用红外光谱仪(infrared spectroscope, FTIR, TENSOR27, Germany)分析材料表面官能团。采用电感耦合等离子发射光谱仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES, PerkinElmer OPTIMA 7000V, America)测试溶出的金属离子浓度。采用台式 pH 计(S220-B, Switzerland)测试溶液 pH 值。

采用平板计数法评价制备材料的抗菌性能。实验细菌 为铜绿假单胞菌(pseudomonas. aeruginosa, P. aeruginosa, 1A00099,中国海洋微生物菌种保藏管理中心)。首先 配置初始浓度为 1×10⁶ CFU/mL 的细菌悬液,然后将 材料加入菌液中,分别配置材料浓度为 0.25、0.5、0.75、 1 mg/mL 的混合菌液,纳米 SiO₂(阿拉丁)作为阴性 对照组。在 37 ℃恒温培养箱中避光培养 24 h 后,将混合 菌液均匀涂在 2216E 琼脂平板上 37 ℃避光孵育 24 h。在 全自动菌落分析仪(Surpere G6R)中统计菌落个数, 抗菌率计算公式如下:

 $\eta = (N_c - N)/N_c \times 100\%$ (1) 式中, η 为抗菌率(%), $N_c \pi N$ 分别是对照组和实验组 的平均菌落数。涂板结束后将剩余的混合菌液用 0.22 nm 滤膜过滤,测量混合菌液的 pH 值与 Mo 离子浓度。

为进一步研究 pH 值和 Mo 离子浓度对 P. aeruginosa 的影响。分别用盐酸和钼酸铵((NH₄)₂MoO₄,上海麦 克林)配置不同 pH 值和 Mo 离子浓度的 PBS 溶液(分 别对应上述 2 种材料浓度为 0.25、0.5、0.75、1 mg/mL 的混合菌液的 pH 值和 Mo 离子浓度)。将以上配置溶 液用 0.22 nm 滤膜过滤后分别与 1×10⁶ CFU/mL 细菌悬 液混合,37 ℃培养 24 h 之后涂板计数。

实验数据采用 T TEST (T 检验)进行统计分析, 结果以平均值±标准偏差表示,显著性差异水平分别 以"***、**、*"来表示"*P*<0.001、*P*<0.01 和 *P*<0.05"。

2 结果与讨论

2.1 材料表征

图 1 为制备的 S450 和 S750 粉末样品的 SEM 形 貌。图 1a 为 S450 样品是由聚集的均匀的板状结构组 成, 堆叠在一起形成交错结构, 尺寸在 100~400 nm

之间。由图 1b 可知, S750 样品为宽度约 5 µm 的长板 状结构,长度为 10~130 µm。由此可以看出热分解温 度由 450 ℃升高至 750 ℃时,所制备的材料尺寸由纳 米级增加到微米级,结构由板状结构转变为长板状结 构。这可能是由于 S750 的合成过程中不均匀形核占主 导地位,导致某些晶面取向择优生长,材料的板状形 貌发展为长板状形貌^[14]。

图 2 为 S450 和 S750 样品的 XRD 图谱。从图中可 以看出 2 种材料的衍射峰与 α-MoO₃(JCPDS 05-0508) 的特征衍射峰一一对应,表明 S450 和 S750 样品均由 α-MoO₃组成。与 α-MoO₃标准卡片的特征峰类似,S450 样品的最强峰对应(021)晶面,而 S750 样品的最强峰 对应(020)晶面。与 S450 样品相比,S750 的(0 k 0) 晶面衍射峰强度相对其它晶面衍射峰强度更强,表明 S750 样品在晶体形成过程中表现出明显的各向异性,晶 面沿择优取向生长^[15]。根据布拉格定律,生长晶面通常 平行于最大原子密度晶面,(0 k 0)晶面相对其他晶面 的晶面间距更大,晶面沿垂直方向生长缓慢而沿水平方 向扩展,最终导致样品的形貌表现为长板状^[14]。此外, XRD 图谱中所有特征峰均为尖锐的衍射峰,表明 2 种条 件下制备的 α-MoO₃都具有良好的结晶度。

图 3 为 S450 和 S750 样品的红外光谱。从图中可 以看出 S450 样品在 986、856、817 cm⁻¹ 处有 3 个特 征峰,相应地 S750 样品在 982、892、804 cm⁻¹ 处有 3 个特征峰。其中 980 cm⁻¹ 附近的伸缩振动峰归因于



图 1 不同热分解温度下获得的 α-MoO₃ 材料的 SEM 形貌

Fig.1 SEM morphologies of α -MoO₃ formed at different thermal decomposition temperatures: (a) S450 specimen (inset is the enlarged image) and (b) S750 specimen



图 2 不同热分解温度下获得的 α-MoO₃ 材料的 XRD 图谱 Fig.2 XRD patterns of α-MoO₃ formed at different thermal decomposition temperatures

Mo=O 键^[16];而 800~900 cm⁻¹处的谱峰是由于对称拉 伸振动 Mo-O-Mo 键中的双配位氧原子引起的。且 S450 样品的 Mo=O 和 Mo-O 键强度显著高于 S750 样 品。红外光谱进一步证实了合成的样品为 MoO₃。Mo-O 键强度可能与样品的溶解度密切相关^[17]。

综上所述,由不同热分解温度获得的 S450 和 S750 样品均由 α-MoO₃组成,但高温(750 ℃)形成的样品 表现出明显的各向异性,形成更大尺寸的微米级的长板 状结构,而低温形成的样品表现出纳米级的板状结构。 2.2 抗菌研究

2.2.1 材料抗菌性能评价

图4为不同浓度的S450和S750样品与P. aeruginosa 共培养24h后的平板计数实验结果。图4a显示随着2 种样品浓度的增加,相应的菌落数逐渐减少,表明细 菌活力与样品浓度密切相关。图4b显示S450浓度为 0.25、0.5、0.75、1 mg/mL时,其抗菌率分别为27.3%、 99%、100%、100%。而在相同浓度条件下,S750样 品的抗菌率依次为16.1%、30.1%、52.3%、73.6%。 由此可见S450和S750样品都表现出良好的抗菌性 能,且S450的抗菌率显著高于S750样品。

图 5 为样品与细菌共培养 24 h 后菌液的 pH 值和 Mo 离子浓度。如图所示, S450 的浓度为 0.25、0.5、 0.75、1 mg/mL 时,菌液的 pH 值分别为 5.1、4.9、4.7、 4.3, Mo 离子浓度分别为 1.6、3.5、4.8、6.5 mmol/L。 S750 的浓度为 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL 时,菌液的 pH 值分别为 5.2, 5.0, 4.7, 4.5, 菌液的 Mo 离子浓 度分别为 1.7, 3.2, 4.6, 5.6 mmol/L。当 S450 或 S750 样品的浓度为 0.25 mg/mL 时,菌液 pH 从初始 7.2 分 别降至 5.1 和 5.2, 随着 S450 或 S750 浓度的增加,菌 液 pH 值持续降低。说明 2 种样品材料溶于水后有 H₃O⁺ 溶出, 使溶液呈酸性。当 S450 或 S750 浓度提高





Fig.3 FTIR spectra of α -MoO₃ formed at different thermal decomposition temperatures







Fig.4 Bacteria colony images (a) and antibacterial rate (b) of α -MoO₃ formed at different thermal decomposition temperatures (SiO₂ is used as control group)

到 1 mg/mL 时, 菌液 pH 值分别降至 4.2 和 4.5。比较 2 种样品溶液的 pH 值, 可以看出相同浓度条件下 S450 的 pH 值比 S750 低, 即 S450 的 H₃O⁺溶出量高于 S750 的 H₃O⁺溶出量。此外, 从图 5 还可以看出, 当 S450 或 S750 的浓度为 0.25 mg/mL 时, 菌液的 Mo 离子浓 度分别为 1.6 和 1.7 mmol/L, 随着 S450 或 S750 浓度 的增加, 菌液的 Mo 离子浓度持续升高。当 S450 或 S750 浓度提高到 1 mg/mL 时, Mo 离子浓度增加到 6.5

和 5.6 mmol/L。由此可见,随着样品浓度的升高, Mo 离子溶出量持续增加。并且在相同浓度条件下, S450 的 Mo 离子溶出量比 S750 显著增加。

本研究中之所以 S450 样品比 S750 样品表现出更 多的 H₃O⁺和 Mo 离子溶出量,可能是由于不同热分解 温度形成的 *a*-MoO₃ 的尺寸和比表面积不同所致。SEM 结果显示 S450 样品由纳米级长板状结构的 *a*-MoO₃ 组 成,其尺寸小于 S750 样品的微米级板状结构。因而相 比于 S750 样品,S450 的比表面积更大并最终在溶液中 表现出更高的溶解度。类似的,Kaptay 等^[18]研究也指 出,金属氧化物的尺寸越小,比表面积越大,在溶液中 表现出的溶解度越高。此外,*a*-MoO₃ 的溶解度还与 Mo-O 和 Mo=O 键的存在密切相关。Pena-Bahamonde 等^[17]的研究表明,溶解度高的 MoO₃ 材料,其 FTIR 谱 中 Mo-O 键更强。在研究中,S450 样品比 S750 样品表 现出更强的 Mo-O 和 Mo=O,因此溶解度更高。

2.2.2 抗菌机制分析

先前的研究表明 MoO₃ 溶于水后,首先在材料表 面形成 H₂MoO₄(公式(3)),然后与水进一步反应产 生 H₃O⁺和 MoO₄²⁻(公式(4))。在平衡态, H₂MoO₄ 转变成 MoO₄²⁻的反应过程是可逆的^[10,19]。

$$MoO_{3}+H_{2}O \Leftrightarrow H_{2}MoO_{4}$$
(3)
$$H_{2}MoO_{4}+H_{2}O \Leftrightarrow H_{3}O^{+}+MoO_{4}^{2-}$$
(4)



图 5 不同热分解温度下获得的 α-MoO₃ 材料在菌液中浸泡 24 h 后溶液的 pH 值及 Mo 离子溶出量

Fig.5 pH value (a) and Mo ion concentration (b) of α -MoO₃ formed at different thermal decomposition temperatures after immersion in the bacterial solution for 24 h

通常在较强的酸性环境中,细菌的生长会受到抑制。这是由于 H₃O⁺通过细菌胞膜扩散进入胞内,破坏了胞内 pH 平衡以及 DNA 螺旋结构等^[10]。而金属氧化物材料对细菌细胞的影响取决于溶液中释放的金属离子的种类和浓度^[20]。MoO₃ 作为可溶性金属氧化物,溶于水后会释放出大量 Mo 离子,从而使细菌胞内 ROS 水平上调,而过量的 ROS 导致氧化应激,造成细菌细胞损伤和死亡^[20-21]。此外,溶出的 Mo 离子还会通过吸附或穿越胞膜导致细菌结构遭到破坏,引起细菌损伤和死亡^[13]。

为进一步证实 pH 值和 Mo 离子浓度对 P. aeruginosa 细菌活力的影响,根据样品与细菌共培养 24 h 后菌液的 pH 值和 Mo 离子浓度(图 5),配置不同 pH 值(4.3、4.5、4.7、4.9、5.0、5.1、5.2)或 Mo 离子浓度(1.6、1.7、3.2、3.5、4.6、4.8、5.6、6.5 mmol/L)的溶液与 细菌共培养 24 h 后,研究菌液 pH 值和 Mo 离子浓度 对 P. aeruginosa 细菌活力的影响。结果(图 6)表明 随着菌液的 pH 值持续降低(从 5.2 降低到 4.2),抗菌率持续升高(从 12%增加到 43%)。另一方面,随着菌液中 Mo 离子浓度持续升高(从 1.6 mmol/L 增加 到 6.5 mmol/L),抗菌率也表现为持续升高(从 0% 提高到 73%)。因此,降低菌液 pH 值或提高菌液中 Mo 离子浓度,均有利于抗菌率的提高。

此外,本研究发现,在相同 pH 值条件下,没有 Mo 离子存在的溶液的抗菌率远低于有 Mo 离子溶液的抗菌



图 6 pH 值及 Mo 离子浓度对抗菌率的影响

Fig.6 Effects of pH value (a) and Mo ion concentration (b) on antibacterial rate

率。类似的,在相同 Mo 离子浓度条件下,低 pH 溶液 比高 pH 值溶液的抗菌率更高。这说明单一 pH 或 Mo 离 子浓度对细菌活力的影响小于两者共同作用的结果。由 此可以推断,本研究中 S450 和 S750 样品的抗菌活性源 于其溶出产生的 H₃O⁺和 Mo 离子的协同作用的影响。

3 结 论

1) 采用一步热分解法在 450 和 750 ℃分别获得板 状和长板状形貌的 α-MoO₃。

2) 2 种 α-MoO₃材料在无光条件下均表现出良好的 抗菌活性。与 750 ℃相比,450 ℃条件下获得的样品溶 出更多的 H₃O⁺和 Mo 离子,因而表现出更高的抗菌率。

3) α-MoO₃ 在无光条件下良好的抗菌活性源于材料 溶出产生的 H₃O⁺和 Mo 离子的协同作用的影响。

参考文献 References

- Li Z, Zhou J Y, Yuan X Y et al. ACS Applied Materials & Interfaces[J], 2021, 13: 47 272
- [2] Wirth S M, Bertuccio A J, Cao F et al. Journal of Colloid and Interface Science[J], 2016, 467: 17
- [3] Ashraf P M, Edwin L. International Biodeterioration & Biodegradation[J], 2016, 115: 39
- [4] Al-Naamani L, Dobretsov S, Dutta J et al. Chemosphere[J], 2017, 168: 408
- [5] Selim M S, El-Safty S A, El-Sockary M A et al. Materials & Design[J], 2016, 101: 218
- [6] Pan Shanshan(潘珊珊), Sun Xiuhua(孙秀花), Wang Ke(王 科) et al. Synthetic Materials Aging and Application(合成材料老 化与应用)[J], 2018, 47: 87

- [7] Desai N, Mali S, Kondalkar V et al. Nanotechnology Nanomedicine & Nanotechnology[J], 2015(6): 1 000 338
- [8] Picarra S, Lopes E, Almeida P L et al. Plos One[J], 2019, 14: 256
- [9] Centa U G, Sternisa M, Visic B et al. Surface Innovations[J], 2021, 9: 256
- [10] Zollfrank C, Gutbrod K, Wechsler P et al. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications[J], 2012, 32: 47
- [11] Xu J, Sun T T, Jiang S Y et al. Applied Surface Science[J], 2018, 447: 500
- [12] Zhao Y J, Xu J, Li Z Y et al. Surface & Coatings Technology[J], 2020, 397: 500
- [13] Xia Zhenhao(夏振昊), Tang Xiaoning(唐晓宁), Zhang Bin (张 彬) et al. Rare Metal Materials and Engineering (稀有金 属材料与工程)[J], 2021, 50(5): 1817
- [14] Alizadeh S, Hassanzadeh-Tabrizi S A. Ceramics International[J], 2015, 41: 10 839
- [15] Sen U K, Mitra S. RSC Advances[J], 2012, 2: 11 123
- [16] Sharma P K, Raghubanshi A S, Shah K. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management[J], 2020, 14: 100 315
- [17] Pena-Bahamonde J, Wu C Z, Fanourakis S K et al. Journal of Catalysis[J], 2020, 381: 508
- [18] Kaptay G. International Journal of Pharmaceutics[J], 2012, 430: 253
- [19] Krishnamoorthy K, Premanathan M, Veerapandian M et al. Nanotechnology[J], 2014, 25: 315 101
- [20] Horie M, Fujita K, Kato H et al. Metallomics[J], 2012, 4: 350
- [21] Liang T, Zeng L L, Shi Y Z et al. Bioactive Materials[J], 2021, 6: 3049

Antibacterial Properties of MoO₃ Formed by One-Step Thermal Decomposition Under the Absence of Light

Wang Yizhuo^{1,2}, Zhang Huanhuan², Zhao Hui¹, Zhao Ying ²

(1. School of Material Science and Engineering, Xi'an Shiyou University, Xi'an 710065, China)

(2. Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Biofouling is an important factor threatening the safe and efficient service of marine engineering materials, so it is of great significance to develop efficient, environmentally friendly, and low-cost antifouling materials. In this research, two kinds of α -MoO₃ powder materials were prepared by one-step thermal decomposition at 450 and 750 °C, which are designated as S450 and S750, respectively. The samples were analyzed by XRD, SEM, and FTIR. Results show that the α -MoO₃ obtained at 450 and 750 °C shows nanoscale plate-like structure and micron-sized long plate-like structure, respectively. Plate counting was used to evaluate the antibiacterial rates of S450 and S750 specimens at Mo ion concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, and 1 mg/mL are 27.3%, 99%, 100%, 100% and 16.1%, 30.1%, 52.3%, 73.6%, respectively, indicating that both α -MoO₃ obtained under two conditions show good antibacterial properties in the absence of light. The pH value of the solution is decreased with increasing of the α -MoO₃ in the absence of light is attributed to the synergistic effect of dissolution of H₃O⁺ and Mo ions. Compared with S750 specimen, S450 specimen exhibits higher antibacterial rate, which may be due to its higher solubility, resulting in the more release of H₃O⁺ and Mo ions. **Key words:** MoO₃; antibacterial property; pseudomonas aeruginosa

Corresponding author: Zhao Ying, Ph. D., Professor, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, P. R. China, Tel: 0086-755-86585229, E-mail: ying.zhao@siat.ac.cn