

# 接触辉光放电等离子体对 *Actinomucor elegans* 的 杀菌作用与机理研究

王婷 万强贵 徐毓鸿 田立鹏 蔡梦 蒲陆梅

(甘肃农业大学理学院 兰州 730000)

**摘要** 雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)感染的毛霉菌病在人群中比较严重,如何杀灭*Actinomucor elegans*显得尤为重要。为了研究接触辉光放电等离子体(CGDP)对*Actinomucor elegans*的杀菌作用与机理,本文通过考察电压、时间、电解质对杀菌效率的影响,确定了杀菌条件。通过分析CGDP对菌落形态、孢子内容物泄漏和过氧化损伤的影响,探讨了CGDP对*Actinomucor elegans*的杀菌机理。结果表明:CGDP对*Actinomucor elegans*的杀菌效果显著,在560 V、15 min、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液的条件下杀菌率( $\eta$ )最高达90.71%;CGDP处理后菌落直径、孢子萌发率、菌丝生物量积累等明显减小;孢子内容物泄漏量、过氧化损伤程度等显著增大;孢子表面皱缩甚至破裂。初步确定,CGDP通过破坏细胞膜完整性使*Actinomucor elegans*失活。本文结果为CGDP在杀灭真菌领域的应用及机理研究提供了一定的参考依据。

**关键词** 接触辉光放电等离子体, *Actinomucor elegans*, 杀菌效率, 细胞膜完整性

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0043

## Study on sterilization effects and mechanisms of contact glow discharge plasma on *Actinomucor elegans*

WANG Ting WAN Qianggui XU Yuhong TIAN Lipeng CAI Meng PU Lumei

(College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT** Mucormycosis infected by *Actinomucor elegans* is relatively serious in the population, so it is urgent need to inactivate *Actinomucor elegans*. In order to investigate the sterilization effect and mechanisms of contact glow discharge plasma (CGDP) on *Actinomucor elegans*, the effects of voltage, time and electrolyte on sterilization efficiency were investigated, and the sterilization conditions were confirmed. The sterilization mechanism of CGDP on *Actinomucor elegans* was explored by analyzing the changes of colony morphology, spore content leakage and peroxidation damage that induced by CGDP treatment. The results showed that CGDP had remarkable sterilization effects on *Actinomucor elegans*, under the conditions of 560 V, 15 min and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution, the sterilization rate ( $\eta$ ) was up to 90.71%, the colony diameter, spore germination rate and mycelial biomass accumulation all decreased significantly after CGDP treatment, while leakage of intracellular components and degree of peroxidation damage increased, and spore surface became shrinking and rupturing. It was concluded that the *Actinomucor elegans* was inactivated due to cell membrane integrity destroying induced by CGDP. The results of this paper could provide a

基金资助: 国家自然科学基金(31860472)资助

第一作者: 王婷,女,1998年10月,2020年获得甘肃农业大学学士学位,目前是甘肃农业大学理学院化学专业的在读研究生

通信作者: 蒲陆梅,硕士生导师, E-mail: pulm@gsau.edu.cn

收稿日期: 初稿 2022-04-19; 修回 2022-06-13

Supported by National Natural Science Foundation of China(31860472)

First author: WANG Ting (female) was born in October 1998 and obtained her bachelor's degree from Gansu Agricultural University in 2020. Now she is a graduate student majoring in chemistry in College of Science, Gansu Agricultural University

Corresponding author: PU Lumei, E-mail: pulm@gsau.edu.cn

Received 19 April 2022; accepted 13 June 2022

reference for the application and mechanism research of CGDP in the field of fungicidal.

**KEYWORDS** Contact glow discharge plasma, *Actinomucor elegans*, Sterilization efficiency, Cell membrane integrity

**CLC** TL99

雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*, *A. elegans*) 又称匍匐放射毛霉、秀丽隐杆线虫, 是一种新兴的真菌病原体<sup>[1]</sup>, 是一种罕见的毛霉菌, 病理学上很少分离。*A. elegans* 广泛存在于土壤、各种植物、谷物(燕麦、大麦、玉米)的根系和动物(兔子和老鼠的粪便、筑巢材料、羽毛及粪便)中<sup>[2]</sup>。*Actinomucor* 属于结合菌门、毛霉目<sup>[3]</sup>。1898年首次由 Schostakowitsch 描述<sup>[4]</sup>, 该属最初有两个种: *A. elegans* 和 *A. taiwanensis*<sup>[5-6]</sup>。2017年真菌索引数据库中放线菌属只有一种名为 *A. elegans* 的物种。回顾毛霉菌病全球性和区域性的研究, 发现根霉属和毛霉菌属种类较多。*A. elegans* 能够引起侵袭性毛霉病, 如2001年从一名无任何基础疾病却患有上颌窦炎的11岁女孩清创手术中分离鉴定出的感染物是 *A. elegans*<sup>[7]</sup>, 这是第一例报道感染毛霉病的病例; 2008年从一位糖尿病患者伤口处分离出了 *A. elegans*<sup>[8]</sup>; 从一位身患再生障碍性贫血的58岁患者中, 检测到感染物为 *A. elegans*<sup>[5]</sup>; 2009年一名30岁因治疗无效死亡的美国士兵右侧躯干、手臂和腿部均分离出了 *A. elegans*<sup>[9]</sup>。

毛霉病是一种常见的霉菌感染, 无论在免疫低下还是正常的个体中, 均可迅速感染, 总死亡率达54%, 散播性感染死亡率达96%<sup>[10]</sup>, 这种高死亡率的原因除了毛霉病在诊断上存在一定的困难外<sup>[11]</sup>, 它的感染方式也是主要原因: 依靠真菌孢子的扩散传播, 较小的孢子可达远端槽隙, 而较大的孢子会停留在鼻子中导致鼻窦炎, 感染之后会扩散到邻近区域, 导致骨破坏, 在疾病晚期, 孢子会侵袭眼眶区域和大脑<sup>[12]</sup>。防治毛霉病的措施有早期诊断, 清创手术, 尤其是后期抗真菌感染治疗以及控制潜在感染条件至关重要<sup>[13]</sup>。所以, 在源头对 *A. elegans* 有效控制和杀灭是非常有必要的。

接触辉光放电等离子体 (Contact glow discharge plasma, CGDP) 是一种新兴的高级氧化技术, 它是通过直流电源的作用在阳极尖端和液体界面之间产生辉光放电<sup>[14]</sup>, 诱发水分子产生多种强氧化性活性物质(如 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{HO}_2\cdot$ 等)<sup>[15]</sup>, 体系中的高能电子及各种活性离子可以在光、电、氧化剂、催化剂等协同下与底物发生反应, 进而达到杀菌效

果<sup>[16]</sup>, 其中 $\cdot\text{OH}$ 是诱发多种反应的基本粒子<sup>[17]</sup>。近年来, 有关辉光放电等离子体杀菌作用的报道日益增多。李兆杰等<sup>[18]</sup>研究了CGDP对食品接触材料上污染真菌的杀菌效果; 刘雅夫等<sup>[19]</sup>对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌杀菌效果的也做了研究; CGDP也能够降解食品中的真菌毒素(立枯丝核菌毒素、T-2毒素和棒曲霉素等), 然而, 对食品的营养品质影响较小<sup>[20-21]</sup>; 杜明远等<sup>[22]</sup>研究了辉光放电等离子体对硫色镰刀菌的杀菌机理。CGDP所具有的操作简单、反应条件温和、环保无残留物等优点, 使其越来越受到研究者的关注, 但对 *A. elegans* 的杀菌作用和机理研究还未见报道。因此, 本文以 *A. elegans* 为研究对象, 研究CGDP在不同条件下对 *A. elegans* 的杀菌效果及机理, 旨在为CGDP在杀灭 *A. elegans* 等真菌领域的应用和机理研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

菌株: 雅致放射毛霉 (*A. elegans*) 由甘肃农业大学理学院实验室提供。

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基(自制); 孟加拉红琼脂购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司; 琼脂粉购自上海源叶生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

等离子体发生装置自制; LDXX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌锅; SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台; 恒温恒湿培养箱; CX21 FS1C 生物显微镜; TU-1901 紫外-可见分光光度计等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株活化

取 *A. elegans* 的冻存样本室温下解冻, 26 °C 下培养 5~7 d, 筛选出长势优良的菌株继续培养, 重复培养 3 次后备用, 同一批多培养几个平板便于后续实验的连续性, 降低实验的差异性。

#### 1.2.2 菌悬液的制备

取一个菌株长势优良的培养皿, 用无菌涂布器

刮取平板上的 *A. elegans* 孢子, 经纱布过滤后转入锥形瓶中, 充分振荡使孢子分散开, 用无菌水稀释并在显微镜下观察计数, 至所需浓度  $2 \times 10^6$  CFU/mL 备用。

### 1.2.3 CGDP 的发生及菌悬液处理

CGDP 发生装置(图 1)由反应器和高压直流电源组成, 反应器的阴极为直径 10 mm 的碳棒, 阳极为直径 0.5 mm 的铂丝。为保持反应器的温度恒定和均匀, 反应器附有循环冷却水浴和磁力搅拌器。接通直流电源, 当电压超过临近值(420 V)时, 阳极尖端开始产生紫色辉光, 当电压升至 540 V 左右时, 辉光放电逐渐稳定, 电极周围的溶液汽化, 在高压电场的作用下产生( $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{H}\cdot$ 等)高能活性粒子, 形成等离子。

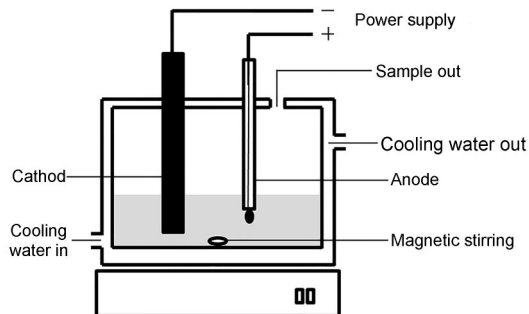


图 1 CGDP 装置示意图  
Fig.1 Schematic diagram of CGDP device

将菌悬液加到反应容器中, 分别在电压 500 V、520 V、540 V、560 V 和 580 V, 处理时间 3 min、6 min、9 min、12 min、15 min 和 18 min, 电解质为  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  时处理, 将处理后的菌悬液使用活菌计数法进行计数, 以未经 CGDP 处理的菌悬液作为对照, 每组重复 3 次, 来研究它们对 *A. elegans* 杀菌效果的影响。最后参考刘智安<sup>[23]</sup>, CGDP 的杀菌率( $\eta$ )按式(1)计算。

$$\eta = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \% \quad (1)$$

式中:  $C_0$  为处理前的菌落数;  $C_1$  为处理后的菌落数。

### 1.2.4 菌落性质的测定

菌落直径参考燕璐等<sup>[24]</sup>的方法并稍作修改: 将处理不同时间的菌悬液滴加到 PDA 平板正中间, 以未处理的菌悬液作对照, 26 °C 下培养。孢子萌发率参考胡林刚等<sup>[25]</sup>的方法并稍作修改: 将处理不同时间的菌悬液滴加到 7 mm PDA 琼脂上, 培养 4 h、6 h、8 h 并在显微镜下观察孢子萌发情况。菌丝生物量积累参考胡晶等<sup>[26]</sup>的方法并稍作修改: 取处理不同时间

菌悬液滴加到 PDB 培养基中, 在摇床中培养 3 d, 抽滤收集菌丝, 并在 80 °C 烘箱下干燥至恒重。产孢量参考关国经等<sup>[27]</sup>的方法并稍作修改: 取处理不同时间菌悬液滴加到 PDA 培养基中 26 °C 下培养 3 d, 用无菌水刮取孢子并在显微镜下计数, 每组重复 3 次。

### 1.2.5 细胞膜完整性及形貌表征

丙二醛(MDA)含量参考邹红梅<sup>[28]</sup>的方法并稍作修改: 取处理不同时间菌悬液, 离心后向上清液中加入 0.67% 的 TBA, 振荡摇匀, 沸水浴反应, 快速冷却离心, 在 450 nm、532 nm 及 600 nm 波长处测定吸光值, 未处理的作对照。麦角甾醇含量参考芦慧<sup>[29]</sup>的方法并稍作修改: 向处理后的菌悬液依次加入去离子水、氯仿、PBS 缓冲液, 振荡后静置分层, 取氯仿相将其浓缩后, 加入甲醇和无水乙醇皂化, 再加入水和石油醚萃取分层后将石油醚相蒸干, 最后用乙醇溶解, 测定 282 nm 波长处吸光度。孢内物质的泄漏量参考盖智星等<sup>[30]</sup>的方法并稍作修改: 取不同时间的菌悬液, 在 4 °C 下离心后取上清液于 260 nm、230 nm 处测定核酸含量, 采用考马斯亮蓝法在 580 nm 处测定蛋白质含量。碘化丙啶(PI)染色参考张蕊等<sup>[31]</sup>的方法并稍作修改: 取不同处理时间菌悬液离心, 加入 1 mL PI 溶液, 在 30 °C 下染色 10 min, 离心除去上清液, 用 PBS 溶液清洗沉淀 3 次, 离心后重新悬浮于 500  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中, 在荧光显微镜下观察。扫描电镜(SEM)观察参考 Yahyazadeh<sup>[32]</sup>的方法并稍作修改: 将处理后的菌悬液离心, 用电镜固定液在 4 °C 下固定后 PBS 清洗, 再用无水乙醇梯度脱水。将干燥后的孢子粘在导电胶上, 喷金处理后, 在真空下观察孢子形态。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CGDP 对 *A. elegans* 的杀菌作用

#### 2.1.1 CGDP 对 *A. elegans* 杀菌效率的影响

CGDP 杀菌效率受到时间、电压及电解质的影响, 结果如图 2 所示。

图 2(a)是在电压一定(560 V)的条件下处理时间对 *A. elegans* 杀菌效率的影响。随 CGDP 处理时间的延长, 杀菌率  $\eta$  升高, 处理 15 min 时,  $\eta$  达到 92.98%, 处理 18 min 后, *A. elegans* 孢子几乎被完全杀灭。这与李兆杰等<sup>[33]</sup>研究辉光放电低温等离子体技术对鱼肉、奶粉等 5 种食品中杀菌试验得出的结

论一致。这是由于随着处理时间的延长,高能粒子与真菌孢子作用机率增多,从而使杀菌效率增高。

电压对 *A. elegans* 杀菌效率的影响如图 2(b) 所示,在时间一定(15 min)的条件下,电压在 500~580 V 的范围内, $\eta$  随电压而升高,电压为 560 V 时, $\eta$  达 90.71%。这与张铮等<sup>[34]</sup>研究的常压介质阻挡放电空气等离子体对金黄色葡萄球菌杀灭效果的结果一致。这可能是由于随着电压的升高,反应体系中单位时间、单位体积内高能活性粒子( $\text{H}_2\text{O}^+$  gas、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{H}$ )数目增多,使杀菌效果增强。

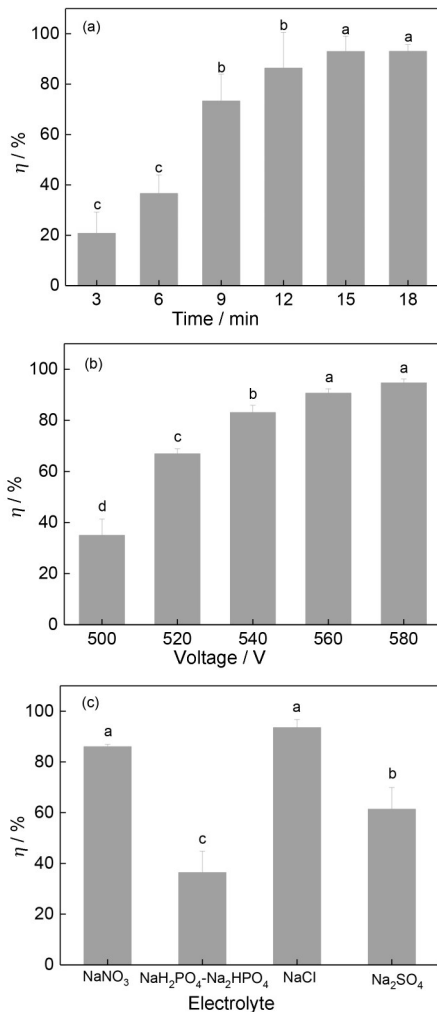


图 2 时间(a)、电压(b)、电解质(c)对  $\eta$  的影响  
Fig.2 Effects of time (a), voltage (b), and electrolyte (c) on  $\eta$

在电压 560 V、处理时间 15 min 的条件下,电解质  $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  对 CGDP 杀菌率的影响如图 2(c) 所示。电解质为  $\text{NaCl}$  时, $\eta$  最高,为 93.57%,原因可能是辉光放电时溶液中的  $\text{NaCl}$  产生  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Cl}_2$  在水溶液中进一步反应生成  $\text{HClO}$ ,其中  $\text{ClO}^-$  是一种强氧化性离子,具有一定的

杀菌作用;其次  $\text{NaNO}_3$  作电解质时, $\eta$  较高,这与  $\text{NO}_3^-$  的强氧化性有关,但它的氧化能力和  $\text{ClO}^-$  相比较弱; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  作为电解质时, $\eta$  为 58.05%,实验过程中溶液的 pH 是逐渐减小的,从 6.81 降到 3.97,由此显示,pH 对杀菌率也有较大的影响,这可能是由于等离子体产生活性物种的存在降低了细胞在低 pH 环境中的防御能力;而当  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  作为电解质时,杀菌率  $\eta$  是 61.38%,这可能是由于  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液是中性溶液, $\text{SO}_4^{2-}$  在溶液中比较稳定,一般不会产生电解发生氧化还原反应,因此不会对 *A. elegans* 的灭活有影响。所以本文将 15 min、560 V、电解质  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  作为杀菌条件。

### 2.1.2 CGDP 对 *A. elegans* 菌落性质的影响

CGDP 对菌落直径、孢子萌发率、菌丝生物量积累和产孢量等菌落性质的影响如图 3 所示。图 3(a) 是 CGDP 处理对菌落直径的影响,随着处理时间的延长菌落直径减小,未经 CGDP 处理的对照组在培养 5 d 的菌落直径为 8.3 cm,CGDP 处理 15 min 后培养 5 d 的菌落直径为 6.6 cm,说明 CGDP 在处理过程中有效地抑制了孢子的生长活性,导致其在相同的生长时间内经 CGDP 处理的菌落直径较小。

真菌孢子在适宜条件下萌发,会形成菌丝进行分裂繁殖,当外界环境不适宜萌发时,孢子会呈休眠状态而生存很长时间。CGDP 对 *A. elegans* 孢子萌发的影响结果如图 3(b) 所示,对照组在 8 h 内几乎全部萌发;CGDP 处理后,孢子萌发率随处理时间的延长而下降,处理 12 min、培养 8 h 后的萌发率为 3.85%,其余孢子均未萌发,处理 15 min、18 min 也无萌发。这说明 CGDP 在处理过程中产生的活性物质可能破坏了孢子内膜或者对萌发比较关键的蛋白,导致孢子失活。

菌丝生物量积累如图 3(c) 所示,未经处理的菌丝生物量积累量是 0.272 1 g,随着处理时间的延长其积累量逐渐减小,处理 15 min 积累量是 0.064 2 g,减少了 76.41%。菌丝是由孢子萌发形成芽管,芽管不断生长成丝状或管状的菌体,在生长过程中可以不断地延伸和分枝。CGDP 处理刺激了孢子萌发的外部环境,阻断了萌发进程,将不会进一步生成菌丝。

CGDP 处理对 *A. elegans* 产孢量的影响如图 3(d) 所示,随着处理时间的延长,*A. elegans* 的产孢量逐渐减少,处理 15 min,产孢量从  $67.33 \times 10^6$  CFU/mL 减少到  $25 \times 10^6$  CFU/mL,减少量为 62.87%。毛霉菌通过孢囊孢子和接合孢子繁殖,孢

子成熟后孢子囊破裂释放孢子,CGDP的处理破坏了适合 *A.elegans* 生长的外部环境,甚至灭活了孢

子,最终导致产孢量的下降。以上结果说明,CGDP对 *A.elegans* 的生长活性具有明显的抑制作用。

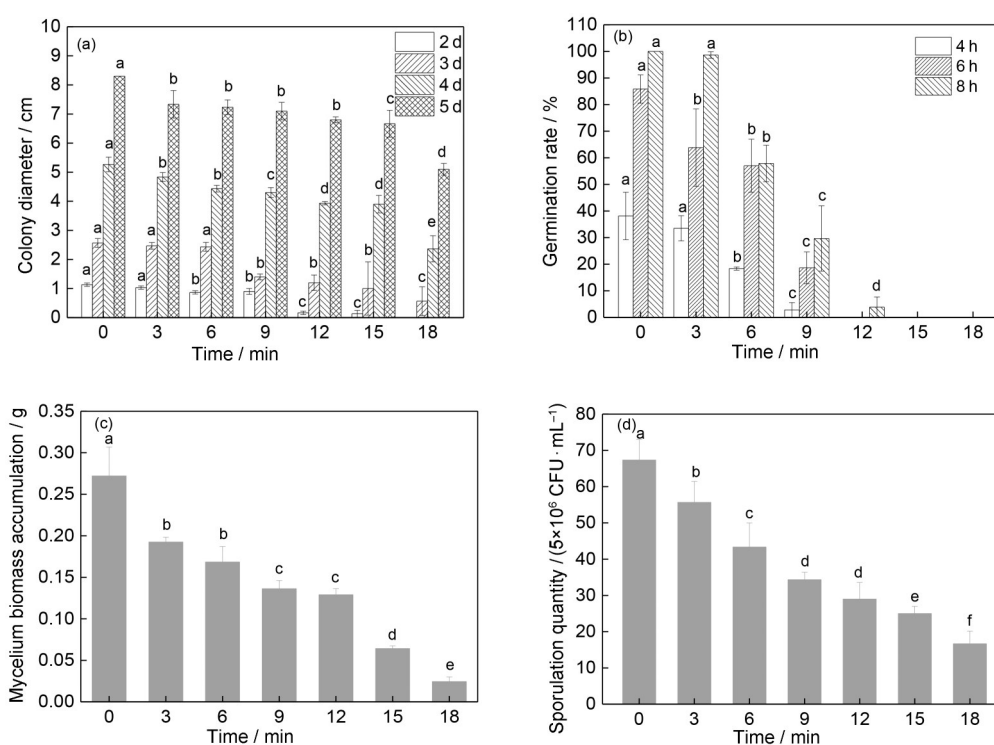


图3 CGDP对 *A.elegans* 菌落形态的影响:(a)菌落直径;(b)孢子萌发率;(c)菌丝生物量积累;(d)产孢量  
Fig.3 Effects of CGDP on colony morphology of *A.elegans*: (a) colony diameter; (b) spore germination rate; (c) mycelial biomass accumulation; (d) sporulation quantity

## 2.2 CGDP对 *A.elegans* 的杀菌机理

### 2.2.1 CGDP对细胞膜氧化损伤的影响

CGDP产生的活性氧化膜的反应即活性氧与生物膜上的物质反应,生成脂质过氧化产物的过程。在细胞被氧化的过程中,脂质过氧化中间产物及最终分解产物丙二醛(MDA)对膜结构和功能会产生严重损伤,导致膜流动性降低<sup>[35]</sup>。氧化产物有MDA和4-羟基壬烯酸(HNE)等,MDA在2017年被世界卫生组织国际癌症研究机构列入致癌物清单中。MDA的产生会引起核酸,蛋白质等生命大分子的交联聚合,具有细胞毒性,并使它们的结构功能和催化功能发生改变,还可以降低膜中不饱和脂肪酸的含量,从而降低膜流动性<sup>[36]</sup>。可以通过MDA含量的变化来测定膜脂质过氧化程度,以间接测定膜系统受损程度。图4显示,CGDP处理时间与MDA的含量成正相关,处理15 min后MDA含量从0.088 1  $\mu\text{mol/L}$ 增加到0.330 2  $\mu\text{mol/L}$ ,增加了274.8%,表明 *A.elegans* 细胞膜的膜脂被CGDP产生的活性物质严重破坏,导致其产物MDA含量急剧

增加,同时也破坏了细胞膜的通透性。产生MDA会从膜上释放,与核酸、蛋白质反应使细胞失活。上述结果表明CGDP的处理可以显著引起膜脂质过氧化损伤,并且处理时间越长,细胞膜损伤越严重。

麦角甾醇是真菌细胞膜中最重要的甾醇,它在调节膜流动性和结构方面起重要作用,其中,90%的游离甾醇存在于细胞膜上,是真菌细胞膜的重要组成成分<sup>[37]</sup>。麦角甾醇主要存在于酵母菌,霉菌等真菌和某些植物中,在真菌生长的过程中,它在膜结构的完整性、膜的流动性以及物质运输等方面起着重要作用<sup>[38]</sup>。事实上,麦角甾醇是真菌胞外囊泡的主要脂质成分,而胞外囊泡是真菌跨细胞壁运输的主要载体,即麦角甾醇是一种短暂的细胞壁成分<sup>[39]</sup>,同时麦角甾醇是微生物细胞膜的重要组成部分,因此可以从甾醇含量的变化判断细胞膜和细胞壁是否有损伤,同时也有研究表明可以通过麦角甾醇的含量来估计真菌的生物量<sup>[40]</sup>。从图5可以看出,CGDP处理时间与麦角甾醇含量成负相关。处理15 min后麦角甾醇含量为0.008 9 mg/mL,相比对照下降了78.97%。这与MDA得到的结果相互印证,因

此可以说明,CGDP 处理有效灭活了 *A. elegans* 孢子,同时麦角甾醇含量与菌丝生物量积累结果相对应。通过麦角甾醇含量的变化证明细胞膜被 CGDP 产生的活性物质破坏。

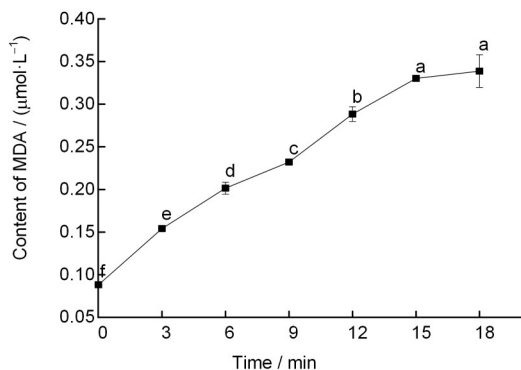


图4 CGDP 处理对 MDA 含量的影响  
Fig.4 Influence of CGDP on MDA content

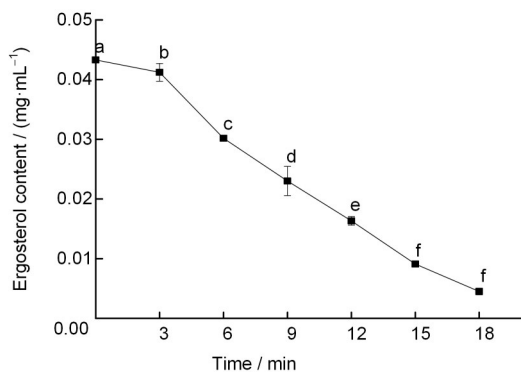


图5 CGDP 处理对麦角甾醇含量的影响  
Fig.5 Effects of CGDP on ergosterol content

### 2.2.2 CGDP 对 *A. elegans* 核酸和蛋白质泄漏的影响

细胞膜是整个细胞的保护层,它是由脂质、蛋白质、多糖等按一定的顺序排列组成的动态薄层结构,平均厚度约 10 nm。脂质和蛋白质约各占膜干重的一半稍弱,多糖不到 10%。当真菌孢子受到外界刺激,细胞膜被破坏后核酸和蛋白质等将会泄漏到细胞外。图 6 显示,随着 CGDP 处理时间的延长,核酸、蛋白质泄漏量均明显增加,处理 15 min 后核酸含量增加 6.208 μg/mL;蛋白质含量增加 0.072 mg/mL。这可能是因为 CGDP 处理时·OH 与细胞膜上的某种物质发生了氧化反应,协同体系中的活性粒子刻蚀细胞,破坏细胞膜完整性导致细胞膜渗透性增大,使核酸、蛋白质和其他细胞器向膜外渗透,最终使细胞灭活。

Kobzev 等<sup>[41]</sup>研究发现,低温等离子体在处理大肠杆菌时,会刺激细胞内的物质释放到细胞外,从

而导致细胞膜的完整性全部或部分被破坏,同时细胞内物质损失不超过 23.6% 就足以使细胞死亡,而 CGDP 处理 3 min 后蛋白质的泄漏量就高达 231.46%,所以 CGDP 有效地灭活了 *A. elegans*。这与 2.2.1 节得到的结果一致,CGDP 处理导致了细胞膜完整性被破坏,使细胞内的生物大分子泄漏。

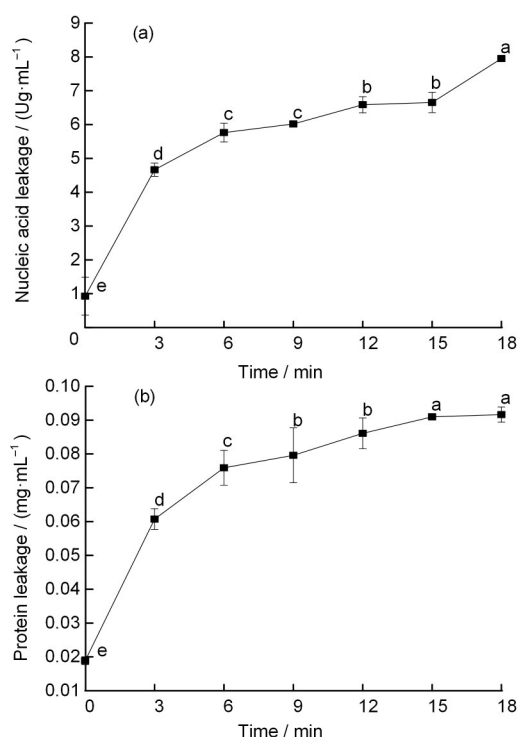


图6 CGDP 对 *A. elegans* 后孢内物质的泄漏量的影响:(a)核酸泄漏量;(b)蛋白质泄漏量  
Fig.6 Effects of CGDP on the amount of intraspinal material leaking from *A. elegans*:  
(a) nucleic acid leakage; (b) protein leakage

### 2.2.3 CGDP 对 *A. elegans* 细胞膜完整性的影响

PI 是一种可对 DNA 进行染色的荧光染料,并且只能穿透破损的细胞膜,进入失活细胞,使细胞发出红色荧光,对于细胞膜完整的细胞不进行染色。因此可作为证明细胞膜完整性是否受损的重要标志,红色荧光越强,表明细胞膜受损程度越高<sup>[31]</sup>。本文为了观察到更明显的结果,将孢子浓度增大至  $5 \times 10^6$  CFU/mL。由图 7(a)和(b)可知,未经 CGDP 处理的孢子未呈现红色的荧光,证明细胞膜未被损坏;从图 7(c)和(d)可以看出,CGDP 处理 15 min, *A. elegans* 孢子的细胞膜几乎都被破坏,染液进入核内对 DNA 进行染色,最终呈现红色的荧光。此外,从图 7(d)也可以看到,荧光强度也不同,表明 CGDP 处理对孢子细胞膜有不同程度的损伤,从图 7(c)和(d)也可得到,最终有 73.58% 的孢子被染色。上述结果

表明,CGDP的处理可以引起真菌细胞膜的氧化损伤,从而破坏细胞膜完整性,最终导致细胞失活。因

此可以推断,CGDP对*A. elegans*孢子活性抑制位点在细胞膜上。

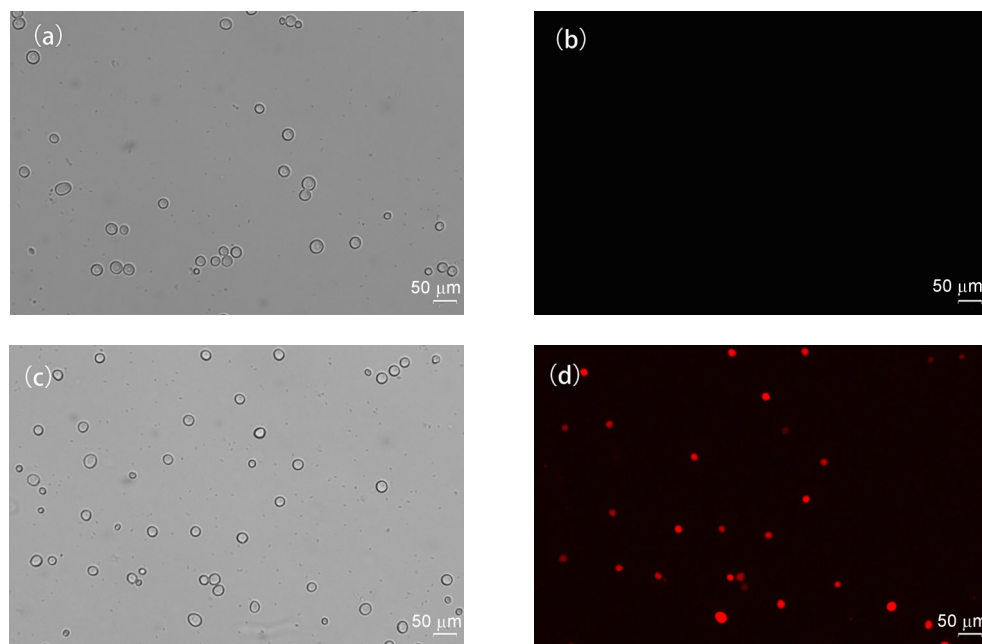


图7 CGDP处理前后*A. elegans*的PI染色图检测孢子细胞膜完整性:(a)明场下未处理的孢子;(b)荧光下未处理的孢子;(c)明场下处理15 min的孢子;(d)荧光下处理15 min的孢子

**Fig.7** Integrity of spore cell membrane was detected by PI staining of *A. elegans* before and after CGDP treatment: (a) Untreated spores in open field; (b) Untreated spores under fluorescence; (c) Spores treated for 15 min in open field; (d) Spores treated for 15 min under fluorescence

#### 2.2.4 CGDP对*A. elegans*孢子形貌的影响

通过扫描电镜可以直观、明显地观察细胞表面的变化。图8是CGDP处理对*A. elegans*孢子表面形貌的影响,可以看出,CGDP对孢子形态的改变比较明显。图8(a)是未处理的孢子,呈球状,饱满,表面完整,有棱状结构,无明显破裂;图8(b)是CGDP处

理15 min后的孢子,表面出现皱缩,并且表面观察到有新物质的出现,推测可能是孢子的渗出物或CGDP与孢子反应的产物。这与Huang等<sup>[42]</sup>研究的环境空气非热等离子体对解淀粉芽孢杆菌孢子失活机制中得到的结论一致,处理后孢子表面出现孔洞,有物质渗出。

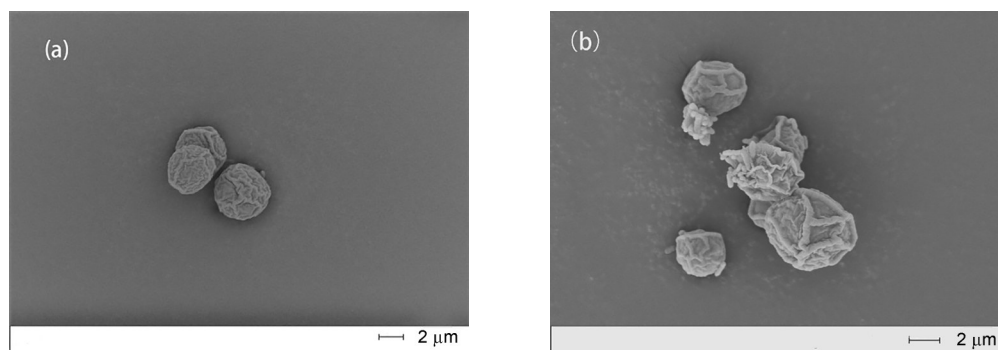


图8 CGDP处理前后*A. elegans*的扫描电镜图:(a)未处理孢子的形态;(b)处理15 min孢子的形态  
**Fig.8** SEM imagines of *A. elegans* before and after CGDP treatment: (a) morphology of untreated spores; (b) morphology of spores treated for 15 min

杜明远等<sup>[43]</sup>研究接触辉光放电等离子体对硫色镰刀菌的杀菌实验中,处理后孢子也出现皱缩、凹陷,甚至出现了细胞膜的破裂。导致这种现象的

原因可能是:(1)CGDP产生的带电粒子聚集在孢子表面,菌悬液作为导体产生斥力,从而灭活孢子;(2)CGDP产生的活性粒子尤其是 $\cdot\text{OH}$ 与孢子反应,

导致孢子失活;(3)CGDP的活性粒子可能与紫外光子协同灭活真菌孢子,造成膜的局部损伤<sup>[44-45]</sup>。其中紫外线的杀菌作用还存在争议,因为在液体等离子体中伴有光辐射,包括紫外线和可见光,有研究认为,其中UV-C在杀菌方面起重要作用<sup>[46]</sup>。

### 3 结论

接触辉光放电等离子体(CGDP)对 *A.elegans* 的灭活效果显著。杀菌率  $\eta$  受放电时间、电压、电解质因素的影响。在CGDP处理 *A.elegans* 时,随电压和时间的延长,杀菌效率逐渐增大,在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为电解质、电压为560 V、处理时间为15 min的条件下,杀菌效率最高达90.71%;在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为电解质、电压为580 V、处理时间为18 min的条件下,可几乎完全杀灭。

CGDP产生的高能活性粒子( $\cdot$ OH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、 $\cdot$ H等)对 *A.elegans* 孢子产生了不可逆转的损伤,尤其是 $\cdot$ OH。在电压为560 V、处理时间15 min、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为电解质的条件下,CGDP处理使膜脂质过氧化产物MDA含量升高0.242 1  $\mu$ mol/L;细胞膜成分麦角甾醇含量下降0.034 19 mg/mL,导致细胞膜完整性被破坏,而使孢子内容物核酸增加5.747 2  $\mu$ g/mL、蛋白质泄漏量增加0.072 1 mg/mL;CGDP处理使孢子的PI染色呈现红色荧光;SEM图观察到细胞被破坏,并有物质释放出来,孢子表面逐渐被侵蚀,随之而来的是生化结构的损伤。

接触辉光放电等离子体是一种有效、简单的灭活 *A.elegans* 的方法,在真菌灭活研究与应用领域具有广阔前景。

**作者贡献声明** 王婷是本研究设计者和实验研究的执行人,完成数据分析和论文初稿的写作;万强贵、徐毓鸿、田立鹏、蔡梦参与实验构思和结果分析;蒲陆梅是实验的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者均已阅读并同意最终的文本。

### 参考文献

- Mahmud A, Lee R, Munfus-Mccray D, et al. *Actinomucor elegans* as an emerging cause of Mucormycosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, **50**(3): 1092-1095. DOI: 10.1128/JCM.05338-11.
- Dorin J, D' Aveni M, Debourgogne A, et al. Update on *Actinomucor elegans*, a mucormycete infrequently detected in human specimens: how combined microbiological tools contribute efficiently to a more accurate medical care[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, **307**(8): 435-442. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.10.010.
- Kubica P A, Rehrauer W M, Sterkel A K. An unusual case of *Actinomucor elegans*: a challenging diagnosis[J]. *The American Journal of Case Reports*, 2020, **21**: e921562. DOI: 10.12659/AJCR.921562.
- Schostakowitsch W. *Actinomucor repens* n. gen. n. sp[J]. *Plant Biology*, 2013, **16**(7): 155-158. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1898.tb06203.x.
- Benjamin C R, Hesseltine C W. The genus *actinomucor* [J]. *Mycologia*, 1957, **49**(2): 240. DOI: 10.2307/3755632.
- Jong S C, Yuan G F. *Actinomucor taiwanensis* sp. nov., form manufacture of fermented soybean food[J]. *Mycotaxon* 1985, **23**: 261-4.
- Davel G, Featherston P, Fernández A, et al. Maxillary sinusitis caused by *Actinomucor elegans*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, **39**(2): 740-742. DOI: 10.1128/jcm.39.2.740-742.2001.
- Khan Z U, Ahmad S, Mokaddas E, et al. *Actinomucor elegans* var. *kuwaitiensis* isolated from the wound of a diabetic patient[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, **94**(3): 343-352. DOI: 10.1007/s10482-008-9251-1.
- Tully C C, Romanelli A M, Sutton D A, et al. Fatal *Actinomucor elegans* var. *kuwaitiensis* infection following combat trauma[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, **47**(10): 3394-3399. DOI: 10.1128/JCM.00797-09.
- Roden M M, Zaoutis T E, Buchanan W L, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2005, **41**(5): 634-653. DOI: 10.1086/432579.
- Kontoyiannis D P, Lewis R E. Invasive zygomycosis: update on pathogenesis, clinical manifestations, and management[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2006, **20**(3): 581-607. DOI: 10.1016/j.idc.2006.06.003.
- Farmakiotis D, Kontoyiannis D P. Mucormycoses[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2016, **30**(1): 143-163. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.011.
- Chamilos G, Lewis R E, Kontoyiannis D P. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic



- malignancy who have zygomycosis[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2008, **47**(4): 503-509. DOI: 10.1086/590004.
- 14 金星龙, 王晓艳, 任红霞, 等. 辉光放电等离子体降解酸性橙及其生物毒性变化[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2017, **50**(1): 79-85.  
JIN Xinglong, WANG Xiaoyan, REN Hongxia, *et al.* Degradation of acid orange 7 and toxicity change to luminescent bacteria during contact glow discharge electrolysis treatment[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science Edition)*, 2017, **50**(1): 79-85.
- 15 王晓艳, 金星龙, 任红霞. 接触辉光放电电解与过硫酸钠联用降解酸性橙[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2021, **54**(1): 17-22.  
WANG Xiaoyan, JIN Xinglong, REN Hongxia. Degradation of acid orange 7 using contact glow discharge electrolysis combined with persulfate[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science Edition)*, 2021, **54**(1): 17-22.
- 16 程煜, 贾蕾蕾, 柳赞雯, 等. 基于等离子体技术的牛仔织物抗菌整理[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2022, **40**(2): 020401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0209.  
CHENG Yu, JIA Leilei, LIU Yunwen, *et al.* Antibacterial finishing treatment of denim fabric based on plasma technology[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2022, **40**(3): 020401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021-0209.
- 17 Wang L, Liu P L, Chen T X. Glow discharge plasma induced dechlorination and decomposition of dichloromethane in an aqueous solution[J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2016, **36**(2): 615-626. DOI: 10.1007/s11090-015-9658-1.
- 18 李兆杰, 徐丽, 刘威, 等. 辉光放电低温等离子体技术对食品接触材料的杀菌研究[J]. *检验检疫学刊*, 2016, **26**(2): 24-26.  
LI Zhaojie, XU Li, LIU Wei, *et al.* Sterilization of several food contact materials by low temperature plasma by glow discharge[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2016, **26**(2): 24-26.
- 19 刘雅夫, 符腾飞, 刘宸成, 等. 低温等离子体对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的杀菌效果及动力学特性[J]. *现代食品科技*, 2021, **37**(12): 127-135. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0302.  
LIU Yafu, FU Tengfei, LIU Chencheng, *et al.* Bactericidal efficacy and kinetics of cold plasma against staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, **37**(12): 127-135. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0302.
- 20 张慧秀. 马铃薯中立枯丝核菌代谢产物的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017: 42.  
ZHANG Huixiu. Study on metabolites of rhizoctonia solani in potato[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017: 42.
- 21 孙艳. 辉光放电等离子体降解T-2毒素和棒曲霉素的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.  
SUN Yan. Degradation of T-2 toxin and patulin by glow discharge plasma[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- 22 杜明远, 龙海涛, 田立鹏, 等. 辉光放电等离子体对硫色镰刀菌的杀菌作用[J]. *食品科学*, 2020, **41**(17): 89-96. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20190828-312.  
DU Mingyuan, LONG Haitao, TIAN Lipeng, *et al.* Fungicidal effect of glow discharge plasma on fusarium sulphureum[J]. *Food Science*, 2020, **41**(17): 89-96. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20190828-312.
- 23 刘智安, 周斐博, 赵巨东, 等. 低频方波脉冲磁场方向对电厂循环冷却水中异养菌杀菌率的影响[J]. *内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版)*, 2013, **42**(6): 658-662. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8735.2013.06.009.  
LIU Zhian, ZHOU Feibo, ZHAO Judong, *et al.* Study on sterilization rate of heterotrophic bacteria in power plant cooling water by changing low frequency square-wave pulsed magnetic fields direction[J]. *Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, **42**(6): 658-662. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8735.2013.06.009.
- 24 燕璐. 体外条件下柠檬酸处理对T.roseum的抑制及部分机理[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.  
YAN Lu. Citric acid inhibits against trichothecium roseum *in vitro* and its partial mechanism[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015.
- 25 胡林刚, 李渐鹏, 李永才, 等. 外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理对马铃薯块茎干腐病的控制及其机理[J]. *中国农业科学*, 2013, **46**(22): 4745-4752.  
HU Lingang, LI Jianpeng, LI Yongcai, *et al.* Control of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on dry rot of potato tuber and possible mechanism of action[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, **46**(22): 4745-4752.
- 26 胡晶, 任怡琳, 陆震鸣. 云芝胞外多糖液体发酵条件的优化[J]. *食用菌*, 2016, **38**(1): 17-18. DOI: 10.3969/j.

- issn.1000-8357.2016.01.007.
- HU Jing, REN Yilin, LU Zhenming. Optimization of liquid fermentation conditions of coriolus versicolor extracellular polysaccharide[J]. *Edible Fungi*, 2016, **38** (1): 17-18. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8357.2016.01.007.
- 27 关国经, 梁贵林, 李继新, 等. 温度对烤烟棒孢霉叶斑病菌生长和产孢量的影响[J]. *中国烟草学报*, 2006, **12** (1): 27-31. DOI: 10.3321/j.issn:1004-5708.2006.01.008.
- GUAN Guojing, LIANG Guilin, LI Jixin, *et al.* Effects of temperature on growth, sporification, and germination of flue-cured tobacco leaf spot causing *C. cassicola* in Guizhou Province[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2006, **12**(1): 27-31. DOI: 10.3321/j.issn: 1004-5708.2006.01.008.
- 28 邹红梅. 微波、乙醇处理对鲜切马铃薯酶促褐变的抑制效果研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019.
- ZOU Hongmei. Effect of microwave, ethanol treatment on enzymatic browning of fresh-cut potatoes[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2019.
- 29 芦慧. 新农抗 702 对植物病原真菌抑菌作用机理的研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2012.
- LU Hui. Study on inhibition mechanism of new agricultural antibiotic 702 on plant pathogenic fungi[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2012.
- 30 盖智星, 王日葵, 贺明阳, 等. 肉桂酸钾对柑橘采后主要病原真菌的抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2016, **42**(3): 109-113. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201603019.
- Gai Zhixing, WANG Rikui, HE Mingyang, *et al.* Antifungal activity of potassium cinnamate against the main postharvest fungal pathogens of citrus fruits[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, **42**(3): 109-113. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201603019.
- 31 张蕊. 臭氧对甜瓜白霉病原菌 *Fusarium sulphureum* 的生长抑制及机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- ZHANG Rui. The inhibition and mechanism on growth of fusarium sulphureum caused fusarium rot of muskmelon[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.
- 32 Yahyazadeh M, Omidbaigi R, Zare R, *et al.* Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **24**(8): 1445-1450. DOI: 10.1007/s11274-007-9636-8.
- 33 李兆杰, 刘小菁, 杨丽君, 等. 辉光放电低温等离子体技术对食品的杀菌及其品质影响研究[J]. *安徽农业科学*, 2015, **43**(18): 310-312, 315. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.18.109.
- LI Zhaojie, LIU Xiaojing, YANG Lijun, *et al.* Sterilization of several foods by glow discharge low temperature plasma and its effects on food quality[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, **43**(18): 310-312, 315. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.18.109.
- 34 张铮, 岳永杰. 常压介质阻挡放电空气等离子体对金黄色葡萄球菌杀灭效果及机理研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2015, **32**(9): 853-856.
- ZHANG Zheng, YUE Yongjie. Study on bactericidal effects and mechanisms of dielectric barrier discharge (DBD) air plasma on *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2015, **32**(9): 853-856.
- 35 于晓光, 倪江, 边淑玲, 等. 酪氨酸和米非司酮对大鼠颗粒细胞膜流动性及线粒体膜电位的影响[J]. *基础医学与临床*, 1999, **19**(2): 69-72.
- YU Xiaoguang, NI Jiang, BIAN Shuling, *et al.* Effects of tyrosine and mifepristone on membrane fluidity and mitochondrial membrane potential of granulosa cell in rats[J]. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 1999, **19**(2): 69-72.
- 36 陈禹兴, 付连双, 王晓楠, 等. 低温胁迫对冬小麦恢复生长后植株细胞膜透性和丙二醛含量的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2010, **41**(10): 10-16. DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2010.10.003.
- CHEN Yuxing, FU Lianshuang, WANG Xiaonan, *et al.* Effect of freezing stress on membrane permeability and MDA content in the re-growth plant of winter wheat cultivars[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, **41**(10): 10-16. DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2010.10.003.
- 37 Zhao J W, Lin W, Ma X H, *et al.* The protein kinase Hal5p is the high-copy suppressor of lithium-sensitive mutations of genes involved in the sporulation and meiosis as well as the ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genomics*, 2010, **95**(5): 290-298. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.02.010.
- 38 曹龙辉, 李晓璐, 赵文红, 等. 麦角甾醇的研究进展[J]. *中国酿造*, 2014, **33**(4): 9-12. DOI: 10.3969/j.issn.0254-5071.2014.04.003.
- CAO Longhui, LI Xiaojun, ZHAO Wenhong, *et al.* Research progress on ergosterol[J]. *China Brewing*, 2014, **33**(4): 9-12. DOI: 10.3969/j.issn.0254-5071.2014.04.003.
- 39 Rodrigues M L. The multifunctional fungal ergosterol[J]. *mBio*, 2018, **9**(5): e01755-e01718. DOI: 10.1128/mBio.01755-18.

- 40 习兴梅, 曾光明, 郁红艳, 等. 真菌生物量指示剂麦角固醇的分离及测定方法[J]. 微生物学通报, 2006, **33**(3): 128-132. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.2006.03.026.  
XI Xingmei, ZENG Guangming, YU Hongyan, *et al.* The techniques of isolation and determination of ergosterol as the indicator of fungal biomass[J]. Microbiology, 2006, **33**(3): 128-132. DOI: 10.13344/j. microbiol. china. 2006. 03.026.
- 41 Kobzev E N, Kireev G V, Rakitskii Y A, *et al.* Effect of cold plasma on the *E. coli* cell wall and plasma membrane [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, **49**(2): 144-149. DOI: 10.1134/s0003683813020063.
- 42 Huang Y H, Ye X P, Doona C J, *et al.* An investigation of inactivation mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in non-thermal plasma of ambient air[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, **99**(1): 368-378. DOI: 10.1002/jsfa.9198.
- 43 杜明远. 辉光放电等离子体对硫色镰刀菌杀菌效果及机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.  
DU Mingyuan. Study on fungicidal effect and mechanism of *fusarium sulphureum* induced by glow discharge plasma[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020.
- 44 Moisan M, Barbeau J, Moreau S, *et al.* Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, **226**(1/2): 1-21. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00752-9.
- 45 Boudam M K, Moisan M, Saoudi B, *et al.* Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2006, **39**(16): 3494-3507. DOI: 10.1088/0022-3727/39/16/s07.
- 46 Ching W K, Colussi A J, Hoffmann M R. Soluble sunscreens fully protect *E. coli* from disinfection by electrohydraulic discharges[J]. Environmental Science & Technology, 2003, **37**(21): 4901-4904. DOI: 10.1021/es034182j.