

等离子体活化水在糠秕马拉色菌灭活中的应用

郝 欣, 刘红霞, 柴守宁

(西安交通大学能源与动力工程学院环境科学与工程系, 710049, 西安)

摘要:针对现有灭活糠秕马拉色菌方法普适性较差, 通常存在依从性低、不良反应及容易产生耐药性等问题, 探索了等离子体活化水在糠秕马拉色菌灭活中的应用。通过低温等离子体技术制取不同类型的等离子体活化水, 探讨物化性质的变化规律; 根据菌落计数法分析糠秕马拉色菌活性在灭活前后的变化规律; 利用检测 DNA 及蛋白质泄漏量、胞外碱性磷酸酶(AKP)浓度以及紫外吸收物质含量等来分析灭活的作用机制。结果表明: 在等离子体活化水中存在大量的活性物种, 包括 H^+ 、 H_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等活性物种; 当气体流量为 5 L min^{-1} 和活化时间为 25 min 时, 能够对糠秕马拉色菌造成明显的灭活效果, 菌落数可降至 $0.98 \text{ lg}(\text{CFU mL}^{-1})$; 导致菌体 DNA 和蛋白质泄漏、胞外 AKP 以及紫外吸收物质含量增加。研究可为等离子体活化水在防治糠秕马拉色菌中的应用提供理论支撑, 有望成为微生物污染防治领域中绿色高效的应用方法。

关键词: 低温等离子体; 糠秕马拉色菌; 灭活作用; 活性物种

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: xxxx-xxxx(XXXX)XX - 0001 - 12

The application of plasma-activated water for inactivating *Malassezia furfur*

HAO Xin, LIU Hongxia, CHAI Shouning

(Department of Environmental Science and Engineering, School of Energy and Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The investigation was motivated by the recognition of the limited applicability of existing methods for inactivating *Malassezia furfur*, which often suffer from low compliance, adverse reactions, and the potential for drug resistance. The application of plasma-activated water in the inactivation of *Malassezia furfur* is explored. Different types of plasma-activated water are produced by low-temperature plasma technology to explore the change rule of physical and chemical properties, and the change rule of bacterial activity before and after inactivation is analyzed according to the colony counting method, DNA and protein leakage, extracellular alkaline phosphatase (AKP) concentration, and ultraviolet absorbing substance content are measured to analyze the mechanism of inactivation. The results indicate that there are a large number of active species present in plasma-activated water, including H^+ , H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , and other active species; When the gas flow rate is 5 L min^{-1} and the activation time is 25 min, it can achieve a significant inactivation effect on *Malassezia furfur*, reducing the colony count to $0.98 \text{ lg}(\text{CFU mL}^{-1})$; This leads to increased leakage of bacterial DNA and proteins, extracellular AKP, and UV-absorbing substances. The study provides theoretical support for the application of plasma-activated water in the prevention and control of *Malassezia furfur*, which is expected to become a green and efficient application method in the field of microbial pollution prevention and control.

Key words: Low-temperature plasma; *Malassezia furfur*; Inactivation; Active species

马拉色菌属是在 19 世纪早期首次被科学家们发现的真菌群体。这一属的微生物属于脂质依赖性酵母, 通常栖息在包括人类在内的温血动物的皮肤上^[1]。在正常情况下, 它们与宿主维持一种共生关系。然而, 当皮肤的屏障功能受到破坏, 或者免疫反应削弱, 又或者是皮肤出现老化等情况时, 这些通常无害的酵母菌有可能转变为致病微生物^[2]。在治疗由糠秕马拉色菌引起的皮肤病症(如头皮屑和脂溢性皮炎)方面, 唑类药物曾一度是主要的治疗手段^[3]。孙丹等^[4]研究证实紫草素可抑制糠秕马拉色菌, 可对人类永生化表皮细胞造成促增殖的作用, 从而延缓银屑病进程。Laokor 等^[5]以高良姜的根茎醇提来抑制马拉色菌, 结果表明有抑菌效果。程露^[6]研究证明在马拉色菌性毛囊炎、花斑糠疹及脂溢性皮炎患者皮损中培养分离出来的马拉色菌对两性霉素 B 等抗真菌药物有耐药现象。Rao 等^[7]以桉树叶为还原剂和封端剂制备了纳米银, 在糠秕马拉色菌模型中表现出抑制作用。但是, 由于这些药物存在不良反应、患者依从性低、疗效不一以及容易产生耐药性等问题, 它们的应用受到了限制。这些挑战催生了对抗真菌药物的深入研究, 目的是寻找更加安全、高效的治疗方案, 以提高对糠秕马拉色菌的杀灭效果。

低温等离子体放电可以产生活性成分^[8], 具有绿色高效的优点, 等离子体已被广泛应用于灭菌和消毒领域。在这一过程中, 活性氧和活性氮分子被认为是主要的杀菌因子。然而, 糠秕马拉色菌作为一种引起脂溢性皮炎、花斑糠疹和毛囊炎等皮肤病的条件性致病菌, 由于等离子体诱导的活性成分穿透力有限, 难以实现彻底的治疗效果, 这大大限制了等离子体在皮肤病治疗领域的应用。水溶液与低温等离子体之间相互作用后生成的、富含多种活性物质的产物被称为等离子体活化水(Plasma-Activated Water, PAW)^[9-10]。气体经

过等离子体发生阶段,产生了物理与化学的反应性结合,生成了自由基、电子、离子及激发态分子^[11-12]。由等离子体产生的这些活性颗粒与水溶液反应,并生成新型的化学混合物,即等离子体活化水^[13]。根据现有的研究,等离子体活化水同样能够有效灭活细菌、病毒和其他微生物^[14-17]。与直接等离子体处理相比,等离子体活化水中的活性成分由于其溶液的均匀性和流体的流动性,可以实现更均匀地分布。此外,特别是与人类健康疾病密切相关的真菌,目前该技术对于糠秕马拉色菌灭活效果以及灭活机制的研究相对较少。

本文研究并探讨了等离子体活化水对糠秕马拉色菌的灭活效果及灭活作用机制。不仅可以为等离子体活化水在微生物污染防治方面提供理论基础和实践指导,而且还可助力开发新型环保灭活剂。

1 实验部分

1.1 主要设备和仪器

本文构建的等离子体射流装置如图1所示。等离子体反应器是针-环放电结构,高压电极是不锈钢针(直径2 mm),介质管是石英管(内径4 mm、外径6 mm、长120 mm),接地电极是介质管外部包裹的铜箔(长50 mm),且距离介质管喷嘴5 mm。高压交流电源的放电功率设定为23 W,高纯氩气作为工作气体。等离子体射流的形成是高压电极与接地电极之间发生气体击穿。

高压交流电源(CTP-2000K,南京苏曼电子有限公司),高压灭菌锅(YX-280D,深圳市良谊实验室仪器有限公司),电热恒温培养箱(303-1A,绍兴市尚城仪器制造有限责任公司),光纤光谱仪(Avantes, Netherlands),紫外分光光度计(SP-1915, Spectrum),多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)。

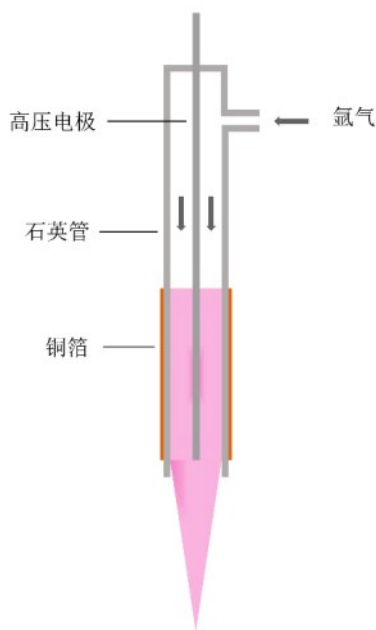


图1 实验装置示意图

Fig.1 Experimental device diagram

1.2 实验菌株

糠秕马拉色菌标准菌株(*Malassezia furfur*),菌种编号:ATCC 14521,购买于上海保藏生物技术中心。

1.3 培养基

为满足糠秕马拉色菌的生长,使用60 g·L⁻¹麦芽汁琼脂、10 g·L⁻¹吐温40、20 g·L⁻¹牛胆粉、2.5 g·L⁻¹甘油单油酸酯制备了培养基。

1.4 实验方法

1.4.1 等离子体发射光谱(OES)诊断

本研究采用发射光谱法(OES)对大气压低温等离子体射流的特性参数进行诊断,该方法广泛应用于识

别等离子体中存在的活性物种及其激发态成分。通过 OES 分析,研究了等离子体射流中激发态活性成分的特征,并结合等离子体与液相之间的反应机制,推测了液相中产生的活性物质。进一步的测量与分析将有助于明确等离子体放电过程中液相中的主要活性成分及其浓度分布。

1.4.2 等离子体活化水的制备

等离子体反应器与自来水液面的距离为 7 mm。在产生的低温等离子体中,活性组分逐渐扩散到自来水中并发生反应,得到等离子体活化水。对自来水分别进行 5、10、15、20、25 min 的等离子体处理,获得不同类型的溶液样本,探索等离子体处理时间与活化效果之间的关系。

1.4.3 溶液物化性质的测定方法

本研究使用 pH 计(雷磁 pH-3C)和电导率计(雷磁 DDS-307),分别对等离子体活化水的 pH 值、氧化还原电位(ORP)和电导率进行了测定。分别采用 E-201F pH 复合电极、501ORP 复合电极和 DJS-1C 铂黑电导电极进行测量。此外,还对活化水的温度进行了参数测定。

表 1 列举了低温等离子体与水溶液作用时产生的常见液相活性粒子以及半衰期^[18]。鉴于短寿命粒子的迅速衰减及本研究使用的是等离子体活化水灭活糠秕马拉色菌,因此本研究仅测定等离子体活化水中代表性长寿命粒子的浓度。而短寿命粒子(含自由基)的定性和定量分析将会在后续的低温等离子体直接灭活糠秕马拉色菌的研究中详细报道。

表 1 低温等离子体与水溶液作用时产生的常见液相活性粒子以及半衰期

Table 1 Common liquid phase active particles produced when low-temperature plasma interacts with aqueous solutions, and their half-lives

活性粒子	化学式	半衰期
长寿命粒子		
过氧化氢	H ₂ O ₂	分钟级别
亚硝酸根	NO ₂ ⁻	分钟级别
硝酸根	NO ₃ ⁻	分钟级别
短寿命粒子		
羟基自由基	OH	纳秒级别
超氧阴离子	O ₂ ⁻	毫秒级别
过氧亚硝酸	ONOOH	毫秒级别
一氧化氮	NO	秒级别
氧原子	O	纳秒级别
单线态氧	¹ O ₂	秒级别

H₂O₂ 浓度测定根据 GB 5009.226-2016^[19]中的钛盐比色法。NO₂⁻ 浓度测定根据 GB 7493-1987^[20]中紫外分光光度法。NO₃⁻ 浓度测定根据 HJ/T 346-2007^[21]采用分光光度法。如图 2(a-c)分别为 H₂O₂、NO₂⁻、NO₃⁻ 标定曲线和拟合方程,根据测量值计算浓度^[22-24]。

1.4.4 糠秕马拉色菌培养

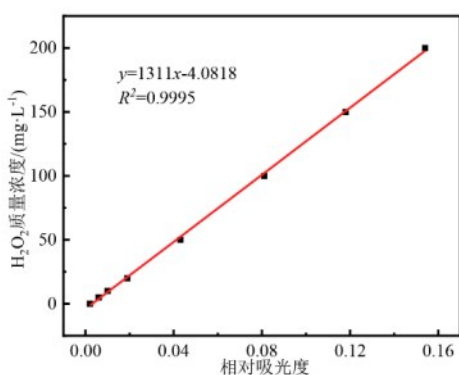
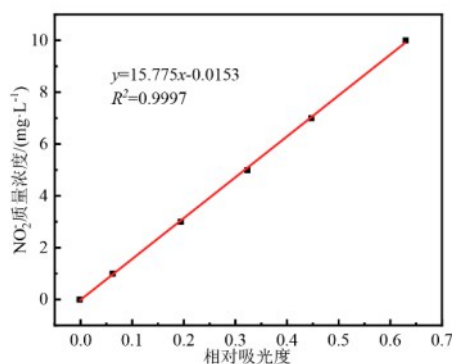
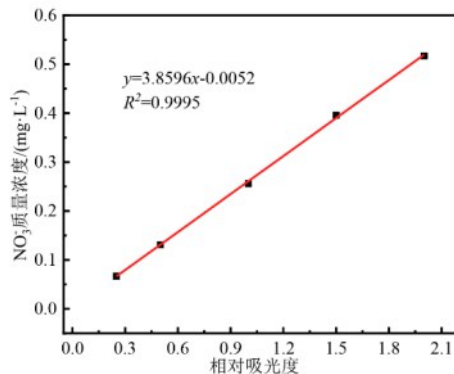
将糠秕马拉色菌斜面(二代)接种于液体培养基中,在 30℃ 下进行振荡孵育 72 h。随后,使用血球计数板在光学显微镜下对糠秕马拉色菌的浓度进行计数。为了获得适当的菌悬液浓度,取适当体积的菌悬液 2000 g, 5 min 离心,弃掉上清液,使用 PBS 缓冲液重悬洗涤菌体沉淀,然后再次进行离心处理,重复此过程三次,最终得到 1×10⁶ CFU·mL⁻¹ 的菌悬液备用。

1.4.5 灭活效果测定方法

菌悬液与等离子体活化水比例为 1:1,灭菌时间为 120 min。利用菌落计数法对固体培养基上的菌落数进行统计,灭活效果采用残活率对数值表示。

$$\lg S = \lg N_0 - \lg N \quad (1)$$

式中: N_0 为灭活前的菌落数(CFU·mL⁻¹), N 为灭活后的菌落数(CFU·mL⁻¹), $\lg S$ 为灭活前后菌落总数降低的对数。

(a)溶液内 H_2O_2 标定曲线(b)溶液内 NO_2^- 标定曲线(c)溶液内 NO_3^- 标定曲线图2 溶液内 H_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 的标定曲线Fig.2 Calibration curves of H_2O_2 , NO_2^- and NO_3^- in solution

此外,人工配制模拟溶液进行灭活实验。分别使用 HNO_3 、 H_2O_2 、 KNO_2 和 KNO_3 配制于等离子体活化水(活化时间分别为5、10、15、20、25 min)具有相同长寿命粒子的模拟溶液。具体为pH模拟溶液、 H_2O_2 模拟溶液、 NO_2^- 模拟溶液和 NO_3^- 模拟溶液。每一组实验都重复三次。

1.4.6 胞内DNA、蛋白质的泄漏量检测

取每组试验中处理后的菌悬液,以2000 g的离心力进行5 min离心。随后,收集上清液测定230 nm和260 nm处的吸光度,并计算DNA和蛋白质的泄漏量^[25-26]。

1.4.7 胞外碱性磷酸酶(AKP)含量测定

对处理后的菌悬液离心后收集上清液,利用胞外AKP试剂盒进行检测^[27]。每组试验中取5 μL 待测溶液,分别加入50 μL 基质液和50 μL 缓冲液,在37°C孵育15 min后加入150 μL 显色剂,立即使用多功能酶标仪在520 nm波长处测定吸光值。

1.4.8 胞外紫外物质吸收的变化

取各组菌悬液样本,经离心处理后,收集并保留上清液。紧接着,使用紫外分光光度计对上清液在 260 nm 波长处进行吸光值测定^[28]。

1.5 统计学处理

所有实验均进行 3 次。应用统计学软件 SPSS 20.0 进行数据分析、处理,统计学方法为 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 气相产物

明确等离子体在液相中生成的活性物质及其浓度,对于分析灭菌效应的机理至关重要。因此,本研究采用发射光谱技术来探究大气压低温等离子体射流中的激发态活性成分。同时,结合等离子体的气液相反应原理,推断出生成在液相中的活性基团。

如图 3(a)所示,是氩气流速 $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 至 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下射流的发射光谱。结果表明,随着氩气流速的提升,发射光谱的强度呈现出增强的趋势。由于本实验使用的是高纯度氩气,因此 OES 检测到在 700 nm 以上的区域有明显的氩谱线活动。为进一步研究氩气流速对发射光谱强度的影响,重点分析了 OH 谱线 (306.3 nm)、 N_2 谱线 (334.8 nm) 和 Ar 谱线 (761.9 nm) 的变化趋势,如图 3(b)所示。结果表明,OH 和 Ar 的发射光谱强度是随氩气流速的提升而增加,并在氩气流速增大的情况下,Ar 的增加速度超过 OH。然而 N_2 的发射光谱强度却呈现出轻微的下降趋势。此现象说明提升氩气流速有利于将大量的激发态和亚稳态氩原子喷射出去,从而形成更多的激发态 OH。因为 OH 活性成分对细胞具有显著的氧化作用,在等离子体灭活过程中起主导作用^[29],所以将后续实验的氩气流速设定为 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2 等离子体活化水的物化性质

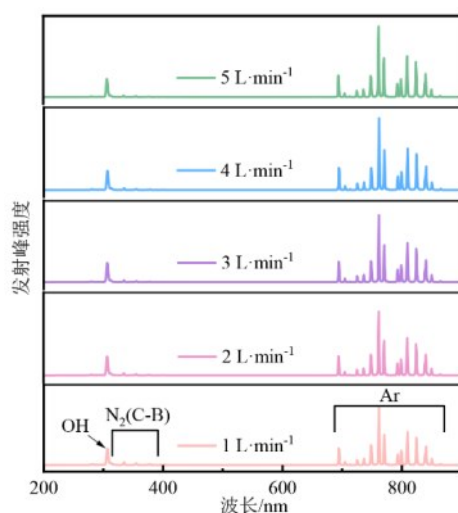
如图 4(a)为不同类型的等离子体活化水的 pH 值、ORP 及电导率的变化趋势。结果显示 pH 值由初始值下降至 6.16,这是由于氮氧化物与水分子反应,生成了亚硝酸盐和硝酸盐。ORP 是反映溶液氧化或还原能力的关键指标,数值大小体现了氧化剂的浓度及氧化能力^[30]。现研究表明,低温等离子体能够灭菌的主要机制是生成的活性成分具有氧化性^[31-35]。结果显示,与对照组相比 ORP 值显著上升至 374 mV。电导率也是反映溶液中离子浓度的方法。等离子体活化 25 min 后,电导率从 $373 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 显著提升到 $2347 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

如表 2 所示,等离子体活化水的温度最高升至 27.4°C ,而环境温度维持在大约 25°C 。鉴于这一温度差异,可以认为由温度变化引起的灭活效果的影响不大,可忽略。

图 4(b)显示经等离子体活化 25 min 后, H_2O_2 的浓度显著提升,从 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $129.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 NO_2^- 的浓度先缓慢上升,随后又迅速提升到 $7.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。相比之下, NO_3^- 的浓度上升较为平稳,活化 25 min 后为 $0.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据等离子体的气液相反应,推测出在液相中长寿活性组分生成的反应公式为



H_2O_2 的生成主要涉及电子解离水分子产生的 OH 自由基的结合,展现出显著的抗菌能力,会造成细胞内 DNA 和蛋白质的泄漏^[16]。 NO_2^- 和 NO_3^- 作为低温等离子体技术制备等离子体活化水的次级产物,在酸性环境中具有较强的杀菌能力^[9]。其中, H_2O_2 与 NO_2^- 反应生成含有显著细胞毒性的 ONOO^- ,可以使细胞壁的通道扩散,从而导致破裂^[36]。 NO_2^- 和 NO_3^- 会同时存在于等离子体活化水中,并能够互相转换。同时,由活性成分产生的氧化应激也是导致细胞活性下降的重要因素之一^[37]。



(a)不同氩气流速时等离子体源的发射光谱

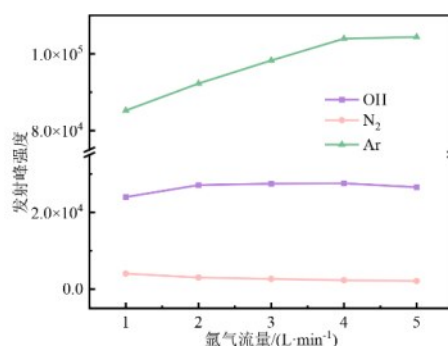
(b)随氩气流速提升时OH、N₂和Ar的发射光谱

图3 等离子体源发射光谱

Fig.3 Plasma source emission spectra

表2 等离子体活化水温度变化

Table 2 Temperature change of plasma-activated water

活化时间/min	0	5	10	15	20	25
温度/°C	25	25.7	26.4	26.8	27.2	27.4

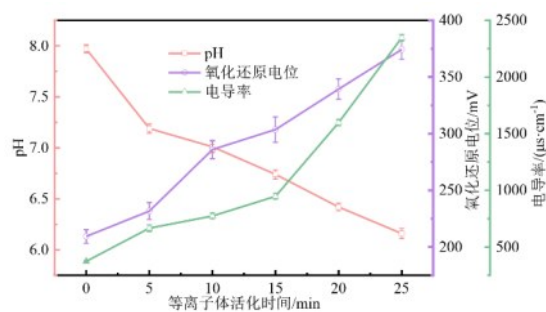
2.3 灭活效果

如图5所示,在灭菌时间固定时,随着等离子体活化时间的延长,菌落存活的数量明显下降。说明活化时间与菌落存活数量之间存在相关性,这可能是由于延长活化时间促进了更多的活性组分生成,导致灭活效果增强。其中在活化时间为25 min时,更是下降到0.98 lg(CFU·mL⁻¹)。综上,活化时间的长短是决定灭活效果的重要因素,活性组分对于灭活效果至关重要。

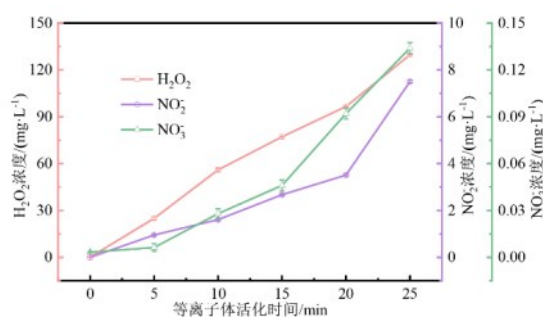
如图6所示,模拟溶液中的H⁺(反映在pH值指数中)和H₂O₂均有灭活效果。其中,H₂O₂的灭活效果最佳,最大下降到2.13 lg(CFU·mL⁻¹);在pH值模拟溶液的灭活效果下,最大下降4.17 lg(CFU·mL⁻¹)。而模拟溶液中的NO₂⁻和NO₃⁻的灭活效果不显著。因此,等离子体活化水对糠秕马拉色菌的最佳灭活效果是溶液中所有活性成分的综合结果所致。

2.4 DNA、蛋白质的泄漏量变化

检测菌体内DNA和蛋白质的泄漏量是评价细胞膜完整性的手段之一,可进一步分析灭活机制。等离子体活化水中存在的大量活性组分不仅会刻蚀菌体表面,而且会破坏细胞外膜的脂蛋白和内部的脂肪酶,从而造成细胞膜的破坏和内含物的泄漏^[38-40]。图7的结果表明,与空白组相比较,随着等离子体活化时间的



(a)等离子体活化水的pH值、ORP及电导率随等离子体活化时间的变化



(b)等离子体活化水中 H_2O_2 、 NO_2^- 及 NO_3^- 浓度随等离子体活化时间的变化

图4 等离子体活化水物化性质的变化规律

Fig.4 The law of change in the physicochemical properties of plasma-activated water

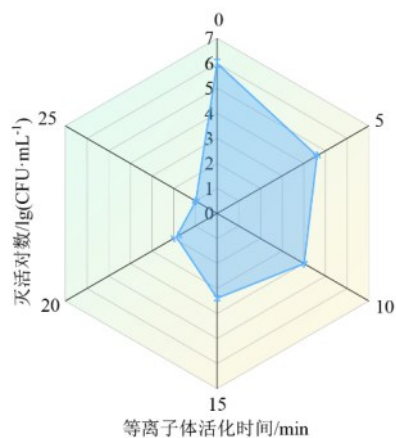


图5 不同处理条件下糠秕马拉色菌的灭活对数

Fig.5 Inactivation logarithm of *Malassezia furfur* under different treatment conditions

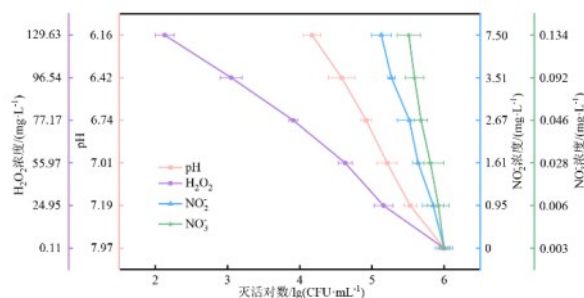
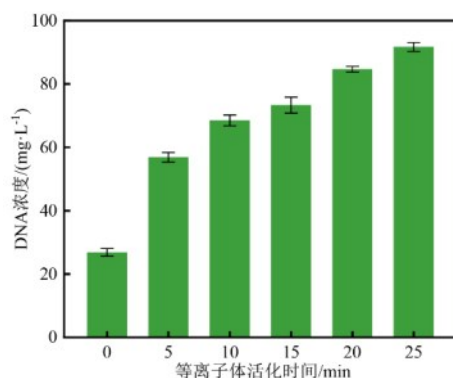


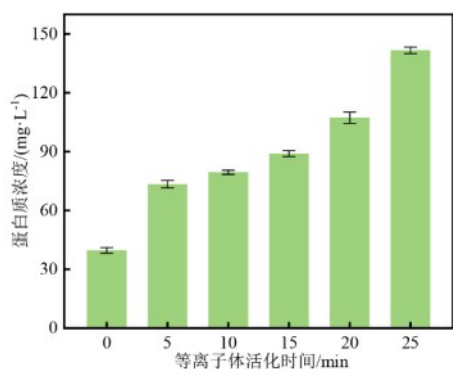
图6 等离子体活化水的各组分对糠秕马拉色菌的灭活作用

Fig.6 The inactivating effect of plasma-activated water components on *Malassezia furfur*

延长,DNA 和蛋白质浓度均明显提升。综上,等离子体活化水中大量的活性成分能够透过细胞壁进入糠秕马拉色菌内部,从而导致菌体凋亡^[41]。



(a)糠秕马拉色菌的DNA泄漏浓度变化



(b)糠秕马拉色菌的蛋白质泄漏浓度变化

图7 糠秕马拉色菌的DNA和蛋白质泄漏量变化

Fig.7 Changes in DNA and Protein leakage of *Malassezia furfur*

2.5 胞外碱性磷酸酶(AKP)的含量变化

AKP是属于细胞壁与细胞膜之间的一种酶,在正常状况其活性难以在胞外检测出。然而细胞壁受到外界攻击时,AKP的渗透性会提升并造成从胞内泄漏到胞外的现象。因此检测胞外AKP含量可以间接反映细胞壁通透性的变化。如图8所示,随着等离子体活化时间的增加,胞外AKP活性也显著提升。综上所述,等离子体活化时间增加导致产生大量的活性成分是有利于刻蚀细胞壁并造成菌体破裂的。

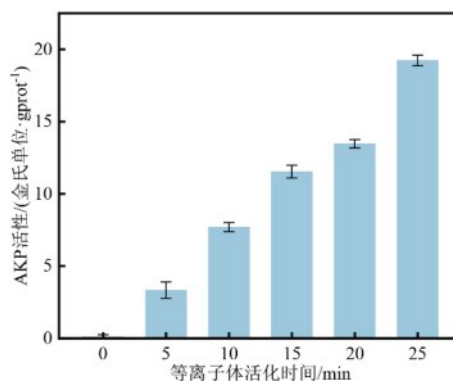


图8 糠秕马拉色菌的AKP活性变化

Fig.8 Changes in AKP activity of *Malassezia furfur*

2.6 紫外吸收物质的变化

菌体在正常情况下,直径不超过 1 nm 的小分子会在细胞壁的微孔自由通行。但是当受到破坏时,会造成细胞壁通透性改变,原本在胞内具有紫外吸收特性的大分子物质会泄漏出去。图 9 结果表明,释放出的紫外吸收物质含量随着等离子体活化时间的增加而增加。具体地,紫外吸收物质含量增加到 6.523 ± 0.003 。因此糠秕马拉色菌的细胞壁能够被破坏,活化时间的延长在灭活过程中有着重要作用。

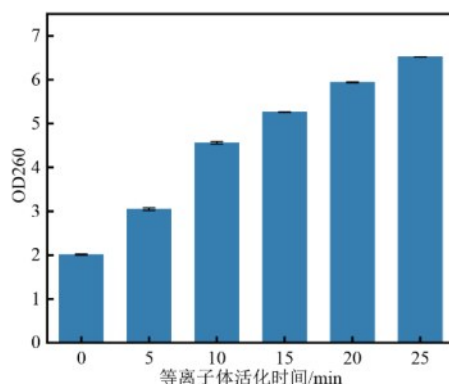


图 9 糠秕马拉色菌的紫外吸收物质变化

Fig.9 Changes in UV-absorbing substances of *Malassezia furfur*

3 讨论

根据研究结果,观察到等离子体活化水中的活性物种浓度与对糠秕马拉色菌的破坏效果之间存在正相关关系。推测的灭菌机制如图 10 所示。活性物种能导致细胞膜脂质过氧化,形成短暂的孔隙,进而损害细胞膜的完整性^[42]。细胞内的活性物种主要通过两种途径积累,一是等离子体活化水中的活性物种通过细胞膜上的瞬时孔隙进入细胞;二是外部氧化应激可诱导细胞氧化应激反应,从而间接增加细胞内活性物种的含量。这些活性物种不仅破坏细胞器,还能攻击大分子(如 DNA、蛋白质)并造成泄漏。等离子体活化水中的活性物种导致糠秕马拉色菌形态发生改变,细胞壁和细胞膜破裂,细胞内物质泄漏,甚至引起细胞核固缩和核酸渗出,最终导致生理功能障碍和细胞死亡。

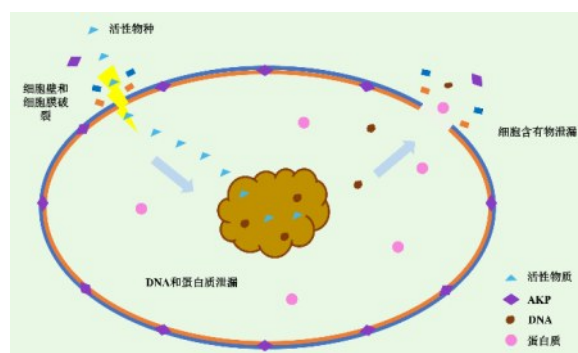


Fig.10 Sterilization mechanism diagram

虽然近年来很多研究表明低温等离子体活化水能够对微生物有效地灭活,但大多研究对象集中于细菌,然而关于低温等离子体活化水对糠秕马拉色菌的影响报道几乎没有。如表 3 展示了等离子体活化水灭活不同微生物的结果,虽然都能够有效灭活,但是仅局限于细菌。本工作研究了等离子体活化水对糠秕马拉色菌的菌落数、菌内含物等影响,证明了在糠秕马拉色菌具有灭活规律的可行性的基础上研究等离子体活化水的作用方式以及灭活机理。

表 3 等离子体活化水(PAW)对不同微生物灭活结果的对比

Table 3 Comparison of the results of inactivation of different microorganisms by plasma-activated water (PAW)

微生物	结果	文献
蜡样芽孢杆菌	2.96 lg(CFU·mL ⁻¹)	[43]
马铃薯表面菌落	2.15 lg(CFU·g ⁻¹)	[44]
脱氧学腐镰刀菌烯醇	降低 34.6%	[45]
绿豆芽上的细菌	2.32 lg(CFU·g ⁻¹)	[46]
糠秕马拉色菌	0.98 lg(CFU·mL ⁻¹)	本文

4 结 论

本文主要以等离子体活化水进行对真菌(糠秕马拉色菌)的灭活,并探讨了其灭菌机理。所得研究结论如下:

(1)等离子体活化水的活化时间为 25 min 时,测得 pH 为 6.16,ORP 为 374 mV,电导率为 2347 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,且含有大量的 H^+ 、 H_2O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等活性物种。

(2)等离子体活化水对糠秕马拉色菌的灭活效果最优可下降到 0.98 lg(CFU·mL⁻¹)。

(3)等离子体活化水处理后能破坏糠秕马拉色菌的细胞壁和细胞膜,从而形成短暂的通道,导致 DNA 和蛋白质泄漏、胞外碱性磷酸酶(AKP)以及紫外吸收物质的生成,最终致使糠秕马拉色菌无法生存。

参考文献:

- [1] RAMÍREZ A M C, AMÉZQUITA A, JARAMILLO J E C C, et al. Analysis of *Malassezia* lipidome disclosed differences among the species and reveals presence of unusual yeast lipids [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 338.
- [2] GOH J P Z, IANIRI G, HEITMAN J, et al. Expression of a *Malassezia* codon optimized mCherry fluorescent protein in a bicistronic vector [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 367.
- [3] ANGIOLELLA L, CARRADORI S, MACCALLINI C, et al. Targeting *Malassezia* species for novel synthetic and natural antidandruff agents [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24(22): 2392 – 2412.
- [4] 孙丹,傅宏阳,杨晓红,等. 紫草素对糠秕马拉色菌作用下 HaCaT 细胞增殖的影响及其对缺氧诱导因子 1 α 表达的调控 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2022, 51(5): 271 – 275.
- [5] LAOKOR N, JUNTACHAI W. Exploring the antifungal activity and mechanism of action of Zingiberaceae rhizome extracts against *Malassezia furfur* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 279: 114354.
- [6] 程露. 分离自不同疾病的同种马拉色菌对抗真菌药物药敏结果比较研究[D]. 昆明医科大学, 2016.
- [7] RAO K J, PARIA S. Anti-*Malassezia furfur* activity of natural surfactant mediated in situ silver nanoparticles for a better antidandruff shampoo formulation [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(13): 11064 – 11069.
- [8] 许子牧. 大气压低温等离子体失活金黄色葡萄球菌及其机理研究[D]. 中国科学技术大学, 2015.
- [9] MA R, WANG G, TIAN Y, et al. Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce [J]. *Journal of hazardous materials*, 2015, 300: 643 – 651.
- [10] SHEN J, SUN Q, ZHANG Z, et al. Characteristics of DC gas-liquid phase atmospheric-pressure plasma and bacteria inactivation mechanism [J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2015, 12(03): 252 – 259.
- [11] RICHMONDS C, WITZKE M, BARTLING B, et al. Electron-transfer reactions at the plasma-liquid interface [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(44): 17582.
- [12] XU Y, TIAN Y, MA R, et al. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus* [J]. *Food chemistry*, 2016, 197(Pt. A): 436 – 444.
- [13] ZHOU R, ZHOU R, PRASAD K, et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxynitrite [J]. *Green Chemistry*, 2018, 20(23): 5276 – 5284.
- [14] 覃思,王闰宁,李虎,等. 等离子体射流和等离子体活化水对变形链球菌灭菌效果的研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2023, 40(3): 559 – 565.

- [15] XIANG Q S, KANG C D, ZHAO D B, et al. Influence of organic matters on the inactivation efficacy of plasma-activated water against *E-coli* O157:H7 and *S-aureus* [J]. Food Control, 2019, 99: 28 – 33.
- [16] XIANG Q S, KANG C D, NIU L Y, et al. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of plasma-activated water against *Pseudomonas deceptionensis* CM2 [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 96: 395 – 401.
- [17] CHEN T P, SU T L, LIANG J F. Plasma-activated solutions for bacteria and biofilm inactivation [J]. Current Bioactive Compounds, 2017, 13(1): 59 – 65.
- [18] LU X, KEIDAR M, LAROSSI M, et al. Transcutaneous plasma stress: From soft-matter models to living tissues [J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2019, 138: 36 – 59.
- [19] 食品安全国家标准食品中过氧化氢残留量的测定:GB 5009226 – 2016[S].
- [20] 水质亚硝酸盐氮的测定分光光度法:GB 7492 – 1987[S].
- [21] 水质硝酸盐氮的测定紫外分光光度法(试行):HJ/T 346 – 2007[S].
- [22] LUKES P, DOLEZALOVA E, SISROVA I, et al. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H_2O_2 and HNO_2 [J]. Plasma Sources Science and Technology, 2014, 23(1): 015019.
- [23] JUDÉE F, SIMON S, BAILLY C, et al. Plasma-activation of tap water using DBD for agronomy applications: Identification and quantification of long lifetime chemical species and production/consumption mechanisms [J]. Water Research, 2018, 133: 47 – 59.
- [24] RATHORE V, PATEL D, BUTANI S, et al. Investigation of physicochemical properties of plasma activated water and its bactericidal efficacy [J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2021, 41(3): 871 – 902.
- [25] 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(03):109 – 113.
- [26] LV F, LIANG H, YUAN Q, et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms [J]. Food research international, 2011, 44(09): 3057 – 3064.
- [27] HAJDU T, SZABÓ K, JAKAB A, et al. Biophysical experiments reveal a protective role of protein phosphatase Z1 against oxidative damage of the cell membrane in *Candida albicans* [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2021, 176: 222 – 227.
- [28] 董洁洁. 凤仙花中1,4-萘醌类成分分离纯化及其抑菌机理的初步研究[D]. 北京中医药大学,2019.
- [29] SUN W T, LI G, LI H P, et al. Characteristics of atmospheric-pressure, radio-frequency glow discharges operated with argon added ethanol [J]. Journal of Applied Physics, 2007, 101(12): 123302.
- [30] MCPHERSON L L. Understanding ORP's role in the disinfection process [J]. Water-Engineering & Management, 1993, 140: 29 – 31.
- [31] TIMOSHKIN I V, MACLEAN M, WILSON M P, et al. Bactericidal effect of corona discharges in atmospheric air [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2012, 40(10): 2322 – 2333.
- [32] LI J, SAKAI N, WATANABE M, et al. Study on plasma agent effect of a direct-current atmospheric pressure oxygen-plasma jet on inactivation of *E. coli* using bacterial mutants [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2013, 41(4): 935 – 941.
- [33] LAI W S, LAI H R, KUO S P, et al. Decontamination of biological warfare agents by a microwave plasma torch [J]. Physics of Plasmas, 2005, 12(2): 023501.
- [34] ZHANG Q, LIANG Y D, FENG H Q, et al. A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage [J]. Applied Physics Letter, 2013, 102: 203701.
- [35] SUROWSKY B, FROHLING A, GOTTSCHALK N, et al. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 174: 63 – 71.
- [36] ZHANG Z L, SHEN J, CHENG C, et al. Generation of reactive species in atmospheric pressure dielectric barrier discharge with liquid water [J]. Plasma Science and Technology, 2018, 20(4): 61 – 66.
- [37] QI Z H, TIAN E Q, SONG Y, et al. Inactivation of *Shewanella putrefaciens* by plasma activated water [J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2018, 38(5): 1035 – 1050.
- [38] 陈玥. 低温等离子体对生鲜湿表面杀菌研究及装置开发[D]. 天津科技大学,2017.
- [39] ARANA I, SANTORUM P, MUELA A, et al. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy

- through the effect on *Escherichia coli* membranes [J]. *Journal of applied microbiology*, 1999, 86(5): 883 – 888.
- [40] 朱育攀. 大气压低温等离子体对金黄色葡萄球菌的杀菌效应研究[D]. 郑州大学, 2019.
- [41] BHUNIA A. *Microbial foodborne pathogens: mechanisms and pathogenesis*, second edition, springer-nature [J]. *Microbial Foodborne Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, Second Edition, Springer-Nature, 2018.
- [42] KANEKO T, SASAKI S, TAKASHIMA K, et al. Gas-liquid interfacial plasmas producing reactive species for cell membrane permeabilization [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2017, 60(1): 3 – 11.
- [43] 白妍. 等离子体活化水对蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)芽孢的杀灭效果与机理研究[D]. 浙江大学, 2020.
- [44] 沈超怡, 吴清燕, 饶景珊, 等. 等离子水处理对马铃薯杀菌保鲜效果的影响[J]. *包装工程*, 2019, 40(19): 9 – 15.
- [45] CHEN D, CHEN P, CHENG Y, et al. Deoxynivalenol decontamination in raw and germinating barley treated by plasma-activated water and intense pulsed light [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2019, 12(02): 246 – 254.
- [46] XIANG Q, LIU X, LIU S, et al. Effect of plasma-activated water on microbial quality and physicochemical characteristics of mung bean sprouts [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2019, 52, 49 – 56.