

介质阻挡放电等离子体对消除灰葡萄孢菌的机理研究

乔艺颖 李莹艳 董露露 柳佳清 龙海涛 蒲陆梅

(甘肃农业大学理学院 兰州 730000)

摘要 本研究系统评估了介质阻挡放电等离子体 (Dielectric barrier discharge, DBD) 对 *B. cinerea* 的灭菌效果及其作用机制。首先根据不同处理时长与电压对灭菌效率的影响, 确定出最优工艺参数; 随后从菌落性质、孢子结构、细胞膜完整性等方面解析 DBD 的杀菌机制。结果显示, 孢子悬浮液浓度为 2×10^6 CFU/mL 时, 在 60 s、10 kV 条件下, 灭菌率高达 99.75%。在 DBD 处理后, *B. cinerea* 的菌落直径、产孢量、菌丝生物量及麦角甾醇含量均显著下降; 细胞膜渗透性增强, 蛋白质与核酸渗漏量、丙二醛含量及碘化丙啶荧光强度均提高; 同时, 活性氧水平上升, 而二乙酰荧光素染色完全缺失。扫描电镜和透射电镜观察进一步证实, DBD 处理导致孢子细胞膜破裂、内部结构受损并出现内容物流失。综上, DBD 通过多重损伤途径破坏 *B. cinerea* 的细胞膜和超微结构, 实现对病原菌的高效灭活。

关键词 灰葡萄孢, 介质阻挡放电, 灭菌效果, 机制

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0123

CSTR: 32195.14.j.JRRRP.1000-3436.2025-0123

引用该文:

乔艺颖, 李莹艳, 董露露, 等. 介质阻挡放电等离子体对消除灰葡萄孢菌的机理研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, XXXX, XX(XX): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0123.

QIAO Yiyang, LI Yingyan, DONG Lulu, *et al.* Study on the mechanism of eliminating *Botrytis cinerea* by dielectric barrier discharge plasma[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, XXXX, XX(XX): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0123.



Study on the mechanism of eliminating *Botrytis cinerea* by dielectric barrier discharge plasma

QIAO Yiyang LI Yingyan DONG Lulu LIU Jiaqing LONG Haitao PU Lumei

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

ABSTRACT In this study, the sterilization efficiency and underlying mechanism of dielectric barrier discharge (DBD) plasma against *B. cinerea* were systematically evaluated. The optimal treatment parameters were first determined based on the effects of treatment duration and voltage on inactivation efficiency. Subsequently, the fungicidal mechanism of DBD was investigated by analyzing changes in colony morphology, spore ultrastructure, and cell membrane integrity. The results showed that with a spore concentration of 2×10^6 CFU/mL, an inactivation

基金资助: 国家自然科学基金 (31860472) 资助

第一作者: 乔艺颖, 女, 2001年9月出生, 2024年于天津理工大学获得学士学位, 现为甘肃农业大学硕士研究生, 制药工程专业, E-mail: 2292068617@qq.com

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

收稿日期: 初稿 2025-12-28; 修回 2026-02-28

Supported by National Natural Science Foundation of China (31860472)

First author: QIAO Yiyang (female) was born in September 2001, obtained her bachelor's degree from Tianjin University of Technology in 2024, and now she is a graduate student of Gansu Agricultural University, majoring in pharmaceutical engineering, E-mail: 2292068617@qq.com

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

Received 28 December 2025; accepted 28 February 2026

rate of up to 99.75% was achieved at 10 kV and 60 s. After DBD treatment, the colony diameter, sporulation quantity, mycelial biomass accumulation, and ergosterol content of *B. cinerea* were significantly reduced. Meanwhile, cell membrane permeability increased, accompanied by elevated protein and nucleic acid leakage, higher malondialdehyde (MDA) content, and enhanced propidium iodide (PI) fluorescence intensity. Reactive oxygen species (ROS) levels were markedly increased, whereas fluorescein diacetate (FDA) staining was completely lost. Observations via scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) further confirmed that DBD treatment caused spore membrane rupture, ultrastructural damage, and leakage of intracellular contents. Overall, DBD effectively inactivates *B. cinerea* through multiple damage pathways, including disruption of spore morphology, cell membrane integrity, and internal structures.

KEYWORDS *Botrytis cinerea*, Dielectric barrier discharge, Elimination, Mechanism

CLC TL99

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 隶属于核盘菌目和核盘菌科, 是一种属于寄生与腐生兼性类型的丝状真菌, 其分生孢子能够利用气流完成远距离的传播^[1]。该病原菌寄生范围极广, 可侵染超过 1 400 种双子叶植物和单子叶植物^[2], 其特征性病理集中于为宿主组织软腐及表面灰色霉层的形成^[3], 对果蔬类经济作物危害尤甚, 导致显著的产量和品质损失。致病过程中, *B. cinerea* 通过分泌细胞壁降解酶以破坏植物初级物理屏障, 同时释放毒素损伤宿主细胞, 二者协同作用促进侵染致病^[4], 此外, *B. cinerea* 更易侵染糖分高的部位, 如花器和幼果^[5], 并在 18~23 °C、大气湿度 >85% 的冷凉条件中迅速繁殖^[6]。由 *B. cinerea* 诱发的灰霉病是树莓产业中最具破坏性的生物胁迫因素之一, *B. cinerea* 在树莓营养生长过程中易侵染花器和叶片, 在采后过程借助机械损伤造成的微裂口侵染作物组织^[7], 其菌丝体能够在田间作物残体的组织中持续存活并长期定殖, 而病害传播速度明显超过标准防控措施的临界响应值, 引发田间与贮藏环境下的病原体控制难度大幅提升^[8]。目前针对 *B. cinerea* 的主要防治方式包括物理处理、生物学方法和化学试剂处理。然而在果蔬采后病害控制中, 人工合成杀真菌剂仍占主导地位。尽管化学药剂使用便捷、成本可控, 但其过量施用可能影响授粉效率^[9]、破坏土壤微生物群落平衡^[10]、诱导病原菌耐药性^[11], 且难以在自然环境中迅速降解, 易造成长期生态风险。由此可见, 开发兼具高效、安全及环境友好特性的替代技术, 对于实现农业生产与生态保护的协同发展至关重要。

介质阻挡放电等离子体 (Dielectric barrier discharge, DBD) 是一种通过电极间设置介质层以

维持稳定放电的常压等离子体技术, 当电极间施加高电压时, 电极间的工作气体 (如氧气、氮气或氩气等) 会被击穿, 形成富含高能电子与反应活性粒子的非平衡态等离子体^[12-13]。在常压条件下, DBD 等离子体以均匀的微放电丝阵列分布于电极间隙, 可直接作用于固体表面或气/液体系, 实现高效处理^[14]。该工艺核心作用源于等离子体内大量活性粒子 (如·OH、O₃及 RONS) 所诱导的表面物理与化学效应。DBD 技术借此可有效调控并优化材料表面性质, 可显著增强材料的润湿性、油墨附着力与复合界面结合力^[15]。此外, 这一特性在处理水体环境时同样适用, 并展现出卓越效果。用 DBD 技术对牛仔布工业废水中有机污染物进行降解, 处理时长在 8~60 min 时, 废水中的亚甲基蓝、靛蓝、刚果红、结晶紫和亚甲基蓝等染料的降解效率达到 86.3%~97.8%, 在最佳处理条件下, 该技术对原生废水和工业废水 COD 的去除率分别高达 97.65% 和 98.1%^[16]。在微生物控制方面, DBD 在水体中的灭菌效果已被多项研究证实。例如, 在短距离 (5 mm) 内对不锈钢表面进行处理, 能够使大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生物膜中的存活单元数量降低至 10⁻⁴~10⁻⁵, 其作用机制主要依赖 RONS 对生物膜基质及微生物结构的协同破坏作用^[17]。

尽管 DBD 技术已在材料改性、水体修复与细菌生物膜灭活等领域显示出优异性能, 但其对植物病原真菌 *B. cinerea* 的灭活效果及作用机制仍缺乏系统研究。因此, 本研究旨在全面评估不同 DBD 处理电压和处理时间对 *B. cinerea* 的杀菌效率, 并通过测定孢子灭活率、菌落形态、电化学特性、ROS 染色、PI / FDA 染色、核酸与蛋白泄漏、MDA 与麦角甾醇含量, 以及观察孢子表面形

态与内部超微结构的变化，深入解析 DBD 对 *B. cinerea* 的杀菌机制。本研究为 DBD 技术在果蔬采后病害控制中的应用提供理论依据与技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株：灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 由甘肃农业大学理学院实验室供给。

虎红琼脂采购于上海户实医药科技有限公司；琼脂粉由北京三药科技有限公司提供；葡萄糖由麦克林生化科技股份有限公司提供；石油醚由成都市科隆化学品有限公司提供；氯仿购于天津市福晨化学试剂厂；碘化吡啶 (PI)、二乙酸荧光素 (FDA) 购自上海源叶生物科技有限公司；甲基紫由上海中泰化学试剂有限公司提供。本文实验药品均为国产品牌分析纯级别。

1.2 主要仪器与设备

本研究所用设备为介质阻挡放电装置 (CTP-2000K)；LDZX50KBS 型高压蒸汽灭菌锅；HPX-150 恒温恒湿培养箱；CX221 FS1C 型生物显微镜；JSM-IT700HR 扫描电子显微镜；Olympus BX53 荧光显微镜；TU-1901 紫外-可见分光光度计；PHS-3C 酸度计。

1.3 方法

1.3.1 培养基的制备

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 选取新鲜的马铃薯去皮并切为小块，称取 200 g 置于 1 L 蒸馏水中，煮沸 20 min，并持续进行搅拌。过滤后加入 20 g 的无水葡萄糖和 20 g 琼脂粉，补足蒸发损失的水分至初始体积，重新加热至彻底溶解。将培养基分装于锥形瓶中，再高压蒸汽灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 制备除不添加琼脂外，其余流程与 PDA 保持一致。

1.3.2 菌的活化

将解冻后 *B. cinerea* 孢子放置在 25 °C 培养箱中孵育 7 d 后，筛选长势良好的菌株进行后续培养。经 3 次培养后，放置在培养箱保存，用于后续实验。

1.3.3 孢子悬浮液的制备

筛选生长势旺盛的 *B. cinerea* 培养皿，制得 *B. cinerea* 孢子悬浮液，经涡旋振荡，于显微镜下测

定孢子浓度，并调整浓度至目标浓度。

1.3.4 DBD 杀菌率的测定

将 2 mL 的孢子悬浮液转移至 DBD 发生装置的石英玻璃上，使用 CTP-2000K 型等离子体实验电源主机的高压输出电压检测接口 (分压比 1:1 000) 连接 Tektronix TBS1102 型数字示波器进行实时监测，将放电频率调节至 10 kHz (设备最佳放电频率区间)。通过调节电源输入电压，使示波器换算所得的实际处理电压分别达到 4 kV、6 kV、8 kV、10 kV、12 kV 进行实验，每 15 s 采集样品一次，直至 75 s 时为止，以未经处理的样本设为空白对照组，各处理组均进行 3 次重复，最终根据式 (1) 计算杀菌率 η (%)。

$$\eta = \frac{C_0 - C_1}{C_1} \times 100 \quad (1)$$

式中： C_0 为空白对照组的菌落数； C_1 为处理组的菌落数。

1.3.5 电化学的测定

使用 pH 计、电导率仪分别对孢子悬浮液进行 pH 值、氧化还原电位及电导率的测定分析。每组 3 次生物学重复，结果取平均值。

1.3.6 菌落性质的测定

产孢量：以李廷刚等^[18]的处理方法进行调 整，将经 DBD 处理的孢子悬浮液点状接于 PDA 培养基，于 25 °C 培养箱孵育 3 d 后制取孢子悬浮液并计数。以未处理孢子悬浮液为对照组，各处理组均设 3 个生物学重复样本。

菌落直径：以裴双康等^[19]的处理方法并改动。将各处理时长的孢子悬浮液依次接种于 PDA，未处理孢子悬浮液为空白对照组，所有样本培养于 25 °C 恒温恒湿培养箱中。在接种后的第 2 天、4 天、6 天和 8 天，于固定时间对各组菌落直径进行测量。

菌丝生物量的积累：以 Halabura 等^[20]的处理方法并作调整。取各处理时长的孢子悬浮液滴加至 PDB 培养基，振荡培养培养 3 d，随后通过真空抽滤，将菌丝进行冷冻干燥至恒重。

1.3.7 细胞膜完整性及形貌表征

ROS 染色：将不同处理时长的孢子悬浮液离心，用 PBS (50 mmol/L) 缓冲液将沉淀洗涤，再加入 10 μ mol/L 活性氧荧光探针 DCFH-DA 溶液，于黑暗条件下孵育 1 h，孵育结束后以 PBS 缓冲液重复漂洗 3 次，最终使用 PBS 缓冲液对孢子重悬，

于 485 nm 激发波长条件, 通过荧光显微镜检测孢子的染色结果。

PI 与 FDA 染色: 以 Ju 等^[21]的方法为基础并作改动。将 1 mL 各处理时长的孢子悬浮液, 以 10 000 r/min 离心处理 5 min, 弃去上清液后用 1 mL PBS 缓冲液冲洗两次, 加入 50 μ L PI 溶液和 100 μ L FDA 溶液染色处理。采用荧光显微镜观察孢子染色情况, 分析细胞膜通透性变化。

核酸、蛋白质泄露量: 参考 Zhai 等^[22]的方法并作调整。分别离心各处理组的孢子悬浮液, 收集上清液, 利用其在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 可得出核酸和蛋白质的外漏量。

MDA 含量: 参考 Wang 等^[23]的方法并作改动。将 2 mL 各处理时长的孢子悬浮液分别离心, 向上清液中滴加 0.67% 硫代巴比妥酸并进行沸水浴, 经冷却进行二次离心, 测定于 450 nm、532 nm 及 600 nm 波长处的吸光度。

麦角甾醇含量: 参考 Kong 等^[24]的测定方法并作调整。向各处理组的孢子悬浮液中分别加入 4 mL 无菌蒸馏水、PBS 缓冲液和氯仿, 充分混匀后经涡旋振荡处理, 待液相分离后取下层, 经减压浓缩处理, 随后加入无水乙醇和甲醇, 进行皂化, 再利用石油醚与水二次萃取。分离石油醚相, 干燥后加入无水乙醇重新溶解, 测定 282 nm 波长下的吸光度。

扫描电子显微镜 (SEM) 观测孢子的形貌特征: 参考 Liang 等^[25]的方法并作修改。孢子悬浮液离心后收集上清液, 于 4 $^{\circ}$ C 环境下用 3% 戊二醛固定。再用不同体积分数的乙醇溶液逐步梯度脱水, 脱水后采用 PBS 缓冲液充分冲洗, 干燥后用 SEM (JSM-IT700HR, 日本) 观察孢子形态及其特征。

透射电子显微镜 (TEM) 观测孢子的形态特征: 根据 Liu 等^[26]的处理方法并作调整, 将孢子样本于 3% 戊二醛溶液中固定, 样品经 PBS 缓冲液冲洗后, 采用 1% 四氧化锇固定及漂洗, 再用不同体积分数的乙醇梯度洗脱脱水, 随后将样品浸泡于纯丙酮中, 采用环氧树脂对样本包埋使其聚合固化, 再制备切片, 利用乙酸铀酰与铅柠檬酸盐对切片复合染色, 最终在 (TEM) JEM-1400PLUS 下观察分析。

1.3.8 数据处理

所有试验均进行 3 次平行重复处理, 实验数据经 Excel 2019 统计, 采用 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析, 组间差异显著性以 $p < 0.05$ 为判定依据, 利用 Origin 2024 软件完成图表绘制。

2 结果与分析

2.1 DBD 对 *B. cinerea* 的杀菌作用

DBD 于不同处理时长与电压条件下对 *B. cinerea* 的杀菌效果由图 1 可见。图 1 (a) 表示, 在电压为 10 kV 时, 处理时间越长, η 越高, 当处理时间达到 60 s 时, η 达到 96.05%, 处理 75 s 后, *B. cinerea* 孢子几乎被完全杀灭。图 1 (b) 表示, 在时间为 60 s 的条件下, 电压在 4~12 kV 范围内, η 随电压升高而升高, 电压为 10 kV 时, η 为 97.98%, 增加到 12 kV 后, η 达到 99.65%。这与刘鑫茹等^[27]研究大气压等离子射流对消除尖孢镰刀菌实验得出的结果相符, 该现象归因于处理时间延长所引发的高能粒子作用增强, 进而提升了真菌孢子的灭活效应。基于操作安全性和实验可行性的综合考量, 后续实验选取处理时间为 60 s、电压为 10 kV 为最佳工艺条件。

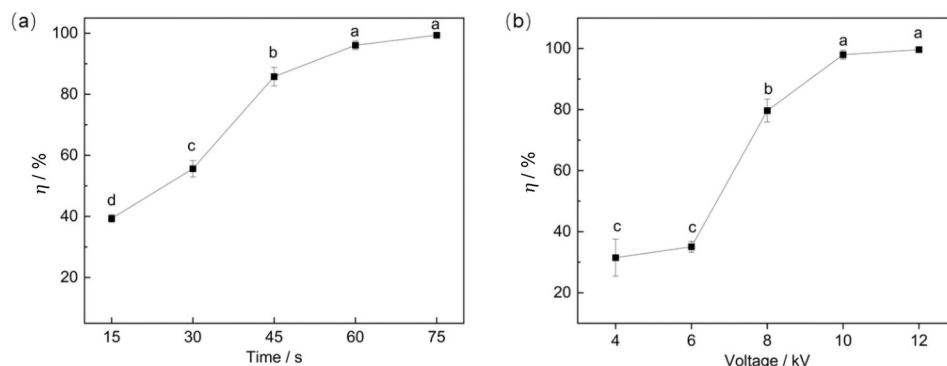


图 1 (a) 时间、(b) 电压对 DBD 对 *B. cinerea* 杀菌率的影响
Fig.1 (a) Time, (b) power on the bactericidal rate of DBD against *B. cinerea*

2.2 DBD 对 *B. cinerea* 菌落性质的影响

图2可观察到DBD处理对*B. cinerea*菌落性质的影响。通过图2(a)可见随DBD处理时间的递增,*B. cinerea*产孢能力逐步降低。经45 s处理后的产孢量相较对照组降低64.34%,75 s时降幅达92.49%。根据图2(b)的结果可见,随着DBD处理时间的延长,*B. cinerea*菌落直径的扩张速度与处理时间呈显著负相关,处理越久,菌落扩展的抑制效果越明显。数据显示,经30 s DBD处理后,在培养第2天菌落直径较对照组减小25.93%,至

第8天时抑制率进一步提高至55.52%。而经75 s处理的样本在培养第2天菌落扩展即被完全抑制(抑制率100%),至第8天菌落直径降幅达到81.9%。图2(c)可观察到的是DBD处理对*B. cinerea*菌丝生物量积累的影响。*B. cinerea*经DBD处理可明显降低菌丝生物量的积累,处理45 s和75 s后,菌丝生物积累量分别降低65.73%和76.69%。

DBD处理对*B. cinerea*菌丝生长具有强效、持久的抑制作用,DBD处理可显著降低*B. cinerea*的产孢量,并且菌丝生物量抑制效果随处理时长呈显著正相关。

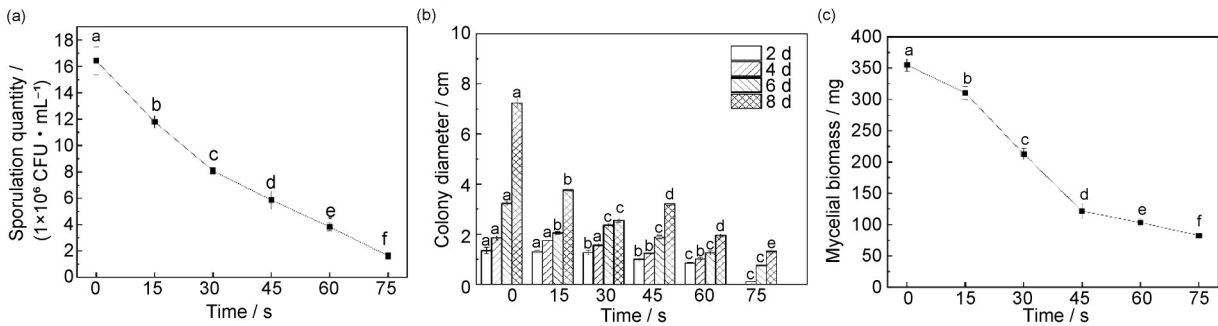


图2 DBD处理对*B. cinerea*菌落性质的影响:(a)产孢量;(b)菌落直径;(c)菌丝生物量
Fig.2 Effects of DBD treatment on colony morphology of *B. cinerea*: (a) sporulation quantity; (b) colony diameter; (c) mycelial biomass accumulation

2.3 DBD 对 *B. cinerea* 溶液中 pH、氧化还原电位、电导率的影响

图3(a)表明了DBD处理过程中*B. cinerea*孢子悬浮液pH的波动规律。结果显示随DBD处理时间的延长,孢子悬浮液的酸性持续增强。空白样品的pH为7.11,当处理时间达到45 s时,pH降至4.17。该波动规律与空白对照组无菌水实验呈一致趋势。

图3(b)展示了DBD处理*B. cinerea*孢子悬浮液过程中氧化还原电位(Oxidation-reduction potential, ORP)的动态趋势。ORP作为表征物质

组分氧化还原活性的关键参数,其数值与物质氧化性呈正相关关系,ORP值越高,物质的氧化能力越强。在0~45 s处理阶段,ORP值从初始的14.17 mV显著升高至264.13 mV;进入45~75 s处理阶段后,ORP值的升幅明显放缓。

图3(c)展示了DBD处理*B. cinerea*孢子悬浮液前后的电导率随处理时间的变化情况。结果表明,表明随着处理时间的延长,悬浮液的电导率持续升高。未经处理样品的电导率为103.33 μS/cm,而经过75 s DBD处理后,电导率增至最大值198.67 μS/cm。

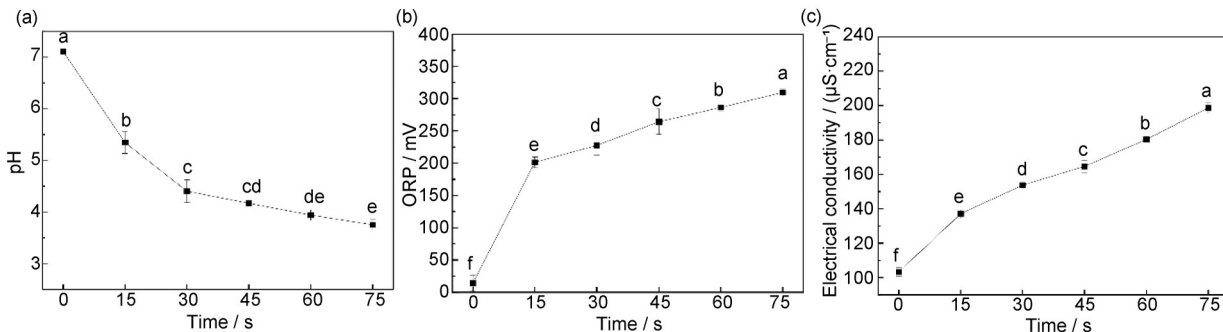


图3 DBD对*B. cinerea*电化学性质的影响:(a)pH;(b)氧化还原电位;(c)电导率
Fig.3 Effects of DBD treatment on electrochemical properties of *B. cinerea* solution: (a) pH; (b) ORP; (c) electrical conductivity

2.4 DBD 对 *B. cinerea* ROS 染色的影响

2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 是一种广泛应用的细胞膜渗透性荧光探针, 其检测原理基于酶解反应与氧化反应的协同作用。该探针进入细胞后, 在胞内酯酶的催化下脱去乙酰基, 生成无荧光活性的 2', 7'-二氯二氢荧光素 (DCFH); 随后, DCFH 会被细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 等氧化性物质氧化, 转化为显示绿色荧光的 2', 7'-二氯荧光素

(DCF)。基于 DCF 的荧光强度与胞内 ROS 水平正相关的特性, DCFH-DA 因而可作为评估细胞内的氧化应激水平的有效探针。

如图 4 所示, DBD 处理时间与 *B. cinerea* 中 ROS 积累呈显著正相关。对照组仅显示背景水平的微弱荧光; 在处理 45 s 后, 部分孢子呈现微弱的浅绿色荧光; 而 75 s 处理组则呈现强烈的绿色荧光, 表明胞内 ROS 大量积聚, 氧化应激显著加剧。

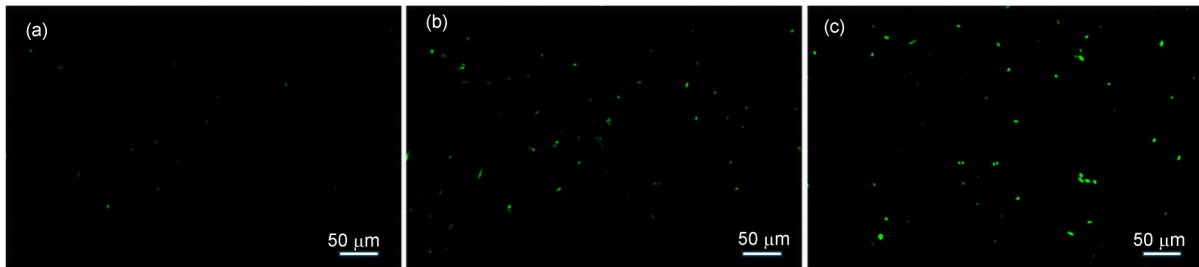


图 4 DBD 前后 *B. cinerea* ROS 染色图: (a) 空白组的孢子; (b) 处理 45 s 的孢子; (c) 处理 75 s 的孢子
Fig.4 ROS staining of *B. cinerea* before and after DBD: (a) control spores; (b) spores treated for 45 seconds; (c) spores treated for 75 seconds

2.5 DBD 对 *B. cinerea* PI 与 FDA 染色的影响

碘化丙啶 (PI) - 荧光素二乙酸酯 (FDA) 双重染色法是评估 DBD 处理对 *B. cinerea* 孢子细胞膜通透性影响的可靠技术手段, 其优势在于两种染料的染色机制上的互补性。具体而言, PI 无法穿透完整细胞膜, 仅能选择性进入对细胞膜受损的孢子中进行染色; 于此相对, FDA 需借助结构完整的细胞膜进入孢子内部, 经胞内酯酶水解后才会产生特异性荧光, 因此只能标记细胞膜功能正

常、活力保持的的孢子。

染色结果如图 5 及图 6 显示, *B. cinerea* 孢子中 PI 阳性染色占比与 DBD 处理时间呈显著正相关, 而 FDA 阳性染色占比则与处理时间呈负相关。当 DBD 处理时长达到 60 s 时, PI 染色率显著升至 5.26%, 与此同时 FDA 染色率降至近乎 0%。上述实验结果证实, DBD 处理可破坏 *B. cinerea* 孢子细胞膜的结构完整性, 导致其丧失正常的屏障功能。

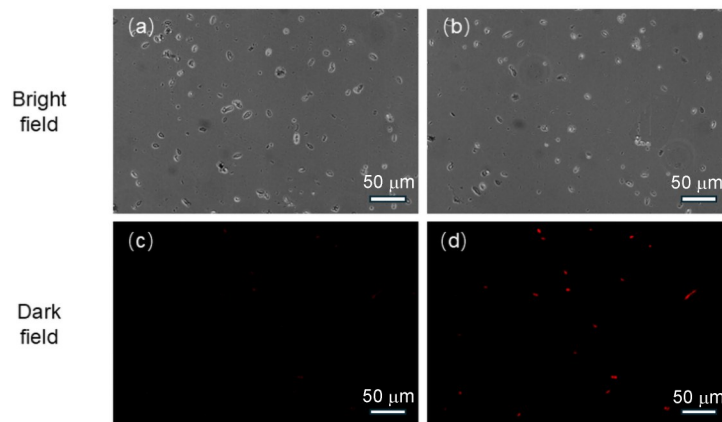


图 5 DBD 前后 *B. cinerea* PI 染色图: (a) 明场空白组的孢子; (b) 明场处理 60 s 的孢子; (c) 暗场空白组的孢子; (d) 暗场处理 60 s 的孢子

Fig.5 PI staining of *B. cinerea* before and after DBD: (a) control spores of bright field; (b) spores treated for 60 s of bright field; (c) control spores of dark field; (d) spores treated for 60 s of dark field

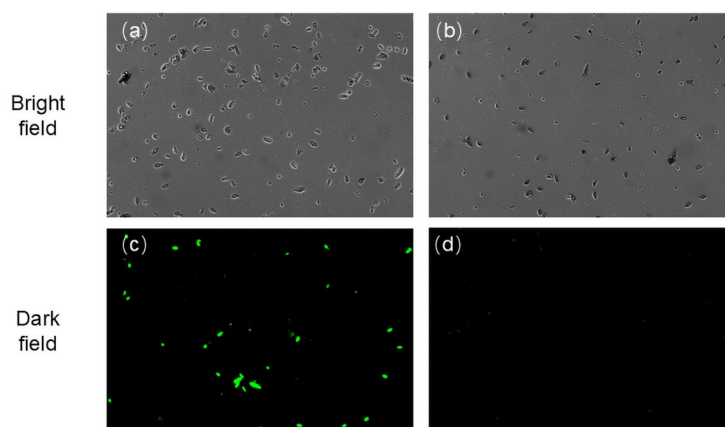


图6 DBD前后 *B. cinerea* FDA 染色图:(a)明场空白组的孢子;(b)明场处理 60 s 的孢子;
(c)暗场空白组的孢子;(d)暗场处理 60 s 的孢子

Fig.6 FDA staining of *B. cinerea* before and after DBD: (a) control spores of bright field; (b) spores treated for 60 s of bright field; (c) control spores of dark field; (d) spores treated for 60 s of dark field

2.6 DBD 对 *B. cinerea* 核酸、蛋白质泄露量的影响

如图 7 所示, 经 DBD 等离子体处理后, *B. cinerea* 孢子的核酸与蛋白质泄露量均随处理时间延长而显著增加。在 45 s 的处理条件下, 核酸泄露浓度从初始的 6.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 升至 13.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 蛋白质泄露量由 39.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 58.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 当处

理时间延长至 75 s 时, 两者进一步上升至 15.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 71.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

胞内物质外泄表明, DBD 处理破坏了 *B. cinerea* 孢子细胞膜的结构完整性, 导致膜通透性显著增强。该结果与 PI / FDA 染色实验所揭示的细胞膜损伤现象相互印证, 进一步确认了等离子体处理对微生物细胞膜的破坏作用。

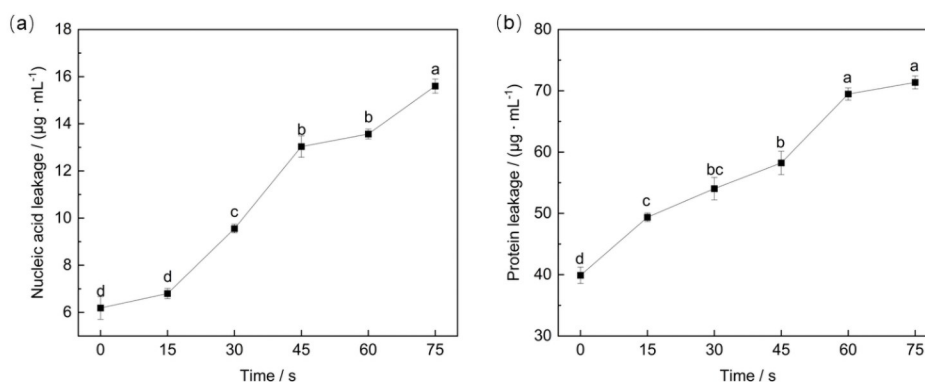


图7 DBD 对 *B. cinerea* 胞内泄露物的影响:(a)核酸的泄露量;(b)蛋白质的泄露量

Fig.7 Effects of DBD on the amount of intraspinal material leaking from *B. cinerea*: (a) nucleic acid leakage; (b) protein leakage

2.7 DBD 对 *B. cinerea* 孢子细胞膜氧化损伤的影响

MDA 作为脂质过氧化作用的关键终产物, 其水平可有效反映机体氧化应激程度。本研究结果显示, DBD 处理可显著提高 *B. cinerea* 菌体内的 MDA 含量, 并呈现出明显的剂量依赖性, 如图 8 (a) 所示, 当处理时间为 45 s 和 75 s 时, MDA 浓度分别从对照组的 0.078 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 显著升高至

0.21 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 0.24 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别为对照组的 1.67 倍与 2.04 倍。这表明 DBD 处理诱导了孢子内严重的氧化损伤, 导致脂质过氧化产物急剧累积。

麦角甾醇浓度变化如图 8 (b) 所示, 其浓度随 DBD 处理时间的增加而显著降低。处理 45 s 后, 麦角甾醇浓度由 20.15 mg/mL 降至 12.17 mg/mL , 较空白对照组下降 39.62%; 当处理时间延长到 75 s 时, 其浓度降幅达 62.11%, 最终为 7.63 $\text{mg}/$

mL。麦角甾醇浓度的降低会引发细胞膜完整性被破坏，其屏障功能丧失，导致膜通透性异常增加

和细胞内离子稳态失衡，因此对 *B. cinerea* 孢子的生长、代谢与增殖过程产生显著抑制作用。

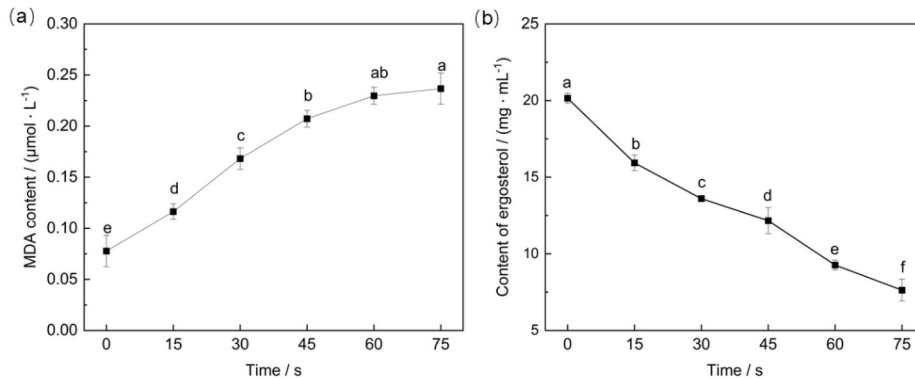


图8 DBD对 *B. cinerea*:(a)MDA含量;(b)麦角甾醇含量
Fig.8 Effects of DBD treatment on the content of (a) MDA and (b) ergosterol in *B. cinerea*

2.8 DBD对 *B. cinerea* 孢子表观形貌以及内部结构的影响

SEM可实现对样品表面三维形貌的精准、直观观测，是常用的表面形貌分析手段。图9为 *B. cinerea* 孢子SEM图像，DBD处理可明显改变 *B. cinerea* 孢子宏观形貌特征。未处理组孢子表现为梭形外观特征，轮廓平滑，且结构完好无破损。经60 s处理后，孢体明显凹陷，呈现不规则褶皱、膜完整性丧失。图像结果表明，DBD处理时间的延长直接导致孢子表面损伤的加剧。

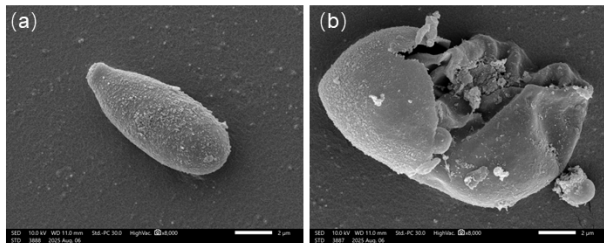


图9 DBD前后 *B. cinerea* 的SEM图像:(a)空白组的孢子形态结构;(b)处理60 s的孢子形态结构

Fig.9 SEM images of *B. cinerea* before and after DBD:
(a) morphological structure of the spores of the control group;
(b) morphological structure of spores after 60 s of treatment

TEM可以观测到细胞内细胞器的形态与分布特征，尤其是线粒体、内质网等关键细胞器的形态特征。如图10所示，DBD处理显著诱发 *B. cinerea* 孢子发生结构崩解。未处理组的孢子表现为典型椭圆形形态，细胞器排列紧凑，细胞壁与细胞膜结构保持完整无缺损，胞质内分布形态完好的细胞器。在60 s DBD处理后，孢子的细胞壁

与细胞膜呈现不规则破裂，孢子内部的组分大量渗漏外流并又诱发胞内空泡化进程。上述特征性损伤模式表明，DBD处理能有效打破孢子的细胞膜系统结构稳定性，最终促使真菌孢子发生不可逆的结构解体，从而实现对菌体的有效破坏和抑制作用。

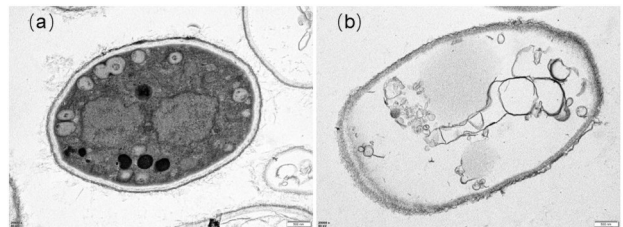


图10 DBD前后 *B. cinerea* 的TEM图像:(a)空白组的孢子形态;(b)处理60 s的孢子形态

Fig.10 TEM images of *B. cinerea* before and after DBD: (a) spore morphology of the control group; (b) morphology of spores after 60 s treatment

3 结论

本文结果表明，DBD处理对 *B. cinerea* 具有显著的杀菌效能与抑制孢子作用，且二者呈现正相关关系：在60 s、10 kV的处理条件下，DBD对浓度为 2×10^6 CFU/mL的 *B. cinerea* 的杀菌率已接近完全灭活。随着时间延长，相比对照组，DBD处理可有效阻断 *B. cinerea* 其增殖与繁殖过程，改变了 *B. cinerea* 孢子悬浮液的理化性质，使 *B. cinerea* 孢子悬浮液的pH值降低、ORP与电导率升高。同时DBD处理使 *B. cinerea* 孢子内核酸与蛋白质的泄漏量大幅度增加，以及麦角甾醇含量的下降。此外，DBD处理会引发孢子细胞结构的不可逆损伤。

ROS 染色结果表明 DBD 处理可诱导 ROS 大量积累，同时 MDA 浓度较对照组升高 2.4 倍，证实细胞膜脂过氧化作用是导致菌体死亡的根本原因。

综上所述，DBD 通过结构性破坏菌体、扰乱膜脂代谢进程及触发氧化应激连锁反应等多重机制的协同作用，实现对 *B. cinerea* 活性的高效抑制，本研究结果为低温等离子体杀菌技术的开发提供了理论支撑。

作者贡献声明 乔艺颖是本研究的实验方案设计与执行人，承担实验数据采集工作与结果分析及论文撰写；李莹艳、董露露、柳佳清、龙海涛协助实验方案设计与构思；蒲陆梅是通信作者，是本实验负责人，主要负责论文方向的定夺、实验的指导、论文的最终修订、审阅及定稿等。所有作者均已阅读并认可该论文最终的所有内容。

参考文献

- Singh R, Caseys C, Kliebenstein D J. Genetic and molecular landscapes of the generalist phytopathogen *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant Pathology, 2024, **25**: e13404. DOI: 10.1111/mpp.13404.
- Elad Y, Pertot I, Cotes Prado A M, et al. Plant hosts of botrytis spp[M]//Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Cham: Springer International Publishing, 2015: 413-486. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_20.
- Chen T, Zhang Z Q, Chen Y, et al. Botrytis cinerea[J]. Current Biology, 2023, **33**(11): R460-R462. DOI: 10.1016/j.cub.2023.01.058.
- Nakajima M, Akutsu K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, **80**(1): 15-23. DOI: 10.1007/s10327-013-0492-0.
- Silva C J, Adaskaveg J A, Mesquida-Pesci S D, et al. *Botrytis cinerea* infection accelerates ripening and cell wall disassembly to promote disease in tomato fruit[J]. Plant Physiology, 2023, **191**(1): 575-590. DOI: 10.1093/plphys/kiac408.
- Li T, Zhou J, Yuan Z, et al. Effects of temperature and humidity on infection process of *Botrytis cinerea* and host response in tomato[EB/OL]. [2024-01-31] (202-12-18). <https://doi.org/10.22541/au.170667028.84161652/v1>.
- Mazur J, Panasiewicz M, Zawislak K, et al. Changes in the quality characteristics of raspberry fruit due to mechanical vibrations and storage conditions[J]. Technical Sciences, 2000(2019/2020), **12**(1): 45-58. DOI: 10.31648/ts.5132.
- Araújo A E, Maffia L A, Mizubuti E S G, et al. Survival of *Botrytis cinerea* as mycelium in rose crop debris and as sclerotia in soil[J]. Fitopatologia Brasileira, 2005, **30**(5): 516-521. DOI: 10.1590/s0100-41582005000500009.
- Tschoeke P H, Oliveira E E, Dalcin M S, et al. Botanical and synthetic pesticides alter the flower visitation rates of pollinator bees in Neotropical melon fields[J]. Environmental Pollution, 2019, **251**: 591-599. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.04.133.
- Wang Y R, Huang B, Wang Y J, et al. Successive hexaconazole application altered the degradation behavior in soil and shifted microbial community and functional profiles[J]. Environmental Research, 2025, **286**: 122820. DOI: 10.1016/j.envres.2025.122820.
- Uk J I C, Chartrain L, Brown J K M, et al. Molecular evolution and mechanisms of fungicide resistance in plant pathogenic fungi[M]//Understanding and minimising fungicide resistance. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2023: 21-58. DOI: 10.19103/as.2022.0116.02.
- 任春生, 王友年. 低温等离子体中的介质阻挡放电[J]. 科学观察, 2022, **17**(4): 9-12. DOI: 10.15978/j.cnki.1673-5668.202204003.
- REN Chunsheng, WANG Younian. Dielectric barrier discharge low temperature plasma[J]. Science Focus, 2022, **17**(4): 9-12. DOI: 10.15978/j.cnki.1673-5668.202204003.
- 任根来, 王鹰, 王东, 等. 大气压等离子体射流功能改性硅树脂的工艺研究[J]. 电镀与涂饰, 2024, **43**(1): 80-86. DOI: 10.19289/j.1004-227x.2024.01.011.
- REN Genlai, WANG Ying, WANG Dong, et al. Study on functional modification of silicone by atmospheric pressure plasma jet[J]. Electroplating & Finishing, 2024, **43**(1): 80-86. DOI: 10.19289/j.1004-227x.2024.01.011.
- Subedi D P, Guragain R P, Joshi U M. Surface modification of polymers by 50 Hz dielectric barrier discharge (DBD) plasma produced in air at 40 Torr[J]. Fundamental Plasma Physics, 2024, **10**: 100058. DOI: 10.1016/j.fpp.2024.100058.
- Palasakar S S, Kale R D, Deshmukh R R. Adhesion properties of DBD plasma treated nylon 66 fabric-Optimisation of plasma process parameters[J]. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2020, **96**: 102446. DOI: 10.1016/j.ijadhadh.2019.102446.

- 16 张玉. 小球藻联合介质阻挡放电等离子体处理有机废水的效果及可行性评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2025. DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2025.001603.
ZHANG Yu. Effects and feasibility evaluation of chlorella combined with dielectric barrier discharge plasma in treating organic wastewater[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2025. DOI: 10.27409/d.cnki.gxbnu.2025.001603.
- 17 Udachin V, Dahle S, Fink R. Dielectric barrier discharge air plasma as a comprehensive disinfection approach to *E. coli* and *S. aureus* biofilm management[J]. *Physica Scripta*, 2025, **100**(2): 025015. DOI: 10.1088/1402-4896/ada4e7.
- 18 李廷刚, 陈广霞, 张倩倩, 等. 葡萄灰葡萄孢生长及产孢条件研究[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2021(2): 6-11. DOI: 10.13414/j.cnki.zwpp.2021.02.002.
LI Tinggang, CHEN Guangxia, ZHANG Qianqian, *et al.* Study on growth and sporulation conditions of grape *Botrytis cinerea*[J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2021(2): 6-11. DOI: 10.13414/j.cnki.zwpp.2021.02.002.
- 19 裴双康, 刘彦妮, 弓玉红, 等. 木贼镰刀菌最适营养条件筛选[J]. *安徽农学通报*, 2020, **26**(2): 24-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7731.2020.02.010.
PEI Shuangkang, LIU Yanni, GONG Yuhong, *et al.* *Fusarium equiseti* most suitable nutrition condition screening[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2020, **26**(2): 24-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7731.2020.02.010.
- 20 Halabura M I W, Avelino K V, Araújo N L, *et al.* Light conditions affect the growth, chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the white-rot fungus *Lentinus crinitus* mycelial biomass[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2023, **22**(3): 669-686. DOI: 10.1007/s43630-022-00344-7.
- 21 Ju J, Xie Y F, Yu H, *et al.* Analysis of the synergistic antifungal mechanism of eugenol and citral[J]. *LWT*, 2020, **123**: 109128. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109128.
- 22 Zhai Y F, Sun J Q, Ye S, *et al.* Principal antifungal factors and underlying mechanisms of dielectric barrier discharge plasma against *Penicillium expansum* spores as well as its application in kiwi-fruit juice[J]. *LWT*, 2023, **185**: 115089. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115089.
- 23 Wang Z W, Jia H, Yang J Y, *et al.* Inactivation of *Alicyclobacillus contaminans* in apple juice by dielectric barrier discharge plasma[J]. *Food Control*, 2023, **146**: 109475. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109475.
- 24 Kong J, Zhang Y, Ju J, *et al.* Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes[J]. *Food Chemistry*, 2019, **285**: 380-388. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.099.
- 25 Liang Z T, Xu X Q, Cao R H, *et al.* Synergistic effect of ozone and chlorine on inactivating fungal spores: influencing factors and mechanisms[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, **420**: 126610. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126610.
- 26 Liu W R, Mei J, Xie J. Elucidating antibacterial activity and mechanism of daphnetin against *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*[J]. *Journal of Food Quality*, 2020, **2020**: 6622355. DOI: 10.1155/2020/6622355.
- 27 刘鑫茹, 董露露, 李毅, 等. 大气压等离子射流对消除尖孢镰刀菌的机理研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2025, **43**(3): 030407. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2024-0083.
LIU Xinru, DONG Lulu, LI Yi, *et al.* Study on the mechanism of eliminating *Fusarium oxysporum* by atmospheric pressure plasma jet[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2025, **43**(3): 030407. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2024-0083.