

臭氧对灵芝菌丝杀灭作用的研究

孙东平* 汪 信

(南京理工大学研究生院 南京 210094)

摘要: 以灵芝菌丝为研究对象,测定了臭氧发生器放电时间、臭氧浓度、灵芝菌丝致死率之间的曲线关系。结果表明,随着放电时间延长,臭氧浓度变大,致死率明显上升,到一定时间后趋缓,在生物显微镜下认真观察了正常菌丝和被破坏菌丝形态上的差别,在透射电子显微镜下观察了菌丝的外观结构,用激光共聚焦扫描显微镜观察了菌丝破坏前后及吖啶橙染色与不染色的形态结构,经低真空扫描电镜、原子力显微镜观察了臭氧处理前后灵芝菌丝细胞的变化情况。

关键词: 灵芝, 臭氧, 杀灭, 致死率, 形态

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0059-06

Study on the Sterilization Effects on *Ganoderma lucidum* Hyphae by the Treatment of Ozone

SUN Dong-Ping WANG Xin

(Graduate School of NUST, Nanjing 210094)

Abstract: The mortality rate was measured against the time of the treatment of ozone and the variation of ozone concentration. Experiment results indicate that *Ganoderma lucidum* hyphae could be destroyed completely by ozone and the mortality rate obviously went up with the prolonging of treatment time. The changes of cell form and the fluorescence of hyphae (dyed by acridine orange or not) were observed through biological microscope, laser confocal scanning microscopic imaging system, transmission electron microscope, scanning electron microscope and atom force microscope, and the mechanism of *Ganoderma lucidum* hyphae (eucaryote) destroyed by ozone was studied.

Key words: *Ganoderma lucidum*, Ozone, Sterilization, Mortality rate, Form

臭氧为淡蓝色气体,固体时为兰黑色晶体,沸点为-111.9℃,熔点为-192.7℃,1840年由德国人 Schorbein 发现并命名,该气体是强氧化剂,具有广谱杀微生物作用。臭氧在水中的溶解度为氧的 10 倍,臭氧水的杀菌效力比在空气中大 200 倍左右。臭氧对微生物的杀灭受浓度、温度、pH、湿度和有机物的影响。目前国内关于臭氧的研究主要集中于其对于常见细菌、真菌杀灭浓度和致死时间方面。

本文以灵芝菌丝为研究对象,系统测定了臭氧发生器放电时间、臭氧浓度、灵芝菌丝致死率之间的曲线关系并运用各种现代显微技术对处理前后的灵芝菌丝细胞形态结构的变化情况作了细致观察。这种结构的变化是因臭氧氧化性强,破坏灵芝菌丝细胞壁,特别是质膜及内膜系统,从而引起整个细胞受损、崩解。这为进一步掌握臭氧杀灭微生物作用机制、特别是拓展臭氧在食品储存、中药除菌保存、治疗皮肤病方面提供重要依据。

* 联系人 Tel: 86-025-84315256, E-mail: gsjwb@mail.njust.edu.cn.

收稿日期: 2003-08-17, 修回日期: 2003-10-16

1 材料与仪器

1.1 材料与药品

菌株为赤芝 (*Ganoderma lucidum* (Leyss.: Fr.) Karst.) 5.65。药品主要有: 硫代硫酸钠(分析纯)为华东师范大学化工厂生产, 碘化钾(化学纯)、氢氧化钾(化学纯)为南京化学试剂厂生产, 葡萄糖(分析纯)为广西西陇化工厂生产, 琼脂为福建省惠安化工厂生产。

1.2 实验仪器

负离子发生器为自制, HITACHI H-800 透射电子显微镜为日本日立公司生产, 激光共聚焦扫描显微镜 BLSCM-2001 为我校研制, 原子力显微镜 (Digital Instruments Nanoscope III Multimode SPM Head) 系南京大学提供, 低真空环境扫描电子显微镜 (XL30-ESEM, Philips) 系扬州大学提供。

2 实验装置

2.1 电源

实验中所用电源为 220V, 50Hz 交流电, 利用变压器使极间电压达 11,000 V。

2.2 电极

实验所用电极为 12.5 cm × 12.5 cm 的针-板电极, 针长度为 1.2 cm, 孔径为 1.0 cm, 孔数为 21 个。

3 实验方法

3.1 用滴定碘法测臭氧浓度

参见文献 [4, 5]。

3.2 臭氧对灵芝菌丝的致死率测定

3.2.1 涂布法: 测臭氧对灵芝菌丝的致死率。

3.2.2 影印法: 测臭氧对灵芝菌丝的致死率。

3.3 激光共聚焦扫描显微镜观察菌丝

3.3.1 染色方法: (1) 于室温中将菌丝挑到载玻片上, 用染色液覆盖 20min。(2) 用滤纸吸去染液, 在菌丝上盖以缓冲的 Krebs-Ringer 液, 反复洗 4~5 次, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下用蓝光观察。

3.3.2 观察方法: (1) 先将未受臭氧处理的菌丝涂片, 在显微镜下找到菌丝, 然后关掉白光灯, 打开蓝光, 观察菌丝的荧光图。同样方法观察已受臭氧处理的菌丝, 并取受臭氧处理不同时间段的菌丝进行观察。(2) 先用吖啶橙对受臭氧处理和未受臭氧处理的菌丝进行染色, 然后分别进行观察。

3.4 透射电镜观察菌丝^[6]

用接种针将菌丝挑在含 5% KOH 的无菌水中, 配成菌丝悬液。将洗净的带膜的铜网放在滤纸上, 用滴管吸取菌丝悬液滴在铜网上, 1h 后, 放入样品架中, 在电子显微镜中观察。

3.5 低真空环境扫描电镜观察菌丝样品

分别挑取臭氧处理前后的灵芝菌丝样品, 放在低真空环境扫描电镜样品室观察并

拍照。

3.6 原子力显微镜观察菌丝

原子力显微镜 (Atomic force Microscope 简写 AFM) 图像分析使用 Digital Instruments Nanoscope III 的多模式 SPM 扫描头, 丁型压电石英扫描管 (125 μ m XY 方向扫描, 5 μ mZ 方向扫描) 进行测量。直接从 PDA 平板上挑取处理前后灵芝菌丝样品放置于云母片上进行扫描。试验在室温下, 空气中用接触模式 (Contact Mode) 进行。扫描图像: 左边为高度 (Height) 图, 提供精确的样品高度信息; 右边为偏差图 (Deflection), 记录高度图像在持续力的模式下的偏差。

4 结果

4.1 透射电镜观察灵芝菌丝

通过 H-800 透射电镜观察灵芝菌丝发现, 中国科学院微生物研究所所提供灵芝菌种菌丝外形光滑、饱满、挺展、长势良好, 有明显的菌丝网结现象, 直径约 5 μ m~10 μ m。

4.2 放电时间与致死率的关系

根据涂布法和影印法, 从平板的菌落数, 计算出菌丝的致死率 (表 1), 发现灵芝菌丝半致死时间约为 2.302min, 发现菌丝的致死率随放电时间的增加而增加。和以前作者做的臭氧对其它真菌的致死率相比^[2], 致死率变化情况基本相同, 只是在开始阶段有差异, 到达一定时间后, 趋于相同。

表 1 臭氧对灵芝菌丝的杀灭作用

| 批次 | 灵芝菌丝的致死率 (min) | | | | | | |
|----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 9 |
| 1 | 10% | 42% | 68% | 77% | 87% | 94% | 97% |
| 2 | 13% | 38% | 63% | 75% | | | |
| 3 | 9% | 46% | 64% | 73% | 91% | | |
| 4 | 9% | 40% | 67% | 76% | 89% | 93% | 98% |
| 5 | 11% | 33% | 67% | 78% | 89% | | |
| 6 | 28% | 57% | 71% | 86% | 86% | | |
| 7 | | | 60% | | 80% | 93% | 100% |
| 8 | | 36% | 77% | | 87% | | |
| 均值 | 13% | 42% | 67% | 76% | 87% | 93% | 98% |

4.3 放电时间与臭氧浓度的关系

根据滴定碘法, 从所用的硫代硫酸钠溶液的量计算出臭氧量, 再根据容器的体积计算出臭氧浓度 (表 2), 从表 1 和表 2 中可以看出, 随着放电时间的增加, 臭氧的浓度也随着增加, 灵芝菌丝的致死率同样增大, 在臭氧浓度达到一定量后, 致死率增加缓慢。

表 2 放电时间对臭氧浓度的影响

| 放电时间 (min) | 不同放电时间达到的臭氧浓度 | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 臭氧浓度 ($\times 10^{-5}$ mol/L) | 0.21 | 0.46 | 0.87 | 1.23 | 1.31 | 47.00 | 1.95 | 2.24 | 2.47 |

4.4 菌丝受臭氧破坏程度与时间的关系

通过激光共聚焦显微镜的观察, 可以看到被臭氧破坏的菌丝碎片, 与正常菌丝在形态上有很大不同 (图 1)。

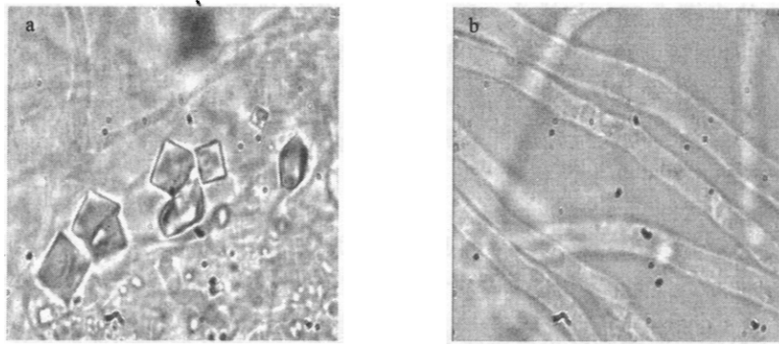


图 1 被臭氧破坏菌丝碎片与正常菌丝比较

a 被破坏的菌丝碎片, b 正常菌丝

一般认为, 臭氧是先对细菌细胞破壁, 然后病毒损伤、割断其核酸, 达到细菌的杀灭效果, 臭氧内含 20% ~ 70% 的强氧化剂物质, 会氧化体膜中的不饱和脂肪酸, 破坏其双重结合部, 进一步破坏卵磷脂^[7]。臭氧对真菌杀灭的机理可能为臭氧破坏了真菌的细胞壁, 并进而破坏了细胞膜^[2], 使得胞内汁液流失, 最终导致真菌的彻底死亡。有些文献认为臭氧可直接氧化细胞膜磷脂、蛋白质等产生有机自由基, 也可直接氧化脂肪酸和多不饱和脂肪酸而形成有毒的过氧化物, 从而损害膜的结构和功能, 改变膜的通透性, 导致细胞内酶的外漏, 引起组织损伤^[8]。

另有一些文献报道^[3], 臭氧可与许多有机和生物分子作用, 产生自由基, 刺激脂质过氧化。而脂质过氧化的产物可与蛋白分子发生聚合、交联、缔合等反应, 从而严重地损害了生物膜的功能。且过氧化使膜不饱和脂肪酸减少, 原来保持的膜饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的均衡就受到破坏, 饱和脂肪酸增多会使膜变为刚性状态, 导致膜功能的异常。

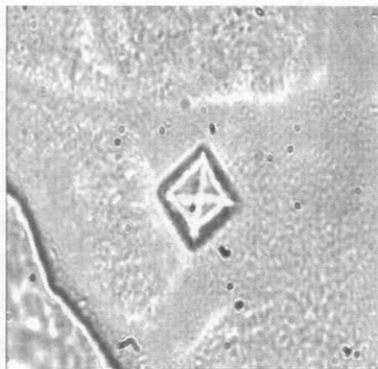


图 2 晶体物质

从多次实验观察, 可以看出受臭氧处理后的菌丝有一些八面体状晶体出现, 且随着处理时间的延长而增加, 但到一定时间后不再增加, 而出现更加细小的不规则碎片。一般在 2h 的时候出现该物质, 在 3h 的时候最多, 到 4h 的时候开始出现更小的碎片。经多次观察, 推测小的碎片可能为晶体分解而来 (图 2)。(注: 以上时间均为从开始放电时开始计算。)

4.5 菌丝破坏前后的荧光图

4.5.1 不染色观察结果: 用激光共聚焦扫描显微镜观察, 未用臭氧处理的菌丝, 在蓝光激发下, 有很微弱的荧光, 但用本仪器的摄像头不能拍到该荧光图。

用臭氧处理后, 当那些很小的碎片聚集在一起时, 能发出比未处理的菌丝强的荧光, 有时甚至很强。这一现象可能和脂质过氧化产生小分子的醛, 而醛类分子易发生聚合作用, 丙二醛或其它醛类的聚合产物具荧光性所致^[3]。

4.5.2 染色观察结果:用吖啶橙染色后,未受臭氧处理的菌丝也能发出强的荧光(图3),处理后菌丝有些变细。那些不染色就能发强荧光的碎片,在同一视场中比菌丝发的荧光更强一些。但晶体物质,不能染上荧光,只发微弱的荧光,或不发荧光。这些晶体物质不能被吖啶橙染色,可以推测其不是核酸类物质。

4.6 低真空环境扫描电镜观察 O_3 处理前后灵芝菌丝

直接挑取 PDA 平板上灵芝菌丝样品放在低真空扫描电镜样品室中观察、环扫并拍照,放大倍数从 800 倍到 12,800 倍,进行大面积环扫,可以看出:未处理灵芝菌丝饱满、挺展、外观光滑整洁、网结现象显

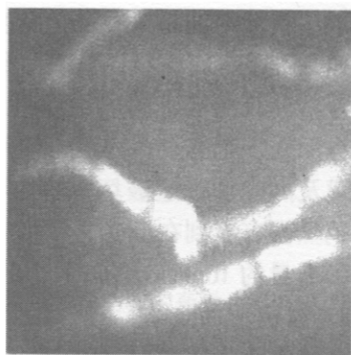


图3 未受臭氧处理的菌丝荧光图
(已染色)

著,可看到担子菌菌丝典型的桶孔型隔膜,并向壁外凸出,且可见到大量气生菌丝及其幼嫩的菌丝顶端。经臭氧处理后灵芝菌丝变形扭曲、瘪缩、破碎,直径由原来的约 $5\mu m \sim 10\mu m$ 降到约 $1\mu m \sim 2.5\mu m$,甚至不到 $1\mu m$,还看到有缺损的断口、碎片,形状极不规则。因此可以认为由于臭氧强烈的生物活性和高氧化性,对灵芝菌丝细胞壁,特别是细胞膜及内膜系统破坏后,胞内物质外流,只剩下空的细胞壁(厚度为 $100nm \sim 200nm$),或直接解体,但看不到激光共聚焦扫描显微镜下观察灵芝菌丝经臭氧处理后的水溶液装片时见到的规则八面体状大量晶体。

4.7 原子力显微镜观察 O_3 处理前后灵芝菌丝

直接挑取 PDA 平板上灵芝菌丝样品,放置于云母片上,放大倍数是 400 倍,进行了大面积扫描,从图4可以看出未处理灵芝菌丝样品,菌丝表面光滑平整、饱满粗壮、

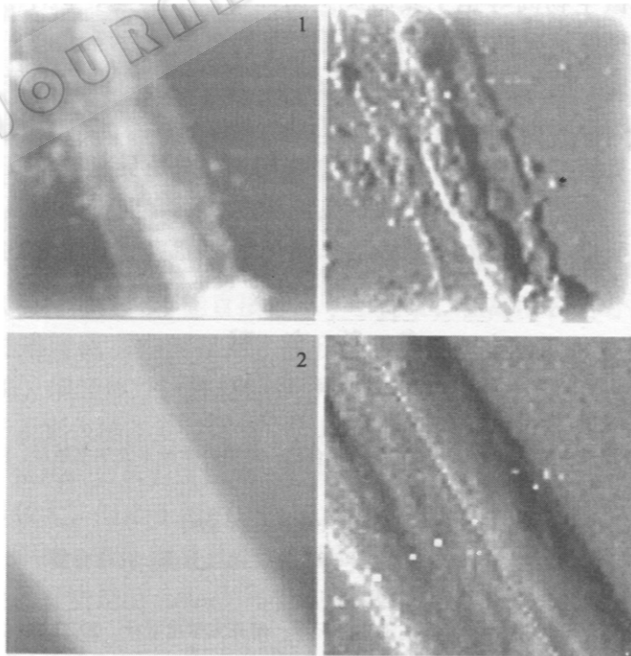


图4 臭氧处理前后灵芝菌丝原子力显微镜照片

1 臭氧处理后菌丝, 2 正常菌丝

挺展,直径约 $5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$,高度约 $1.2\mu\text{m}$,经臭氧处理过或老化自溶的灵芝菌丝样品表面凹凸不平,有破损、缺口、结构松散、支离破碎、变细、极不规则、厚度达数百纳米左右(只相当于两层细胞壁的厚度),细胞表面有纵横的沟槽,宽约 $0.5\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$,且有深穴,更有众多碎块、碎片。由此可见,灵芝菌丝细胞经臭氧处理后细胞壁、细胞膜及内膜系统遭破坏,胞内物质外漏,因而出现原子力显微镜照片上的诸种情况。但仍然没有看到在激光共聚焦扫描显微镜观察经臭氧处理后灵芝菌丝水溶液装片中见到的大量约 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ 大小的规则八面体状晶体。

4.8 讨论

灵芝为担子菌门(Basidiomycota),层菌纲(Hymenomycetes),无隔担子菌亚纲(Homobasidiomycetidae),非褶菌目(Aphyllorphales),灵芝菌科(Canodermataceae),灵芝属(*Ganoderma* Karst)。根据实验观察,该晶体物质约为 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ 大小,吡啶橙不能着色,表明其不是核酸类物质,且又能观察到荧光,说明其组成分子中具有共轭体系存在。而且在做成水溶液装片情况下经普通光镜,激光共聚焦扫描显微镜观察,明显看到有大量八面体状晶体出现(特别是臭氧处理3h后),而在低真空环境扫描电镜、原子力显微镜观察时,直接挑取固体PDA培养基表面样品置电镜样品室中观察,则看不到该晶体,且平素灵芝菌丝培养时间过长,老化时,菌丝外被也会分泌白色物质,故作者认为该晶体是灵芝菌丝被臭氧处理破坏后,内容物外泄,在水环境下,一些蛋白类等生物大分子依靠分子间键(如静电力、氢键、疏水力、范德华力)进行分子自装形成规则的八面体状晶体,随着时间延长,又会拆解。变成不规则形状,乃至众多细小碎片。作者认为灵芝菌丝细胞在经氧化性强、生物活性高的臭氧处理后,细胞壁、细胞膜,特别是内膜系统遭到破坏,胞内物质外流,最后崩解成碎片。本实验工作虽然主要是以真核类微生物高等担子真菌灵芝菌丝为研究对象,但不仅在真菌生理学、细胞生物学上探讨臭氧杀灭微生物细胞机制方面具有重要参考价值,而且为拓展臭氧的用途提供理论依据。臭氧可以看到作为一种化学消毒剂,虽稳定性差,有一定毒性和腐蚀性,受有机物影响较大,但仍具有使用方便,刺激性低,作用快速,无残留污染等突出的优点。臭氧在除菌方面有独到的地方,特别是臭氧气体在食品储存、中药除菌保存方面不是一般除菌剂能相比的。在治疗皮肤病方面,因为真菌易进入药物不易到达的真皮层,所以一般药物不能根治,而臭氧却能克服这个难题,可以作为一种新的医疗方法来研究。

参 考 文 献

- [1] 孙东平,张爱娟,卢平,等.生物学杂志,1999,16(5):19~20.
- [2] 孙东平,卢平,张爱娟,等.微生物学通报,2001,28(1):29~31.
- [3] 孙存普,张建中,段绍瑾主编.自由基生物学导论.合肥:中国科学技术大学出版社,1999.19~21,44,48~63.
- [4] 夏玉宇.化验员实用手册.北京:化学工业出版社,1999.558~559.
- [5] 杭州大学化学系分析化学教研室.分析化学手册(第二版)第二分册.化学分析.北京:化学工业出版社,1997.702.
- [6] 张丰德,王秀玲主编.现代生物学技术(第二版).天津:南开大学出版社,2001.19~30.
- [7] 方荣楠.中国水产,2000,4:26.
- [8] 孟紫强.环境毒理学.北京:中国环境科学出版社,2000.368.