

表面功能化

Al_{0.4}CoCrCuFeNi 高熵合金在生活 环境中的抗菌性能

肖凌云, 武文韬, 周沂霖, 闫姿霓, 周恩泽,
孙明月, 徐大可, 王福会

(东北大学 材料科学与工程学院, 沈阳 110819)

摘要: **目的** 利用高熵合金多主元的设计思想, 添加高含量的铜制备出具有优良机械性能的新型含铜抗菌高熵合金 (Antibacterial High-entropy Alloy), 探究其在多种复杂生活环境中服役时的抗菌性能。**方法** 通过 XRD 分析高熵合金的物相组成。通过拉伸试验研究该高熵合金的机械性能。采集多种生活环境下的微生物群落, 通过平板涂布、场发射扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜观察细菌生长与成膜形貌, 对比分析高熵合金的抗菌性能。通过基因测序, 经由 OTU 聚类分析与物种分类学分析等研究手段, 统计和分析菌落结构与物种多样性。通过活性氧簇分析, 探究高熵合金的杀菌机理。**结果** Al_{0.4}CoCrCuFeNi 高熵合金的屈服强度为(308±10) MPa, 高于传统抗菌不锈钢材料。通过抗菌试验结果得出, 高熵合金的抗菌率达到 99.99%以上。通过扫描电镜分析和活死染色结果, 发现 AHEA 表面菌落数量显著减少且几乎没有任何活的微生物。此外, 通过测序结果可以看出, 易黏附于普通金属样品表面的优势菌种多为有害致病菌, 包含细菌和真菌, 而 AHEA 对它们有着良好的抑制作用。**结论** AHEA 可以作为一种高效的抗菌材料, 不仅能防止细菌在金属材料表面繁殖生长, 还能有效抑制真菌生长和生物被膜的形成, 综合性能远优于传统抗菌合金。

关键词: 抗菌材料; 高熵合金; 抗细菌; 抗真菌; 生物被膜; 生活环境

中图分类号: TG172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2023)01-0266-12

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2023.01.027

Antibacterial Properties of Al_{0.4}CoCrCuFeNi High Entropy Alloy in Living Environment

XIAO Ling-yun, WU Wen-tao, ZHOU Yi-lin, YAN Zi-ni, ZHOU En-ze,
SUN Ming-yue, XU Da-ke, WANG Fu-hui

(School of Materials Science and Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

ABSTRACT: By using the multi principal component design idea of high entropy alloy and adding high content of copper, the work aims to prepare the new antibacterial high-entropy alloy (AHEA, Al_{0.4}CoCrCuFeNi) containing copper with excellent mechanical properties and to explore the antibacterial performance of it in a variety of complex living environments. The phase

收稿日期: 2022-01-12; 修订日期: 2022-03-05

Received: 2022-01-12; Revised: 2022-03-05

基金项目: 辽宁省兴辽英才计划项目 (XLYC1907158)

Fund: Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC1907158)

通讯作者: 周恩泽 (1991—), 男, 博士, 主要研究方向为微生物腐蚀。

Corresponding author: ZHOU En-ze (1991-), Male, Doctor, Research focus: microbiologically influenced corrosion.

引文格式: 肖凌云, 武文韬, 周沂霖, 等. Al_{0.4}CoCrCuFeNi 高熵合金在生活环境中的抗菌性能[J]. 表面技术, 2023, 52(1): 266-277.

XIAO Ling-yun, WU Wen-tao, ZHOU Yi-lin, et al. Antibacterial Properties of Al_{0.4}CoCrCuFeNi High Entropy Alloy in Living Environment[J]. Surface Technology, 2023, 52(1): 266-277.

composition of high-entropy alloys is analyzed through XRD. Taking of the tensile test to study the mechanical properties of high entropy alloy, and collect microbial communities in various living environments. Furthermore, by plate coating, using field emission scanning electron microscope (FESEM) and confocal laser scanning microscope (CLSM) to observe the bacterial growth and film morphology, and to compare and analyze the antibacterial properties of the high entropy alloy. Through gene sequencing, OTU cluster analysis and species taxonomy analysis were carried out to statistically analyze community structure and species diversity. Through the analysis of reactive oxygen species clusters, the sterilization mechanism of high entropy alloys was explored. The gauge length of the rod tensile specimen is 33 mm and the diameter is 6 mm. A constant strain rate of the room temperature tensile test is executed $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. And the final yield strength result is $(308 \pm 10) \text{ MPa}$, which is higher than that of traditional antibacterial stainless steel. In this experiment, a medical cotton swab sterilized in a sterilizer was placed in a 50 mL centrifuge tube containing 10.9 g/L PBS buffer. Three environments are randomly selected: the metal button of ATM (a), the metal door handle of laboratory (b) and the door handle of dermatology clinic (c). Then the collected strains are enriched and cultured with LB liquid medium and cultured in a shaking table at 37°C for 12 hours waiting to be used. Through the calculation formula of antibacterial rate and the experimental results (R - the antibacterial rate; B - the number of viable bacteria in the control (CFU/mL); A - the number of viable bacteria in antibacterial sample (CFU/mL), it is concluded that the antibacterial rate of high entropy alloy is more than 99.99%. The results of scanning electron microscope (FESEM) analysis and live and dead staining results shows that the number of colonies on the surface of AHEA decrease significantly and there are almost no living microorganisms, cause the stained image is basically in red and it sparsely distributes. In addition, the sequencing results shows that the dominant bacteria that are easy to adhere to the surface of common metal samples are mostly harmful pathogens, including bacteria and fungi, after consulting the data, it shows that the collected dominant bacteria will cause serious diseases or have a great impact on production and life, but fortunately, AHEA inhibits them nicely. The above results indicate that AHEA can be used as a long-term broad-spectrum antibacterial material. It can prevent the reproduction and growth of bacteria and fungi on the metal surface and the formation of biofilm. The comprehensive performance is much better than that of traditional antibacterial alloys. The application prospect of copper containing high entropy alloy in daily living environment is confirmed, which provides a new idea for the further development of unique antibacterial metal materials with high antibacterial efficiency and mechanical properties.

KEY WORDS: antibacterial alloys; high-entropy alloys; anti-bacterial; anti-fungal; biofilm; living-environment

微生物常见于人们的生产生活中, 对人类的健康生存环境等方面均产生了重要的影响。一方面, 微生物对人类保健具有积极作用, 例如生存在人类肠道中的双歧杆菌, 对病人机体炎症和免疫的调节都具有积极影响^[1]。另一方面, 微生物对人体的健康也有危害, 例如在生产加工运输过程中的食物由于保存不当, 将极易滋生有害病菌; 在医院内常见的肺炎克雷伯菌, 感染人类后可引起较严重的下呼吸道感染甚至死亡^[2]。根据世界卫生组织的报道, 全球每年至少有 1 600 万人因细菌传染导致身患疾病而死亡^[3]。此外, 2019 年出现的新型冠状病毒也迅速席卷全球, 至今国内仍时有接触感染发生。在这场全民抗疫的战斗中, 人们对生活中公共接触物品杀菌消毒的重视达到了空前的高度。相对于病毒, 各种致病菌更容易长期附着在生活环境中的金属制品上, 其形成的生物被膜可有效抵御外部环境的变化^[4-6]。生活中常用的传统杀菌方式, 如喷洒 75% 酒精, 难以对真菌生物被膜起到有效的杀灭作用, 导致一些常见的真菌感染疾病, 例如脚气、花斑癣等, 容易反复发作, 难以根除^[7]。因此, 如何避免诸如门把手、电梯扶手、电梯按钮等这些频繁接

触的金属制品成为传播细菌的媒介, 已经成为了当下的研究热点问题之一。

铜元素有着天然良好的抗菌性能, 为了使普通合金也具有抑菌的能力, 近些年研究者们已经将具有抗菌功能的铜加入到这些合金中, 所得材料可通过直接接触或释放铜离子、亚铜离子杀死附着细菌^[8-9]。然而对于现有的抗菌不锈钢合金, 如 304 含铜不锈钢等, 在保证不牺牲材料本身机械性能的同时具有良好的抗菌效果, 材料中所添加的铜含量都存在极限值 (不锈钢中 Cu 质量分数通常低于 5%)^[10], 但较低的铜含量会显著影响合金材料的抗菌效果。此外, 抗菌不锈钢材料仅是通过添加铜或银元素对合金成分进行优化, 难以集中各合金元素的优异特性, 限制了其发展应用。而高熵合金通常包含 5~13 种组元, 且每一组元的含量介于 5%~35% 之间, 按照等原子比或近于等原子比进行合金化形成多主元合金^[11]。该多主元合金的设计理念可为多功能金属材料的开发设计带来一个全新的发展空间。通过优化高熵合金的组成成分, 可以使其同时拥有多种优异特性, 如高强度、高硬度、耐腐蚀、耐磨损等, 因此高熵合金具备很高

的研究价值与应用前景^[12-14]。因此,利用具有天然抗菌性的铜元素作为抗菌高熵合金的主元素之一,可以制备出兼具优良机械性能和抗菌性能的新型抗菌合金。但目前关于含铜高熵合金的抗菌性能研究较少,起步较晚。2016年,Wu等^[15]研究了CuCoCrFeNi高熵合金对大肠杆菌的抗菌性能,发现其抗菌率可达99.5%。2022年,Gao等^[16]进一步利用3D打印技术制备得到具有优异抗菌性能的CoCrCuFeNi高熵合金,其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果分别达到98%和99%以上。此外,Ren等^[17]的研究表明,铜的添加可以在不牺牲机械性能的情况下能提高Co_{0.4}FeCr_{0.9}Cu_x抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能。关于Al_{0.4}CoCrCuFeNi含铜高熵合金的研究结果也表明,该合金材料对海洋铜绿假单胞菌、海洋越南芽孢杆菌、多重耐药鲍曼不动杆菌和金黄色葡萄球菌均具有十分优异的抑菌效果^[18-19]。但是,单一菌种并不能完全反映该合金在实际复杂菌群环境中的广谱抗菌性以及高效性。目前市场上不仅缺少有效可用的抗菌金属材料,而且对抗菌金属材料在实际应用过程中的抗菌效果知之甚少。

因此,为评定Al_{0.4}CoCrCuFeNi抗菌高熵合金(Antibacterial High-entropy Alloys, AHEA)对实际生活环境中菌群的抗菌性能,本试验收集来自3种不同生活环境中的金属制品表面的混菌,并采用304不锈钢(304 SS)、含铜304不锈钢(304 Cu-SS, 4.1%Cu)和纯铜(Cu)样品作为对照,研究Al_{0.4}CoCrCuFeNi高熵合金对环境微生物的实际抗菌效果。

1 试验

1.1 抗菌高熵合金制备

Al_{0.4}CoCrCuFeNi抗菌高熵合金的制备均选用纯度为99%以上的工业级纯原料(Al、Co、Cr、Cu、Fe和Ni)。原料依次经过称量配比、混匀熔炼,最终浇铸得到合金铸锭,具体熔炼步骤如下。

首先按各合金元素物质的量比进行称量配重,称量出总质量约为2.5 kg的合金料。合金采用真空电弧炉熔炼。熔合金时,按照Al原料在下,Co、Cr、Cu、Fe和Ni原料均匀混合在上的顺序放入水冷铜坩埚,真空电弧炉抽真空至 3×10^{-3} Pa,反冲氩气至0.05 Pa。合金熔炼前先熔炼Ti合金锭,吸收真空电弧炉内残余氧气。熔炼合金时,需要进行翻面熔炼,并且至少熔炼6遍,每遍熔炼1~2 min,获得合金液并浇铸成铸态的Al_{0.4}CoCrCuFeNi高熵合金。

1.2 机械性能测试

利用Instron 5569测试机对合金试样进行拉伸试验。棒状拉伸样的标距长度为33 mm,直径为6 mm,以 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的恒变速率进行室温拉伸。拉伸试样

侧面逐级打磨至1000#,以消除线切割痕迹对拉伸试验产生的影响。

1.3 菌样采集

使用经灭菌锅灭菌的医用棉签,将其置于装有PBS缓冲液(10.9 g/L)的50 mL离心管中,分别随机选择ATM机金属按键(a)、实验室金属门把手(b)、皮肤科门诊室门把手(c)3个环境刮取采集菌种。利用LB液体培养基对采集得到的菌种进行富集培养,在37℃摇床中培养12 h备用。其中,LB液体培养基成分为1 000 mL去离子水、10 g氯化钠、10 g胰蛋白胍和5 g酵母提取物。

1.4 抗菌测试

将AHEA对于生活环境混菌的抗菌特性与304 SS、304 Cu-SS、Cu进行比较,其中AHEA、304 Cu-SS、Cu为抗菌样,304 SS为对照样。表1为304 SS和304 Cu-SS的元素组成及其含量。图1为抗菌测试试验的示意图,具体过程为:取出摇床中的菌样,使用分光光度计测定菌液OD值,调整至OD₆₀₀约为0.5,此时菌液浓度约为 10^8 CFU/mL;用含0.1 g/L酵母提取物的PBS缓冲液作为稀释剂和培养液,将菌液稀释到 10^5 CFU/mL,采用覆膜法将稀释后的菌液(100 μ L)接种到4种金属试样表面(样品表面积均为1 cm²),将接种3种菌群环境下的试样放在37℃恒温箱中分别培养1、3、6 h,所有试验均重复3次。

表1 304 SS和304 Cu-SS的化学元素成分及含量
Tab.1 Chemical element composition and content of 304 SS and 304 Cu-SS

	wt. %						
Material	Cr	Ni	Cu	Mn	Si	C	Fe
304 SS	17.9	7.8	0.0	1.1	0.4	0.01	Bal.
304 Cu-SS	17.0	7.9	4.1	1.0	0.4	0.01	Bal.

之后将AHEA和Cu样品(表面均含100 μ L菌液)轻轻取出置于装有900 μ L PBS缓冲液的离心管内,充分震荡摇匀后,取其中100 μ L含菌液(即稀释10倍后)进行平板涂布。此外,对304 SS和304 Cu-SS的覆膜液再次稀释10倍接种于LB固体培养基中,在37℃恒温箱中培养24 h,拍摄培养基中菌落的照片并统计菌落数,每个试验至少进行3次。抗菌率由式(1)计算得到。

$$R = \frac{B - A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为抗菌率; B 为对照样活菌数(CFU/mL); A 为抗菌样活菌数(CFU/mL)。

1.5 扫描电镜分析

通过场发射扫描电子显微镜(FESEM, Ultra-Plus, Zeiss, Germany)观察经前述相同方法覆膜6 h

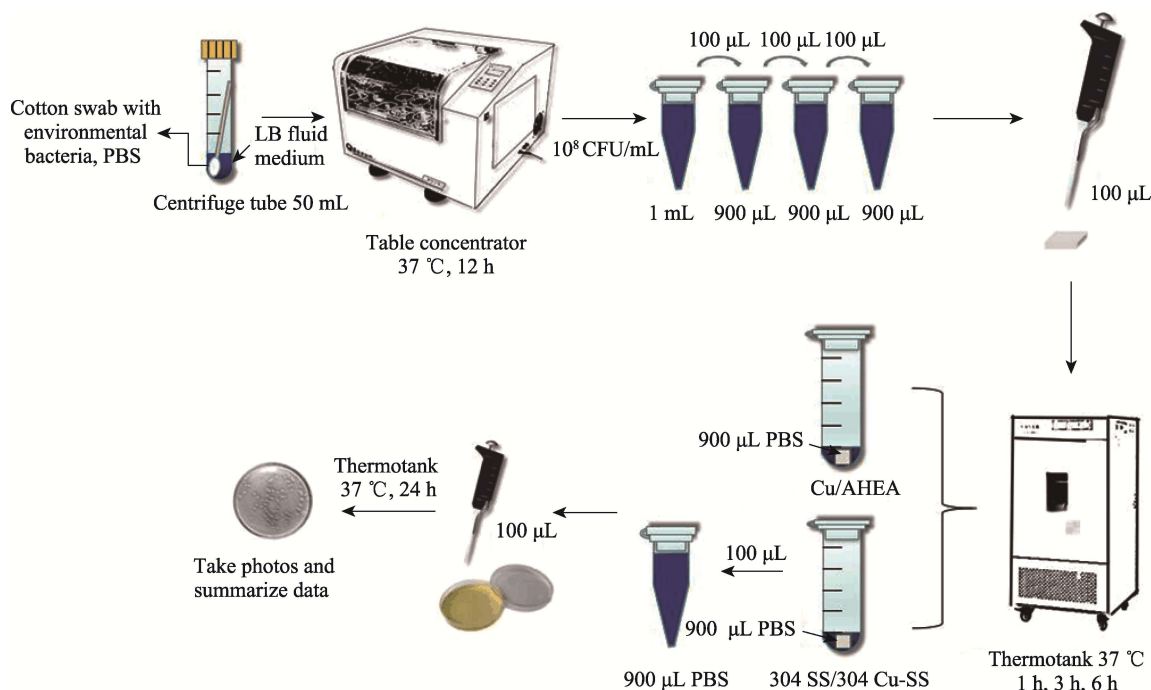


图 1 抗菌试验流程图

Fig.1 Process of the antibacterial test

后的样品。首先,将样品在去离子水中清洗,轻轻洗去表面的覆膜液,将样品连同附着的生物被膜一同放入 4%戊二醛溶液中,在 4 °C 冰箱中进行 2 h 的固定处理。戊二醛是一种渗透快的双交联剂,交联能力强,可以将细胞中的蛋白质固定且不破坏细胞骨架的结构^[19]。接下来,分别以 50%、60%、70%、80%、90%、95%和 100%的乙醇溶液逐级梯度脱水,每个浓度梯度下放置的时间为 7 min。100%乙醇脱水结束后将样品取出吹干。最后,使用导电胶将样品固定于铝板表面,利用离子溅射仪对样品进行喷金处理,以确保样品表面有良好的导电性,然后再在 FESEM 高倍数目镜下进行形貌观察。同时利用扫描电镜对本试验中的高熵合金表面进行金相观察。

1.6 活死细胞染色

采用与抗菌测试中同样的方法在 37 °C 覆膜 6 h 后,使用 LIVE/DEAD® (Invitrogen, USA) 细菌活死染色试剂盒,在暗室 (23 °C) 中对样品进行染色。绿色荧光 SYTO-9 染料染色活细胞。红色荧光碘化丙啶 (PI) 染料染色死细胞。着色后使用激光共聚焦显微镜 (CLSM) (C2 Plus, Nikon, Japan) 以 3-D 模式观察细菌生长与生物被膜厚度^[21-22]。

1.7 基因测序

分别对细菌液体样品和在 304 SS 试样表面培养 6 h 后的生物被膜样品,进行 16S 基因测序。根据 OTU 聚类 (ASV 去噪) 分析结果,检测 OTU (ASV) 多样性指数和测序深度;根据分类信息,对每个分类级别的群落结构进行统计分析。

1.8 活性氧簇分析

选用实验室细菌,通过覆膜 1、3、6 h 后,使用活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测试剂盒 (碧云天, 中国),在暗室 (23 °C) 中对样品进行染色 30 min。用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 观察 AHEA、304 SS、304 Cu-SS、Cu 4 种金属表面 ROS 的产量,即绿色荧光强度。

1.9 XRD 分析

利用 X 射线衍射仪 (XRD, Shimadzu XRD-6000) 进行物相组成分析,采用 Cu 靶,扫描速度为 4 (°)/min, 2θ 扫描范围为 20°~100°。

2 结果及分析

2.1 材料组织与机械性能分析

通过图 2 可以明显看出,304 不锈钢和 304 Cu-SS 均为典型的奥氏体结构,内部存在少量的马氏体。但在添加铜的不锈钢样品中没有检测到富铜相的存在,这可能是因为奥氏体相和析出的富铜相结构相似,均为面心立方结构 (FCC),因此富铜相衍射峰与奥氏体相衍射峰接近被覆盖,也表明了此时含铜不锈钢铜含量较少,形成的富铜相体积分数难以检测得到。纯铜是 FCC 结构,其衍射峰为 (111)、(200)、(220),不存在其他衍射峰,表明试验所用铜样品的纯度较高,杂质较少。XRD 结果也表明,高熵合金主要是 FCC 结构。进一步利用 SEM 观察高熵合金的金相组织可

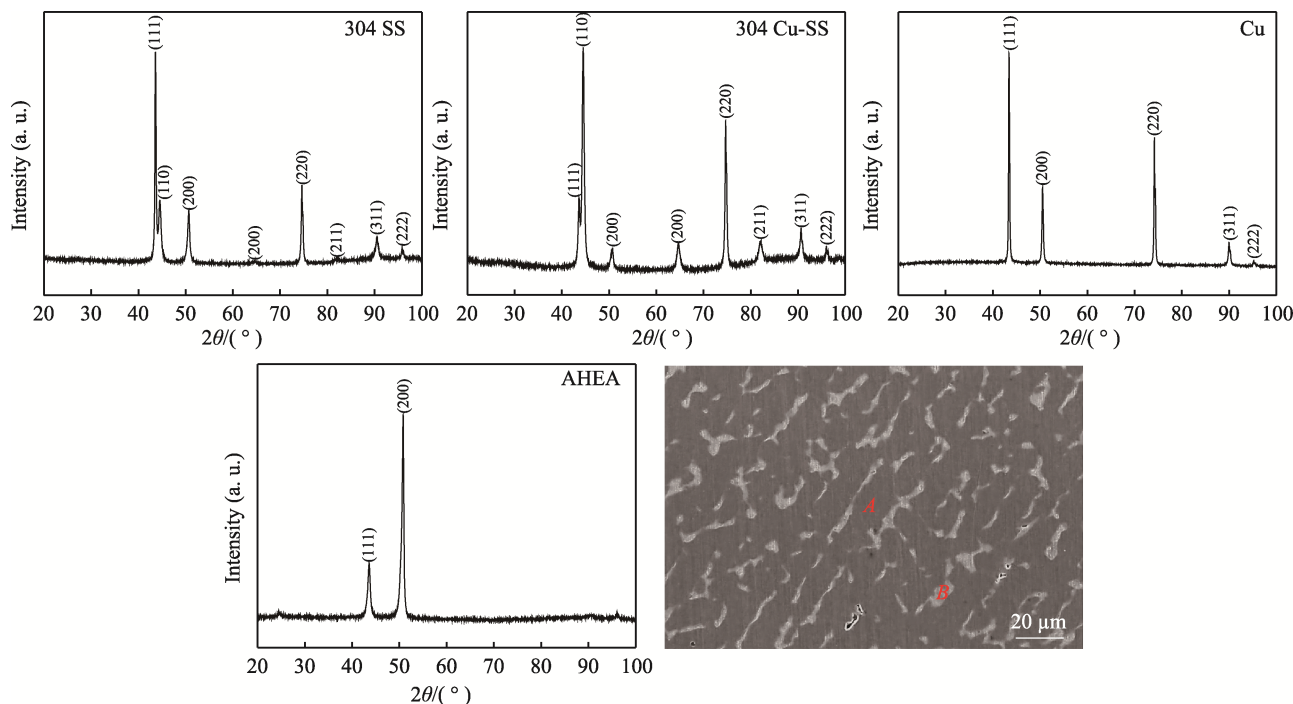


图2 几种金属材料的组织结构分析

Fig.2 Structural analysis of various metal materials: a) XRD analysis of 304 SS; b) XRD analysis of 304 Cu-SS; c) XRD analysis of Cu; d) XRD analysis of AHEA; e) SEM analysis of AHEA

发现,该抗菌高熵合金具有粗枝晶区域(A)和枝晶间结构(B)。通过能谱仪分析枝晶和枝晶间的化学成分,结果见表2。从化学元素分布结果可以看出,该合金的枝晶区富含Co、Cr、Fe和Ni元素,枝晶间富含Cu元素,表明合金材料表面弥散均匀分布着大量的Cu元素,可能有利于增强材料的抗菌能力。

表2 抗菌高熵合金的化学元素成分及含量
Tab.2 Chemical element composition and content of AHEA

	wt. %					
Position	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Ni
Dendrite area	6.4	21.6	22.6	9.6	21.8	18.0
Interdendritic area	10.9	5.5	4.2	62.5	5.1	11.8

经测试,未经过轧制变形或热处理等增强手段,铸态AHEA的屈服强度仍优于304不锈钢(图3)。铸态AHEA的屈服强度为 (308 ± 10) MPa,高于304不锈钢 (278 ± 8) MPa以及304 Cu-SS (225 ± 8) MPa的屈服强度。纯铜的屈服强度同样远低于 $\text{Al}_{0.4}\text{CoCrCuFeNi}$ 高熵合金材料。Xi等^[23-24]报道的316/317 Cu-SS的屈服强度约为230 MPa,也低于该铸态AHEA,表明该高熵合金比传统抗菌不锈钢材料具有更优异的屈服强度。

2.2 抗菌性能分析

采用微生物平板计数法(图1)评估AHEA、304 Cu-SS和Cu的抗菌性能,抗菌结果如图4所示。可

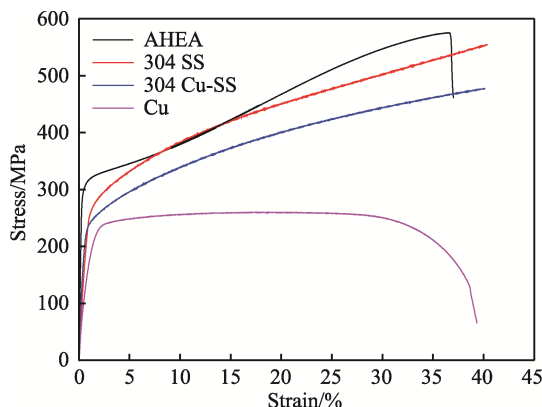


图3 金属材料的应力-应变曲线

Fig.3 Stress-strain curve of the metal materials

以看到,各环境的304 SS与304 Cu-SS样品的培养基上均长出了较多菌株(稀释100倍)。其中,ATM机金属按键环境(a)中的菌在与金属接触初期(1 h)生长缓慢,随接触时间的延长,微生物开始迅速繁殖,培养6 h后样品表面黏附菌株数量可达到约 $50\,000\text{ CFU/cm}^2$;实验室金属门把手环境(b)中,开始培养时(1、3 h)仅有少量菌株,而与金属接触6 h后,在培养基上可以观察到大量成蛛网状的真菌(直径2~3 cm),但具体真菌种类还需通过16s基因测序进行进一步鉴定分析;医院皮肤科门诊室门把手环境(c)所示结果与(a)中类似,在培养6 h后存在有大量微生物。不过经过试验对比可以看出,在2种金属表面培养6 h后存活菌数量相差不大,304 Cu-SS虽然在普通304 SS的基础上添加了一定的铜元素,

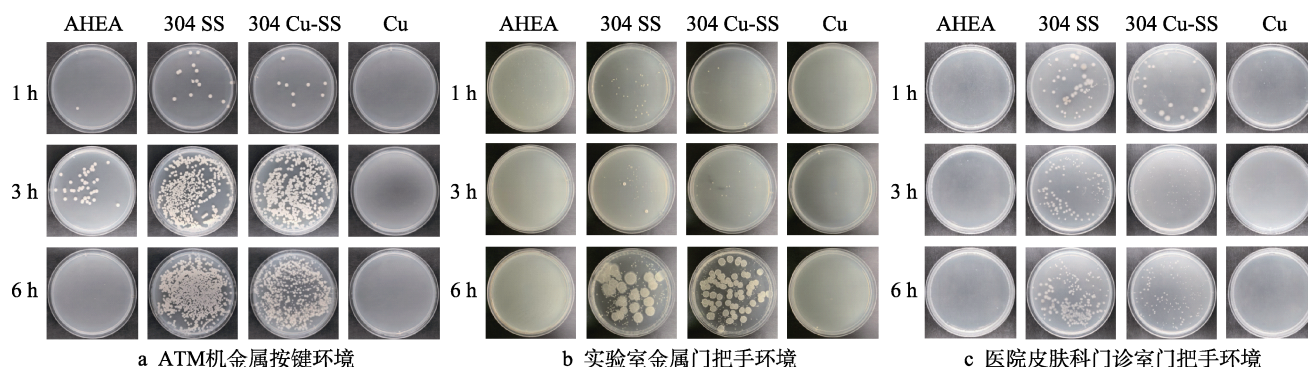


图 4 不同环境下各金属抗菌性能测试结果

Fig.4 The mixed bacteria collected from metal keys of ATM (a), metal door handles of laboratory (b), door handles of dermatology clinic (c) were coated for 1, 3 and 6 hours and cultured on LB agar medium for 24 hours (The dilution ratio of film coating solution after collection is as follows: AHEA and Cu, 10 times dilution; 304 SS and 304 Cu-SS, diluted 100 times)

但并没有表现出良好的抗菌性能。

而观察 AHEA 的抗菌效果, 可以发现在刚开始进行培养时 (1、3 h), 部分样品稀释 10 倍涂板后上虽然也显示生长出少量菌落, 但数量相较于 304 SS 与 304 Cu-SS 上的已有显著降低; 而当培养时间到达 6 h 后, 培养基上的菌落几乎完全消失。与此同时, Cu 中的菌落数量极少或者并没有观察到菌落。由抗菌率的计算公式结合试验结果可以得出, 37 °C 时 AHEA 对于在前述 3 种环境中所采集到的环境混菌大约只需要 3~6 h, 便可以达到 99.99% 的杀菌率。这些结果表明, AHEA 可以作为一种高效的抗菌材料在实际环境中进行应用。

2.3 成膜性能分析

2.3.1 微生物形态分析

利用 FESEM 进一步研究 4 种金属对固着微生物细胞的影响。如图 5 所示, 在覆膜 6 h 后, 304 SS 表面存在大量形态完好的微生物群落, 表明微生物的生长较好; 304 Cu-SS 的表面形貌与 304 SS 相差无几, 表明 304 Cu-SS 并未表达出良好的抗菌性能; 而相较于 304 SS 和 304 Cu-SS, AHEA 表面已经几乎没有任何附着的生物被膜, AHEA 对于附着生物被膜的抑制几乎达到了 100%; Cu 表面可以观察到大量析出物, 这可能与 Cu 容易被氧化有关, 使得对 Cu 表面的观

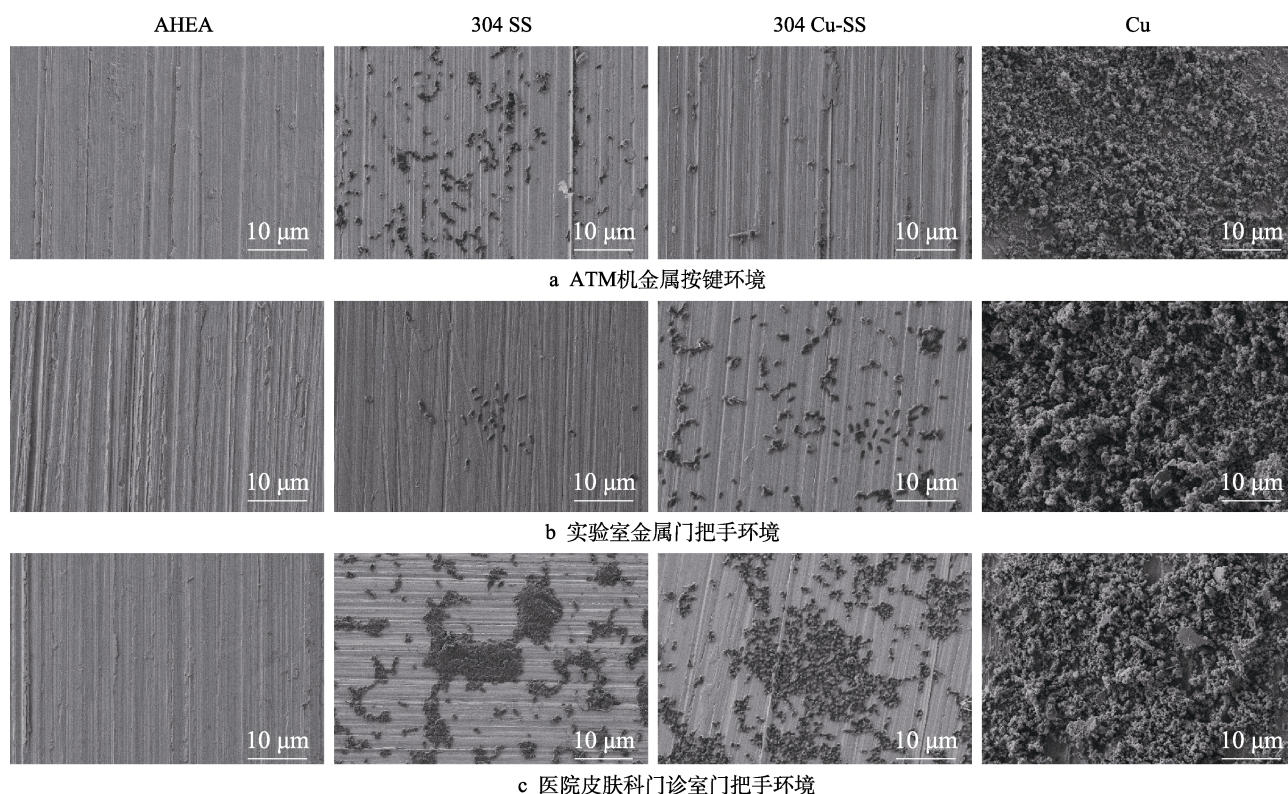


图 5 覆膜 6 h 后不同金属试样表面的微生物群落形貌图

Fig. 5 Adhesive colonies of the mixed bacteria collected from metal keys of ATM (a), metal door handles of laboratory (b), door handles of dermatology clinic (c) on AHEA, 304 SS, 304 Cu-SS and Cu after coating for 6 h

察难度被进一步提高,也难以观察到 Cu 表面有明显附着的生物被膜,但结合平板数据可知 Cu 样品表面并不存在活细菌。细胞染色技术将有利于进一步确定 Cu 以及其他合金表面的细菌黏附情况和活死状态。这些结果说明 AHEA 在抑制生物被膜附着上的性能要显著优于 304 SS 和 304 Cu-SS。相关研究表明,AHEA 合金的抗菌性能来自内部铜相的直接接触和释放的铜离子,实现了对浮游和固着微生物的抑制和杀灭^[25-26]。而 304 Cu-SS 虽然也会析出一定量的铜离子,但是并不足以对生物被膜形成起到有效的抑制效果。

2.3.2 活死细胞染色

使用活死细胞染色技术观察 6 h 后 4 种不同类型金属上的混菌生长状态。如图 6 所示,观察结果与平板计数所展现出的规律相似。在 Cu 样品上几乎看不到任何活细菌和死细菌的存在,结合平板涂板结果,表明 Cu 能快速有效杀灭细菌以防止其黏附。在 304 SS 样品上仍能观察到大量存活的厚生物被膜,平均厚度为 $(56.2 \pm 2.5) \mu\text{m}$;而在 AHEA 表面观察到的生物被膜几乎都已经被杀死,并且其平均厚度为 $(29.5 \pm 0.5) \mu\text{m}$,约为 304 SS 表面生物被膜厚度的一半;304 Cu-SS 表面生物被膜的平均厚度为 $(42.8 \pm 1.0) \mu\text{m}$,同样远高于 AHEA。这一结果表明,AHEA 对表面形成的生物被膜的抑制能力和杀灭效率都要显著高于 304 Cu-SS。

2.4 基因测序

在前文中已经证明了 $\text{Al}_{0.4}\text{CoCrCuFeNi}$ 新型含铜抗菌高熵合金对在 3 个环境中所采集到的混菌有着卓越的抗菌效果,但是由于尚不确定采集到的混菌的组成成分,所以无法判断 AHEA 究竟对哪种或哪几种菌甚至是真菌都有着良好抗菌效果,所以对混菌样品进行了 16S rDNA 测序分析,通过得到环境中各物种的相对丰度来说明 AHEA 抗菌性能的积极意义。

2.4.1 细菌

对来自前述 3 种环境上的混菌样品进行 16S rDNA 测序分析,得到优势细菌物种的相对丰度如表 3 所示。图 7 为表 3 所对应的柱状图。样本中丰度占比小于 1% 的物种归为 Others,其余的作为优势物种进行分析。

从试验数据中可以观察到,在 ATM 机金属按键上采集到的混菌样品的菌液(a)中丰度最高的为芽孢杆菌属(*Bacillus*);而在 304 SS 样品表面培养 6 h 后(d),克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)成为了生物被膜中的优势菌种。多数芽孢杆菌属细菌是无害的,只有少数对人和动物具有致病性,例如蜡样芽孢杆菌可引起食物中毒,临床表现为呕吐或腹泻^[27];而当人感染克雷伯氏菌属后,则会引发较严重的下呼吸道感染甚至死亡^[2]。更为严重的是,近年来由于抗菌药物的滥用,使得克雷伯氏菌对常用抗菌药物呈现出严重的多

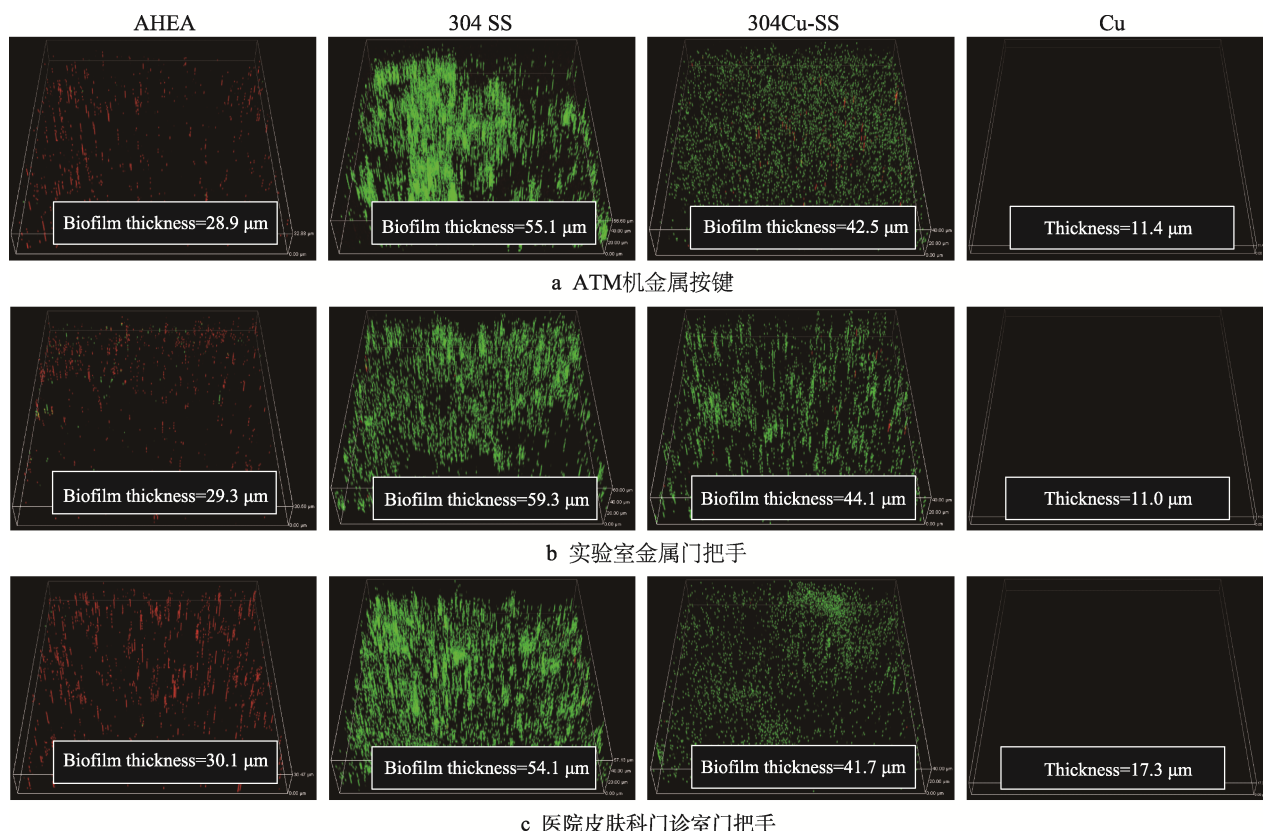


图 6 覆膜 6 h 后不同金属试样表面的微生物群落活死染色图

Fig.6 Live/ dead cell stained images of mixed bacteria collected from (a) metal keys of ATM, (b) metal door handles of laboratory, (c) door handles of dermatology clinic on AHEA, 304 SS and 304 Cu-SS after coating for 6 h (Green fluorescence indicates living cells and red fluorescence indicates dead cells)

表 3 不同环境下的细菌组成和丰度
Tab.3 Bacterial composition and abundance in different environments

Specimen group	a	b	c	d	e	f
<i>Klebsiella</i>	0.03	45.72	0.07	85.83	0.76	89.63
<i>Bacillus</i>	96.43	39.44	15.45	6.58	13.16	4.81
<i>Staphylococcus</i>	2.42	0.21	76.54	4.63	83.60	1.10
<i>Weissella</i>	0.02	14.00	0.03	0.02	0.03	1.75
<i>Unclassified_Bacillales</i>	0.70	0.15	7.12	0.36	2.07	0.09
Others	0.40	0.48	0.79	2.58	0.38	2.62

Notes: 16S rDNA sequencing was performed after centrifugation and enrichment of bacterial solution and biofilm from three environments, including (a) ATM metal key bacterial solution, (b) laboratory metal door handle bacterial solution, (c) dermatology outpatient door handle bacterial solution, (d) ATM metal key biofilm, (e) laboratory metal door handle biofilm and (f) dermatology outpatient door handle biofilm.

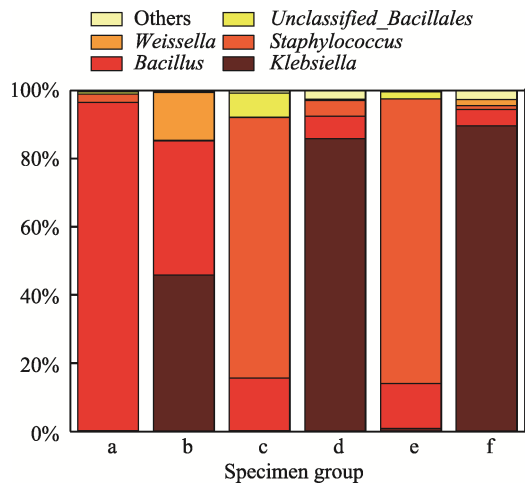


图 7 表 3 所对应的柱状图
Fig.7 Histogram corresponding to table 3

重耐药性, 常常使临床抗感染治疗陷入困境, 对临床和公共卫生健康产生巨大威胁^[28]。

在实验室金属门把手上采集到的混菌样品的菌液 (b) 中丰度最高的是克雷伯氏菌属和芽孢杆菌属, 此外还有少量的葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和魏斯氏菌属 (*Weissella*); 经过 6 h 的培养后 (e), 葡萄球菌属成为生物被膜中的优势菌种。少数葡萄球菌属可导致疾病, 是最常见的化脓性球菌, 也是医院交叉感染的重要来源之一, 可以对人类和畜牧业造成严重的危害^[29]。尤其是最广为人知的金黄色葡萄球菌, 可以引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等局部化脓感染, 同时也可以引起败血症甚至是脓毒症等全身感染^[30]。魏斯氏菌属则没有那么严重的致病性, 主要用途为发酵以及生物研究^[31]。

在皮肤科门诊室门把手上所采集的样品的结果与其他 2 种环境类似, 混菌菌液 (c) 中的优势菌种为葡萄球菌属; 培养 6 h (f) 后生物被膜中的优势菌种被克雷伯氏菌属所取代, 值得一提的是, 因这种菌致病的病例中, 有 95% 的患者是在医院受到感染^[2]。由此可见, 这是一种不可忽视且危害极大的医院中常见的致病细菌。

2.4.2 真菌

对来自前述 3 种环境下的混菌样品进行 16S rDNA 测序分析, 未能检测到 ATM 机金属按键以及皮肤科门诊室门把手存在真菌物种。从实验室金属门把手得到优势真菌物种相对丰度如表 4 所示。图 8 为表 4 所对应的柱状图。样本中丰度占比小于 1% 的物种归为 Others, 其余的作为优势物种进行分析。

在实验室金属门把手上采集到的混菌样品的菌液 (a) 中, 各种类的真菌丰度较为均匀, 除了能导致植物根腐病^[32]和人类肺真菌病^[33]的镰刀菌属 (*Fusarium*) 之外并没有明显的优势菌种。但是当在 304 SS 样品表面培养 6 h (b) 后, 依萨酵母属 (*Issatchenkia*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、帚枝霉属 (*Sarocladium*) 以及威克汉姆酵母属 (*Wickerhamomyces*) 的相对丰度明显高于其他物种。其中, 依萨酵母属可以在果蝇体表携带, 这种酵母菌在致病性测定试验中被证实为能够引发葡萄酸腐病的致病菌, 已经成为葡萄生长中后期重要的病害之一, 造成葡萄果穗大量腐烂, 严重影响葡萄的品质与产量^[34]; 曲霉菌属则可以导致人体患多种疾病, 例如感染性心内膜炎^[35]、曲霉菌性脊柱炎^[36]等; 常见于霉变粮食中的黄曲霉菌也是曲霉菌属的一种, 其分泌的黄曲霉素在世界卫生组织国际癌症研究机构公布的一类致癌物清单中, 对人体有着极大的危害; 帚枝霉属感染水稻后会引引起水稻鞘腐病, 造成 20%~85% 的产量损失^[37]; 威克汉姆酵母属尽管属于酵母菌属, 但也会感染人类引起真菌血症^[38]。这 4 种真菌在生物被膜样品中的总相对丰度之和超过了 60%, 并且任何一种感染动物或植物后都能引起严重的疾病, 会对生产或是生活产生重大影响。

除了上述 4 种可以感染人体或植物导致发病的真菌外, 在非优势物种中, 还有一些真菌同样可以引起各种疾病, 例如假丝酵母菌属 (*Candida*) 在一定条件下可侵犯皮肤、黏膜、内脏和血液, 引起继发性感染, 表现为急性、亚急性或慢性炎症^[39], 并且假丝

表 4 实验室门把手的真菌丰度和组成
Tab.4 Fungal abundance and composition of laboratory door handle

Specimen group	a	b	Specimen group	a	b
<i>Issatchenkia</i>	1.10	20.27	<i>Verticillium</i>	7.25	—
<i>Aspergillus</i>	1.79	17.47	<i>Devriesia</i>	5.83	0.21
<i>Sarocladium</i>	1.04	14.32	<i>Arthrosporum</i>	4.60	—
<i>Wickerhamomyces</i>	0.90	8.51	<i>Saccharomyces</i>	2.91	—
<i>Pichia</i>	—	2.73	<i>Trichoderma</i>	2.74	—
<i>Torulaspora</i>	—	2.72	<i>Rhinoclatiella</i>	2.51	—
<i>Mortierella</i>	0.38	2.56	<i>Lophiostoma</i>	2.11	—
<i>Candida</i>	0.63	2.46	<i>Aureobasidium</i>	1.77	0.97
<i>Hyphopichia</i>	—	2.08	<i>Oliveonia</i>	1.38	—
<i>Rhizomucor</i>	0.60	1.73	<i>Medicopsis</i>	1.15	—
<i>Strobilurus</i>	—	1.62	<i>Unclassified_Capnodiales</i>	18.23	0.32
<i>Periconia</i>	—	1.36	<i>Unclassified_Dothideomycetes</i>	7.28	—
<i>Lecanicillium</i>	—	1.26	<i>Unclassified_Helotiales</i>	1.04	—
<i>Rhizopus</i>	—	1.24	<i>Unclassified_Rozellomycota</i>	—	1.59
<i>Clavispora</i>	—	1.03	<i>Unclassified_Fungi</i>	3.97	1.46
<i>Fusarium</i>	11.80	—	Others	19.01	14.09

Notes: 16S rDNA sequencing was carried out after centrifugation and enrichment of bacterial solution and biofilm from laboratory door handle, including (a) laboratory metal door handle bacterial solution, (b) laboratory metal door handle biofilm.

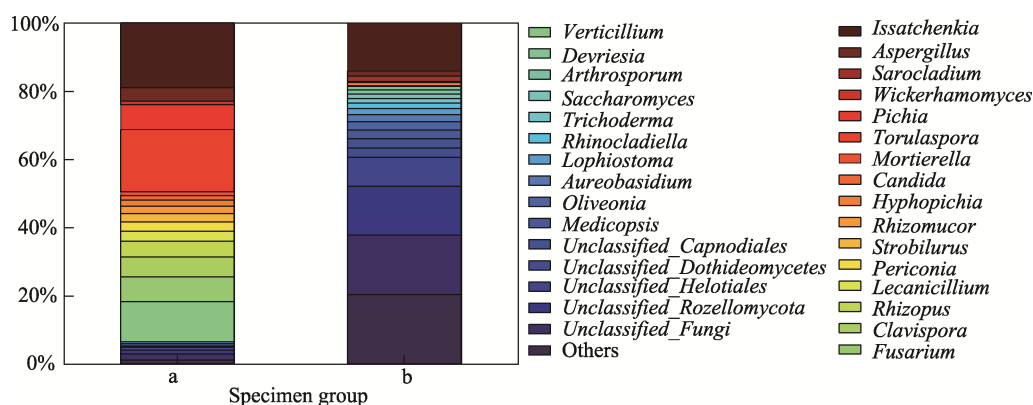


图 8 表 4 所对应的柱状图
Fig.8 Histogram corresponding to table 4

酵母菌外阴阴道炎是育龄期女性的常见病和多发病，其长期反复发作、难以根治的特点严重影响患者的日常生活及身心健康^[40]；生丝毕赤酵母属（*Hyphopichia*）长期以来虽然只被用作生物研究，但是近期也被发现同样可以感染人类^[41]；根毛霉属（*Rhizomucor*）会引起皮肤接合菌病，且发生率正在逐年增加^[42]；绝大多数木霉（*Trichoderma*）对人类无害，但有些种类能够感染人类造成木霉病，表现形式多样，临床极易误诊，临床表现中以腹膜炎最多见^[43]；喙枝孢霉属（*Rhinoclatiella*）在 2020 年被发现是导致免疫能力差的患者患脑真菌病的致病菌^[44]；短梗霉属（*Aureobasidium*）引发的感染在临床上多表现为真菌血症，腹膜炎或者皮肤感染^[45]。

2.5 ROS 分析

选用实验室环境下的微生物菌群覆膜于不同金属表面，观察其在不同时间节点下产生的活性氧（ROS），如图 9 所示。与 AHEA 和纯铜相比，304 不锈钢以及 304 Cu-SS 样品上几乎没有绿色荧光，表明 304 Cu-SS 在短时间内几乎没有 ROS 产生，因此没有抗菌性。相比之下，AHEA 表面在 3 h 后便观察到高水平的 ROS（高荧光强度），纯 Cu 材料表面 ROS 产量最高。结合合金组织与成分分析（图 2）可知，合金中的 Cu 含量越多，微生物菌群中的 ROS 产量越高。而 ROS 的高表达也证明了抗菌高熵材料与微生物（包含细菌和真菌）的直接接触会引发接触式杀菌反应，从而催化 ROS 表达，破坏细菌结构。

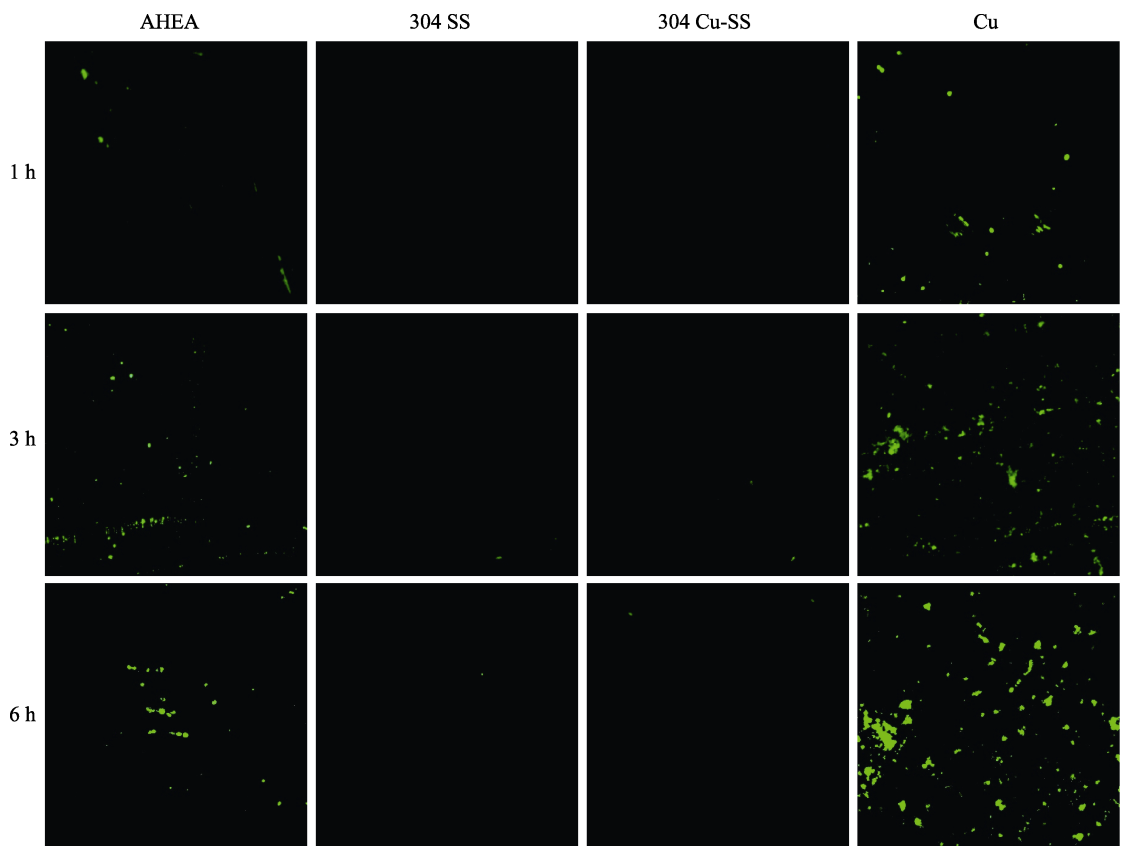


图 9 实验室菌液覆膜 1、3、6 h 后不同金属试样表面的活性氧染色图
Fig.9 Reactive oxygen species stained images of mixed bacteria collected from metal door handles of laboratory after coating for 1, 3 and 6 hours (Green fluorescence indicates reactive oxygen species)

3 结论

通过抗菌测试、活死细胞染色、微生物形态分析、活性氧分析，证明了 Al_{0.4}CoCrCuFeNi 高熵合金对于多种生活环境中常见的、可能引起人或各种动植物患病的细菌或真菌都有良好的、接近纯铜的抗菌性能，对环境微生物的抑制效果显著高于 304 SS 与 304 Cu-SS。这一结论有利于更好地将此新型合金材料应用于各种生活环境，拓展其相关应用，为开发兼具抗菌性能等综合性能优异的生活用金属新材料提供新思路及数据支撑，为未来的金属防护提供新的有效的材料。

参考文献：

[1] 田承莉. 与人体微生物和谐共处[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(65): 41.
TIAN Cheng-li. Harmonious Coexistence with Human Microorganisms[J]. World Latest Medicine Information, 2019, 19(65): 41.

[2] 陈刚, 陈荣, 邓子德, 等. 肺炎克雷伯菌感染部位分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22): 5562-5563, 5566.
CHEN Gang, CHEN Rong, DENG Zi-de, et al. Distribu-

tion and Drug Resistance of Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(22): 5562-5563, 5566.

[3] 孟岩岩. 无机抗菌剂在日用陶瓷中的应用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
MENG Yan-yan. Development of Inorganic Antibacterial Agents for Chinaware[D]. Xiamen: Xiamen University, 2009.

[4] AUTHORITY E F S, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2016[J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2018, 16(2): e05182.

[5] SURAJU M O, LALINDE-BARNES S, SANAMVEN-KATA S, et al. The Effects of Indoor and Outdoor Dust Exposure on the Growth, Sensitivity to Oxidative-Stress, and Biofilm Production of Three Opportunistic Bacterial Pathogens[J]. Science of the Total Environment, 2015, 538: 949-958.

[6] 朱平. 功能纤维及功能纺织品[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2006.
ZHU Ping. Functional Fiber and Functional Textiles[M]. Beijing: China Textile & Apparel Press, 2006.

[7] 杨森. 六种常见皮肤病(寻常型银屑病、白癜风、斑秃、瘢痕疙瘩、花斑癣、雀斑)的遗传流行病学比较性研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007.

- YANG Sen. Comparative Research of the Genetic Epidemiology of Six Common Skin Diseases (Psoriasis Vulgaris/Vitiligo/Alopecia Areata/Keloid/Pityriasis Versicolor/Ephelides)[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2007.
- [8] 刘丹, 杨纯田, 周恩泽, 等. 海洋用金属材料的微生物腐蚀研究进展[J]. 表面技术, 2019, 48(7): 166-174.
- LIU Dan, YANG Chun-tian, ZHOU En-ze, et al. Progress in Microbiologically Influenced Corrosion of Metallic Materials in Marine Environment[J]. Surface Technology, 2019, 48(7): 166-174.
- [9] 尹路, 徐大可, 杨春光, 等. 银、铜复合添加对 2205 双相不锈钢耐硫酸盐还原菌腐蚀行为的影响[J]. 表面技术, 2019, 48(7): 316-323.
- YIN Lu, XU Da-ke, YANG Chun-guang, et al. Effect of Cu and Ag on Microbiologically Influenced Corrosion Resistance of 2205 Duplex Stainless Steel in Sulfate Reducing Bacteria[J]. Surface Technology, 2019, 48(7): 316-323.
- [10] 敬和民, 陈四红, 董加胜, 等. 抗菌不锈钢材料及其发展现状[J]. 材料保护, 2003, 36(10): 9-12.
- JING He-min, CHEN Si-hong, DONG Jia-sheng, et al. Anti-Bacterium Stainless Steels and Its Development[J]. Materials Protection, 2003, 36(10): 9-12.
- [11] YE H J W, CHEN S K, LIN S J, et al. Nanostructured High-Entropy Alloys with Multiple Principal Elements: Novel Alloy Design Concepts and Outcomes[J]. Advanced Engineering Materials, 2004, 6(5): 299-303.
- [12] 姜越, 李秀明, 周广泰, 等. B 含量对 CrFeCoNiTi_{0.6} 高熵合金显微组织和性能的影响[J]. 粉末冶金材料科学与工程, 2020, 25(5): 403-409.
- JIANG Yue, LI Xiu-ming, ZHOU Guang-tai, et al. Effects of B Content on Microstructure and Properties of CrFeCoNiTi_{0.6} High-Entropy Alloy[J]. Materials Science and Engineering of Powder Metallurgy, 2020, 25(5): 403-409.
- [13] 盛洪飞. Al_xCoCrCuFeNi 系高熵合金及其复合材料的制备、微结构与性能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2014.
- SHENG Hong-fei. Processing, Microstructure and Properties of Al_xCoCrCuFeNi High Entropy Alloys and Their In-situ Composites[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2014.
- [14] 张爱军, 韩杰胜, 苏博, 等. AlCoCrFeNi 高熵合金的高温摩擦磨损性能[J]. 摩擦学学报, 2017, 37(6): 776-783.
- ZHANG Ai-jun, HAN Jie-sheng, SU Bo, et al. Tribological Properties of AlCoCrFeNi High Entropy Alloy at Elevated Temperature[J]. Tribology, 2017, 37(6): 776-783.
- [15] 吴小盼, 张伟强, 李哲. CuCoCrFeNi 高熵合金的电化学腐蚀性能和抗菌性能研究[J]. 沈阳理工大学学报, 2016, 35(6): 1-6.
- WU Xiao-pan, ZHANG Wei-qiang, LI Zhe. Electrochemical Corrosion Performance and Antimicrobial Property of CuCoCrFeNi High-Entropy Alloy[J]. Journal of Shenyang Ligong University, 2016, 35(6): 1-6.
- [16] GAO Jing-bo, JIN Yu-ting, FAN Yong-qiang, et al. Fabricating Antibacterial CoCrCuFeNi High-Entropy Alloy via Selective Laser Melting and In-Situ Alloying[J]. Journal of Materials Science & Technology, 2022, 102: 159-165.
- [17] REN Guang-yu, HUANG Li-li, HU Kun-ling, et al. Enhanced Antibacterial Behavior of a Novel Cu-Bearing High-Entropy Alloy[J]. Journal of Materials Science & Technology, 2022, 117: 158-166.
- [18] ZHOU En-ze, QIAO Dong-xu, YANG Yi, et al. A Novel Cu-Bearing High-Entropy Alloy with Significant Antibacterial Behavior Against Corrosive Marine Biofilms[J]. Journal of Materials Science & Technology, 2020, 46: 201-210.
- [19] ZHOU En-ze, REN Guang-yu, SUN Yun-ling, et al. Antibacterial Activities of a Novel Cu-Bearing High-Entropy Alloy Against Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* and *Staphylococcus Aureus*[J]. Rare Metals, 2022, 41(2): 570-579.
- [20] 张鹏. 电化学活性微生物胞外电子传递过程的强化及机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- ZHANG Peng. Enhanced Microbial Extracellular Electron Transfer Process of Electrochemical Active Bacteria and Mechanism Analysis[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018.
- [21] LI Hua-bing, ZHOU En-ze, REN Yi-bin, et al. Investigation of Microbiologically Influenced Corrosion of High Nitrogen Nickel-Free Stainless Steel by *Pseudomonas Aeruginosa*[J]. Corrosion Science, 2016, 111: 811-821.
- [22] LI Hua-bing, ZHOU En-ze, ZHANG Da-wei, et al. Microbiologically Influenced Corrosion of 2707 Hyper-Duplex Stainless Steel by Marine *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20190.
- [23] XI Tong, SHAHZAD M B, XU Da-ke, et al. Effect of Copper Addition on Mechanical Properties, Corrosion Resistance and Antibacterial Property of 316L Stainless Steel[J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 71: 1079-1085.
- [24] XI Tong, YANG Chun-guang, BABAR SHAHZAD M, et al. Study of the Processing Map and Hot Deformation Behavior of a Cu-Bearing 317LN Austenitic Stainless Steel[J]. Materials & Design, 2015, 87: 303-312.
- [25] ZHAO Jin-long, ZHAI Zhao-feng, SUN Da, et al. Antibacterial Durability and Biocompatibility of Antibacterial-Passivated 316L Stainless Steel in Simulated Physiological Environment[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 100: 396-410.
- [26] CADY N C, BEHNKE J L, STRICKLAND A D. Copper-Based Nanostructured Coatings on Natural Cellulose: Nanocomposites Exhibiting Rapid and Efficient Inhibition of a Multi-Drug Resistant Wound Pathogen, *A. Baumannii*, and Mammalian Cell Biocompatibility in Vitro[J]. Advanced Functional Materials, 2011, 21(13): 2506-2514.
- [27] 李玲, 刘耀, 魏元苗, 等. 食品中蜡样芽孢杆菌耐药性及其机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12):

- 4943-4953.
LI Ling, LIU Yao, WEI Yuan-miao, et al. Research Progress on Antibiotic Resistance of *Bacillus Cereus* in the Food Chain[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4943-4953.
- [28] 谷彤彤, 张航, 姜玲海, 等. 2016 至 2020 年上海市某三级医院肺炎克雷伯菌耐药率与抗菌药物使用强度相关性分析[J]. *中国药事*, 2021, 35(10): 1199-1206.
GU Tong-tong, ZHANG Hang, JIANG Ling-hai, et al. Correlation Analysis of Drug Resistance and the Use Intensity of Antibiotic of *Klebsiella Pneumoniae* in a Tertiary Hospital of Shanghai from 2016 to 2020[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2021, 35(10): 1199-1206.
- [29] 曾淑仪. 广东地区葡萄球菌中耐药基因 *cfr* 的流行性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
ZENG Shu-yi. Characterization of the Prevalence and Distribution of *cfr* in *Staphylococcus* Isolated from Pig Farms in Guangdong[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [30] 杨国兴. 多重 PCR 检测肉及肉制品中四种食源性致病细菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
YANG Guo-xing. Multiplex PCR Assay for detection of Four Bacterial Pathogens in Meat Sample[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2008.
- [31] CARLOSAMA ADRIANA M, RODRÍGUEZ MISAEEL C, LONDOÑO GUILLERMO C, et al. Optimization of the Reproduction of *Weissella Cibaria* in a Fermentation Substrate Formulated with Agroindustrial Waste[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00671.
- [32] 杨丽. 抗苜蓿根腐病菌株的分离鉴定及其抗苜蓿尖孢镰刀菌的实验研究[J]. *中国草食动物科学*, 2021, 41(6): 41-44.
YANG Li. Isolation and Identification of Bacterial Strains Resistance to Root Rot Disease and Its Role to *Fusarium Oxysporum*[J]. *China Herbivore Science*, 2021, 41(6): 41-44.
- [33] 邵杨, 姜淑娟. 57 例肺真菌病临床分析[C]//中华医学会呼吸病学年会——2013 第十四次全国呼吸病学学术会议论文汇编. 大连: [s. n.], 2013: 171.
SHAO Yang, JIANG Shu-juan. Clinical Analysis of 57 Cases of Lung Mycosis[C]//Proceedings of the 14th National Academic Conference on Respiratory Diseases of the Chinese Medical Association. Dalian: [s. n.], 2013: 171.
- [34] 王超男, 李兴红, 李红, 等. 北京地区葡萄酸腐病病原微生物种类调查[C]//中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2015: 127-127.
WANG Chao-nan, LI Xing-hong, LI hong, et al. Investigation on Pathogenic Microorganisms of Grape Acid Rot in Beijing[C]// Proceedings of Chinese Society for Plant Pathology 2015 Annual Academic Conference. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 127-127.
- [35] 廖一兰, 孟召友, 唐朋, 等. 临床药师参与 1 例曲霉菌引起的感染性心内膜炎患者治疗的药学实践[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(16): 1690-1693.
LIAO Yi-lan, MENG Zhao-you, TANG Peng, et al. Pharmaceutical Practice of Individualized Treatment for a Patient with Infective Endocarditis Caused by *Aspergillus*[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2021, 41(16): 1690-1693.
- [36] 肖二辉, 张东梅, 赵岩, 等. 曲霉菌性脊柱炎患者六例的临床特点分析[J]. *中华传染病杂志*, 2021, 39(8): 491-495.
XIAO Er-hui, ZHANG Dong-mei, ZHAO Yan, et al. Clinical Characteristics of Six Patients with *Aspergillus Spondylitis*[J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2021, 39(8): 491-495.
- [37] ZHANG Jiang-lin, LU Zhi-feng, REN Tao, et al. Metabolomic and Transcriptomic Changes Induced by Potassium Deficiency during *Sarocladium Oryzae* Infection Reveal Insights into Rice Sheath Rot Disease Resistance[J]. *Rice*, 2021, 14(1): 81.
- [38] ZHANG Li, XIAO Meng, ARASTEHFAR A, et al. Investigation of the Emerging Nosocomial *Wickerhamomyces Anomalous* Infections at a Chinese Tertiary Teaching Hospital and a Systemic Review: Clinical Manifestations, Risk Factors, Treatment, Outcomes, and Anti-Fungal Susceptibility[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 744502.
- [39] 覃羽华. 白假丝酵母菌检测技术的发展及评价[J]. *右江医学*, 2019, 47(5): 393-396.
QIN Yu-hua. Development and Evaluation of Detection Technology for *Candida Albicans*[J]. *Chinese Youjiang Medical Journal*, 2019, 47(5): 393-396.
- [40] 罗兰兰, 李卫, 陈娟. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病诊治研究进展[J]. *现代医学*, 2017, 45(12): 1844-1847.
LUO Lan-lan, LI Wei, CHEN Juan. Research Progress in Diagnosis and Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis[J]. *Modern Medical Journal*, 2017, 45(12): 1844-1847.
- [41] CHAMROENSAKCHAI T, KANJANABUCH T, SAIKONG W, et al. The First Human Report of *Hyphopichia Burtonii*, Initially Misdiagnosed as Sterile Peritonitis in a Patient on Peritoneal Dialysis[J]. *Medical Mycology Case Reports*, 2021, 33: 26-29.
- [42] 王思卜, 余进, 万喆, 等. 分离于中国皮肤接合菌病的根毛霉属的鉴定和药物敏感性研究[C]//首届中国临床微生物学大会(宁波会议)暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛论文汇编. 宁波, 2010: 18.
- [43] 张公杰, 李东明. 木霉病的研究现状[J]. *菌物学报*, 2019, 38(8): 1287-1297.
ZHANG Gong-jie, LI Dong-ming. Trichodermasis: A Review of the Literature[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(8): 1287-1297.
- [44] ZAIN MUSHTAQ M, ZAFAR MAHMOOD S B, NASIR N, et al. Cerebral Phaeohyphomycosis Due to *Rhinoctadiella Mackenziei* in an Immunocompetent Patient: A Case Report and Review of Literature[J]. *Current Medical Mycology*, 2020, 6(3): 65-68.
- [45] 周亚彬, 李东明. 短梗霉感染文献回顾[J]. *菌物学报*, 2022, 41(4): 505-517.
ZHOU Ya-bin, LI Dong-ming. *Aureobasidium* Infections: A Literature Review[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(4): 505-517.