郭赛赛, 刘小妹, 陈宏坤, 等. 球磨生物炭的性质及其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1468-1475.

GUO Sai-sai, LIU Xiao-mei, CHEN Hong-kun, et al. Properties of ball-milled biochar and its toxic effects on *E. coli* and *S. aureus*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(7): 1468-1475.

球磨生物炭的性质及其对大肠杆菌和 金黄色葡萄球菌的毒性效应研究

郭赛赛1, 刘小妹1, 陈宏坤2, 庄志成1, 王宜志3, 唐景春1,4*

(1.南开大学环境科学与工程学院,天津 300071;2.石油石化污染物控制与处理国家重点实验室,中国石油集团安全环保技术研究院,北京 102206;3.天津天迈节能设备有限公司,天津 300112;4.天津市城市环境污染诊断与修复工程技术中心,天津 300071)

摘 要:为研究球磨生物炭的微生物毒性效应,采用元素分析、比表面积分析(BET)、扫描电子显微镜(SEM)及傅立叶红外(FTIR) 表征等手段研究了500℃裂解小麦秸秆生物炭(BC)和球磨生物炭(BM)的性质,采用毒性暴露实验分析了不同浓度(0、10、20、50、100、200 mg·L⁻¹)下两种生物炭对大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 25923 的毒性效应。结果表明:BC的比表面积为98 m²·g⁻¹,而BM的比表面积提升到309 m²·g⁻¹,球磨可以增加生物炭中含氧官能团的数量;在0.9% NaCl溶液中,添加10 mg·L⁻¹的BM时,*S. aureus*存活率为90.1%,*E. coli*存活率为98.2%。当浓度增大到200 mg·L⁻¹时, *S. aureus*的存活率仍可达91.8%;而在LB培养基中,BM浓度为200 mg·L⁻¹时,*S. aureus*的存活率增加到58.1%;相同条件下,BM对微生物的毒性显著强于BC,这可能与粒子大小差异相关。而BM对革兰氏阳性菌*S. aureus*的毒性显著强于革兰氏阴性菌*E. coli*,这可能与*E. coli*产生的胞外聚合物(EPS)有关;添加活性氧自由基(ROS)消除剂N→乙酰半胱氨酸(NAC)发现,氧化损伤是造成*S. aureus*细胞死亡的主要原因,但是纳米颗粒对细胞的机械碰撞等其他因素也有可能是BM产生毒性的原因。研究表明BM对微生物具有一定的环境毒性效应,因此在BM使用过程中应注意其可能的环境影响。

关键词:球磨生物炭;毒性;大肠杆菌;金黄色葡萄球菌;ROS

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)07-1468-08 doi:10.11654/jaes.2018-1617

Properties of ball-milled biochar and its toxic effects on E.coli and S.aureus

GUO Sai-sai¹, LIU Xiao-mei¹, CHEN Hong-kun², ZHUANG Zhi-cheng¹, WANG Yi-zhi³, TANG Jing-chun^{1,4*}

(1.College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2.State Key Lab of Petroleum Pollution Control, CNPC Research Institute of Safety & Environmental Technology, Beijing 102206, China; 3.Tianjin Tianmai Energy Saving Equipment Co., Ltd., Tianjin 300112, China; 4.Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Tianjin 300071, China)

Abstract: Ball milling is effective in changing the particle size distribution of biochar(BC); however, it can cause toxic effects during the utilization of biochar. Therefore, it is essential to analyze the microbial toxicity of ball-milled biochar(BM). In this study, element analyses, BET, SEM, and FTIR detection were conducted to characterize the properties of wheat straw biochar prepared at 500 °C and BM. The effects of different concentrations of BC(0, 10, 20, 50, 100 mg·L⁻¹, and 200 mg·L⁻¹) on the ROS content and survival rate of bacteria were

*通信作者:唐景春 E-mail:tangjch@nankai.edu.cn

收稿日期:2018-12-23 录用日期:2019-03-06

作者简介:郭赛赛(1996—),女,江苏徐州人,硕士研究生,从事纳米材料性质及毒性研究。E-mail:2111785658@qq.com

刘小妹与郭赛赛同等贡献

基金项目:CNPC科技发展计划项目(2016D-4610);天津市科技计划项目(17PTGCCX00240,16YFXTSF00520,17ZXSTSF00050);国家自然科学基金项目(41473070);高等学校学科创新引智计划项目(T2017002)

Project supported: CNPC Scientific Research and Technological Development Project (2016D-4610); Tianjin S&T Program (17PTGCCX00240, 16YFXTSF00520, 17ZXSTSF00050); The National Natural Science Foundation Program (41473070); Overseas Expertise Introduction Project for Discipline Innovation of China(T2017002)

郭赛赛,等:球磨生物炭的性质及其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的毒性效应研究

studied to confirm the effects of BC and BM on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectively. The results showed that the specific surface area of BC was 98 m² · g⁻¹, and the surface area of BM increased to 309 m² · g⁻¹. Ball milling could lead to an increase in the oxygen–containing functional groups in biochar. In the 0.9% NaCl solution, when mixed with 10 mg · L⁻¹ BM, the survival rate of *S. aureus* was 90.1%, and the survival rate of *E. coli* was 98.2%. The survival rate of *S. aureus* decreased to 23.5%, and the survivvival rate of *E. coli* remained at 91.8%, when the concentration of BM was increased to 200 mg · L⁻¹. However, in the LB medium, the survival rate of *S. aureus* increased to 58.1% when the concentration of BM was 200 mg · L⁻¹. Under the same conditions, the toxicity of BM on microorganisms was significantly higher than that of general BC, which might be related to the differences in particle size. The toxicity of BM on *S. aureus* was significantly higher than that on the gram–negative bacteria, *E. coli*, which may be related to the extracellular polymeric substances (EPSs) produced by *E. coli*. By adding N–acetyl cysteine (NAC), an ROS eliminating agent, we found that oxidative damage was the main cause of cell death in *S. aureus*, and other factors such as mechanical damage of BM nanoparticles in cells might also be the basis of the toxic effects caused by BM. As this study concludes that BM shows toxic effects on microorganisms, it is necessary to consider environmental effects when BM is being used.

Keywords: ball-milled biochar; toxicity; Escherichia coli; Staphylococcus aureus; ROS

由于生物炭(BC)优异的物理化学性质,包括巨 大的表面积、大量的孔隙结构,其已被广泛用于环境 修复中。针对BC对微生物毒性影响的研究还未见报 道,但有研究表明BC施于土壤后,会引起微生物群落 的变化^[1-2]。施用BC可以增加土壤养分和稳定碳的 含量[3-6],从而为微生物提供更多的底物,提高微生物 的丰度;BC在土壤中的应用也为微生物提供了一个 安全的栖息地^四。所以在经过BC改良的土壤中,微生 物的数量和活性会有所增加,这也导致土壤微生物群 落和酶活性发生显著变化¹⁸¹。但是 BC 对某种具体微 生物的影响尚不清楚。Chen 等¹⁹在中国桐乡市进行 了大田试验,研究了稻草BC对土壤养分和微生物特 性的影响,研究发现施用20%BC与对照相比,土壤细 菌数量增加了26.9%;施用10%以上的BC,放线菌数 量显著增加80.6%~130%,但是真菌数量减少22.2%~ 30.2%,枯草杆菌数量减少42.4%~54.4%。另外 Oiao 等^{10]}在受砷污染的稻田土上进行实验,发现BC增加 了砷和铁相关细菌的丰度,但对其他菌群的影响尚不 清楚。

球磨生物炭(BM)是由高温裂解后的BC在球磨 机中通过机械力作用,将BC粒径减小到纳米或者微 米级别的新型生物炭材料^[11]。这种新型材料由Peterson等^[11]在2012年提出。由于它比BM具有更好地吸 附^[12]和降解^[13]性能,而经常被用于去除水体和土壤中 的污染物。之前的研究证明了BM具有更大的比表 面积^[11]和更多的酸性官能团。近年来,关于BM的研 究多集中在它的吸附降解性能^[14],很少有研究关注它 对微生物的毒性。但是,根据以往的研究^[15],达到纳 米级别的BC很有可能对微生物产生毒性效应。另 外,之前的研究^[16-17]证明了碳纳米材料都存在一定的 毒性,如氧化石墨烯[18-20]、碳纳米管[21]、富勒烯[22-23]等。

已有研究表明,自由基的产生是纳米材料对微生 物毒性作用的重要方式[24]。自由基或产生的活性氧 可以与许多化学结构分子发生反应,包括生物大分 子,如糖蛋白会导致细胞膜失稳和细胞死亡。在水相 中,这些自由基可以触发活性氧自由基(ROS)的产 生。研究发现,中、高浓度的ROS通过细胞氧化应激 反应诱导细胞凋亡甚至导致其坏死[25-27],低浓度的 ROS更广泛的生理意义在于其对转录因子的激活以 及对细胞增殖、分化的促进^[25]。Lieke等^[28]对500℃水 稻秸秆BC研究发现,存在于BC中的自由基对线虫神 经毒性产生影响。此外, Liao 等[29]和 Farhangi-Abriz 等^[30]证明了BC颗粒中的自由基在水中可以促进活性 氧的产生,并对植物的种子萌发以及根和茎伸长产生 不利的影响。BM经球磨后,材料粒度大幅降低,部分 可以达到纳米尺度,因此有理由认为BM有一定程度 的纳米毒性效应。

到目前为止,关于BM对细菌的毒性影响尚未有 人研究。基于此,本研究以小麦秸秆为原料,在 500℃下制备得到BM,通过行星式球磨仪制备球磨 生物炭材料。对其性质进行研究,同时选取两种模式 细菌进行急性毒性实验,利用荧光法测定细菌的ROS 和存活率等指标,并利用扫描电子显微镜(SEM)和激 光共聚焦显微镜(LSCM)观察细菌的形态,对BM的 微生物毒性和抗菌机理进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验原料

实验所用的生物炭原料为小麦秸秆,来源于天津 周边农村。BC由小麦秸秆在马弗炉中500℃限氧裂 解 2.5 h 制备而成^[31], BM 由生物炭按照 Lyu 等^[14]的方 法制备而成。大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 25923 为实验室保存菌种。大肠杆菌和金黄色葡萄 球菌的培养均采用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵 母提取物 5 g·L⁻¹, 氯化钠 10 g·L⁻¹), 在 30 ℃、180 r· min⁻¹条件下, 于摇床中培养 12 h 至对数生长期。

1.2 BC的表征

对制备的BC和BM进行清洗处理:将BC和BM 置于蒸馏水中浸泡一周,并用磁力搅拌器(84-B,山 东菏泽正虹科教仪器有限公司,中国)搅拌,每隔6h 倒掉漂浮在水面上的杂质,再加入等量的蒸馏水进行 清洗。将清洗好的BC和BM进行抽滤,置于恒温干 燥箱(DGG-9023A,上海优浦科学仪器公司,中国) 中,于80℃下干燥24h,装入塑封袋密封,备用。采 用多站扩展式全自动快速比表面仪(ASAP 2460,麦 克公司,美国)测定BC和BM的比表面积;采用扫描 电子显微镜(JSM-7800F,日本电子,日本)观测BC和 BM的表面形貌;采用傅里叶变换红外光谱仪(TEN-SOR 37,BRUKER,德国)分析BC和BM的官能团;采 用pH计(PB-10,Sartorius,德国)测定pH值;采用电 导率仪[FE30,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司, 中国]测定电导率值。

1.3 急性毒性实验

将 50 mL培养至对数生长期的 *E.coli*和 *S.aureus* 转移至 50 mL无菌离心管中,5000 r·min⁻¹离心 5 min, 倒掉上清液,用无菌 0.9% NaCl清洗 3 次以除去残留 的 LB培养基。将清洗完的菌种倒入 50 mL分别加入 了 0、10、20、50、100、200 mg·L⁻¹ BC 和 BM 的无菌 LB 培养基和 0.9% NaCl中,置于摇床(HNY-2102C,欧诺 公司,中国)里, 30 ℃、180 r·min⁻¹培养 2.5 h后,分析 其毒性影响。

1.4 细菌形貌观测

取 50 mL染毒后的菌液,5000 r・min⁻¹离心 5 min 后,去除上清液。将菌体放到 2.5% 的戊二醛(扫描电 镜专用)中,4℃固定 4 h(或固定过夜)。将固定液倒 掉,0.1 mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH7.0)漂洗 3 次,每次 15 min。利用浓度为 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇 进行梯度脱水,每次 15 min,随后用无水乙醇处理两 次,每次 20 min。真空干燥后在菌体表面喷金,置于 SEM下观察细胞形态。

1.5 细菌存活率测定与LSCM观测

存活率采用细菌细胞活性测定试剂盒(Invitro-

农业环境科学学报 第38卷第7期

gen,美国)测定^[24]。染料为PI和SYTO9,PI只能穿过 破损的细胞膜,与细胞核结合显红色荧光;SYTO9可 以穿过所有细胞膜,与细胞核结合显绿色荧光。当两 种染料同时存在时,活细胞呈现绿色,死细胞呈现红 色。取1mL染毒后的菌液置于2mL离心管中,10000 r·min⁻¹离心3min,用无菌0.9% NaCl清洗3次,取100 μ L PI和SYTO9等量混匀后的染料与100 μ L菌液混 合,锡箔纸包好后置于摇床中,于30°,180 r·min⁻¹混 合摇匀15min,取100 μ L样品于96微孔板中,用全功 能酶标仪(Synergy H4,伯腾公司,美国,激发波长485 nm,发射波长521 nm)测定荧光值,计算存活率。另 取50 μ L样品用LSCM(LSM880 with Airyscan,Zeiss公 司,德国)观测。

1.6 细菌 ROS 测定

用活性氧试剂盒(碧云天,中国)测定细菌细胞内 的 ROS 含量^[24],染料为2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA)。DCFH-DA向细胞内扩散,脱去乙酰基 成为不显荧光的 DCFH,细胞内的 ROS迅速将 DCFH 氧化成具有高强度荧光的 DCF,其荧光强度和细胞内 的 ROS 含量成正比。取1 mL染毒后的菌液置于2 mL 离心管中,10 000 r·min⁻¹离心3 min,用无菌0.9% NaCl 清洗3次后,取100 μL活性氧染料与100 μL菌液混 合,锡箔纸包好后置于摇床中,于30 ℃、180 r·min⁻¹混 合摇匀30 min,取100 μL样品于96 微孔板中,用酶标 仪(激发波长485 nm,发射波长521 nm)测定荧光值。 相对 ROS 水平表示为样品组与空白对照组的荧光强 度之比^[26]。

消除 ROS 实验:将培养至对数期的菌体清洗干 净后,倒入50 mL 0.9% NaCl中,并加入2 mmol·L⁻¹ N-乙酰半胱氨酸(NAC)^[32]。以不加 NAC 的 0.9% NaCl 为对照,30 ℃条件下培养1 h后,向加入 NAC 的培养 瓶中依次加入0、10、20、50、100、200 mg·L⁻¹的 BM,培 养 2.5 h后,测定各体系的致死率和 ROS 含量,并在 LSCM和 SEM下直观观察细胞的损伤情况。

1.7 数据分析

采用Origin 2018进行数据处理及作图,数据表示 为平均值±标准差,ROS和存活率的测定均设置3次 平行,采用SPSS对数据进行方差分析(One way ANO-VA)及Turkey's Test分析,P<0.05表示有显著差异。

2 结果与分析

2.1 BM和BC的性质

BM和BC的基本性质见表1。分析表1可知,BM

的比表面积远大于BC,是BC的3.15倍,而pH值低于 BC。由表1中的元素分析结果可知,BM中C和O的 含量高于BC,这与BM溶液比BC溶液的颜色黑这一 实验现象相吻合。将BM和BC置于蒸馏水中, 超声 30 min 后, BC 在 10 min 内上浮或者沉淀, 而 BM 在 12 h内未发生沉淀,说明BM的稳定性和分散性优于 BC_o

表1 BM和BC的比表面积、pH和元素组成 Table 1 Specific surface area, pH and elemental composition of BM and BC

样品 Samples	比表面积Specific surface area/m ² ·g ⁻¹	рН	C/%	H/%	0/%	N/%
BM	309	8.2	68.214	2.388	18.52	0.145
BC	98	10.8	63.688	4.665	11.35	0.521

用扫描电子显微镜对BM和BC的颗粒大小和形 态进行比较的结果见图1。由图1a和图1b可知BC是 多孔的,存在明显的孔状结构,粒度为毫米级别,孔径 约为1 µm。由图1c和图1d可知,BM的粒径不规则, 且大小不均匀,但都在1µm以下,图中圈出的红色部 分为小于100 nm 的颗粒。总体来看, BM 的粒度在 60 nm~1 µm之间。BC 经过球磨成 BM 后,颗粒粒径 减小,颗粒数量大量增加,这导致了比表面积的增加, 与比表面积的结果一致。

从BM和BC的红外图谱(图2)可以发现,BM在 3356 cm⁻¹和 3048 cm⁻¹处, O-H和 N-H键显著拉伸, C=C、N=N、C=N和N=O双键在1586 cm⁻¹处伸缩振动, C-H在873、810 cm⁻¹和749 cm⁻¹处弯曲振动。此外, 在 BM 上观察到两个新的峰,分别为 1380 cm⁻¹和 1092 cm⁻¹处的酚醛 C-X 和 C-O,表明球磨引入了一 些酸性官能团,这与pH值的结果相一致。在测试条 件下,BM表面酸性官能团的引入会增强电双层之间 的排斥力,以防止亚微米球磨生物炭粒子的聚集,这 与超声分散的结果一致。

2.2 添加BM和BC对E.coli和S.aureus存活率的影响

经过2.5h的毒性暴露实验后, E. coli和S. aureus 的存活率测定结果如图3所示。在0.9% NaCl中,仅 添加 10 mg·L⁻¹的 BM, S. aureus 的存活率为 90.1%, 当 浓度增大到200 mg·L⁻¹时,存活率仅为23.5%;而添加 10 mg·L⁻¹的 BC 时, S. aureus 的存活率为 98.2%, 当浓 度增大到200 mg·L⁻¹时,存活率仍为68.9%。这说明相 比于BC,BM对S.aureus的毒性更显著。在LB培养基 中,BM浓度为200 mg·L⁻¹时,S.aureus存活率为60.9%, 这说明在LB培养基中,BM对S.aureus的毒性减弱。

无论是在0.9% NaCl还是LB培养基中,添加BM和BC 后, E. coli的存活率一直维持在90%以上, 且两者差别 较小,这说明BM和BC对E.coli的存活率影响不显 著。由 SPSS 分析,数据对照均具有显著性差异。

2.3 添加BM和BC对E.coli和S.aureus氧化损伤的影响

为了分析BM和BC对E.coli和S.aureus产生毒性 的原因,测定了两种菌细胞内的ROS含量,结果如图4 所示。细菌和培养介质相同的条件下,添加BM产 生的 ROS 是 BC 的 1.1~2.0 倍。如图 4a 所示, 在 0.9% NaCl中,添加BM对E.coli最大的氧化损伤为空白的 1.4倍,对S.aureus的氧化损伤最大为空白的6.4倍,且 倍数随着BM浓度的增加而增加,说明BM对S.aureus 造成的氧化损伤远大于E.coli。如图4b所示,在LB培 养基中,添加BM对E.coli最大的氧化损伤为空白的 1.2倍,对S.aureus的氧化损伤为空白的4倍。对比图



a、b放大倍数为5000倍;c放大倍数为16000倍; d放大倍数为30000倍 The magnification of a and b is 5000 times, c is 16 000 times, d is 30 000 times

图1 BM和BC的扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron microscopy (SEM) of BM and BC





农业环境科学学报 第38卷第7期

4a和图4b可以发现,在LB培养基中,添加BM和BC 后,细菌细胞内的ROS均有所减少。

2.4 BM对S.aureus产生毒性的机理探究

2.4.1 NAC对 S.aureus 产生 ROS 与存活率的影响

由于 BM 对 E.coli 的毒性效果不明显,因此以 S. aureus 为模式菌株探究 BM 毒性与氧化损伤的关系。

如图5所示,加入NAC后,各处理组ROS的含量 降低至与空白相接近,说明各组中ROS的作用已基 本消除。与暴露于BM的各组相比,加入的NAC使得 S.aureus存活率升高,但是与对照相比仍有一定差距。 说明BM对S.aureus产生毒性主要是由于氧化损伤导 致的,但是其他因素,例如BM的机械碰撞作用也有 可能是造成毒性的一个原因,因此虽然消除了ROS, 但其存活率与对照相比仍有一定差距。

2.4.2 E.coli和S. aureus的LSCM图像

为进一步证实上述推测,采用荧光活/死染色法观察细菌膜完整性,区分活菌(绿色)和死菌(红色),以探讨 BM 和 BC 对 E.coli和 S.aureus 的抗菌能力。选取在 0.9% NaCl 中,添加 BM 后的 E.coli和 S. aureus 的LSCM 图像进行分析。如图 6 所示,在 0.9% NaCl 中, 不添加 BM 时, E.coli和 S.aureus 几乎全为绿色,添加





BM后, E.coli和S.aureus中均有红色出现,且红色部分 所占比率和BM的浓度呈正相关。同一浓度下, S.aureus中红色部分远大于 E.coli,说明 BM 对 S.aureus 的 毒性远大于 E.coli。在 0.9% NaCl 中添加 200 mg·L⁻¹ BM, 消除 ROS 后 S.aureus 的 LSCM 图像(图 6d)与未消 除 ROS 的图像(图 6c)相比, 红色部分大量减少,说明 加入 NAC 后, S.aureus 的存活率上升。

2.4.3 E.coli和S. aureus的SEM图像

为了进一步确定实验结论,采用SEM观察了E. coli和S. aureus的表面形态。选取在0.9% NaCl中,添加BM后 E. coli和S. aureus的SEM图像进行分析,如图7所示:不添加BM的S. aureus表面光滑,无褶皱存在。添加BM后,S. aureus的表面存在褶皱,且随着BM浓度的增加,褶皱更加明显。可能是由于BM造成S. aureus细胞膜和细胞壁损伤,细胞质泄漏所致;不添加BM的E. coli表面光滑无破损,添加BM后,细



Figure 4 ROS produced by bacteria in 0.9% NaCl

and LB medium

胞表面存在微量的褶皱,但是随着浓度增加,细胞体积不变。说明在0.9% NaCl中,BM对S.aureus的毒性远大于E.coli。在LB培养基中也有相似情况,但没有在0.9% NaCl中明显。在0.9% NaCl中添加200 mg·L⁻¹BM,消除ROS后S.aureus的SEM图像(图7d)与未消除ROS的图像(7c)相比,褶皱大量减少,细胞膜基本无褶皱。这与ROS、存活率和LSCM的结果吻合。

加入 NAC 消除 ROS 的实验说明氧化损伤是造成 细胞死亡的重要原因,但是其他因素,例如纳米颗粒对 细胞的机械碰撞等也有可能是造成 BM 毒性的原因。

3 讨论

本次研究的实验结果表明,相比于BC,BM具有 更低的pH值,更多的酸性官能团,更大的比表面积, 这与Lyu等^[14]和Wang等^[33]的研究结果一致。球磨能 够将毫米尺度的颗粒减小到纳米级别,由于颗粒减小,BM在蒸馏水中分散得更好。同时,也由于颗粒减小使大量亚微米颗粒增加,从而导致了BM比表面积的增加。FTIR结果表明,BM具有更多的酸性官能团,从而导致pH值的降低。

对比 BC 和 BM,相同条件下,BM 的毒性更明显。 BM 由 BC 经过球磨得到,通过球磨,可能会增加持久 性自由基的数量^[34-35]。本次研究中,相比于 LB 培养 基,BM 在 0.9% NaCl 中对 S.aureus 的毒性更明显,可 能是由于 LB 培养基中的营养物质起到了缓冲与保护 作用,这与 Liu 等^[24]的研究结果一致。在两种介质中, BM 的毒性都大于 BC。这除了与自由基有关,可能还 与颗粒尺寸有关。由图 1 可知,BM 的粒度在 60 nm~ 1 µm 之间,远小于 BC^[36],而 S.aureus 的直径在 0.8 µm 左右,小于 100 nm 的颗粒极有可能穿过细胞的细胞



Figure 5 ROS produced by S.aureus and livability of S.aureus in 0.9% NaCl



图 6 在 0.9% NaCl 中添加 BM 后细菌的 LSCM 图像(×40 倍) Figure 6 LSCM image of bacteria in 0.9% NaCl after adding BM(×40 times)

农业环境科学学报 第38卷第7期





膜,进入细胞,造成高浓度的 ROS,从而导致 S. aureus 的死亡。100 nm~1 μm之间的颗粒,由于培养过程中 的振荡作用,会对 S. aureus 产生撞击,从而造成一定 的机械损伤。由于粒度减小,导致 BM 具有更大的比 表面积^[33,37],与 E. coli和 S. aureus 的接触更充分,使其 产生更高浓度的 ROS,所以损伤更大。此外, BM 对 E. coli和 S. aureus 的毒性效应不同,可能还与 E. coli产生 的胞外聚合物(EPS)有关。由于革兰氏阳性菌与阴 性菌的细胞壁构造不同,在其表面产生的 EPS 也不 同^[38]。EPS 不仅可以起到屏障作用,防止生物炭所造 成的物理损伤,而且还可以作为 ROS 的汇,保护细菌 免受生物炭的毒害^[39]。

4 结论

(1)球磨生物炭具有更多的酸性官能团和更大的 比表面积。

(2)球磨生物炭对 E.coli 和 S.aureus 的毒性影响远大于生物炭。

(3)球磨生物炭对S.aureus的毒性高于E.coli,且 毒性与浓度呈正相关。

参考文献:

- Song W, Wang X J, Gu J, et al. Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 231:1–8.
- [2] Chen J H, Chen D, Xu Q F, et al. Organic carbon quality, composition of main microbial groups, enzyme activities, and temperature sensitivity of soil respiration of an acid paddy soil treated with biochar[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55(2):185–197.

- [3] Abujabhah I S, Doyle R B, Bound S A, et al. Assessment of bacterial community composition, methanotrophic and nitrogen-cycling bacteria in three soils with different biochar application rates[J]. *Journal of Soils* and Sediments, 2018, 18(1):148–158.
- [4] Nyoka W K, Khanyile S N, Bredenhand E, et al. Biochar alleviates the toxicity of imidacloprid and silver nanoparticles (AgNPs) to Enchytraeus albidus (Oligochaeta) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(11):10937-10945.
- [5] Anderson C R, Hamonts K, Clough T J, et al. Biochar does not affect soil N-transformations or microbial community structure under ruminant urine patches but does alter relative proportions of nitrogen cycling bacteria[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2014, 191: 63-72.
- [6] Xu Y L, Seshadri B, Sarkar B, et al. Biochar modulates heavy metal toxicity and improves microbial carbon use efficiency in soil[J]. Science of the Total Environment, 2018, 621:148–159.
- [7] Liu Y, Zhu J R, Ye C Y, et al. Effects of biochar application on the abundance and community composition of denitrifying bacteria in a reclaimed soil from coal mining subsidence area[J]. Science of the Total Environment, 2018, 625:1218-1224.
- [8] Chen J H, Liu X Y, Li L Q, et al. Consistent increase in abundance and diversity but variable change in community composition of bacteria in topsoil of rice paddy under short term biochar treatment across three sites from south China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 91:68–79.
- [9] Chen G, Qiao J, Zhao G H, et al. Rice-straw biochar regulating effect on chrysanthemum morifolium Ramat. cv. ' Hangbaiju' [J]. Agronomy Journal, 2018, 110(5):1996-2003.
- [10] Qiao J T, Li X M, Li F B. Roles of different active metal-reducing bacteria in arsenic release from arsenic-contaminated paddy soil amended with biochar[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 344: 958-967.
- [11] Peterson S C, Jackson M A, Kim S, et al. Increasing biochar surface area: Optimization of ball milling parameters[J]. *Powder Technology*, 2012, 228:115-120.
- [12] Alamin A H, Kaewsichan L. Equilibrium and kinetic studies of sorp-

tion of 2, 4-dichlorophenol onto 2 mixtures:Bamboo biochar plus calcium sulphate(BC) and hydroxyapatite plus bamboo biochar plus calcium sulphate(HBC), in a fluidized bed circulation column[J]. *Polish Journal of Chemical Technology*, 2016, 18(2):59-67.

- [13] Shan D N, Deng S B, Zhao T N, et al. Preparation of ultrafine magnetic biochar and activated carbon for pharmaceutical adsorption and subsequent degradation by ball milling[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 305:156–163.
- [14] Lyu H H, Gao B, He F, et al. Effects of ball milling on the physicochemical and sorptive properties of biochar: Experimental observations and governing mechanisms[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 233:54-63.
- [15] 闾晓萍,黄 绚,杨 坤.碳纳米材料的生物毒性效应研究及展望
 [J].环境污染与防治, 2011, 33(5):87-94.
 LÜ Xiao-ping, HUANG Xuan, YANG Kun. Advance and perspectives of the bio-toxicity of carbon nanomaterial[J]. *Environmental Pol-*
- *lution & Control*, 2011, 33(5):87–94.
 [16] Rafieerad A R, Bushroa A R, Amiri A, et al. Antibacterial biocompati-
- ble arginine functionalized mono-layer graphene: No more risk of silver toxicity[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 360:132-140.
- [17] Bhat S V, Sultana T, Koernig A, et al. Correlative atomic force microscopy quantitative imaging–laser scanning confocal microscopy quantifies the impact of stressors on live cells in real–time[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):8305.
- [18] Gao Y, Ren X M, Wu J C, et al. Graphene oxide interactions with coexisting heavy metal cations: Adsorption, colloidal properties and joint toxicity[J]. *Environmental Science*: Nano, 2018, 5(2):362-371.
- [19] Zhao R T, Lv M, Li Y, et al. Stable nanocomposite based on PEGylated and silver nanoparticles loaded graphene oxide for long-term antibacterial activity[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(18): 15328-15341.
- [20] Guo Z L, Xie C J, Zhang P, et al. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm[J]. Science of the Total Environment, 2017, 580:1300-1308.
- [21] Fan X J, Xu J H, Lavoie M, et al. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 233:633-641.
- [22] Beheshtian J, Ravaei I. Toxic CO detection by Li-encapsulated fullerene-like BeO[J]. Structural Chemistry, 2018, 29(1):231–241.
- [23] Molani F, Askari M. A DFT study on the structural and electronic properties of small toxic gases on B- and Al- doped C₂₀ fullerene[J]. *Journal of Structural Chemistry*, 2017, 58(4):657–666.
- [24] Liu X M, Tang J C, Wang L, et al. Mechanisms of oxidative stress caused by CuO nanoparticles to membranes of the bacterium *Strepto*myces coelicolor M145[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 158:123-130.
- [25] Zheng J L, Zeng L, Xu M Y, et al. Different effects of low- and highdose waterborne zinc on Zn accumulation, ROS levels, oxidative damage and antioxidant responses in the liver of large yellow croaker pseudosciaena crocea[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(1): 153-163.
- [26] Li J H, Zhou H J, Wang J X, et al. Oxidative stress-mediated selec-

tive antimicrobial ability of nano-VO₂ against Gram-positive bacteria for environmental and biomedical applications[J]. *Nanoscale*, 2016, 8 (23):11907-11923.

- [27] Li Y, Zhao J, Shang E X, et al. Effects of chloride ions on dissolution, ROS generation, and toxicity of silver nanoparticles under UV irradiation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (8) : 4842– 4849.
- [28] Lieke T, Zhang X C, Steinberg C E W, et al. Overlooked risks of biochars: Persistent free radicals trigger neurotoxicity in caenorhabditis elegans[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (14) : 7981–7987.
- [29] Liao S H, Pan B, Li H, et al. Detecting free radicals in biochars and determining their ability to inhibit the germination and growth of corn, wheat and rice seedlings[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(15):8581-8587.
- [30] Farhangi-Abriz S, Torabian S. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2017, 137:64-70.
- [31] 黄 华, 王雅雄, 唐景春, 等. 不同烧制温度下玉米秸秆生物炭的 性质及对萘的吸附性能[J]. 环境科学, 2014, 35(5):1884-1890.
 HUANG Hua, WANG Ya-xiong, TANG Jing-chun, et al. Properties of maize stalk biochar produced under different pyrolysis temperatures and its sorption capability to naphthalene[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(5):1884-1890.
- [32] Ding C Z, Pan J, Jin M, et al. Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina[J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10 (8):1051-1060.
- [33] Wang B, Gao B, Wan Y S. Comparative study of calcium alginate, ball-milled biochar, and their composites on aqueous methylene blue adsorption[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26 (12):11535-11541.
- [34] Lyu H H, Gao B, He F, et al. Experimental and modeling investigations of ball-milled biochar for the removal of aqueous methylene blue [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 335:110–119.
- [35] Wang B, Gao B, Wan Y S. Entrapment of ball-milled biochar in Caalginate beads for the removal of aqueous Cd(II)[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2018, 61:161–168.
- [36] Wang T, Rodriguez-Uribe A, Misra M, et al. Sustainable carbonaceous biofiller from miscanthus: Size reduction, characterization, and potential bio-composites applications[J]. *Bioresources*, 2018, 13(2): 3720-3739.
- [37] Peterson S C, Jackson M A, Kim S, et al. Increasing biochar surface area: Optimization of ball milling parameters[J]. *Powder Technology*, 2012, 228:115-120.
- [38] Kang F X, Alvarez P J, Zhu D Q. Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag⁺ to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 48(1): 316–322.
- [39] Guo Z L, Xie C J, Zhang P, et al. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm[J]. Science of the Total Environment, 2017, 580:1300-1308.