

病毒在土壤中的迁移行为*

赵炳梓 张佳宝[†]

(封丘农业生态国家实验站,土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所),南京 210008)

摘要 细菌和病毒等致病微生物广泛存在于化粪池、污水污泥、废水等源头。由于病毒比细菌和原生动物包裹小得多,在通过多孔土壤时不容易被过滤净化,地下水资源的病毒污染已引起各国科学家的高度关注,在过去的几十年间已经进行了较多的研究工作。也有了一些有关病毒在土壤中迁移行为及其影响机理的文献报道。本文的主要目的是在对过去国内外的一些研究结果作一综述,重点探讨影响病毒在土壤中迁移的主要因素,包括(1)影响病毒迁移的水动力学因素;(2)病毒吸附机理及其影响因素;(3)影响病毒生存或死亡的因素。土壤物理性质的不均一性是导致微生物和非反应物质之间的迁移行为差异的主要因素。影响病毒在土壤中吸附和死亡的因素很多,比如:土壤类型、病毒类型、pH、离子强度和多价阳离子、有机质、温度、土壤含水量、微粒、微生物活动等,对它们的影响机理进行了一一描述和解释。在指示病毒的选择上,噬菌体(比如 MS2、PRD1、φX174)已经被广泛用来研究病毒在土柱和田间条件下的迁移行为,并认为它们比较吻合指示病毒所需的各种条件。根据上述综述资料,在文章的最后对病毒迁移的进一步研究提出了一些建议。

关键词 病毒;迁移;土壤;影响因子

中图分类号 X172 **文献标识码** A

美国环境保护署 (USEPA) 早在 1990 年就指出饮用水系统 (尤其是地下水) 的微生物 (细菌、原生动物、病毒) 污染已成为威胁人类身体健康最具挑战性的问题之一^[1]。一般认为,广泛存在于化粪池、污水污泥、废水等源头的致病细菌和病毒等微生物,由于处理不当,能通过地表和土壤迁移,污染土壤、地表水和地下水^[2]。根据美国的研究报道,由于水质导致的人类疾病爆发,大约 70% 与地下水污染有关^[3],而其中有相当大的部分与地下水含有致病微生物有关。Abbaszadegan 等利用 PCR 技术对 244 个井水样品的检测结果表明:38% 的样品含有一种或一种以上的致病病毒,18% 的样品含有大肠杆菌噬菌体;利用细胞培养方法的检测结果显示:7% 的样品含人类病毒,10% 的样品含大肠菌,18% 的样品含肠道球菌^[4]。Bauder 等对 Montana 地区的私人井水的调查结果表明:40% 的样品已经有大肠菌污染^[5]。美国地质调查部门 (USGS) 对 Missouri 地区的 109 口公共水井的调查结果表明:8% 的样品含可培养的人类病毒,还有 8% 的样品含大肠杆菌噬菌体^[6]。

这些基础调查结果首先告诫我们的是,地下水

可能遭受致病微生物的污染;其次告诫我们的是,通过土壤“自然净化”功能来防止致病微生物向下迁移污染地下水的作用,对于不同土壤需要从科学上重新进行评估。特别是病毒,由于它们绝大多数比细菌或原生动物包裹小得多,更能通过细菌过滤器,同时比细菌或原生动物更能抵御消毒处理,因而当它们通过多孔土壤介质后,被土壤“自然净化”的可能性比细菌或原生动物包裹要小,而随水分迁移进入土壤深层和地下水系统的可能性要大^[7,8]。田间试验也发现,一些肠道病毒能通过迁移穿过非饱和和饱和带到达相当深的土层^[9]。

由于病原体在很低的含量范围内即可对人类的健康构成威胁。美国环境保护署 (USEPA) 1994 年对原饮用水卫生标准,又增加了病毒颗粒含量的指标:即每万立方米水中含有病毒颗粒不超过 2 个,这样可使年感染的风险率降低到低于万分之一的水平^[10]。为了保证达到这个指标,美国环境保护署提出了一项旨在保护作为饮用水源的地下水免遭致病微生物污染的管理条例 (Ground Water Rule)。该条例中很重要的一项就是必须对作为饮用水源的地下水上部

* 国家自然科学基金项目 (40471063) 资助

[†] 通讯作者: E-mail: jbzhang @issas. ac. cn; Tel: 025-86881228; Fax: 025-86881000

作者简介:赵炳梓 (1967~),女,副研究员,主要研究方向为土壤水分与作物生长、溶质迁移。E-mail: bzhaob @issas. ac. cn

收稿日期:2005-03-15;收到修改稿日期:2005-06-21

包气带水力学性质及微生物学敏感性进行分析,以确定该地区“自然净化”能力的强弱,从而制定出一套管理措施。如果该地区的包气带“自然净化”能力很弱,即没有水力学和微生物学上的屏障,那么其供水系统必须进行严格的消毒。

水力学上的屏障作用主要指某种土壤对水以及随水迁移微生物的传导能力,主要取决于土壤水力学性质;而微生物学上的净化作用主要是指某种土壤对进入土体的细菌、病毒等致病微生物的吸附及致死能力,主要取决于土壤及微生物本身的理化性质及土壤环境的组成等。如果某种土壤存在某些特别性质,导致进入土体的细菌、病毒等致病微生物吸附、固定或死亡,就能达到净化的目的。因此,土壤对细菌、病毒等致病微生物迁移的水力学屏障能力以及在迁移过程中的净化能力已成为评价某一地区地下水是否易受细菌、病毒等致病微生物污染的一个重要指标。

因此,本文的主要研究目标为:(1)综述病毒在土壤中迁移研究的现状;(2)剖析影响病毒在土壤中迁移的主要因素及其机制;(3)提出进一步研究的建议。

1 病毒的基本性质

病毒是严格的细胞内寄生物,在宿主细胞外环境,病毒不能独立进行代谢活动,也不能以分裂方式进行繁殖,只能以形态成熟的颗粒存在,即毒粒(virion)存在;毒粒具有感染性,一旦进入细胞,毒粒便会解体,释放出的病毒基因组能利用宿主细胞的大分子合成装置进行复制表达,从而导致病毒的繁殖,并随之表现出遗传、变异等一系列生命特征^[7]。

病毒没有细胞结构,大多数病毒是由核酸(DNA或RNA)和蛋白质外壳(capsid)组成的大分子,其直径一般在20~100 nm之间^[2],但不同病毒的等电点的变异性比较大。蛋白质外壳的理化性质决定着病毒在环境中的去向及迁移行为,这些性质包括大小、形状、密度、电动性(electrophoretic mobility)、净电荷、疏水性等。蛋白质外壳含有极性、非极性、离子区。由离子区产生的电荷分布是不均一的,由于pH的变化,正电荷和负电荷在不同点同时存在。电动性是决定病毒电荷特性的关键因素^[2]。

2 病毒在土壤中的迁移机理

西方学者认为病毒在土壤中的迁移取决于土壤

的水动力学性质和影响迁移的相关因子,前者决定迁移的动力,后者决定病毒是否能完成整个迁移过程,即在迁移过程中被不可逆吸附或死亡而不能到达终点。这个推论首先来自于20世纪70年代Goyal和Gerba进行的不同土壤对病毒吸附试验研究的结果^[14],尽管该研究的目的并非为了病毒在土壤中的迁移而为。研究选择了28种病毒和9种土壤作为研究对象,用一次平衡法进行病毒吸附试验,结果发现不同土壤对病毒的吸附量变化在0.01%~99.9%之间,而这些变化受土壤性质的影响,它们包括土壤质地、有机质含量、pH值、交换性磷含量、总铝含量、交换性铝含量等,其中pH值的影响最为显著。这些发现意味着:如果病毒不能被土壤完全吸附,就有可能随水进行迁移,但迁移量受各种因素的影响。因此,研究者们认为,除了迁移的水动力因素外,病毒在经过土壤进行迁移的过程中,可逆或不可逆地吸附在土壤颗粒表面,以及由于各种原因导致的死亡是影响病毒在土壤中迁移的两个非常重要过程^[2,15,16]。

2.1 影响病毒迁移的水动力学因素

土壤物理性质的不同是导致细菌和非反应物质Br⁻之间的迁移行为差异的主要因素^[17]。在质地均匀的砂土上,病毒和非反应物质示踪剂的迁移速度相当^[18]。但当介质存在明显裂隙、虫孔、根孔等大孔隙时,由于优势流的存在,细菌的迁移速度会出人意料地迅速,而示踪剂的移动则受阻,比病毒这样的胶体颗粒更容易分散,到达穿透曲线峰值所需时间比病毒长^[19]。其原因主要是因为当大孔隙存在时,可供微生物迁移的路径远远少于或短于供示踪剂迁移的路径^[20],像Cl⁻或Br⁻这样小的示踪剂能够通过对流或扩散进入与优势流通道相连接的细小缝隙,但微生物则由于直径较大而可能不能进入这样的小缝隙^[17]。McKay等在粘粒含量高的耕地上的实验结果表明,MS2和PRD1的迁移速率分别为2 m d⁻¹和大于5 m d⁻¹,而Br⁻和¹⁸O的迁移速率分别仅为0.01 m d⁻¹和0.07 m d⁻¹^[21]。同样,由于向土壤裂缝间细小缝隙的扩散现象的存在,Cl⁻浓度经过43 h后才达稳定,而由于孔隙大小排斥(pore size exclusion)作用,MS2和PRD1浓度到达平衡只需3 h^[22]。Sinton等比较研究了染料、细菌、噬菌体迁移通过一冲积砂砾含水层的速度时发现,噬菌体的迁移速度最大,其次为细菌,再次为染料,他们认为细菌比染料的迁移速度快是由于孔隙大小排斥;而噬菌体比细菌更快是因为噬菌体的静电排斥作用比细

菌强烈,也有可能是因为噬菌体更容易吸附在一些比细菌迁移速度更快的颗粒上^[23]。

2.2 影响病毒在土壤颗粒表面吸附的因素

病毒和土壤颗粒之间的相互作用(吸引作用和排斥作用)主要取决于它们的表面性质,一些外部条件的改变可以导致它们表面性质的变化,这样又反过来影响它们之间的相互作用。病毒和土壤颗粒之间的相互作用决定着病毒在土壤颗粒表面的吸附和解吸行为,下面详细讨论影响病毒在土壤颗粒表面吸附的一些主要因素。

2.2.1 土壤类型

土壤是个复杂的多相体,不同土壤含有不同量的砂粒、粉砂、粘粒等,每个组成部分及其性质的不同可能不同程度地影响病毒的吸附。一般说来,粘粒含量高的土壤吸附病毒的能力比砂粒含量高的土壤强^[24]。粘粒的比表面积比较大,而病毒比较容易吸附在表面积比较大的土壤上^[25];另外,粘粒表面比较容易分布含正电荷的吸附点。Moore 等发现土壤颗粒中带正电荷总量的多少与病毒吸附量之间存在显著相关性^[26]。有些土壤含有如三氧化物和碳酸盐,这些颗粒可能带正电荷,尽管含量不高,但它们的表面积很大,可能显著影响病毒的吸附^[16]。Ryan 和 Elimelech 研究也指出,铁、铝、锰氧化物在 pH 接近中性时带正电荷,并且它们一般覆盖在矿物颗粒表面,即使在含量很低的情况下,它们吸附病毒的量可能以数量级增长^[27]。Jin 等的研究进一步证实 ϕ X174 颗粒在 Ottawa 砂粒上的吸附主要集中在由针铁矿覆盖的含有正电荷的砂粒上^[28]。因此,以铁氧化物为主要成分的有磁性砂土和赤铁矿显著影响病毒吸附,而蒙脱石、海绿石、沥青页岩对病毒吸附的影响最小^[26]。

2.2.2 病毒类型

病毒的吸附是个非常复杂的过程,无数的实验已经证明即使在相似条件下,绝大部分病毒类型间,甚至同一类型的不同病毒株间的吸附行为是截然不同的^[11]。病毒和土壤颗粒之间的相互作用主要发生在病毒的蛋白质外壳和土壤颗粒之间,因而蛋白质外壳的电荷类型及其疏水性可能决定着病毒的吸附行为^[29]。病毒的蛋白质外壳的氨基酸含有弱酸和弱碱基团,如羧基和氨基,它们决定着病毒所带的电荷类型。病毒的不同类型之间甚至同一类型的不同病毒株之间的等电点(pI)值均不同^[30],也就是说,同一 pH 值条件下,不同的病毒类型或同一类型的不同病毒株均具有其独

特的带电性质,由此可能导致病毒的不同吸附特性。当病毒所带电荷和土壤颗粒所带电荷相反时有利于病毒的吸附,在自然状况下,这种情况通常发生在环境 pH 值低于 pI 值时。同样,每个病毒也有其独特的疏水性,因为不同病毒的蛋白质外壳可能含有不同数量的疏水氨基酸,它们决定着病毒的疏水性能^[2]。

基于前人的总结和介绍,Ball 根据病毒的内在吸附特性将其分成三组:(1) 吸附能力相对较弱(平均吸附率为 44%),如 MS2、 ϕ X174;(2) 吸附能力较强(平均吸附率为 78%),如脊髓灰质炎病毒;(3) 吸附能力比较特殊,如 f2 噬菌体,其平均吸附率远低于上述二组病毒,只有 16%⁽¹⁾。Meschke 和 Sobsey 的研究证实了不同病毒在 6 种不同质地土壤上的吸附规律为脊髓灰质炎病毒 > Norwalk 病毒 > MS2^[31]; DeBorde 等的田间实验同样发现脊髓灰质炎病毒比 PRD1、MS2、 ϕ X174 的吸附能力强^[13]。

2.2.3 pH

由于大部分病毒的蛋白质外壳是由可离子化的氨基酸组成,因而环境 pH 值显著影响其离子化程度,从而进一步影响其在土壤颗粒表面的吸附和解吸行为。许多一次平衡法实验发现病毒在土壤颗粒上的吸附量一般随 pH 值的升高而有降低趋势^[14, 24, 32]。Bales 等的土柱实验结果发现,当 pH 5.0 时,噬菌体 MS2 在硅土上的吸附量比 pH 7.0 时高许多;脊髓灰质炎病毒也有相似趋势,在 pH 5.5 时的吸附量比 pH 7.0 时高^[33]。Ryan 等的田间实验也表明,随着 pH 值的升高,噬菌体 PRD1 的解吸量随之增加^[34]。

Dowd 等的研究发现,pI 值是控制直径较小病毒被吸附的主要因素。病毒 pI 值通常在 3~7 之间,当土壤 pH 值为 4~9 时,土壤颗粒表面主要为负电荷,如果土壤的 pH 值小于某种病毒的 pI 值,大部分病毒就会吸附在土壤颗粒表面而不易迁移;反之,当 pH 值大于 pI 值时,病毒和矿物颗粒表面均带负电荷,病毒不易被吸附而容易随水迁移^[35]。Loveland 等发现在 pH 值大于病毒 pI 值 2.5~3.5 的范围内存在一个吸附临界值,当 pH 值在吸附临界值之内时,几乎所有的噬菌体 PRD1 都吸附在矿物质表面并且不可逆,当 pH 值越过吸附临界值时,噬菌体 PRD1 被吸附的量很少并且可逆^[16]。

2.2.4 离子强度和价阳离子

组成病毒蛋白质外壳的氨基酸上的羧基和氨基离子化时带电荷,

(1) Ball P.N. Subsurface microbiology: Viral transport studies and the microbial ecology of landfill environments. PhD thesis. The University of Montana, 2001

因此,分散的病毒颗粒在溶液中形成双电层。离子强度影响双电层的厚度,离子强度比较高的溶液压缩双电层,缩短病毒和带相同电荷的土壤颗粒之间的接触距离,从而促进病毒吸附、阻碍病毒迁移^[36]。病毒在电导率为 $500 \sim 600 \mu\text{S cm}^{-1}$ 的污水中比在电导率为 $10 \mu\text{S cm}^{-1}$ 左右的蒸馏水中容易被土壤吸附^[37]。在 pH 5 时,噬菌体 MS2 和 ϕX174 在石英砂上的吸附量随着 NaCl 浓度从 0.01 mol L^{-1} 上升到 0.1 mol L^{-1} 而增加,但当其浓度进一步增加到 0.3 mol L^{-1} 时,对噬菌体 MS2 的吸附影响很小,却导致 MS2 吸附量的减少^[38]。

除了溶液浓度,阳离子和阴离子的组成也影响着病毒的吸附。多价阳离子 (Ca^{2+} 或 Mg^{2+}) 导致的离子强度的增加比单价阳离子 (Na^{+}) 导致的离子强度的增加更能促进噬菌体 MS2 吸附在石英砂上^[39]。Bales 等的一次平衡法实验结果也表明,有 Ca^{2+} 存在时 MS2 在硅粒上的吸附量较没有 Ca^{2+} 存在时高 10 倍以上^[40],因多价阳离子可以在病毒和带相同电荷的土壤颗粒之间形成“盐桥 (salt bridge)”^[25, 32]。一般而言,当 pH 值大于病毒和土壤颗粒的等电点时,病毒的吸附与阳离子的价数成正比,即三价 > 二价 > 单价^[41]。不同的阴离子同样有可能影响病毒吸附,Lance 和 Gerba 的研究发现 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 较 Cl^- 更有利于病毒的吸附^[42]。

2.2.5 有机质 Moore 等的一次平衡法实验结果发现,脊髓灰质炎病毒在 34 种不同土壤和矿物上的吸附量和有机碳含量之间存在显著负相关,他们认为脊髓灰质炎病毒的等电点低而导致的其表面带负电荷是决定土壤有机质吸附能力较弱的原因之一^[26]。大量资料表明,地下水中的有机质会阻碍病毒在土壤颗粒或沉积物上的吸附^[33, 37],因为可溶性和/或悬浮有机质的主要成分是胡敏物质,而胡敏物质与病毒一样带负电荷,因而有可能与病毒竞争土壤颗粒表面吸附点,有机质也有可能覆盖在病毒表面而改变病毒与土壤颗粒之间的吸附行为^[30];同时,可溶性和/或悬浮有机质有可能增加病毒的解吸,因为胡敏物质与非离子型疏水有机化合物有很强的亲和力^[43, 44]。

另一方面,在吸附能力本身很低的土壤上,吸附在其上的有机碳可能可以提供疏水吸附位。Bales 等的土柱实验很清楚地证实,在 pH 7 时,带负电荷的硅土表面只要覆盖有很少量的疏水性 C18-氯硅烷,MS2 的吸附量即可迅速增加^[33]。然而,Burge 和 Enkiri 得出的实验结果互相矛盾, ϕX174 在 4 种不同

类型土壤上的吸附量随着有机碳含量的增加而增加,第 5 种土壤的有机碳含量尽管较其他 4 种高得多,但其对 ϕX174 的吸附量则很低,作者认为这可能由于过高的有机质阻塞病毒吸附点^[24]。因此,有机质对病毒吸附的影响需综合考虑土壤类型、病毒类型、有机质特性^[11]。Zhuang 和 Jin 综合比较不同类型有机质对 MS2 和 ϕX174 的吸附行为后得出结论,有机质对病毒吸附行为的影响非常复杂,主要取决于有机质特性和病毒类型,尽管自然土壤中有机质的主要成分是胡敏物质,但它们的来源、矿化条件、形成时间均可能影响土壤中有机质特性^[45]。

2.3 病毒死亡

病毒死亡是指由蛋白质外壳的分裂和核酸退化导致的病毒浓度随时间的降低^[30]。死亡病毒不会感染宿主细胞,因而丧失对人畜健康危害。病毒从污染源迁移通过包气带的存活率越高,则表示该病毒污染地下水的可能性越大。以肠道病毒(脊髓灰质炎病毒、人肠道孤病毒、柯萨奇病毒)为例,发现它们在淡水资源的平均死亡率为:自来水 $0.576 \log_{10} \text{d}^{-1}$; 污染河水 $0.325 \log_{10} \text{d}^{-1}$; 未污染河水 $0.25 \log_{10} \text{d}^{-1}$; 围水 $0.374 \log_{10} \text{d}^{-1}$; 地下水 $0.174 \log_{10} \text{d}^{-1}$ ^[46]。死亡率均小于 $1 \log_{10} \text{d}^{-1}$,表明病毒在淡水资源的存活时间相当长。肠道病毒在土壤中的存活时间也不容忽视,同样以肠道病毒(脊髓灰质炎病毒 1、人肠道孤病毒 7、柯萨奇病毒 B3)为研究对象,pH 7.5 时,它们在砂土和壤土上的存活时间可长达 110 ~ 170 d; pH 5.0 时,它们的存活时间仍可达 25 ~ 60 d^[46]。影响病毒在包气带环境存活的因素很多,Jin 和 Flury 罗列了影响病毒在土壤包气带存活率的许多因子,其中包括温度、微粒对病毒的吸附、水分、微生物活动、pH、土壤和病毒类型、有机质等^[2],但 Schijven 和 Hassanizadeh 认为前面 4 点是影响病毒死亡的主要因素^[11]。下面分别简述:

2.3.1 温度 温度是影响病毒死亡率最为重要的因素。温度越高,病毒的死亡率越高。Hurst 等研究表明肠道病毒(脊髓灰质炎病毒 1、人肠道孤病毒 7、柯萨奇病毒 B3)在地面淡水资源的平均死亡率为:22 时 8 周间平均死亡率为 $6.5 \sim 7.0 \log_{10}$ 单位,1 时 12 周间平均死亡率为 $4 \sim 5 \log_{10}$ 单位,-20 时 12 周间平均死亡率为 $0.4 \sim 0.8 \log_{10}$ 单位^[47]。20 时经过 10 d 后,河水中 99% 轮状病毒死亡,而在 4 时,达到同样的死亡率需要 32 d^[48]。脊髓灰质炎病毒在 4 的饱和砂土和砂壤土中可存活 180 d

以上,而当温度升到 37 °C 时,12 d 后病毒全部死亡^[2]。病毒对温度的敏感性因病毒的不同类型或同一类型不同病毒株而异,在室温条件下,99%的腺病毒(40 型)死亡需经过 60 d,而腺病毒(41 型)需经过 84 d;HAV 需要 27 d、脊髓灰质炎病毒只需 11 d 即可导致 99%病毒死亡^[46]。

2.3.2 土壤含水量 土壤含水量是决定病毒死亡率的另一重要因素。干燥时污泥处理土壤中的病毒可存活 8 d,而潮湿情况下病毒可生存 35 d^[37]。厌氧条件有利于增长病毒寿命。随着土壤含水量持续增加到饱和含水量时,脊髓灰质炎病毒死亡率增加,然后随着含水量的进一步增加(即超过饱和含水量),病毒寿命又增长,也就是说,在土壤含水量在饱和点时的病毒死亡率最高。其中的原因比较复杂,可能与不同含水量条件下病毒在土壤颗粒上的吸附机理和程度不同有关,也有可能不同含水量条件下的微生物生长速率不同有关^[46]。Jin 等通过研究饱和和非饱和条件下病毒在砂土填装的土柱中的迁移行为发现,MS2 在非饱和条件下的死亡率增加,同时他们认为非饱和条件下气-水界面的存在是导致 MS2 死亡的主要原因,但死亡率高因病毒类型不同而异^[15]。Rossi 的一次平衡法实验证实了气-水界面导致病毒死亡的推测,当气-水界面被有机质饱和后,病毒进入气-水界面的机会减少、死亡率降低;当加绿坡缕石(attapulgite)后,导致病毒颗粒快速吸附在粘粒上,降低了病毒接触气-水界面的机会,使病毒的死亡率进一步降低⁽²⁾。Chu 等的进一步研究表明,除了病毒类型外,土壤颗粒的表面性质同样决定着气-水界面的存在与病毒死亡率高低的的关系,他们认为在活性固-水界面不存在的情况下,气-水界面是影响病毒死亡的主要原因,其影响力随含水量的进一步降低而减弱^[49]。

2.3.3 微粒对病毒的吸附 Schijven 和 Hasanizadeh 在总结他人的研究结果后得出结论:废水中的绝大部分病毒颗粒吸附在直径小于 0.3 μm 的固体和其他胶体颗粒上,这些颗粒主要包括粘粒、细胞碎片、废物、其他混杂残骸;但病毒一旦吸附在这些粘粒上,它们的死亡量显著减少^[11]。Sakoda 等的报道表示,在磷酸缓冲液(pH 7.2)中加入纤维素、DEAE-纤维素、纤维素磷酸盐、高岭石、有机碳、悬浮颗粒、江河沉积物后,其中 MS2 和 Q 的死亡率显著降低^[50]。肝炎

病毒在 5 种不同土壤(粘土、粘壤土、壤质砂土、砂土、腐殖土)中的寿命,以在粘土中的寿命为最长,这可能与病毒在粘粒上的吸附有关^[2]。Gerba 认为死亡率降低是由于吸附可保护病毒免遭蛋白水解酶或其他导致病毒死亡的物质的危害、增强病毒蛋白质外壳的稳定性、防止病毒团聚现象的产生、阻挡紫外线辐射等^[36]。Sakoda 等认为吸附在固体颗粒表面的病毒可防止病毒由于膨胀而导致的死亡^[50]。

然而,也有病毒吸附在微粒上后其死亡率增加报道,尤其存有金属氧化物时^[2]。Zhuang 和 Jin 利用砂性土柱的研究结果表明,当砂粒用 Al-氧化物包裹后,其去除病毒的能力大大增强^[45]。Gerba 认为这可能与病毒吸附在金属氧化物表面而导致的病毒退化有关^[36]。

2.3.4 微生物活动 病毒在灭菌介质中较在不灭菌介质中的死亡率要低^[32]。土壤中本身存在的好氧微生物显著降低脊髓灰质炎病毒的寿命,而厌氧微生物则没有影响,作者推测原因可能为微生物的掠夺和产生妨碍病毒颗粒与土壤颗粒之间的吸附^[46]。Hurst 等的研究表示原生微生物的存在不利于脊髓灰质炎病毒在壤质砂土上的生长,但当温度降低至 1 °C 时,在实验的 70 d 内没有发现病毒数量的变化^[51],但 Bagdasaryan 认为土壤是否灭菌对病毒生长没有明显影响^[52]。因此,土壤中本身存在的微生物对病毒死亡的影响依条件不同而异。

至此,我们已经分别介绍了影响病毒在土壤中去向的物理、化学、生物过程及其影响因素。实际上,各因素可能同时存在、相互影响,很难将它们截然分开。在病毒的迁移过程中,它们对病毒在土壤中的真正去向的相对贡献到底如何?如何研究?笔者认为开发系列数学模型模拟研究不同条件下病毒的消亡是比较理想的选择。

3 研究病毒在土壤中去向时指示病毒(indicator viruses)的选择

由于病毒的感染剂量很低,因此测定环境水样中的病毒含量非常麻烦,通常先采取大量样品,然后经过多次的浓缩后才有可能利用诸如 RT-PCR 之类的高新技术进行测定,这样的测定耗时、价格昂贵、有可能污染环境也有可能受环境背景病毒的干扰,

(2) Rossi P. Advances in biological tracer techniques for hydrology and hydrogeology using bacteriophages. PhD Thesis. University of Neuchatel, Switzerland, 1994

甚至有的病毒根本不能培养^[4]。另外,在实验室或自然环境加入大量致病病毒将会对人畜健康构成极大危害。因此,在研究病毒在土壤中的迁移行为时,必须使用不会致病的指示病毒替代,但这种指示病毒能够表达真正病毒的行为,也就是说,在特定条件下它们的吸附和死亡等行为与真正病毒相似,能够通过指示病毒在土壤中的去向来预测真正病毒在土壤中的去向。

通常情况下,噬菌体是指示病毒的最佳选择,因为(1)对人畜没有任何危害,但它能感染特定的宿主细菌;(2)能够高浓度制备(可达 10^{10} 至 10^{12} pfu ml⁻¹)。(3)测定相对容易^[11]。噬菌体 MS2、 ϕ X174、PRD1 曾广泛作为指示病毒,用来研究病毒在土柱实验条件和田间实验条件下的迁移行为^[11],它们代表了病毒的系列理化性质,如大小、表面电荷、疏水性能等。MS2 为二十面体噬菌体(核酸 ss-RNA),其直径 24~26 nm,等电点 pI 为 3.5,吸附能力相对比较弱(尤其在有机质含量比较低的情况下),在温度低于 7 °C 时稳定性较好^[2]。 ϕ X174(核酸 ss-DNA)被认为是最理想的指示病毒,因为它的静电和疏水作用能力很低,在中性条件下几乎不带电荷(pI 介于 6.6 和 6.8 之间),直径 25~27 nm^[2];田间实验表明 ϕ X174 非常稳定,在田间即使经过 1.5 a 后,其死亡率依然很低^[12,13]。PRD1 也为二十面体噬菌体(核酸 ds-DNA),其直径 62 nm,内部有一脂质膜,等电点 pI 介于 3 和 4 之间,较 MS2 耐高温,在 10~23 °C 之间依然保持稳定^[2]。

由于病毒的吸附和迁移机理非常复杂,任何一个指示病毒都不可能完全表达真正病毒在多孔土壤介质中的迁移行为,因此在引用利用指示病毒所得的研究结果时必须考虑到这一点。

4 病毒迁移在我国的研究现状和进一步研究的一些建议

在我国,对致病微生物在土壤中迁移问题在近 2~3 年来已经给予关注,这主要是基于我国的环境问题比发达国家的形势更加严峻,由迁移导致的致病微生物对环境,特别是地下水的污染可能比发达国家更加严重。国家自然科学基金委员会(NSFC)已于 2003 年批准了一项有关细菌在土壤中迁移规律研究的面上项目,并已有初步结果^[53]。然而,病毒作为致病微生物的一个重要部分,由于近来对全球性人类健康产生的威胁,如 SARS 和禽流感等,其

在环境介质中的传播途径,必然会引起政府、社会和科技界的更为关注。以病毒为对象,以土壤为传播介质,研究其在不同土壤中的迁移特征、机理及消失途径方面研究在我国尚在起步阶段,其研究意义首先是在科学的层次上揭示病毒以迁移的方式在土壤介质中的传播规律,为人类健康和环境保护提供重要基础数据;其次是开拓土壤物质迁移研究领域的内容,将传统的对水分、溶质等无生命物质在土壤中迁移规律的研究扩展到对有生命的颗粒物质在土壤中迁移规律的研究。

根据上述的最新研究进展回顾,我们能看出,较早的以静态一次平衡法研究土壤性质对病毒消失的影响,已发展到目前的以土柱稳态流法(稳态饱和流和非饱和流)研究土壤性质对病毒在土壤中迁移及消失过程的影响。但目前的研究绝大部分均是在人工控制下的理想模拟环境中(比如以灭菌过的砂或砂土作为迁移介质),而土壤是一个复杂的多相体,对于在这个复杂的系统中病毒迁移可能受到的各影响因子之间的相互作用是不言而喻的。因而,诸如病毒在迁移过程中被土壤吸附和消亡的机理以及与静态一次平衡法研究中获得的结果有无不同;当水分运动速率改变时(由于水分状况的改变或土壤水力学性质的不同),病毒迁移和消亡的速率是否改变;如果土壤在其他微生物存在的条件下(即自然土壤,而不是消毒过的),病毒迁移及消亡所受的影响机理等一系列问题都了解甚少。更深一步地,如果病毒是以脉冲式污染土壤(不是连续性进入土壤)并进行迁移,其迁移与消失过程如何?不同土壤对病毒“过滤净化”能力有多大?即使在发达国家也还没有系统地展开研究。到目前为止最有挑战性的工作可能是如何将实验室结果推广到田间、物理化学性质如何影响病毒在田间自然条件下的迁移和去向。因此,这些诸多问题的存在,为我们在该方面可能做出创新性工作提供了较大的空间。

参考文献

- [1] US Environmental Protection Agency. Reducing Risk: Setting Priorities and Strategies for Environmental Protection. Appendix B: Report of the Human Health Subcommittee. USEPA Science Advisory Board, SAB-EC-90-021B, Washington DC, 1990
- [2] Jin Y, Flury M. Fate and transport of viruses in porous media. *Advances in Agronomy*, 2002, 77: 39~102
- [3] Craun G F. Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Sci. Technol.*, 1991, 24: 17~20
- [4] Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detec-

- tion of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 444 ~ 449
- [5] Bauder J W, White B A, Inskip W P. Montana extension initiative focuses on private well quality. *J. Soil Water Conserv.*, 1991, 46: 69 ~ 74
- [6] USGS. Microbiological quality of public-water supplies in the Ozark Plateaus aquifer system, Missouri. Fact Sheet 028-98. US Geological Survey, Washington DC, 1998
- [7] 周德庆著. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. Zhou D Q. Microbiology Tutorial (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 1993
- [8] Quanrud D M, Carroll S M, Gerba C P, *et al.* Virus removal during simulated soil-aquifer treatment. *Water Res.*, 2003, 37: 753 ~ 762
- [9] Sinton L W, Finley R K, Pang L, *et al.* Transport of bacteria and bacteriophages in irrigated effluent into and through an alluvial gravel aquifer. *Water, Air, Soil Pollut.*, 1997, 98: 17 ~ 42
- [10] US Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule, Proposed Rules. Federal Register 65: 30193-30274, USEPA, Washington DC, 2000
- [11] Schijven J F, Hassanizadeh S M. Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2000, 30: 49 ~ 127
- [12] DeBorde D C, Woessner W W, Lauerman B, *et al.* Virus occurrence in a school septic system and unconfined aquifer. *Ground Water*, 1998, 36: 825 ~ 834
- [13] DeBorde D C, Woessner W W, Kiley Q T, *et al.* Rapid transport of viruses in a floodplain aquifer. *Water Res.*, 1999, 33: 2 229 ~ 2 238
- [14] Gyal S M, Gerba C P. Comparative adsorption of human enteroviruses, simian rotavirus, and selected bacteriophages to soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38: 241 ~ 247
- [15] Jin Y, Chu Y, Li Y. Virus removal and transport in saturated and unsaturated sand columns. *J. Contam. Hydrol.*, 2000, 43: 111 ~ 128
- [16] Loveland J P, Ryan J N, Amy G L, *et al.* The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 1996, 107: 205 ~ 221
- [17] Harvey R E, Kinner N E, MacDonald D, *et al.* Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observations of bacteria, microbial-sized microspheres, and bromide transport through aquifer sediments. *Water Resources Res.*, 1993, 29: 2 713 ~ 2 721
- [18] Pieper A P, Ryan J N, Harvey R W, *et al.* Transport and recovery of bacteriophage PRD1 in a sand and gravel aquifer: Effect of sewage-derived organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31: 1 163 ~ 1 170
- [19] Abu-Ashour J, Joy D M, Lee H, *et al.* Transport of microorganisms through soil. *Water, Air, Soil Pollut.*, 1994, 75: 141 ~ 158
- [20] Harvey R W. Microorganisms as tracers in groundwater injection and recovery experiments: A review. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 20: 461 ~ 472
- [21] McKay L D, Gillham R W, Cherry J A. Field experiments in a fractured clay till. 2. Solute and colloid transport. *Water Resource Res.*, 1993, 29: 3 879 ~ 3 890
- [22] Hinsby K, McKay L D, Jorgensen P, *et al.* Fracture aperture measurements and migration of solutes, viruses and immiscible creosote in a column of clay-rich till. *Ground Water*, 1996, 34: 1 065 ~ 1 075
- [23] Sinton L W, Finlay R K, Pang L, *et al.* Transport of bacteria and bacteriophages in irrigated effluent into and through an alluvial gravel aquifer. *Water, Air, Soil Pollut.*, 1997, 98: 17 ~ 42
- [24] Burge W D, Enkiri N K. Adsorption kinetics of bacteriophage ϕ X-174 on soil. *J. Environ. Qual.*, 1978, 7: 536 ~ 542
- [25] Moore R S, Taylor D H, Reddy M M, *et al.* Adsorption of reovirus by minerals and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44: 852 ~ 859
- [26] Moore R S, Taylor D H, Struman L S, *et al.* Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1981, 42: 963 ~ 975
- [27] Ryan J N, Elimelech M. Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 1996, 107: 1 ~ 56
- [28] Jin Y, Yates M V, Thompson S S, *et al.* Sorption of viruses during flow through saturated sand columns. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31: 548 ~ 555
- [29] Shields P A, Farrah S R. Determination of the electrostatic and hydrophobic character of enteroviruses and bacteriophages. *Abstr. Q-82 Program Abstr. 87th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society of Microbiology*, Washington DC, 1987
- [30] Gerba C P, Keswick B H, Dupont H L, *et al.* Isolation of rotavirus from drinking water. *Monogr. Virol.*, 1984, 15: 119 ~ 125
- [31] Meschke J S, Sobsey M D. Comparative adsorption of Norwalk virus, poliovirus 1 and F+ RNA coliphage MS2 to soil suspended in treated wastewater. *Water Sci. Tech.*, 1998, 38: 187 ~ 189
- [32] Sobsey M D, Dean C H, Knuckles M E, *et al.* Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, 40: 92 ~ 101
- [33] Bales R C, Li S, Maguire K M, *et al.* MS2 and poliovirus transport in porous media: Hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Res.*, 1993, 29: 957 ~ 963
- [34] Ryan J N, Elimelech M, Ard R A, *et al.* Bacteriophage PRD1 and silica colloid transport and recovery in an iron oxide-coated sand aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33: 63 ~ 73
- [35] Dowd S E, Pillai S D, Wang S, *et al.* Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 405 ~ 410
- [36] Gerba C P. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1984, 30: 133 ~ 168
- [37] Bitton G, Gerba C P. *Groundwater Pollution Microbiology*. In: Bitton G, Gerba C P. eds. *Groundwater Pollution Microbiology*. New York, USA: John Wiley and Sons, 1984. 1 ~ 88
- [38] Penrod S L, Olson T M, Grant S B. Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media. *Langmuir*, 1996, 12: 5 576 ~ 5 587
- [39] Redman J A, Grant S B, Olson T M, *et al.* Physicochemical mecha-

- nisms responsible for the filtration and mobilization of a filamentous bacteriophage in quartz sand. *Water Res.*, 1999, 33: 43 ~ 52
- [40] Bales R C, Hinkle S R, Kroege T W, *et al.* Bacteriophage adsorption during transport through porous media: Chemical perturbation and reversibility. *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25: 2 088 ~ 2 095
- [41] Bitton G. Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water. *Water Res.*, 1975, 9: 473 ~ 484
- [42] Lance J C, Gerba C P. Virus movement in soil during saturated and unsaturated flow. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 47: 335 ~ 337
- [43] Ouyang Y, Shinde D, Mansell R S, *et al.* Colloid-enhanced transport of chemicals in subsurface environments: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 1996, 26: 189 ~ 204
- [44] Shimizu Y, Sogabe H, Terashima Y. The effects of colloidal humic substances on the movement of non-ionic hydrophobic organic contaminants in groundwater. *Water Sci. Technol.*, 1998, 38: 159 ~ 167
- [45] Zhuang J, Jin Y. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: Effects of ionic strength and composition. *J. Contam. Hydrol.*, 2003, 60: 193 ~ 209
- [46] Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, 28: 441 ~ 453
- [47] Hurst C J, Benton W H, McClellan A. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can. J. Microbiol.*, 1989, 35: 474 ~ 480
- [48] Raphael R A, Sattar S A, Springthorpe V S. Longterm survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can. J. Microbiol.*, 1985, 31: 124 ~ 128
- [49] Chu Y, Jin Y, Flury M, *et al.* Mechanisms of virus removal during transport in unsaturated porous media. *Water Resour. Res.*, 2001, 37: 253 ~ 263
- [50] Sakoda A, Sakai Y, Hayakawa K, *et al.* Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Sci. Technol.*, 1997, 35: 107 ~ 114
- [51] Hurst C J, Gerba C P, Cech I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, 40: 1 067 ~ 1 079
- [52] Bagdasaryan G A. Survival of viruses of the enterovirus group (poliomyelitis, echo, coxsackie) in soil and on vegetables. *J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol.*, 1964, 8: 497 ~ 505
- [53] 李桂花, 李保国. 大肠杆菌在饱和砂土中的运移及其模拟. *土壤学报*, 2003, 40(5): 783 ~ 786. Li G H, Li B G. Transport of *Escherichia coli* through saturated sandy soil: Experiments and modeling (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(5): 783 ~ 786

TRANSPORT OF VIRUSES IN THE SOIL : AN OVERVIEW

Zhao Bingzi Zhang Jiabao[†]

(State Experimental Station for Agror Ecology, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Pathogens such as bacteria and viruses are widely spread in septic tanks, sewage sludge, wastewater and other sources. Groundwater contamination with viruses has caused great concerns in various countries because viruses are much smaller in size than bacteria or protozoan cysts and not easy to be filtered out through the porous soil matrix. Many scientific studies have been conducted in the past decades and much information is available in the literature about virus transport in the subsurface and its mechanisms. The purpose of this study is to review the literature from China and foreign countries with a focus on factors that influence virus transport in the subsurface, which include (1) general hydrodynamic factors that may affect fate and transport of viruses, (2) factors influencing virus adsorption and their mechanisms, (3) factors influencing virus inactivation and their mechanisms. Soil physical heterogeneity is one of the main factors that cause dissimilarities between microorganisms and conservative solute tracers in transport behavior. Factors such as soil type, virus type, pH, ionic strength and the multivalent cations, organic matter, temperature, soil moisture content, particulate matter and soil, and microbial activities have been found to influence virus adsorption and inactivation in the subsurface. Each influencing factor is described and explained in detail. As for selection of indicator viruses, bacteriophages such as MS2, PRD1, and ϕ X174 have been used extensively to study virus transport in columns and fields various in conditions and are considered to meet the requirements as indicator viruses. Based on the review, recommendations are made for future research activities.

Key words Virus; Transport; Soil; Influencing factors