土壤对病毒的吸附行为及其在环境净化中的作用 *

王秋英[1,2]　赵炳梓[1†]　张佳宝[1]　王一明[3]　张　辉[1]
陈效民[2]　龚建东[1,2]

(1 封丘农田生态系统国家试验站,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)
(2 南京农业大学资源与环境科学学院,南京　210095) (3 中国科学院南京土壤研究所,南京　210008)

摘　要　病毒在土壤上的吸附行为在很大程度上决定着其对饮用水的污染威胁。通过一次平衡法实验,比较研究噬菌体 MS2 和 ΦX174 在 6 种不同性质土壤上的吸附行为的差别,同时阐述土壤中本身存在的微生物对土壤吸附行为的影响。总体趋势为土壤对 ΦX174 的吸附能力高于对 MS2 的吸附能力;红黏土对病毒的吸附能力最强,而沙质潮土最弱;土壤中本身存在的微生物对土壤吸附病毒的影响依不同类型的土壤和病毒而异,除了红黏土外,灭菌土壤显著增加其对 MS2 的吸附;但对 ΦX174 来说,灭菌后显著降低其在红黏土上的吸附,其他 5 种土壤的灭菌处理对 ΦX174 的吸附行为没有显著影响。说明红黏土或与红黏土类似性质的材料在净化被病毒污染的水域时可能是一比较理想的病毒吸附剂;而在沙质潮土地区,病毒通过被土壤吸附而达到过滤净化的可能性则比较小。土壤中可能存在某一种或一类特殊微生物,它们可能可以控制病毒在土壤中的吸附行为,因而进一步研究其机理十分必要。

关键词　病毒;吸附;土壤
中图分类号　X172　　**文献标识码**　A

由于饮用水中含有极少量病毒即可对人类的健康构成威胁,因而美国环境保护署(USEPA)在 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到低于万分之一的水平[1]。应用各种消毒方法,比如加氯消毒法、臭氧消毒法、紫外线放射消毒法等在一定程度上可降低饮用水中的病毒含量,但由此引起的副作用也是显而易见的[2]。因此,评价饮用水源,特别是地下水源周边的土壤在屏障病毒污染方面的能力,对寻找合格饮用水源、降低消毒剂的用量或剂量具有极其重要的意义。

一般认为,土壤颗粒表面对病毒的吸附特性在很大程度上决定着土壤净化病毒、保护饮用水源免受病毒污染的能力。有鉴于此,已经开展了许多相关研究,特别是人工土壤或灭菌土壤对病毒的吸附行为研究已有较多的报道[3],其目的是为预测和评价不同地区饮用水源的卫生安全提供科学依据。然而,土壤对病毒的吸附行为受多种因素的影响,如病毒类型(基本性质和存活条件)、土壤性质(颗粒组成及表面性质、pH、离子强度和多价阳离子、土壤有机质含量等)[3]、环境条件(温度、湿度)以及土著微生物特征(组成与活性)等等[3],仅通过对有限影响因素影响下的人工土壤或灭菌土壤进行研究,很明显难以评价真实土壤对病毒的吸附能力,更难以了解真实土壤对病毒的吸附机理[4]。目前已经有报道指出,土壤系统中其他微生物的存在能对病毒存活和吸附产生显著的影响并随其他条件的改变而变化[5~7],然而,研究含有土著微生物的不灭菌土壤对病毒吸附行为的可能影响机理还鲜有报道。本文选择噬菌体 MS2 和 ΦX174 为指示病毒、选择理化性质差别比较显著的 6 种土壤经过灭菌和不灭菌处理后为研究对象,其主要研究目的为:(1) 不同性质土壤对不同类型病毒的吸附行为的影响;(2) 土壤中土著微生物对土壤吸附病毒行为的影响;(3) 评估不同性质土壤通过吸附"自然净化"病毒的能力。由于本研

* 国家自然科学基金项目(40471063)和江苏省青年科技创新人才项目(BK2007535)资助
† 通讯作者,E-mail :bzhao @issas. ac. cn; Tel: 025-86881230; Fax: 025-86881000
作者简介:王秋英,硕士研究生
收稿日期:2006 - 06 - 12;收到修改稿日期:2006 - 08 - 22

究对吸附在土壤颗粒上的病毒没有检测其死亡病毒比例,因此,最后计算的病毒吸附量实际上包括病毒吸附和死亡的总量。

1　材料与方法

1.1　病毒样品及其定量检测

考虑到环境和健康的安全性,研究以噬菌体 MS2 和 ΦX174 作为病毒的代替对象,因为它们与病毒的吸附和死亡行为相似,但对人类没有致病性,同时能被大量人工繁殖和相对容易测定。在本研究中采用的 MS2 (编号 ATCC 15597B1) 和 ΦX174 (编号 ATCC 13706B1) 及其宿主细菌 *Escherichia coli* (编号分别为 ATCC 15597 和 ATCC 13706) 均购自美国的 American Type Culture Collection(ATCC)。MS2 为二十面体单束 RNA 噬菌体(ss-RNA),其直径约26 nm[8],等电点 pI 为 3.9(1),在大部分自然环境的 pH 条件下,MS2 的表面带负电荷;ΦX174 为二十面体单束 DNA 噬菌体(ss-DNA),其直径约 23 nm,等电点 pI 为 6.6,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[9]。

两种噬菌体的大量扩增和定量检测方法见文献[10],它们的定量检测采用双层平板法,主要步骤为:(1)取培养至对数期的宿主细菌悬液 0.1 ml 和待测样品 0.1 ml 充分混合,然后在 37 ℃条件下温浴培养 20 min;(2)将(1)培养物加入融化的半固体培养基(事先使其温度保持在 42 ℃,以防其凝固或温度过高杀死培养物)中,然后迅速倒入事先准备好的固体培养基平板;(3)待上层半固体培养基凝固,将平板倒置放入 37 ℃培养箱培养 8～12 h(MS2)或 5 h (ΦX174);(4)为了方便、精确记录每个平板的噬菌斑数,选择可数噬菌斑数在 30～300 之间的平板,然后计数,最后结果用噬菌斑形成单位(plaque forming unit,pfu)表示。

配备培养基所需的酵母膏(Yeast Extract LP0021)、胰蛋白胨(Tryptone LP0042)、牛肉膏('Lab-Lemco' Powder LP0029)均购自英国的 OXOID 公司;NaCl、KCl、Na_2HPO_4均为分析纯试剂;日本进口琼脂粉。所有的噬菌体溶液均用磷酸盐缓冲(Phosphate-buffered saline, PBS)溶液(0.02 mol L^{-1} Na_2HPO_4, 0.10 mol L^{-1} NaCl, 0.003 mol L^{-1} KCl, pH 7.5)配制。

1.2　土壤

根据质地和性质差异选择了 6 种不同的土壤为研究对象,即红壤(较低 pH、可变电荷)、潮土(较高 pH、恒电荷)和水稻土(Eh 值变化大)各 2 个,它们分别来自于江西鹰潭红色砂岩上发育的红壤(红壤土)和第四纪红色黏土上发育的红壤(红黏土)、江苏常熟湖积物上发育的水稻土(乌栅土)和高平原黄土性母质上发育的水稻土(黄泥土)、河南封丘黄泛母质上发育的两种质地潮土(砂质潮土和壤质潮土)。所有土样采自表层 0～15 cm,经风干、过2 mm筛、待用,它们的基本理化性质见表 1。

土壤灭菌方法:用高压灭菌锅(LDZX-40BI,上海申安)在温度为 121 ℃、压力为 0.105 MPa 下湿热每间隔 24 h 灭菌 3 次,每次灭菌 3 h,灭菌土壤放置于通风良好、已灭菌的无菌操作室内待用。

1.3　一次平衡法吸附实验

一次平衡法吸附实验在 50 ml 硬质塑料离心管中进行,每种噬菌体在浓度为 10^1～10^9pfu ml^{-1}范围内至少选择 6 个浓度等级来进行实验,各等级浓度的噬菌体悬液均用 PBS 配制。每个离心管中加 10 ml噬菌体悬液和 10 g 土壤样品,空白处理只加 10 ml噬菌体悬液。土壤 - 噬菌体混合液在恒温(4 ℃)、恒速(300 r min^{-1})条件下的振荡培养箱(HZ-9310K,中国太仓)中连续旋转振荡培养 3 h,然后其混合液用高速离心机(Avanti® J-30I, BECKMAN COVLTER, USA)在 4 ℃条件下以 10 000 r min^{-1}(即 12 096 ×g)离心 15 min,双层平板法测上清液噬菌体浓度。空白处理离心管的实验步骤与有土壤样品处理的离心管一样。所有实验 3 次重复。土壤对病毒的吸附比例(R)和相对吸附量(Cs)用下列公式计算:

$$R = [(Ci - Cl) \times 100 / Ci]$$

$$Cs = [(Ci - Cl) / M]$$

上式中 R、Ci、Cl、Cs 分别表示病毒被吸附的比例(%)、空白处理的病毒浓度(pfu ml^{-1})、土壤样品处理后的上清液病毒浓度(pfu ml^{-1})、土壤对病毒的相对吸附量(pfu g^{-1}),M 为每次吸附实验时每单位悬液中土壤样品含量(g ml^{-1})。

土壤中本身存在的微生物对病毒吸附行为影响的显著性差异用 SPSS 11.5 进行统计分析。

(1) Zerda K S. Adsorption of Viruses to Charge-modified Silica. PhD Diss. Baylor College of Medicine, Houston, 1982

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

土壤 Soil	采集地点 Sampling site	pH	有机质 OM (g kg^{-1})	CEC (mmol kg^{-1})	砂粒 Sand	粉粒 Silt (%)	黏粒 Clay	游离 Fe_2O_3 Free Fe_2O_3 (g kg^{-1})	游离 Al_2O_3 Free Al_2O_3 (g kg^{-1})	无定形 Fe_2O_3 Amorphous Fe_2O_3 (g kg^{-1})	无定形 Al_2O_3 Amorphous Al_2O_3 (g kg^{-1})
红壤土 Loamy red soil	江西鹰潭 Yingtan, Jiangxi	5.13	2.84	33.35	39.80	50.37	9.83	12.84	20.00	0.65	3.75
红黏土 Clayed red soil	江西鹰潭 Yingtan, Jiangxi	4.30	4.32	99.62	35.62	25.45	38.93	29.61	32.95	1.56	7.24
乌栅土 Wushan soil	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	7.19	35.49	205.4	25.80	48.84	25.36	15.50	12.11	6.54	5.45
黄泥土 Huangni soil	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	6.96	25.30	147.4	34.91	47.44	17.66	16.23	12.26	5.24	4.65
砂质潮土 Sandy Chao soil	河南封丘 Fengqiu, Henan	8.05	4.43	44.02	92.45	2.18	5.37	8.53	6.06	0.55	4.23
壤质潮土 Loamy Chao soil	河南封丘 Fengqiu, Henan	7.96	11.42	79.48	76.29	11.24	12.47	8.15	4.45	0.71	4.65

2 结果与讨论

2.1 病毒在非灭菌土壤上的吸附行为

2.1.1 不同病毒吸附行为的差异 6种土壤在不灭菌的条件下,MS2 和 ΦX174 的平均吸附比例分别为 21.29 %和 46.77 %(表 2,表 3)。除了 MS2 和 ΦX174 在红黏土上的吸附行为非常相似外,MS2 在其他 5 种土壤上的吸附比例和相对吸附量均远低于 ΦX174;当起始浓度低于 10^5 pfu ml^{-1}时,MS2 在该 5 种土壤上的相对吸附量和吸附比例均为 0,尤其是 MS2 在乌栅土和壤质潮土上的吸附量和吸附比例在本研究的起始浓度范围内均为 0;而对 ΦX174 来说,只有当起始浓度低于 10^4 pfu ml^{-1}时,其在红壤土和砂质潮土上的吸附比例和相对吸附量为 0,而在其他所有土壤上和所有的起始浓度范围内均有不同程度的吸附,表示土壤对 MS2 的吸附能力比 ΦX174 弱,同时也表明土壤对病毒的吸附量有随起始浓度的增加而提高的趋势。Thompson 等研究 MS2 和 ΦX174 在砂粒、砂壤土、壤砂土上的吸附行为时亦发现,ΦX174 在该三种介质中的吸附能力远高于 MS2[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能均可能影响着病毒的吸附行为[12]。病毒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。Dowd 等的研究发现,病毒等电点 pI 值是控制直径较小病毒被吸附的主要因素,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[13]。本研究中 MS2 和 ΦX174 的 pI 值分别为 3.9 和 6.6,供试土壤的 pH 值在 4.3 和 8.1 之间(表 1)。根据 Dowd 的等电点控制吸附机制,可以看出,加入到 6 种土壤中的 MS2 主要带负电荷,它们将难以被主要带负电荷的土壤吸附,如乌栅土、黄泥土、砂质潮土和壤质潮土,但容易被带有较多正电荷的红黏土吸附。然而,等电点控制吸附机制并不能解释同样带有较多正电荷的红壤土对 MS2 吸附的试验结果。而对于 ΦX174 来说,其在红黏土上的吸附试验结果也不能验证 Dowd 等的发现,因为红黏土的 pH 值低于 ΦX174 的 pI,ΦX174 应以带正电荷的形式存在,不易被红黏土吸附,但试验结果表明其接近 100 %的被吸附。显然,土壤在不灭菌的条件下对病毒的吸附受多种因素的作用。

表 2　非灭菌土壤对 MS2 的吸附1)

Table 2　Adsorptive behavior of MS2 to non-sterilized soils

Ci2) (pfu ml^{-1})	Cl3) (pfu ml^{-1})	R4) (%)	Cs5) (pfu g^{-1})	Ci (pfu ml^{-1})	Cl (pfu ml^{-1})	R (%)	Cs (pfu g^{-1})
红壤土 Loamy red soil				红黏土 Clayed red soil			
1.16×10^{2}	$(2.54\pm0.70)\times10^{2}$	0	0	9.05×10^{1}	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^{1}$
1.16×10^{3}	$(1.69\pm0.35)\times10^{3}$	0	0	9.05×10^{2}	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^{2}$
1.16×10^{4}	$(2.35\pm1.12)\times10^{4}$	0	0	9.05×10^{3}	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^{3}$
1.45×10^{5}	$(1.35\pm0.07)\times10^{5}$	7.06 ± 4.87	$(1.02\pm0.07)\times10^{4}$	9.05×10^{4}	$(2.00\pm1.76)\times10^{1}$	99.98 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^{4}$
1.45×10^{6}	$(1.13\pm0.15)\times10^{6}$	22.03 ± 9.98	$(3.20\pm1.45)\times10^{5}$	9.05×10^{5}	$(2.87\pm2.48)\times10^{2}$	99.97 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^{5}$
1.45×10^{7}	$(1.33\pm0.03)\times10^{7}$	8.43 ± 1.95	$(1.22\pm0.28)\times10^{6}$	9.05×10^{6}	$(2.65\pm2.37)\times10^{3}$	99.98 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^{6}$
乌栅土 Wushan soil				黄泥土 Huangni soil			
9.05×10^{1}	$(3.97\pm2.26)\times10^{2}$	0	0	1.09×10^{2}	$(2.06\pm0.96)\times10^{2}$	0	0
9.05×10^{2}	$(2.10\pm0.81)\times10^{3}$	0	0	1.09×10^{3}	$(1.40\pm0.53)\times10^{3}$	0	0
9.05×10^{3}	$(1.52\pm0.39)\times10^{4}$	0	0	1.09×10^{4}	$(1.22\pm0.14)\times10^{4}$	0	0
8.23×10^{4}	$(8.57\pm3.44)\times10^{4}$	0	0	1.09×10^{5}	$(6.61\pm3.84)\times10^{4}$	43.28 ± 21.90	$(4.32\pm1.46)\times10^{4}$
9.05×10^{5}	$(9.10\pm2.76)\times10^{5}$	0	0	1.09×10^{6}	$(7.20\pm1.51)\times10^{5}$	30.42 ± 21.42	$(3.73\pm3.01)\times10^{5}$
9.05×10^{6}	$(1.55\pm1.32)\times10^{7}$	0	0	1.09×10^{7}	$(4.92\pm2.33)\times10^{6}$	55.61 ± 12.42	$(6.00\pm2.17)\times10^{6}$
砂质潮土 Sandy Chao soil				壤质潮土 Loamy Chao soil			
1.09×10^{2}	$(3.54\pm0.45)\times10^{2}$	0	0	1.09×10^{2}	$(4.61\pm0.85)\times10^{2}$	0	0
1.09×10^{3}	$(2.10\pm0.24)\times10^{3}$	0	0	1.09×10^{3}	$(2.40\pm0.73)\times10^{3}$	0	0
1.09×10^{4}	$(1.44\pm0.16)\times10^{4}$	0	0	1.09×10^{4}	$(2.09\pm0.10)\times10^{4}$	0	0
1.09×10^{5}	$(1.22\pm0.24)\times10^{5}$	0	0	1.09×10^{5}	$(1.27\pm0.23)\times10^{5}$	0	0
1.09×10^{6}	$(1.18\pm0.16)\times10^{6}$	0	0	1.09×10^{6}	$(1.26\pm0.12)\times10^{6}$	0	0
1.28×10^{7}	$(1.21\pm0.06)\times10^{7}$	6.01 ± 4.63	$(7.70\pm5.94)\times10^{5}$	1.09×10^{7}	$(1.26\pm0.08)\times10^{7}$	0	0

1) 平均值 ±标准差 Mean ±SD;2) Ci:空白处理的病毒浓度 Concentration of virus in the control;3) Cl:土壤样品处理后的上清液病毒浓度 Concentrations of virus in the supernatant from treated soils;4) R:病毒被吸附的比例 Ratio of sorbed viruses;5) Cs:土壤对病毒的相对吸附量 Relative virus sorption capacity of soils

表 3 非灭菌土壤对 ΦX174 的吸附[1)]

Table 3 Adsorptive behavior of ΦX174 to non-sterilized soils

Ci[2)] (pfu ml^{-1})	Cl[3)] (pfu ml^{-1})	R[4)] (%)	Cs[5)] (pfu g^{-1})	Ci (pfu ml^{-1})	Cl (pfu ml^{-1})	R (%)	Cs (pfu g^{-1})
红壤土 Loamy red soil				红黏土 Clayed red soil			
2.45×10^{2}	$(3.99\pm4.73)\times10^{2}$	0	0	1.36×10^{2}	0	100	$(1.36\pm0.01)\times10^{2}$
2.45×10^{3}	$(2.51\pm2.25)\times10^{3}$	0	0	1.36×10^{3}	0	100	$(1.35\pm0.01)\times10^{3}$
1.36×10^{4}	$(5.87\pm0.62)\times10^{3}$	56.73 ± 4.54	$(7.69\pm0.62)\times10^{3}$	1.36×10^{4}	$(2.40\pm2.45)\times10^{2}$	98.23 ± 1.81	$(1.33\pm0.03)\times10^{4}$
1.36×10^{5}	$(1.25\pm1.10)\times10^{5}$	7.79 ± 0.00	$(1.06\pm0.00)\times10^{4}$	1.36×10^{5}	$(5.00\pm0.71)\times10^{2}$	99.63 ± 0.52	$(1.35\pm0.01)\times10^{5}$
1.36×10^{6}	$(5.99\pm1.58)\times10^{5}$	55.85 ± 11.63	$(7.57\pm1.58)\times10^{5}$	1.36×10^{6}	$(2.50\pm0.71)\times10^{3}$	99.82 ± 0.05	$(1.35\pm0.00)\times10^{6}$
3.00×10^{7}	$(2.87\pm2.26)\times10^{7}$	5.07 ± 1.76	$(1.31\pm0.65)\times10^{5}$	1.36×10^{7}	$(1.48\pm0.35)\times10^{5}$	98.91 ± 0.26	$(1.34\pm0.00)\times10^{7}$
乌栅土 Wushan soil				黄泥土 Huangni soil			
1.36×10^{2}	$(8.50\pm0.71)\times10^{1}$	37.30 ± 5.22	$(5.05\pm0.70)\times10^{1}$	1.28×10^{2}	$(4.11\pm1.71)\times10^{1}$	67.97 ± 13.30	$(8.73\pm1.72)\times10^{1}$
1.36×10^{3}	$(1.04\pm0.05)\times10^{3}$	23.65 ± 3.65	$(3.20\pm0.49)\times10^{2}$	6.35×10^{3}	$(3.20\pm0.48)\times10^{2}$	68.00 ± 12.05	$(6.03\pm1.56)\times10^{3}$
1.36×10^{4}	$(5.75\pm0.49)\times10^{3}$	57.58 ± 3.65	$(7.80\pm0.49)\times10^{3}$	1.28×10^{4}	$(4.92\pm2.96)\times10^{3}$	61.67 ± 23.03	$(7.92\pm2.94)\times10^{3}$
1.36×10^{5}	$(6.13\pm0.04)\times10^{4}$	54.82 ± 0.26	$(7.42\pm0.04)\times10^{4}$	5.60×10^{5}	$(2.94\pm0.87)\times10^{5}$	47.44 ± 15.46	$(2.65\pm0.87)\times10^{5}$
1.36×10^{6}	$(2.57\pm0.10)\times10^{5}$	81.04 ± 0.73	$(1.10\pm0.01)\times10^{6}$	1.28×10^{6}	$(1.73\pm0.18)\times10^{5}$	86.50 ± 1.40	$(1.11\pm0.02)\times10^{6}$
1.36×10^{7}	$(6.32\pm0.87)\times10^{6}$	53.41 ± 6.42	$(7.24\pm0.87)\times10^{6}$	1.28×10^{7}	$(3.01\pm1.96)\times10^{6}$	76.59 ± 15.29	$(9.83\pm1.96)\times10^{6}$
砂质潮土 Sandy Chao soil				壤质潮土 Loamy Chao soil			
6.35×10^{2}	$(9.73\pm0.17)\times10^{2}$	0	0	6.35×10^{2}	$(5.63\pm0.53)\times10^{2}$	11.29 ± 8.35	$(7.16\pm5.30)\times10^{1}$
6.35×10^{3}	$(6.91\pm1.54)\times10^{3}$	0	0	6.35×10^{3}	$(4.91\pm1.65)\times10^{3}$	22.71 ± 9.17	$(1.44\pm0.73)\times10^{3}$
6.35×10^{4}	$(5.53\pm0.99)\times10^{4}$	12.91 ± 15.59	$(8.20\pm9.90)\times10^{3}$	6.35×10^{4}	$(5.20\pm0.46)\times10^{4}$	18.11 ± 7.25	$(1.15\pm0.46)\times10^{4}$
6.00×10^{5}	$(4.33\pm0.58)\times10^{5}$	27.78 ± 9.62	$(1.67\pm0.58)\times10^{5}$	5.60×10^{5}	$(5.43\pm1.37)\times10^{5}$	3.04 ± 0.12	$(1.70\pm0.31)\times10^{4}$
6.00×10^{6}	$(2.80\pm0.35)\times10^{6}$	53.33 ± 5.77	$(3.20\pm0.35)\times10^{6}$	1.28×10^{6}	$(8.53\pm1.37)\times10^{5}$	33.56 ± 10.63	$(4.31\pm1.37)\times10^{5}$
6.00×10^{7}	$(5.23\pm0.25)\times10^{7}$	12.78 ± 4.19	$(7.66\pm2.52)\times10^{6}$	1.28×10^{7}	$(6.73\pm1.01)\times10^{6}$	47.57 ± 7.88	$(6.11\pm1.01)\times10^{6}$

1) 平均值 ±标准差 Mean ±SD;2) Ci:空白处理的病毒浓度 Concentration of virus in the control;3) Cl:土壤样品处理后的上清液病毒浓度 Concentrations of virus in the supernatant from treated soils;4) R:病毒被吸附的比例 Ratio of sorbed viruses;5) Cs:土壤对病毒的相对吸附量 Relative virus sorption capacity of soils

2.1.2 不同性质土壤对病毒吸附行为的影响

不同性质土壤显著影响其对病毒的吸附行为(表 2,表 3),红壤土、红黏土、乌栅土、黄泥土、砂质潮土、壤质潮土对 MS2 的平均吸附率分别为 6.25%、99.99%、0、21.55%、1.00%、0;而对 ΦX174 的平均吸附率则为 20.91%、99.43%、51.30%、68.03%、17.80%、22.71%。对红黏土来说,任何等级起始浓度的 MS2 和 ΦX174 几乎均全部被吸附,因而在所研究的 6 种土壤中,其吸附能力最强;乌栅土、砂质潮土、壤质潮土对 MS2 的吸附比例在我们研究的起始浓度范围内均为 0 或接近 0;同样,当 ΦX174 的起始浓度低于 10^{4}pfu ml^{-1}时,其在砂质潮土和红壤土上没有任何吸附,但在研究的起始浓度范围内,任何起始浓度等级的 ΦX174 在乌栅土、黄泥土、壤质潮土上均有不同程度的吸附比例。因此,在本研究实验条件下,红黏土对病毒的吸附能力最强,而砂质潮土相对较弱。

根据 Gerba 和 Goyal 对病毒吸附能力的分组情况,MS2 和 ΦX174 属于第一组,而决定第一组病毒吸附的土壤性质根据权重依次为 pH、有机质含量、交换性铁含量,pH 和有机质含量与病毒吸附量之间成负相关,而交换性铁含量与病毒吸附量之间成正相关[14];另一方面,黏粒含量高的土壤吸附病毒的能力比砂粒含量高的土壤强[15],因为黏粒的比表面积比较大,而病毒比较容易吸附在表面积比大的土壤上[16];再次,Ryan 和 Elimelech 研究指出,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[17]。很显然,本研究的6种土壤中,红黏土的pH和有机质含量均

处于最低或比较低的水平,而黏粒含量则在 6 种土壤中处于最高水平(表 1);再者,红黏土的铁、铝氧化物含量相对比较丰富(表 1);这些土壤性质均有利于红黏土对病毒的吸附;而砂质潮土的 pH 值、黏粒含量等性质在我们研究的 6 种土壤中与红黏土刚好完全相反,显然,不利于其对病毒吸附。

2.2　病毒在灭菌土壤上的吸附行为

土壤灭菌后对病毒吸附的影响依土壤和病毒类型的不同而有不同的响应(表 4,表 5),土壤灭菌后,红壤土、红黏土、乌栅土、黄泥土、砂质潮土、壤质潮土对 MS2 的平均吸附比例分别为 82.06 %、99.98 %、77.10 %、73.78 %、65.00 %、59.05 %,分别较非灭菌土壤提高 75.8、0、77.1、52.2、64.0、59.1 个百分点,进一步的方差分析结果表示,除了红黏土外,其他 5 种研究土壤灭菌后均极显著($p < 0.001$)提高其对 MS2 的吸附比例;土壤灭菌后对 ΦX174 的平均吸附比例则分别为 29.62 %、64.37 %、29.55 %、33.24 %、19.17 %、10.61 %,与非灭菌土壤相比,其吸附比例百分点的变化增减分别为:+8.7、-35.1、-21.8、-34.8、+1.4、-12.1,因此,土壤灭菌后对 ΦX174 的吸附比例有下降的趋势,进一步的方差分析结果表示,红黏土灭菌后对 ΦX174 的吸附比例显著($p < 0.05$)下降,而在其他 5 种研究土壤的非灭菌和灭菌处理间的差别不显著。

表 4　灭菌土壤对 MS2 的吸附[1)]

Table 4　Adsorptive behavior of MS2 to sterilized soils

Ci[2)] (pfu ml^{-1})	Ci[3)] (pfu ml^{-1})	R[4)] (%)	Cs[5)] (pfu g^{-1})	Ci (pfu ml^{-1})	Ci (pfu ml^{-1})	R (%)	Cs (pfu g^{-1})
红壤土 Loamy red soil				红黏土 Red clay soil			
2.12×10^{3}	$(4.33\pm2.59)\times10^{2}$	79.63 ±12.22	$(1.69\pm0.26)\times10^{3}$	2.12×10^{3}	0	100	2.12×10^{3}
2.12×10^{4}	$(2.72\pm0.78)\times10^{3}$	87.18 ±3.67	$(1.85\pm0.08)\times10^{4}$	2.12×10^{4}	0	100	2.12×10^{4}
2.12×10^{5}	$(5.08\pm2.10)\times10^{4}$	76.10 ±9.87	$(1.62\pm0.21)\times10^{5}$	2.12×10^{5}	0	100	2.12×10^{5}
2.12×10^{6}	$(6.04\pm1.16)\times10^{5}$	71.54 ±5.48	$(1.52\pm0.12)\times10^{6}$	2.12×10^{6}	0	100	2.12×10^{6}
2.12×10^{7}	$(1.83\pm0.73)\times10^{6}$	91.40 ±3.42	$(1.94\pm0.07)\times10^{7}$	2.12×10^{7}	0	100	2.12×10^{7}
2.12×10^{8}	$(2.87\pm1.04)\times10^{7}$	86.49 ±4.92	$(1.84\pm0.10)\times10^{8}$	2.12×10^{8}	$(2.94\pm1.90)\times10^{5}$	99.86 ±0.09	$(2.11\pm0.01)\times10^{8}$
乌栅土 Wushan soil				黄泥土 Huangni soil			
3.69×10^{3}	$(1.4\pm0.14)\times10^{3}$	60.40 ±3.76	$(2.22\pm0.14)\times10^{3}$	3.69×10^{3}	$(1.96\pm0.74)\times10^{3}$	46.93 ±20.07	$(1.73\pm0.74)\times10^{3}$
3.69×10^{4}	$(1.11\pm0.34)\times10^{4}$	69.77 ±9.14	$(2.57\pm0.33)\times10^{4}$	3.69×10^{4}	$(9.97\pm3.25)\times10^{3}$	72.97 ±8.82	$(2.69\pm0.33)\times10^{4}$
3.69×10^{5}	$(7.39\pm6.35)\times10^{4}$	79.95 ±17.22	$(2.95\pm0.63)\times10^{5}$	3.69×10^{5}	$(5.65\pm0.88)\times10^{4}$	84.67 ±2.40	$(3.12\pm0.09)\times10^{5}$
3.69×10^{6}	$(6.93\pm3.59)\times10^{5}$	81.19 ±9.75	$(2.99\pm0.36)\times10^{6}$	3.69×10^{6}	$(9.68\pm2.54)\times10^{5}$	73.75 ±6.88	$(2.72\pm0.25)\times10^{6}$
3.69×10^{7}	$(5.91\pm2.79)\times10^{6}$	83.96 ±7.57	$(3.09\pm0.28)\times10^{7}$	3.69×10^{7}	$(6.05\pm0.76)\times10^{6}$	83.59 ±2.07	$(3.08\pm0.08)\times10^{7}$
3.69×10^{8}	$(4.68\pm0.52)\times10^{7}$	87.31 ±1.40	$(3.22\pm0.05)\times10^{8}$	3.69×10^{8}	$(7.09\pm3.77)\times10^{7}$	80.77 ±10.23	$(2.98\pm0.37)\times10^{8}$
砂质潮土 Sandy Chao soil				壤质潮土 Loamy Chao soil			
3.52×10^{2}	$(2.20\pm0.17)\times10^{2}$	37.58 ±4.91	$(1.32\pm0.17)\times10^{2}$	3.52×10^{2}	$(3.15\pm0.21)\times10^{2}$	10.62 ±6.02	$(3.74\pm2.12)\times10^{1}$
3.52×10^{3}	$(1.27\pm0.10)\times10^{3}$	63.97 ±2.74	$(2.25\pm0.10)\times10^{3}$	3.52×10^{3}	$(1.77\pm0.10)\times10^{3}$	49.87 ±2.86	$(1.76\pm0.10)\times10^{3}$
1.63×10^{4}	$(7.67\pm1.32)\times10^{3}$	52.89 ±8.10	$(8.61\pm1.32)\times10^{3}$	1.63×10^{4}	$(5.39\pm0.58)\times10^{3}$	66.88 ±3.59	$(1.09\pm0.06)\times10^{4}$
1.63×10^{5}	$(4.49\pm1.26)\times10^{4}$	72.43 ±7.73	$(1.18\pm0.13)\times10^{5}$	1.63×10^{5}	$(5.48\pm0.78)\times10^{4}$	66.33 ±4.81	$(1.08\pm0.08)\times10^{5}$
1.63×10^{6}	$(3.05\pm0.35)\times10^{5}$	81.28 ±2.17	$(1.32\pm0.03)\times10^{6}$	1.63×10^{6}	$(3.37\pm0.20)\times10^{5}$	79.31 ±1.24	$(1.29\pm0.02)\times10^{6}$
1.63×10^{7}	$(2.96\pm0.07)\times10^{6}$	81.83 ±0.43	$(1.33\pm0.01)\times10^{7}$	1.63×10^{7}	$(3.04\pm0.31)\times10^{6}$	81.30 ±1.90	$(1.32\pm0.03)\times10^{7}$
1.63×10^{8}	$(2.71\pm0.25)\times10^{7}$	83.33 ±1.52	$(1.36\pm0.02)\times10^{8}$	1.63×10^{8}	$(3.44\pm0.18)\times10^{7}$	78.84 ±1.08	$(1.28\pm0.02)\times10^{8}$
1.63×10^{9}	$(2.73\pm0.08)\times10^{8}$	83.25 ±0.51	$(1.36\pm0.01)\times10^{9}$	1.63×10^{9}	$(3.28\pm0.02)\times10^{8}$	79.87 ±0.14	$(1.30\pm0.00)\times10^{9}$

1) 平均值 ±标准差 Mean ±SD;2) Ci:空白处理的病毒浓度 Concentration of virus in the control;3) Ci:土壤样品处理后的上清液病毒浓度 Concentrations of virus in the supernatant from treated soils;4) R:病毒被吸附的比例 Ratio of sorbed viruses;5) Cs:土壤对病毒的相对吸附量 Relative virus sorption capacity of soils

表 5 灭菌土壤对 ΦX174 的吸附[1)]

Table 5 Adsorptive behavior of ΦX174 to sterilized soils

Ci[2)] (pfu ml^{-1})	Cl[3)] (pfu ml^{-1})	R[4)] (%)	Cs[5)] (pfu g^{-1})	Ci (pfu ml^{-1})	Cl (pfu ml^{-1})	R (%)	Cs (pfu g^{-1})
红壤土 Loamy red soil				红黏土 Red clay soil			
5.49×10^{2}	$(4.49\pm0.14)\times10^{2}$	18.27 ± 2.55	$(1.00\pm0.14)\times10^{2}$	5.49×10^{2}	$(3.43\pm2.41)\times10^{2}$	37.60 ± 2.19	$(2.06\pm1.20)\times10^{2}$
5.49×10^{3}	$(4.04\pm0.38)\times10^{3}$	26.34 ± 6.93	$(1.45\pm0.38)\times10^{3}$	5.49×10^{3}	$(3.29\pm1.20)\times10^{3}$	40.07 ± 21.84	$(2.20\pm1.20)\times10^{3}$
5.49×10^{4}	$(3.87\pm0.62)\times10^{4}$	29.56 ± 11.32	$(1.62\pm0.62)\times10^{4}$	5.49×10^{4}	$(9.74\pm6.01)\times10^{3}$	82.25 ± 10.95	$(4.51\pm0.60)\times10^{4}$
5.49×10^{5}	$(3.62\pm0.52)\times10^{5}$	34.05 ± 9.54	$(1.87\pm0.52)\times10^{5}$	5.49×10^{5}	$(7.61\pm1.45)\times10^{4}$	86.14 ± 2.64	$(4.73\pm0.15)\times10^{5}$
5.49×10^{6}	$(4.20\pm0.52)\times10^{6}$	23.49 ± 9.47	$(1.29\pm0.52)\times10^{6}$	5.49×10^{6}	$(2.26\pm0.56)\times10^{6}$	58.89 ± 10.22	$(3.23\pm0.56)\times10^{6}$
5.49×10^{7}	$(2.96\pm1.56)\times10^{7}$	46.02 ± 28.48	$(2.52\pm1.56)\times10^{7}$	5.49×10^{7}	$(1.03\pm0.41)\times10^{7}$	81.28 ± 7.52	$(4.46\pm0.41)\times10^{7}$
乌栅土 Wushan soil				黄泥土 Huangni soil			
2.00×10^{2}	$(1.13\pm1.35)\times10^{3}$	0	0	2.00×10^{2}	$(4.44\pm1.66)\times10^{2}$	0	0
2.00×10^{3}	$(7.75\pm1.80)\times10^{3}$	0	0	2.00×10^{3}	$(3.51\pm1.20)\times10^{3}$	0	0
2.00×10^{4}	$(3.68\pm0.81)\times10^{4}$	0	0	2.00×10^{4}	$(4.33\pm2.66)\times10^{4}$	0	0
2.00×10^{5}	$(1.25\pm0.54)\times10^{5}$	37.66 ± 27.12	$(7.53\pm5.42)\times10^{4}$	2.00×10^{5}	$(8.73\pm0.68)\times10^{4}$	56.33 ± 3.40	$(1.13\pm0.07)\times10^{5}$
2.00×10^{6}	$(5.15\pm0.88)\times10^{5}$	74.25 ± 4.38	$(1.48\pm0.09)\times10^{6}$	2.00×10^{6}	$(4.32\pm0.70)\times10^{5}$	78.42 ± 3.50	$(1.57\pm0.07)\times10^{6}$
2.00×10^{7}	$(6.92\pm2.57)\times10^{6}$	65.40 ± 12.85	$(1.31\pm0.26)\times10^{7}$	2.00×10^{7}	$(7.07\pm0.26)\times10^{6}$	64.67 ± 1.32	$(1.29\pm0.03)\times10^{7}$
砂质潮土 Sandy Chao soil				壤质潮土 Loamy Chao soil			
8.80×10^{2}	$(8.85\pm0.32)\times10^{2}$	0	0	8.80×10^{2}	$(1.06\pm0.05)\times10^{3}$	0	0
8.80×10^{3}	$(9.63\pm0.90)\times10^{3}$	0	0	8.80×10^{3}	$(1.03\pm0.01)\times10^{4}$	0	0
8.80×10^{4}	$(5.92\pm1.24)\times10^{4}$	32.70 ± 14.07	$(2.88\pm1.24)\times10^{4}$	8.80×10^{4}	$(6.95\pm1.09)\times10^{4}$	21.00 ± 12.33	$(1.85\pm1.09)\times10^{4}$
8.80×10^{5}	$(5.93\pm1.67)\times10^{5}$	32.59 ± 19.00	$(2.87\pm1.67)\times10^{5}$	8.80×10^{5}	$(7.00\pm2.04)\times10^{5}$	20.47 ± 11.73	$(1.80\pm1.03)\times10^{5}$
8.80×10^{6}	$(7.65\pm2.22)\times10^{6}$	13.09 ± 5.78	$(1.15\pm0.51)\times10^{6}$	8.80×10^{6}	$(8.61\pm0.12)\times10^{6}$	2.21 ± 1.31	$(1.95\pm1.15)\times10^{5}$
8.80×10^{7}	$(5.58\pm1.09)\times10^{7}$	36.64 ± 12.35	$(3.22\pm1.09)\times10^{7}$	8.80×10^{7}	$(7.04\pm1.39)\times10^{7}$	19.98 ± 15.75	$(1.76\pm1.38)\times10^{7}$

1) 平均值 ±标准差 Mean ±SD;2) Ci:空白处理的病毒浓度 Concentration of virus in the control;3) Cl:土壤样品处理后的上清液病毒浓度 Concentrations of virus in the supernatant from treated soils;4) R:病毒被吸附的比例 Ratio of sorbed viruses;5) Cs:土壤对病毒的相对吸附量 Relative virus sorption capacity of soils

有关土壤中本身存在的微生物对病毒寿命的影响,不同科学家有不同的结论,Bagdasaryan 认为土壤是否灭菌对病毒存活没有明显影响[7];Hurst 等的研究表示土著微生物的存在不利于脊髓灰质炎病毒在壤质砂土上的存活,但当温度降低至 1 ℃时,在实验的 70 d 内没有发现病毒数量的变化[6];Ottosson 和 Stenström 进行的在介质分别为灭菌和不灭菌条件下的 5-周培养实验时发现,无论培养温度为 4 ℃还是 20 ℃,灭菌均增加 MS2 和 ΦX174 在介质中的衰竭速率[18]。根据 Hurst 及 Ottosson 和 Stenström 的研究结果,本研究在土壤灭菌条件下 MS2 的吸附比例的增加可能与 MS2 在灭菌土壤中的死亡率增加有关;但 ΦX174 在灭菌土壤中的吸附比例下降或不变的结果与 Ottosson 和 Stenström 的结果相矛盾。

为进一步阐述土壤中本身存在的微生物对病毒吸附行为影响的内在机理,笔者认为进一步的研究应该从以下几方面着手:(1)增加研究病毒的种类,以期更加广泛比较不同病毒种类间吸附行为的差别;(2)区分吸附病毒的生存状况,以了解病毒死亡对病毒吸附比例的贡献,同时评估被吸附病毒对二次污染环境的可能性;(3)明确土壤中是否存在某一特殊的微生物,其可能主要决定着不同病毒在不同土壤中的吸附行为差别,抑或土壤中的大部分微生物均有可能影响病毒的吸附行为。

3 小 结

不同性质土壤对不同病毒的吸附行为存在极大差别,红黏土对病毒的强大吸附能力表明,红黏土或与红黏土性质类似的材料在净化被病毒污染的水域

时可能是一比较理想的病毒吸附剂,其实际吸附性能可能会更好,因为自然条件下的病毒浓度往往在本研究病毒浓度范围的低浓度段,而红黏土对低浓度段病毒的吸附率几乎为 100 %;同时,红黏土地区地下水病毒污染的可能性比较小,而在其他地区通过土壤吸附来"自然净化"病毒的可能性则要小得多。土壤中本身存在的微生物可能会控制着某些病毒在土壤中的吸附行为,因而进一步研究其机理十分必要。

参 考 文 献

[1] US Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule, Proposed Rules. Federal Register 65: 30193-30274, USEPA, Washington DC, 2000

[2] Chattopadhyay S, Puls R W. Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil. Chemosphere, 2000, 41: 1 279～1 286

[3] 赵炳梓, 张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为. 土壤学报, 2006, 43(2): 306～313. Zhao B Z, Zhang J B. Transport of viruses in the soil: An overview (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(2): 306～313

[4] 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

[5] Rzeżutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. FEMS Microbio. Rev., 2004, 28: 441～453

[6] 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

[7] 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

[8] Strauss J H Jr, Sinsheimer R L. Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. J. Mol. Biol., 1963, 7: 43～54

[9] Jin Y, Chu Y, Li Y. Virus removal and transport in saturated and unsaturated sand columns. J. Contam. Hydrol., 2000, 43: 111～128

[10] 王秋英, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 噬菌体 MS2 和 ΦX174 的双层琼脂平板和液体培养基扩增方法的建立. 土壤, 2007, 39: 297～300. Wang Q Y, Zhao B Z, Zhang J B, *et al*. Propagation of bacteriophages MS2 and ΦX174 using double layer agar plate and liquid medium culture (In Chinese). Soils, 2007, 39: 297～300。

[11] Thompson S S, Flury M, Yates M V. Role of the Air-Water-Solid interface in bacteriophage sorption experiments. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 304～309

[12] 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

[13] 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

[14] Gerba C P, Goyal S M. Quantitative assessment of the adsorptive behavior of viruses to soils. Environ. Sci. Technol., 1981, 15: 940～944

[15] Burge W D, Enkiri N K. Adsorption kinetics of bacteriophage ΦX-174 on soil. J. Environ. Qual., 1978, 7: 536～542

[16] 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

[17] Ryan J N, Elimelech M. Colloid mobilization and transport in groundwater. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 1996, 107: 1～56

[18] Ottosson J, Stenström T A. Growth and reduction of microorganisms in sediments collected from a greywater treatment system. Letters Appl. Microbiol., 2003, 36: 168～172

VIRUS-ADSORBING BEHAVIOR OF SOIL AND ITS SIGNIFICANCE IN NATURAL DISINFECTION

Wang Qiuying[1,2]　Zhao Bingzi[1†]　Zhang Jiabao[1]　Wang Yiming[3]　Zhang Hui[1]
Chen Xiaomin[2]　Gong Jiandong[1,2]

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

(2 College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(3 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Virus-adsorbing behavior of soil, to a large extent, determines the risk of viruses polluting drinking water. Batch sorption experiments were carried out with bacteriophages MS2 and ΦX174 to compare 6 different soils with contrast properties in virus-adsorbing behavior, and to expound effect of the presence of indigenous microorganisms on the behavior. In general, soils were more adsorptive to ΦX174 than to MS2. Among the studied 6 soils, clayed red soil showed the greatest adsorption capacity,

while sandy Chao soil the lowest. Effect of the presence of indigenous microorganisms on soil virus-adsorbing behavior varied with soil and bacteriophage. Sterilization increased soil adsorption of MS2 in all the soil samples, except in clayed red soil, whereas it did not affected their adsorption of ΦX174 except in clayed red soil, where adsorption of ΦX174 decreased significantly, which suggests that clayed red soil or materials with similar properties may be used as an ideal virus sorbent to purify virus-contaminated water. In areas dominated with sandy Chao soil, the possibility of "natural disinfection" through soil adsorption is rather limited. In soils may exit some microorganisms and some special groups of microorganisms that may control the process of virus adsorption by soils. It is, therefore, essential to further study mechanisms involved in this process.

Key words Virus; Adsorption; Soils