

不同提取方法对土壤中病毒回收率的比较*

张 辉^{1,2} 赵炳梓^{1†} 张佳宝¹

(1 中国科学院南京土壤研究所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,南京 210008)

(2 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘 要 以 MS2 和 ϕ X174 作为指示病毒,系统比较了 4 种不同提取方法对 4 种不同性质土壤中的病毒回收率。最终选择含有 0.04 mol L^{-1} 焦磷酸钠的 3% 牛肉浸膏 (pH 9.4) 作为最有效提取剂;提取剂与含有病毒的土壤充分混合后,离心前调节 pH 7.2 ~ 7.4,然后测上清液病毒含量为最优操作步骤。该提取方法在红壤土、红黏土、潮土上的回收率达到 62.9% ~ 97.7%,但在黄泥土上的回收率为 30% 左右,这可能与黄泥土较高的无定形 Fe、Al 氧化物含量有关。病毒类型对回收率结果没有显著影响。因此,该方法为研究病毒在我国大部分土壤上的去向和行为提供了平台。

关键词 MS2; ϕ X174; 回收率; 土壤

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A

环境中特别是地下水中致病微生物的污染问题已经引起各国政府和科学家的高度关注^[1~3],其中病毒对环境的潜在污染问题更加引人注目^[4,5]。一般认为,土壤具有“自然净化”能力,即当病毒通过作为饮用水源的地下水上部包气带时能够通过吸附(可逆或不可逆)病毒和致死病毒达到清除病毒的目的。大量的一次平衡法实验往往采用差减法来计算土壤对病毒的吸附量,但不能区分其中的致死量^[6,7],这将妨碍正确评估病毒的潜在污染能力;同时,研究土壤中病毒随时间的消长规律也需要及时掌握土壤中活病毒的数量变化^[8,9]。因此,建立一套价格适宜、普通实验室均可操作并且快速、简单、结果重现性良好的从土壤中提取病毒的方法对进一步研究病毒在土壤中的行为和去向非常必要。

目前对病毒提取的报告大多集中于从污水污泥中对病毒的提取,从土壤环境中提取病毒的研究还不多见。各种方法主要涉及提取剂及其 pH 的不同、以及检测方法的不同等,其提取结果也各不相同。而这些方法^[8,10,11]中很多步骤繁琐、复杂,测定过程中很容易造成交叉污染。但到目前为止,尚未有报道系统比较不同方法或不同试剂

在不同土壤上的回收率,我国在这方面的报道几乎为空白。

因此,本研究的主要目的是在国外已有的相关研究基础上^[12],以我国四种典型的质地和性质截然不同的土壤,即壤质红壤(红壤土)、黏质红壤(红黏土)、黏壤质黄泥土(黄泥土)、砂质潮土(潮土)为研究对象,以噬菌体 MS2 和 ϕ X174 为指示病毒,系统比较不同提取剂或同一提取剂不同 pH 调节后在不同土壤中的病毒回收率,以筛选出操作简便、适宜性广泛(即可在不同土壤上使用)、重现性良好、在国内普通实验室均可进行的提取方法。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

红壤土、红黏土、黄泥土、潮土分别采自江西鹰潭红色砂岩上发育的红壤、江西鹰潭第四纪红色黏土上发育的红壤、江苏常熟高平原黄土性母质上发育的水稻土、河南封丘黄泛母质上发育的潮土。所有土样均采自表层 0 ~ 15 cm。土样风干、过 1 mm 筛。其基本理化性质见表 1。

* 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: bzhaob@issas.ac.cn

作者简介: 张 辉(1983~),女,博士研究生,主要从事土壤中病毒行为研究。E-mail: hzhang@issas.ac.cn

收稿日期:2007-01-05;收到修改稿日期:2007-04-03

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soil samples

土壤 Soil	采集地点 Sampling site	pH ¹⁾	有机质 OM (g kg ⁻¹)	CEC (mmol kg ⁻¹)	砂粒 粉粒 黏粒			游离	游离	无定型	无定型
					Sand	Silt	Clay	Fe ₂ O ₃ Free Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ Free Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ Amorphous Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ Amorphous Al ₂ O ₃
					————— (%) —————			————— (g kg ⁻¹) —————			
红壤土 Red earth soil	江西鹰潭 Yingtán, Jiangxi	5.13	2.84	33.35	39.80	50.37	9.83	11.67	4.96	0.56	1.17
红黏土 Red clay soil	江西鹰潭 Yingtán, Jiangxi	4.30	4.32	99.62	35.62	25.45	38.93	28.94	7.63	1.33	2.64
黄泥土 Huangni soil	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	6.96	25.30	147.4	34.91	47.44	17.66	15.34	2.74	5.51	1.71
潮土 Fluvo-aquic soil	河南封丘 Fengqiu, Henan	8.05	4.43	44.02	92.45	2.18	5.37	8.25	1.44	0.47	0.35

1) 土水比 1:1 Soil:water = 1:1

1.2 病毒样品及其培养基

供试指示病毒 MS2 (编号 ATCC 15597B1) 和 ϕ X174 (编号 ATCC 13706B1) 及其宿主细菌 *E. coli* (编号分别为 ATCC 15597 和 ATCC 13706) 均购自美国的 American Type Culture Collection (ATCC)。噬菌体 MS2 和 ϕ X174 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^[13,14]。MS2 为二十面体单链 RNA 噬菌体 (ss-RNA),其直径约 26 nm^[15],等电点 pI 为 3.9⁽¹⁾,在一般自然环境的 pH 条件下,MS2 的表面带负电荷; ϕ X174 为二十面体单链 DNA 噬菌体 (ss-DNA),其直径约 23 nm,等电点 pI 为 6.6,其静电和疏水作用能力很低,在中性条件下几乎不带电荷^[16]。

噬菌体 MS2 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597) 的培养基成分为:酵母膏 (LP0021,OXOID) 1.0 g, NaCl 8.0 g,胰蛋白胨 (LP0042,OXOID) 10.0 g,琼脂粉 13.5 g,蒸馏水 1000 ml。

噬菌体 ϕ X174 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC 13706) 的培养基成分为:牛肉膏 (LP0029,OXOID) 3.0 g, NaCl 5.0 g,胰蛋白胨 5.0 g,琼脂粉 13.5 g,蒸馏水 1000 ml。

如果需要配制半固体或液体培养基,则琼脂含量降为 5.0 g 或 0 g。

1.3 病毒样品大量扩增

噬菌体 ϕ X174 和 MS2 的大量扩增^[13]采用“高复

数感染”方法,主要步骤为(以 ϕ X174 为例,MS2 在培养时间上略有差别):(1)将宿主细菌单菌落接种到装有 10 ml 液体培养基的试管内,水浴恒温震荡 (37 °C, 150 r min⁻¹) 过夜培养;(2)在容量为 500 ml 的烧瓶中加入 300 ml 预热至 37 °C 的液体培养基,然后在烧瓶中加入步骤 (1) 培养的细菌溶液,水浴恒温震荡 (37 °C, 200 r min⁻¹) 培养 150 min;(3)在步骤 (2) 培养结束后的烧瓶中接种 5 ml 10⁸ pfu ml⁻¹ 噬菌体 ϕ X174 母液,水浴恒温震荡 (37 °C, 200 r min⁻¹) 培养 90 min 至培养物变清澈;(4)在烧瓶中加入 10 ml 氯仿,水浴恒温震荡 (37 °C, 200 r min⁻¹) 培养 10 min;(5)将培养物转移至高速离心管中,4 °C 条件下 10,000 r min⁻¹ (即 12096 \times g) 离心 30 min。所得噬菌体溶液在 4 °C 条件下保存待用。

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 Na₂HPO₄, 0.10 mol L⁻¹ NaCl, 0.003 mol L⁻¹ KCl, pH 7.5) 配制。

1.4 病毒提取方法

1.4.1 病毒接种

准确称取 4.00 g 土壤于具塞玻璃三角瓶中,加入 4 ml 浓度约 10⁶ ~ 10⁷ pfu ml⁻¹ 的病毒溶液,用旋涡混合仪 (WH3, 上海) 剧烈旋涡混合约 2 min 使其混匀,静置 30 min,空白处理在三角瓶中只加 4 ml 病毒溶液。所有实验 3 次重复。

(1) Zerda K.S. Adsorption of viruses to charge-modified silica. PhD diss. Baylor College of Medicine, Houston, 1982

1.4.2 病毒提取方法 本研究选择 4 种不同的提取方法比较它们在不同土壤上的回收率,方法 1 和方法 2、方法 3、方法 4 的提取剂不同;方法 2、方法 3、方法 4 采用相同的提取剂,但在离心前调节不同的 pH,具体描述如下:

方法 1:此方法建立于经污水污泥处理的土壤中提取病毒的试验^[12]。根据本文 1.4.1 节所述准备好的土壤噬菌体混合液中加入 72 ml (1:10) 提取剂 (pH9.4),其中含有:3%牛肉浸膏、0.05 mol L⁻¹磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)、5 mmol L⁻¹柠檬酸 (C₆H₈O₇),在振荡培养箱 (HZ-9310K,中国太仓)中恒温 (4℃)、恒速 (300 r min⁻¹) 连续旋转振荡 30 min,然后轻轻将其混合液转移至高速离心管中,调节 pH 至 9.4,4℃条件下以 10,000 r min⁻¹ (即 12 096 ×g) 高速离心机 (Avanti J-30I, BECKMAN COULTER, USA) 离心 30 min,上清液调节 pH7.2~7.4,双层平板法测定上清液噬菌体浓度。

方法 2、方法 3、方法 4:三种方法均是方法 1 经过改进而得到的,即在提取剂中加入焦磷酸钠 (Na₄P₂O₇),不加磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄) 和柠檬酸 (C₆H₈O₇)。焦磷酸钠是一种非常有效的分散剂,已被广泛用于土壤质地分析^[17]。根据本文 1.4.1 节所述准备好的土壤-噬菌体混合液中加入 72 ml (1:10) 提取剂 (pH9.4),其中含有:3%牛肉浸膏和 0.04 mol L⁻¹焦磷酸钠 (Na₄P₂O₇),在振荡培养箱中恒温 (4℃)、恒速 (300 r min⁻¹) 连续旋转振荡 30 min,然后轻轻将混合液转移至高速离心管中,分别调节 pH9.4 (方法 2)、pH7.2~7.4 (方法 3) 和 pH4.5 (方法 4),4℃条件下以 10,000 r min⁻¹ (即 12 096 ×g) 离心 30 min,上清液调节 pH7.2~7.4,双层平板法测定上清液噬菌体浓度。

1.5 噬菌体检测方法

噬菌体的定量检测^[13]采用双层平板法,其主要步骤为:(1)取新鲜的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 (要事先使其温度保持在 45℃,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,将平板倒置于 37℃智能光照培养箱 (GZP-250A,中国南京)中培养 8~12 h (MS2) 或 5h (ϕ X174);(4)选择可数噬菌斑数在 10~300 之间的平板进行计数,结果用噬菌斑形成单位 (plaque forming unit,

pfu) 表示。

同一方法在不同土壤间或同一土壤不同方法间的回收率结果显著性差异采用 SPSS 12.0 进行检验。

2 结果与讨论

2.1 提取方法对病毒从纯溶液中回收率的影响

无论是 MS2 还是 ϕ X174,各提取方法对它们从纯溶液中 (即不加土壤的空白溶液中) 提取的回收率顺序均为:方法 1 > 方法 2 > 方法 3 > 方法 4 (表 2)。进一步的方差分析结果表明:对 MS2 来说,所有方法之间的回收率结果差异均不显著;而对 ϕ X174 来说,方法 3 和方法 4 之间差异不显著,但它们均极显著低于方法 1 和方法 2,并且方法 1 又极显著高于方法 2。上述结果表明,提取剂本身及提取剂和病毒的混合悬液在离心前的不同 pH 调节对 MS2 的最后回收率不敏感,但它们显著影响 ϕ X174 的最后回收率。方法 1 对 ϕ X174 的回收率显著高于 100%,分析其原因,焦磷酸钠是很好的分散剂,对病毒的分散起到了一定的效果,提高了病毒测定的准确度,消除了实验结果偏高的现象;方法 4 结果显著低于 100%;而方法 2 和方法 3 结果与 100% 之间的差异不显著,因此,单从回收率来看,方法 2 或方法 3 是四种方法中的较佳选择。

提取剂 pH 值是影响回收率的重要因素之一^[10,18]。因为病毒是由蛋白质外壳包裹的核酸组成的“非细胞生物”,所以其行为特征与蛋白质相似。而蛋白质是一种两性电解质,能和酸或碱发生作用,发生解离、沉淀等行为。当改变环境 pH 达到蛋白质的等电点使质点失去携带相同净电荷,那么蛋白质分子就会凝集成大的质点而沉淀。尽管本实验中方法 2、方法 3、方法 4 之间的 pH 差异发生在提取过程完成后 (即混合物离心前) 进行,但该阶段的 pH 值依然显著影响最后病毒的回收率。其总体趋势是随着 pH 值的降低,回收率随之下降,这与前人得出的结论相一致,即病毒回收率随提取剂 pH 的升高有增加的趋势。但当 pH 超过 11.5,则可能对病毒有致死作用^[10]。

相同方法提取不同病毒时,其最后回收率亦有差别 (表 2)。进一步的方差分析表示,方法 1 对 ϕ X174 的回收率显著高于对 MS2 的回收率,但方法 2、方法 3、方法 4 对提取 MS2 和 ϕ X174 之间的差别不显著。因此,综合考虑回收率和提取方法的广谱

性,在本实验条件下,方法 2 或方法 3 为溶液中提取病毒的最佳选择。

Thompson 等^[19]认为由于气-水界面的存在,用聚丙烯材料制成的离心管作为容器进行一次平衡法实验时,对 MS2 有很高的致死率(甚至达到 99.9%),而对 ϕ X174 的影响很小;但当用玻璃管时,容器对 MS2 和 ϕ X174 的影响均很小。尽管实验中

离心用的是塑料离心管,但方法 2 或方法 3 对 MS2 和 ϕ X174 的回收率没有显著影响,这是因为实验在振荡阶段用的是玻璃容器,而只有在离心前将混合物转移至塑料离心管。该结果同时也表明在一次平衡法实验时,只要在振荡阶段用玻璃容器进行,就可消除空白实验时容器对病毒的致死影响。

表 2 噬菌体 MS2 和 ϕ X174 空白处理的回收率

Table 2 Recovery efficiency of bacteriophage MS2 and ϕ X174 from the CK samples

	MS2			ϕ X174(ml ⁻¹)		
	C ₀ ¹⁾ (pfu ml ⁻¹)	C ₁ ²⁾ (pfu ml ⁻¹)	回收率 ³⁾ Recovery efficiency (%)	C ₀ (pfu ml ⁻¹)	C ₁ (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)
方法 1 Method 1	5.13 ×10 ⁷	4.63 ×10 ⁷	90.13 ±16.00	8.20 ×10 ⁶	2.09 ×10 ⁷	252.2 ±37.0
方法 2 Method 2	5.13 ×10 ⁷	4.25 ×10 ⁷	82.72 ±0.05	8.20 ×10 ⁶	1.14 ×10 ⁷	138.6 ±40.0
方法 3 Method 3	5.13 ×10 ⁷	4.03 ×10 ⁷	78.53 ±5.69	8.20 ×10 ⁶	4.47 ×10 ⁶	54.45 ±19.00
方法 4 Method 4	5.13 ×10 ⁷	3.03 ×10 ⁷	58.97 ±11.68	8.20 ×10 ⁶	2.12 ×10 ⁶	25.87 ±1.20

1) C₀: 加入病毒的初始浓度 Initial concentration of virus; 2) C₁: 提取出的病毒浓度 Extracted concentration of virus; 3) 回收率 = C₁/C₀ Recovery efficiency = C₁/C₀

2.2 提取方法对病毒从土壤中回收率的影响

实验选择的 4 种提取方法在 4 种不同性质土壤上提取病毒的平均回收率范围为 9.65% ~ 141.2% (表 3,表 4)。方法 4 从本实验所研究的 4 种土壤上提取病毒的效率均是最低的,同时,方法 1 从红黏土上提取 MS2 和从潮土上提取 ϕ X174 均出现极显著高于 100% 的情况,上述趋势均与从纯溶液中提取病毒的实验结果相一致。因此,在本实验条件下,方法 4 和方法 1 可能是本实验所比较的 4 种方法中最不理想的提取方法,这也与从纯溶液中提取病毒的结论相一致。

比较方法 2、方法 3、方法 4 之间的回收率,随着离心前提取剂 pH 从碱性调节到中性再到酸性,病毒从 4 种土壤上的回收率均有降低趋势,但从中性调节到酸性的下降趋势更为显著,尤其在 ϕ X174 上的表现更为明显。也就是说,提取剂 pH 变化对提取 ϕ X174 更为敏感。Hurst 和 Gerba^[10]的报道也曾指出从不同土壤上提取不同病毒时,提取剂适宜 pH 也是不同的。病毒回收率随提取剂 pH 降低而下降的现象可能与低 pH 导致病毒集中于底部沉淀物中有关。Katzenelson 等^[18]采用二步沉淀法测定自来水

中脊髓灰质炎病毒含量时发现,当 pH 降低至 3.5 或 4.0 时,几乎所有的溶液中病毒均沉积在底部;而当降低至 4.5 时,大约有 1/3 的病毒沉淀在底部。

方法 2 和方法 3 的结果之间并没有显著的差异 ($p=0.990$),而且回收率可达到 26.34% ~ 99.07% 范围之内,所以可选择方法 2 和方法 3 作为供试土壤的适宜提取方法。由于噬菌体的测定需要将离心后的上清液调节到 pH = 7.2 ~ 7.4,对高浓度测定时,可以用 PBS 直接稀释以达到适宜浓度进行测定,但是对低浓度的噬菌体进行测定时则需要加 HCl 或 NaOH 进行调节后测定,这步操作有可能会造成杂菌污染。所以方法 3 可以作为更加合理的提取方法。此方法避免了离心后的杂菌污染。

2.3 影响病毒回收率的土壤性质和病毒性质

土壤性质显著影响病毒的回收率,比较同一方法从不同土壤上提取病毒的效率发现,无论是 MS2 还是 ϕ X174,从黄泥土上的回收率均显著低于在其他三种土壤上的回收率(表 3,表 4)。研究的 4 种方法对 MS2 从红壤土、红黏土、黄泥土、潮土上的平均回收率分别为 65.42%、93.42%、25.25%、93.08%;而对 ϕ X174 的平均回收率分别为 74.75%、61.00%、27.00%、85.75%。

表 3 四种土壤中噬菌体 MS2 的回收率

Table 3 Recovery efficiency of bacteriophage MS2 from the four soils

	红壤土 Red earth soil			红黏土 Red clay soil		
	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 ³⁾ Recovery efficiency (%)	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)
方法 1 Method 1	5.13 ×10 ⁷	3.72 ×10 ⁷	72.38 ±2.5	4.80 ×10 ⁷	6.78 ×10 ⁷	141.18 ±42.9
方法 2 Method 2	5.13 ×10 ⁷	3.27 ×10 ⁷	63.74 ±0.6	4.80 ×10 ⁷	3.84 ×10 ⁷	79.96 ±17.7
方法 3 Method 3	5.13 ×10 ⁷	3.31 ×10 ⁷	64.57 ±2.1	4.80 ×10 ⁷	4.48 ×10 ⁷	93.35 ±21.4
方法 4 Method 4	5.13 ×10 ⁷	3.12 ×10 ⁷	60.87 ±3.1	4.80 ×10 ⁷	2.84 ×10 ⁷	59.18 ±6.2
	黄泥土 Huangni soil			潮土 Fluvo-aquic soil		
	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)
方法 1 Method 1	4.80 ×10 ⁷	1.06 ×10 ⁷	22.03 ±4.2	4.67 ×10 ⁷	4.81 ×10 ⁷	103.14 ±13.9
方法 2 Method 2	4.80 ×10 ⁷	1.46 ×10 ⁷	30.41 ±5.7	4.67 ×10 ⁷	4.62 ×10 ⁷	99.07 ±5.9
方法 3 Method 3	4.80 ×10 ⁷	1.39 ×10 ⁷	28.90 ±9.7	4.67 ×10 ⁷	4.56 ×10 ⁷	97.71 ±28.3
方法 4 Method 4	4.80 ×10 ⁷	9.06 ×10 ⁶	18.87 ±5.5	4.67 ×10 ⁷	3.38 ×10 ⁷	72.38 ±9.4

1) C_0 : 加入病毒的初始浓度 Initial concentration of virus; 2) C_1 : 提取出的病毒浓度 Extracted concentration of virus; 3) 回收率 = C_1/C_0 Recovery efficiency = C_1/C_0

一般来说,病毒的回收率随着土壤黏粒含量的增加而降低^[10]。尽管黄泥土的黏粒含量低于红黏土,但黄泥土上 MS2 和 ϕ X174 的回收率均显著低于土壤其他三种,这可能与黄泥土较高的无定形 Fe、Al 氧化物含量有关。Zhuang 和 Jin^[20]利用砂性土柱的研究结果表明,当砂粒用 Al-氧化物包裹后,其上病毒的死亡率显著增加。Gerba^[21]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。Ryan 和 Elimelech^[22]的研究也指出,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。You 等^[23]的进一步研究表明,其中无定形 Fe、Al 氧化物对致死病毒起着最为重要的作用。而在本实验中只有活病毒才能提取。

潮土上相对较高的回收率可能与其较高的土壤 pH 有关。当 pH 大于 pI 时,病毒和矿物颗粒表面均带负电荷,病毒不易被吸附^[24]。Ryan 等^[25]的田间

实验也表明,随着 pH 的升高,噬菌体 PRD1 的解吸量随之增加。本研究中,潮土的 pH(8.05)高于 MS2 和 ϕ X174 的 pI 分别为 3.9 和 6.6,而红黏土和红壤土的 pH 分别为 5.13 和 4.30,其尽管高于 MS2 的 pI,但低于 ϕ X174 的 pI。因此,pH 高的土壤有利于病毒的解离,相应地也就容易提取。

MS2 和 ϕ X174 分别采用 4 种提取方法在 4 种不同土壤上的平均回收率分别为 69.29%、60.97%,因此,总体看来,土壤对 MS2 的回收率较 ϕ X174 高,但差异没有达到显著水平。这可能与 MS2 和 ϕ X174 的不同吸附能力有关。王秋英等^[26]和 Thompson 等^[19]的研究结果均表示土壤对 MS2 的吸附能力较 ϕ X174 弱。病毒和土壤颗粒之间的相互作用主要发生在蛋白质外壳和土壤颗粒之间,而蛋白质外壳的电荷类型显著影响着病毒的吸附行为。Dowd 等^[24]的研究发现,病毒等电点 pI 是控制直径较小病毒被吸附的主要因素,如果土壤的 pH 小于某种病毒的 pI,大部分病毒和土壤颗粒表面带有相反电荷而容

易被吸附;反之,当 pH 大于 pI 时,病毒和矿物颗粒表面均带负电荷,病毒则不易被吸附。供试土壤的 pH 在 4.3 和 8.1 之间(表 1),而 MS2 的 pI 低于

ϕ X174,因而 MS2 较 ϕ X174 带更多的负电荷,因而可能更不容易被带负电荷的土壤所吸附。

表 4 四种土壤中噬菌体 ϕ X174 的回收率

Table 4 Recovery efficiency of bacteriophage ϕ X174 from the four soils

	红壤土 Red earth soil			红黏土 Red clay soil		
	$C_0^{1)}$ (pfu ml ⁻¹)	$C_1^{2)}$ (pfu ml ⁻¹)	回收率 ³⁾ Recovery efficiency (%)	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)
方法 1 Method 1	3.70 ×10 ⁶	3.52 ×10 ⁶	95.00 ±2.1	1.300 ×10 ⁶	1.07 ×10 ⁶	82.58 ±2.4
方法 2 Method 2	3.70 ×10 ⁶	3.56 ×10 ⁶	96.23 ±1.0	1.300 ×10 ⁶	1.12 ×10 ⁶	86.23 ±21.0
方法 3 Method 3	3.70 ×10 ⁶	3.36 ×10 ⁶	90.72 ±15.7	1.593 ×10 ⁶	1.06 ×10 ⁶	66.58 ±19.4
方法 4 Method 4	3.70 ×10 ⁶	9.98 ×10 ⁵	26.96 ±9.4	1.300 ×10 ⁶	2.03 ×10 ⁵	15.59 ±10.0
	黄泥土 Huangni soil			潮土 Fluvo-aquic soil		
	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)	C_0 (pfu ml ⁻¹)	C_1 (pfu ml ⁻¹)	回收率 Recovery efficiency (%)
方法 1 Method 1	3.150 ×10 ⁷	1.21 ×10 ⁷	38.40 ±12.7	1.30 ×10 ⁶	1.60 ×10 ⁶	122.77 ±29.8
方法 2 Method 2	3.150 ×10 ⁷	8.30 ×10 ⁶	26.34 ±8.7	1.30 ×10 ⁶	8.61 ×10 ⁵	66.26 ±18.8
方法 3 Method 3	3.150 ×10 ⁷	1.06 ×10 ⁷	33.48 ±16.4	1.30 ×10 ⁶	8.17 ×10 ⁵	62.85 ±18.4
方法 4 Method 4	3.150 ×10 ⁷	3.04 ×10 ⁶	9.65 ±1.0	1.30 ×10 ⁶	5.80 ×10 ⁵	44.58 ±20.0

1) C_0 : 加入病毒的初始浓度 Initial concentration of virus; 2) C_1 : 提取出的病毒浓度 Extracted concentration of virus; 3) 回收率 = C_1/C_0 Recovery efficiency = C_1/C_0

3 结 论

本研究最终确立的从供试土壤中提取病毒的最适宜方法为:3%的牛肉浸膏 + 0.04 mol L⁻¹ 焦磷酸钠(Na₄P₂O₇) (pH9.4) 作为提取剂,加入到含有病毒的土壤悬浮液中,振荡后,调节 pH 7.2 ~ 7.4,离心取上清液测定。此方法操作简单,重现性好。在黏粒含量低、有机质含量低且铁铝氧化物含量低的土壤中有很好的适用性,如在黄淮海冲积平原地区的潮土上提取 MS2 和 ϕ X174 回收率分别为 97% 和 63%;在黏粒含量较高的南方红壤土和红黏土上也有很好的适用性,回收率在红壤土和红黏土上也分别达到 65% ~ 93% (MS2) 和 67% ~ 91% (ϕ X174);但是对无定形 Fe、Al 氧化物含量较高的黄泥土则有一

定的限制性,在该土壤上病毒的回收率只有 30% 左右,因而如果需要研究病毒在黄泥土上的去向和行为了,需要进一步研究提高病毒在其上的回收率。

参 考 文 献

- [1] USEPA. On-site Wastewater Treatment Systems Manual. Washington DC: United States Environmental Protection Agency, 2002
- [2] Charles K, Ashbolt N, Roser D, et al. Australasian standards for on-site sewage management: implications for nutrient and pathogen pollution in the Sydney drinking water catchments. Water Journal Australian Water Association (Aust.), 2001, 28: 58 ~ 64
- [3] Ryan J N, Harvey R W, Metge D, et al. Field and laboratory investigations of inactivation of viruses (PRD1 and MS2) attached to iron oxide-coated quartz sand. Environ. Sci. Technol., 2002, 36: 2403 ~ 2413
- [4] Macler B A, Merkle J C. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. Hydrogeol., 2000, 8: 2 ~ 40

- [5] Quanrud D M, Carroll S M, Gerba C P, *et al.* Virus removal during simulated soil-aquifer treatment. *Water Res.*, 2003, 37: 753 ~ 762
- [6] Moore R S, Taylor D H, Sturman L S, *et al.* Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1981, 42: 963 ~ 975
- [7] Moore R S, Taylor D H, Reddy M M M, *et al.* Adsorption of reovirus by minerals and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44: 852 ~ 859
- [8] Davies C M, Logan M R, Rothwell V J, *et al.* Soil inactivation of DNA viruses in septic seepage. *Appl. Microbiol.*, 2006, 100: 365 ~ 374
- [9] Hurst C J, Gerba C P, Cech I. Effect of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, 40: 1 067 ~ 1 079
- [10] Hurst C J, Gerba C P. Development of a quantitative method for the detection of enteroviruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 37: 626 ~ 632
- [11] Landry E F, Vaughn J M, Thomas M Z, *et al.* Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 36: 544 ~ 548
- [12] Straub M S, Pepper I L, Abbaszadegan M, *et al.* A method to enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 1 014 ~ 1 017
- [13] 王秋英, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 噬菌体 MS2 和 ϕ X174 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 ϕ X174 using double layer agar plate and liquid medium culture (In Chinese). *Soils*, 2007, 39: 297 ~ 300
- [14] 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 (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(2): 306 ~ 313
- [15] Strauss J H, Sinsheimer R L. Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. *Mol. Biol.*, 1963, 7: 43 ~ 54
- [16] Jin Y, Chu Y J, Li Y S. Virus removal and transport in saturated and unsaturated sand columns. *Contam. Hydrol.*, 2000, 43: 111 ~ 128
- [17] Sheldrick B H, Wang C. Particle size distribution. In: Martin R C, eds. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science. London, Lewis Publishers, 1993
- [18] Katzenelson E, Fattal B, Hostovsky T. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 32: 638 ~ 639
- [19] Thompson S S, Flury M, Yates M V, *et al.* Role of the air-water-solid interface in bacteriophage sorption experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 304 ~ 309
- [20] Zhuang J, Jin Y. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: Effects of ionic strength and composition. *Contam. Hydrol.*, 2003, 60: 193 ~ 209
- [21] Gerba C P. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1984, 30: 133 ~ 168
- [22] Ryan J N, Elimelech M. Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 1996, 107: 1 ~ 56
- [23] You Y W, Han J, Chiu P C, *et al.* Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39: 9 263 ~ 9 269
- [24] 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
- [25] 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
- [26] 王秋英, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 土壤对病毒的吸附行为及其在环境净化中的作用. *土壤学报*, 2007, 44: 808 ~ 816. Wang Q Y, Zhao B Z, Zhang J B, *et al.* Virus-adsorbing behavior of soil and its significance in natural disinfection (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44: 808 ~ 816

SOIL VIRUS RECOVERY EFFICIENCY OF VARIOUS METHODS

Zhang Hui^{1,2} Zhao Bingzi^{1†} Zhang Jiabao¹

(1 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)

(2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Comparison was conducted between four different virus extraction methods in recovery efficiency of bacteriophage MS2 and ϕ X174. The method of 3 % beef extract plus 0.04M sodium pyrophosphate (pH = 9.4) was the most effective one, with virus recovery efficiency ranging from 62.9 % to 97.7 % for red earth, red clay and fluvo-aquic soil. But the recovery efficiency reached only about 30 %, which might be attributed to its high content of amorphous iron oxide and amorphous aluminium oxide. It was also found that type of viruses had little effect on the recovery efficiency. The findings could be cited as a platform for the research on fate and behavior of virus in most soils in our country.

Key words MS2; ϕ X174; Recovery efficiency; Soil