

王丰, 刘灵芝, 刘蕊, 郭冰清, 孟奥, 陈美慧, 安婷婷, 汪景宽. 农田土壤病毒荧光显微计数法优化[J]. 土壤学报, 2026,  
WANG Feng, LIU Lingzhi, LIU Rui, GUO Bingqing, MENG Ao, CHEN Meihui, AN Tingting, WANG Jingkuan. Optimization of Virus  
Enumeration in Epifluorescence Microscopy for Farmland Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2026,

## 农田土壤病毒荧光显微计数法优化\*

王丰, 刘灵芝<sup>†</sup>, 刘蕊, 郭冰清, 孟奥, 陈美慧, 安婷婷, 汪景宽

(沈阳农业大学土地与环境学院, 土肥资源高效利用国家工程实验室/农业农村部东北耕地保育重点实验室, 沈阳 110866)

**摘要:** 病毒在土壤微生物群落结构及宿主动态调控中发挥重要作用。受土壤环境复杂性影响, 土壤病毒的有效提取和计数仍然面临诸多挑战。本研究通过病毒提取和显微观察条件优化, 提高土壤病毒荧光显微检测的效率。选取沈阳农业大学棕壤长期定位施肥实验站土壤, 评估三种关键因素对土壤病毒提取效率及荧光显微计数结果的影响: (1) 防荧光淬灭方法 (防淬灭剂 Fluoromount-G<sup>TM</sup> 和实验室制备防褪色剂); (2) 破碎方式 (手持搅拌棒、涡旋混合器、超声波细胞粉碎机、水浴摇床); (3) 土壤与提取液比例 (30:100 和 50:100; w: v)。采用 SYBR Green I 核酸染料对病毒颗粒进行染色, 并利用荧光显微镜观察和计数。将所得优化方案应用于棕壤、黑土与草甸土, 以验证其普遍性。结果表明: 在荧光显微镜检测过程中, 不使用任何防荧光淬灭剂 (防褪色剂或防淬灭剂) 时病毒颗粒在 100×物镜下难以观察, 而使用防淬灭剂 (Fluoromount-G<sup>TM</sup>) 后, 病毒计数提升至  $3.75 \times 10^8$  virus-like particles (VLPs) ·g<sup>-1</sup>, 显著优于使用防褪色剂。此外, 破碎方式显著影响病毒提取效率 ( $P < 0.05$ ), 其中手持搅拌棒 (650 W, 50 Hz) 处理 3 min 的提取效率最高, 显著优于涡旋混合器和水浴摇床, 而使用超声波细胞粉碎机未能检测到病毒颗粒。土液比的增加显著提升病毒提取效率 ( $P < 0.05$ ), 土液比为 50:100 (w:v) 时的病毒数量较 30:100 (w:v) 时提高了 1227.10%。三种类型土壤验证结果显示, 优化方法在供试土壤中均能获得稳定、可靠的病毒计数结果, 且不同类型土壤间病毒丰度差异显著。综上所述, 本研究通过优化破碎方式、土液比及防淬灭剂选择, 建立了一种高效、稳定且适用性较广的土壤病毒荧光显微计数方法, 可有效提高土壤病毒的提取效率和荧光显微镜计数效果, 为土壤病毒生态学研究提供技术支持。

**关键词:** 土壤病毒; 病毒提取与计数; 防荧光淬灭剂; 荧光显微镜; 破碎方式; 土液比

中图分类号: S154.3

文献标志码: A

### Optimization of Virus Enumeration in Epifluorescence Microscopy for Farmland Soil

WANG Feng, LIU Lingzhi<sup>†</sup>, LIU Rui, GUO Bingqing, MENG Ao, CHEN Meihui, AN Tingting, WANG Jingkuan  
(National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources / Key Laboratory of Arable Land Conservation in  
Northeast China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang  
110866, China)

**Abstract:** 【Objective】 Viruses play a crucial role in regulating soil microbial community and host dynamics. However, the efficient extraction and enumeration of soil viruses remain challenging due to the complexity of soil environments. This study aimed to enhance the efficiency of soil virus detection by optimizing both the viral extraction protocol and epifluorescence microscopy observation conditions. 【Method】 Soil samples were collected from the long-term brown soil fertilization

\*国家重点研发计划项目 (2024YFD1501302) 和辽宁省高等学校基本科研课题项目 (LJKMZ20220995) 资助 Supported by the National Key R & D Program of China (No. 2024YFD1501302) and the Basic Scientific Research Project of the University in Liaoning Province, China (No. LJKMZ20220995)

<sup>†</sup>通讯作者 Corresponding author, E-mail: liulingzhi2006@syau.edu.cn

作者简介: 王丰 (1994—), 女, 辽宁抚顺人, 博士, 主要研究方向为土壤微生物学。E-mail: wfeng9412@126.com

收稿日期: 2025-08-31; 收到修改稿日期: 2026-01-12; 网络首发日期 (www.cnki.net):

experimental station at Shenyang Agricultural University. Three key factors affecting soil virus extraction efficiency and enumeration results were evaluated: (1) antifade agents (the commercial anti-quenching agent Fluoromount-G™ and a laboratory-prepared antifade agent); (2) disruption methods (blender, vortex mixer, ultrasonic cell disruptor, and water bath shaker); and (3) soil-to-liquid ratios (30:100 and 50:100; mass: volume). Viral particles were stained using SYBR Green I and enumerated under an epifluorescence microscope. The optimized protocol was subsequently applied to brown soil, black soil, and meadow soil to validate its general applicability. 【Result】 Without an antifade agent (Fluoromount-G™ or laboratory-prepared antifade agent), viral particles were difficult to observe under the 100× objective. The application of Fluoromount-G™ significantly increased virus counts to  $3.75 \times 10^8$  virus-like particles (VLPs)·g<sup>-1</sup>, outperforming the laboratory-prepared antifade agent. The disruption method significantly affected virus extraction efficiency ( $P < 0.05$ ). The blender (650 W, 50 Hz) treatment for 3 minutes achieved the highest extraction efficiency, significantly surpassing the vortex mixer and water bath shaker, whereas no viral particles were observed with the ultrasonic cell disruptor treatment. In addition, increasing the soil-to-liquid ratio also significantly enhanced virus extraction efficiency ( $P < 0.05$ ), with the 50:100 ratio resulting in a 1227.10% increase in virus counts compared to the 30:100 ratio. The validation results demonstrated that the optimized method consistently yielded stable and reliable viral counts across all three soil types, with significant differences in viral abundance observed among them, confirming its broad applicability. 【Conclusion】 In summary, this study established an efficient, stable, and widely applicable epifluorescence microscopy method for soil virus enumeration through the systematic optimization of the disruption method, soil-to-liquid ratio, and antifade agent. The optimized method significantly enhances the extraction efficiency and counting accuracy of soil viruses, thereby providing robust technical support for soil viral ecology research.

**Key words:** Soil viruses; Virus extraction and enumeration; Antifade agent; Epifluorescence microscopy; Disruption method; Soil-to-liquid ratio

病毒作为地球上丰度最高、种类最丰富的生物实体，广泛分布于土壤、水体和生物体内<sup>[1-2]</sup>。病毒由蛋白质外壳和核酸组成，细胞内寄生，可侵染生物界三域系统（细菌、古菌和真核生物域）中所有生物体，在生态系统中具有重要的调控作用<sup>[3-4]</sup>。作为土壤微生物存亡的重要驱动者，病毒在调控宿主微生物参与的土壤生态功能中发挥着重要作用。当宿主细胞被病毒侵染后，土壤微生物生理代谢、基因表达和死亡速率发生变化，引起微生物数量、种群组成与功能发生改变，同时宿主细胞释放出的大量有机物质，成为土壤生境中碳、氮等元素循环的有效底物与能量<sup>[5]</sup>，最终影响土壤的物质循环及能量流动<sup>[6-7]</sup>。

近年来，随着测序技术的快速发展，基于基因层面的研究方法已成为分析土壤病毒多样性和生态功能的重要手段<sup>[8-9]</sup>。然而，受病毒变异率影响，其通用引物难以设计，进而限制了土壤中病毒的定量观察和检测<sup>[10]</sup>。宏病毒组测序技术虽有助于未培养/非可培养病毒类群的检测和分析，但测序具有偏好性，且相关结果难以准确反映自然生境中病毒的生存与行为<sup>[11]</sup>。此外，病毒在土壤中的低丰度及其复杂的物理化学环境也增加了土壤病毒提取和检测的困难<sup>[9]</sup>。与测序相比，透射电子显微镜（TEM）能够实现病毒颗粒的直接观察和计数，但局限性在于检测区域小、设备昂贵、操作复杂以及对实验条件要求高，使其难以在土壤病毒研究中大规模推广应用<sup>[5]</sup>。相比之下，荧光染色结合显微镜计数法因其灵活性和较高的操作效率，可成为土壤和水环境中病毒颗粒计数的重要方法<sup>[12]</sup>。

荧光染色-显微计数法常采用 SYBR Green I、4',6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）、恶唑黄（Yo-Pro-1）、SYBR Gold 等核酸染料对病毒核酸进行染色，在激发光照射下染料发出荧光，通过荧光显微镜进行可视化和计数，从而实现病毒颗粒的检测<sup>[13-14]</sup>。其中，SYBR Green I 因其高灵敏性和广泛适用性，已广泛应用于海洋、淡水及其他水环境中的病毒研究<sup>[15-16]</sup>。然而，上述研究方法在土壤环境中的应用仍面临一定的局限性<sup>[17]</sup>。如，土壤中的复杂有机质和矿物质可能会干扰荧光染料的染色效果，同时，病毒提取效率也受到多种因素的影响，导致其效果各异<sup>[5]</sup>。因此，优化土壤病毒计数方法，提高其检测精度与重复性显得尤为重要。

本研究旨在优化荧光染色-显微计数法在农田土壤病毒分析中的应用，从土壤病毒提取与显微镜

察的关键步骤入手, 系统评估土壤样品与浸提液比例、振荡仪器及其参数设置, 以及防淬灭剂的应用效果。通过对农田土壤样品的实验验证, 提出了一种适用于土壤病毒定量分析的优化流程, 以期后续土壤病毒的定量分析和侵染方式研究提供可行的技术参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试土壤

用于方法优化的土壤采集自沈阳农业大学棕壤长期定位施肥实验站(41°49'N, 123°34'E), 采样时间为2021年4月, 采样深度0~20 cm。土壤样品采集后保存于4℃, 于一周内完成检测。

用于适用性验证的样品包含三种土壤类型, 草甸土采集自辽宁省沈阳市法库县(42°34'N, 123°28'E), 采样时间为2023年6月; 黑土采集自黑龙江省哈尔滨市巴彦县(46°44'N, 126°91'E), 采样时间为2025年7月; 棕壤采集自辽宁省铁岭市昌图县(42°46'N, 123°57'E), 采样时间为2025年7月。采样深度均为0~20 cm。所有土壤样品采集后保存于4℃, 于一周内完成检测。

### 1.2 供试材料与仪器

试验耗材与试剂: 载玻片(1.0~1.2 mm, 25.4 mm×76.2 mm); 盖玻片(Nr. 1.0, 25 mm×25 mm); Anodisc™25 滤膜(0.02 μm 孔径, 25 mm 直径; Cat. 6809-6002, Cytiva, 美国); 0.22 μm 孔径针头式过滤器(Cat. SLGV033RB, 密理博, 美国); 高效液相色谱级(HPLC)水(Cat. W820536, 麦克林, 上海); Tris base Molecular Grade (Cat. ZZ02531, NOVON, 英国); SYBR Green I 核酸染料(10 000×)(Cat. SY1020, 索莱宝, 北京); DNase I 酶(Cat. D8070, 索莱宝, 北京); 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)(Cat. E8030, 索莱宝, 北京) Fluoromount-G™抗荧光淬灭封片剂(Cat. 36307ES08, 翌圣, 上海); 香柏油(Cas. 8000-27-9, 华灵, 天津)。

主要仪器包括百分之一电子天平(CP224S, 赛多利斯, 德国), 涡旋混合器(Vortex-Genie 2, Scientific Industries, 美国), 往复式水浴恒温摇床(ZWY-110X50, 智城, 上海), 超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-II D, 新芝, 宁波), 手持搅拌棒(HR2534, 飞利浦中国, 上海), 超速离心机(CR21N, HITACHI, 日本), 真空泵(SCJ-15, 苏珀, 常州)和荧光显微镜(DM4B, Leica, 德国)。

### 1.3 试验方法

本研究采用基于荧光显微镜的病毒计数方法, 主要包括以下关键阶段: (1) 病毒提取与纯化: 通过化学分散与机械搅拌从土壤中释放病毒颗粒, 并经过离心与过滤步骤去除土壤颗粒及细菌等杂质; (2) 病毒浓缩与荧光染色: 利用超滤膜富集病毒颗粒, 并对病毒核酸进行染色; (3) 显微制片与计数: 将染色后的病毒样品固定于载玻片上, 在荧光显微镜下观察并计数。基于此, 系统评估了多个关键因素对土壤病毒计数结果的影响。

**1.3.1 防荧光淬灭方法对病毒计数的影响** 比较使用与不使用防褪色剂和防淬灭剂对病毒计数的影响。实验室防褪色剂制备方法为: 无水乙醇与(S)-(-)-α-甲基苄胺的体积比为1 000: 1, 制成防褪色原液, 将100 mL防褪色原液与1 mL甘油-磷酸盐缓冲液储备液混合均匀, 通过0.1 μm微孔滤膜, 室温保存备用。防淬灭剂使用Fluoromount-G™抗荧光淬灭封片剂(水溶性)。上述处理均在土液比为30: 100 (w:v), 且使用手持搅拌棒获得土壤悬液的条件下进行, 每个处理计数取9个视野的平均值。

**1.3.2 土壤悬液破碎方式对病毒计数的影响** 分别使用4种不同破碎方式处理土壤悬液, 比较不同方法对病毒提取效率的影响。具体包括: (1) 涡旋混合器开至最大转速(3 200 r·min<sup>-1</sup>), 室温振荡3 min; (2) 水浴摇床120 r·min<sup>-1</sup>室温振荡60 min; (3) 超声波细胞粉碎机(100 W, 40 kHz) 19 s工作/3 s间歇的脉冲模式, 共3 min, 离心管外置冰浴, 防止温度过高; (4) 手持搅拌棒(650 W, 50 Hz) 室温振荡3 min。上述处理均在土液比为30: 100 (w:v), 且使用防淬灭剂进行显微镜观察的条件下进行, 每个处理计数取9个视野的平均值。

**1.3.3 土壤样品与提取液比例对病毒计数的影响** 于100 mL 柠檬酸钾磷酸盐缓冲液(pH 7)中分别加入30 g和50 g新鲜土壤, 分析不同土液比(30: 100 (w:v, 下同)和50: 100 (w:v, 下同))对土壤

病毒计数的影响。上述处理均在使用手持搅拌棒获得土壤悬液、加防淬灭剂进行显微镜观察的条件下进行，每个处理计数取9个视野的平均值。

柠檬酸钾磷酸盐缓冲液配制方法如下：1.44 g 磷酸氢二钠，0.24 g 磷酸氢二钾，10 g 柠檬酸钾，溶于高效液相色谱级（HPLC）水，调节 pH 至 7 后定容至 1 L，将配制好的缓冲液通过 0.1 μm 微孔滤膜，灭菌冷却后保存于 4℃。

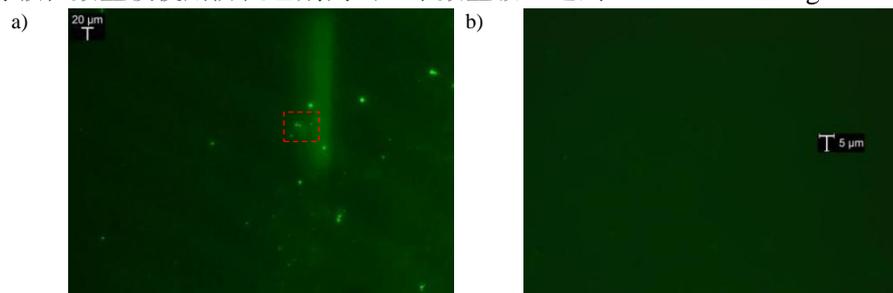
#### 1.4 数据处理

使用 Leica Application Suite（Leica Microsystems, LAS V4.12, 德国）荧光显微镜采集的图像进行计数，并使用 Excel 2019 处理数据。使用 SPSS20.0 进行单因素方差分析（ANOVA）或配对样本 T 检验，并采用最小显著差异法（LSD）进行多重比较分析。使用 Origin2019 绘制数据可视化图表。雷达图采用 R 4.1.1 中的 fmsb 包处理并生成图形。

## 2 结果

### 2.1 防荧光淬灭方法对病毒计数的影响

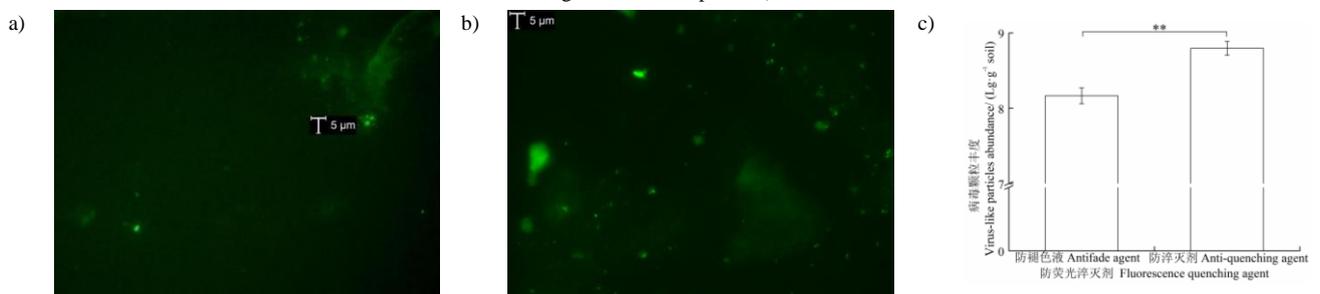
从图 1 中可以看出，不使用防褪色剂和防淬灭剂，显微镜下放大 100 倍时，能够观察到一定数量散发荧光的颗粒（<1 μm），然而，当放大倍数为 1000 倍时，视野中则无法观察到土壤病毒颗粒，表明病毒颗粒在短时间内发生的淬灭现象影响了观察结果。使用防褪色剂或防淬灭剂时，二者均能有效防止荧光淬灭（图 2）。其中，使用防褪色剂后土壤中病毒颗粒数量为  $8.78 \times 10^7$  VLPs·g<sup>-1</sup>，使用防淬灭剂后土壤病毒颗粒数量较使用防褪色剂高出一个数量级，达到  $3.75 \times 10^8$  VLPs·g<sup>-1</sup>。



注：样品经 SYBR Green I 染色，图中明亮、均匀的圆形荧光信号为单个或多个聚集的土壤病毒颗粒，其直径小于 1 μm。下同。Note: The sample was stained with SYBR Green I, and the bright, uniform, and spherical fluorescence signals represent individual or aggregated soil virus-like particles, with a diameter of less than 1 μm. The same below.

图 1 未经防淬灭处理的土壤病毒荧光显微照片（a. 10×物镜；b. 100×物镜，对应图 a 中矩形框标注区域）

Fig. 1 Epifluorescence micrographs of soil viruses without anti-fade treatment (a. 10× objective lens; b. 100× objective lens, corresponding to the rectangle indicated in panel a.)



注：样品经 SYBR Green I 染色，使用 100×油镜拍摄。数据均采用平均值（基于 9 个随机视野的计数结果）±标准误差。\*，\*\*，和\*\*\* 分别表示显著性水平  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ 。下同。Note: The sample was stained with SYBR Green I and imaged under a 100× oil-immersion objective. The data are expressed as the mean (from nine randomly selected fields of view) ± standard error of the mean. \*, \*\*, and \*\*\*

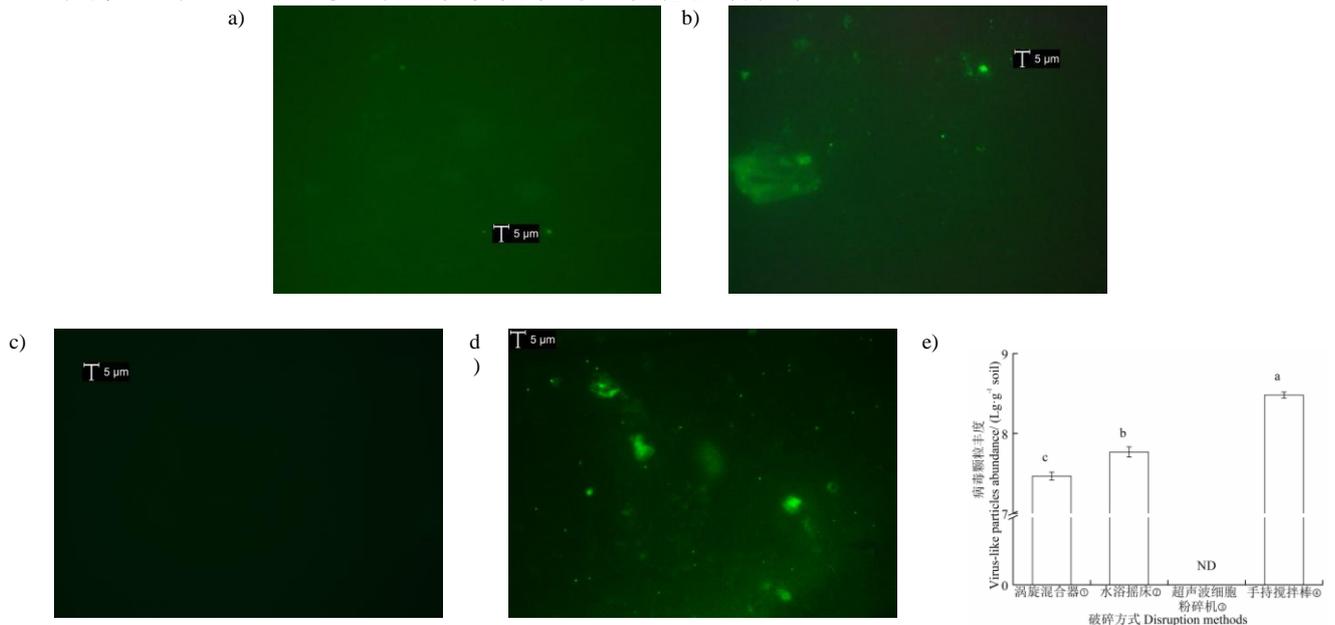
indicate significance at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.001$ , respectively. The same below.

图2 不同防荧光淬灭处理下土壤病毒的荧光显微照片 (a. 防褪色剂处理; b. 防淬灭剂处理) 与丰度 (c)

Fig. 2 Epifluorescence micrographs (a. antifade agent; b. anti-quenching agen) and abundance of soil viruses (c) under different anti-fade treatments

## 2.2 土壤悬液破碎方式对病毒计数的影响

不同破碎方式下土壤病毒的提取效率差异较大 (图3)。使用超声波细胞粉碎机时, 显微镜下未观察到土壤病毒颗粒, 表明该方法并不能有效提取土壤病毒 (图3c)。相比之下, 手持搅拌棒处理中能够观察到大量的病毒颗粒, 丰度可达  $3.03 \times 10^8 \text{ VLPs} \cdot \text{g}^{-1}$ 。尽管涡旋混合器和水浴摇床也能提取到病毒颗粒, 但其提取效率分别为使用手持搅拌棒的9.68%和19.36%, 显著低于手持搅拌棒的提取效率 ( $P < 0.05$ )。综上, 破碎仪器的转速和功率显著影响土壤病毒的提取效率。在四种破碎方式中, 使用手持搅拌棒 (650 W, 50 Hz) 振荡3 min后, 土壤悬液的提取效率最高, 优于其他破碎方式。



注: 不同字母表示显著性水平  $P < 0.05$ 。ND 表示未检出。下同。Note: Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ . ND: not detected. The same below. ① Vortex mixer; ② Bath shaker; ③ Ultrasonic cell disruptor; ④ Blender.

图3 不同破碎方式下土壤病毒的荧光显微照片 (a. 涡旋混合器; b. 水浴摇床; c. 超声波细胞粉碎机; d. 手持搅拌棒) 与丰度 (e)

Fig. 3 Epifluorescence micrographs (a. Vortex mixer; b. Bath shaker; c. Ultrasonic cell disruptor; d. Handheld blender) and abundance of soil viruses (e) under different disruption methods

## 2.3 土壤样品与提取液比例对病毒计数的影响

当土液比为 30: 100 时, 显微镜下可观察到较为明显的病毒颗粒, 丰度达到  $1.07 \times 10^8 \text{ VLPs} \cdot \text{g}^{-1}$ 。随着土液比增加至 50: 100, 土壤病毒丰度提高至  $1.42 \times 10^9 \text{ VLPs} \cdot \text{g}^{-1}$ , 增幅为 1227.10% (图4)。上述结果表明, 与土液比 30: 100 相比, 增加土壤样品量 (土液比 50: 100) 能够显著提高土壤病毒的提取效率 ( $P < 0.001$ ), 更有效地反映土壤病毒的丰度。

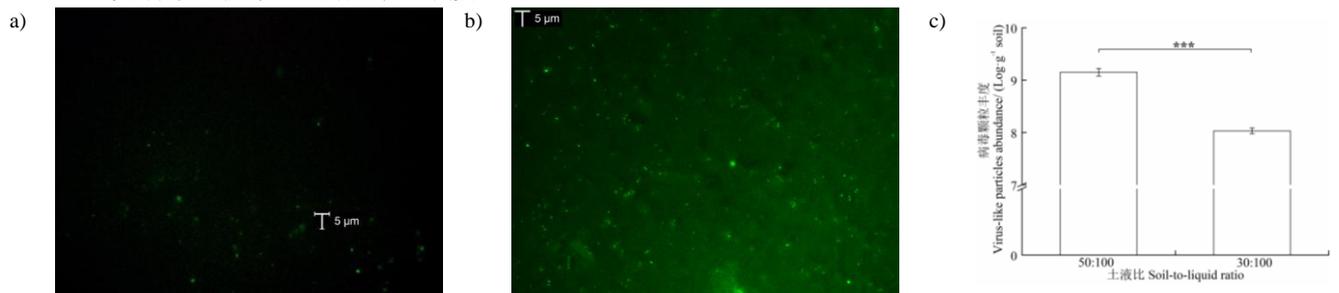


图4 不同土液比例 (a. 土液比 30:100 (w:v); b. 土液比 50:100 (w:v)) 下土壤病毒的荧光显微照片与丰度 (c)

Fig. 4 Epifluorescence micrographs ( a. soil-to-liquid ratio of 30:100 (w:v); b. soil-to-liquid ratio of 50:100 (w:v) ) and abundance of soil viruses (c) under different soil-to-liquid ratios

## 2.4 土壤病毒提取与检测的优化方案

综合比较不同破碎方式、土液比及防荧光淬灭方法对土壤病毒提取效率及荧光显微镜观察结果的影响,结果(图5)表明:在破碎方式方面,涡旋混合器、水浴摇床和手持搅拌棒均可有效破碎土壤,但手持搅拌棒的破碎效果更佳。其次,土液比对土壤病毒提取的影响最为关键,当土液比为50:100时,病毒提取效率最高。此外,在防荧光淬灭方法方面,合适的防荧光淬灭措施对于保持染色颗粒的稳定性和提高检测准确性至关重要,防褪色剂和防淬灭剂对土壤病毒荧光显微观察的结果影响相近,防淬灭剂的效果略优于防褪色剂。

综上,采用手持搅拌棒破碎,结合较高土液比(50:100),并配合防淬灭剂处理,是优化土壤病毒提取及荧光显微观察的最优方案,有助于获得更稳定和可靠的计数结果。在该条件下,土壤病毒丰度可达 $1.42 \times 10^9$  VLPs·g<sup>-1</sup>(图4b),显著高于其他处理。

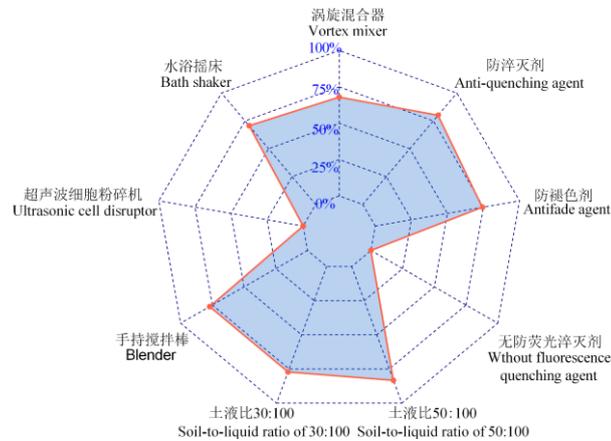


图5 不同处理对土壤病毒提取效率及荧光显微观察的综合影响

Fig. 5. Comprehensive effects of different treatments on soil virus extraction efficiency and epifluorescence microscopy observation

基于上述优化结果,最终确定优化方案的具体操作流程如下:

- 1) 称取 50 g 农田土壤样品,置于含 100 mL 柠檬酸钾磷酸盐缓冲液中,使用手持搅拌棒搅拌 3 min;
- 2) 将搅拌好的土壤悬液分装至 2 个 50 mL 无菌离心管中,6 000 ×g、4℃离心 20 min;
- 3) 收集上清液,经 0.22 μm 针孔滤膜过滤,移取 1.8 mL 滤液至无菌离心管中;
- 4) 向离心管中分别加入 100 μL Tris base Molecular Grade (100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.5) 和 2 μL DNase I, 37℃水浴 30 min;
- 5) 加入 35 μL EDTA 溶液 (0.5 mmol·L<sup>-1</sup>), 65℃水浴 10 min;
- 6) 反应结束后,置于室温下冷却;
- 7) 使用 0.02 μm 滤膜抽滤 900 μL 反应液(预先用高效液相色谱级(HPLC)水润膜)。
- 8) 在滤膜上加入 500 μL SYBR Green 核酸荧光染料,避光染色 20 min,随后用高效液相色谱级(HPLC)水冲洗 2~3 次;
- 9) 取出滤膜,避光晾干;
- 10) 在洁净载玻片上滴加 35 μL 高效液相色谱级(HPLC)水,置于滤膜下,再滴加 35 μL 防淬灭剂,置于滤膜上,随后覆盖盖玻片;
- 11) 在荧光显微镜(100×物镜)下进行病毒观察与计数;
- 12) 计数公式

$$N = \frac{N_t \times A_t \times V_0 \times C}{A_m \times V_1 \times T_0} \quad (1)$$

式中, $N$ 为测定样品每克干物质质量中的病毒颗粒数量, VLPs·g<sup>-1</sup>;  $N_t$ 为显微镜下计数的病毒颗粒数量, VLPs;  $A_t$ 为滤膜面积, mm<sup>2</sup>;  $V_0$ 为土壤浸提液体积, mL;  $C$ 为电荷耦合器件(CCD)系数 2.0408,用于校正显微

镜图像;  $A_m$  为显微镜视野面积,  $\text{mm}^2$ ;  $V_t$  为测定样品体积, 即最后通过滤膜的样品反应液体积,  $\text{mL}$ ;  $T_0$  为测定样品干物质量,  $\text{g}$ 。

### 2.5 优化方法在不同土壤类型中的验证

为验证优化后的荧光显微计数法在不同土壤类型中的适用情况, 将其应用于三种代表性农田土壤, 分别为棕壤、黑土与草甸土。结果表明, 三种土壤在  $100\times$  物镜下均能观察到病毒颗粒 (图 6a~图 6c)。其中, 草甸土中病毒丰度最高, 可达  $1.78 \times 10^8 \text{ VLPs}\cdot\text{g}^{-1}$ , 显著高于棕壤 ( $1.05 \times 10^8 \text{ VLPs}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 黑土则介于二者之间。尽管草甸土和棕壤中病毒丰度有显著差异 ( $P < 0.05$ ; 图 6d), 但数量级相近, 表明优化后的土壤病毒检测方法具备良好的适用性、稳定性与可重复性。

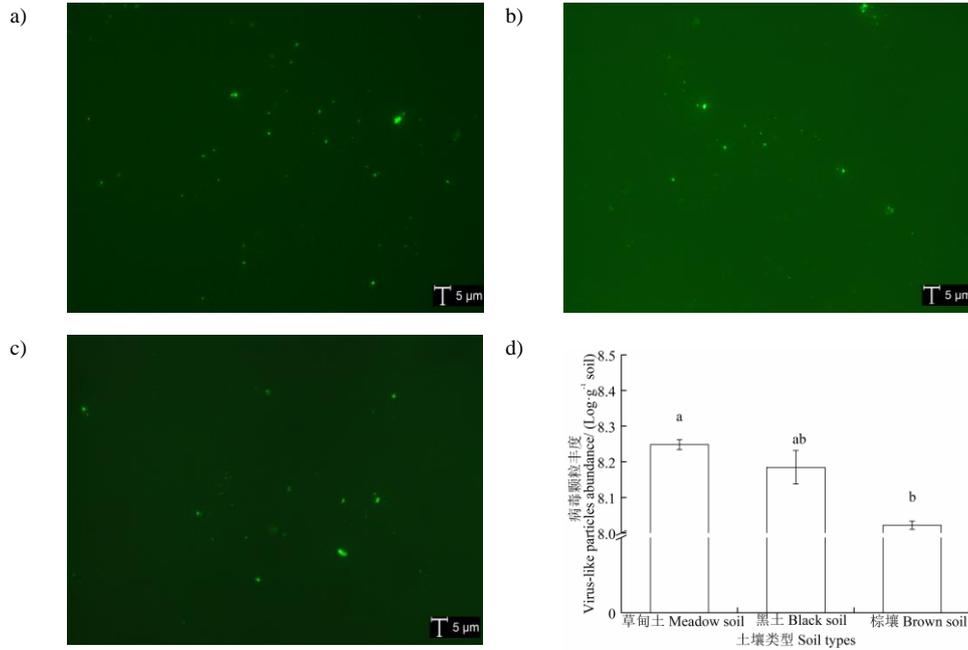


图 6 不同类型土壤病毒的荧光显微照片 (a. 草甸土; b. 黑土; c. 棕壤; ) 与丰度 (d)

Fig. 6 Epifluorescence micrographs (a. Meadow soil; b. Black soil; c. Brown soil) and abundance of soil viruses (d) under different soil types

## 3 讨论

本研究选用了 SYBR Green I 染料, 这是一种常见的核酸染料, 广泛应用于微生物的荧光显微计数<sup>[18]</sup>。研究中观察到, 在未使用防褪色剂和防淬灭剂的情况下, 荧光信号在显微镜下会迅速衰减, 导致难以对病毒颗粒进行准确计数。添加防褪色剂后, 病毒颗粒的数量为  $8.78 \times 10^7 \text{ VLPs}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 而在使用防淬灭剂后, 病毒颗粒数量显著增加, 达到了  $3.75 \times 10^8 \text{ VLPs}\cdot\text{g}^{-1}$  (图 2)。该结果与 Noble 和 Fuhrman<sup>[19]</sup>的研究结果一致, SYBR Green I 染料的荧光信号在 30 s 内迅速衰减, 而防褪色剂能够有效延缓该过程。本研究则进一步表明, 防淬灭剂能够通过抑制光化学反应和氧化过程, 显著延长荧光信号寿命, 其在提升病毒计数方面的效果显著优于防褪色剂。因此, 在土壤病毒计数中, 推荐使用防荧光淬灭剂 (防褪色剂或防淬灭剂) 以提高检测的精确性和可靠性。

韩丽丽等<sup>[9]</sup>认为, 土壤病毒浸提过程中, 使用柠檬酸钾磷酸盐缓冲液提取效率最高, 且更适合后续荧光显微计数。此外, 土壤悬液破碎方式对土壤病毒颗粒的提取效率具有显著影响。一些研究指出, 高频超声波产生的气泡和压力波会破坏病毒结构, 尤其是病毒外壳的完整性<sup>[20]</sup>, 这可能是本研究使用超声波细胞粉碎机未能在显微镜下观察到病毒颗粒的主要原因。然而, 维妙<sup>[21]</sup>使用相同参数的超声波细胞粉碎机成功提取了海洋沉积物中的病毒颗粒, 究其原因, 应与水分在超声波处理中的关键作用有关。通常认为, 高水分环境能够增强超声波的传播效果, 从而产生更有效的空化作用<sup>[22]</sup>。相比之下, 农田土壤的含水量显著低于海洋沉积物, 降低了超声波的传播效率, 进而影响病毒的提取效果。此外, 土壤颗粒也会干扰超声波的传递和能量释放<sup>[23-24]</sup>, 进一步导致提取效率下降。本研究中, 手持搅拌棒展现了最优的破碎效果, 其提取效率分别

是涡旋混合器与水浴摇床的 10.33 倍与 5.17 倍 (图 3)。这一显著优势主要源于其高功率 (650 W) 运行所产生的高强度剪切力与液体湍流。相比于其他两种方法, 该方法能够更有效地破坏土壤团聚体结构并释放病毒颗粒。此外, 快速的均匀分散可缩短样品处理时间, 降低病毒在提取过程中的降解风险。因此, 机械力相对温和且混合均匀性较差的涡旋混合器和水浴摇床的提取效率相对有限。

优化土液比是提高土壤病毒提取效率的最关键因素 (图 5)。当前相关研究中普遍采用的土液比为 30:100<sup>[25-26]</sup>。然而, 本研究结果表明, 当土液比调整至 50:100 时, 土壤病毒丰度可显著提高 13.18 倍 (图 4), 表明适当提高样品比例可提高土壤病毒的释放与检测效率。尽管通常认为提取液的用量越多, 提取效率越高, 但在一定程度内提高土液比可增加土壤样品与缓冲液的接触频率, 增强病毒颗粒的释放效率。单位体积内土壤颗粒浓度升高还能够增加颗粒间的碰撞频率, 通过竞争吸附位点等方式使原本牢固吸附的病毒粒子解离并进入浸提液。该结果与 Li 等<sup>[27]</sup>发现相近, 增加土壤用量有助于更好分析土壤微生物群落丰富度和组成。然而, 过高的土液比可能会导致溶液黏度增加, 降低土壤病毒提取效率。因此, 从土壤样品与缓冲液的表现状态, 研究中未继续增加土液比例, 依据观察结果将土液比 50:100 确定为最佳比例。

将优化后的标准流程应用于不同类型土壤, 均成功获得了较高且稳定的病毒计数结果 (图 6), 展现出良好的适用性。尽管与 qPCR、宏基因组学等分子生物学方法相比, 本研究优化的荧光显微计数法无法解析病毒群落的物种组成与遗传功能, 但其不依赖已知病毒序列设计引物, 能够有效避免因引物偏好性所造成的丢失问题; 同时, 其检测结果不受 DNA 提取效率、宿主 DNA 污染及测序深度等多种偏差的影响<sup>[28]</sup>, 能够更直接、稳定地反映土壤病毒的实际数量, 为农田土壤病毒丰度检测提供了一种高效、实用的技术选择。

综上所述, 本研究通过防荧光淬灭方法、优化破碎方式和土液比等关键参数, 显著提升了土壤病毒的提取效率, 为病毒生态学研究提供了更加高效的技术支持。未来研究应进一步探索荧光显微计数法的应用潜力。例如, 不同季节、土层以及农业管理措施 (如施肥制度、耕作方式或秸秆还田等) 下该方法的适用性与稳定性。此外, 将本方法与宏基因组学、宏转录组学等分子技术结合, 在对病毒进行绝对定量的基础上分析其群落多样性, 揭示病毒与宿主之间的作用关系, 进一步阐明病毒在调控农田土壤微生物群落、驱动碳、氮、磷等元素循环中的关键作用。

## 4 结论

本研究从防荧光淬灭方法、土壤悬液破碎方式及土液比入手, 优化土壤病毒的荧光显微计数方法, 结合不同类型土壤病毒丰度检测, 验证优化后方法在农田土壤中的适用性。使用防淬灭剂能够显著延长 SYBR Green I 的荧光信号寿命, 提高病毒计数准确性; 手持搅拌棒振荡 3 min 和土液比 50:100 (w:v) 可显著促进病毒颗粒从土壤中释放, 提高提取效率。优化后农田土壤病毒荧光显微计数操作流程在多种类型土壤 (棕壤、黑土与草甸土) 中均能获得稳定且可重复的病毒计数结果, 具有广泛适用性与可靠性。综上, 本研究建立了一套操作简便、重复性强、适用性高的土壤病毒计数流程, 可为深入开展土壤病毒生态学研究提供技术参考。

## 参考文献 (References)

- [1] Xia R, Zheng X X, Ye M, et al. Advances in effects of bacteriophages on transformation of carbon and nitrogen in soil[J]. *Soils*, 2021, 53(4): 661-671. [夏蓉, 郑晓璇, 叶茂, 等. 噬菌体对土壤碳氮元素循环转化影响的研究进展[J]. *土壤*, 2021, 53(4): 661-671.]
- [2] Sun Y, Wang G H, Li Y S, et al. Research progress and main ecological functions of soil viruses[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 2771-2784. [孙岩, 王光华, 李彦生, 等. 土壤病毒研究进展及主要生态功能解析[J]. *微生物学报*, 2025, 65(7): 2771-2784.]
- [3] Shen P, Chen X D. *Microbiology*[M]. 9th ed. Beijing: Higher Education Press, 2024. [沈萍, 陈向东. *微生物学*[M]. 9 版. 北京: 高等教育出版社, 2024.]
- [4] Wang G H. Lift mysterious veil of soil virus: 'Dark matter' of soil biota[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(6): 575-584. [王光华. 掀开土壤生物“暗物质”——土壤病毒的神秘面纱[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(6): 575-584.]
- [5] Wei M, Xu K D. Optimization of viral enumeration in epifluorescence microscopy for marine sediments[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017,

- 48(3): 516-526. [维妙, 徐奎栋. 海洋沉积物病毒荧光计数法的优化[J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(3): 516-526.]
- [6] Wang G H, Liu J J, Zhu D, et al. A review of researches on viruses in soil — Advancement and challenges[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(6): 1319-1332. [王光华, 刘俊杰, 朱冬, 等. 土壤病毒的研究进展与挑战[J]. 土壤学报, 2020, 57(6): 1319-1332.]
- [7] Chen Z T, Wei L, Zhu Z K, et al. Research progress in ecological functions of soil viruses[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2401-2417. [陈紫婷, 魏亮, 祝贞科, 等. 土壤病毒的生态学功能研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2401-2417.]
- [8] Liu Z K, Huang S X, Yang M Y. Virus diversity studies in paddy soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(6): 1703-1713. [刘泽锟, 黄士轩, 杨美艳. 稻田土壤中病毒多样性研究[J]. 土壤学报, 2024, 61(6): 1703-1713.]
- [9] Han L L, Yu D T, He J Z. Research methods for soil viral ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(6): 1749-1756. [韩丽丽, 于丹婷, 贺纪正. 土壤病毒生态学研究方法[J]. 生态学报, 2017, 37(6): 1749-1756.]
- [10] Sanjun R, Domingo-calap P. Genetic diversity and evolution of viral populations//Bamford D. Encyclopedia of Virology[M]. Academic Press, 2021: 53-61.
- [11] Ruan C J, Xiong G Z, Niu X Y, et al. Preliminary analysis of the virus metagenome in a farmland black soil of Northeast China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(5): 1447-1456. [阮楚晋, 熊广州, 牛欣尧, 等. 一个东北农田黑土样品宏病毒组的初步分析[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1447-1456.]
- [12] Liang X L, Zhang Y Y, Wommack K E, et al. Lysogenic reproductive strategies of viral communities vary with soil depth and are correlated with bacterial diversity[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2020, 144: 107767.
- [13] Patel A, Noble R T, Steele J A, et al. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I[J]. Nature Protocols, 2007, 2(2): 269-276.
- [14] Fischer U R, Kirschner A, Velimirov B. Optimization of extraction and estimation of viruses in silty freshwater sediments[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2005, 40: 207-216.
- [15] Cheng S T, Zhao Y J, Liao M J. Comparative study on counting methods of planktonic bacteria and viruses in Xiangxi river and reservoir bay [J]. Environmental Protection and Circular Economy, 2021, 41(2): 40-43, 50. [程斯婷, 赵以军, 廖明军. 香溪河库湾浮游细菌和病毒计数方法比较研究[J]. 环境保护与循环经济, 2021, 41(2): 40-43, 50.]
- [16] Shen L X, Wang S P, Liang C L, et al. The temporal and spatial variation of microplankton abundance in Sanmen Bay[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 40(2): 117-126. [沈丽新, 王思鹏, 梁春玲, 等. 三门湾微型浮游生物丰度的时空变化特征[J]. 海洋学报, 2018, 40(2): 117-126.]
- [17] Liang X L, Wang Y S, Zhang Y, et al. Viral abundance, community structure and correlation with bacterial community in soils of different cover plants[J]. Applied Soil Ecology, 2021, 168: 104138.
- [18] Marie D, Brussaard C, Thyrhaug R, et al. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 45-52.
- [19] Noble R T, Fuhrman J A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria[J]. Aquatic Microbial Ecology, 1998, 14: 113-118.
- [20] Sadraeian M, Kabakova I, Zhou J J, et al. Virus inactivation by matching the vibrational resonance[J]. Applied Physics Reviews, 2024, 11(2): 021324.
- [21] Wei M. Temporal and spatial distribution and molecular diversity of sediment viruses in the Western Pacific Ocean[D]. Qingdao, Shandong: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020. [维妙. 西太平洋沉积物病毒时空分布及分子多样性研究[D]. 山东青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2020.]
- [22] Xi X P, Ma C F, Wang W. Application situation of ultrasonic technology[J]. Shanxi Chemical Industry, 2007, 27(1): 25-29. [席细平, 马重芳, 王伟. 超声波技术应用现状[J]. 山西化工, 2007, 27(1): 25-29.]
- [23] Kaiser C, Franklin O, Dieckmann U, et al. Microbial community dynamics alleviate stoichiometric constraints during litter decay[J]. Ecology Letters, 2014, 17(6): 680-690.
- [24] Shi W H, Lou Q F, Xie X J, et al. Research progresses and prospects of water erosion monitoring methods in China[J]. Soils, 2024, 56(5): 921-927. [史文海, 娄黔方, 谢鑫杰, 等. 中国水力侵蚀监测方法研究进展[J]. 土壤, 2024, 56(5): 921-927.]
- [25] He L, Yan Y T, Yuan C Y, et al. Characteristics of soil viral communities in Cunninghamia lanceolata plantations with different stand ages[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2024, 35(9): 2543-2551. [和莉, 严雨亭, 袁程昱, 等. 不同林龄杉木人工林土壤病毒群落特征[J]. 应用生态学报, 2024, 35(9): 2543-2551.]
- [26] Liang X L, Wagner R E, Zhuang J, et al. Viral abundance and diversity vary with depth in a southeastern United States agricultural ultisol[J]. Soil

Biology & Biochemistry, 2019, 137: 107546.

[27] Li T, Zhang S, Hu J M, et al. Soil sample sizes for DNA extraction substantially affect the examination of microbial diversity and co-occurrence patterns but not abundance[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2023, 177: 108902.

[28] Han L L, Cao M M, Bi L, et al. Research advances and application prospect of soil viruses[J]. Science & Technology Review, 2022, 40(3): 75-86.

[韩丽丽, 曹苗苗, 毕丽, 等. 土壤病毒的研究进展与应用前景[J]. 科技导报, 2022, 40(3): 75-86.]

(责任编辑: 陈荣府)