

DOI: 10. 11766/trxb201301290060

外源细菌添加对红壤吸附病毒的影响*

赵炳梓[†] 蒋艳

(封丘农业生态实验站,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 污水中病毒往往与一些可溶性有机物质、无机胶体及菌体细胞同时存在,但很少有研究考虑菌体细胞及其分泌物对环境中的病毒去向的影响。从 3 株代表性菌株培养液中分别获取菌体细胞及其分泌的胞外聚合物(EPS),其目的是为了:(1)比较不同红壤的病毒吸附能力;(2)明确细菌存在对红壤吸附病毒的影响;(3)评估菌体细胞及 EPS 影响红壤吸附病毒的相对作用权重。结果表明,4 种经过灭菌处理的红壤中,红黏土和赤红壤对病毒的吸附容量最大,其次为砖红壤,而红壤土的吸附能力最弱。菌体细胞对红壤吸附病毒的影响很小,在某种土壤中甚至有促进病毒吸附的趋势,但 EPS 或 EPS 与菌体细胞同时存在显著降低了红壤对病毒的吸附能力,其降低比例分别达 36% 和 30%,表明细菌存在降低土壤吸附病毒的现象主要由其分泌物 EPS 导致。本研究结果表明在评估某一介质对病毒的吸附能力时必须同时考虑细菌存在的影响,否则有可能高估其吸附容量。

关键词 病毒吸附;红壤;细菌胞体;胞外聚合物

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A

病毒广泛存在于污水、污泥等污染物中^[1],这些污染物往往还含有其他有机无机污染物。比如,在城市污水和家禽废水中同时含有细菌、病毒及各种分解半分解有机质混合物等^[2-3]; Omoike 等^[4]表示自然水体中含有各种有机大分子(可溶性有机质(DOM)和细菌分泌物)、无机胶体(黏土矿物和各种氧化物)及细菌胞体。有关各种无机胶体和 DOM 对环境中的病毒去向的研究已经很多^[5-6],但很少有研究关注细菌胞体及其分泌物对病毒去向的影响。通过数学模型预测, Kim 等^[7]认为细菌存在显著提高疏水性有机污染物的迁移潜力,这同时表明细菌存在降低了介质对这些污染物的吸附能力。通过灭菌和不灭菌对比实验,研究发现灭菌促进红壤土和红黏土对噬菌体 MS2 的吸附和消亡,但则降低红黏土对 ϕ X174 的吸附^[8-9]。显然,在选择基于某些基质的吸附特性进行病毒去除时,如果不考虑环境中细菌存在的影响,有可能高估或低估这些基质的病毒去除能力或净化能力。

细菌在生长发育过程中会向细胞外分泌胞外聚合物(EPS)。在实际操作过程中,EPS 可分成可

溶性部分和粘附在细胞表面的部分,前者是指细菌培养物在高速离心后能够从细胞表面分离从而溶解进入上清液的部分,而后者则指经过上述分离过程依然粘附在细胞表面的部分^[10-11]。

影响病毒在环境中吸附和消亡的因素很多,但一般认为它们与吸附介质或迁移媒介中金属氧化物的含量(包括 Fe、Al 氧化物)有显著正相关关系^[12-13]。基于上述研究结果,有关采用金属氧化物含量比较丰富的矿物或金属氧化物本身进行病毒去除的研究报道比较多^[9,14]。尽管有文献已经对富含 Fe、Al 氧化物的红黏土进行病毒去除潜力研究^[9],但对不同红壤之间的效应差别及其某些特定细菌的影响行为尚未展开探讨。

本研究选择自然界广泛存在的 2 株革兰氏阴性菌(*Pseudomonas putida* 和 *Pseudomonas aeruginosa*) 和 1 株革兰氏阳性菌(*Bacillus subtilis*) 为代表细菌,以噬菌体 ϕ X174 为指示病毒,其主要研究目的包括:(1)明确不同红壤对病毒吸附能力的差异;(2)探明细菌存在对红壤吸附病毒的影响;(3)评估细菌中胞体和 EPS 对土壤吸附病毒影响的相对

* 国家自然科学基金项目(40971129)资助

† 通讯作者,E-mail:bzhao@issas.ac.cn

作者简介:赵炳梓(1967—),女,博士,研究员,主要从事土壤肥力与作物生长、溶质迁移研究。E-mail:bzhao@issas.ac.cn

收稿日期:2013-01-29;收到修改稿日期:2014-02-24

权重。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤

4 种供试土壤分别为:(1)红壤土(铁质湿润锥形土):采集于江西省鹰潭市(116°55'30"E、28°15'20"N);(2)红黏土(黏化湿润富铁土):采集于江西省鹰潭市(116°53'00"E、28°14'00"N);(3)赤红壤(富铝湿润富铁土):采集于广东省肇庆市(112°32'23"E、23°10'12"N);(4)砖红壤(暗红湿润铁铝土):采集于海南省海口市(110°36'11"E、18°52'00"N)。所有土壤均采自土壤表层(0~15 cm),然后在实验室风干、过 2 mm 筛。

为了消除本土微生物对实验结果的潜在影响,所有土壤实验前均进行灭菌处理,灭菌条件为:取 10~100 g 风干土置于 250 ml 玻璃三角瓶中,硅胶塞

与报纸封口,置于高压灭菌锅(LDZX-40BI,上海申安)内,在温度为 121℃、压力为 0.105 MPa 条件下湿热灭菌 3 次,每次灭菌 3 h,每间隔 24 h 灭菌 1 次,灭菌土壤置于通风良好、已灭菌的无菌操作室内待用。灭菌后测定土壤中细菌、真菌及放线菌数量,稀释平板计数测定结果均为 0,表明该方法可以达到有效的去除微生物的效果。

对灭菌土壤进行基本理化性质测定,测定方法为常规方法^[15],pH 采用 pH 计(HANNA211)测定,土水比为 1:2.5;有机质采用重铬酸钾法测定;可溶性有机碳采用土水比 1:2 提取—TOC 仪测定;土壤阳离子交换量采用 EDTA-铵盐快速法测定;土壤游离氧化铁和游离氧化铝采用连二亚硫酸钠-柠檬酸钠-重碳酸钠提取法(DCB)测定;土壤无定型氧化铁和无定型氧化铝采用草酸铵提取法测定;土壤比表面积采用氮气等温吸附法测定;土壤颗粒组成采用吸管法测定。测定结果见表 1。

表 1 土壤基本理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of the soils

土壤类型 Soil type	pH (H ₂ O)	有机质 OM (g kg ⁻¹)	可溶性有机碳 DOC (mg kg ⁻¹)	阳离子交换量 CEC (mmol kg ⁻¹)	游离氧化铁 Free Fe ₂ O ₃ (g kg ⁻¹)	游离氧化铝 Free Al ₂ O ₃ (g kg ⁻¹)	无定型氧化铁 Amorphous Fe ₂ O ₃ (g kg ⁻¹)
红壤土 ^①	4.38	5.27	128.3	22.49	11.82	4.22	0.67
红黏土 ^②	4.36	4.36	66.85	68.31	33.19	7.40	3.62
赤红壤 ^③	3.61	47.98	1 095	116.7	33.96	7.45	5.14
砖红壤 ^④	4.56	30.94	566.7	69.50	164.3	23.85	2.97

土壤类型 Soil type	无定型氧化铝 Amorphous Al ₂ O ₃ (g kg ⁻¹)	比表面积 Specific surface area (m ² g ⁻¹)	砂粒 (2~0.02 mm) Sand (%)	粉粒 (0.02~0.002 mm) Silt (%)	黏粒 (<0.002 mm) Clay (%)	质地 Textural class
红壤土 ^①	1.02	8.21	39.8	50.37	9.83	粉质壤土 Silt loam
红黏土 ^②	2.75	30.21	35.62	25.45	38.93	壤质黏土 Loam clay
赤红壤 ^③	1.37	10.11	45.52	6.58	43.9	壤质黏土 Loam clay
砖红壤 ^④	4.06	52.5	25.93	19.1	54.98	黏土 Clay

①Ferriudic Cambosols, ②Argiargiudic Ferrosols, ③Allitriargiudic Ferrosols, ④Rhodiudic Ferralolsols

1.2 供试细菌

1.2.1 细菌及其培养条件 供试的 3 株菌株皆购于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),分别为:(1)PP. (*Pseudomonas putida*, 恶臭假单胞菌),革兰氏阴性菌,在 30℃ 的 LB 培养基(蛋白胨 1.0 g,酵母粉 0.5 g, NaCl 1.0 g, 水 100 ml, pH 7.0~7.2)中培养;(2)PA. (*Pseudomonas aeruginosa*, 铜绿假单胞菌),革兰氏阴性菌,在 35℃ 的 LB 培养基中培养;

(3)BS. (*Bacillus subtili*, 枯草芽孢杆菌),革兰氏阳性菌,在 35℃ 的 PYG 培养基(葡萄糖 3.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 酵母粉 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.45 g, 碳酸钙 0.2 g, 水 100 ml)中培养。所有培养基配制固体时加琼脂粉 1.5~2.0 g, 液体不加。

1.2.2 胞体及 EPS 悬液获取 收获培养至稳定期(本实验条件下的 3 株菌株的稳定期均为 24 h)的各菌株培养物,将该培养物先离心 15 min (5 000

g, 4℃), 然后将上清液在高离心力条件下再离心 30 min (12 096 g, 4℃) [16]。沉淀物中的菌体细胞用无菌生理盐水冲洗 3 次, 以消除粘附在细胞表面的培养基残留杂质, 测定胞体浓度, 然后 4℃ 保存, 待用。

上清液中 EPS 的提取方法根据 Omoike 和 Chorover [16] 所示方法进行, 即在上清液中添加 4℃ 乙醇, 用量按乙醇:上清液比为 3:1 进行, 然后在 -20℃ 下醇沉 18 h, 离心 30 min (12 096 g, 4℃), 分离出沉淀物。沉淀物用蒸馏水溶解后, 用再生纤维素膜 (cellulose membranes, 3 500 MWCO from Spectrum) 进行超纯水透析, 去除杂质, 包括残留乙醇。共透析 72 h, 每 12 h 更换超纯水, 然后冷冻干燥、称重, 4℃ 保存。

实验前菌体细胞、EPS、及它们的混合悬液均用无菌生理盐水调节至原取样体积。

1.3 病毒及其检测方法

本研究选择噬菌体 ϕ X174 为指示病毒, 因其结构类似于人类肠道病毒而被广泛用于各种实验研究 [5-6, 8-9]。 ϕ X174 (ATCC 13706B1) 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC13706) 均购自美国标准培养物保藏中心 (ATCC), ϕ X174 是一个直径约 23 nm 的二十面体单链 DNA 噬菌体, 等电点约为 6.6 [17]。采用 BEP 培养基 (NaCl 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g, 牛肉膏 0.3 g, 水 100 ml, pH 7.0 ~ 7.2) 培养。本实验中病毒均在 4℃ 保存, 并采用双层平板法定量测定, 具体测定方法参见王秋英 [18]、张辉等 [19]。

1.4 不同处理影响红壤吸附病毒的实验方法

在 15 ml 无菌离心管中分别加入过 2 mm 筛的 4 种灭菌土壤 (1.00 g), 细胞悬液 (或 EPS 悬液或混合悬液) 1.0 ml, 及用无菌生理盐水稀释至约 10^7 pfu ml⁻¹ 的 ϕ X174 悬液 0.1 ml, 混合均匀; 添加细胞悬液、EPS 悬液和混合悬液的处理分别用 Cell、EPS、Mixture 表示。对照处理为 0.1 ml 噬菌体悬液加 1.0 ml 无菌生理盐水和 1.00 g 土壤, 用 Control 表示。空白处理为 0.1 ml 噬菌体悬液加 1.0 ml 无菌生理盐水。离心管置于恒温 (4℃)、恒速 (300 r min⁻¹) 条件下的振荡培养箱 (HZ-9310K, 中国太仓) 中连续往复振荡处理 3 h, 然后将样品混合液离心 30 min (12 096 g, 4℃)。利用双层平板法定测定上清液中病毒浓度。被土壤吸附 (包括消亡) 的病毒量为空白处理病毒浓度与上清液浓度的差值, 其比例 (R) 的计算公式为:

$$R = [(C_i - C) / C_i] \times 100 \quad (1)$$

式中, R 、 C_i 、 C 分别表示病毒的吸附比例 (%)、空白处理的病毒浓度 (pfu ml⁻¹)、实验处理后离心所得上清液中的病毒浓度 (pfu ml⁻¹)。

同时测定震荡结束后 Cell 和 Cell/EPS 处理中细菌数量在实验前后的变化, 并将其与空白 1 和空白 2 进行比较, 以评估实验条件对细菌本身含量变化的影响。空白 1 处理为 1.0 ml 细胞悬液 (或混合悬液) 加 0.1 ml 无菌生理盐水, 空白 2 处理为 1.0 ml 细胞悬液 (或混合悬液) 加 0.1 ml ϕ X174 悬液。

以上所有实验均进行 3 次重复, 实验结果为 3 次重复的平均值。

1.5 数据处理

考虑土壤类型 (S)、菌株类型 (B)、菌株组成部分, 即菌体或 EPS 或它们的混合 (C) 及它们之间的交互作用 ($S \times B$, $S \times C$, $B \times C$, $S \times B \times C$) 的三元方差分析, 及考虑土壤类型 (S)、菌株组成部分 (C) 及它们之间的交互作用 ($S \times C$) 的二元方差分析均采用 SPSS17.0 进行分析, 多重比较采用 Duncan 法进行显著性检验 ($p < 0.05$)。

2 结果

2.1 稳定期细菌浓度及其 EPS 含量

表 2 结果显示稳定期 3 菌株的可培养细菌浓度在 PP、和 BS、菌株之间差异性不大, 但 PA、菌株要较它们大约高出 1 个数量级; 但 EPS 含量在 3 菌株之间没有显著性差异 (表 2)。

表 2 各菌株稳定期可培养细菌浓度及其 EPS 含量

Table 2 Concentration of culturable bacterial cells and their exuded EPS at stationary phase

菌株 Strain	细菌浓度 Bacterial concentration (cfu ml ⁻¹)	EPS 含量 EPS content (mg ml ⁻¹)
PP.	8.62×10^8 b	1.397 a
PA.	8.05×10^9 a	1.403 a
BS.	8.82×10^8 b	1.373 a

注: 表中同列不同字母表示不同菌株间有显著性差异 ($p < 0.05$, Duncan test); PP、PA、BS、分别表示 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtili*。下同 Note: Numbers in a column followed by different letters indicate bacterial species effect at 0.05 probability levels based on Duncan 0.05。PP、PA、BS、stand for *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtili*, respectively. The same below

2.2 不同土壤中细菌去向

为追踪细胞悬液和混合悬液处理中添加细菌在不同土壤中去向,本研究测定了该二处理混合震荡后的可培养细菌含量,并与空白进行比较(表3)。结果显示,病毒存在对本研究所用的3菌株的去向没有任何影响,这可能由于该3菌株均非 ϕ X174的宿主菌所致^[20]。无论是细胞悬液还是混合悬液处理,可培养细菌在不同土壤混合液中的浓度与各自对照相比尽管有些情况下有统计学上的差别,但均没有数量级上的区别(表3),换言之,这3菌株在经过3h的菌体-土壤-病毒或菌体+EPS-土壤-病毒混

合震荡后依然在大多数情况下均能存活。因而震荡处理后混合体系中胞体要么被土壤颗粒可逆/不可逆吸附、要么依然存在溶液中,其中不可逆吸附的比例不到细菌加入总量的20%,并且主要发生在细胞悬液处理的PP.和BS.菌株与赤红壤和砖红壤的混合体系中(表3)。PA.菌株在所有混合体系中的可培养菌体含量均与对照没有显著性差别,说明PA.菌株在3菌株中的抗性可能最强,这与Hassen等^[21]报道的PA.菌株为抗金属细菌的结论相一致,因为本研究所用的4种土壤的Fe和Al氧化物含量均比较高(表1)。

表3 不同土壤中可培育细菌含量

Table 3 Concentrations of culturable bacteria in different soils (cfu ml⁻¹)

处理 Treatment	菌株 Strain	空白1 Blank1	空白2 Blank 2	红壤土 Ferriudic Cambosols	红黏土 Argiargiudic Ferosols	赤红壤 Alltiargiudic Ferosols	砖红壤 Rhodiudic Ferralosols
细胞悬液 Cell	PP.	7.83 × 10 ⁸ a	7.80 × 10 ⁸ a	7.37 × 10 ⁸ ab	7.33 × 10 ⁸ ab	6.33 × 10 ⁸ c	6.77 × 10 ⁸ bc
	PA.	7.31 × 10 ⁹ a	7.27 × 10 ⁹ a	7.13 × 10 ⁹ a	7.10 × 10 ⁹ a	6.73 × 10 ⁹ a	6.93 × 10 ⁹ a
	BS.	8.08 × 10 ⁸ a	7.97 × 10 ⁸ a	7.47 × 10 ⁸ ab	7.53 × 10 ⁸ ab	6.77 × 10 ⁸ b	6.73 × 10 ⁸ b
混合悬液 Mixture	PP.	7.85 × 10 ⁸ a	7.87 × 10 ⁸ a	7.53 × 10 ⁸ ab	7.57 × 10 ⁸ ab	6.73 × 10 ⁸ b	7.23 × 10 ⁸ ab
	PA.	7.35 × 10 ⁹ a	7.30 × 10 ⁹ a	7.17 × 10 ⁹ a	7.17 × 10 ⁹ a	6.80 × 10 ⁹ a	7.03 × 10 ⁹ a
	BS.	8.01 × 10 ⁸ a	8.00 × 10 ⁸ a	7.57 × 10 ⁸ a	7.50 × 10 ⁸ a	6.87 × 10 ⁸ a	7.07 × 10 ⁸ a

注:同行不同字母表示不同土壤间有显著性差异 ($p < 0.05$, Duncan test) Note: Numbers in a row followed by different letters indicate significant difference between soils at 0.05 probability levels based on Duncan 0.05

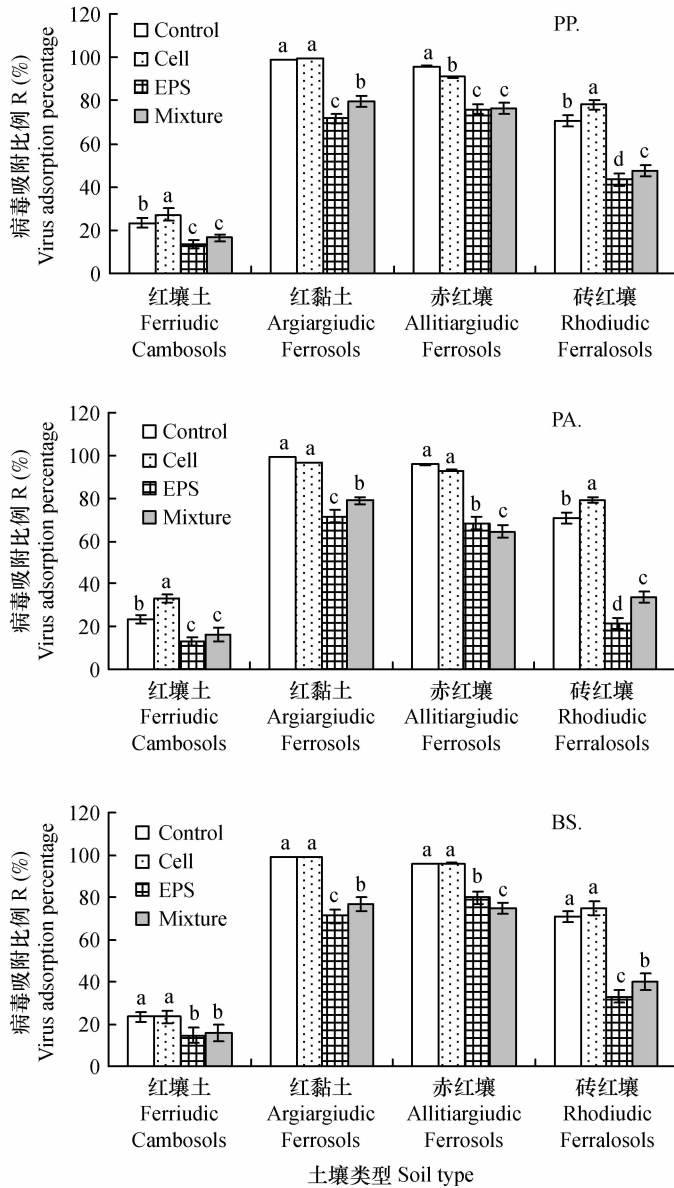
2.3 细菌存在对不同土壤中病毒去向的影响

土壤类型(S)、菌株类型(B)、菌株组成部分,即菌体或EPS或它们的混合(C)、及它们之间的相互作用的三元方差分析结果显示,尽管所有因子均显著影响土壤对病毒的吸附,但土壤类型、菌株组成部分及它们的交互作用能解释病毒吸附变异的98.17%,表明在本研究条件下,3菌株对土壤吸附病毒的影响相似(图1)。

图1结果显示4种土壤中,红黏土对病毒的吸附能力最强,其次为赤红壤、砖红壤、红壤土,在没有外界因素影响条件下它们对病毒的吸附量分别达到99.10%、95.71%、70.82%、23.40%。

对每种土壤而言,细菌存在对病毒吸附的影响可明显分成两组:第一组为对照和添加细胞悬液处理,第二组为添加EPS悬液和混合悬液处理,其中

第一组的病毒吸附量显著高于第二组。尽管组内(即Control和Cell之间,EPS和Mixture之间)在某些情形下存在统计学上的显著性差异,但该差异与组间的差异相比显得微不足道(图1)。在红壤土和砖红壤上,PP.和PA.菌株的细胞悬液处理能促进病毒吸附,并达到显著性差异(图1)。4种土壤EPS处理平均降低病毒吸附36%左右,其变幅为16%~70%;而添加混合悬液处理平均降低病毒吸附30%左右,其变幅为19%~53%。上述结果表明,环境中菌体细胞存在对红壤吸附病毒影响很小,某些土壤甚至有增加病毒吸附的趋势,但添加EPS悬液和混合悬液处理显著降低病毒吸附量;由于实际情况为菌体及其分泌物同时存在,因而细菌存在可减弱土壤对病毒的吸附能力,其减弱行为主要由细菌的分泌物EPS导致。



注: 每一菌株相同土壤上不同字母表示处理间差异显著 ($p < 0.05$, Duncan test); Control、Cell、EPS、Mixture 分别表示对照处理和添加细胞悬液、EPS悬液和混合悬液的处理 Note: Different letters affixed to strains of bacteria in the same soil indicate significant difference based on Duncan 0.05. Control, Cell, EPS and Mixture stands for treatment of control, cell suspension, EPS suspension, and combined cell/EPS suspension, respectively

图1 不同处理对土壤吸附病毒的影响

Fig. 1 Virus adsorption by soils as affected by treatment

3 讨论

3.1 土壤性质的影响

本研究使用的4种土壤的病毒吸附能力由大到小的排列顺序为红黏土、赤红壤、砖红壤、红壤土。与其他3种土壤相比,红壤土的黏粒含量最低,比表面积为其他土壤的1/4~1/6,Fe、Al氧化物含量为其他土壤的1/3~1/15(表1),这可能均是导致其

对病毒吸附能力在4种土壤中最主要的原因,因为已有研究表明比表面积和Fe、Al氧化物含量均与病毒吸附成正比^[22-24];与此相反,红黏土和赤红壤的这些性质均有利于病毒吸附(表1),另一方面,红黏土的最低可溶性有机质(DOC)含量也是导致其有利于病毒吸附的主要原因(表1),因为 ϕ X174为相对亲水性病毒,DOC存在可能与病毒竞争土壤颗粒表面的吸附位点从而导致病毒的吸附量降低,但对疏水性病毒而言(比如MS2),DOC存在有可能增

加病毒吸附量^[6,9];尽管砖红壤的黏粒含量、比表面积及 Fe、Al 氧化物含量均为 4 种土壤中最高的, DOC 含量也介于赤红壤和红壤土之间(表 1),但其病毒吸附能力也介于赤红壤和红壤土之间的现象好像与上述讨论不符合(图 1),其原因可能与其较高 pH 有关,本研究的 4 种土壤中,赤红壤的 pH 最低,而砖红壤最高,土壤 pH 被认为是影响病毒吸附的主要因素之一,pH 升高,一方面降低病毒吸附量,另一方面还有可能增加病毒的解吸量^[8]。

3.2 EPS 的影响

在土壤-病毒-EPS 混合系统(即 EPS 处理)中,病毒与土壤颗粒之间的作用力为静电吸引和范德华力^[5],而 EPS 主要通过静电吸引被黏土矿物和 Fe 氧化物吸附^[25]。此外,病毒也可能被 EPS 灭活(未发表数据),其潜在机理包括 EPS 直接抑制病毒生长,和/或 EPS 中的一些酶对病毒的直接致死作用^[26-28]。因而,混合系统中 EPS 存在一方面可降低土壤对病毒吸附,其原因与环境中可溶性有机碳存在阻碍病毒吸附的机理相似,主要包括(1)与病毒竞争土壤颗粒表面的吸附位点,(2)空间位阻作用^[29-30];另一方面由于 EPS 对病毒的灭活又有可能提高病毒的消亡。本研究结果显示,在所研究的 4 种土壤中,3 株细菌的 EPS 均显著降低病毒吸附能力(图 1),表示 EPS 抑制病毒吸附的效应超过 EPS 本身的消亡效应,从而总体表现出 EPS 降低土壤对病毒的吸附。

由于本研究所用的土壤 pH 在 3.61 ~ 4.56 之间并且富含 Fe、Al 氧化物(表 1),它们的等电点分别可达约 8.3 和 9.0,并通常覆盖在土壤颗粒表面^[8-9];另一方面, ϕ X174 的等电点为 6.6^[17],EPS 的大部分功能团在 pH < 2 时质子化,并随着 pH 升高其带负点现象越发明显^[31],因此,在本研究条件下,EPS 通常带负电荷,病毒和 Fe、Al 氧化物带正电荷,其中病毒带的正电荷应该较 Fe、Al 氧化物的正电荷弱,这表明通过静电吸附 EPS 较病毒更容易被土壤颗粒表面的金属氧化物所吸附,进一步解释了 EPS 抑制土壤吸附病毒的现象。

3.3 菌体细胞的影响

在土壤-病毒-菌体细胞混合系统(即 Cell 处理)中,病毒和菌体细胞均有可能被土壤颗粒吸附^[5,32],但在本研究条件下,菌体细胞被土壤吸附大多呈可逆吸附状或在溶液中呈游离状(表 3)。本研究所有的病毒也有可能被 PP、PA、BS 菌体细胞吸附(未发表数据),但病毒存在对菌体细胞存活没有显著

影响(表 3)。3 株细菌的菌体细胞在大部分情况下对土壤吸附病毒的影响没有显著性差异(图 1),有两个可能机理:(1)菌体细胞和病毒之间几乎没有竞争吸附位点现象存在,(2)菌体细胞与病毒之间有可能通过竞争吸附位点而降低病毒吸附量,但降低部分被菌体细胞本身吸附的病毒量所抵消,从而同样在表观上表现出菌体细胞对土壤吸附病毒没有影响。但在红壤土和砖红壤上,PP 和 PA 菌体细胞促进病毒吸附的现象可能主要由于在这两种土壤存在时,菌体细胞和病毒的吸附变得更为显著所致,具体由哪些土壤性质所导致值得进一步探讨。

3.4 不同菌株类型的影响

三元方差分析结果显示菌株类型及其与土壤类型、细菌不同组成部分的交互作用对土壤吸附病毒的贡献不到 1%,说明本研究所用的 3 菌株类型对土壤吸附病毒的影响很小,这可能与 3 菌株具有相近 EPS 含量有关(表 2)。Subramanian 等^[11]认为 EPS 含量相近,表示不同菌株的代谢活性类似。尽管表 1 表明在稳定期 3 菌株的活菌数量有差异(表 2),但由于菌体细胞对土壤吸附病毒的影响很小(图 1),因而本研究条件下没有发现细菌浓度与病毒吸附之间的关系。

4 结论

本研究结果表明不同红壤对病毒的吸附能力差异较大,在没有外界条件存在的情况下红黏土和赤红壤吸附病毒能力最强,分别达 99.10% 和 95.71%;而砖红壤和红壤土则分别只有 70.82% 和 23.40%。环境中细菌存在显著降低它们对病毒的吸附能力,降幅达 30% 左右,其中细菌胞体的影响很小,甚至在某种土壤上还有促进红壤吸附病毒的趋势,但细菌分泌的胞外聚合物(EPS)的存在则显著降低病毒吸附量。综上所述,细菌存在降低土壤吸附病毒的现象主要由 EPS 导致。由于环境中病毒存在通常伴随细菌以及一些可溶性有机质(DOM)同时存在,而已有研究表明 DOM 同样有可能阻碍病毒吸附,因而在选择基于吸附机理的病毒去除材料或去除方法的建立时需要考虑它们对去除效率的负面影响,同时需要考虑 EPS 和 DOM 是否存在叠加或协同负效应。尽管本研究所用的 3 菌株对红壤吸附病毒的影响类似,但需要进一步扩展细菌种类来证实,基于本研究结果,尤其需要从不同菌株间分泌 EPS 的量及其不同理化性质层面

上来考虑。

参 考 文 献

- [1] 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
- [2] Bradford S A,Tadassa Y F,Jin Y. Transport of coliphage in the presence and absence of manure suspension. Journal of Environmental Quality,2006,35(5):1692—1701
- [3] Koivunen J,Heinonen-Tanski H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants,UV irradiation and combined chemical/UV treatments. Water Research, 2005, 39 (8): 1519—1526
- [4] Omoike A,Chorover J,Kwon K D,et al. Adhesion of bacterial copolymers to r-FeOOH:Inner-sphere complexation of phosphodiester groups. Langmuir,2004,20(25):11108—11114
- [5] Jin Y,Flury M. Fate and transport of viruses in porous media. Advances in Agronomy,2002,77:39—102
- [6] Schijven J F,Hassanizadeh S M. Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2000, 30 (1):49—127
- [7] Kim S B,Corapcioglu M Y,Kim D J. Effect of dissolved organic matter and bacteria on contaminant transport in riverbank filtration. Journal of Contaminant Hydrology,2003,66(1/2):1—23
- [8] Zhao B Z,Zhang H,Zhang J B,et al. Virus adsorption and inactivation in soil as influenced by autochthonous microorganisms and water content. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40 (3): 649—659
- [9] Zhang H,Zhang J B,Zhao B Z,et al. Removal of bacteriophages MS2 and phiX174 from aqueous solutions using a red soil. Journal of Hazardous Materials,2010,180(1/3):640—647
- [10] Liu H,Fang H H P. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 80 (7): 806—811
- [11] Subramanian S B,Yan S,Tyagi R D,et al. Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. Water Research,2010,44(7):2253—2266
- [12] Chu Y,Jin Y,Flury M,et al. Mechanisms of virus removal during transport in unsaturated porous media. Water Resources Research,2001,37(2):253—263
- [13] 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. Environmental Science & Technology,2002,36(11):2403—2413
- [14] You Y,Han J,Chiu P C,et al. Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron. Environmental Science & Technology,2005,39(23):9263—9269
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京:中国农业科技出版社,2000:205—226. Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press,2000:205—226
- [16] Omoike A,Chorover J. Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. Geochimica et Cosmochimica Acta,2006,70(4):827 - 838
- [17] 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. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(2):405—410
- [18] 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(2):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(2):297—300
- [19] 张辉,赵炳梓,张佳宝,等. 气-水界面对病毒静态吸附实验结果的影响. 环境科学,2007,28(12):2800—2805. Zhang H, Zhao B Z, Zhang J B, et al. Virus adsorption from batch experiments as influenced by air-water interface (In Chinese). Environmental Science,2007,28(12):2800—2805
- [20] 蒋艳,赵炳梓. 细菌生长过程中的病毒消失行为研究. 土壤,2013,45(3):522—528. Jiang Y,Zhao B Z. Effects of bacterial growth process on virus removal (In Chinese). Soils,2013,45(3):522—528
- [21] Hassen A,Jerbouli Z,Cherif M,et al. Impact of heavy metals on the selective phenotypical markers of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Ecology,2001,42(1):99—107
- [22] Burge W D,Enkiri N K. Adsorption kinetics of bacteriophage ϕ X174 on soil. Journal of Environmental Quality,1978,7(4):536—541
- [23] Moore R S,Taylor D H,Reddy M M,et al. Adsorption of reovirus by minerals and soils. Applied and Environmental Microbiology, 1982,44(4):852—859
- [24] Ryan J N,Elimelech M. Colloid mobilization and transport in groundwater. Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects,1996,107:1—56
- [25] Cao Y,Wei X,Cai P,et al. Preferential adsorption of extracellular polymeric substances from bacteria on clay minerals and iron oxide. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 83 (1): 122—127
- [26] Berggren I,van Vuurde J W L,Mårtensson A M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. Viceae. Applied Soil Ecology,2001,17(2):97—105
- [27] Callan J R,Hartmann F A,West S E,et al. Cleavage of Influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. Journal of Virology,1997,71(10):7579—7585
- [28] Nasser A M,Glozman R,Nitzan Y. Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil. Water Research,2002,36(10):2589—2595
- [29] Bradyv-Estévez A S,Schnoor M H,Vecitis C D,et al. Multiwalled

- Carbon Nanotube Filter: Improving viral removal at low pressure. *Langmuir*, 2010, 26(18):14975—14982
- [30] Brady-Estévez A S, Nguyen T H, Gutierrez L, et al. Impact of solution chemistry on viral removal by a single-walled carbon nanotube filter. *Water Research*, 2010, 44(13):3773—3780
- [31] Martinez R E, Smith D S, Kulczycki E, et al. Determination of intrinsic bacterial surface acidity constants using a Donnan shell model and a continuous pKa distribution method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 253(1):130—139
- [32] Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(2):287—292

VIRUS ADSORPTION ONTO RED SOIL AS INFLUENCED BY ADDITIONAL BACTERIA

Zhao Bingzi[†] Jiang Yan

(*State Experimental Station of Agro-Ecosystem in Fengqiu, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

Abstract Viruses usually exist simultaneously with various dissolved organic matter, inorganic colloids, and microbial cells in wastewater, while little has been done on effects of microbial cells and their exudates on fate of viruses in the environment. In this study, bacterial cells were harvested and their exuded extracellular polymeric substances (EPS) were extracted from the media that had been used to cultivate three typical strains of bacteria. The aim is to (1) compare red soils in virus adsorption capacity; (2) investigate effect of the presence of the bacteria on virus adsorption onto the red soils; and (3) evaluate relative contributions of the bacterial cells and their exuded EPS to the effect. Results show that among the four kinds of sterilized red soils, Argiargiudic Ferrosols and Allitiargiudic Ferrosols was the highest in virus adsorption capacity, Rhodiudic Ferralosols followed, and Ferriudic Cambosols lagged behind, being the lowest. The presence of bacterial cells did not have much effect on the adsorption, and in a certain kind of red soil it displayed a promotive trend. However, the presence of EPS alone or of cells and EPS simultaneously significantly reduced virus adsorption capacities of all the four studied soils, by 36% or 30%, respectively, which indicates that the effect of the presence of bacteria reducing virus adsorption by the soils is attributed mainly to the EPS bacteria exude. The findings demonstrate that it is essential to take into account the presence of bacteria and its effect in assessing virus adsorption capacity of a certain medium. Otherwise, it is very likely to have it overestimated.

Key words Virus adsorption; Red soil; Bacterial cell; Extracellular polymeric substances (EPS)

(责任编辑:檀满枝)