气-水界面对病毒静态吸附实验结果的影响

张辉[1,2]，赵炳梓[1*]，张佳宝[1]，张丛志[1,2]，王秋英[1]，陈吉[1,2]
(1.中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室封丘农田生态系统国家试验站，南京 210008；2.中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要：气-水界面存在可能导致不能正确评价土壤对病毒的静态吸附能力.本研究通过室内一次平衡法实验，比较分析气-水界面对噬菌体 MS2 在不同处理(非灭菌/灭菌)的不同土壤中的吸附实验结果影响，同时评价不同程度气-水界面对没有土壤存在时的病毒回收率影响.结果表明，气-水界面存在对吸附实验结果的影响在砂质潮土上最为明显，其次为红壤土，而在红粘土上的影响几乎可忽略，这可能与土壤本身吸附/致死病毒的能力不同有关；土壤灭菌后进一步加剧气-水界面对砂质潮土吸附实验结果的偏差，而在红壤土上则有减弱趋势.气-水界面存在显著降低空白实验病毒回收率，其降低趋势随气-水界面的增加而加剧，当加入土壤后，土壤颗粒有可能阻止病毒接近气-水界面或改变病毒吸附在固-液-气界面的力量，因而气-水界面存在时的空白实验结果并非为真正的空白实验结果，这可能是导致气-水界面引起静态吸附实验结果偏差的主要原因.

关键词：MS2；土壤；气-水界面；静态吸附
中图分类号：X53 **文献标识码**：A **文章编号**：0250-3301(2007)12-2800-06

Virus Adsorption from Batch Experiments as Influenced by Air-Water Interface

ZHANG Hui[1,2], ZHAO Bing-zi[1], ZHANG Jia-bao[1], ZHANG Cong-zhi[1,2], WANG Qiu-ying[1], CHEN Ji[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. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The presence of air-water interface in batch sorption experiments may result in inaccurate estimation of virus adsorption onto various soils. A batch sorption experiment was conducted to compare the adsorption results of MS2 in different soils under presence/absence of air-water interface. Soils with sterilization/nonterilization treatment were used. Virus recovery efficiency in a blank experiment (no soil) was also evaluated as affected by different amount of air-water interface. The presence of air-water interface altered the results of virus adsorption in different soils with different extent, with Sandy fluvo-aquic soil being the most considerably affected, followed by Red loam soil, and the least being Red clay soil, probably because of different soil properties associated with virus adsorption/inactivation. Soil sterilization resulted in more significant difference of virus adsorption onto the Sandy fluvo-aquic soil between the presence and absence of air-water interface, while a reduced difference was observed in the Red loam soil. The presence of air-water interface significantly decreased virus recovery efficiency, with the values being decreased with increase in the amount of air-water interface. Soil particles likely prohibit viruses from reaching the air-water interface or alter the forces at the solid-water-air interface so that the results from the blank experiment did not truly represent results from control blank, which probably resulted in adsorption difference between presence and absence of the air-water interface.

Key words: MS2; soils; air-water interface; adsorption

病毒比细菌和原生动物包囊小，在土壤剖面的移动性相对较容易，同时病毒更能抵抗各种消毒手段，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囊要小，而随水分迁移进入土壤深层和地下水系统的可能性要大[1,2].已有研究表明病毒在很低的含量范围内就会对人类健康造成威胁[2,3].因此正确评价土壤对病毒的“自然净化”能力成为当今众多研究者关注的热点.

土壤对病毒的吸附能力在很大程度上决定着土壤对病毒的“自然净化”能力，影响病毒在土壤中吸附因素很多，比如：土壤类型、病毒类型、温度、pH、离子强度、有机质、土壤含水量和铁铝氧化物等.国外有关于这方面的研究已经开展了几十年[4~10]，而我国在该领域的研究才刚起步[11~14].

一次平衡法实验是定量研究不同土壤吸附病毒能力的主要方法，通常通过差减法获得土壤对病毒的吸附量，包括被吸附病毒量和死亡病毒量.Thompson 等[15,16]首次发现在一次平衡法实验中由于气-水界面的存在，导致空白实验中(不加土壤)病毒损失量高于土壤存在时病毒吸附量.由此引起各国科学家对气-水界面导致的病毒去向研究领域的极大兴趣[17~20].

收稿日期：2007-01-13；**修订日期**：2007-04-24
基金项目：国家自然科学基金项目(40471063)；江苏省青年科技创新人才项目(BK2007535)
作者简介：张辉(1983～)，女，博士研究生，主要研究方向为土壤中病毒行为，E-mail：hzhang@issas.ac.cn
* 通讯联系人，E-mail：bzhao@issas.ac.cn

土壤中铁、铝氧化物含量是导致病毒失活的主要因素之一,尽管它们在土壤中的含量可能比较低,但它们往往包裹在土壤颗粒表面,可通过强大的静电吸引导致病毒死亡,因此,少量的铁、铝氧化物含量即可导致病毒以数量级死亡[7,9,21].另外,目前已有报道指出,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,并随其他条件的变化而变化[22~24],然而,在不同铁、铝氧化物含量、不同处理(即灭菌/不灭菌处理)土壤上,比较研究气-水界面对病毒吸附实验结果的影响鲜有报道.

本研究选择噬菌体 MS2 为指示病毒,选择质地和铁、铝氧化物含量差别比较明显的 3 种土壤经过灭菌和不灭菌处理后为对象,采用一次平衡法为手段,其主要目的为:①气-水界面在不同性质土壤上对病毒的吸附实验结果的影响;②土壤中土著微生物对气-水界面存在条件下土壤吸附病毒实验结果的影响.同时,对不同程度气-水界面存在对病毒回收率的影响也进行了系统比较.

1　材料与方法

1.1　供试土壤

供试土壤分别为河南封丘黄泛母质上发育的砂质潮土、江西鹰潭红色砂岩上发育的红壤土和江西鹰潭第四纪红色粘土上发育的红粘土,它们基本理化性质见表 1,所有土样采自表层 0 ~ 15 cm,经风干、过 2 mm 筛、备用.

灭菌土壤: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 ~ 48 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备用.

表 1　土壤基本理化性质

Table 1　Soil physical and chemical properties

土壤	采集地点	pH	有机质 /g•kg^{-1}	CEC /mmol•kg^{-1}	土壤质地			游离 Fe_2O_3 /g•kg^{-1}	游离 Al_2O_3 /g•kg^{-1}	无定型 Fe_2O_3 /g•kg^{-1}	无定型 Al_2O_3 /g•kg^{-1}
					砂粒	粉粒	粘粒				
砂质潮土	河南封丘	8.05	4.43	44.02	92.45	2.18	5.37	8.25	1.44	0.47	0.35
红壤土	江西鹰潭	5.13	2.84	33.35	39.80	50.37	9.83	11.67	4.96	0.56	1.17
红粘土	江西鹰潭	4.30	4.32	99.62	35.62	25.45	38.93	28.94	7.63	1.33	2.64

1.2　病毒样品及检测方法

在本研究中采用的 MS2(编号 ATCC 15597B1),其宿主细菌 *Escherichia coli*(编号为 ATCC 15597)购自美国的 American Type Culture Collection(ATCC).MS2 为二十面体单链 RNA 噬菌体(ss-RNA),其直径约 26 nm[25],等电点 pI 为 3.9[26],在一般自然环境的 pH 条件下,MS2 的表面带负电荷.实验培养基的配置材料及配置方法见文献[11],该噬菌体大量扩增采用室内实验"高复数感染"方法,其定量检测采用双层平板法,具体操作见文献[12],实验的最后计数结果采用噬菌斑形成单位(plaque forming unit,pfu)表示.

1.3　一次平衡法实验

(1)气-水界面不存在时(即当离心管全部充满时)对土壤吸附病毒的影响　在 50 mL 聚丙烯离心管中进行,每个离心管中加 34 g 风干过筛(2 mm)后的土样和约 34 mL 不同浓度的噬菌体悬液,每种噬菌体在浓度为 $10^1 \sim 10^9$ pfu•mL^{-1} 范围内选择 6 个浓度等级,所有实验做 3 次重复和 1 次空白,空白实验离心管中充满噬菌体悬液.加样的离心管水平放置于恒温(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.

(2)气-水界面存在时(即当离心管部分充满时)对土壤吸附病毒的影响　在 50 mL 聚丙烯离心管中进行,每个离心管中加 10 g 风干过筛(2 mm)后的土样和 10 mL 不同浓度的噬菌体悬液,每种噬菌体在浓度为 $10^1 \sim 10^9$ pfu•mL^{-1} 范围内选择 6 个浓度等级,所有实验做 3 次重复和 1 次空白,空白实验只加 10 mL 噬菌体悬液.加样的离心管竖直放置于恒温(4℃)恒速(300 r•min^{-1})条件下的振荡培养箱(HZ-9310K,中国太仓)中连续往复振荡培养 3 h,其余操作同实验(1).

(3)不同程度气-水界面(即不加任何土壤时)对病毒回收率的影响　在 50 mL 聚丙烯塑料离心管中进行,每个离心管中分别加入 10、25 和 50 mL 的噬菌体 MS2 悬液,将离心管分别竖直放置和水平放置于恒温(4℃)恒速(300 r•min^{-1})条件下的振荡培养箱(HZ-9310K,中国太仓)中连续往复振荡培养 3 h,其余操作同实验(1).

土壤对病毒的吸附比例(R)和相对吸附量(c_s)用下列公式计算.

$$R = (c_i - c_1) \times 100/c_i \quad (1)$$

$$c_s = (c_i - c_1)/M \quad (2)$$

式中,R、c_i、c_1、c_s 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}).

病毒回收率(R_1)的计算公式为:

$$R_1 = c_1/c_0 \quad (3)$$

式中,R_1、c_1、c_0 分别表示病毒的回收率(%)、振荡培养后回收的病毒浓度(pfu·mL^{-1})、加入的初始病毒浓度(pfu·mL^{-1}).

2 结果与讨论

2.1 气-水界面对土壤中病毒吸附实验结果的影响

当不存在气-水界面时,空白处理(不加土壤)病毒浓度与加入的起始病毒浓度几乎相等(具体实验数据没有标出).表明实验用试管壁对病毒吸附影响可以忽略,因而该实验条件下计算得到的病毒吸附量均为通过土壤在固-液界面的吸附导致,可以认为是土壤对病毒的真正吸附量(包括致死量).

而当气-水界面存在时,空白处理(不加土壤)病毒有不同程度的损失,其损失程度依加入起始病毒浓度的不同而有差异(具体实验数据没有标出).Rossi 等[20]认为气-水界面可导致病毒死亡,其主要原因是液体的表面张力和剧烈的振荡破坏了病毒的蛋白质外壳.Sim 等[27]也认为病毒吸附于气-水界面主要受病毒颗粒表面的疏水性、溶液的离子强度和电荷性质影响,且由于毛细管强大束缚力的存在,病毒吸附于气-水界面基本是不可逆的.而当加入土壤后,振荡过程使体系中气-水界面和气-液-固界面同时存在,粘粒或与粘粒大小相似的颗粒比较容易聚积在气-水界面[28],因此土壤中的粘粒可阻止病毒接近气-水界面而降低病毒死亡机率.另外,气-液-固界面对病毒的致死力也可能低于气-水界面对病毒的致死力,因而土壤颗粒可能有保护病毒的效应.由此可见,气-水界面存在时的空白实验结果并不能表示真正的空白结果,由此计算而来的土壤对病毒吸附结果也不能表示真正的吸附量.

2.2 不同性质土壤中病毒吸附实验结果受气-水界面的影响

在 2 种处理(非灭菌/灭菌)的砂质潮土和红壤土中,气-水界面存在显著影响了病毒吸附实验结果(病毒被吸附比例 R);而对红粘土来说,4 种条件下其对病毒的吸附比例均高达 99.9% 以上(表 2、3).可见,气-水界面对吸附实验结果的影响依土壤性质不同而异.

表 2、3 中结果为"0"的数值,按照公式 1 和 2 计算实际结果基本上为不同程度的负数,也就是出现了"负吸附"现象,即土壤样品处理后上清液病毒浓度高于空白处理的病毒浓度.进一步比较气-水界面存在与不存在之间的实验结果,其差异在砂质潮土上最大,其次为红壤土,而红粘土则几乎没有变化.即气-水界面对吸附实验结果的影响由大到小顺序依次为:砂质潮土、红壤土、红粘土.

这可能与土壤本身固有吸附病毒特性不同有关,砂质潮土的 pH 较高,而 pH 的高低与病毒吸附量之间存在负相关关系;而且砂质潮土砂粒含量达到 92.45%,而粘粒含量只有 5.37%,土壤质地比红壤土和红粘土轻,导致其比表面积比后 2 种土壤小;此外,砂质潮土的铁铝氧化物含量也低于后 2 种土壤(表 1),砂质潮土的这些性质都不利于其对病毒的吸附.而红粘土的 pH 低,且粘粒和铁、铝氧化物含量比较高(表 1),这些性质均有利于吸附/致死病毒,尤其是铁、铝氧化物,它们的含量高低是决定病毒死亡的主要因素之一,主要通过病毒颗粒和铁、铝氧化物之间的强静电吸引导致病毒颗粒碎裂而失去感染能力[19].气-水界面存在时,当病毒进入含有强吸附能力的土壤中,土壤和病毒颗粒之间的吸引力大大超过气-水界面对病毒的致死能力,以至于气-水界面对病毒致死的影响可以忽略.

Rossi[29]认为当病毒颗粒吸附于土壤时,降低了病毒接触气-水界面的机会,减少病毒由于界面而导致的失活.Chu 等[18]通过病毒在"活性"土壤(富含游离铁铝氧化物)和"惰性"土壤(去除游离氧化铁铝氧化物)中的迁移研究发现,低含水量情况下,"活性"土壤对病毒的去除主要因为土壤对病毒的吸附,而"惰性"土壤对病毒的去除则主要因为气-水界面对病毒的吸附.

2.3 土壤中土著微生物对气-水界面存在条件下土壤吸附病毒实验结果的影响

对砂质潮土来说,灭菌后进一步加大气-水界面存在和不存在之间的吸附实验结果的差别,而对红壤土来说,该差别有缩减的趋势,对红粘土则影响不大(表 3).如果以气-水界面不存在的吸附实验结果

为标准,比较表 2 和表 3 结果,灭菌可增加红壤土对病毒的吸附能力,这可能是灭菌后,导致病毒在气-水界面存在和不存在之间红壤土的吸附实验结果偏差减少的主要原因.

表 2　气-水界面对 MS2 在非灭菌土壤上的静态吸附实验结果影响[1)]

Table 2　Role of air-water interface on adsorption of MS2 to nonsterilized soils from batch experiments

类型	气-水界面不存在				气-水界面存在			
	c_i[2)] /pfu·mL^{-1}	c_l[3)] /pfu·mL^{-1}	R[4)] /%	c_s[5)] /pfu·g^{-1}	c_i /pfu·mL^{-1}	c_l /pfu·mL^{-1}	R /%	c_s /pfu·g^{-1}
砂质潮土	2.33×10^2	$(4.20\pm0.32)\times10^2$	0	0	1.09×10^2	$(3.54\pm0.45)\times10^2$	0	0
	2.10×10^3	$(2.49\pm0.15)\times10^3$	0	0	1.09×10^3	$(2.10\pm0.24)\times10^3$	0	0
	9.87×10^3	$(1.18\pm0.13)\times10^4$	0	0	1.09×10^4	$(1.44\pm0.16)\times10^4$	0	0
	2.20×10^5	$(2.28\pm0.18)\times10^5$	0	0	1.09×10^5	$(1.22\pm0.24)\times10^5$	0	0
	9.30×10^5	$(9.88\pm0.62)\times10^5$	0	0	1.09×10^6	$(1.18\pm0.16)\times10^6$	0	0
	9.85×10^6	$(1.16\pm0.21)\times10^7$	0	0	1.28×107	$(1.21\pm0.06)\times10^7$	6.01 ± 4.63	$(7.70\pm5.94)\times10^5$
红壤土	2.33×10^2	$(3.16\pm0.36)\times10^2$	0	0	1.16×10^2	$(2.54\pm0.70)\times10^2$	0	0
	2.10×10^3	$(1.50\pm0.52)\times10^3$	28.49 ± 17.18	$(5.98\pm5.20)\times10^2$	1.16×10^3	$(1.69\pm0.35)\times10^3$	0	0
	9.87×10^3	$(7.52\pm0.64)\times10^3$	23.76 ± 4.28	$(2.34\pm0.64)\times10^3$	1.16×10^4	$(2.35\pm1.12)\times10^4$	0	0
	2.20×10^5	$(1.52\pm0.12)\times10^5$	31.19 ± 4.42	$(6.88\pm1.19)\times10^4$	1.45×10^5	$(1.35\pm0.07)\times10^5$	7.06 ± 4.87	$(1.02\pm0.07)\times10^4$
	9.30×10^5	$(5.95\pm0.61)\times10^5$	36.02 ± 5.28	$(3.35\pm0.61)\times10^5$	1.45×10^6	$(1.13\pm0.15)\times10^6$	22.03 ± 9.98	$(3.20\pm1.45)\times10^5$
	9.85×10^6	$(7.28\pm0.21)\times10^6$	26.06 ± 1.94	$(2.57\pm0.21)\times10^6$	1.45×10^7	$(1.33\pm0.03)\times10^7$	8.43 ± 1.95	$(1.22\pm0.28)\times10^6$
红粘土	3.06×10^2	0	100	3.06×10^2	9.05×10^1	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^1$
	2.16×10^3	0	100	2.16×10^3	9.05×10^2	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^2$
	4.05×10^4	0	100	4.05×10^4	9.05×10^3	0	100	$(9.04\pm2.85)\times10^3$
	8.30×10^5	$(2.30\pm0.52)\times10^2$	99.97	8.30×10^5	9.05×10^4	$(2.00\pm1.76)\times10^1$	99.98 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^4$
	2.05×10^6	$(1.02\pm0.13)\times10^3$	99.95	2.05×10^6	9.05×10^5	$(2.87\pm2.48)\times10^2$	99.97 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^5$
	6.85×10^7	$(1.53\pm0.31)\times10^4$	99.98	6.85×10^7	9.05×10^6	$(2.65\pm2.37)\times10^3$	99.98 ± 0.02	$(9.04\pm2.85)\times10^6$

1) 平均值 ± 标准差; 2)c_i:空白处理的病毒浓度; 3)c_l:土壤样品处理后的上清液病毒浓度; 4)R:病毒被吸附的比例; 5)c_s:土壤对病毒的相对吸附量,下同

表 3　气-水界面对 MS2 在灭菌土壤上的静态吸附实验结果影响

Table 3　Role of air-water interface on adsorption of MS2 to sterilized soils from batch experiments

类型	气-水界面不存在				气-水界面存在			
	c_i /pfu·mL^{-1}	c_l /pfu·mL^{-1}	R /%	c_s /pfu·g^{-1}	c_i /pfu·mL^{-1}	c_l /pfu·mL^{-1}	R /%	c_s /pfu·g^{-1}
砂质潮土	7.80×10^2	$(1.44\pm0.20)\times10^3$	0	0	3.52×10^2	$(2.20\pm0.17)\times10^2$	37.58 ± 4.91	$(1.32\pm0.17)\times10^2$
	1.04×10^4	$(1.18\pm0.16)\times10^4$	0	0	3.52×10^3	$(1.27\pm0.10)\times10^3$	63.97 ± 2.74	$(2.25\pm0.10)\times10^3$
	2.76×10^4	$(4.28\pm0.16)\times10^4$	0	0	1.63×10^4	$(7.67\pm1.32)\times10^3$	52.89 ± 8.10	$(8.61\pm1.32)\times10^3$
	5.84×10^5	$(6.78\pm0.60)\times10^5$	0	0	1.63×10^5	$(4.49\pm1.26)\times10^4$	72.43 ± 7.73	$(1.18\pm0.13)\times10^5$
	1.40×10^6	$(1.83\pm0.23)\times10^6$	0	0	1.63×10^6	$(3.05\pm0.35)\times10^5$	81.28 ± 2.17	$(1.32\pm0.03)\times10^6$
	2.01×10^7	$(2.22\pm0.44)\times10^7$	0	0	1.63×10^7	$(2.96\pm0.07)\times10^6$	81.83 ± 0.43	$(1.33\pm0.01)\times10^7$
红壤土	5.94×10^2	$(3.40\pm1.32)\times10^2$	42.79 ± 16.92	$(2.54\pm1.32)\times10^2$	2.12×10^3	$(4.33\pm2.59)\times10^2$	79.63 ± 12.22	$(1.69\pm0.26)\times10^3$
	6.55×10^3	$(1.54\pm0.38)\times10^3$	76.43 ± 3.98	$(5.01\pm0.38)\times10^3$	2.12×10^4	$(2.72\pm0.78)\times10^3$	87.18 ± 3.67	$(1.85\pm0.08)\times10^4$
	2.76×10^4	$(1.55\pm0.50)\times10^4$	43.89 ± 11.90	$(1.21\pm0.50)\times10^4$	2.12×10^5	$(5.08\pm2.10)\times10^4$	76.10 ± 9.87	$(1.62\pm0.21)\times10^5$
	5.84×10^5	$(2.42\pm0.59)\times10^5$	58.50 ± 8.85	$(3.41\pm0.59)\times10^5$	2.12×10^6	$(6.04\pm1.16)\times10^5$	71.54 ± 5.48	$(1.52\pm0.12)\times10^6$
	1.40×10^6	$(5.08\pm0.40)\times10^5$	63.71 ± 2.29	$(8.91\pm0.40)\times10^5$	2.12×10^7	$(1.83\pm0.73)\times10^6$	91.40 ± 3.42	$(1.94\pm0.07)\times10^7$
	2.01×10^7	$(7.92\pm1.42)\times10^6$	60.52 ± 6.45	$(1.21\pm0.14)\times10^7$	2.12×10^8	$(2.87\pm1.04)\times10^7$	86.49 ± 4.92	$(1.84\pm0.10)\times10^8$
红粘土	2.16×10^3	0	100	2.16×10^3	2.12×10^3	0	100	2.12×10^3
	4.05×10^4	0	100	4.05×10^4	2.12×10^4	0	100	2.12×10^4
	8.30×10^5	0	100	8.30×10^5	2.12×10^5	0	100	2.12×10^5
	2.58×10^6	$(9.40\pm4.10)\times10^1$	100	2.58×10^6	2.12×10^6	0	100	2.12×10^6
	2.71×10^7	$(1.53\pm0.47)\times10^2$	100	2.71×10^7	2.12×10^7	0	100	2.12×10^7
	3.81×10^8	$(3.86\pm0.88)\times10^3$	100	3.81×10^8	2.12×10^8	$(2.94\pm1.90)\times10^5$	99.86 ± 0.09	$(2.11\pm0.01)\times10^8$

Rossi 等[20]的研究中指出,无法完全分离气-水界面的影响是一次平衡法实验的一个缺点;而 You 等[19]在做一次平衡法实验时也强调在加样时应尽可能地将反应容器充满,防止空气的进入,以减少

气-水界面对病毒失活的影响；Sim 等[27]指出了一次平衡法实验往往由于气-水界面的影响而得不到一致的实验结果，认为用土柱实验来研究土壤对病毒吸附和死亡的影响有更好的结果.当加入土壤时，土壤有阻止病毒接近气-水界面或改变病毒吸附在气-液-固界面的力量，从而与空白实验相比反而增加上清液病毒浓度，所以气-水界面存在时的空白实验结果并非为真正的空白结果，这就是实验结果出现“负吸附”的根本原因.而气-水界面导致的病毒死亡可能会妨碍正确评价一次平衡法实验中获取的土壤对病毒的吸附能力，从而妨碍正确评价不同土壤在环境中对病毒 的“自然净化”能力，因而一次平衡法实验时应尽量避免该因素对实验结果的影响，比较简单的方法是利用去除溶解气体的病毒悬液尽量充满实验容器.

2.4 不同程度气-水界面(即不加任何土壤时)对病毒回收率的影响

前面实验结果表明，气-水界面导致了土壤对病毒的“负吸附”现象.为了进一步明确不同程度气-水界面对病毒去向的影响，进行了以下研究.

表 4 表明，不存在气-水界面时，离心管在 2 种放置方式下，病毒回收率均可达到 100%.当离心管在竖直放置条件下，振荡只有少量气泡产生，即使离心管没有充满，即只装一半体积的病毒悬液(25 mL)时，依然可以 100%回收，当病毒悬液体积继续降低到 10 mL 时，病毒回收率尚接近 80%；而在水平放置条件下，气-水界面存在时的病毒回收率急剧下降，装 10 mL 和 25 mL 悬液的病毒回收率均不到 10%，并且随着气-水界面量的增加而降低，这是因为与离心管竖直放置相比，水平放置增加气-水界面量，进而增加病毒与气-水界面的接触机率，而且，水平放置振荡时产生的气泡量也比竖直放置时多，进一步增加了病毒接触气-水界面的机率.

Rossi 等[20]详细比较了噬菌体 T7 分别在聚丙烯、聚碳酸脂、聚四氟乙烯、硼硅酸盐和硅烷化材料上连续振荡情况下，气-水界面对病毒去向的影响，其结果为，3 h 连续振荡后，T7 的损失比例都超过 75%，特别是在聚丙烯、聚碳酸脂和聚四氟乙烯 3 种材料上的损失比例接近 100%，而在硼硅酸盐和硅烷化材料上的损失比例较前三者低；进一步研究噬菌体 T7 在连续振荡/间歇振荡情况下受气-水界面的影响，其结果显示，连续振荡下 T7 的损失率高于间歇振荡.可见，该实验结果和本研究相吻合.

上述研究结果同时也表明，当不存在气-水界面时，管壁对病毒几乎没有吸附，而气-水界面存在时的病毒损失主要由于病毒在气-水界面的死亡.进行室内一次平衡法实验时，振荡方式一般有往复式、回转式和滚动式几种，选择的原则是尽量能保证每一周期的振荡都能使固体和溶液充分接触，显然，滚动式是最佳的选择.国外已有的研究报道以采用滚动式的振荡方式为主[15,16,19]，所以在反应容器未充满的情况下，必然会对某些病毒的失活造成很大的影响，造成空白实验结果不能与土壤处理的实验结果相比较；而我国现有的普通实验室条件下多采用往复式和回转式的振荡方式，所以即使在反应容器未充满的条件下，当振荡不产生大量气泡时，由于降低了病毒与气-水界面接触的可能性，从而不会造成空白实验中病毒(如 MS2)的大量损失.由此可见，具体实验结果要依不同条件来讨论.

表 4 不加土壤时一次平衡法实验中 MS2 的回收率[1)]

Table 4 MS2 recovery efficiency from batch experiments (without soil)

振荡方式	V[2)] /mL	c_1[3)] /pfu·mL^{-1}	R_1[4)] /%
竖直放置	10	$(1.29 \pm 0.16) \times 10^5$	79.93 ± 9.77
	25	$(1.62 \pm 0.28) \times 10^5$	100
	50	$(1.75 \pm 0.16) \times 10^5$	100
水平放置	10	$(3.57 \pm 2.71) \times 10^1$	0.02 ± 0.02
	25	$(1.06 \pm 0.50) \times 10^4$	6.58 ± 3.08
	50	$(1.70 \pm 0.14) \times 10^5$	100

1)加入的初始病毒浓度 $c_0 = 1.62 \times 10^5$ pfu·mL^{-1}；2)V：加入的噬菌体悬液的体积；3)c_1：振荡培养后的病毒浓度；4)R_1：病毒的回收率

3 结论

(1)一次平衡法实验是评价土壤对病毒吸附能力的常用方法，由于气-水界面有致死病毒作用，而土壤可能能够保护病毒，降低气-水界面对病毒致死的影响，所以实验过程中存在气-水界面时，导致空白实验结果与经过土壤样品处理后的实验结果产生偏差，妨碍正确评价土壤对病毒的吸附能力.

(2)气-水界面对吸附实验结果的影响随土壤性质不同而有显著差异，其差异由大到小依次为：砂质潮土、红壤土、红粘土.红粘土吸附实验结果受气-水界面影响很小，所以即使在气-水界面存在时，其静态吸附实验结果依然能代表真正的病毒吸附量.

(3)土壤灭菌处理后，对砂质潮土来说，进一步加大气-水界面存在和不存在之间的吸附实验结果的差别；而对红壤土来说，该差别有缩减的趋势；对红粘土则影响不大.

(4)在空白实验(不加土壤时)中，病毒回收率随

气-水界面程度的增加而显著降低.为了正确评价不同土壤介质对病毒吸附能力的强弱，采用一次平衡法实验时应尽量避免气-水界面存在，以使空白实验和处理实验条件的一致.

参考文献：

[1] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京：高等教育出版社，1993.

[2] Quanrud D M，Carroll S M，Gerba C P，*et al*. Virus removal during simulated soil-aquifer treatment[J]. Water Res，2003，**37**：753～762.

[3] Macler B A，Merkle J C. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control[J]. Hydrogeol J，2000，**8**：29～40.

[4] Chu Y J，Jin Y，Baumann T，*et al*. Effect of soil properties on saturated and unsaturated virus transport through columns[J]. J Environ Qual，2003，**32**：2017～2025.

[5] Moore R S，Taylor D H，Sturman L S，*et al*. Poliovirus Adsorption by 34 Minerals and Soils[J]. Appl Environ Microbiol，1981，**42**(6)：963～975.

[6] You Y W，Vance G F，Sparks D L，*et al*. Sorption of MS2 bacteriophage to layered double hydroxides：effect of reaction time，pH，and competing anion[J]. J Environ Qual，2003，**32**：2046～2053.

[7] Jin Y，Flury M. Fate and transport of viruses in porous media[J]. Adv Agron，2002，**77**：39～102.

[8] Sobsey M D，Dean C H，Knuckles M E，*et al*. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials[J]. Appl Environ Mocrobiol，1980，**40**(1)：92～101.

[9] Zhuang J，Jin Y. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns：Effects of ionic strength and composition[J]. J Contam Hydrol，2003，**60**：193～209.

[10] Moore R S，Taylor D H，Reddy M M M，*et al*. Adsorption of reovirus by minerals and soils[J]. Appl Environ Microbiol，1982，**44**(4)：852～859.

[11] 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作用[J]. 土壤学报，2007，**44**(5)：808～816.

[12] 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[J]. 土壤，2007，**39**(2)：297～300.

[13] 赵炳梓，张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为[J]. 土壤学报，2006，**43**：306～313.

[14] 张丛志，赵炳梓，张佳宝，等.我国典型土壤对病毒等温静态吸附的数值模拟[J].环境科学，2007，**28**(8)：1835～1840.

[15] Thompson S S，Flury M，Yates M V，*et al*. Role of the air-water-solid interface in bacteriophage sorption experiments[J]. Appl Environ Microbiol，1998，**64**(1)：304～309.

[16] Thompson S S，Yates M V. Bacteriophage inactivation at air-water-solid interface in dynamic batch systems[J]. Appl Environ Microbiol，1999，**65**(3)：1186～1190.

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

[18] Chu Y J，Jin Y，Flury M，*et al*. Mechanisms of virus removal during transport in unsaturated porous media[J]. Water Resour Res，2001，**37**(2)：253～263.

[19] You Y W，Han J，Chiu P C，*et al*. Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron[J]. Environ Sci Technol，2005，**39**(23)：9263～9269.

[20] Rossi P，Aragno M. Analysis of bacteriophage inactivation and its attenuation by adsorption onto colloidal particles by batch agitation techniques[J]. Can J Microbiol，1999，**45**：9～17.

[21] Gerba C P. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces[J]. Adv Appl Microbiol，1984，**30**：133～168.

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

[23] Hurst C J，Gerba C P，Cech I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil[J]. Appl Environ Microbiol，1980，**40**(6)：1067～1079.

[24] Bagdasaryan G A. Survival of viruses of the enterovirus group (poliomyelitis，echo，coxsackie) in soil and on vegetables[J]. J Hyg Epid Microbiol Immunol，1964，**8**：497～505.

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

[26] Zerda K S. Adsorption of viruses to charge-modified silica[D]. Houston：Baylor College of Medicine，1982.

[27] Sim Y，Chrysikopoulos C V. Virus transport in unsaturated porous media[J]. Water Resour Res，2000，**36**(1)：173～179.

[28] Wan J，Wilson J L. Colloid transport and the gas-water interface in porous media[A]. In：Sabatini D A，Knox R C. Transport and remediation of subsurface contaminants[C]. Washington DC：American Chemical Society，1992. 55～70.

[29] Rossi P. Advances in biological tracer techniques for hydrology and hydrogeology using bacteriophages[D]. Switzerland：University of Neuchatel，1994.