

细菌生长过程中的病毒消失行为研究^①

蒋 艳^{1,2}, 赵炳梓^{1*}

(1 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), 封丘农田生态系统国家实验站, 南京 210008;

2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 环境中土著微生物存在及微生物的不同生长阶段可能影响病毒去向。本研究选择自然界广泛存在的 3 株细菌: 恶臭假单胞菌(PP)、铜绿假单胞菌(PA)、枯草芽孢杆菌(BS)为微生物代表, 以噬菌体 ϕ X174 为指示病毒, 通过 30°C(PP)和 35°C(PA 和 BS)条件下病毒与细菌同步生长的培养实验和 4°C条件下病毒与不同生长时段的菌株培养物的静态吸附实验, 比较分析了细菌生长发育阶段对病毒消失(包括可逆/不可逆吸附和消亡)的影响。培育实验结果表明, 病毒在 30°C 和 35°C 培养基中的浓度随着培育时间持续降低; 但当培养基中接菌时, 病毒浓度从接种至对数期 6 h 间急剧降低, 降低幅度超过对照处理, 其中在 BS 处理中降幅最大, 其次为 PA 和 PP 处理; 随着细菌由对数期进入稳定期和衰亡期, 病毒浓度先反弹升高, 然后持续降低, 反弹最高点病毒浓度在 3 菌株处理中均高于各自对照处理, 反弹持续时间和病毒浓度的反弹提升程度依不同菌株而异。静态实验结果表明, 菌株培养物的培育时间从 6 h 延长至 18 h 时, 病毒的消失比例逐渐降低, 继续延长至 24 h 时又迅速升高, 然后随着培育时间的进一步延长而持续降低。以上结果表明细菌对病毒消失的影响随细菌生长发育阶段和菌种而异, 暗示在研究病毒在环境中去向时, 必须考虑环境中本土微生物的存在及其组成。

关键词: 恶臭假单胞菌; 铜绿假单胞菌; 枯草芽孢杆菌; 噬菌体 ϕ X174; 消失

中图分类号: S154.3

病毒的粒径(大约 0.01 ~ 0.1 μm)比较小、容易在环境中迁移, 再加上病毒对通常的消毒方法(比例加氯消毒)不敏感、其在很低的浓度范围内即可对人类健康构成威胁。因而病毒在环境中的去向越来越引起各国科学家的关注。美国环境署规定对饮用水中病毒含量的标准为: 每万立方水中含有的病毒颗粒不超过 2 个, 这样可使年感染的风险降低到低于万分之一的水平^[1]。

影响病毒在环境中去向的因素很多, 比如土壤类型、病毒类型、pH、离子强度和多价阳离子、有机质、温度、土壤含水量、微粒、土著微生物活动等^[2], 其中土著微生物存在对病毒去向的影响往往被忽视, 有限的一些研究结果大都在比较灭菌/不灭菌这样的极端条件下获取, 并且研究结果也不一致。比如 Nasser 等^[3]和 Davies 等^[4]发现噬菌体 MS2 和 PRD1 在不灭菌土壤中的消亡速率较在灭菌土壤中更快速。Alvarez 等^[5]报道 MS2 和脊髓灰质炎病毒在通过 0.2 μm 孔径过滤的地下水中的消亡率略高于未经任

何处理的地下水, 而 Gordon 和 Toze^[6]则表示在灭菌地下水中病毒的灭活率降低。灭菌促进红壤对噬菌体 MS2 的吸附和消亡^[7-8]。

细菌在自然界广泛存在, 其在土壤环境中的含量达 $10^7 \sim 10^{10}$ cells/g^[9]。众所周知, 微生物在适宜的温度、通气等条件下, 发生有规律的增长。如以细胞数目的对数值作纵坐标, 以培养时间作横坐标, 就可画出一条由延滞期、指数期、稳定期、和衰亡期 4 个阶段组成的曲线。基于设想细菌每个生长阶段的细胞数量及其分泌物的数量和质量不同有可能导致病毒的去向不同, 本研究选择自然界广泛存在的 3 株细菌: 恶臭假单胞菌(PP)、铜绿假单胞菌(PA)和枯草芽孢杆菌(BS)为微生物代表, 以噬菌体 ϕ X174 为指示病毒, 进行了细菌和病毒生长同步培养实验和病毒在不同生长时段菌株培养物的静态吸附实验研究。其主要研究目的包括: 伴随细菌生长的病毒浓度变化; 细菌不同生长发育阶段的菌株培养物在 4 条件下对病毒消失的影响。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(0971129)资助。

* 通讯作者(bzhao@issas.ac.cn)

作者简介: 蒋艳(1987—), 女, 江苏宜兴人, 硕士研究生, 主要从事土壤中病毒污染研究。E-mail: jiangyan_07@163.com

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其培养条件

供试的 3 株菌株皆购于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 它们在水和土壤中广泛分布。分别为:

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*, PP), 革兰氏阴性, 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)中培养; 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA), 革兰氏阴性, 在 35℃ 的 LB 培养基中培养; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS), 革兰氏阳性, 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(KH₂PO₄) 0.45 g, 碳酸钙(CaCO₃) 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 模式病毒的培养与测定

噬菌体 ϕ X174 因其结构类似于人类肠道病毒, 而作为替代品被广泛用于各种实验研究, 故本实验也采用 ϕ X174 作为模式病毒。噬菌体 ϕ X174 购自美国标准培养物保藏中心(ATCC 13706B1), 是一个直径约 23 nm 的二十面体单链 DNA 噬菌体^[10], 等电点约 6.6^[11]。其宿主细菌 *E. coli* 也购自美国标准培养物保藏中心(ATCC13706), 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, 具体测定方法参见参考文献[12-13]。

1.3 实验设计

1.3.1 菌株培养物的获取 实验中选用 3 株菌在不同培育时间点的菌株培养液, 其获取方法为: 取出于 4℃ 冷冻保藏的 PP、PA 和 BS, 通过重复在相应培养基上划线转接并在 30℃(PP)或 35℃(PA、BS)恒温培养箱培育 24 h, 进行两次传代培养后, 挑取一环接种至 100 ml 的 LB(PP、PA)或 PYG(BS)培养基中, 于对应温度下恒温水浴振荡培养 18 h, 使培养液中细菌浓度达到 10⁸~10⁹ cfu/ml, 将其作为各实验中接种使用的初始菌株培养物。

将上述初始菌株培养物按 1% 的接种量转接到对应新鲜培养液中, 在各菌株相应条件下恒温水浴摇床培养至实验所需时间点(如 6 h、12 h 等)时, 分别直接采取各培育时间点的菌株培养物(包含菌体及其代谢产物、液态培养基)。

1.3.2 病毒存在对细菌生长影响 在分别装有 98.0 ml 灭菌新鲜培养液(LB 或 PYG)的锥形瓶中接入初始菌株培养物(PP、PA 或 BS)1.00 ml 和病毒溶液(使培养液中病毒浓度约 10⁷ pfu/ml)1.00 ml, 在各菌株对

应条件下(即 PP: 30℃, LB 培养基; PA: 35℃, LB 培养基; BS: 35℃, PYG 培养基)进行恒温水浴摇床培养; 利用平板菌落计数法测定 0~48 h 取出的各样品中的活菌数(cfu/ml)。以活菌数的对数为纵坐标, 生长时间为横坐标, 绘制生长曲线。对照处理为对应 99.0 ml 灭菌新鲜培养液中接入 1.00 ml 病毒溶液分别进行上述条件相同处理。

1.3.3 细菌生长过程中病毒浓度变化实验 实验处理与 1.3.2 相同, 于培育时间为 0、4、6、12、24、36、48 h 时取样 2.00 ml, 在 4℃ 下用高速离心机(Avanti J-30I, BECKMAN COVLTER, USA)以 10 000 r/min (即 12 096 g)离心 10 min。利用双层平板法测定实验处理和对照处理的上清液中噬菌体浓度, 绘制病毒浓度随培育时间的变化曲线。

1.3.4 不同培育时间菌株培养物对病毒消失的影响 在 50 ml 无菌硬质塑料离心管中加入 9.00 ml 在 1.3.1 获取的各培育时间点(6、12、18、24、30、48 h)3 株菌的菌株培养物, 分别和 1.00 ml ϕ X174 病毒溶液混匀, 使混合液中病毒浓度约为 10⁶ pfu/ml; 同时在相同条件下, 用 9.00 ml 对应新鲜培养液代替菌株培养物作为空白处理。进行一次平衡吸附实验: 加样的离心管置于恒温(4℃)、恒速(300 r/min)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, 然后样品混合液在 4℃ 下以 10 000 r/min 离心 15 min。利用双层平板法测定上清液中噬菌体浓度。由于预实验结果已经表示在实验时间内培养基浓度变化对病毒去向的影响很小, 因而空白处理病毒浓度与上清液浓度的差值认为是被菌株培养物中细菌及其胞外分泌物(包括死细胞的破碎溶解物)吸附和(或)消亡的病毒(即消失的病毒), 其消失比例(*R*)的计算公式为:

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

式中, *R*、*C_i*、*C* 分别表示病毒的消失比例(%), 空白处理的病毒浓度(pfu/ml)、实验处理后离心所得上清液中的病毒浓度(pfu/ml)。同时利用平板菌落计数法测定实验所用各培育时间点菌株培养液中的活菌数。

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。

1.4 数据处理方法

数据处理及图形、表格制作均在 Excel 2003 中进行; 在 SPSS 17.0 中进行实验结果的差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 病毒对细菌生长的影响

病毒是否存在条件下的细菌生长曲线见图 1。结

果表明,病毒存在对 3 株细菌的生长曲线几乎没有影响,这主要由于本研究使用的指示病毒 ϕ X174 有其专一宿主细菌,对其他细菌均不具有感染性。由于 ϕ X174 的宿主细菌在自然界几乎不存在,因而 ϕ X174 在自然条件下不可能繁殖,这也是国际上研究病毒在土壤中去向时广泛选择 ϕ X174 作为指示病毒的主要原因^[14]。

图 1 同时表明,3 株菌在培育 2 h 后都进入对数期,在 8 h 后进入稳定期,而在实验过程中只有 BS 菌株在 24 h 之后进入了衰亡期。对数期细菌细胞生长速率最大,活菌数增加最快,酶系活跃,代谢旺盛。12 和 24 h 时,3 株菌都处于稳定期,此时各菌株培养液中菌体浓度达到最大,活菌数目维持动态平衡,即处于新繁殖的细胞数与衰亡的细胞数相等的动态平衡之中,表现为图 1 中的平台期,是主要的代谢产物合成期。衰亡期时,细菌代谢活性降低,活菌数目迅速减少,形态发生多形化,而 BS 菌株在此时期释放芽孢^[15]。

2.2 细菌生长过程中病毒浓度的变化

细菌生长过程中环境变化主要体现在:细菌浓度及其胞外分泌物(包括死细胞的破碎溶解物)的变化;培养基浓度的改变。预实验结果表明在实验时间内培养基浓度变化对病毒浓度变化的影响可以忽略(具体数据在此没有罗列),而 2.1 部分的实验结果已经表明病毒对本研究所用的 3 株菌的生长没有影

响,因此,认为细菌生长过程中病毒浓度变化主要由于细菌生长过程中的细菌浓度及其胞外分泌物变化所致。

图 2 表明,病毒浓度在不存在细菌的培养基(即对照处理)中随着培育时间延长而持续稳定降低,其中在 PP 菌株存在的培养基中降低速率最小,在 BS 菌株存在的培养基中降低速率最大,病毒在 PA 菌株存在的培养基中的降低速率介于上述两者之间。尽管 PP 和 PA 菌株同样用 LB 培养基,但 PP 菌株的生长条件为 30 ,而 PA 菌株则为 35 。温度是影响病毒死亡率最为重要的因素,温度越高,病毒的死亡率越高。Jin 和 Flury^[14]发现,脊髓灰质炎病毒在 4 的饱和砂土和砂壤土中可存活 180 天以上,而当温度升到 37 时,12 天后病毒全部死亡。同样,尽管 PA 和 BS 菌株的生长温度相同,但 BS 菌株生长的 PYG 培养基中按 0.2% 添加了 CaCO_3 ,存在 Ca^{2+} 有可能导致病毒消亡,Edney 等^[16]研究发现当 Ca^{2+} 浓度达到 0.15% 或更高时会促进病毒灭活。可见在较高温度下,培养基作为连续培养实验的背景溶液时,BS 菌株代谢产酸溶解培养基中 CaCO_3 ,使离子强度改变而影响温度对病毒的灭活效果,Zhuang 等^[17]的研究也指出了这一点。

当培养基中接入细菌后,病毒浓度随细菌培育时间变化而波动,波动时间与程度依不同细菌而异

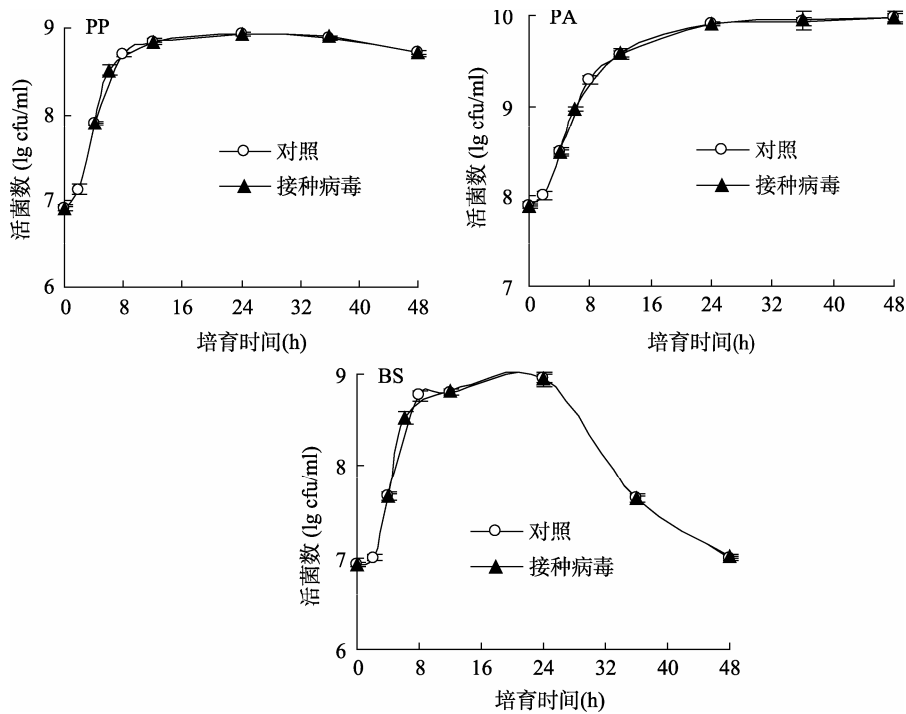
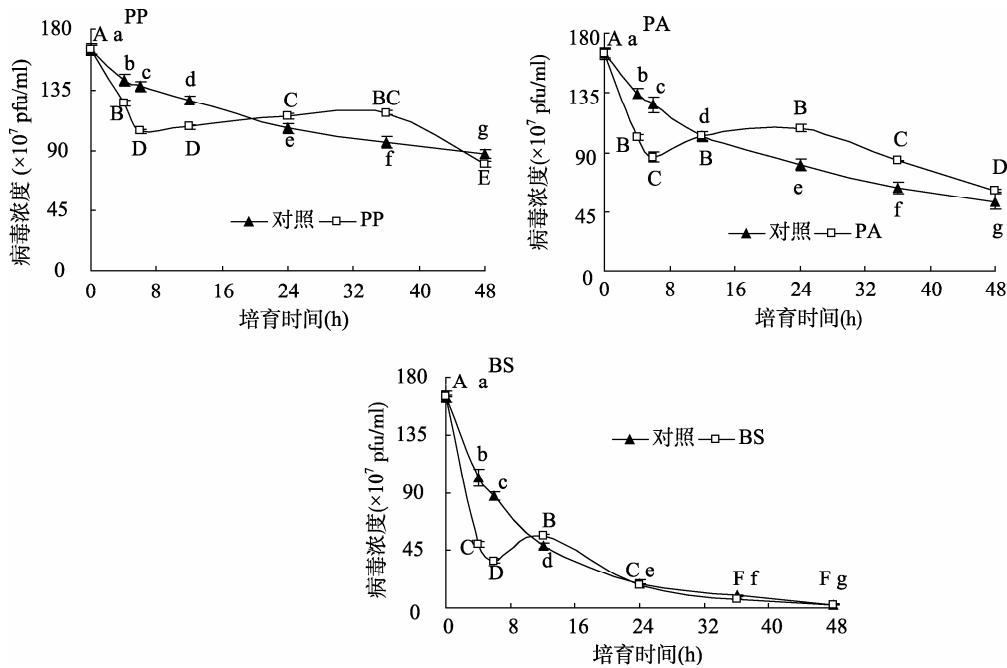


图 1 接种病毒对不同细菌生长曲线的影响
Fig. 1 The effect of virus presence on bacterial growth curves



(图中不同小写字母表示对照处理病毒浓度在不同培育时间的差异在 $P < 0.05$ 水平显著; 不同大写字母表示接菌处理病毒浓度在不同培育时间的差异在 $P < 0.05$ 水平显著, $n = 3$)

图 2 细菌 PP、PA、BS 生长过程中病毒浓度的变化

Fig. 2 The change of virus concentration during growth phase of bacteria PP, PA, and BS

(图 2)。与各自对照处理相比, 接菌处理细菌生长过程中病毒浓度在 0~6 h 间快速降低, 在 6 h 时, 病毒浓度分别较各自对照处理降低 $24.1\% \pm 0.7\%$ (PP)、 $31.4\% \pm 1.6\%$ (PA)、 $58.0\% \pm 1.1\%$ (BS); 然后从 6 h 开始, 病毒浓度开始反弹, 在 PP、PA、BS 菌株分别生长至 36、24、12 h 时达最高, 但远低于起始添加的病毒浓度, 此时病毒浓度分别较各自对照增加 $23.1\% \pm 1.3\%$ 、 $34.2\% \pm 0.8\%$ 、 $15.8\% \pm 1.3\%$; 随着培育时间的进一步延长, 病毒浓度随细菌生长均持续降低, 至 48 h 培育结束时, 病毒浓度在 PP 处理中低于对照处理, 在 PA 处理中高于对照处理、在 BS 处理中接近对照处理(图 2)。随着培育时间延长, 细菌生长由对数期进入稳定期和衰亡期, 吸附在对数期细胞上的病毒到稳定期后可能随着细菌的吸附行为的变化、或(和)部分细胞的溶解、或(和)形成的胞外分泌物将吸附病毒解吸而重新释放到溶液中, 导致病毒浓度反弹, 反弹持续期因不同细菌而异; 随着衰亡期来临, 溶液中有更多的细胞裂解和胞外分泌物积累等^[15], 因而推测其中胞外分泌物中酶等对病毒的消亡影响超过因原先吸附而释放到溶液中的存活病毒数量, 总体表现为细菌培育后期病毒浓度的持续降低。由于酶存在导致病毒消亡现象是可能的, 比如 PA 菌株分泌的蛋白酶和胰肽酶 E 能破坏流感病毒^[18]。Nasser 等^[3] 研究指出低浓度(0.05 mg/ml)的链霉蛋白酶可导致添加的 Cox-A9 病毒的灭活率超过 90%; PA 菌株分泌

物的胞外酶作用 7 天后, 可灭活 99% 以上的 Cox-A9 病毒。这进一步说明微生物生长过程中的某些代谢产物会影响部分病毒的消亡, 而微生物代谢产物的产生与其生长阶段密切相关。郑耀通等^[19] 也曾表明 BS 菌株纯培养对肠道病毒有一定消亡作用。有研究指出, 吸附和聚集是病毒在水中长期存活而不被消亡的十分重要的因素, 废水中的病毒对黏粒、细胞碎片、废物、其他混杂残骸等物质的吸附, 会显著减少它们的死亡量^[20]。而本实验中, 在衰亡期前, 各菌株菌体细胞及其代谢产物对 $\phi X174$ 的吸附也一定程度上减缓了其死亡, 这种减缓也部分解释了病毒浓度在细菌生长过程中先下降后上升的波动变化。上述结果表明, 细菌生长前期病毒浓度的降低主要由于细菌细胞的吸附导致, 但其中有相当部分没有被致死或存在可逆吸附; 而到细菌生长后期, 病毒浓度的降低则可能由于细胞吸附和胞外分泌物致死并存所致。

2.3 不同培育时间点菌株培养物对病毒消失的影响

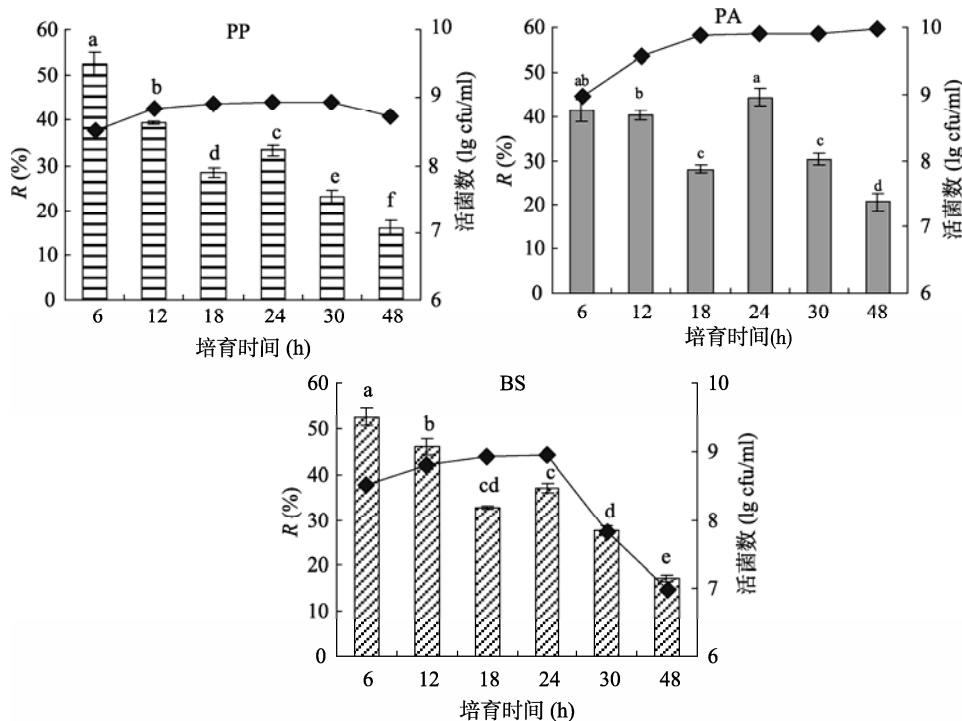
本部分研究与 2.2 部分的区别在于将不同培育时间的菌株培养物取出在 4℃ 条件下与病毒进行一次平衡吸附实验, 以消除细菌生长过程中的高温(30℃ 和 35℃)对病毒消亡的影响, 除此以外, 影响病毒去向的条件也不同, 在 2.2 部分, 细胞溶解、胞外分泌物形成前, 病毒已经存在; 而这部分研究是某一生长阶段的细菌培养物与病毒的吸附实验, 因此在与病毒接触前, 细胞表面已经发生变化、部分细胞已经溶解、

胞外分泌物已经存在。

图 3 中的纵坐标 R 为添加病毒的消失比例(即包括被细菌及其胞外分泌物(包括死细胞的破碎溶解物)吸附和(或)消亡的病毒比例),其值随菌株培养物培育时间的延长而呈波动变化,不同细菌间的变化趋势类似,从 6~18 h 持续显著降低,从 18~24 h 显著迅速提升,然后至 48 h 稳定下降。二元方差分析结果表明,不同菌株、菌株培育时间、及其它们的交互作用均显著影响 R 值,其中培育时间可用来解释 R 值变异的 86%,交互作用解释 9%,不同菌株解释 2%,可见, R 值变化主要由菌株的培育时间决定。

病毒的消失比例在对数期 6 h 时比较高(对 PP 和 BS 处理来说 6 h 时最高,但对 PA 处理来说 24 h 时最高),这可能类似于对数生长期的宿主细胞更利于噬菌体吸附。Hilla^[21]研究表明,噬菌体对细菌的吸附速率与细菌生长速率有关,细菌生长速率越快,则噬菌体的吸附就越容易发生,推测造成这一现象的原因是快速生长的细菌细胞具有更大的表面积,可以提供更多的吸附位点;Sanders 和 Klaenhammer^[22]也指出细菌经过 4~6 h 培育到达对数后期期的时候最有利于噬菌体吸附。根据图 2 的结果,这部分病毒主要以活病毒的吸附状态存在,一旦条件适宜,有可能重新以感染态释放回溶液。

尽管活菌数在 6~18 h 间持续增加(图 3),但由于菌体生长对数期与稳定期的细胞膜的流动性有很大差别^[23],细胞形态也发生一定改变,导致病毒对细菌的接触能力不同,随着培育时间延长进入稳定期菌体细胞对病毒的吸附能力会逐渐下降;且此时细菌细胞死亡量很小,产生的少量残体及分泌的初级代谢产物可能对病毒消亡影响较小。培育至 24 h 时的菌株培养物中病毒的消失比例 R 较 18 h 时不同程度反弹升高,PA 处理 24 h 时的 R 值甚至超过 6 h 时的 R 值,导致该现象的原因可能与此时胞外分泌物对病毒的灭活突然升高有关,因为稳定期为代谢产物的主要合成期^[15],例如,PA 菌株代谢累积胞外多糖、绿脓菌素及具有表面活性剂性能的鼠李糖脂等^[24];BS 菌株则能够合成大量具有水解酶活力的胞外蛋白,并产生大量苯乙酸、邻苯二甲酸等有机酸类物质^[25];这些代谢产物,特别是酶类物质,可能对病毒灭活存在较大的贡献。随着培育时间的进一步延长,细胞对病毒的吸附和胞外分泌物对病毒的灭活作用均下降,从而导致病毒消失比例 R 在 24 h 培育时间后的持续下降。一方面,随着营养物质逐渐耗尽、代谢废物累积等培养条件的恶化,细菌代谢活性降低,细胞形态改变^[15],不利于病毒吸附;另一方面,细胞表面积累积的胞外聚合物(EPS)等,吸附了营养物及大量代谢废



(柱形图代表病毒消失比例 R (%), 柱形图上方不同小写字母表示不同培育时间病毒消失比例差异在 $P < 0.05$ 水平显著;折线图代表活菌数对数)

图 3 不同培育时间点的菌株培养物对病毒消失的影响

Fig. 3 The effect of bacterial growth time on virus removal efficiency

物,且 EPS 可黏结单个细菌形成细菌团块^[26],进一步阻碍了病毒接触吸附到细菌细胞上。

3 结论

环境中微生物存在及其生长发育时段显著影响病毒的消失(包括可逆/不可逆吸附、消亡)程度。伴随着细菌在适宜温度和培养基条件下的生长,病毒浓度呈现先从接种至对数期急剧降低,然后反弹,紧接着又持续降低的波动变化现象,病毒浓度降幅和反弹程度及其反弹持续时间因细菌不同而异。在 4℃ 时不同培育时间的菌株培养物与病毒的吸附实验表明,添加病毒的消失比例呈现随菌株培养物的培育时间从 6 h 延长至 18 h 时显著降低,继续延长至 24 h 时又迅速升高,然后随着培育时间的进一步延长而持续显著降低的波动趋势。

参考文献:

- [1] US Environmental Protection Agency. Federal Register. National Primary Drinking Water Regulations: Enhanced Surface Water Treatment Requirements; Proposed Rule[M]. Washington DC: USEPA, 1994, 59: 38 832-38 858
- [2] 赵炳梓, 张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为[J]. 土壤学报, 2006, 43(2): 306-313
- [3] Nasser AM, Glozman R, Nitzan Y. Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil[J]. Water Res., 2002, 36: 2 589-2 595
- [4] Davies CM, Logan MR, Rothwell VJ, Krogh M, Ferguson CM, Charles K, Deere DA, Ashbolt NJ. Soil inactivation of DNA viruses in septic seepage[J]. J. Appl. Microbiol., 2006, 100: 365-374
- [5] Alvarez ME, Aguilar M, Fountain A, Gonzalez N, Rascon O, Saenz D. Inactivation of MS-2 phage and poliovirus in groundwater[J]. Can. J. Microbiol., 2000, 46: 159-165
- [6] Gordon C, Toze S. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses[J]. J. Appl. Microbiol., 2003, 95: 536-544
- [7] Zhao BZ, Zhang H, Zhang JB, Jin Y. Virus Adsorption and Inactivation in Soil as Influenced by Autochthonous Microorganisms and Water Content[J]. Soil Biol. Biochem., 2008, 40: 649-659
- [8] Zhao BZ, Chen J, Zhang JB, Qin SW. Soil microbial biomass and activity response to repeated drying-rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices[J]. Geoderma, 2010, 160: 218-224
- [9] Ghiorse WC, Wilson JT. Microbial ecology of the terrestrial subsurface[J]. Adv. Appl. Microbiol., 1988, 33: 107-172
- [10] Yates MV, Yates SR, Wagner J, Gerba PC. Modeling virus survival and transport in the subsurface[J]. J. Contam. Hydrol., 1987, 1: 329-345
- [11] Dowd SE, Pillai SD, Wang SY, Corapcioglu MY. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils[J]. Appl. Environ. Microb., 1998, 64(2): 405-410
- [12] 王秋英, 赵炳梓. 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[J]. 土壤, 2007, 39(2): 297-300
- [13] 张辉, 赵炳梓. 气-水界面对病毒静态吸附实验结果的影响[J]. 环境科学, 2007, 28(12): 2 800-2 805
- [14] Jin Y, Flury M. Fate and transport of viruses in porous media[J]. Adv. Agron., 2002, 77: 39-102
- [15] Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56: 1875-1881
- [16] Edney M, Burnet FM. Influence of ions on thermal inactivation and modification of an influenza virus[J]. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1952, 30(2): 129-138
- [17] 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(3/4): 193-209
- [18] Callan JR, Hartmann FA, West SE, Hinshaw VS. Cleavage of influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases[J]. J. Virol., 1997, 71(10): 7 579-7 585
- [19] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 污水稳定塘菌-藻生态系统去除与灭活植物病毒 TMV 研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(6): 1 128-1 134
- [20] Schijven JF, Hassanizadeh SM. Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters[J]. Crit. Rev. Env. Sci. Tec., 2000, 30: 49-127
- [21] Hilla H. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli[J]. Microbiology, 1997, 143: 179-185
- [22] Sanders ME, Klaenhammer TR. Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: Evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 46(5): 1 125-1 133
- [23] 代文涛, 韩霄, 王华林, 胡志红, 邓菲. HearNPV 在生长对数期与平台期宿主细胞中的复制差异分析[J]. 病毒学报, 2007, 23(5): 399-406
- [24] Onbasli D, Aslim B. Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses[J]. Afr. J. Biotechnol., 2008, 7(24): 4 614
- [25] Morsi NM, Atef NM, El-Hendawy H. Screening for some *Bacillus* spp. inhabiting Egyptian soil for the biosynthesis of biologically active metabolites[J]. Int. J. Food. Agr. Environ., 2010, 8(2): 1 166-1 173
- [26] 董成亚, 马小彤. 生物被膜分散方式的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 120-123

Effects of Bacterial Growth Process on Virus Removal

JIANG Yan^{1,2}, ZHAO Bing-zi^{1*}

(1 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;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The existence and different growth stages of local microbe in environment may affect the virus fate. In this study, *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Bacillus subtilis* (BS), widely found in nature, were chosen as microbe representative. Using bacteriophage ϕ X174 as virus indicator to do synchronization culture experiments with the bacteria under the condition of 30°C (PP) and 35°C (PA and BS) and static adsorption experiments with the strain cultures of different growth periods under the condition of 4°C, the impacts of bacterial growth and development stages on virus removal (including the reversible / irreversible adsorption and demise) were compared and analyzed. The incubation experiment results showed that in cultures of 30°C and 35°C, the virus concentration decreased with the extension of incubation time, but when medium inoculated, virus concentration drastically reduced more than the control from inoculation to the logarithmic phase of 6 h, the largest decline was found in BS, followed by PA and PP. With the bacteria from the logarithmic phase into the stable phase and decline phase, virus concentration rebounded to rise at first and then continued to reduce. To the three bacteria, the highest points of the rebound virus concentration were higher than their control respectively, the duration and extent of virus concentration enhance of rebound varied according to different strains. The static experimental results showed that the proportion of virus removal was gradually reduced when the incubation time of strain culture extended from 6 h to 18 h, but rapidly increased when extended to 24 h and then decreased with further extension of time. These results suggested that the influence of bacteria on virus removal was changed with bacterial growth stages and strains, which implies that the existence of local microbes and their components should be considered when studying the fate of viruses in the environment.

Key words: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, Bacteriophage ϕ X174, Fate