

一种浓缩噬藻体的反冲超滤技术*

罗文清¹, 鞠川¹, 程凯¹, 赵以军^{1**}, 石正丽²

(1. 华中师范大学生命科学学院, 湖北武汉, 430079; 2. 中国科学院武汉病毒研究所无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉, 430071)

A Backflushing Ultrafiltration Technique for Concentrating Cyanophage*

LUO Wen-qing¹, JU Chuan¹, CHENG Kai¹, ZHAO Yi-jun^{1**}, SHI Zheng-li²

(1. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Joint-laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Most of the cyanophages were adsorbed onto the ultrafilter membrane when pre-filtrated water sample passed through the tangential flow ultrafiltration system. In order to recover much more cyanophages, we used a technique named "backflushing ultrafiltration". The results indicated that when the volume of the backflush liquid was raised step by step, the concentration multiple of the cyanophage would gradually decrease, while the recovery rate of the cyanophage would gradually increase. In our performance, the maximal concentration multiple and the recovery rate of cyanophage could reach up to 30 times and more than 90% severally. This method was tested to be effective for concentrating cyanophage from large volume liquid sample. Moreover, the concentration multiple of the cyanophage could be elevated to nearly one-hundred times when two-step backflushing ultrafiltration was adopted.

Key words: Ultrafiltration; Backflush; Cyanophage; Concentration

关键词: 超滤; 反冲; 噬藻体; 浓缩

中图分类号: Q939.48

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0397-04

噬藻体(Cyanophage)是一类感染蓝藻的病毒,形态上同于噬菌体^[1],近期的研究表明,噬藻体作为水体环境中活跃的动态因子,在控制水体初级生产力和有害藻类水华(Harmful Algal Bloom, HAB)方面可能发挥着重要的作用^[2, 3],甚至影响水体生态系统中食物链的结构^[4],因此研究水体中噬藻体的生理生态学特性对于了解其生态功能是非常重要的,但是由于自然水体中的噬藻体浓度往往较低,难以直接对其进行定性或定量研究,所以对天然水样中的噬藻体进行高效、快速的浓缩是研究噬藻体生态地位和功能的关键和难点。超滤法是国际上流行的浓缩自然水样中病毒的方法^[5, 6],但在我国尚未见报道。基于超滤的原理,本实验室对超滤法进行了改进,建立了一套能够有效浓缩水样中噬藻体的方法---反冲超滤法,此法浓缩工艺简单,耗

时短,费用低,效率高。

1 材料与方法

1.1 材料

鲍氏织线藻(*Plectonema boryanum* IU594)取自中国科学院水生生物研究所的藻种保藏中心。AA培养基^[7]用于培养鲍氏织线藻和保存噬藻体。蓝藻噬藻体“PP”从本实验室分离,它能裂解鲍氏织线藻(*P. boryanum* IU594)和席藻(*Phormidium foveolarum* IU427)^[8]。超滤装置是PALL过滤器有限公司生产的32040204CL型切向流超滤膜包(过滤分子量为100kDa);预过滤装置是PALL过滤器有限公司生产的12116型(孔径为3 μ m)、12131型(孔径为0.8/0.45 μ m渐变)囊式滤器。

1.2 一步反冲超滤实验

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-03-03

* 基金项目: 国家自然科学基金(39600004, 399700647), 中国科学院院长基金(院基计字 892 号)

作者简介: 罗文清(1979-), 女, 湖北省襄樊市籍, 硕士研究生, 环境微生物学。

** 通讯作者: 赵以军(1963-), 男, 湖北省洪湖籍, 教授, 环境微生物学, yjzhao@public.wh.hb.cn

1.2.1 水样的预过滤和超滤：取 1 毫升“PP”噬藻体悬液用 AA 培养基稀释至 1000mL，混匀后取 1 毫升用 PFU 法测定噬藻体效价^[9]，结果记为 A1，同时对其余的稀释噬藻体悬液进行预过滤和超滤处理，流程如图 1 所示：

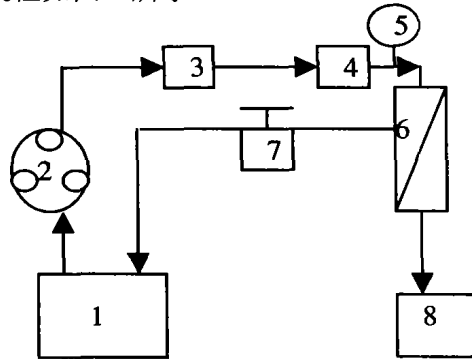


图 1 切向流超滤流程图

1, 回流液容器; 2, 泵; 3, Versapor 过滤器; 4, Versapor 过滤器; 5, 压力表; 6, 超滤器; 7, 压力螺旋夹; 8, 透出液容器。

Fig.1 Flow chart of tangential flow ultrafiltration

1, Container of circumfluent solution; 2, Pump; 3, Versapor filter(3 μ m); 4, Versapor filter(0.8/0.45 μ m); 5, Pressure meters; 6, Ultrafilter; 7, Pressure screw clamp; 8, Container of transmitted liquid.

上述稀释噬藻体悬液首先经 12116 型和 12131 型滤器过滤，去除直径大于 0.45 μ m 的颗粒性物质，取 1mL 滤过液测定 PFU 效价，结果记为 A2，然后调节蠕动泵以 450-650mL \cdot min⁻¹ 的流速向超滤膜包泵出上述预滤过液，经超滤后，透过液（经过超滤膜过滤）的流出速度是 250-400 mL \cdot min⁻¹，回流液（未过滤超滤膜过滤）的流出速度为 200-250 mL \cdot min⁻¹，回流液循环过滤直至其体积减少至 5mL 时停止，最后取 1mL 透过液和 1mL 回流液分别用 PFU 法测定噬藻体效价，结果分别记为 A3 和 A4。

1.2.2 反冲膜包浓缩噬藻体：用透过液做为反冲液，以 990mL \cdot min⁻¹ 的流速反冲超滤膜包，当使用的反冲液体积分别为 50 mL、150 mL、400 mL、700 mL、900 mL 时，各取 1mL 用 PFU 法测定噬藻体效价（结果见图 2）。

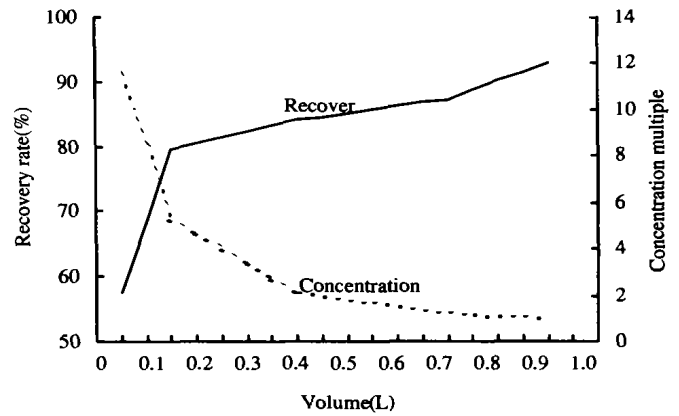


图 2 噬藻体回收率和浓缩倍数与反冲液体积的关系

Fig.2 The relationship among cyanophage recovery rate, concentration multiple and the volume of the backflush liquid

1.3 天然湖水的反冲超滤实验

从武汉东湖卓刀泉处采集的 10L 湖水，用 25 号浮游生物采集网网布进行一次初滤，然后将噬藻体混入这 10L 水样中，混匀后测其效价，结果记为 B1，接着按照 1.2.1 中所述的步骤，进行预过滤、超滤和反冲（反冲液为 150mL），预过滤液、超滤透过液和反冲液中的噬藻体效价依次记为 B2、B3 和 B4。

1.4 两步反冲超滤实验

两步超滤反冲法就是将第一步反冲操作中得到的反冲液作为第二次超滤的水样，第二次超滤的步骤与第一次完全相同，但无论是水样体积还是反冲液体积都比第一次超滤反冲要小。具体设置为，初始水样为 10L，噬藻体效价测定结果记为 C1，第一次反冲液体积为 1.2L，噬藻体效价测定结果记为 C2，经过第二次超滤和反冲后，得到 100mL 反冲液，其噬藻体效价测定结果记为 C3。

2 结果和分析

以上各试验的数据结果如表 1 所示：

表 1 噬藻体校价测定结果 ($\times 10^3$ PFU/mL)
Table 1 The results of cyanophage titer ($\times 10^3$ PFU/mL)

	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3
Pre-filtrating & ultrafiltrating	1.58	1.57	0	1.61							
Backflushing ultrafiltration					1.25	1.25	0	40.1			
Two-step backflushing ultrafiltraton									6.9	39.7	619.3

由实验 2 结果可知, 在水样的预过滤和超滤试验中, 未处理水样、初滤水样和回流液三者的噬藻体浓度基本相同, 说明预过滤没有造成噬藻体效价的损失, 但超滤后回流液中噬藻体的效价也并未提高, 也就是说普通的超滤过程未能有效浓缩噬藻体; 而透过液的效价 (即结果 A3) 为 0, 说明噬藻体不能通过超滤膜。综合比较结果 A1、A2、A3 和 A4, 作者推测噬藻体极有可能是被吸附到超滤膜上, 试验 1.2.1.2 的结果正好可以支持这一假设, 图 2 就是噬藻体回收率和噬藻体的浓缩倍数随反冲液体积变化的曲线, 其中当反冲液体积达到 900mL 时, 噬藻体的回收率可达 90% 以上, 而噬藻体的浓缩倍数则随着反冲液体积的增大而减小, 最大可达 12 倍。

用天然湖水进行的试验结果与上述结果是类似的, B1 与 B2 相等, B3 为 0, 同样说明预过滤没有造成噬藻体效价的损失, 并且超滤透过液中无噬藻体; 而 B4 相较于 B1、B2 却有很大的升高说明反冲液中噬藻体效价得到了大幅度的提高, 浓缩倍数超过 30 倍, 回收率为 48.1%, 表明此法同样适用于浓缩天然水样中的噬藻体。

由两步反冲超滤实验的结果计算可知: 第一次反冲超滤后噬藻体回收率为 69%, 浓缩倍数为 5.8 倍; 第二次反冲超滤后噬藻体回收率为 65%, 浓缩倍数为 15.6 倍; 整个过程中噬藻体的回收率为 45%, 浓缩倍数为 89.7 倍。

根据前面的实验结果可以推测, 尽管实验中选用的膜包是由低蛋白吸附的亲水性聚砜材料制造的, 但此膜对噬藻体仍有较强的吸附能力, 经过超滤之后的噬藻体被大量吸附。而通过快速反冲超滤膜的工艺, 可以将吸附在膜上的噬藻体反冲下来, 当使用的反冲液体积不同时, 噬藻体就能够得到不同程度的浓缩。用 SPSS10.0 的 Curve Estimation 分析图 2 所示的数据, 发现噬藻体被反冲下来的情况符合以下经验公式, 即: $\text{回收率} = 0.97 + 0.1407 * \ln(\text{反冲体积}/\text{超滤体积})$ ($P < 0.01$), 如图 3 所示。

图 3 表明, 当处理水样时, 反冲液与初始水样的体积比为 1:10 时, 回收率可达 65%, 反冲液与初始水样的体积比为 4:10 时, 回收率达 80% 以上, 以后随着反冲液与初始水样体积比的增大, 回收率可接近 100%。所以, 在处理一定量的水样时, 我们可用较少量的反冲液获得较高的噬藻体回收率。因此, 在实际操作中, 为了使得到的噬藻体悬液浓度更高, 可以采用了两步反冲超滤法来进行浓缩, 其中第一步和第二步的反冲液体积是根据上述经验公式推算出来的, 实验的结果表明使用两步法后

虽然噬藻体的回收率有所降低, 但浓缩倍数却得到了大幅度的提高。

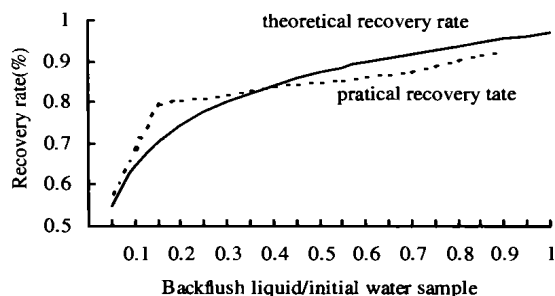


图 3 理论回收率与实际回收率的关系

Fig.3 Relationship between theoretical and practical recovery rate

关于水中病毒浓缩的方法, 国内已有过一些报道^[10-14], 如吸附法、絮凝法、免疫捕获法等, 这些方法有的虽然可以得到较高的病毒回收率, 但其工序繁复 (需要调 pH、制作滤层、制备洗脱液), 且不适用大量水样的处理; 有的虽然特异性强, 灵敏度高, 但耗时长, 成本高, 操作复杂。而反冲超滤法不但可以有效的浓缩噬藻体 (噬藻体的回收率在 60% 以上, 浓缩倍数为十几倍, 运用两步反冲工艺后的浓缩倍数可达近百倍), 而且与以往的水中病毒浓缩技术相比, 有耗时短 (处理 10 L 的水样只需 2h, 如用大通量膜包则时间还可成倍缩短), 费用低 (本试验中处理每升水样的成本为 5 元左右, 这一成本还主要来自预过滤器的损耗, 而昂贵的超滤膜包在使用多次后几乎没有损耗的迹象, 因此, 如果能够采用前置低成本滤布的预过滤方式, 将大大延长整套装置的使用寿命, 成本也会相应降低), 能够处理大量的天然水样 (10L~100L), 操作简便等特点, 特别是将初滤系统与超滤系统串接起来使用后, 大大简化了实验程序。

参考文献

- [1] 赵以军, 石正丽, 黄国锦, 等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展[J]. 中国病毒学, 1999, 14(2): 100-105.
- [2] Wommack K E, Rita R C. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 1092-2172.
- [3] Suttle C A, Chan C A, Cottrell M T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity[J]. Nature (London), 1990, 347: 467-469.
- [4] Wommack K E, Colwell R R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000,

- 64: 69-114.
- [5] Bellara S R, Cui Z, MacDonald S L, *et al.* Virus removal from bioproducts using ultrafiltration membranes modified with latex particle pretreatment [J]. *Bioseparation*, 1998, 7(2): 79-88.
- [6] Patti A M, Alicino F A, Santi A L, *et al.* Enteric virus pollution of tyrrhenian areas[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1996, 88(3-4): 261-267.
- [7] Carr N G. Notes on isolation and laboratory culture[A]. In: *The Biology of Blue-Green Algae*[C]. Berkeley: Blackwell Scientific Publications, 1973, 525-531.
- [8] 赵以军, 程凯, 石正丽, 等. 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定[J]. *自然科学进展*, 2002, 12(2): 923-927.
- [9] Suttle C A. Enumeration and isolation of viruses[C]. In: *Aquatic Microbial Ecology*[M]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, 121-134.
- [10] 张楚瑜. 两部浓缩法回收水中噬藻体的有效性[J]. *中国环境科学*, 1989, 9(6): 463-465.
- [11] Gilgen M, Wegmuller B, Burkhalter P, *et al.* RT-PCR to detect enteroviruses in surface water[J]. *Appl Microbiol Methods* 1995, 61: 1226-1231.
- [12] Ma J F, Naranjo J, Gerba C P. Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tapwater[J]. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60(6): 1974-1977.
- [13] Schwab K J, Leon R D, Sobsey M D. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric enteric viruses for detection by RT-PCR[J]. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62(6): 2086-2094.