

TMV 在不同水体与温度条件下的灭活动力学*

郑耀通^{1**}, 林奇英², 谢联辉²

(1.福建农林大学资源与环境学院, 福建福州 350002; 2.福建农林大学植物病毒研究所, 福建福州 350002)

Inactivation Dynamics of TMV under Different Water Bodies and
TemperaturesZHENG Yao-tong¹, LING Qi-ying², XIE Lian-hui²

(1. College of Resources and Environment; 2. Institute of Plant Viruses, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: It is very important to understand the laws of *Tobacco mosaic virus*(TMV) inactivation under different water bodies and temperatures. Choosing the typical plant virus TMV as a model virus, the inactivation dynamics of it in Min River water, tap water, super-pure water, life sewage and sterile sewage under different temperatures were studied in this paper. The results showed that the temperature was a very important factor to influence the survival of TMV. The higher temperature of the water body, the faster the inactivation rate of TMV. Besides the environmental temperature, some water quality factors also influence the inactivation rate of TMV. The influences of the dissolved salts on the inactivation of TMV were different from the various environmental conditions. Some microbes or their metabolites were harmful to the survival of TMV. The biodegradable organic substances lead to TMV inactivation may be thought to promote the bacteria multiplying.

Key words: *Tobacco mosaic virus* (TMV); Inactivation; Dynamics; Water body

摘要: 了解植物病毒在不同水体与温度条件下的灭活规律具有重要的理论与实际意义。本文以典型植物病毒烟草花叶病毒 (TMV) 为模型, 比较了其在不同温度条件下, 在闽江水、自来水、生活污水、微孔滤膜过滤除菌污水及超纯水中的灭活动力学。结果显示, 温度是导致 TMV 灭活的重要因素, 水温升高, 病毒灭活速率加快; 此外, 某些水质因子也影响 TMV 的灭活效率, 其中可溶性盐的存在及其含量对 TMV 的灭活会因所处的环境不同而异; 某些微生物或代谢产物对植物病毒 TMV 具有灭活作用, 而能生化降解的有机质加速 TMV 灭活可能是通过促进水体中的微生物增殖而起作用。

关键词: 烟草花叶病毒 (TMV); 灭活; 动力学; 水体

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0385-04

植物病毒可经由感染的植物根释放与植物残体的污染, 动物吞咽植物及人类食用生蔬菜与水果后的排泄物污染等途径而成为水体环境中一类常见的生物性污染物^[1-5]。目前不同的水域中分离到多达 13 个属 30 余种的植物病毒^[6]。这些植物病毒常具有在侵染植物体内高浓度存在、经植物根释放

并在外界环境中非常稳定、再经植物根侵染植物而无需介体的参与、具有广泛的寄主范围等特性而对农业生产存在着很大的威胁^[7, 8]。然而目前对水体植物病毒的研究还仅仅局限于病毒的分离与监测, 更深层次的研究如对植物病毒在水体环境的生态行为还没有报导。我们不清楚植物病毒通过各种途

收稿日期: 2004-01-08, 收回日期: 2004-03-26

* 基金项目: 福建省科技计划项目资助 (R-98-17)

** 通讯作者: 郑耀通 (1965-), 男, 浙江丽水籍, 副教授, 博士, 从事环境微生物学与研究工作。Corresponding author. Tel: 0591-3721293, Email: zyt168@yahoo.com

径进入水体环境后的生态行为、存活时间以及对农业生产有可能存在的潜在危险性。这方面的资料急需补充,以正确评估因水传播植物病毒可能发生的植物病毒病流行与远距离传播的可能性。因此,本文以烟草花叶病毒 TMV 模型,探讨其在不同水体与温度条件下的灭活规律。

1 材料与方法

1.1 实验材料

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 为本校植物病毒研究所收藏的强毒株系,摩擦接种在普通烟 K₃₂₆ 上繁殖,待植株严重发病时取症状典型的嫩叶作为 TMV 毒源,用略加修改的 Gooding 法提纯^[9],经 200~300nm 紫外扫描确定其纯度与浓度。在枯斑寄主心叶烟植株上用半叶法进行侵染活性测定^[10],每个样品接种 5~6 个叶片,待出现明显枯斑后,及时记录枯斑数,取平均值,实验重复 2 次。对低浓度的 TMV 先用蒙脱石吸附-碱性氯化铝絮凝-碱性 EDTA-Gly 缓冲液洗脱法浓缩后再定量^[11]。

选取 5 种不同水质作为实验水样,其中自来水用硫代硫酸钠脱氯处理;生活废水取于福州市晋安河中游内河生活污水;闽江水取于本校门口河段;无菌生活污水用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌;超纯水由超纯水机制备。各水样的理化特性如下表 1。

表 1 不同水样的理化性质

Table 1 The characters of water samples used in the experiment

Items	TW	MW	WW	FW	PW
pH	6.54	6.61	6.36	6.43	6.19
BOD ₅ (mg/L)	0.59	10.7	176.8	84.3	0
Conductivity (μ s/cm)	363	214	576	327	20
SS (mg/L)	11	24.5	64.2	6.2	0
Bacterial number (cfu/L)	2.1 \times 10 ²	4.8 \times 10 ⁵	9.3 \times 10 ⁷	0	0

TW-Tap water; MW-Min River water; WW-Wastewater; FW-Distilled wastewater by microfilm filter; PW-Superpure water.

1.2 实验方法

在 500 mL 无菌三角瓶中装入 300 mL 上述各水样,加入 TMV 贮备液至总浓度约为 4.6 \times 10⁵ 枯斑/mL,经充分摇匀后取出 3 mL 装于冷冻管中作为 t₀ 时的植物病毒浓度 N₀。将三角瓶保温于 4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C,约 1500Lx 光照强度,12h 光照与黑暗循环的光照生化培养箱中。实验过程中,每隔一定时间 t 取样测定此时的病毒活性,因 log₁₀(N_t/N₀) (N_t 表示 t

时刻的病毒浓度, N₀ 表示初始时刻的病毒浓度) 实行对数转换后表示病毒存活率;再进一步将 log₁₀(N_t/N₀) 与相应时间作直线回归,求得回归方程,根据此回归方程导出病毒在不同条件下的灭活速度及灭活 99% 病毒所需的时间 T₉₉ 值 (即 log₁₀(N_t/N₀) = -2 所需的时间)。

2 结果与分析

2.1 低温条件下, TMV 在不同水样中的灭活动力学

水温 4 $^{\circ}$ C, TMV 在不同水体环境中的灭活动力学显示 (图 1), TMV 在生活污水中的平均比灭活速度最大,膜过滤生活污水中次之,而在自来水中的平均比灭活速率最慢。在自来水经过 50d 后仅灭活 0.3 log₁₀(枯斑数/mL) 的 TMV,而在生活污水和膜过滤生活污水中则分别灭活 0.79 log₁₀(枯斑数/mL) 的 TMV 和 0.59 log₁₀(枯斑数/mL) 的 TMV,而在超纯水和闽江水中则分别灭活 0.52 log₁₀(枯斑数/mL) 的 TMV 和 0.5 log₁₀(枯斑数/mL) 的 TMV。TMV 在自来水、闽江水、超纯水、膜过滤污水及生活污水中的平均比灭活速率分别达 -0.01373d⁻¹、-0.0223d⁻¹、-0.02414d⁻¹、-0.0304d⁻¹ 和 -0.04154d⁻¹ (表 2)。预测灭活 99% 加入 TMV 所需的时间分别为 335、200.8、190.8、151.5、110.8d。

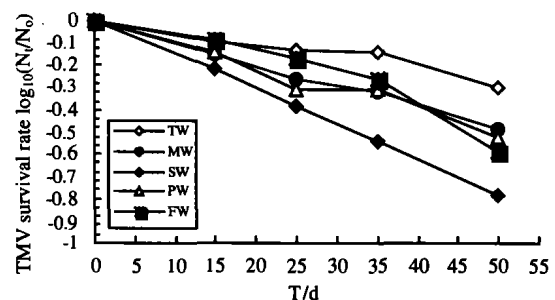


图 1 TMV 在 4 $^{\circ}$ C 条件下在不同水体环境中的灭活动力学
Fig. 1 The inactivation dynamics of TMV in different water bodies at 4 $^{\circ}$ C

TW-Tap water; PW-Superpure water; FW-distilled wastewater by microfilm filter WW-wastewater; MW-Min River water.

2.2 室温条件下 TMV 在不同水样中的灭活动力学

室温条件下 (20 $^{\circ}$ C), TMV 在生活污水中灭活速度同样最快,而在闽江水中次之,然后依次是在膜过滤生活污水、超纯水和自来水的灭活 (图 2)。最快与最慢灭活速率的水环境与在低温条件下 (4 $^{\circ}$ C) 的实验结果一致。TMV 在自来水中经过 50d 仅灭活 0.9log₁₀(枯斑数/mL),而在生活污水中则达 2.44 log₁₀(枯斑数/mL)。TMV 在自来水、超纯水、膜过滤生活污水、闽江水和生活污水中的平均比灭活速度依

次递增, 分别为 -0.03979 d^{-1} 、 -0.0665 d^{-1} 、 -0.0726 d^{-1} 、 -0.0802 d^{-1} 和 -0.1107 d^{-1} 。预测灭活 99% TMV 所需的时间则分别为 115.7d、69.6d、63.4d、57.4d 与 41.6d (表 2)。

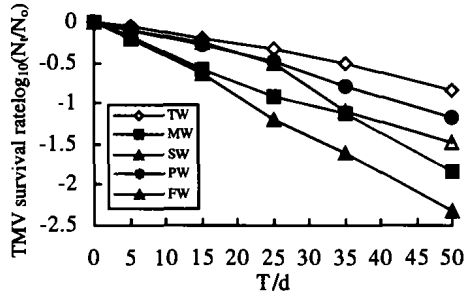


图 2 TMV 在 20°C 条件下在不同水体环境中的灭活动力学
Fig. 2 The inactivation dynamics of TMV in different water bodies at 20°C

2.3 35°C 条件下 TMV 在不同水样中的灭活动力学

35°C 水温条件下, TMV 在不同水样中的存活规律同室温条件下相似(图 3), 同样是在生活污水中灭活速度最快, 而在自来水中最慢。在其它水样中的灭活速度也同室温条件下的实验结果类似。然而同室温条件下的灭活速率比较, TMV 在 35°C 条件下的灭活速度显著提高。在自来水、超纯水、膜过滤除菌生活污水、闽江水和生活污水中的比灭活速率分别为 -0.15902 d^{-1} 、 -0.18067 d^{-1} 、 -0.18921 d^{-1} 、 -0.20381 d^{-1} 和 -0.26841 d^{-1} 。而预测灭活 99% 的 TMV 所需的时间分别为 28.9d、25.5d、24.4d、22.6d 与 17.1d。

2.4 不同水温条件下, TMV 在闽江水中的灭活动

力学

比较了 TMV 在同一水样中, 在不同的温度条件下的灭活动力学, 结果如图 4, 很显然温度是导致水体环境中 TMV 灭活的重要因素, 随温度升高, TMV 灭活速度急剧加快。

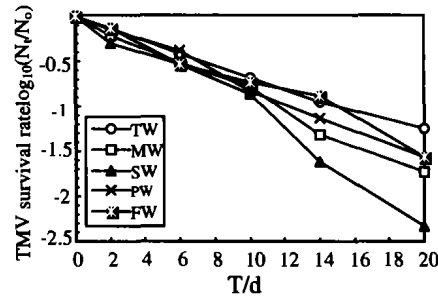


图 3 TMV 在 35°C 条件下在不同水体环境中的灭活动力学
Fig. 3 The inactivation dynamics of TMV in different water bodies at 35°C

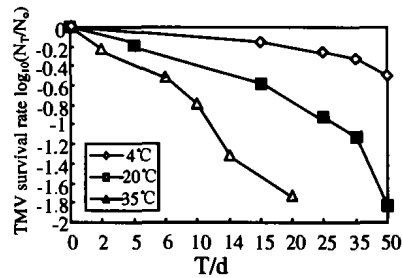


图 4 在不同温度条件下, TMV 在闽江水中的灭活动力学
Fig. 4 The inactivation dynamics of TMV in Min River water under different temperature

表 2 在不同水体环境及温度下 TMV 比灭活速率及 T_{99} 预测

Table 2 The ratio of TMV inactivation and their value of T_{99} in different water sample and temperature

Temperature (°C)	Inactivation ratio and T_{99} forecast in different water samples																			
	TW				PW				FW				SW				MW			
	r	T_{99}	R^2	P	r	T_{99}	R^2	P	r	T_{99}	R^2	P	r	T_{99}	R^2	P	r	T_{99}	R^2	P
4	-0.0137	335.6	0.945	0.008	-0.024	190.8	0.950	0.001	-0.030	151.5	0.863	0.003	-0.042	110.8	0.955	0.001	-0.022	200.8	0.979	0.001
20	-0.0398	115.7	0.967	0.001	-0.081	69.6	0.905	0.003	-0.073	63.4	0.915	0.003	-0.111	41.6	0.994	0.001	-0.080	57.4	0.974	0.002
35	-0.1590	28.9	0.940	0.000	-0.181	25.5	0.993	0.001	-1.119	4.1	0.972	0.024	-0.269	17.1	0.978	0.001	-0.204	22.6	0.983	0.000

TW-tap water, PW-superpure water, FW-distilled wastewater with microfilm, WW-wastewater, and MW-Min River water, r-the inactivation ratio of TMV, T_{99} was the time of inactivation 99% TMV, R^2 -the decisive coefficient, P was represent the significant level.

3 讨论

虽然 TMV 是一种可导致多种植物致病的重要植物病原体, 并可在植物压出汁液或吸附于植物残体和土壤颗粒上存活很长时间^[6], 然而有关其在水环境中的稳定性及其存活规律等研究却没有见到

报导。本次实验结果显示, TMV 可在不同的水体环境中存活相当长时间, 因此由 TMV 导致的植物病毒病有可能因流动的水体而造成远距离传播。TMV 具有较强的对水体中灭活因素的抗性同其具有紧密的双螺旋结构有着必然联系, 因为要使双螺旋外壳蛋白保护的病毒 RNA 受到破坏而失去活

性需要更大的环境压力。

已有研究指出, 温度是影响动物病毒或噬菌体存活的重要因素^[12,13], 与之相类似也是影响存在于水体中植物病毒存活的主要因素。在自来水中 TMV 的灭活速率分别从 4℃ 时的 $-0.005961d^{-1}$ 升高到 35℃ 的 $-0.06964d^{-1}$, 提高了近 10 倍。预测灭活 99% TMV 所需时间从 336d 减少到 29d, 在其它水体中的存活灭活规律也相类似 (表 2)。

除了温度是影响病毒在水体环境中生存时间长短的主要因素外, 病毒在同一实验温度下而在不同的水体中, 其比灭活速率也不相同, 这说明某些水质因子也对病毒的灭活在起作用。TMV 在 5 种不同水质理化特性的水体中灭活规律, 具有基本相似的特点, 即在任一实验温度下, 病毒在自来水中的存活时间总是最长 (表 2)。比较 5 种水体的理化特性, 主要区别是自来水中含有较高浓度的可溶性盐及较低浓度的有机物含量和细菌总数。由此可以认为, 水体的电导率对病毒的存活可能具有有利的作用, 而水体有机物及生物污染不利于病毒存活, 但生活污水中含有比自来水高的多的电导率, 然而其灭活速率反而最快。因此, 可溶性盐的存在及其含量对病毒生存的影响会因所处的环境不同而异, 相反水环境中可生化性有机质的存在却明显地降低病毒的存活时间。同时, TMV 在生活废水中的灭活总是最快, 这可能同生活污水含有最高的有机物质及细菌总数有着一定的联系, 这似乎也暗示着某些微生物或代谢产物对植物病毒 TMV 具有灭活活性。TMV 在生活污水经微孔滤膜过滤除菌后的存活时间延长, 这种现象说明, 水体中的生物污染因素确实影响着 TMV 在水环境中存活。从中还可以看出, 超纯水因水中基本没有离子成分又没有悬浮性物质存在, 但也没有对 TMV 具有灭活作用的活性物质存在, 因此 TMV 在超纯水中存活基本介于中间。在不同的温度下, TMV 的灭活机制可能略有不同, 如在低温 (4℃) 时, TMV 在灭菌生活污水中灭活速率均比在闽江水中灭活速率快, 可能原因是生活污水中本身含有的某些化学物质在起作用, 这些化学物质也有可能是原先生活污水中生物起源的物质。在 20℃ 或 35℃ 条件下, TMV 在闽

江水中的灭活速率均比在灭菌生活污水中的灭活速率快, 其机制大概是由于细菌在高温下大量增殖, 产生某些对 TMV 生存不利的物质, 从而加快 TMV 的灭活。5 种水样的理化特性显示, 生活污水也同样含有相当高的可溶性盐浓度, 为什么没有像在自来水中那样给予 TMV 保护作用, 这种机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Plese N, Juretic N, Mamula D. Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia[J]. *Phyton*, 1996, 36(1):135-143
- [2] Yarwood G E. Release and preservation of virus by boots[J]. *Phytopathology*, 1960, 50(1):111-114
- [3] Smith P R, Campbeu R N. Isolation of plant viruses from surface water[J]. *Phytopathology*, 1969, 59(15):1678-687.
- [4] Kerler G, Kleinhempel H, Kegler H. Investigation on the soil transmissibility of tomato bushy stunt virus[J]. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz*, 1980, 16(2):73-76.
- [5] Lanter J M, Goode M J, McGuire J M. Persistence of tomato mosaic virus in tomato debris and soil under field conditions[J]. *Plant Dis*, 1982, 66(7): 552-555.
- [6] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 水体环境中的植物病毒及其生态效应[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(1):1-7.
- [7] Kleinhempel H, Gruber G. Transmission of tomato bushy stunt virus without vectors[J]. *Acta Phytopathol Acad Sci Hung*, 1982, 15(3): 107-111.
- [8] Kegler G, Kerler H. On vectorless transmission of plant pathogenic viruses[J]. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz*, 1981, 17(5): 307-323.
- [9] Gooding G V, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. *Phytopathology*, 1967, 57(11): 1285-1289.
- [10] 裘维蕃. 《植物病毒学》(修订版)[M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [11] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 水体病毒浓缩条件的优化验[J]. *中国病毒学*, 2004, 19(1): 65-69.
- [12] Yahya M T, Cluff C B, Gerba C P. Virus removal by slow filtration and nanofiltration[J]. *Wat Sci Tech*, 1993, 27(2): 409-412.
- [13] Yate M V, Gerba C P, Kelly L M. Virus persistence in groundwater[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(3): 778-781.