

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.07.004

## 污水中包膜病毒离心超滤浓缩方法研究

李方旭, 杨伊菡, 周小红, 杨云锋, 刘锐平, 陆 韵, 刘艳臣,  
黄 霞

(清华大学 环境学院, 北京 100084)

**摘 要:** 针对污水中包膜病毒高效富集浓缩方法缺乏的问题,以Phi6噬菌体为模式包膜病毒,系统考察了超滤浓缩方法对污水样本中Phi6噬菌体的富集浓缩效果。结果表明,超滤筒的截留分子质量越小,对污水中Phi6噬菌体的回收率就越高,但所需浓缩时间也会增加。综合考虑回收率和耗时,推荐采用截留分子质量为10 ku的超滤筒,在4℃条件下3 000g正向离心28 min、1 000g反向收集5 min,浓缩倍数为110倍,回收率可达到 $(32\pm 3.7)\%$ 。

**关键词:** 包膜病毒; 污水; 超滤; 浓缩

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)07-0028-05

### Concentration of Enveloped Viruses in Wastewater by Centrifugal Ultrafiltration Method

LI Fang-xu, YANG Yi-han, ZHOU Xiao-hong, YANG Yun-feng, LIU Rui-ping,  
LU Yun, LIU Yan-chen, HUANG Xia

(School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** In view of the lack of methods for efficient concentration of enveloped viruses, this paper systematically investigated the performance of centrifugal ultrafiltration method for concentration of the bacteriophage Phi6 (taking it as a model enveloped virus) in wastewater. The recovery rate of Phi6 increased with the decrease of molecular weight cut-off of the ultrafiltration cartridge, however, accompanying with the prolonged concentration time. Considering the recovery performance and time, it was recommended to select the ultrafiltration cartridge with the molecular weight cut-off of 10 ku. Under the conditions of 4℃, forward centrifugation of 3 000g for 28 min and backward centrifugation of 1 000g for 5 min, and 110 times of concentration ratio, the recovery rate reached  $(32\pm 3.7)\%$ .

**Key words:** enveloped virus; wastewater; ultrafiltration; concentration

进入21世纪以来,由病毒传播引发的全球性重大公共卫生事件呈频繁加剧的态势,给世界经济和社会稳定带来重大挑战。特别是,近年来由SARS-CoV、SARS-CoV-2等呼吸道病原体导致的全球大流行病引发了人们对包膜病毒的持续关注。包膜病毒

包括正黏病毒科(如流感病毒)、副黏病毒科(如麻疹病毒)、疱疹病毒科、冠状病毒科等。其中,SARS-CoV、SARS-CoV-2为 $\beta$ 属冠状病毒<sup>[1]</sup>。SARS-CoV和SARS-CoV-2感染者的粪便中均已检测到活病毒<sup>[2-4]</sup>,提示粪口传播可能是造成此类病毒环境传播

基金项目: 国家自然科学基金资助重大项目(52091541)

通信作者: 周小红 E-mail: xzhzhou@tsinghua.edu.cn;

黄霞 E-mail: xhuang@tsinghua.edu.cn

的途径之一。2003年,香港淘大花园暴发的聚集性非典疫情被怀疑是由感染者粪便中携带的 SARS-CoV 经污水排放系统传播造成<sup>[5]</sup>。近期也有间接证据证明粪便气溶胶传播可能导致聚集性 COVID-19 暴发<sup>[6]</sup>。鉴于此,污水中包膜病毒的赋存状态、传播规律、风险评估,以及基于污水病毒检测的疫情预警等研究已引起国际学术界的广泛关注。

病毒精准检测是实现疫情科学防控的关键和前提,对于预防病毒经环境介质传播也至关重要。鉴于污水成分复杂、病毒含量低,病毒富集浓缩方法成为影响其检测效率的关键步骤之一。目前常用的病毒富集浓缩方法包括滤膜过滤-洗脱法、超滤法、PEG 沉淀法、氢氧化铝吸附-沉淀法和免疫磁珠分离法等<sup>[7]</sup>,但大部分研究仍是以污水中常见的非包膜病毒或病毒替代物——非包膜噬菌体为研究对象建立的。相较于非包膜病毒,包膜病毒对有机溶剂和 pH 值等条件更为敏感<sup>[8]</sup>,上述建立的富集浓缩方法不一定具有适用性。2003 年非典疫情暴发后,中国科学家采用美国环保署推荐的污水中肠道病毒和诺如病毒富集浓缩方法,通过污水加标 SARS-CoV,考察了掺杂纳米氧化铝纤维的阳离子滤膜对 SARS-CoV 的截留效率,发现该方法对 SARS-CoV 的回收率范围在 0%(居民区污水)与 21.4%(医院污水)之间,平均仅为 1.02%<sup>[9]</sup>。

国内外现行标准规范中尚未涉及污水样品中包膜病毒的富集浓缩标准化操作方法。为了探索最大程度保留包膜病毒活性的污水富集浓缩方法,很多学者做了不同的尝试。早期的研究以牛肠道冠状病毒为目标物,通过调节 pH 值至 3.3,利用负电荷的玻璃粉末吸附水中带相反电荷的病毒粒子,再用 pH 值为 9 的洗脱液将病毒粒子洗脱下来,使水样中的病毒粒子得到浓缩,该方法对目标物的回收率在 24%~28% 之间<sup>[10]</sup>。Heijnen 等人<sup>[11]</sup>考察了中空纤维超滤膜过滤对污水中甲型 H1N1 流感病毒的富集浓缩效果,发现浓缩倍数为 47 倍时,回收率可达到 70%~90%。Ye 等人<sup>[8]</sup>评估了 3 种从市政污水中分离和浓缩病毒的方法,包括 PEG 沉淀法、超速离心法和离心超滤法,发现离心超滤法效果最佳,对包膜鼠肝炎病毒(MHV)的回收率为 25.1%。Phi6 噬菌体(*Pseudomonas* phage)是一种植物细胞噬菌体,便于培养与检测,生物安全性高,且在污水环境中背景值低,常被用作包膜病毒替代物进行水中

包膜病毒的赋存与归趋研究<sup>[12-13]</sup>。笔者以 Phi6 噬菌体作为包膜病毒替代物,开展基于超滤法的病毒富集浓缩方法研究,考察了离心超滤筒的截留分子量对富集浓缩效果的影响,以为污水中包膜病毒离心超滤浓缩方法的建立提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Phi6 噬菌体与丁香假单胞菌(德国微生物菌种保藏中心);Centricon Plus-70 ultrafilter 超滤筒(截留分子量分别为 3、10、30 ku, Millipore);高速冷冻离心机;超净工作台(洁净度级别达 100 级)。

LB 液体培养基:1 L LB 培养基中加入 0.06 g 硫酸镁,溶解后转移至带盖玻璃瓶中,121 °C 灭菌 15 min,于 4 °C 下保存,不超过 1 个月。

LB 固体培养基:1 L LB 液体培养基中加入 15 g 琼脂,经 121 °C 灭菌 15 min 后,降温至(48±1) °C,倾倒入平板,凝固后封膜,置于 4 °C 下倒置保存,不超过 1 周。

LB 半固体培养基:1 L LB 液体培养基中加入 7.5 g 琼脂,经 121 °C 灭菌 15 min 后,置于 4 °C 下保存,不超过 1 周。

40% 的甘油冻存液:用超纯水配制 40% 的甘油溶液,经 121 °C 灭菌 15 min 后,置于 4 °C 下保存。

PBS 缓冲液:称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,溶解于 800 mL 纯水中,用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.4,加水定容至 1 L,混匀后放入玻璃试剂瓶中。经 121 °C 灭菌 15 min 后,于 4 °C 下保存,不超过 1 个月。

### 1.2 Phi6 宿主细胞的培养

取粉末状丁香假单胞菌进行扩大培养:①从 -80 °C 取出菌种干粉,加入 200 μL LB 液体培养基,室温静置孵育 30 min;②取 100 μL 孵育后的菌液涂布或划线于固体培养基平板,待菌液被吸收后倒置于 26 °C 生化培养箱中培养 14~20 h;③从平板上挑取单菌落接种于 20 mL LB 液体培养基中,于 26 °C、150 r/min 进行扩大培养 12~16 h 后,取出 100 μL 测定 OD<sub>640</sub> 达到 0.2 左右,用 40% 的甘油与菌液 1:1(体积比)混合后置于 -80 °C 冻存。

### 1.3 噬菌体的扩大培养

将购买的带有噬菌体的滤纸取出进行噬菌体扩大培养,具体步骤如下:①取固体培养基平板置

于26℃生化培养箱预热30 min;②将半固体培养基加热并冷却至48℃后,取出3~4 mL与0.1 mL新鲜培养的宿主菌液混合均匀,迅速将混合液倒入固体培养基平板中;③待固体培养基平板中上层半固体培养基-菌液混合物凝固后,打开噬菌体的安瓿瓶,用无菌镊子取出滤纸,将其放在含有宿主菌的平板中间;④滴入100 μL LB液体培养基浸润纸片,待液体基本渗入到固体培养基后,将平板倒置于26℃的培养箱中培养12~24 h,观察到平板中形成清晰明显的噬菌斑;⑤加入2~5 mL LB液体培养基至平板中,将平板置于室温下,摇床缓慢旋转4 h;⑥获得噬菌体悬浮液,5 000g高速离心将细菌沉淀,上清液用0.45 μm滤膜过滤以去除残留的宿主菌。获得的噬菌体悬浮液在4℃下可以保存两周左右,长期保存建议冻存于-80℃下。

#### 1.4 噬菌体效价测定方法

将半固体培养基加热溶解后冷却至50℃,置于水浴锅中保温。将待测噬菌体原液进行适度稀释,取0.1 mL稀释后噬菌体溶液,加入0.9 mL新鲜培养的宿主菌液与3 mL半固体培养基,快速混匀后立即倒入底层平板上(1.5%琼脂),轻摆摇匀,使半固体培养基铺满整个平板(如果不能铺满,培养基凝固后不要继续摇动)。待半固体培养基混合菌液凝固后,倒置,在26℃下培养14~18 h至观察到明显噬菌斑,记录培养时间。观察平板中的噬菌斑,选取30~300个噬菌斑的平板计数,计算每毫升未稀释的噬菌体原液的噬菌体效价:噬菌体效价(PFU/mL)=噬菌斑数×10×稀释倍数。

#### 1.5 离心超滤富集浓缩

离心超滤富集浓缩Phi6噬菌体的流程见图1。

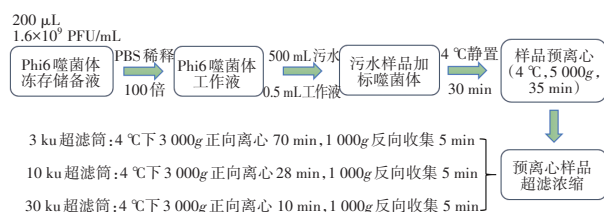


图1 离心超滤富集浓缩Phi6噬菌体的详细步骤

Fig.1 Detailed procedures for bacteriophage Phi6 concentration by centrifugal ultrafiltration

取出200 μL Phi6噬菌体冻存储备液,用100倍PBS溶液稀释制备成Phi6噬菌体工作液。取50 mL大兴污水处理厂进水,加入0.5 mL噬菌体工作液,

混合后在4℃下静置30 min。取混合液进行预离心,条件为4℃、5 000g、40 min。取上清液进一步做超滤离心二次浓缩,针对不同截留分子质量的滤筒,具体操作条件不同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 噬菌体效价测定

100 μL不同稀释倍数的噬菌体与900 μL宿主菌混合后在半固体培养基中的生长情况见图2。其中,A为空白对照,平板中只加入宿主菌;B~F分别为噬菌体原液经10倍稀释法稀释 $10^5$ ~ $10^9$ 倍后与宿主菌混合的生长平板。可以看出,平板D相较于其他平板,在长出了清晰可见的噬菌斑的同时,噬菌斑不十分密集,更易计数(30~300个噬菌斑),噬菌斑计数为37~40个(3个平行),计算得到噬菌体效价约为 $3.9 \times 10^9$  PFU/mL。

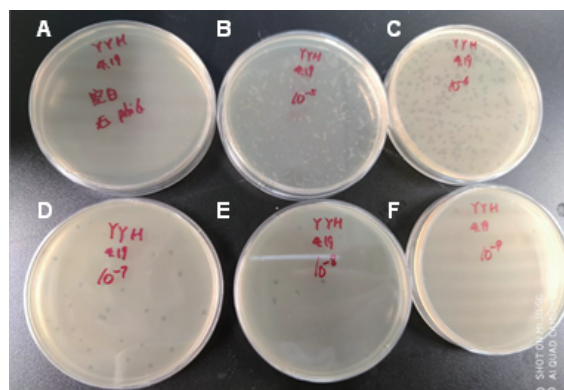


图2 噬菌体效价分析

Fig.2 Titer analysis of bacteriophage Phi6

### 2.2 不同离心超滤条件下的富集浓缩效果

#### 2.2.1 不同截留分子质量下的富集浓缩效果

表1为不同截留分子质量的超滤筒对Phi6噬菌体的回收情况,其中噬菌体工作液效价为 $1.60 \times 10^9$  PFU/mL,超滤滤液中噬菌体效价均无检出。对比污水加标噬菌体初始效价与工作液效价可知,噬菌体与污水混合后,均会产生一定程度的效价损失。分析可能的原因有二,一是噬菌体进入污水环境后不利于其存活,二是污水中含有的杂菌及其他干扰条件不利于噬菌体的培养,导致效价检测不够准确。为了验证上述猜想,考察加标污水中Phi6噬菌体效价随时间的变化,并通过对污水进行灭菌(121℃灭菌15 min)消除杂菌对效价测试的影响,结果见图3。当噬菌体与污水混合30 min后,噬菌体效价不再发生明显变化,以混合后30 min加标样进行后续



的超滤离心浓缩可以尽可能减少噬菌体效价随时间衰减造成的干扰。而且在同一时间,灭菌污水加标样效价更高,说明污水中的杂菌会对噬菌体的效价测定产生一定干扰。考虑到污水成分变化多样,在后续实验中,先考察污水加标噬菌体初始效价损失程度,以判断污水是否可用于加标实验,根据评判结果再进行超滤浓缩效果评估是必要的。

表1 不同截留分子质量的超滤筒对Phi6噬菌体的回收效果

Tab.1 Recovery effect of bacteriophage Phi6 by ultrafiltration cartridges with different molecular weight cut-off

截留分子质量/ ku	污水加标噬菌体初始效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	浓缩后 体积/ mL	浓缩液噬菌体效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	回收率/%	回收率1/%
3	4.00×10 <sup>4</sup>	0.45	5.37×10 <sup>6</sup>	30±0.6	121±2.6
10	4.85×10 <sup>4</sup>	0.45	5.63×10 <sup>6</sup>	32±3.7	104±12
30	5.15×10 <sup>4</sup>	0.45	3.87×10 <sup>6</sup>	22±1.8	68±5.6

注：“回收率”为浓缩液噬菌体效价相对于噬菌体工作液效价的百分比;“回收率1”为浓缩液噬菌体效价相对于污水加标噬菌体初始效价的百分比。

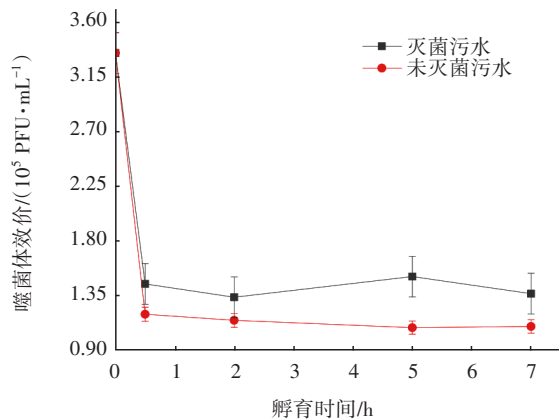


图3 加标污水中Phi6噬菌体效价随时间的变化

Fig.3 Variation of bacteriophage Phi6 titer with time in spiked wastewater

可以推测,若能够排除或减少污水中的杂菌及其他干扰条件对噬菌体效价评估的影响,基于浓缩液噬菌体效价与污水加标噬菌体初始效价计算得到的回收率(表1中的回收率1)应该更能反映不同截留分子质量超滤筒对污水中包膜噬菌体的富集浓缩效果。3 ku与10 ku截留分子质量下的回收率1均大于100%,分析原因可能是污水中固体颗粒悬浮物、生物质絮体等的存在,以及噬菌体加入后在

污水中的分布不均匀影响了污水加标后的初始噬菌体效价,使效价值偏低,而污水进行预处理及浓缩处理后噬菌体效价值较高,使得回收率1的计算值较大。从文献调研结果来看,基于浓缩液噬菌体效价与噬菌体工作液效价计算获得的回收率仍是当前评价病毒富集浓缩方法的主要指标<sup>[8,13]</sup>。在本研究中,不论参考何种回收率,当截留分子质量≤10 ku时,离心超滤对活性包膜病毒的截留程度最高。考虑到截留分子质量降至3 ku时,超滤所需时间明显增大。为减少超滤时间,同时获得相对较高的病毒回收率,建议使用截留分子质量为10 ku的超滤筒,在总离心时间为33 min、浓缩倍数为110的条件下,回收率可达到(32±3.7)%。

2.2.2 不同浓缩倍数的富集浓缩效果

在超滤筒截留分子质量相同的条件下,比较不同浓缩倍数对Phi6噬菌体回收率的影响。采用截留分子质量为10 ku的超滤筒超滤浓缩50 mL污水,浓缩倍数分别为30、55、110倍,噬菌体回收率分别为(59±8.7)%、(36±1.3)%、(32±3.7)% (见表2),表明增加浓缩倍数会对噬菌体回收率产生不利影响,可能与离心超滤中噬菌体相互挤压有关。

表2 不同浓缩倍数下污水中Phi6噬菌体的回收效果

Tab.2 Recovery effect of bacteriophage Phi6 from wastewater under different concentration times

噬菌体工作液效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	浓缩后 体积/mL	浓缩倍数/倍	浓缩液噬菌体效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	回收率/%
4.85×10 <sup>8</sup>	1.7	30	8.43×10 <sup>7</sup>	59±8.7
3.40×10 <sup>8</sup>	0.9	55	6.83×10 <sup>7</sup>	36±1.3
1.60×10 <sup>7</sup>	0.45	110	5.63×10 <sup>6</sup>	32±3.7

2.2.3 超滤筒再生的富集浓缩效果

为节省超滤筒,采用50 mL、0.5 mol/L的NaOH溶液对超滤筒进行超滤清洗,重复清洗两次后,加入70%乙醇溶液保存以重复使用。表3比较了新筒与再生筒对污水中噬菌体回收率的影响,在相近的噬菌体工作液效价和浓缩倍数条件下,再生筒较新筒对噬菌体的回收率有所下降,由(36±1.3)%降至(28±0.6)%,这可能与再生过程不能完全恢复超滤筒的功能有关。以往研究也表明,化学清洗滤膜会在一定程度上改变滤膜的性质,对截留病毒带来一定的不利影响<sup>[8,14]</sup>。此外,污水初始体积对回收率的影响不大。

表3 超滤筒再生前后对污水中Phi6噬菌体的回收效果

Tab.3 Recovery effect of bacteriophage Phi6 from wastewater before and after regeneration of ultrafiltration cartridge

项 目	噬菌体工 作液效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	污水体 积/mL	浓缩后 体积/ mL	浓缩液噬 菌体效价/ (PFU·mL <sup>-1</sup> )	回收 率/%
10 ku新筒	3.40×10 <sup>8</sup>	50	0.90	6.83×10 <sup>7</sup>	36±1.3
10 ku再生筒	3.60×10 <sup>8</sup>	50	0.80	6.20×10 <sup>7</sup>	28±0.6
10 ku再生筒	3.60×10 <sup>8</sup>	250	3.75	5.94×10 <sup>7</sup>	25±0.6

### 3 结论

建立了包膜病毒替代指示病毒Phi6噬菌体的培养和鉴定技术,系统考察和评估了污水中Phi6噬菌体富集浓缩离心超滤方法,发现超滤筒截留分子质量、富集浓缩倍数以及超滤筒是否再生均会对噬菌体回收率产生影响,综合处理时间与噬菌体回收效果得出,截留分子质量为10 ku的超滤筒效果最好,增大浓缩倍数和超滤筒再生均会使噬菌体回收效果下降。推荐最优富集浓缩条件如下:采用截留分子质量为10 ku的滤筒,在4℃条件下3 000g正向离心28 min,1 000g反向收集5 min,浓缩倍数为110倍,对Phi6噬菌体的回收率可达到(32±3.7)%。

### 参考文献:

- [1] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192.
- [2] LEUNG W K, TO K F, CHAN P K S, *et al.* Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(4): 1011-1017.
- [3] XIAO F, TANG M, ZHENG X, *et al.* Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2 [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(6): 1831-1833.
- [4] ZHANG H, KANG Z, GONG H, *et al.* The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.01.30.927806.
- [5] MCKINNEY K R, GONG Y Y, LEWIS T G. Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens [J]. *Journal of Environmental Health*, 2006, 68(9): 26-30.
- [6] KANG M, WEI J, YUAN J, *et al.* Probable evidence of fecal aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a high-rise building [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2020. DOI: 10.7326/M20-0928.
- [7] CASHDOLLAR J L, WYMER L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(1): 1-11.
- [8] YE Y, ELLENBERG R M, GRAHAM K E, *et al.* Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(10): 5077-5085.
- [9] WANG X W, LI J S, GUO T K, *et al.* Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 128(1/2): 156-161.
- [10] COLLOMB J, LAPORTE J, VAUTHEROT J F, *et al.* Research on coronaviruses in water. I. Adsorption and elution of the coronavirus on glass powder [J]. *Virologie*, 1986, 37(2): 95-105.
- [11] HEIJNEN L, MEDEMA G. Surveillance of influenza A and the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in sewage and surface water in the Netherlands [J]. *Journal of Water and Health*, 2011, 9(3): 434-442.
- [12] DE CARVALHO N A, STACHLER E N, CIMABUE N, *et al.* Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(15): 8692-8700.
- [13] YE Y, CHANG P H, HARTERT J, *et al.* Reactivity of enveloped virus genome, proteins, and lipids with free chlorine and UV<sub>254</sub> [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(14): 7698-7708.
- [14] LU R, MOSIMAN D, NGUYEN T H. Mechanisms of MS2 bacteriophage removal by fouled ultrafiltration membrane subjected to different cleaning methods [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(23): 13422-13429.

作者简介:李方旭(1997-),男,河北泊头人,硕士研究生,研究方向为水中微量污染物的快速生物传感分析技术。

E-mail:937334287@qq.com

收稿日期:2020-12-19

修回日期:2021-04-09

(编辑:刘贵春)