

参 考 文 献

- [1] 卞咏梅 陈树元, 植物生理学通讯, 1, 41—45 (1982).
- [2] 江苏省植物研究所编著, 城市绿化与环境保护, 7—29 页, 中国建工出版社, 1977 年.
- [3] 汪嘉熙, 环境污染与生态学文集, 29—35 页, 江苏省

科技出版社, 1980 年.

- [4] 谭常 李振国 刘恩 余叔文, 植物生理学报, 4, 433—435 (1980).
- [5] Mandl, R. H., L. H. Weinstein, M. Dean and M. Wheeler, *Environmental and Experimental Botany*, 20, 359—365 (1980).
- [6] Mandl, R. H., L. H. Weinstein and M. Keveny, *Environ. Pollut.*, 9, 133—143 (1975).

滑石粉-硅藻土技术浓缩水中病毒效果的研究

张楚瑜 李丕芬 李 军 王祖卿 王 萍

(武汉大学病毒学系)

监测水中的病毒是研究水病毒的基础, 包括病毒的浓缩、分离培养和鉴定三个部分. 从水中浓缩病毒的技术, 国外已有许多报道^[1-7]. 但上述方法都不够理想, 有的需要昂贵的仪器设备, 有的操作烦琐费时费力, 还有的浓缩水样极少.

我们参考了 S. A. Sattar 的工作^[8-10], 用国产设备和材料建立了适合于一般实验室条件开展水病毒研究的滑石粉-硅藻土浓缩系统, 取得了较好的效果. 本文报告我们的研究成果并作简要讨论.

材 料 和 方 法

1. 水样的采集

实验性病毒污染所用的水样分别采自武昌东湖的水和东湖水厂的自来水, 经高压灭菌后置室温备用. 自来水样消毒前加 0.4% 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)脱氯, 最终浓度为 1:100.

2. 病毒株

试验所用的病毒是减毒的 1 型脊髓灰质炎病毒. 用 Hela 细胞增殖, 测定滴度后分装, 置冰箱中备用.

3. 吸附剂

滑石粉 (广字 104 部队石粉厂产), 硅藻土 (上海行知中学校办工厂产).

4. 细胞

实验用 Hela 细胞, 其营养液为 1640 液 60%、0.5% 的水解乳蛋白汉克斯液 28%、灭活小牛血清 10%、适量 NaHCO_3 和青、链霉素.

5. 浓缩方法

(1) 吸附层的制备 将一张直径 60 毫米的新华滤纸平铺于 60 毫米直径滤器内衬垫上, 用灭菌后的水将滤纸浸湿, 把灭菌的滑石粉-硅藻土混悬液 (滑石粉 300 毫克, 硅藻土 100 毫克) 倒在浸湿的滤纸上, 使之形成均匀而平整的薄层, 然后盖上一张直径相同的滤纸. 用同样的方法在直径为 125 毫米的滤器内制备一个滑石粉-硅藻土单层 (滑石粉 1.2 克、硅藻土 0.4 克).

(2) 水样的处理 分别取 1 升和 10 升灭菌的自来水和东湖水, 按 1% 的比例加 Earle's 液于水样中 (增加两价阳离子促进病毒的吸附), 用 1N HCl 将水样的 pH 调至 4.5, 然后用已知滴度的脊髓灰质炎 1 型病毒加到两种水样中.

(3) 水样的浓缩 将处理的自来水样加到 60 毫米的吸附层上抽滤; 而东湖水样加到 125 毫米的吸附层上加压过滤. 待水样全部通过吸附层后, 分别用 10 毫升 pH 9.0 的洗脱

液(含 10% 小牛血清的生理盐水)就地洗脱吸附层上的病毒,得到的浓缩液用 0.3 微米的微孔滤膜除菌,置冰箱中待用。

6. 滴定

病毒滴定用 Hela 细胞培养管,浓缩液用 PBS 液连续 10 倍稀释,每个稀释度接种四管细胞,按照 Reed-Muench 的 50% 终点法计算回收的病毒滴度。

结 果

我们用滑石粉-硅藻土技术进行浓缩和回收实验性污染的自来水和东湖水中的脊髓灰质炎病毒,以确定滑石粉-硅藻土技术回收病毒的效率和不同浑浊度的水样对回收率的影响。用已知滴度的病毒液污染 1 升自来水样经抽滤吸附后,用小牛血清生理盐水(pH9.0)洗脱液洗脱,所得的病毒回收率(见表 1)在 54.2—98.2% 之间,平均 83.5%。

表 1 实验性污染自来水的病毒回收率

实验次数	1 升自来水中加入的病毒量 (TCD ₅₀)	浓缩液体积 (ml)	浓缩倍数	回收的病毒量 (TCD ₅₀)	回收率 (%)
1	59×10 ⁹	10	100	58×10 ⁹	98.2
2	59×10 ⁹	10	100	32×10 ⁹	54.2
3	59×10 ⁹	10	100	58×10 ⁹	98.2
平均	59×10 ⁹	10	100	49.3×10 ⁹	83.5

用已知滴度的病毒污染 10 升东湖水样,加压过滤吸附洗脱后,所得的病毒回收率(见表 2)在 57.2—82.1% 之间,平均为 79.8%。

表 1 和表 2 的数据说明,滑石粉-硅藻土技术回收自来水和东湖水样中病毒的效率都在 80% 左右,同 S. A. Sattar 研究的结果较接近^[9],水样的体积和浑浊度对回收病毒的效率影响不明显。另外,我们还做了自来水和东湖水样的对照实验,未见水样品对 Hela 细

胞的毒性作用。

表 2 实验性污染东湖水样的病毒回收率

实验次数	10 升东湖水中加入的病毒量 (TCD ₅₀)	浓缩液体积 (ml)	浓缩倍数	回收病毒量 (TCD ₅₀)	回收率 (%)
1	56×10 ⁹	10	1000	32×10 ⁹	57.1
2	56×10 ⁹	10	1000	46×10 ⁹	82.1
3	56×10 ⁹	10	1000	41×10 ⁹	79.8
平均	56×10 ⁹	10	1000	41×10 ⁹	79.8

讨 论

病毒检测的标准方法应该是能够有效地定量,回收率高的方法。我们采用滑石粉-硅藻土技术,经实验说明本法有三个优点:一是回收病毒的效率较高;二是设备经济易得、操作简便、速度快,浓缩 10 升水样只需 20 分钟左右,适合于一般实验室应用;三是我们多次对湖水和常规处理的自来水进行浓缩,都检测出了病毒。这证明该方法不仅适用于浓缩大量的水样,而且对浓缩含低浓度病毒的水样,灵敏度也是较高的。在整个浓缩过程中所用的 pH 是 4.5—9.0,比 M. C. Sagar 等人所用的膜吸附洗脱法^[11] pH (3.5—11.5) 范围窄,减少了病毒的灭活机会,使得那些对 pH 较敏感的病毒(例如腺病毒、呼肠孤病毒和轮状病毒等)易于检测出来。我们实验室用本法从湖水中已分离出了脊髓灰质炎病毒和柯萨奇病毒。S. A. Sattar 用这种方法还分离出了猴轮状病毒^[12]、腺病毒和人呼肠孤病毒,表明该方法能有效地浓缩多种病毒。S. A. Sattar 用 100—1000 升水样试验,加入的脊髓灰质炎病毒,每升水中为 1.2 个空斑形成单位,把水样浓缩 10 万倍,病毒的回收率在 58—64% 之间。

滑石粉-硅藻土浓缩病毒的基本原理是病毒与滑石粉的电化作用而产生的一种可

逆性结合。因为大多数病毒都有一层衣壳蛋白,其物理化学性质类似于蛋白质,在水溶液中病毒是两性亲水胶体,它的网状电荷受溶液的 pH、离子成份和离子强度的影响。在中性溶液中,病毒带负电荷。所以在酸性环境中病毒易吸附到滑石粉上。在碱性环境中,由于小牛血清的作用,病毒被解脱下来。如果小牛血清在滑石粉-硅藻土层上分布不均或作用时间太短时,就不可能把病毒全部洗脱下来,因而影响回收的病毒滴度。这可能是两组实验中的两次回收率较低的原因之一。另一种可能是洗脱前,滑石粉-硅藻土层中含水量过多,相对地加大了病毒浓缩液体积,也影响病毒滴度。经多次实验,我们体会到要提高病毒回收率应注意两点:一是洗脱液同吸附层接触要充分,并维持 3—5 分钟,让病毒尽量解脱;二是水样滤过后要加适量的洗脱液,一般用 10 毫升洗脱液洗脱,收获 8 毫升浓缩液为宜。

滑石粉-硅藻土技术同其它浓缩方法一样,样品中的颗粒性物质容易阻塞吸附层。我们解决这个问题的办法是:(1)配制滑石粉-硅藻土时,用无离子水反复洗三次,除掉微小的颗粒,减少阻塞,可浓缩 1—20 升水;(2)浓缩 20 升以上水样时,用 0.8 微米的微孔滤膜预过滤水样,除去一些较大的颗粒。

S. A. Sattar 等人曾用四种不同的洗脱液

进行洗脱效果的比较实验,认为 10% 小牛血清生理盐水是最好的洗脱剂。我们经过多次实验,先后用了不同批号的四批血清进行洗脱,也都获得了较好的洗脱效果。没有发现血清中有抗体或特异性病毒抑制因子存在。

综上所述,我们认为滑石粉-硅藻土技术是一种浓缩水中病毒较为理想的方法,适用于具有一般病毒学实验条件的实验室用。

参 考 文 献

- [1] Melnick, J. L., *American Journal of Hygiene*, 45, 240 (1947).
- [2] American Public Health Association. *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*, 14th ed., 968, (1975).
- [3] Albertson, P. A., *Nature*, 182, 709 (1958).
- [4] Wesslen, T. et al., *Arch. Ges. Viruforsch.*, 9, 510 (1959).
- [5] Sweet, B. H. et al., *Water Res.*, 6, 775 (1972).
- [6] Hill, W. F. Jr. et al., *Water Res.*, 5, 967 (1971).
- [7] Rao, V. C. et al., *J. Amer. Water Works Assoc.*, 5, 1288 (1968).
- [8] Sattar, S. A. et al., *Can. J. Microbiol.*, 22, 1620 (1976).
- [9] Sattar, S. A. et al., *Water Res.*, 13, 637 (1979).
- [10] Sattar, S. A. et al., *Water Res.*, 13, 1351 (1979).
- [11] Sagar, M. C. et al., *J. Water Pollut. Control Federation*, 2247 (1978).
- [12] Sattar, S. A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 430 (1980).

(上接封三)

而过,靠植物的吸收和有机层的吸附作用将污物与水分分离。

该研究中心提供的数据说,经过这些方法处理,可将污水中 98% 的氮和 97% 的磷除去,地下水中的营养物质和重金属浓度及其它所有监测数据都可达到饮用水标准。而且在混合硬木林(也有些柏树)用流经处理法也获得了同样好的效果。每处理 1000 加仑水的成本,湿地处理法为 0.422 美元,喷灌法为 0.63 美元,物理-化学法为 1.07 美元。而且湿地处理法不消耗能源和化学药品,还可起到调节地下

水在旱、雨两季的水位,减少树木及周围植物失火的作用。Waldo 附近河岸边树木的生长速度,比污水注入前加快了 2.6 倍,而且浮萍生长旺盛,很快覆盖了水面,它们吸收了污水中大量的氮、磷和重金属,弥补了在冬季树木处理污水能力的降低。

美国国家和联邦负责制订规章的有关机构表示,他们相信这种方法可以取代现有的三级水处理措施。由于河岸型比水墩型效率高,成本低,该研究中心正在对此类型湿地的负荷率和处理机制进行更深入的研究,以便正式投入使用。

(张仁编 译自 PB82-103540)