

沼气发酵法灭活肠道病毒实验研究

江苏省寄生虫病研究所 无锡市卫生防疫站
无锡市卫生防疫站

兴办沼气是农村一项重要的能源、肥料和卫生建设。沼气发酵对粪便中寄生虫卵及肠道致病菌的沉降、杀灭效果已被证实，但对病毒的灭活作用，国内未见报道。本课题旨在探索沼气发酵不同温度对肠道病毒的灭活作用。现将试验结果报告于下。

材料和方法

一、病毒准备：将脊髓灰质炎(灰质炎)病毒 I 型在Hela细胞中传代增殖，用 Reed和 Muench方法测定TCD₅₀，当病毒滴定达到10⁻⁶/0.025毫升以上时收获，-25℃冻存备用。

二、实验设计：共作两批试验。1983年夏季在实验室以猪、牛、人粪等自制微型沼气发酵池；1984年春季由农村沼气池(投料为人、猪粪及稻草等)取已发酵好的料液作为发酵料液。两批实验设计基本相同，在料液中投入制备好的病毒，使其TCD₅₀理论值约为10⁻⁵/0.025毫升，分装，严密加塞，压入适量沼气为实验组(沼气发酵组)。同时以加入与上同量病毒的发酵料液，不加塞，使成好氧发酵为对照一组；以含同量病毒的0.5%水解乳蛋白液为对照二组。各组再分别置于25℃、30℃及35℃三种温

度继续孵育发酵。共9个试验组。

三、取样及样品处理：投入病毒孵育发酵一小时后每组采样测定病毒量，作为投入病毒的初始浓度，以后每或隔天从各组取样测定，直到测不到病毒。所取样本按粪便标本病毒分离的要求，以活性炭及抗菌素处理、冻融、3000转/分离心30分钟，取上清液，-25℃冻存待检。

四、病毒测定：将处理好的样本在试管中作10倍递增稀释，以微量滴管加于聚苯乙烯培养板中，每稀释度四凹，每凹一滴(每滴0.025毫升)，每凹再加入Hela细胞悬液二滴(约含细胞1万/毫升)及营养液一滴，混匀，以透明胶纸密封，37℃孵育，第3天起每日观察结果，直至第7天。

结 果

1983年夏季的试验，投放病毒的初始浓度为10⁻⁶~10^{-6.75}，24小时后，实验组病毒灭活99.97~99.996%，发酵孵育后第6天查不到病毒(见表1)。对照组与之相比差别不大，只是对照二组中病毒灭活趋势较缓。

1984年春季重复了两次试验的平均结果：

表 1 1983年实验组不同温度对脊灰病毒灭活情况

发酵 天数	25℃		30℃		35℃	
	TCD ₅₀	灭活%	TCD ₅₀	灭活%	TCD ₅₀	灭活%
1	10 ^{-2.5}	99.99	10 ^{-2.5}	99.968	10 ^{-2.23}	99.996
2	10 ^{-2.5}	99.99	10 ^{-1.67}	99.995	10 ^{-1.33}	99.9996
3	10 ^{-2.0}	99.997	10 ^{-1.5}	99.997	10 ^{-1.0}	99.9998
4	10 ^{-1.33}	99.999	10 ^{-1.67}	99.995	10 ^{-0.67}	99.9999
5	10 ^{-0.67}	99.9999	10 ^{-0.5}	99.999	10 ^{-0.33}	99.9999
6	—	100.00	—	100.00	—	100.00

实验组投放病毒的初始浓度为 $10^{-5.31}$ ，发酵24小时后病毒大部灭活，灭活率为96.02~96.84%，35℃发酵孵育到第9天查不到病毒，而25℃到17天。对照一组在24小时灭活率为84.51~96.11%，21天病毒完全灭活；对照二组24小时灭活率为76.01~92.76%，直到24天仍有0.006~0.6%病毒活存，病毒剩余量随温度升高而递减(表2)。

表 2 1984年实验组不同温度对脊灰病毒灭活情况

发酵 天数	25℃		30℃		35℃	
	TCD ₅₀	灭活%	TCD ₅₀	灭活%	TCD ₅₀	灭活%
1	$10^{-3.81}$	96.84	$10^{-3.91}$	96.02	$10^{-3.81}$	96.84
3	$10^{-3.32}$	98.98	$10^{-3.42}$	98.70	$10^{-2.21}$	99.92
6	$10^{-2.71}$	99.75	$10^{-2.70}$	99.75	$10^{-1.70}$	99.97
9	$10^{-2.33}$	99.89	$10^{-1.5}$	99.89		100.00
13	$>10^{-0.33}$	< 99.99	$10^{-0.5}$	99.998		100.00
15	$10^{-0.33}$	99.99	$10^{-0.33}$	99.999		100.00
17	—	100.00	—	100.00		100.00
21	—	100.00	—	100.00		100.00
24	—	100.00	—	100.00		100.00

抗力较强，可在粪便中存活1月以上。本试验以灰质炎病毒为代表，试验结果表明本病毒在沼气发酵中存活时间明显缩短，提示利用沼气发酵方法对灭活粪便中的肠道病毒有一定效果，在可能范围内提高沼气池温度，可加速灭活效果。

二、1979年Fenters(贾尔芳译：国外沼气资料1981，2：13)用污泥上清液的厌氧发酵作灭活脊灰病毒试验，35℃时第3天即测不到病毒，25℃、30℃到第7天未测到终点。我们试验结果病毒存活时间较长，可能是由于发酵料液不同。

三、1983年夏季试验病毒灭活较快，可能由于发酵料液、试验季节等条件不同所致，其中最大可能是试验时温度的影响，因夏季气温高，接种罩中温度达39℃~40℃，可加速病毒的灭活。

四、本试验仅选用灰质炎I型病毒，在实验条件下进行，沼气发酵的不同条件对不同病毒的灭活效果等问题，有待于进一步探讨。

为了便于比较，用检出病毒存活百分率的数据连日计算平均每对间病毒的灭活率，可见两批试验皆以实验组平均病毒灭活率最高，对照一组次之，对照二组最低。各组平均灭活率均随发酵温度升高而上升。

讨 论

一、一般认为肠道病毒对外界理化因素的

摘 要

本文报告沼气发酵法灭活肠道病毒的实验效果。共进行两批试验，两批发酵材料相似，同样设三组、三种发酵温度共9个试验组，每组投入等量灰质炎I型病毒。用Hela细胞微量培养法逐日测定各组病毒的TCD₅₀。结果夏季病毒灭活较快，投放病毒发酵24小时后三组灭活率分别为99.97~99.996%、99.75~99.992%、90~99.99%，至第6天全部查不到病毒。春季发酵24小时后三组病毒灭活率分别为96.8~99.68%、85~96%、82~92.7%，实验组第17天查不到病毒，对照一组到21天，对照二组直到24天仍有0.006~0.6%病毒活存。从温度分析，35℃灭活最快。实验提示沼气发酵对肠道病毒有一定灭活效果，适当提高发酵温度可加速病毒灭活。

(刘秉辉 童鹤泉 执笔)

ABSTRACT

The inactivation effect on enteroviruses with methane fermentation products is reported.

There were two sets of experiments. Each set was further divided into three groups, fermenting material of each group were cultured under different temperatures (25°C, 30°C, and 35°C), and poliov-

irus type I was examined for its activity. Hela cell micro-culture method was used to determine TCD50 of the virus every day. The results were as follows: virus inactivation took place faster in summer than in spring. After incubation for 24 hours in summer, the inactivation rates in the three groups were: 99.97-99.996% (35°C), 99.75-99.992% (30°C) and 90-99.99% (25°C). No active virus could be found on the 7th day. In spring, the inactivation rates were 96.8-99.68% (35°C), 85-96% (30°C), 82-92.7% (25°C). No active virus could be found in the experimental

groups on the 17th day, whereas in the control group I on the 21st day, and 0.006-0.6% of virus could still be found in the control group 2 on the 24th day.

The results of the experiments indicated that methane fermentation products offers an effective method for inactivating enterovirus, and that in raising temperature of the environment properly might speed up the process of inactivation.

(参加工作的还有: 颜维安、袁琴芬、尤凤兴、丁茂金和钱敏诸同志)

云南省登革热血清学调查报告

云南省流行病防治研究所

张海林 施华芳 张嘉玉 米竹青 自登云

我们于1979~81年的8~12月,对云南省西部和南部的德宏、临沧和西双版纳三地、州正常人作了登革热血清学调查,结果如下:

共采取正常人群血清814份,以补结试验测定登革病毒抗体。抗体滴度 $\geq 1:8$ 为阳性,同时排除乙脑,基孔肯亚感染。结果阳性71份,阳性率为8.72%。其中耿马阳性率最高,为13.73%(14/102);其次为西双版纳(三县)9.21%(28/304)和临沧9.5%(19/200);瑞丽最低,仅为4.81%(10/208)。

从登革各型病毒抗体阳性率看,Ⅳ、Ⅱ型较高。GMT Ⅱ型(15.02)和Ⅳ型(23.83)高于Ⅰ型(12.48)和Ⅲ型(12.85)。结果表明Ⅱ、Ⅳ两型是当地人群

登革热主要抗体。

抗体滴度大多在1:8~1:16,部分达1:32或1:64,说明有近期感染和隐性感染。此外,还从西双版纳白纹伊蚊分离出Ⅳ型病毒。说明云南有本病自然疫源地存在。

我省许多地区属热带或亚热带气候,气温高、湿度大,白纹伊蚊分布广泛,又有本病病毒循环,人群免疫水平不高,有引起爆发流行的条件,应引起注意。

(云南省医学情报研究所张仁民医师,参加了瑞丽县的调查工作,谨此致谢)

(上接256页)

9. 江苏省嗜人按蚊调查协作组: 江苏省嗜人按蚊(雷氏按蚊嗜人亚种)初步调查报告, 内部资料, 1984
10. 沈大勇等: 河南信阳地区首次发现雷氏按蚊, 内部资料, 1980
11. 胡江水等: 雷氏按蚊地面分布与地形关系的研究, 中国医学科学院寄生虫病研究所, 1962年年报, 197页
12. 上海寄生虫病研究所: 雷氏按蚊嗜血习性的调查研究, 上海寄生虫病研究所技术资料汇编(1965~1971), 129页
13. 浙江省人民卫生实验院: 二种类型中华按蚊越冬的观察, 内部资料, 1957
14. 许锦江等: 昆虫学报, 13(5): 753, 1964
15. 安徽省芜湖市卫生防疫站: 中华按蚊与雷氏按蚊嗜人亚种

- 蚊卵越冬情况, 内部资料, 1976
16. 柳朝藩等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 2(4): 216, 1984
17. 李华宪等: 流行病学杂志, 1(4): 224, 1980
18. 李克清等: 四川动物, (4): 4, 1982
19. 许龙善等: 疟疾数学流行病学一种模型的初步尝试, 内部资料, 1981
20. 刘吟龙等: 浙江北部消灭疟疾实验研究, 中国医学科学院寄生虫病研究所1964年年报, 140页
21. 吴振友等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 2(4): 220, 1984