

水体病毒浓缩条件的优化*

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)

Studies On the Optimizing Conditions of Concentration Viruses in Water

ZHENG Yao-tong^{1**}, LING Qi-ying², XIE Lian-hui²

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

Abstract: It is very important to optimize the operating conditions of virus concentration from water body for evaluating virus's pollution and removing efficiency. In this paper, an optimizing method of virus concentration from water body was established. It was to adopt the way of throwing clay of Na-montmorillonite in water sample in advance, in order to increase the ability of viruses precipitation because of their adsorption to the clay, then choose a good quality flocculating agent of poly chlorination aluminum and optimize the operating conditions of precipitating the suspend solid of Na-montmorillonite. The rate of recoved viruses from different water bodies of Min River water, domestic sewage and drinking water were higher than 84.3% to PV₁, TMV and the phage of *E coli* by this concentration method. It can give a way of simplicity, high viruses recovery rate and low cost viruses concentration method.

Key words: Water body; Virus pollution; Virus concentration; Optimizing operation conditions

摘要: 病毒浓缩条件的优化是水环境病毒污染监测及灭活去除效率评价的基础, 本文开发了在待浓缩水样中预先加入钠化蒙脱石吸附病毒以增加其沉降性能, 并在优化絮凝条件下用聚合氯化铝絮凝沉淀蒙脱石钠的水体病毒浓缩方法。该方法对人为污染的脊髓灰质炎病毒 (*Poliovirus 1, PV₁*)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus, TMV*)、大肠杆菌噬菌体 (*Phage of Ecoli, E.cp*) 在闽江水、生活污水、自来水中分别有高于 84.3% 的浓缩回收率, 说明该浓缩方法具有较广泛的适用性和应用前景, 可为水体病毒污染监测及灭活去除评价提供一个简便、回收率高、成本低的浓缩方法。

关键词: 水体; 病毒污染; 病毒浓缩; 条件优化

中图分类号: Q939, X17

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0062-05

目前, 水体环境中存在有动、植物病毒及其对人类健康和农业生产的危害性已引起人们普遍关注^[1, 2]。了解水体病毒的污染状况与特征, 对于确定饮用水取水口、废水排放口的位置和决定水处理方法非常重要。然而一般水体中的病毒往往达不到可被直接检测的浓度 (PCR 法除外), 常需经预先浓缩才可被检测, 因此要了解水体的病毒污染状况, 首要条件是其浓缩方法的有效性和准确性。但

是, 目前还没有一种较理想的浓缩方法可供选用。总体上讲, 早期的浓缩方法, 应用范围有限且只能处理有限的水量, 还不能用于含有较高悬浮物或有机质的水体, 同时现场应用也很困难^[3-9]。曾认为膜吸附-洗脱法是比较理想的水体病毒浓缩方法, 然而也存在着许多难以解决的缺陷^[10-14]。因此开发一种较为理想的水体病毒浓缩方法已迫在眉睫, 这对于社会经济水平落后, 又没有饮用水病毒学卫生

收稿日期: 2003-07-14, 修回日期: 2003-09-20

* 基金项目: 福建省科技计划项目 (98-R-17) 和福建省自然科学基金 (D990017) 资助。

** 通讯作者: 郑耀通 (1965-), 男, 浙江丽水籍, 副教授, 博士, 从事环境生物学教学与科研工作
Corresponding author. E-mail: zyt168@yahoo.com

标准的发展中国家显得更为重要。为此, 本文对用化学絮凝法浓缩水体病毒的浓缩条件进行了优化, 目的在于为水体病毒的浓缩提供一个简便、快速、高效低成本的方法。

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。常规摩擦接种于普通烟 K₃₂₆ 上增殖, 待植株严重发病时, 取症状典型的嫩叶作为 TMV 毒源, 经正丁醇抽提, 聚乙二醇沉淀提取 TMV 作为浓缩用病毒实验材料, 在心叶烟植株上枯斑寄主法定量^[15]。

PV₁ 疫苗株 (*Poliovirus 1*, PV₁) 由某卫生防疫站赠送, 在 Hep₂ 细胞中于 RPMI 1640 (Gibco 产品, 含 L-谷氨酰胺、25mmol/L 的 HEPES 生物缓冲剂及 10% 胎牛血清) 基质中繁殖后, 反复 3 次冻融后离心收集病毒液作为实验用病毒样品, 空斑形成单位 (PFU) 法定量^[16]。大肠杆菌噬菌体 (*Phage of E coli*, E_{cp}) 为本实验室收藏, 寄主为大肠杆菌 DH₅₂, 琼脂法噬菌斑定量^[17]。浓缩用水样分别为闽江水 (取于本校门口河段)、生活污水 (本校南区教工及学生宿舍排放污水) 和实验室自来水。

1.2 浓缩材料及其制备

絮凝剂聚合氯化铝 (poly chlorination aluminum, PCA) 购自福建漳州锦业净水剂有限公司, 其碱化度 $B \geq 2.5$ 。吸附剂粘土蒙脱石 (Montorillonite) 先经水力沉降处理, 取粒径 $< 2\mu\text{m}$ 的颗粒, 悬浮于 5 倍体积 1.0 mol/L NaCl 溶液中, 经磁力搅拌钠化 60min 后, 静置过夜。第二天离心沉降弃去上清液后, 重复上述过程再次钠化, 重复 3 次后, 用超纯水反复洗涤, 离心除去多余 NaCl, 直到上清液用 AgNO₃ 检验不到含有氯离子。取沉淀物在 95℃ ~ 100℃ 烘干, 磨细后即 为 吸附剂蒙脱石钠。

1.3 水体病毒浓缩条件优化

1.3.1 蒙脱石钠对大肠杆菌噬菌体的吸附动力: 以定量钠化蒙脱石在不同的吸附时间内, 对大肠杆菌噬菌体的吸附差异, 及在一定时间内不同浓度蒙脱石钠吸附定量噬菌体能力的差异来说明吸附剂对噬菌体的吸附动力。

1.3.2 沉降柱中聚合氯化铝沉降蒙脱石钠的均匀设计试验: 选用 3 因子 4 水平, U₅(5⁴) 表头设计的均匀设计法对絮凝沉降蒙脱石钠的操作条件进行优化, 其因子水平及设计方案列于表 4。

1.3.3 聚合氯化铝絮凝沉降试验、沉降曲线及蒙脱

石钠沉降效率 E_T 值测定: 实验用多点取样沉降柱, 采用有效高度 1.5 米, 内径 9.5cm 的有机玻璃柱, 柱体一侧每隔 30cm 为一个沉降取样高度, 各沉降高度的终线上有一取样口。将 300mg/L 钠化蒙脱石与按表 4 设计加入不同浓度 PCA 及 CaCl₂, 在不同 pH 环境的蒸馏水中混合后, 倾入沉降管内, 分别在不同时间段内测定沉降柱某处蒙脱石钠溶液的光密度, 以此值表示不同时间及不同水深处的残留悬浮物 SS 浓度。对数据进行处理, 绘制出不同水深处的 E-t 曲线和 SS 等去除率曲线, 并计算指定水深 H 处在不同沉降时间下的蒙脱石钠总沉降速率 E_T (%)。以此 E_T 的大小来衡量絮凝沉降操作条件。

1.4 病毒在不同水体中的浓缩回收

分别取闽江水、生活污水、自来水作为浓缩病毒载体水样, 各水样标本分成 2000mL 的 3 份, 取其中 2 份按 2.4×10^3 PFU/L (终浓度) 左右投入已知浓度的 PV₁、TMV 或大肠杆菌噬菌体。另一份作为病毒污染本底对照水样, 依上述优化沉降条件浓缩病毒, 并计算同一病毒在不同水体环境中及不同病毒在同一水体中的病毒浓缩回收率, 以说明该浓缩方法的适用性和可靠性。

2 结果与分析

2.1 水样中加入粘土悬浮物对病毒的吸附效果

考虑到河水中病毒含量相对较低及水环境中病毒的存在状态和吸附机制, 为提高病毒的浓缩效率并缩短浓缩时间以减少病毒的灭活程度, 本实验采用预先在待浓缩水样中加入粘土物质来吸附病毒使其快速沉降而得到浓缩的方法。在蒸馏水中添加粘土蒙脱石和膨润土对大肠杆菌噬菌体的吸附效果列于表 1。结果显示蒙脱石与膨润土对大肠杆菌噬菌体的吸附能力不同且吸附机制也有差别, 因为从沉淀物中洗脱回收吸附病毒的效率, 膨润土的洗脱率显著低于蒙脱石的洗脱率, 这种现象说明病毒同膨润土的结合能力明显高于蒙脱石与病毒的结合力。这种同悬浮物结合的洗脱特性决定了膨润土不能用于水体病毒浓缩前的吸附剂。另外, 实验还发现同样的粘土, 当溶液中含有金属离子时, 吸附病毒的能力会显著增加, 其中蒙脱石钠吸附剂再加入钙离子后吸附病毒的能力最高, 同时与悬浮物结合的病毒也可绝大部分回收, 因此宜选用蒙脱石钠作为病毒浓缩前的吸附剂。

2.2 蒙脱石钠对大肠杆菌噬菌体的吸附动力

表 2 结果显示, 300mg/L 蒙脱石钠对大肠杆菌噬菌体的饱和吸附可在很短时间内完成 (10~30min),

表 1 在蒸馏水中添加粘土对大肠杆菌噬菌体的吸附效果

Table 1 The results of clay matter adsorbed E.cp at different conditions in distilled water

Adsorbents	Virus percent of the Dissociations(%)	Recovery rate of virus in the precipitate(%)
蒙脱石(Montmorillonite)	63.2	97
蒙脱石+Ca ⁺⁺ (Montmorillonite+Ca ⁺⁺)	12.1	>99
蒙脱石钠 (Na-montmorillonite)	5.6	>99
蒙脱石+Ca ⁺⁺ (Na-Montmorillonite+Ca ⁺⁺)	<1	>99
膨润土 (Bentonite)	89	14
膨润土+Ca ⁺⁺ (Bentonite+Ca ⁺⁺)	13.8	21

Note: the conditions of the experiment were 300mg/L clay , 0.005mol/L CaCl₂ , 30min adsorption time. The adsorbed virus was extracted by 0.05 mol/L Gly-EDTA(1 mmol/L), pH 9.5 buffer(2~3 times volume of the precipitate), and then centrifugation 10min at 5 000r/min. The concentration of virus was 2.4×10³pfu/L, the water pH value was 4.0. The rate of virus adsorption was determined by

后随吸附时间延长,病毒吸附量略有增加,到 30min 左右时最高,但再延长吸附时间其吸附率反而略有下降,可能是部分已吸附的病毒重新解吸或灭活。因此,吸附时间宜控制在 30min 以内。蒙脱石钠浓度变化对吸附大肠杆菌噬菌体的不同效果表明(表 3),随钠化蒙脱石浓度的增加,吸附病毒总量增加,但 300mg/L 与 500mg/L 的吸附剂吸附效率已差别不大,再者悬浮物过高加入会增加工艺的复杂性,也会降低第一次洗脱病毒的回收量并增加洗脱液的体积,因此宜选择加入蒙脱石钠吸附剂浓度低于 300mg/L。

表 2 蒙脱石钠吸附大肠杆菌噬菌体的吸附动力

Table 2 Dynamics of Na-montmorillonite adsorption E.cp in distilled water

Adsorption time(min)	The rate of virus adsorption(%)
2	54.6
5	87.4
10	89.7
30	93.7
60	90.8

Note: The concentration of Na-montmorillonite was 300mg/L, pH value of distilled water was 4.0, the total import virus concentration was 2.3×10³pfu/L, the other experiment conditions were the same as table 2-1 experiment.

表 3 不同浓度蒙脱石钠对 E.cp 的吸附差异性

Table 3 The results of different concentration of Na- montmorillonite adsorb E.cp

Na-montmorillonite(mg/L)	Adsorption rate of virus(%)
50	63.7
100	80.7
200	85.6
300	90.3
400	91.2
500	92.3

Note: the virus concentration was 3.4×10³PFU/L, adsorption time was 30min. the other conditions were the same as table 1.

2.3 均匀设计法优化混凝沉降蒙脱石钠的操作条件

沉降蒙脱石钠的均匀设计因子水平与实验条件列于表 4,对实验结果进行统计学分析后,结果显示影响悬浮物沉降效率的主要因素是 PCA 浓度,在一定悬浮物浓度下,有一个最合适的 PCA 浓度值;水环境中性 pH 利于 PCA 絮凝悬浮物沉降。实验结果 C 组沉淀效率最高,考虑到过低的 pH 对病毒存活不利并进一步提高 PCA 的絮凝效果,选择 C 组的浓缩条件但适当提高 pH 值作为浓缩水体环境中病毒的操作条件。

表 4 均匀设计法确定 PCA 混凝沉降蒙脱石钠操作条件与沉降效率

Table 4 The conditions and results of PCA precipitate Na-Montmorillonite with the design of even

Group	Poly chlorination aluminum(mg/L)	pH	CaCl ₂ (mol/L)	Rimoving rate of the Na-Montmor-llonite(%)
A	5(1)	4(2)	0.05(4)	46.7
B	10(2)	6(4)	0.01(3)	70.5
C	20(3)	3(1)	0.005(2)	90.8
D	30(4)	5(3)	0.0025(1)	87.4

Note: the SS removing rate after one hour flocculation subside at the experiment of three factors and four levels (Number inbrackets) U₃(5⁴) even design

2.4 优化沉降蒙脱石钠条件下的浓缩水体病毒效果

同一种病毒在不同水体条件下及同一种水样对不同的病毒浓缩效果如表 5 所示,结果显示,该浓缩法对肠道病毒 PV₁、大肠杆菌噬菌体、植物病毒 TMV 在三种不同的水体环境中分别有平均 90.5%、88.3%、94.1%的回收率,而三种病毒在同一种水体如闽江水、自来水、生活污水中的回收率分别达 91.1%、93.9%、87.8%,说明该法具有较广泛的适用性和应用价值。

表 5 优化沉降蒙脱石钠条件下的浓缩病毒效果

Table 5 The results of concentration viruses from different water by PCA

Sample of waters	Viruses recovery rate (%)		
	PV ₁	TMV	E.coli
闽江水(Min River water)	90.4	94.2	88.6
生活污水水(Domestic sewage)	87.2	90.1	84.3
自来水(Drinking water)	93.6	97.5	90.8

3 讨论

水体病毒污染监测包括代表性水样采集、水样浓缩、病毒检测及鉴定等过程, 其中水样的浓缩是关键。曾有不同的方法用于浓缩水体病毒, 但都存在一些缺陷。这些方法大多是利用了病毒的理化特性如物理吸附、沉淀、相分离、膜过滤及其在电场下的迁移等原理。较早的方法主要涉及到病毒外壳蛋白与吸附剂表面的电化学相互作用, 如用多价阳离子盐、不溶性多聚电解质沉淀浓缩病毒^[5-7, 9, 13, 19]; 也有用病毒对矿物质的吸附特性如用膨润土、滑石粉吸附水体中的病毒^[3, 4, 8, 14]; 还有像电泳、电渗透、冷冻等方法也曾用于浓缩水体中的病毒。然而, 前期的水体病毒浓缩方法, 应用范围有限, 往往只能处理有限的水量, 也不能用于含高浓度悬浮物或高有机质的水体, 同时在现场应用也很困难。在目前的条件下, 膜吸附—洗脱法是较好的水体病毒浓缩方法^[20, 21], 经过不断的改进, 如用不同滤膜作为病毒的初始吸附, 或加入一定量的盐和酸以提高病毒对膜的吸附能力等措施, 已成功地用于 500 加仑自来水的浓缩。但是这种方法, 对含有较高浓度的悬浮物、无机盐或可溶性有机物质的水样, 浓缩病毒却有很大的困难^[10, 22], 因水样中的悬浮固体易于堵塞过滤膜而减少了可处理水样的体积。然而, 膜过滤浓缩水体病毒方法最大的缺陷还是其过滤流速受到限制, 且随时间的延长, 流速会越来越慢^[23]。如果水样中有可溶性高分子有机物的存在, 这些物质还会同病毒竞争滤膜上的吸附位点而减少病毒的实际回收率。同时, 有机物(如腐殖酸等)的存在对于初始洗脱液的进一步浓缩也有很大的妨碍作用^[11]。膜过滤病毒浓缩方法的另一个明显缺陷是由于使用了微孔膜, 需要很长的过滤操作时间^[8, 12, 13]。再者, 当过滤大容量水样时, 一个重要的技术难题是能否保证给定的滤膜都吸附相等量的病毒, 即会不会随着过滤时间的延长, 病毒的吸附量不一样, 事实上已有

研究指出, 并不是所有的病毒都以相同的流速吸附到膜上^[24]。另外, 过滤的流速也影响膜对病毒的吸附效率, 病毒对膜的吸附随流速的增加而减少, 因为最小的接触时间对于病毒与过滤膜之间电荷的相互作用是必须的。当然, 膜过滤法还需昂贵的进口阳电荷滤膜和不锈钢正压设备。因此, 开发比滤膜过滤法浓缩水体病毒更有效的方法已迫在眉睫。

理想的水体病毒浓缩方法应该能在最短的时间内完成, 可处理大量水样, 能浓缩存在于水环境中的大多数病毒且回收率高和稳定, 还能检测到沉积及吸附到悬浮颗粒上的病毒, 不受水质尤其是浊度的限制, 操作过程简易、价廉且尽可能快和适于现场应用等优点。根据这一原则, 从最早的纱布包法、到后来的电泳、冷冻、相分离和目前应用最多的膜过滤法等都无法满足上述要求。但如能优化和利用水环境中病毒自身聚集、对颗粒物的吸附及解吸条件, 采用简易的化学絮凝法浓缩水体病毒是一个值得重视和深入研究的方法。单就操作条件而言, 该法无需昂贵的不锈钢过滤装置和空气压缩机, 也省去进口的阳电荷滤膜, 还可避免水样浊度对有过滤程序浓缩水体环境中病毒方法的制约以及易堵塞滤膜、耗时过长并造成大量病毒丢失, 更无法处理大量水样的缺陷。因此, 化学絮凝法对一般基层实验室不失是一种理想的水体病毒浓缩方法的首选方法。

要监测水体病毒污染状况, 其首要条件是水样浓缩方法的有效性和准确性。浓缩方法的有效性取决于一系列因素, 其中所能处理水样的体积和对不同水质类型的适应性, 以及快速易于使用等都是衡量一个浓缩方法有效性的重要标志。另外, 浓缩的条件还要不使病毒在浓缩过程中灭活, 在不利于病毒存活的操作时间要尽可能短等因素都需要考虑。开发简便、成本低、适用范围广、浓缩效率高的方法对发展中国家意义重大。我国张楚瑜等学者曾在 1983 年发展了滑石粉—硅藻土水体病毒浓缩方法^[14], 该法由于其原理在于病毒吸附—膜过滤—洗脱, 因此也存在着膜过滤法本身固有的缺陷。同时, 赵淑敏等^[18]比较了滑石粉—硅藻土浓缩法、阳电滤膜过滤法、三氯化铝沉淀法三种方法浓缩水体病毒的不同效果。每种浓缩方法分别测 5 种水样, 每种水样分别测 6 次, 实验发现: 三氯化铝沉淀法无论在各种水源的检测中均显示出较高的回收率(50.12%~79.43%), 其次是滑石粉—硅藻土法(35.48%~50.12%)。还发现用滑石粉—硅藻土法的试验结果稳定性也很差, 同时试验操作所花时间最长且还需

不锈钢过滤器和空气压缩机等设备。三种方法中三氯化铝絮凝沉淀法回收率最高,方法也最简单。郭润霞等^[25]也认为三氯化铝絮凝沉淀法操作简单、不需特殊的试剂和设备、适于基层实验室使用。本实验浓缩方法又在三氯化铝浓缩方法的基础上加以发展改良,采用预先加入钠化高岭土吸附病毒以提高其沉降性能,并选择性能优良的 PCA 絮凝沉淀悬浮物的方法来浓缩水体环境中病毒,该法对动物病毒(PV₁)、噬菌体(*E.coli* phage)、植物病毒(TMV)在三种不同水体中分别有平均 90.5%、88.3%、94.1%的回收率;而在闽江水、自来水、生活污水中的回收率分别达 91.1%、93.9%、87.8%,说明该法具有较广泛的适用性和应用价值。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Bitton, G. Introduction to environmental virology [M]. New York: John, Niley & Sons, 1980.
- [3] 张楚瑜, 李 军, 李丕芬, 等. 武昌东湖水中病毒的分离鉴定[J]. 中国环境科学, 1983, 3(4): 55.
- [4] 张楚瑜. 自来水病毒污染的初步研究[J]. 环境科学, 1984, 5(2): 29.
- [5] Cookson J T. The chemistry of virus concentration by chemical methods[A]. In: "Development in industrial microbiology"[C]. Arlington: American Institute of Biological Science. 1974. 15: 160-173.
- [6] England B. Comparison of methods for concentration of the viral content of sewage and treated effluents [A]. In: "International Virology"[C]. 1971, 342-325.
- [7] England B. Concentration of reovirus and adenovirus from sewage and effluents by protomine surface (saline) treatment[J]. Appl Microbiol, 1972, 24: 510-512.
- [8] Kalter S S. Efficacy of methods for the detection of viruses in treated and untreated sewage[A]. Virus Survival in Water and Wastewater Systems, In: "Water Resources Symposium Number 7. University of Texas at Austin" [C] 1974, 33-44in.
- [9] Lal S M, Lund E. Recovery of virus by chemical precipitation followed by elution[A]. Presented at the International Water Pollution Research Conference[C]. Paris, France. 1974.
- [10] Farrah S R, Gerba C P. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1976, 31: 221-226.
- [11] Payment P. Methods of concentrating viruses from large volumes of estuarine water on pleated membranes[J]. Wat Res, 1976, 10: 893-896.
- [12] Sobsey M D, Wallis C, Henderson M. Concentration of enteroviruses from large volumes of water [J]. Appl Environ. Microbiol, 1973 26: 529-534
- [13] Wallis C, Melnick J L. Detection of viruses in large volumes of nature water by concentration on insoluble polyelectrolyte[J]. Wat Res. 1970, 4: 787-796.
- [14] 张楚瑜. 滑石粉-硅藻土浓缩水体环境中的病毒[J]. 环境科学, 1983, 4(2): 54-57.
- [15] 裘维蕃. 《植物病毒学》[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [16] 戴华生. 《病毒学实验诊断技术》(资料专辑) [M]. 南昌: 江西省出版事业管理局, 1980.
- [17] 余茂效, 司樨东. 《噬菌体实验技术》[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [18] 赵淑敏, 田勇琴, 孟昭英, 等. 三种浓缩方法在水体病毒分离中的比较研究[J]. 环境与健康杂志, 1996, 13(3): 120-122.
- [19] Wallis C, Grinstein S J. Concern traction of virus from sewage and excreta on insoluble polyelectrolyte [J]. Appl Microbiol, 1969, 18: 1007-1014.
- [20] Wallis C, Homma A. Apparatus for concentrating viruses from large volume water[J]. J Am Water Works Assoc. 1972, 64: 189-196.
- [21] Sobey M D. Concentration of enteroviruses from large volumes of turbid estuary water[J]. Can Microbiol, 1977, 23: 770-778
- [22] Homma A. Virus concentration from sewage [J]. Wat Res. 1973, 7: 945-950.
- [23] Wallis C, Melnick J L. Concentration of enterovirus on membrane filters [J]. J Virol, 1967, 1: 472-477.
- [24] Powelson D K. Fate and transport of microorganisms in the vadose zone[A]. In: "Handbook of vadose Zone Characterition and Monitoring. Boca Raton "[C]. Wilson, L.G. Everett (ends). Flo: Lewis Publishers. 1995, 123-125.
- [25] 郭润霞, 黄海云, 翼 玲, 等. 三氯化铝—氯化钠絮凝法浓缩水中肠道病毒[J]. 环境与健康杂志, 1997, 14(4): 176.