

# 不同地表水体中四种典型肠道病原细菌的分布特性研究

张爱宁, 闫志刚, 刘丽, 刘永军

(西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 西北水资源生态与环境教育部重点实验室, 西安 710055)

**摘要:** 利用实时荧光定量 PCR 方法, 对西安市区洁净水体、轻度污染水体以及重度污染水体中的大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏痢疾杆菌以及霍乱弧菌进行 4 个月的连续检测, 结果表明: 霍乱弧菌在各种地表水体, 甚至城市污水中均未检出, 而埃希氏大肠菌从各种水体检出的频度最高, 且在水体受到轻微污染后即持续检出。在污染严重的水体中, 埃希氏大肠菌检出的强度在  $10^4 \sim 10^5$  copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, 沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌检出强度分布在  $10^1 \sim 10^2$  copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, 且能够持续检出; 在轻度污染水体和清洁水体中, 3 种病原细菌的强度都在 10 copies·(100 mL)<sup>-1</sup> 左右, 并且不能够连续检出。这些结果说明, 对于污染严重的水体, 埃希氏大肠菌是水中肠道感染细菌的主体, 沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌强度尽管远低于埃希氏大肠菌, 但可以认为是水体病原污染的标志之一。

**关键词:** 地表水; 肠道病原细菌; 分布; 定量 PCR

**中图分类号:** X131.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-9901(2011)01-0272-06

## Distribution of four kinds of typical enteric pathogens in different surface waters

ZHANG Ai-ning, YAN Zhi-gang, LIU Li, LIU Yong-jun

(Key Laboratory Northwest Water Resource, Ecology and Environment, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

**Abstract:** The cell densities of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* in clean waters, slightly polluted waters and seriously polluted waters located in urban area of Xi'an were detected continuously for four months by using real-time quantitative PCR(QPCR) method. The results showed that the *Vibrio cholerae* was not existed in any kinds of surface waters, even not found in municipal wastewater. However, *E. coli* is the one that can be most frequently found out in all kinds of waters. When the water was polluted slightly, it could be detected continually. In seriously polluted waters, the cell densities of *E. coli* is  $10^4 \sim 10^5$  copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, the cell densities of *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* are  $10^1 \sim 10^2$  copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, and can be detected continually. In clean waters and slightly polluted waters, the cell densities of three enteric pathogens above are 10 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, and can not be detected continually. These results indicated that the *E. coli* is the main pathogenic bacteria in the seriously polluted waters, although the cell densities of *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* are far lower than that of *E. coli*, it still can be considered as one of the marks of water pathogenic pollution.

**Key words:** surface water; enteric pathogens; distribution; real-time quantitative PCR(QPCR)

随着城市工业化进程的加快, 城市污染也随之加重, 更多未经处理的污水直接排放到地表环境, 从而引发人类多种疾病甚至死亡, 这在发展中国家尤为严重。特别是通过水域传播的疾病, 如痢疾、伤寒、霍乱, 以及旅行中常见的腹泻等 (Hunter, 1977), 都是由致病细菌引起的。由此可见, 水域

收稿日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50848045); 陕西省教育厅项目 (2010JK648); 陕西省重点实验室项目 (2010JS026)

通讯作者: 刘永军, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

性病原菌的常规监测, 对于公共健康来说是非常重要的。但由于缺乏精确和费用低廉的检测方法, 预防和控制水域传染病暴发仍有阻碍。

对于水体中病原菌的检测主要基于选择性培养法和标准的生物化学方法, 但这些方法存在一系列的缺陷 (Kong et al, 2002)。越来越多的人开始研究分子生物学方法的可行性, 以求缩短检测和报告时间 (Guy et al, 2003; Maria et al, 2004)。其中之一就是定量聚合酶链式反应 (QPCR) 方法研究 (Lu et al, 2007; Olga et al, 2007)。这一技术连同引物和探针技术, 已被广泛应用在不同粪便指示生物和水域传染病原生物检测上 (Abu-Halaweh et al, 2005; Megan et al, 2007), 这一方法可使测样到出结果的时间缩短到几个小时。

本研究运用实时荧光定量 PCR 技术对不同环境水体中大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhmurium*)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的出现和流行情况进行系统定量分析, 为进一步对水体进行较为全面的病原性污染风险评估奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 取样点及取样方法

选取西安市区洁净水体 (水源水)、轻度污染水体 (景观水) 和严重污染水体 (纳污水体和污水处理厂出水) 作为研究对象, 表 1 所示为取样水体水质情况。采样断面分别设置在出水区 (兴庆湖和唐芙蓉园北湖)、出水口 (黑河进入曲江水厂处)、排污区下游 (浐河) 以及污水处理厂二级出水口 (西安市北石桥污水处理厂)。除非特殊的天气原因, 从 2006 年 3 月—2006 年 6 月, 每个月的 5、15、25 日分别从黑河、北湖、兴庆湖、浐河和北石桥污水处理厂收集水样。取样时间是早上 8:00—12:00, 采样位点为水深 1/2 处。同时记录每个被调查水样的其它辅助资料, 包括 pH、温度、浊度、游人密度以及船只等。

### 1.2 引物合成

志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*), 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*), 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhmurium*) 和埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*) 4 种病原细菌的特异性引物序列见表 2, 引物由上海申能博彩公司合成。

表 1 取样水体水质  
Table 1 Water quality of the different water bodies

地表水体	污水处理厂 二级出水 (A)	浐河 (B)	芙蓉园北湖 (C)	兴庆湖 (D)	黑河 (E)
浊度 (NTU)	2.4~13.1	11.1~747.0	6.1~67.0	8.1~75.0	1.7~16.3
pH 值	7.1~8.4	7.4~8.3	7.3~8.8	6.7~9.8	8.1~8.7
DO (mg·L <sup>-1</sup> )	2.2~7.6	0.6~4.3	7.8~13.5	3.8~11.2	8.1~12.4
氯化物 (mg·L <sup>-1</sup> )	62.7~85.8	9.6~43.6	2.5~5	8.5~21.4	0.2~0.7
总磷 (mg·L <sup>-1</sup> )	0.4~2.9	0.07~1.4	0.04~0.5	0.1~2.5	0.02~0.3
总氮 (mg·L <sup>-1</sup> )	1.3~19.4	2.0~13.4	0.4~1.0	0.1~2.2	0.2~0.7
COD (mg·L <sup>-1</sup> )	30.4~65.7	13.3~65.7	7.3~22.9	27.1~68.9	2.3~8.7
水体用途	二级出水	纳污水体	新建景观用水	景观用水	供水水源
备注	污水厂出水 (未消毒)	严重污染 水体	轻度污染水体	轻度污染水体	清洁水体

表 2 所用引物的碱基序列  
Table 2 Sequences of primers used in this study

引物编号	目标细菌	引物序列	参考文献
1	<i>Shigella flexneri</i>	ipaH1 5'-GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATAC-3'	Theron et al, 2001;
2		ipaH3 5'-CATTTCCTTCACGGCAGTGGA-3'	Hartman et al, 1990
3		ST3 5'-AGATGGTACTGGCGTTGCTC-3'	Song et al, 1993;
4	<i>Salmonella typhi</i>	ST4 5'-TGGAGACTTCGGTCGCGTAG-3'	Wei and Joys, 1985
5		Es1 5'-TGTTTCAGTGGCAAGAGTT-3'	Venkatesan et al, 1988;
6	<i>Escherichia coli</i>	Es2 5'-TAATCGATATACCCGCTC-3'	Sethabutr et al, 1993
7		ctxA1 5'-CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG-3'	Nandi et al, 2000;
8	<i>Vibrio cholerae</i>	ctxA2 5'-TCTATCTCTGTAGCCCTATTACG-3'	Keasler and Hall, 1993

### 1.3 QPCR 样品处理

标准菌株：本研究所用的伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 标准菌株购自美国菌种保藏中心(ATCC)，志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*) 和埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*) 购自陕西省微生物研究所，细菌培养用 LB 肉汤培养基 (1 L 水中：10 g 蛋白胨，5 g NaCl, 5 g 酵母浸膏) 在 37 °C 下振荡培养 24 h 后，离心 (10000 r·min<sup>-1</sup>) 收集菌体。

细菌 DNA 的提取：菌株培养液 1.5 mL 或 100 mL 地表水水样用灭菌离心管离心 (10000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min) 后，弃去上清液；沉淀物加入 567 μL 的裂解缓冲液 (40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1% SDS)，反复吹打使之重新悬浮，接着加入 66 μL 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl，充分混匀后，10000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后将上清转入一只新管中，加入等体积的酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25:24:1 体积比)，振荡混匀，离心 (10000 r·min<sup>-1</sup>, 4~5 min)；取上清后，加入 0.6 倍体积的异丙醇，轻轻混合直到 DNA 沉淀下来，沉淀可稍加离心；沉淀用 1 mL 的 70% 乙醇洗涤后，离心弃乙醇 (刘永军等, 2008)。

QPCR 标准曲线：用 LB 固体培养基 (1 L 水中：10 g 蛋白胨，5 g NaCl, 5 g 酵母浸膏，1.5 g 琼脂粉) 经平板计数，测得细菌培养液中细菌的浓度。用上述苯酚-氯仿法提取细菌总 DNA，然后将总 DNA 10 倍梯度稀释，以此作为 QPCR 标准曲线制作的 DNA 模板，每个稀释梯度平行操作 3 组，利用梯度稀释的细菌 DNA 提取物 QPCR 检测的 C<sub>T</sub> 值与相应的细菌菌株细胞密度对数值的离散与回归分析绘制标准曲线 (刘永军等, 2008)。

### 1.4 QPCR 分析

在 QPCR 反应体系中加入荧光试剂 Syber Green I，利用荧光信号实时检测 PCR 进程。Syber Green I 试剂盒购于天根生化科技有限公司 (北京)。QPCR 反应体系总体积 25 μL，内含 1× realMastrMix/1× SYBR solution，上下游引物分别为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>，DNA 模板 2 μL。将 QPCR 混合反应液放入八连管 (MJ Research TLS-0251)，用超净管盖封闭 (MJ Research TCS-0803) 将反应管放入定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD MJ) 进行扩增反应。QPCR 扩增条件如下：94 °C 预变性 5 min，94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，85 °C 2 s，共 35 个循环。每隔 0.2 s 自动读数一次，阈值设定为最初的 3~7 个循环荧光值标准偏差的 10 倍 (Haugland

et al, 1999)。

用于水体病原细菌检测的 DNA 样品至少平行 3 组，稀释样品内的细菌细胞数量是通过把原始细菌细胞提取物的细菌数量除以提取物稀释系数得到的，范围大约是 10<sup>7</sup>~10<sup>1</sup>。环境水样中目标细菌细胞数量的确定是通过已知细菌数量的病原细菌 QPCR 标准曲线推断出的相对数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种病原细菌 PCR 检测结果

以 4 种目标菌株的总 DNA 为模板，分别利用志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)，霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)，沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 和埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*) 的特异性引物进行 PCR 扩增，结果如图 1 所示。相应的目标菌株有特异性的扩增产物，扩增产物的核苷酸序列测定结果 (未显示) 也表明本研究所采用的 4 对特异性引物对目标菌株有极高的特异性。

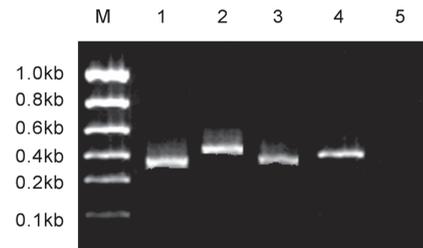


图 1 4 种病原细菌的特异性引物 PCR 检测结果

Fig.1 PCR amplification results of the four target strains with specific primers

M: DNA Marker; 1: *Shigella dysenteriae*; 2: *Vibrio cholerae*;  
3: *Salmonella typhmuri*; 4: *E. coli*; 5: 阴性对照

1: *Shigella dysenteriae*; 2: *Vibrio cholerae*; 3: *Salmonella typhmuri*;  
4: *E. coli*; 5: Negative control

### 2.2 不同地表水体 4 种病原细菌 QPCR 检测结果

对西安市洁净水体、轻度污染水体和严重污染水体共 5 个地表水体水样中志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)，霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)，沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*)，埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*) 的 QPCR 检测值如表 3 所示，每个水体的检测样本数分别为 55 (n=55)。

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 在所有水体中都没有检出，说明该病原菌通常情况下在西安市区水体中存在的可能性很小。在洁净水体中 (E)，埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*)，志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*) 和沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 的平均检测值分别为 2.7 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>、4.0 copies·(100 mL)<sup>-1</sup> 和 0.7 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>。由于

表3 地表水体中几种病原细菌的细胞密度 (copies·(100 mL)<sup>-1</sup>)  
Table 3 Cell densities of different pathogenic bacteria in surface water samples (copies·(100 mL)<sup>-1</sup>)

地表水体 样本数 (n=275)		A (n=55)	B (n=55)	C (n=55)	D (n=55)	E (n=55)
大肠埃希氏菌	最大值	1.6×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	2.2×10 <sup>1</sup>	2.6×10 <sup>2</sup>	1.6×10 <sup>1</sup>
	最小值	1.8×10 <sup>4</sup>	2.0×10 <sup>3</sup>	0	1.0×10 <sup>1</sup>	0
	平均值	5.0×10 <sup>4</sup>	9.1×10 <sup>4</sup>	7.2	6.7×10 <sup>1</sup>	2.7
伤寒沙门氏菌	最大值	1.3×10 <sup>2</sup>	3.0×10 <sup>2</sup>	2.1×10 <sup>1</sup>	3.0×10 <sup>1</sup>	1
	最小值	2.1×10 <sup>1</sup>	2.5×10 <sup>1</sup>	1	1.0	0
	平均值	6.3×10 <sup>1</sup>	9.2×10 <sup>1</sup>	5.2	6.0	0.7
痢疾志贺氏菌	最大值	2.5×10 <sup>2</sup>	3.3×10 <sup>2</sup>	2.1×10 <sup>1</sup>	8.9×10 <sup>1</sup>	2.7×10 <sup>1</sup>
	最小值	3.0	2.0	0	0	0
	平均值	3.3×10 <sup>1</sup>	4.6×10 <sup>1</sup>	2.5	1.5×10 <sup>1</sup>	4.0
霍乱弧菌	最大值	1.6	0	0	0	0
	最小值	0	0	0	0	0
	平均值	0.1	0	0	0	0

该水体为西安市饮用水源水, 受到良好的保护, 水体没有受到病原体污染。

在轻度污染水体中(C, D), 埃希氏大肠杆菌(*E. coli*), 志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)和沙门氏菌(*Salmonella typhmurium*)的检测值分别为7.2~67 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>、2.5~15 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>和5~6 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>。在严重污染水体中(A, B), 埃希氏大肠杆菌浓度很高, 检测值为(5~9.1)×10<sup>4</sup> copies·(100 mL)<sup>-1</sup>; 志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)和沙门氏菌(*Salmonella typhmurium*)的检测值分别为33~46 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>和63~92 copies·(100 mL)<sup>-1</sup>。

### 2.3 地表水体中4种病原细菌的检出频率

如表4所示, 在5种地表水体共55份样本中, 霍乱弧菌的检出频率为“0”。在不同的取样地点中, 发现埃希氏大肠杆菌(*E. coli*), 志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)和沙门氏菌(*Salmonella typhmurium*)的检测频率有所差异。其中大肠埃希氏菌和沙门氏菌在污染严重的水体(A, B)和轻度污染水体中(C, D)的检出频率都是100%。但

是在洁净水体中(E), 大肠埃希氏菌的检出频率较高为72.7%, 而沙门氏菌的检出频率相对较低, 仅为27.3%。志贺氏痢疾杆菌在污染严重的水体中(A, B)的检出频率在90%以上, 但是在轻度污染的水体(C, D)和洁净水体中(E), 志贺氏痢疾杆菌的检出频率相对较低, 为18.2%。

在总的55个样品中, 埃希氏大肠菌从各种水体检出的频度最高, 且在水体受到一定污染后即持续检出。在污染严重的水体中, 沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌也持续被检出, 同样可以认为是水污染的标志之一。

### 2.4 地表水体中不同病原微生物检出浓度分布

图2所示为不同地表水体中4种病原微生物检出频率的分布情况。在污染严重的水体中(图2A, 2B)中, 几种主要致病菌中, 埃希氏大肠菌从各种水体检出的强度最高, 细菌细胞浓度为10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, 沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌也持续被检出, 检出强度分布在10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup> copies·(100 mL)<sup>-1</sup>, 而且能够持续检出。所以, 对于污染严重的水体, 埃希氏大肠菌是水中肠

表4 不同地表水体中病原菌的检出频率  
Table 4 Detection frequencies of bacterial pathogens in surface water samples

目标微生物	病原菌阳性检出率(%)				
	地表水样本(n=55)				
	A (n=11)	B (n=11)	C (n=11)	D (n=11)	E (n=11)
大肠埃希氏菌	100	100	100	100	72.7
伤寒沙门氏菌	100	100	100	100	27.3
痢疾志贺氏菌	91.9	100	18.2	72.7	18.2
霍乱弧菌	0	0	0	0	0

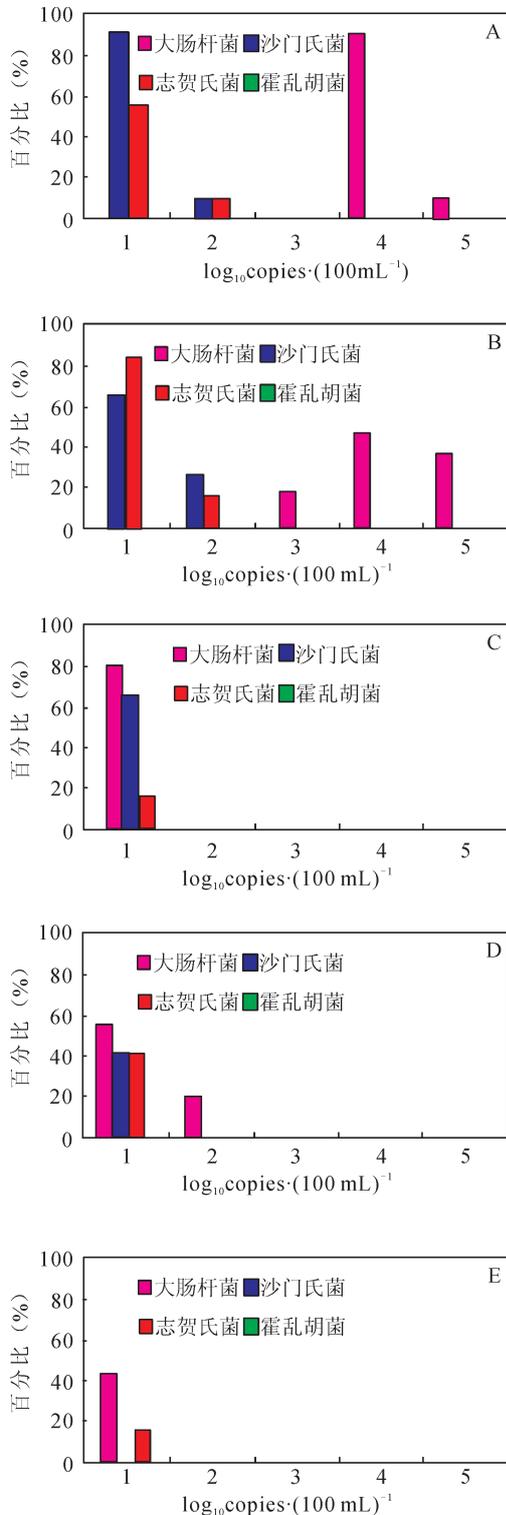


图2 不同地表水体中病原微生物检出浓度分布  
Fig.2 Distribution of positive frequencies of bacterial pathogens in surface water samples

道感染细菌群的主体,沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌强度尽管远低于埃希氏大肠菌,但同样可以认为是水污染的标志。在轻度污染水体(图2C,2D)和清洁水体中(图2E),埃希氏大肠菌、沙门氏菌、

痢疾志贺氏菌的强度都在  $10$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$  左右,并且不能够连续检出。

以上实验结果显示,A号水样病原菌污染严重,该水样采自一座生活污水处理厂未经消毒的二级出水。B号水样采自浐河,该河有城市污水和工业废水排入,病原菌检出频率较高。D号水样取自兴庆湖,该湖曾受到生活污水的严重污染,不久前进行过清污,加强了污染源控制,但实验结果表明该湖病原微生物的检出频率依然较高。C号水样取自风景区的一座人工湖,与D号水样相比,病原微生物浓度较低,但仍不能满足细菌学水质要求,这可能与大量的游人活动有关。E号水样只有大肠杆菌和志贺菌偶尔被检测出,细菌学水质指标较好,该水样取自西安市水源地黑河,说明该供水水源受到良好的保护。

### 3 结论

(1) 霍乱弧菌在各种地表水体,甚至城市污水中均未检出,说明该病原菌通常情况下在西安市区水体中存在的可能性很小;埃希氏大肠菌从各种水体检出的频度最高,且在水体受到一定污染后即持续检出,是水体病原菌污染的标志。

(2) 在轻度污染和清洁水体中,埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*),志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*) 和沙门氏菌 (*Salmonella typhmuri*) 的检测值分别为  $7.2 \sim 67$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$ 、 $2.5 \sim 15$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$  和  $5 \sim 6$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$ ,并且不能够连续检出。说明西安市水源水受到很好的保护,城市景观水由于受游人活动的影响而受到不定期的污染。

(3) 在污染严重的水体中,埃希氏大肠菌检出的强度在  $10^4 \sim 10^5$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$ ,沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌检出强度分布在  $10^1 \sim 10^2$  copies  $\cdot$  (100 mL) $^{-1}$ ,且能够持续检出。虽然沙门氏菌和志贺氏痢疾杆菌检出强度远低于埃希氏大肠菌,但这些病原菌存在的可能性变得非常高,可以认为是水污染的标志之一。

### 参考文献

- 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 2008. 环境水体中肠道病原菌的定量 PCR 检测 [J]. 环境科学, 29(5): 1175-1180.
- 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 2008. 环境水体中肠道病原菌的定量 PCR 检测与膜过滤分析方法的比较 [J]. 环境科学学报, 28(7): 1482-1488.
- Abu-Halaweh M, Bates J, Patel B K. 2005. Rapid detection

- and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR[J]. *Res Microbiol*, 156(1-2): 107-114.
- Guy R A, Payment P, Krull U J, et al. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage[J]. *Appl Environ Microbiol*, 69: 5178-5185.
- Hartman A B, Venkatesan M M, Oaks E V, et al. 1990. Sequence and molecular characterization of multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*[J]. *J Bacteriol*, 172(4): 1905-1915.
- Haugland R A, Vesper S J, Wymer L J. 1999. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan<sup>TM</sup> fluorogenic probe system[J]. *Mol Cell Probes*, 13: 329-340.
- Hunter P R. 1997. Drinking water and waterborne diseases. In: Hunter PR, editor. *Waterborne disease: epidemiology and ecology*[M]. New York: Wiley, 27-41.
- Keasler S P, Hall R H. 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae*O1 with multiplex polymerase chain reaction[J]. *Lancet*, 341: 1661.
- Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR[J]. *Water Research*, 36: 2802-2812.
- Lu J R, Jorge S D, Shanks O C. 2007. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach[J]. *Water Research*, 41: 3561-3574.
- Maria Alexandrino, Elisabeth Grohmann, Ulrich Szewzyk. 2004. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples[J]. *Water Research*, 38: 1340-1346.
- Megan L D, Beth R, Fariba N, et al. 2007. A PCR marker for detection in surface waters of faecal pollution derived from ducks[J]. *Water Research*, 41: 3553-3560.
- Nandi B, Nandy R, Mukhopadhyay S, et al. 2000. Rapid Method for Species-Specific Identification of *Vibrio cholerae* Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein *OmpW*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11): 4145-4151.
- Olga Savichtcheva, Noriko Okayama, Satoshi Okabe. 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators[J]. *Water Research*, 41: 3615-3628.
- Sethabutr O, Venkatesan M M, Murphy G S, et al. 1993. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen DNA sequence in patients with dysentery[J]. *J Infect Dis*, 167(2): 458-461.
- Song J H, Helen C, Park M Y, et al. 1993. Detection of *Salmonella typhi* in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6): 1439-1443.
- Theron J, Morar D, Du Preez M, et al. 2001. A sensitive seminested PCR method for the detection of *shigella* in spiked environmental water samples[J]. *Wat Res*, 35(4): 869-874.
- Venkatesan M M, Buysse J M, Vandendries E, et al. 1988. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*[J]. *J Clin Microbiol*, 26(2): 261-266.
- Wei L, Joys TM. 1985. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*[J]. *J Mol Biol*, 186: 791-803.