

环境水体中肠道病原细菌的定量 PCR 检测

刘永军, 张崇淼, 王晓昌, 吕英俊, 左丽丽

(西安建筑科技大学西北水资源生态与环境教育部重点实验室, 西安 710055)

摘要:采用通用引物,通过实时荧光定量 PCR 方法(QPCR),对西安市 5 处地表水体中肠道病原细菌的细胞密度进行 4 个月的连续检测,并将 QPCR 检测结果与滤膜法测得的大肠菌群 CFU 值进行比较分析.结果显示, QPCR 法可信度为 94%,最小检测值为每管未稀释 DNA 提取物含 2.7 个大肠杆菌细胞.5 个水体($N = 60$)检测结果表明, QPCR 检测结果是 大肠菌群 CFU 的 2.2 ~ 5 倍.病原细菌的几何平均值范围, QPCR 法在 25 ~ 67 000 CCE/100 mL 之间, MF 法大肠菌群为 3 ~ 45 000 CFU/100 mL 之间.2 种方法的离散和回归分析表明, QPCR 检测结果与大肠菌群 CFU 显著正相关,秩相关系数为 $r = 0.983$.

关键词:地表水;通用引物;病原细菌;定量 PCR;膜过滤

中图分类号:X832; R123 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2008)05-1175-06

Detection of Enteric Pathogenic Bacteria from Surface Waters by Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR)

LIU Yong-jun, ZHANG Chong-miao, WANG Xiao-chang, LÜ Ying-jun, ZUO Li-li

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

Abstract: A rapid quantitative polymerase chain reaction (QPCR) analysis method with universal primers was developed to detect cell densities of the enteric pathogenic bacteria from 5 surface water of Xi'an City for 4 months continuously. And the detection results by QPCR method were compared with counts of coliforms colony-forming units (CFU) determined by membrane filter (MF) analysis. The results showed that QPCR method had an estimated 94% confidence, and detection limit was 2.7 *Escherichia coli* cells per sample in undiluted DNA extracts. For five surface waters ($N = 60$), the geometric mean of pathogenic bacteria concentration determined by QPCR was 2.2-5 times of corresponding coliform CFU determined by MF analysis. Using QPCR analysis, these geometric means of pathogenic bacteria concentration ranged from 25 CCE/100 mL to 67 000 CCE/100 mL. Using MF culture analysis, coliforms ranged from 3 CFU/100 mL to 45 000 CFU/100 mL. Regression analysis showed that there was a significant positive correlation between pathogenic bacteria determined by QPCR method and coliforms determined by MF method, the correlation coefficient (r) was 0.983.

Key words: surface water; universal primer; enteric pathogenic bacteria; quantitative polymerase chain reaction (QPCR); membrane filtration (MF)

城市污染的加重使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.尤其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^[1],都是由致病细菌引起的.因此,水域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,使得预防和控制水域传染病暴发受到阻碍.

对于水体中病原菌的检测主要基于选择性培养和标准的生物化学方法,但这些方法存在一系列的缺陷^[2~5].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.其中之一就是定量聚合酶链式反应(QPCR)方法研究.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病原生物检测上^[6~11],用这一方法可使从测样到出结果的时间缩短到几个小时.

本研究设计了包括志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和埃希氏大肠杆菌(*E. coli*) 4 类肠道病原细菌在内的病原细菌通用引物^[12],通过定量 PCR 方法快速检测西安市地表水体中的多种病原菌,探索该法的灵敏度、精确度以及在整个环境浓度变化范围内此法的可用性.除此之外,将 QPCR 方法的结果与传统指示微生物 CFU 计数结果进行比较分析,根据 2 种方法结果的相关性,初步评价用快速 QPCR 法检测地表水体水质的潜在可行性,以期为进一步对水体进行病原性污染风险评价奠定基础.

收稿日期:2007-05-21;修订日期:2007-10-15

基金项目:国家自然科学基金项目(50478048);国家自然科学基金重大国际合作项目(50621140001);西安市科技计划项目(YF07196)

作者简介:刘永军(1969~),男,博士,副教授,主要研究方向为污水再生回用及健康风险评价, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

1 材料与方法

1.1 取样地点

选取西安市区两河两湖地表水进行采样,同时以未消毒的污水处理厂二级出水作为对照.表 1 列出了水体所在的位置及水体的性质.采样断面分别设在出水区(兴庆湖和大唐芙蓉园北湖)、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(北石桥污水处理厂).

表 1 地表水样的水体性质

Table 1 Character of surface water samples

序号	水体名称	水体用途	备注
1	浐河	纳污水体	不定期受严重污染
2	兴庆湖	景观用水	曾受严重污染,正在治理
3	北湖(大唐芙蓉园)	景观用水	新建景观用水
4	黑河	供水水源	受到良好保护
5	北石桥污水处理厂	二级出水	未消毒

1.2 取样方法

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 08:00~12:00,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.

1.3 总大肠菌群分析

选取适量的水样(理想的水样体积是一片滤膜上生长约 50 个大肠菌群菌落,细菌总数不超过 200 个),将水样注入已灭菌的放有滤膜(孔径 0.45 μm)的滤器中,经过抽滤,细菌被截留在膜上,将该滤膜贴于品红亚硫酸钠培养基上(1 L 水中:蛋白胨 10 g,酵母浸膏 5 g,牛肉浸膏 5 g,乳糖 10 g,磷酸氢二钾 3.5 g,5% 碱性品红乙醇溶液 20 mL,无水亚硫酸钠 5 g),37℃ 恒温培养 24 h,在滤膜上出现紫红色具有金属光泽的菌落,记数此特性的菌落数,计算出每 100 mL 水样中的总大肠菌群数^[13].

1.4 引物设计与合成

以细菌 16S rRNA 基因为靶序列,根据细菌 16S rRNA 基因的高度保守性,设计志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、沙门氏菌(*Salmonella typhmuri*)和埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)的通用引物,设计的通用引物序列如下:5'-aaggcgacgatccctagct ggtctgagaggatgac-3' (246~280 bp, *E. coli*, 16S rRNA); 5'-gcttgccagta tcagatgcagttcccag-gttgagc-3' (521~556 bp, *E. coli*, 16S rRNA)^[12].引物

由上海申能博彩公司合成.

1.5 QPCR 样品处理

参考菌株的培养:本研究所用的参考菌株由陕西省微生物研究所提供(表 2),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℃ 下振荡培养 24 h 后,离心(7 000 r/min)收集菌体.

表 2 所用参考菌株及编号

Table 2 Reference bacteria strains

编号	菌株	编号	菌株
EF424586	<i>Staphylococcus aureus</i>	NC_009089	<i>Clostridium difficile</i>
EF420247	<i>Bacillus subtilis</i>	EF421208	<i>Bifidobacterium longum</i>
EF378646	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DQ171719	<i>Lactococcus lactis</i>
EF422070	<i>Bacillus cereus</i>	DQ362495	<i>Shigella dysenteriae</i>
EF413067	<i>Bacillus thuringiensis</i>	DS179652	<i>Vibrio cholerae</i>
EF394153	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	D12814	<i>Salmonella typhmuri</i>
BD267944	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	EF418614	<i>Escherichia coli</i>

细菌 DNA 的提取:参考菌株培养液 1.5 mL 和 100 mL 地表水水样用灭菌离心管离心(7 000 r/min, 10 min)后,弃去上清液;沉淀物加入 567 μL 的裂解缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L 乙酸钠,1 mmol/L EDTA,1% SDS),反复吹打使之重新悬浮,接着加入 66 μL 5 mol/L NaCl,充分混匀后,7 000 r/min 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(7 000 r/min,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^[12,14].

QPCR 标准曲线样品: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,测得埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)培养液中细菌的浓度.将培养液用灭菌蒸馏水 10 倍梯度稀释,稀释后的菌液离心后(7 000 r/min, 10 min),回收菌体,并用灭菌蒸馏水洗涤 3 次,用上述苯酚-氯仿法提取细菌总 DNA,以此为 QPCR 标准曲线制作的 DNA 模板.每个稀释浓度,平行操作 3 组,以 3 组细菌细胞数的平均来确定悬浮液中的细胞浓度^[8].

1.6 QPCR 分析

PCR 体系及产物分析:PCR 扩增反应体系总体积 25 μL ,内含 dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U,1 $\times$ Buffer,2.0 mmol/L MgCl_2 ,上下游引物分别为 0.1 mmol/L,10 倍稀释的 DNA 模板 2 μL . PCR 扩增条件如下:94℃ 变性 5 min,94℃ 30 s,55℃,30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 5 min.阴性对照

中,用灭菌双蒸水代替 DNA 模板^[12].PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳分析(含 0.5 mg/mL 溴化乙锭),用凝胶成像系统 1000(Bio-Rad)成像.PCR 产物回收纯化(PCR 回收试剂盒,华美生物工程公司产品)后,送至上海申能博彩公司测序,序列测定结果用 DNA-STAR 软件(Perkin Elmer, Norwalk, Conn, USA)进行同源性分析.

QPCR 体系及结果分析:QPCR 是在上述 PCR 基础上,在 PCR 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 μ L,内含 1 $\times$ realMastrMix/1 $\times$ SYBR solution,上下游引物分别为 0.1 mmol/L, DNA 模板 2 μ L.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 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,85 $^{\circ}$ C 2 s,共 35 个循环,每隔 0.2 s 自动读数 1 次,阈值设定为最初的 3~7 个循环荧光值标准偏差的 10 倍^[15].

用于水体病原细菌检测的 DNA 样品至少平行 3 组,稀释样品内的细胞数量是通过把原始细胞提取物的细胞数量除以提取物稀释系数得到的,范围大约是 10¹ ~ 10⁷.利用埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)梯度稀释 DNA 提取物 QPCR 检测的 C_T 值与相应的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)细胞密度对数值的离散与回归

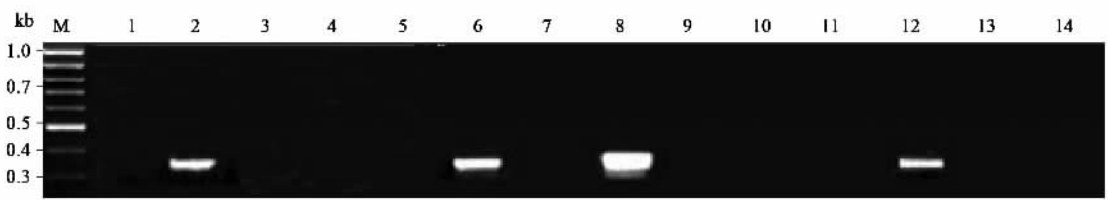
分析,推断 QPCR 检测的灵敏度及准确度^[8].环境水样中目标细胞数量的确定是通过已知细胞数量的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)QPCR 标准曲线推断出的相对数量.

2 结果与讨论

2.1 通用引物设计及检测结果

根据细菌 16S rRNA 基因的高度保守性,设计包括志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、沙门氏菌(*Salmonella typhmurium*)和埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)的病原细菌通用引物.将所设计的通用引物序列提交 GenBank 进行同源性比对,BLAST 结果显示(未列出),与通用引物互补的序列绝大多数是 4 种目标菌株不同株系的 16S rRNA 基因片段,也有极少量未知菌株的核酸序列.这表明,所设计的通用引物对这 4 种参考菌株表现出极高的特异性.

以 4 种目标菌株及 10 株对照菌株的总 DNA 为模板,利用通用引物进行 PCR 扩增,产物经凝胶电泳分析,4 目标菌株在 320 bp 处均都得到了清晰的电泳条带,而对照菌株无扩增产物,如图 1 所示.扩增产物经纯化后进行核酸序列测定,测序结果与 GenBank 中 4 种病原菌的 16S rRNA 的基因序列比较,其相似度在 99% 以上.分析结果证明,该通用引物对目标基因片段有很好的特异性,能够用于 4 种目标菌株的特异性检测.



M: DNA Marker; 2: *Shigella dysenteriae*; 6: *Vibrio cholerae*; 8: *Salmonella typhmurium*; 12: *E. coli*, 1, 3~5, 7, 8~11, 13~14: 对照菌株

图 1 4 株参考菌株及 10 株对照菌株的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of the four target strains and ten control strains

2.2 定量 PCR 分析及检测效果

本实验利用已知起始拷贝数的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)DNA 绘制标准曲线.图 2 所示为扩增产物起始模板细菌细胞密度的对数与对应的 QPCR 检测 C_T 值的关系,通过获得未知样品的 C_T 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数.方程式的斜度可以用来检测 PCR 的效率,对于 100% PCR 效率来说,一个理想的斜率是 -3.32.最佳的标准曲线是建立在 PCR 的扩增效率为 90% ~ 100%(100%意

味着在每个循环之后,模板的总数将增加为前一次的 2 倍)的基础上.标准曲线的线性回归分析需要存在一个高相关系数($R^2 \geq 0.99$),这样才能认为实验的过程和数据是可信的^[8,15,16].

实验所检测的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)DNA 初始模板拷贝数的线性范围从 $6.8 \times 10^1 \sim 6.8 \times 10^5$ CFU/mL,起始模板浓度的对数与对应的 C_T 值成正比.回归系数为 0.994,表明了极强的线性关系.这些数据二次回归后所得直线斜率为 -3.203,其扩增

效率可达 99%。对每一个浓度梯度,重复 3 个样品,重复样品间 C_T 的标准偏差 <0.3 。

用定量 PCR 方法检测已知细菌细胞浓度的志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和沙门氏菌(*Salmonella typhmuri*um),3 种细菌的检测结果代入回归直线中验证,发现直线的斜率并没有发生明显的变化或者有中断现象,QPCR 法检测结果的可信度为 94%。

当以埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)为代表菌,用定量 PCR 方法检测梯度稀释后的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*),PCR 反应扩增 35 个循环,且扩增率为 99%时,得到包括所用埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)的回收、DNA 提取以及 QPCR 检测等过程在内的最低检测限为 2.7 个细菌细胞 DNA 提取物。

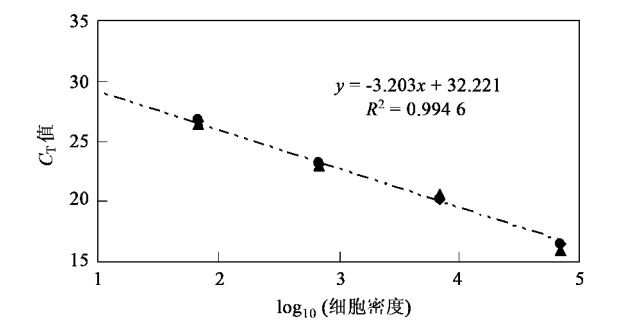


图 2 埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)梯度稀释 DNA 提取物 QPCR 检测的 C_T 值与相应的埃希氏大肠杆菌(*E. coli*)细胞密度对数值的离散与回归分析

Fig.2 Scatter plot and regression analysis results of $\log_{10}$ calibrator cell equivalents (CCE) of *E. coli* on QPCR-measured cycle threshold (C_T) values for serially diluted DNA extracts of *E. coli*

2.3 地表水样分析结果

对 5 个地表水体水样分别用 QPCR 法与 MF 法连续 4 个月的检测(3~6 月,共 12 次),对 MF 法大肠菌群 CFU 与 QPCR 法 CCE 结果进行比较分析,结果如图 3、表 3 所示。可以看出,5 处地表水中,QPCR 法测得的细菌细胞 CCE 平均值大约是大肠菌群 CFU 的 2.2~5 倍。

其中黑河水体 QPCR 的均值为 37 CCE/100 mL,大肠菌群的均值为 15 CFU/100 mL。包含 4 类病原细菌的通用引物定量 PCR 检测的均值为大肠菌群滤膜法检测均值的 5 倍。从 QPCR 结果分析可知,尽管黑河水体中大肠菌群值较低,但是存在受到其他肠道病原细菌污染的可能性。

大唐芙蓉园北湖水体 QPCR 检测的值为 134 CCE/100 mL,大肠菌群的检测值为 181 CFU/100 mL,

QPCR 检测均值为滤膜法检测均值的 3.2 倍,水体受到一定的污染。其污染情况受人类活动影响较大,QPCR 及 MF 法检测结果在 5 月 1 日后都出现了一个峰值。

兴庆湖水体 QPCR 的检测值为 1998 CCE/100 mL,大肠菌群的检测值为 436 CFU/100 mL。QPCR 法检测均值为大肠菌群 MF 法检测均值的 4.6 倍,由于湖面设有游艇等娱乐设施,水体受到粪便污染。5 月 1 日后,水体细菌污染出现明显的峰值。进入夏季后,QPCR 与 MF 检测值都有上升趋势。

北石桥污水净化中心二级处理排水 QPCR 检测值在 102 000~12 800 CCE/100 mL 之间,大肠菌群检测值为 2 800~45 000 CFU/100 mL,QPCR 检测均值为大肠菌群检测均值的 3.2 倍。由于所取水样未经消毒处理,所以水体病原细菌污染严重。

浐河水体 QPCR 检测值在 1 000~3 800 CCE/100 mL 之间,大肠菌群检测值为 1 300~4 520 CFU/100 mL 之间。QPCR 检测均值为大肠菌群检测均值的 2.2 倍。由于浐河中有工业污水和生活污水排入,水体细菌污染严重。

表 3 西安市地表水体中细菌检测结果分析
Table 3 Detection results analysis of enteric bacteria in surface water of Xi'an City

水样	方法	平均值	标准偏差	变差系数
黑河	MF/CCE·(100 mL) ⁻¹	15.25	8.87	0.58
	QPCR/CFU·(100 mL) ⁻¹	74.67	26.51	0.36
北湖	MF/CCE·(100 mL) ⁻¹	181.17	133.79	0.74
	QPCR/CFU·(100 mL) ⁻¹	591.00	302.92	0.51
兴庆湖	MF/CCE·(100 mL) ⁻¹	435.83	348.78	0.80
	QPCR/CFU·(100 mL) ⁻¹	1 998.33	853.83	0.43
浐河	MF/CCE·(100 mL) ⁻¹	2 509.17	1 031.92	0.41
	QPCR/CFU·(100 mL) ⁻¹	5 755.56	1 791.03	0.31
北石桥污水厂	MF/CCE·(100 mL) ⁻¹	13 200.00	12 173.74	0.92
	QPCR/CFU·(100 mL) ⁻¹	42 300.00	25 965.22	0.61

变差系数分析结果显示,变差系数最小的是浐河水样,在 0.33~0.44 之间。由浐河水体常年受到严重污染,病原细菌含量始终都维持在一个较高的水平;其次为黑河水样,在 0.36~0.74 之间,其上游的黑河水坝起到了一定的水质稳定作用。2 处人工景观湖用水,都表现出较大的变差系数,可以看出这 2 处水样受人类活动影响较大,在 5 月 1 日后都有明显的水质恶化迹象。而二级污水处理厂受工艺调整的影响,也表现出较大的出水水质变化差异。

将 QPCR 结果与 MF 检测结果的变差系数比较可以发现,QPCR 检测结果的变差系数值小于 MF 法

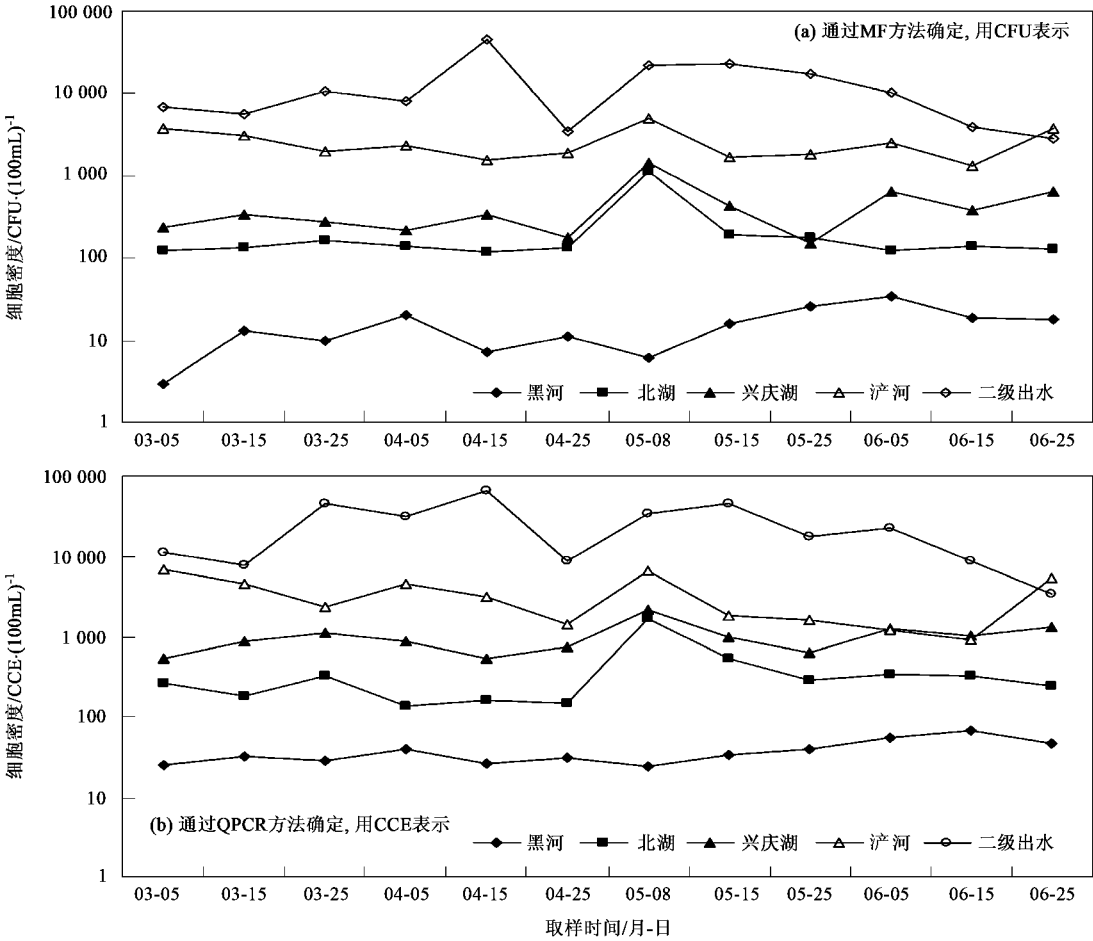


图3 西安市地表水体所有取样点每 100 mL 水样的细菌密度检测结果

Fig.3 Geometric means of enteric bacteria densities per 100 mL of water from all sampling locations of Xi'an City

检测结果的变差系数.

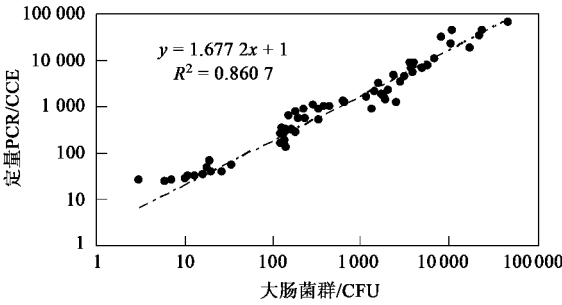
5 个地表水样中大肠菌群检测值为病原菌通用引物 QPCR 检测值的 20% ~ 45.6%. 其原因一方面是由于笔者所用的 QPCR 通用引物除了能检测到埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*) 以外, 还能够检测到志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、沙门氏菌 (*Salmonella typhmurium*) 及其与其亲缘关系较近的菌株, 还有可能包括水体中其它未知的或已知的细菌; 另一方面的因素是 QPCR 不能分辨活细胞, 只要能提取到细胞 DNA, 即检测到阳性结果. 这与 Ludwig 等^[6]、Duprey 等^[17]、Kreader 等^[18] 报道的研究结果一致. 所以, 对水体样品的 PCR 扩增产物进行相应的序列分析, 并构建其基因文库, 分析各个目标菌株在水体中所占的比例, 明确 4 种病原微生物的具体含量, 也是需要进一步研究的内容.

2.4 检测结果离散与回归分析

图 4 表示了从 5 个地表水每次取样中 QPCR 和

MF 方法所测得的细菌细胞密度离散图形及回归分析结果. 在对 5 个地表水体监测的 16 周内, QPCR 检测结果与大肠菌群 MF 法检测值的秩相关系数为 $r = 0.983$, 二者的拟合较好. 其原因主要是由于实验研究所用的 QPCR 通用引物包含大肠杆菌, 同时也说明水体中传统细菌学指标的检测 results 和 QPCR 的检测 results 有比较一致的趋势, 即水体中大肠菌群含量高时, 志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和沙门氏菌 (*Salmonella typhmurium*) 的含量也有可能高.

QPCR 法和 MF 法检测 results 显示出强相关性表明: 在地表水体病原体污染监测中, QPCR 方法很可能成为 MF 的补充. 但由于 2 种方法并不能完全一一对应^[16], 还远不能达到代替传统指标的程度, 如果要用 QPCR 方法对地表水体进行健康风险评价, 还需要进一步收集 QPCR 检测 results 以及相关的卫生学数据.



通过 MF 方法确定,用 CFU 表示;通过 QPCR 方法确定,用 CCE 表示

图 4 西安市地表水体所有被调查样品中 QPCR 检测结果与大肠菌群密度的离散和回归分析

Fig.4 Scatter plot and regression analysis results of geometric mean of coliform CFU densities determined by MF method and pathogenic bacteria CCE determined by QPCR method

3 结论

(1)建立了水体中病原细菌通用引物 QPCR 检测方法,能在不到 5 h 内完成检测.该法可信度为 94%,最小检测值为每管未稀释 DNA 提取物含 2.7 个大肠杆菌细胞.

(2)对西安市 5 个地表水样分别用 QPCR 方法和 MF 法进行连续 4 个月的病原细菌密度检测,QPCR 检测值是大肠菌群 MF 法检测值的 2.3 倍;滦河水样变差系数最小,在 0.33 ~ 0.44 之间;黑河水样受到上游水坝对水质的稳定作用,变差系数较小,在 0.36 ~ 0.74 之间;2 处人工景观湖用水受人类活动影响较大,变差系数较大,在 5 月 1 日过后都有明显的水质恶化迹象;二级污水处理厂受原水水质的影响,出水水质变化差异也比较大.

(3)QPCR 结果和 MF 法检测结果显著正相关,在地表水的病原细菌污染监测中,QPCR 方法很可能成为 MF 的补充.但是,由于 QPCR 检测结果中包含多种病原细菌,每种病原菌的浓度还是未知数.所以,如果要用 QPCR 方法预测地表水的病原污染风险,还需要分别对通用引物所包含的 4 种病原细菌进行定量研究以及相关的卫生学调查.

参考文献:

[1] Hunter P R. Drinking water and waterborne diseases [M]. New York: Wiley, 1997. 27-41.
[2] Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR [J]. Water Research, 2002, 36: 2802-2812.
[3] Fleisher J M. Conducting recreational water quality surveys: some problems and suggested remedies [J]. Mar Pollut Bull, 1990, 21: 562-567.

[4] Roszak D B, Colwell R R. Survival strategies of bacteria in the natural environment [J]. Microbiol Rev, 1987, 51: 365-379.
[5] Rahman I, Shahamat M, Chowdhury M A, et al. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type I [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 115-120.
[6] Ludwig W, Schleifer K H. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts [J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23: 556-562.
[7] Lyon W J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4685-4693.
[8] Brinkman N E, Haugland R A, Wymer L J, et al. Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for cellular enumeration of pathogenic *Candida* species in water [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 1775-1782.
[9] Frahm E, Obst U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples [J]. J Microbiol Methods, 2003, 52: 123-131.
[10] Guy R A, Payment P, Krull U J, et al. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5178-5185.
[11] Noble R T, Allen S M, Blackwood A D, et al. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study [J]. J Water Health, 2003, 1: 195-207.
[12] 刘永军,张崇森,王晓昌,等.通用引物 PCR 方法在地表水病原菌检测中的应用研究 [J]. 环境科学研究, 2007, 20: 89-93.
[13] American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [M]. (twentieth ed). Washington DC: American Public Health Association, 1998.
[14] Bej A K, Steffan R J, DiCesare J L, et al. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water using the polymerase chain reaction and gene probes foruid [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 1013-1017.
[15] Haugland R A, Vesper S J, Wymer L J. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the Taq Man™ fluorogenic probe system [J]. Mol Cell Probes, 1999, 13: 329-340.
[16] Richard A, Haugland, Shawn C, et al. Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis [J]. Water Research, 2005, 39: 559-568.
[17] Duprey E, Caprais M P, Derrien A, et al. *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis [J]. J Appl Microbiol, 1997, 82: 507-510.
[18] Kreader C A. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides diastonis* from human feces in river water [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4103-4105.