

矿泉水和山泉水中粪链球菌污染调查及主要污染菌株的 ERIC-PCR 分型研究

李飞^{1,2} 吴清平^{2*} 张菊梅² 潘力¹ 阙绍辉³ 郭伟鹏²

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

(2. 广东省微生物研究所 广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地
广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(3. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510663)

摘要: 【目的】通过调查广东省矿泉水和山泉水生产企业水源水、碳后水和成品水中的粪链球菌(*Enterococcus faecalis*)污染情况,为生产企业微生物控制提供相应的依据。【方法】粪链球菌的检测方法采用稍作修改的 GB/T8538-2008/4.53,并运用 ERIC-PCR 技术对主要污染菌株进行分型。【结果】206 份水样中有 35 份水样检出粪链球菌,其中水源水 20 份、碳后水 13 份和成品水 2 份,水源水、碳后水和成品水的污染率分别为 26.3%、20% 和 3.1%,总污染率为 17%。矿泉水和山泉水的总污染率分别为 3.8%和 25.2%,山泉水、地下水和地表水的水源污染率分别为 33.3%和 63.6%。ERIC-PCR 指纹图谱聚类分析显示 35 株菌分为 3 簇,主要污染菌基因型在 B 簇。【结论】广东省山泉水的粪链球菌污染率明显高于矿泉水的污染率,同时山泉水的水源水污染率中,地表水高于地下水。

关键词: 矿泉水, 山泉水, 粪链球菌, 污染率, ERIC-PCR

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2010B031000020, 2011B03080000)

*通讯作者: Tel: 86-20-87688132; 信箱: wuqp203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-01-21; 接受日期: 2013-02-18

Studies on the contamination investigation and ERIC-PCR typing of *Enterococcus faecalis* in mineral and spring water

LI Fei^{1,2} WU Qing-Ping^{2*} ZHANG Ju-Mei² PAN Li¹
QUE Shao-Hui³ GUO Wei-Peng²

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Company Limited, Guangzhou, Guangdong 510663, China)

Abstract: [Objective] The contamination of *Enterococcus faecalis* in source water, activated carbon filtered water and finished water from mineral and spring water plants in Guangdong province was investigated for offering important data to control the *E. faecalis* pollution. [Methods] The standard GB/T8538-2008/4.53 with little modification was used to detect the existence of *E. faecalis*, then to carry out the ERIC-PCR fingerprinting of *E. faecalis*. [Results] Thirty-five samples were detected positively for *E. faecalis* with the total contamination rate of 17%. Among the 35 positive samples, the source water, activated carbon filtered water, and finished water samples were 20 (26.3%), 13 (20%) and 2 (3.1%) respectively. According to ERIC-PCR, *E. faecalis* strains from 35 samples were divided into three groups and the type B was the main genotype in Guangdong province. [Conclusion] The results indicated that the contamination rate of *E. faecalis* in spring water in Guangdong province was much higher than that of mineral water, moreover, as far as spring water was concerned, the source water contamination rate was higher from surface water than from ground water.

Keywords: Mineral water, Spring water, *Enterococcus faecalis*, Contamination rate, ERIC-PCR

肠球菌(*Enterococcus*)由于对多种抗生素均能产生抗性,逐渐成为导致医院内感染的第二到第三大种类微生物,感染后可引起心脏内膜炎、血液感染、泌尿道感染、伤口感染以及其他疾病等^[1-4]。与大肠杆菌(*Escherichia coli*)相比,肠球菌在水中存活时间更长、数量较少,作为粪便指示

菌,肠球菌更具有代表性^[5],因此,2008年GB/T8537-2008《饮用天然矿泉水》将肠球菌属的粪链球菌(*Enterococcus faecalis*)列入其中,作为重要的污染指示菌^[6]。

当前有不少研究揭示了矿泉水中相关病原菌的污染情况。本研究团队邓梅清等^[7]于2008年对

南方地区 16 家矿泉水生产企业进行铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的检测时,发现源水污染率为 24.44%,成品水污染率为 10%。László Varga 等^[8]从 2009 年 9 月到 2010 年 3 月在匈牙利全国范围内购买矿泉水水样 492 份(包括 27 个国内品牌 452 份样品和 8 个国外品牌 40 份样品)进行微生物检测,检测结果发现,总大肠菌群、大肠埃希氏杆菌、肠球菌、铜绿假单胞菌、亚硫酸盐还原梭菌分别检出 31、7、6、7 和 1 份,污染率分别为 6.3%、1.4%、1.2%、1.4%、0.2%。当前国内外还没有研究揭示粪链球菌在矿泉水和山泉水中的污染情况。

目前对粪链球菌进行溯源分析的主要方法有脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分型(Multi locus sequence typing, MLST)^[9-13],而 PFGE 在不同实验室之间的重复性不高,且操作过程繁琐,MLST 通过对管家基因序列的测定阐述同种间的进化关系,所需实验费用较高。ERIC-PCR 分型技术是基于肠道细菌基因间高度保守的重复序列(Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)而设计进行的 PCR 分型方法, Kosek 等^[14]用 PFGE 和 ERIC-PCR 两种分型方法对志贺氏杆菌(*Shigella*)进行基因分型,发现 ERIC-PCR 分型结果与 PFGE 具有高度一致性,其分辨率高达 0.961 (95% 置信区间=0.886-1.000)。ERIC-PCR 由于其简便、快捷、经济等特征,在铜绿假单胞菌、大肠杆菌和阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)等食源性致病菌的分子分型中已经得到广泛应用^[15-17],近年来 ERIC-PCR 已成功应用于粪链球菌^[18-19]的分子分型。

本研究首次系统地调查了广东省矿泉水和山泉水企业的粪链球菌污染情况,对反映水源质量的水源水、反映企业生产规范程度的中间环节——活性碳过滤后水(简称“碳后水”)和反映

产品质量的成品水进行系统调查,旨在为矿泉水和山泉水企业在生产过程中对微生物污染的控制提供参考。同时,通过 ERIC-PCR 分型技术对菌株进行分子分型和分析污染细菌的主要基因型,为今后控制饮用水中粪链球菌污染提供基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

从 2011 年 12 月开始采样,采样地点分为四大区域,即粤中(Central Guangdong, 简写 CG, 包括广州、东莞、惠州、佛山、中山、珠海和江门)、粤北(North Guangdong, 简写 NG, 包括韶关和清远)、粤东(East Guangdong, 简写 EG, 包括河源和梅州)以及粤西(West Guangdong, 简写 WG, 包括肇庆、云浮和阳江)。

为防止二次污染,全部水样均现场采集,采样方法严格按照《饮用天然矿泉水检验方法》GB/T8538-2008/4.2^[20]进行,每个水厂采集水源水、碳后水和成品水各 1 份,但由于有些水厂具有多个水源地,因此采集水源水多份。本研究从 68 个厂家(矿泉水厂家 25 个,山泉水厂家 43 个)共采集水样 206 份(矿泉水厂家 79 份、山泉水厂家 127 份),其中水源水 76 份(矿泉水厂家 29 份、山泉水厂家 47 份),碳后水 65 份(矿泉水厂家 25 份、山泉水厂家 40 份),成品水 65 份(矿泉水厂家 24 份、山泉水厂家 41 份)。具体如表 1 所示。

在所采集的水源水样品中,29 份矿泉水企业的水源水均为地下水,47 份山泉水企业的水源水中有 11 份为水库、湖泊等地表水,其余 36 份均为地下水。具体如表 2 所示。

1.2 培养基和试剂

KF 链球菌琼脂培养基、脑-心浸萃琼脂培养基、3%过氧化氢均由广东环凯微生物科技有限公司提供,滤膜购自 Millipore 公司,API STREP 鉴定条及相应的配套试剂购自法国梅里埃公司,DNA

表1 各区域采样数量
Table 1 The sampling qualities of different districts

区域 Districts	厂家类型 Plant type	水源水 Source water		碳后水 Activated carbon filtered water		成品水 Finished water		总数 Total amount	
Central Guangdong	M	22	49	18	41	18	41	58	131
	S	27		23		23		73	
North Guangdong	M	2	9	2	7	2	7	6	23
	S	7		5		5		17	
East Guangdong	M	4	9	4	8	4	8	12	25
	S	5		4		4		13	
West Guangdong	M	1	9	1	9	1	9	3	27
	S	8		8		8		24	
Guangdong	M	29	76	25	65	25	65	79	206
	S	47		40		40		127	

Note: M: Represents the mineral water; S: Represents the spring water.

表2 各区域山泉水中不同源水的数量分布
Table 2 The numbers of different source water of spring water in different districts

区域 Districts	地表水 Surface water	地下水 Ground water
Central Guangdong	6	21
North Guangdong	4	3
East Guangdong	1	4
West Guangdong	0	8
Guangdong	11	36

提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司, *Taq* 酶及 PCR 所需试剂购自天根生化科技(北京)有限公司, DNA 引物由华大基因公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 粪链球菌的分离鉴定: 参照国标《饮用天然矿泉水检验方法》GB/T 8538-2008/4.53 粪链球菌-滤膜法^[20]。将 250 mL 水样用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤, 滤膜移至 KF 链球菌琼脂选择性培养基上, 于 36 °C±1 °C 温箱中培养 48 h, 计数红色或粉红色典型菌落。如有典型菌落, 需将菌落(大于 5 个随机挑取 5 个, 小于 5 个全选)接种于脑-心浸萃琼脂培养基进行确证性试验, 如过氧化氢酶反应为阴性, 用 API STREP 鉴定为粪链球菌

的计阳性。根据上述典型菌落的计数和确证性试验为阳性的结果, 计算每 250 mL 水样中的粪链球菌数量, 结果以 CFU/250 mL 表示。

1.3.2 粪链球菌 ERIC-PCR: 经分离鉴定后的粪链球菌, 每一个检出的样品取一株, 标准株为 CMCC32223 来自广东省微生物研究所。基因组 DNA 的提取采用生工试剂盒, 方法按照该试剂盒内的说明进行操作。同时对 ERIC-PCR 体系进行优化, 优化后的总反应体系为 25 μL, 其中包含 1 μL 模板(约 50 ng)、200 μmol/L dNTPs、2.5 μL 10×Buffer、2.5 μmol/L Mg²⁺、0.5 μmol/L 上下游引物和 1.5 U *Taq* 酶(天根生化)。ERIC-PCR 扩增参数如下: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 36 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 8 min。扩增产物用 1.2% 的 TAE 琼脂糖在 110 V 电压电泳 40 min, 再通过紫外凝胶成像系统观察照相。分型条带采用 Gel-Pro Analyzer 软件和 Ntsys 软件处理分析。

2 结果与分析

2.1 粪链球菌污染情况

2.1.1 粪链球菌的检出结果: 广东省 68 个厂家

中共有 22 个厂家检出粪链球菌, 阳性样品污染量在 100 CFU/250 mL 以内的有 31 个, 100–200 CFU/250 mL 之间的有 1 个, 200–300 CFU/250 mL 之间的有 2 个, 平均污染量为 48.3 CFU/250 mL。其中水源水、碳后水和成品水的平均污染量分别为 50.2、39.4 和 87.5 CFU/250 mL。具体的检出结果如表 3 所示(厂家按所在区域编号, 未检出的

未列出)。

在广东省所有矿泉水厂和山泉水厂的 206 份水样中, 共有 35 份水样检出粪链球菌, 总污染率为 17%, 这些检出的样品包括水源水 20 份、碳后水 13 份和成品水 2 份, 水源水、碳后水和成品水的污染率分别为 26.3%、20.0% 和 3.1%。广东省总体及各区域的污染情况如表 4 所示。

表 3 粪链球菌检出结果

Table 3 Detection results of *Enterococcus faecalis*

企业编号 Manufacture No.	水源水 Source water (CFU/250 mL)	碳后水 Carbon filtered water (CFU/250 mL)	成品水 Finished water (CFU/250 mL)
Central Guangdong			
CG2#	6	ND	ND
CG12#	1	ND	–
CG13#	1	ND	ND
CG14#	50	38	ND
CG16#	263	–	172
CG17#	4	2	ND
CG21# ^a	2	ND	ND
CG25#	63 ^b	21	ND
	47 ^b		
CG30#	24 ^b	ND	ND
CG31# ^a	nd	1	ND
CG39#	60	1	ND
CG40#	1	ND	ND
CG42#	43	38	3
CG43#	10	ND	ND
North Guangdong			
NG4#	12 ^b	24	ND
NG5#	15 ^b	30	ND
NG6#	54 ^b	28	ND
East Guangdong			
EG3#	ND	2	ND
EG7#	264 ^b	263	ND
EG9# ^a	ND	6	ND
West Guangdong			
WG1#	84	58	ND
WG2#	1	ND	ND

Note: –: None; ^a represents the mineral water, the others represent spring water; ^b represents the surface water, the others represent the ground water; ND: Not detected.

2.1.2 矿泉水中粪链球菌的污染情况分析: 广东省所有矿泉水共检出 3 份阳性样品, 总污染率为 3.8%, 水源水、碳后水和成品水分别检出 1 份、2 份和 0 份阳性, 其污染率分别是 3.4%、8.0% 和 0, 数据可以看出, 总体污染率较低, 其中碳后水的污染率相比较高。具体如表 5 所示。

2.1.3 山泉水中粪链球菌的污染情况分析: 广东省各区域山泉水中的粪链球菌污染情况如表 6 所示。广东省山泉水中共检出 32 份阳性样品, 总污染率为 25.2%, 水源水、碳后水和成品水的污染率分别检出 19、11 和 2 份阳性样品, 污染率分别为 40.4%、27.5% 和 5.0%, 大大高于矿泉水的污

染水平。

值得注意的是, 山泉水企业的水源由于其来源不同, 污染率也有较大的差异, 如表 7 所示。全省的地下水污染率为 33.3%, 地表水污染率为 63.6%, 以地下水为水源的源水其粪链球菌污染率仅为地表水为水源的一半左右。

2.2 粪链球菌 ERIC-PCR 分型结果

所分离到的 35 株粪链球菌 ERIC-PCR 分型结果如图 1 所示, 每个菌株产生 4-8 个大小在 200 bp 到 2 500 bp 之间的条带, 共有 17 种分型, 直观上可以分为 A、B、C 三簇, 其中 A 簇包含 14 株菌, 相似性为约 70%-86%, B 簇包含 19 株菌, 相

表 4 粪链球菌在不同地区的污染情况

Table 4 The contamination rates of *Enterococcus faecalis* in different districts

区域 Districts	水源水		碳后水		成品水		总数	
	Source water		Carbon filtered water		Finished water		Total amount	
	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)
Central Guangdong	14	28.6	6	14.6	2	5.0	22	16.8
North Guangdong	3	33.3	3	42.8	ND	0	6	26.1
East Guangdong	1	11.1	3	37.5	ND	0	4	16.0
West Guangdong	2	22.2	1	11.1	ND	0	3	11.1
Guangdong	20	26.3	13	20.0	2	3.1	35	17.0

Note: ND: Not detected.

表 5 矿泉水中粪链球菌污染情况

Table 5 The contamination rates of *Enterococcus faecalis* in mineral water

区域 Districts	水源水		碳后水		成品水		总数	
	Source water		Carbon filtered water		Finished water		Total amount	
	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)
Central Guangdong	1	4.5	1	5.6	ND	0	2	3.4
North Guangdong	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0
East Guangdong	ND	0	1	25.0	ND	0	1	8.3
West Guangdong	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0
Guangdong	1	3.4	2	8.0	ND	0	3	3.8

Note: ND: Not detected.

表 6 山泉水中粪链球菌污染情况
Table 6 The contamination rates of *Enterococcus faecalis* in spring water

区域 Districts	水源水		碳后水		成品水		总数	
	Source water		Carbon filtered water		Finished water		Total amount	
	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)
Central Guangdong	13	48.1	5	21.7	2	8.7	20	27.4
North Guangdong	3	42.8	3	60.0	ND	0	6	35.3
East Guangdong	1	20.0	2	50.0	ND	0	3	23.1
West Guangdong	2	25.0	1	12.5	ND	0	3	12.5
Guangdong	19	40.4	11	27.5	2	5.0	32	25.2

Note: ND: Not detected.

表 7 山泉水中不同来源水源的粪链球菌污染情况
Table 7 The contamination rates of *Enterococcus faecalis* in different source water of spring water

区域 Districts	地下水		地表水	
	Groundwater		Surface water	
	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)	阳性数 Positive amount	污染率 Contamination rate (%)
Central Guangdong	10	47.6	3	50.0
North Guangdong	0	0.0	3	75.0
East Guangdong	0	0.0	1	100.0
West Guangdong	2	25.0	—	—
Guangdong	12	33.3	7	63.6

Note: —: None.

似性在 68%–86% 之间, 其余 3 株在 C 簇中, 相似性为 80%–88%。

菌株间按照 80% 的相似性被认为是同一菌株或同一来源菌株^[21–22], B 簇中的菌株 3、4、10、19、20、21、22、23、27、28、30、32、35 共 13 株菌具有相近的亲缘关系, 从数量上看, 该基因型菌株为广东的优势菌株。同样, A 簇中的菌株 2、5、33、6、7、14、16、17 共 8 株菌也具有相近的亲缘关系。

3 讨论

目前国内关于饮用水的微生物调查研究较少, 尚没有粪链球菌的专向报道。

对于水源水, 马群飞等^[23]对福建省饮用天然

矿泉水水源进行铜绿假单胞菌的检测, 发现其污染率为 22.50%, 本研究团队于 2008 年调查得出, 广东省矿泉水水源中铜绿假单胞菌污染率为 24.44%^[7]。通过本研究的调查发现, 广东省矿泉水中粪链球菌的污染率远远低于山泉水的污染率, 山泉水的污染主要集中在水源水上, 值得注意的是, 检出的水源水中有较多的是地表水, 检出率占所有地表水的 63.6%, 远高于地下水的检出率。原因可能是地表水一般从用管道引流到露天或半露天的蓄水池, 其水源长期暴露于空气中, 没有采取有效的保护措施, 而采用地下水的厂家, 其水源水具有建筑保护, 同时严格控制人员进出, 因此污染控制水平普遍较高。

活性炭是目前水处理的重要工艺之一, 其不

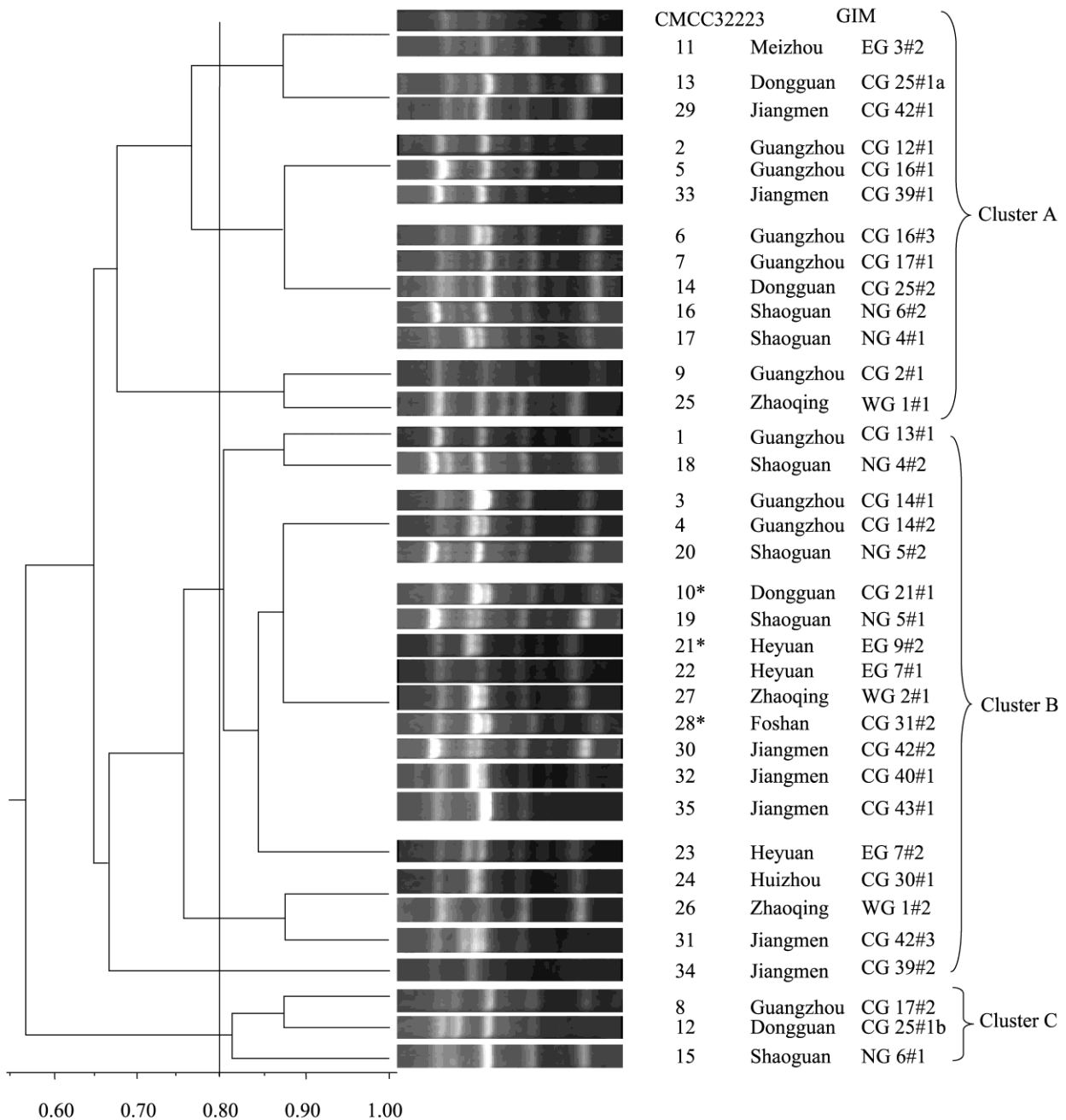


图 1 粪链球菌 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig. 1 ERIC-PCR patterns of *Enterococcus faecalis*

Note: GIM is the abbreviation of Guangdong Institute of Microbiology; #1: Represents the source water, #2: Represents the activated carbon filtered water; #3: Represents the finish water; a and b: Reflect the different samples in the same plant; *: Indicates the strain is isolated from mineral plants.

仅可以吸附异味，也可以吸附一定的微生物，达到对源水中微生物的富集与消除，净化水质，因此，碳后水中粪链球菌的检测可以用来指示一个

企业的生产规范程度。本研究首次对活性炭过滤后水进行微生物调查，粤东地区的检出结果表明，未定期清洗并消毒活性炭，即使水源质量再

好, 碳后水的污染率也会明显偏高。可见, 碳后水的质量不仅与水源有关, 同时与加工过程中对活性炭的维护存在密切关系。

成品水的污染是评价一个水厂最重要, 同时也是最直观的指标。当前国内的数据大多由第三方检测机构通过整理其检测的样本而得出, 可以一定程度的反应相关污染情况, 江苏省苏州市疾病预防控制中心潘莉珍等^[24]于 2004 年 1 月-2010 年 6 月期间共检测矿泉水 860 份, 不合格率 3.49%; 山泉水 1 612 份, 不合格率 5.02%, 均为菌落总数超标, 未检出大肠菌群、霉菌及酵母菌、粪链球菌以及铜绿假单胞菌。本研究发现广东省有 2 家山泉水企业的成品水中检出粪链球菌, 说明该企业在生产工艺方面出现了严重问题, 原因可能与消毒不够彻底、管道形成了生物膜或活性炭的处理与维护不当有关。

从污染菌株的分子分型结果可以看出, 广东省的优势菌株主要为 A、B 两簇, 从矿泉水中分离的编号为 10、21 和 28 的 3 株粪链球菌, 尽管其分离地点不同, 但其分子图谱一致, 3 株菌之间的相似率达到 100%, 是否矿泉水中污染的菌具有高度同源性, 由于分离到的菌株较少, 目前还不得而知。今后需要不断加强饮用水的微生物检测, 获取更多的菌株, 以建立粪链球菌分型数据库, 进而对饮用水安全进行风险评估。同时, 聚类结果发现, 同一厂家收集到的菌株具有较高的相似性, 如编号 13 和 14, 但有些厂家分离到的菌株分子图谱相差较远, 如编号 7 和 8, 30 和 31 等, 说明该厂的水处理过程中可能出现了交叉污染。

水源是决定水的质量的关键因素, 企业在选址的时候必须严格考察水源地的水源质量, 并做好保护水源的措施, 同时重视生产加工过程控制, 加强生产过程中的管理, 同时企业还需培养相关技术人员, 建立起基本的检测手段, 及时有效的检测每一批出厂水的质量。本研究首次系统

地对矿泉水和山泉水中的粪链球菌进行调查, 为饮用水行业提供了相关污染数据, 同时对收集到的粪链球菌进行分子分型, 找出了污染矿泉水和山泉水粪链球菌的主要基因型, 今后以这些主要基因型菌株为研究对象, 将使预防和控制饮用水中粪链球菌的污染更具针对性, 同时效果也将会更加明显。

参 考 文 献

- [1] Murray BE, Weinstock GM. Enterococci: new aspects of an old organism[J]. Proceedings of the Association of American Physicians, 1999, 111(4): 328-334.
- [2] Zou LK, Wang HN, Zeng B, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China[J]. New Microbiology, 2011, 34(1): 73-80.
- [3] Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2/3): 255-262.
- [4] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(12): 2622-2636.
- [5] Guidelines for Drinking-water Quality-Fourth Edition[S].
- [6] GB8537-2008. 饮用天然矿泉水[S].
- [7] 邓梅清, 张菊梅, 郭伟鹏, 等. 矿泉水中铜绿假单胞菌污染状况调查研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2672-2673.
- [8] László V. Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary[J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 591-595.
- [9] Chowdhury SA, Arias CA, Nallapareddy SR, et al. A tri-locus sequence typing scheme for hospital epidemiology and subspecies differentiation of an important nosocomial pathogen, *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(9): 2713-2719.
- [10] Ewa S, Aleksandra S, Waleria H. Comparison of

- multilocus variable-number tandem-repeat analysis with multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for *Enterococcus faecalis*[J]. Polish Journal of Microbiology, 2011, 60(4): 335–339.
- [11] Sreedhar R, Nallapareddy, Ruay-Wang Duh, et al. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(3): 868–876.
- [12] Jamet E, Akary E, Poisson MA, et al. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 191–198.
- [13] Burgos MJ, López RL, Abriouel H, et al. Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* from vegetable foods reveals two new sequence types[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(3): 321–327.
- [14] Kosek M, Yori PP, Gilman RH, et al. Facilitated molecular typing of shigella isolates using ERIC-PCR[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2012, 86(6): 1018–1025.
- [15] Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related?[J]. Journal of Environmental Management, 2011, 92(1): 250–255.
- [16] Yuan W, Chai TJ, Miao ZM. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses[J]. The Science of the Total Environment, 2010, 408(6): 1446–1450.
- [17] Ye YW, Wu QP, Zhou YH, et al. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *Ent. sakazakii* in dry food samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(3): 392–397.
- [18] Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, et al. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132(1): 24–32.
- [19] Sánchez Valenzuela A, Benomar N, Abriouel H, et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2012, 101(4): 701–711.
- [20] GB/T 8538-2008. 饮用天然矿泉水检验方法[S].
- [21] Wolska K, Szweida P. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for detection the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. Polish Journal of Microbiology, 2008, 57(2): 157–163.
- [22] Syrmiss MW, O'Carroll MR, Sloots TP, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53(Pt11): 1089–1096.
- [23] 马群飞, 林坚, 陈美兰, 等. 饮用天然矿泉水水源铜绿假单胞菌污染调查[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(3): 157–159.
- [24] 潘莉珍, 朱莉勤, 邹文燕. 苏州市2004年~2010年桶装饮用水卫生状况检测评价[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(6): 41–42.