

DOI:10.3880/j.issn.1004-6933.2016.01.001

地表水微生物溯源技术的开发和应用进展

魏源送¹, 郑嘉熹¹, 王光宇², 张玉秀³, 王亚炜¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 10085; 2. 美国加州环境保护署圣塔莫尼卡湾治理委员会, 洛杉矶 CA 90013;
3. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083)

摘要:论述了微生物溯源(microbial source tracking, MST)技术的发展背景与特征,从源指示物的选择、源指示物的检测和源解析总结了 MST 技术的开发与应用进展,并介绍了用于支持最大日负荷总量(total maximum daily load, TMDL)方案制定或实施的 MST 技术工作流程,对今后 MST 技术的研究与应用进行了展望,以期为我国地表水病原微生物污染控制提供参考。
关键词:水体污染;地表水病原微生物;污染控制;源指示物;微生物溯源技术;TMDL
中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-6933(2016)01-0001-11

Development and application progress of microbial source tracking in surface water

WEI Yuansong¹, ZHENG Jiayi¹, WANG Guangyu², ZHANG Yuxiu³, WANG Yawei¹

(1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;
2. Santa Monica Bay Restoration Commission, Cal/EPA LARWQCB, Los Angeles CA90013, USA;
3. School of Chemical Environmental Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: The development background and characteristics of microbial source tracking (MST) technology are discussed. Development and application progress of MST are summarized from the aspect of selection, detection and analysis of source indicators. The technical process of MST supporting total maximum daily load (TMDL) scheme was also introduced. At last, the further study and application of MST were forecasted, to provide reference for pathogenic microorganism pollution control in surface water in China.
Key words: water pollution; surface water pathogenic microorganism; pollution control; source indicator; MST; TMDL

河流等地表水的病原微生物污染对人类健康构成了巨大的潜在威胁,我国各大水系均已受到不同程度的病原微生物污染,其中畜禽粪便和生活污水是地表水病原微生物污染的最主要来源之一^[1]。病原微生物是美国地表水质不能达标的首要肇因^[2]。随着我国对“水污染防治行动计划(简称“水十条”)”的严格实施和水污染防治工作的持续推进,地表水体的黑臭、富营养化等问题将会逐步得到

有效控制,而地表水病原微生物污染及其控制将日益得到人们的重视。最近 20 多年以来,欧美发达国家开展了大量的地表水病原微生物污染防控工作,其中实施病原微生物污染源调查,开展源控制以降低病原微生物风险,已被证明是一个高效、实用的水体保护措施^[3]。因此,笔者通过文献调研,从地表水病原微生物的指示与溯源入手,通过梳理微生物溯源(microbial source tracking, MST)技术的发展背

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2015ZX07203-005,2014ZX07510-001);国家自然科学基金(51478460);中国科学院生态环境研究中心“一三五”项目(YSW2013B02)
作者简介:魏源送(1969—),男,研究员,主要从事河流生态修复、污水处理与回用、有机固体废弃物资源化处理的研究。E-mail:yswei@rcees.ac.cn
通信作者:王亚炜,助理研究员,博士。E-mail:wangyawei@rcees.ac.cn

景与技术特征,从源指示物的选择、源指示物的检测和源解析等方面论述地表水微生物溯源技术的进展,介绍用于支持流域病原微生物污染控制的工作流程和案例,以期为我国地表水病原微生物污染控制和地表水环境质量标准中有关病原微生物指标的修订提供参考。

1 地表水中病原微生物的指示与溯源

1.1 粪便污染指示微生物

地表水环境中病原微生物污染评价方法包括①直接检测地表水环境中的病原微生物;②采用病原微生物的指示微生物,间接反映水环境的病原微生物污染状况。由于病原微生物的直接检测具有较多困难,如种类繁多、部分微生物不可培养、浓度较低、检测繁琐,故通常广泛采用指示微生物方法。病原微生物的指示微生物通常应具备以下几个特征:①仅存在于受污染水体;②数量上高于待测定的病原微生物;③与病原微生物对自然条件和污染处理过程的抗性相似;④易于通过简单、经济的方法进行分离、鉴定和计数。目前常用的指示微生物包括①细菌指示物,如细菌总数(*Total bacteria*, TB)、总大肠菌群(*Total coliforms*, TC)、粪大肠菌群(*Fecal coliforms*, FC)、肠球菌(*Intestinal Enterococci*, IE)、大肠杆菌(*Escherichia Coli*, EC)、粪链球菌(*Streptococcus Faecilis*)以及沙门氏菌(*Salmonella*)和志贺氏菌(*Shigella*)等致病菌;②病毒指示物,如SC噬菌体(*Somatic Coliphages*), F-RNA噬菌体(*F-specific RNA bacteriophages*)和脆弱拟杆菌噬菌体(*Bacteroides fragillis bacteriophage*)等;③原生动物指示物,如贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*),隐孢子虫(*Cryptosporidium*)等^[1]。目前粪便污染指示菌(*fecal indicator bacteria*, FIB)被各国作为水质标准采用。我国目前实施的GB 3838—2002《地表水环境质量标准》采用FC为指示微生物,但基于大量的流行病学研究结果,已有部分发达国家摒弃了应用已久的TC和FC指标,改为采用EC和IE作为指示微生物^[1]。

1.2 病原微生物污染来源

地表水病原微生物污染的最主要来源是畜禽粪便和生活污水^[1]。来自人类的病原微生物污染源主要包括未经处理的直排污水、污水管道破损和处理设施失效(工艺失败或者缺乏消毒措施)导致的排放污水;非人类来源的病原微生物主要来自畜禽(猪、牛、鸡等)和野生动物或宠物(鸟类、猫、狗)等。当城市污水直接排放、污水处理厂违规排放或管道泄漏等主要点源逐步被有效控制后,非点源如化粪池渗漏、畜禽/宠物/野生动物等就可能成为地表水

体病原微生物指数超标的主要原因。目前已知至少有200多种动物传染病和寄生虫病可传染给人类,其中最常见的人畜共患传染病有几十种,新出现的各种感染性疾病越来越呈现出“人禽共患”或“人畜共患”的关系。大多数此类共患传染病,如布氏杆菌病病菌、结核病菌、沙门氏菌病等是通过粪便污染饮用水和食物等间接接触方式进行传播^[4]。仅仅测量FIB不能够有效提供有关病原微生物污染来源或宿主的信息,因为一方面来自人、牛、狗、鸟这些污染源的病原微生物共同存在,另一方面,多种来源(人、畜禽、野生动物)的病原微生物是否对人群有同样的致病作用尚不可知。病原微生物的污染源信息是实施决策的前提,如仅仅采用FIB指标,将会导致缺乏足够的信息,这不仅将严重影响管理部门的判断,而且会造成事倍功半的效果,因此,如何从繁多的病原微生物来源中高效、准确查明罪魁祸首,正是微生物溯源(Microbial Source Tracking, MST)技术亟须解决的问题。

1.3 结合TMDL制定流域保护方案

MST技术开发的动力主要来自美国最大日负荷(total maximum daily load, TMDL)方案制定与实施的需要^[5-6]。TMDL方案是美国联邦环保署推行的控制水污染源、保护地表水环境质量的计划和措施^[7]。自TMDL开展30多年以来,人们在流域水质模拟、安全边际估算等方面积累了大量经验,对改善水质、控制污染发挥了重要作用。目前国内已有较多的针对化学污染物控制TMDL方案的研究报道,但还没有基于病原微生物污染控制的TMDL方案报道。制定TMDL方案的主要步骤包括源识别、负荷分配以及实施效果评估。源识别是MST技术在TMDL编制过程中最重要的用途,MST技术的结果不仅可以帮助方案编制者确定首要控制的病原微生物污染源,以便有针对性地提高流域的污染负荷削减效率,而且还可为优化方案的制定提供指导。

2 微生物溯源技术的开发进展

2.1 开发历程

近几十年以来,人们利用指示微生物开展了大量的水体病原微生物污染来源诊断的研究工作,并逐步形成了MST的概念。MST就是利用宿主特异性或者与宿主相关(单个物种或者群体)的微生物指标,建立区别、鉴定粪便污染和其他污染源的流程^[3]。MST起源于20世纪80年代^[8-9],可划分为如下几个阶段:①初期阶段。主要是定义新的病原微生物污染指示物^[10-12]。②溯源方法开发阶段^[13-14]。随着聚合酶链式反应(polymerase chain

reaction, PCR)和实时定量 PCR (qPCR)等分子生物学技术的发展,MST技术得到了迅速发展^[15]。③大规模的MST比选阶段(2003年至今)^[16]。该阶段MST技术已展现出作为管理手段的潜质,主要是同一种方法在不同实验室间的可重复性,以及不同方法间的大规模对比工作^[17-19]。④应用阶段(2005年至今)。主要标志是MST技术作为病原微生物污染源诊断的管理工具得到了美国联邦环保署的认可,并出版了MST工作导则^[20],这表明MST已开始进入实地应用功效评估和实用标准程序制定的阶段^[21]。需要注意的是,新的方法至今仍在不断被开发。

MST技术应用前景广泛,如污染责任界定^[3]、水质风险评价^[22]、食品安全保障^[23-24]等。MST技术的推广应用不仅大大提高了水体病原微生物污染防治的针对性,而且提高了治理效率和整体治理成果。在水环境保护领域,应用MST技术主要有3个目的^[21]:①确定人类来源(如市政污水、小区化粪池系统或人类其他行为)的粪便污染物是否存在以及所占比例;②确定与人类活动相关的非人源污染来源(如家畜)的存在及其所占比例;③明确所有粪便污染物来源(如人、牛、马、狗、猫、鸟、水禽、啮齿动物等)中各类别的存在及其所占比例。MST技术方案包括3个环节:源指示物的选择、源指示物的检测和源解析。

2.2 源指示物的选择

MST技术所用的源指示物是能够指示水体病原微生物污染来源的代表性物质,包括大量具有种属、遗传物质特异性的微生物或者某些特殊的化学物质。选择合适的源指示物是MST技术的基础和关键。除了在传统粪便监测中使用的FIB(细菌、病毒、原生动物),许多研究表明,某些化学物质也可用作人或动物粪便污染的指示物。这是因为人类和动物的饮食组成和习惯有很大差异,经过体内代谢会产生不同的副产物,特异性副产物可用作标记物,进而推测其污染来源。现有MST源指示物采用的主要化学物质有粪甾醇、脂肪酸、胆汁酸等,以及与人生活习性有关系的化学物质,如咖啡因、荧光增白剂等^[25]。虽然化学检测法简单易行,但受环境因素的影响很大,稳定性不高,难以区分各种病原微生物的来源,目前主要用于判定人源污染物是否存在。

2.3 源指示物的检测

MST技术有多种分类方法,但基于检测和溯源的方法是主要的分类方法。按照分离培养和建立样本库,MST技术方法有4类^[25]:培养建库法(culture-dependent library-dependent);培养非建库

法(culture-independent library-independent);非培养建库法(culture-independent library-dependent)和培养非建库法(culture-dependent library-independent)。指示物的检测方法是MST方法学的关键组成部分,主要有表型法(phenotypic methods)、基因法(genotypic methods)和化学法。表1所列各项常用MST技术的原理与特征已有较多综述进行了整理^[2, 23, 25-27],本文不再赘述。

表1 常用的微生物溯源技术

	建库方法	非建库方法
培养法	表型法(phenotypic methods) • 抗生素抗性分析(ARA) • 碳源利用鉴定(carbon-source utilization profiling, CUP)	大肠杆菌噬菌体(F-specific RNA coliphages)
	基因法(genotypic methods) • 脂肪酸鉴定(FAME) • 核糖体分型(ribotyping) • 重复序列扩曾分型(REP-PCR) • 脉冲场凝胶电泳(PFGE)	SC噬菌体(somatic coliphages)
		化学法 • 粪甾醇(fecal sterols) • 咖啡因(caffine)
	群落指纹分析(community fingerprinting)	基因法 • 大肠杆菌宿主特异性毒性基因 • 双歧杆菌、拟杆菌宿主特异PCR(host-specific PCR)

表型法主要依赖培养的结果,利用微生物在不同环境因素诱发下产生的特有生化代谢产物来判断宿主来源。表型法主要包括抗生素抗性分析、碳源利用鉴定、血清型法和噬菌体法^[28]等。基于培养法的MST,通过富集步骤增加靶标微生物的数量或提供分离的菌株,其优势是相对价格便宜、技术门槛低、易于广泛使用。培养法常用FIB的存活、运输以及相关流行病学资料较为充分^[25],但其不足之处是培养法无法提供用于溯源的FIB种群多样性和宿主特定种群,这是因为:①大多数细菌难以培养,限制了培养法MST技术的应用范围;②微生物群落的组成可能在培养时发生剧烈变化^[25, 29],定量评价时必须考虑“培养偏差”;③与培养法配合的菌株分子生物学鉴别方法价格较高,如脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP),部分抵消了培养法成本低的优势。

基因法的原理是利用微生物在不同宿主内环境(如pH值、营养元素、菌群变化等)而发生的适应性改变,并产生遗传多样性,反向追踪其所在宿主。基因法主要检测方法有PFGE、核糖体分型(ribotyping)、限制性片断长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP)^[30]、qPCR以及反转录定量PCR(qRT-PCR)^[31]等。

相对于表型法,基因法具有灵敏、特异、简便、快速和可靠等优势,越来越广泛应用于源指示微生物的检测。表2是基于分子生物学的常规检测方法,在实际应用时应综合考虑各项技术特征选用。非培养MST技术的优点是可以覆盖样品中的整个种群,没有培养偏差,不仅可用于易培养指示菌,还可用于难培养或不可培养的指示菌^[20]。在美国加州,经过评估,人们认为分子生物学方法将成为MST的最有效工具,因而近年来投入大量资源支持分子生物学方法的研究,但分子生物学方法的不足之处是某些条件下特定标记物的含量很低(如病毒)或稀少(如毒力基因,宿主肠道细胞),需要大量水样(超过100 L)或富集步骤来开展检测。

表2 常用分子生物学菌种鉴定技术比较 ^[32]							
技术	培养要求	操作简易性	分析结果简易性	分辨率	时间	重复性	费用
PFGE	是	适度	适度简便	高	长	高	适中-高
TRFLP	否	适度	简便	适中	适中	高	低
Ribotyping	是	适度	适度	适中	适中	高	高
Rep-PCR	是	简便	简便	高	短	高	低
qPCR	否	适度	简便	高	短	高	低
qRT-PCR	否	复杂	简便	适中	适中	高	适中、低

2.4 源解析方法

按照是否需要建立已知单一污染源样本库,源解析方法可分为建库和非建库微生物溯源(表1)。建库MST方法是通过与基础样本库或已知粪便来源的细菌菌株的基因型或表型指纹水样进行比对,进而确定病原微生物污染的粪便来源。非建库MST方法基于所述细菌或病毒的已知宿主特定特征的来源,无需与样本库进行对比。样本库可根据源指示微生物的宿主特异性来建立,而宿主特异性好的源指示微生物及其特异基因片段可直接用于非建库微生物溯源方法^[20, 26-27]。

建库解析方法的优点是可以识别指示菌(如大肠杆菌或肠球菌)的多种来源(人、宠物、家畜和野生动物等),但比较昂贵。建库MST方法具有劳动密集型特点,样本量大,需满足代表性和地理稳定性等复杂要求,样本量少会导致评价效果不佳^[33]。对于特殊地点,需要建立专门的样本库^[25],如果是跨流域使用,还需要开展大量校正工作。一般来说,采用基因型检测方法的样本库通常包含35~500株菌,采用表型法(如应用最广泛的抗生素抗性分析)的样本库一般含有1000~6000株菌^[34]。因此,近年来基于建库的源解析方法已大量被非建库方法所替代,这是因为美国的大学或研究机构中仍保留的水体病原微生物样本库已经很少,一些使用样本库的研究组已经逐步转移了开发重点^[21]。

2.5 MST方法的比选

迄今为止,人们对最佳MST方法还没有形成广泛的共识^[21],但经过多年来人们对多种分子生物学方法的研究和筛选,非建库的聚合酶链式反应(PCR)技术由于灵敏度高、特异性强、测试简单、检测时间短等优点已显示出巨大潜力,特别是基于拟杆菌16S rRNA基因序列扩增与比较的方法。目前很多实验室已经开发并注册了针对人或某类动物特有的16S rRNA序列的基因探针(表3),这些方法检测复杂样品(如污水、废水)比菌种检测方法更为方便,但在做定量评价时需要谨慎,因为标记物可以在多菌种的菌株上存在,或者每个菌株上标记物的数量不确定^[35]。因此,新指示生物的开发和新检测或定量方法的改善仍然是当今的研究热点。MST方法之间的比较有利于方法的完善,这其中3次大规模比较研究极大地推动了MST方法的进步,克服了小规模比较研究的覆盖范围小、缺乏盲样控制等不足^[25]。

2.5.1 2003年美国实验室间比较研究

20世纪90年代,美国许多实验室已开展了基于分子生物学方法的MST溯源工作,但由于测试的样本类别与数量有限,加之人们对不同MST溯源方法的效果缺乏统一和综合的比较和鉴定,所以,为了考察MST方法的可推广性,2003年美国南加州沿海水域研究所和美国加州环保局主持了一项大型的MST方法比较研究^[36-38]。在这次研究中,参与人员得到一套含有人、牛、狗、海鸥、生活污水或它们的混合物的水样(盲样)以及组成这些盲样的粪便样品。参与溯源分析的比选方法包括基于大肠杆菌噬菌体、病毒、抗生素抗性、碳利用种类分析、Ribotyping、REP-PCR(重复序列PCR)、PFGE、微生物种群指纹、E. Coli毒力基因宿主特异性PCR、拟杆菌生物标记物PCR等12种方法,其中6种方法基于培养法^[16]。

该项研究中,评价MST技术的指标包括病原微生物来源的识别率,粪便污染的定量分析和多种应用条件(淡水、咸水和腐殖酸干扰条件下)下的适用性。在这12种方法中,基于大肠杆菌毒素基因和拟杆菌标记物的宿主特异性PCR方法可准确查明样品与人类粪便和污水的关系,没有假阳性结果。该方法使用了人源、反刍类动物和狗的拟杆菌生物标记物,以及人源和牛的大肠杆菌的毒力基因标记物,但还缺少海鸥和狗的标记物。Ribotyping和PFGE方法在部分实验室也可正确识别人源和其他4个来源。但基于样品建库的表型法和基因型法表现不

佳,只能部分识别人源污染,并出现了大量假阳性结果。基于病毒检测的方法可以非常有效地判别生活污水样品,但在检测人源粪便污染时表现欠佳。总体而言,该研究中没有一种方法能正确识别所有样品的污染来源,所有方法均在确定污染来源比例上表现不佳,并且同样的方法在不同实验室的差异也很大,这对 MST 方法的标准化提出了较高的要求。

2.5.2 2006 年欧洲实验室间比较研究

基于当时主流的 MST 方法,欧洲的研究人员于 2006 年开展了跨实验室(西班牙、法国、瑞典、英国、塞浦路斯)的 MST 方法比较研究^[17],检测对象包括大肠杆菌噬菌体、拟杆菌噬菌体、山梨糖醇发酵双歧杆菌(*sorbitol-fermenting bifidobacteria*)、FC 噬菌体、大肠杆菌和肠球菌表观分型、*B. dentium* 与 *B. adolescentis* 的 PCR 基因型检测、粪甾醇化学检测等。该研究除了对 MST 方法进行单项评估外,还基于实验结果开发出多个低参数要求的预测模型。本次比选与 2003 年美国比选的最大区别是没有采用统一的盲样进行分析,而是按照统一方法自行采集当地污水和猪场废水进行样品配制。虽然盲样检测可确保实验室间方法的可比性,但针对不同地理位置的已知源样品,该研究探明了在跨地区使用时哪些方法或哪些组合方法能有效识别人源和动物来源的病原微生物,这对完善 MST 方法具有重要意义。两个最佳方法分别是通过检测山梨糖醇发酵双歧杆菌与噬菌体感染的拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*)是否存在及其与噬菌体的比例判断人源污染物的存在。虽然没有一个方法可把人源污染 100% 地识别出来,但由微生物和化学指标定义的 38 个变量(独立和组合变量)而开发的多个模型可有效识别人源污染物^[17]。研究人员指出,下阶段的研究重点是考察 MST 方法对实际样品(如浓度较低的或者更多种来源的混合物)的检测效果以及实际样品中标记物的持久性。

2.5.3 2012 年 美国实验室间比较研究

MST 方法经过 10 年的发展,主流方法除了病毒培养法之外,均是非建库的方法。2011—2012 年,南加州沿海水域研究所牵头,联合美国和欧洲 27 个研究机构的实验室,对 41 种较为成熟的 MST 方法进行了特异性和敏感性的比较研究^[16, 19]。

这次研究与 2003 年的比较研究存在较大的差异。这 41 种方法绝大多数都采用 PCR 或 qPCR 技术,并以 16S rRNA 作为分子标记物(表 3^[39-65]),包括了专门针对人类、反刍动物类、狗、海鸥、猪、马、羊的 MST 方法。针对病毒的分析多基于 qRT-PCR 技

术,而噬菌体仍使用培养法检测。参与测试的方法也包括 3 个以微生物群落分析为基础的方法,分别是 PhyloChip、16S 末端限制性片段长度多态性法(TRFLP)和 Bacteroidales 16S TRFLP。样本分别来自生活污水和直接从各种动物体外采集的排泄物标本。用以识别人类粪便或生活污水的指示物包括病毒和噬菌体两大类,其中病毒类指示物包括腺病毒(HAdV)、肠道病毒(EV)、I 类和 II 类诺如病毒(NoV I 和 NoV II)和多瘤病毒(HPyVs);噬菌体类包括用作一般性粪便污染指标的大肠杆菌噬菌体和 F-特异性 RNA 噬菌体(F-RNAPH)。每一种方法都由 1 至 7 个实验室进行测试。

比选结果表明:①按照以标记物在粪便样品中的定性存在或不存在作为判定粪便来源的鉴定标准,针对不同宿主的敏感性和特异性最高的方法分别为 HF183 端点法和 HF183SYBR 法(人类),CF193 法和 Rum2Bac 法(反刍动物类),CowM2 和 CowM3(牛),BacCan(狗),Gull2SYBR 和 LeeSeaGull(海鸥),PF163 和 pigmtDNA(猪),HoF597(马),PhyloChip(猪,马,鸡,鹿),通用 16S TRFLP(鹿)和 Bacteroidales 16S TRFLP(猪,马,鸡,鹿)。这些方法的敏感性和特异性在所有实验室都超过了 80%。②按照定量分析的标准,表现最好的方法只有 HF183Taqman^[66]和 BacH(人),Rum2Bac 和 BacR(反刍动物类),LeeSeaGull(海鸥)和 Pig2Bac(猪),而针对牛或狗的检测方法都没达到定量分析的特异性和敏感性标准。

在这次测试中,几种用来检测人类特异病毒方法的测试结果都不太理想^[67]。这些方法一般都具备高度的特异性,但对人类粪便源的敏感性都不高。特异性和敏感性方面表现最佳的方法是腺病毒 qPCR 法(Tetra Tech 公司),虽然用该方法测试结果的准确度达到 100%,但灵敏度仅为 13.2%,也就是说,如果检测出病毒标记物,可以有把握地确认污染源包括人粪便;如果没有检测到病毒标记物,研究者还不能轻易排除人类污染源。该研究结果很有代表性,反映了目前采用 qRT-PCR 技术检测人体特异病毒的现状和面临的挑战。除非受到大量生活污水的污染,一般情况下地表水中病毒含量偏低,需要将大量采集的水样浓缩后进行病毒分析。虽然水样富集方法近年来有所改进,但找到一个既可以有效提取和分离水样中的病毒,同时又避免其副作用(富集浓缩过程同时干扰 PCR 反应)的方法还是一个难题。

表 3 参与 2011—2012 美国南加州 MST 技术比较研究的指示微生物检测方法

方法名称/代号	方法类型及针对微生物			方法开发机构
	针对宿主	源指示物	检测方法	
CowM2	牛	拟杆菌(<i>total Bacteroidales</i> and <i>B. thetaiotaomicron</i>)	qPCR	A ^[39]
CowM3	牛	拟杆菌(<i>total Bacteroidales</i> and <i>B. thetaiotaomicron</i>)	qPCR	A ^[39]
BacCow	牛	拟杆菌	qPCR	B ^[40]
BacR	反刍动物类	拟杆菌	qPCR(TaqMan [®] minor groove binder probes)	C ^[41]
Rum2Bac	反刍动物类	拟杆菌	qPCR(TaqMan [®] real time PCR)	D ^[42]
CF128	反刍动物类	拟杆菌	PCR	E ^[12]
CF193	牛	拟杆菌	PCR	E ^[12]
Gull2SYBR	海鸥	细菌(<i>Catelicoccus marimammalium</i>)	qPCR	A ^[43]
Gull2Taqman	海鸥	细菌(<i>Catelicoccus marimammalium</i>)	qPCR(TagMan)	F ^[44]
LeeSeaGullSpecific	海鸥	细菌(<i>Catelicoccus spp.</i>)	qPCR	G ^[45]
Gull2Endpt	海鸥	细菌(<i>Catelicoccus marimammalium</i>)	qPCR	A ^[43]
Pig2Bac	猪	拟杆菌	qPCR	D ^[42]
PF163	猪	拟杆菌	qPCR	E ^[46]
PigmtDNA	猪	拟杆菌	Host-specific mitochondrial DNA qPCR	H ^[47]
DogBact	犬	拟杆菌	qPCR	F ^[44]
BacCan	犬	拟杆菌	qPCR	B ^[40]
HoF597	马	拟杆菌	qPCR	E ^[46]
Omvito	羊	拟杆菌	Host-specific mitochondrial DNA PCR	H ^[47]
HF183SYBR	人	拟杆菌	qPCR	I ^[48]
HF183Taqman	人	拟杆菌	qPCR	J ^[49]
BacHum	人	拟杆菌	qPCR	B ^[40]
HumM2	人	拟杆菌	qPCR	A ^[50]
BsteriF1	人	拟杆菌	qPCR	J ^[49]
nifH	人	产甲烷古菌(<i>methanogenic archaea</i>)	qPCR	K ^[51]
BacH	人	拟杆菌	qPCR	C ^[52]
gyrB	人	拟杆菌	qPCR(gyrB gene-based)	G ^[53]
Btheta	人	拟杆菌	qPCR(gene VPI 5482-based)	L ^[54]
GB124 phage	人	噬菌体	双层琼脂培养法	M ^[55]
HB73 phage	人	噬菌体	双层琼脂培养法	N ^[56]
F-specific coliphage	人	噬菌体	双层琼脂培养法	D ^[57]
HF183Endpt	人	拟杆菌	PCR	E ^[12]
Enterovirus	人	肠病毒	qRT-PCR	O等 ^[58-59]
Adenovirus	人	腺病毒	qPCR	P ^[60-61]
Norovirus I	人	诺如病毒	qRT-PCR	P ^[60-62]
Norovirus II	人	诺如病毒	qRT-PCR	P ^[60, 62]
Polyomavirus	人	多瘤病毒	qRT-PCR	Q ^[63]
MB55 phage	人	噬菌体	双层琼脂培养法	N ^[56]
Canine scent tracking	犬	气味	qRT-PCR	R ^[64]
PhyloChip	多种	细菌群落	phylogenetic DNA microarray analysis	S ^[65]
Bacteroidales TRFLP	多种	拟杆菌群落	TRFLP	T ^[30]
General TRFLP	多种	全细菌群落	TRFLP	T ^[30]

注：A—美国环保署国家风险管理研究实验室，B—美国加州大学戴维斯分校土木环境工程系，C—奥地利维也纳技术大学，D—法国海洋开发研究所微生物实验室，E—美国俄勒冈州立大学微生物系，F—美国北伊利诺伊大学护理和健康研究学院，G—美国俄亥俄州立大学公共卫生学院，H—加拿大魁北克大学国立科学研究所，I—比利时根特大学微生物生态学技术实验室，J—美国环保署国家接触研究实验室，K—美国国家海洋大气局沿海环境健康和分子生物研究中心，L—美国密苏里大学兽医病理系，M—英国布莱顿大学，N—美国夏威夷大学水资源研究中心，O—美国斯坦福大学土木和环境工程系，P—美国疾病控制预防中心，Q—美国南佛罗里达大学生物系，R—美国加州圣塔芭芭拉市，S—美国加州洛伦斯伯克利国家实验室地球科学部，T—美国南加州沿海水域研究所。

2.6 MST 综合方法在 TMDL 中的应用

如果能提前进行 MST 诊断,TMDL 方案中有关病原微生物污染负荷削减的任务分配将更加具体、准确和切合实际情况。如,削减措施可具体到控制畜牧区的径流、某化粪池或者泄漏的污水管道。污

染排放者通过排污权交易对流域内的经营行为进行调整,如调整放牧和农业用地的面积。目前美国联邦环保署不建议将 MST 结果作为病原微生物污染源负荷估计或削减负荷分配的依据,因为现有的 MST 方法在实际操作中尚不能进行可靠的定量分

析,但 MST 结果可用于定性识别或者半定量识别污染源。在美国污染源管理体制下,MST 结果可为国家污染物排放削减 (national pollution discharge elimination System, NPDES) 许可证持有人接受污染源控制方案提供有力证据。

准确、可行的病原微生物污染控制方案的制定依赖于污染源的准确识别。在实际工作中究竟使用哪种 MST 方法和何时使用 MST 方法,主要取决于 TMDL 的要求、技术方法的效能和成本。根据 MST 方法比选的结果,单一方法不能有效解决源识别的问题^[17],宜采用 MST 综合方法。各种方法在效率、成本、检测时间、操作便捷性等方面均各具特点,在实际工作中可结合多种手段形成复合方法。研究人员建议在制定 TMDL 方案之前,可在 MST 技术的“工具箱”中遵循从一般到特殊的方式选择 MST 方法,或者使用多步检测法 (multi-tiered methods),实施从廉价到昂贵的检测措施^[16, 33]。其主要思路如下,一旦决定使用 MST 方法。开始时尽可能以较便宜的方法集中在一个或少数几个具有高度可能的微生物污染来源,首先是识别的人源,然后采用宿主特

异性 PCR 方法确定/选择特定来源。一般情况下, MST 的初步结果已能提供足够的信息进行管理决策,也可作为是否需要采用更加昂贵、全面方法 (如基于样本库的方法识别所有物种) 的依据。图 1 为 TMDL 框架下应用 MST 技术的工作流程。开始时使用化学物质溯源等低成本、低工作量的方法,后期综合使用多种方法更为有效,如拟杆菌 PCR^[68] 是一种常用的低成本方法,如果与低成本的病毒检测组合,则可提供更为准确的结果。

佛罗里达州 Lower St. Johns 河流域的 TMDL 方案^[21]制定过程中,采用了 MST 综合诊断技术,流程如下:①资料收集,采用地理信息系统对流域内的数据进行整理;②大规模的现场调查,如 20 人以上的为期 8 d 和 2 个水期的调查;③第一批 10 个支流所采用的 MST 综合方法使用 qPCR 技术识别人源、反刍动物类和马的细菌指示物。为提高检测精确度,降低工作成本,其中对人源的细菌分析选用 enterococcus faecium 特异性引物和 human polyomavirus (HPyV) 特异性标记物;④清查排污口点源,包括化粪池和连接错误的管线。

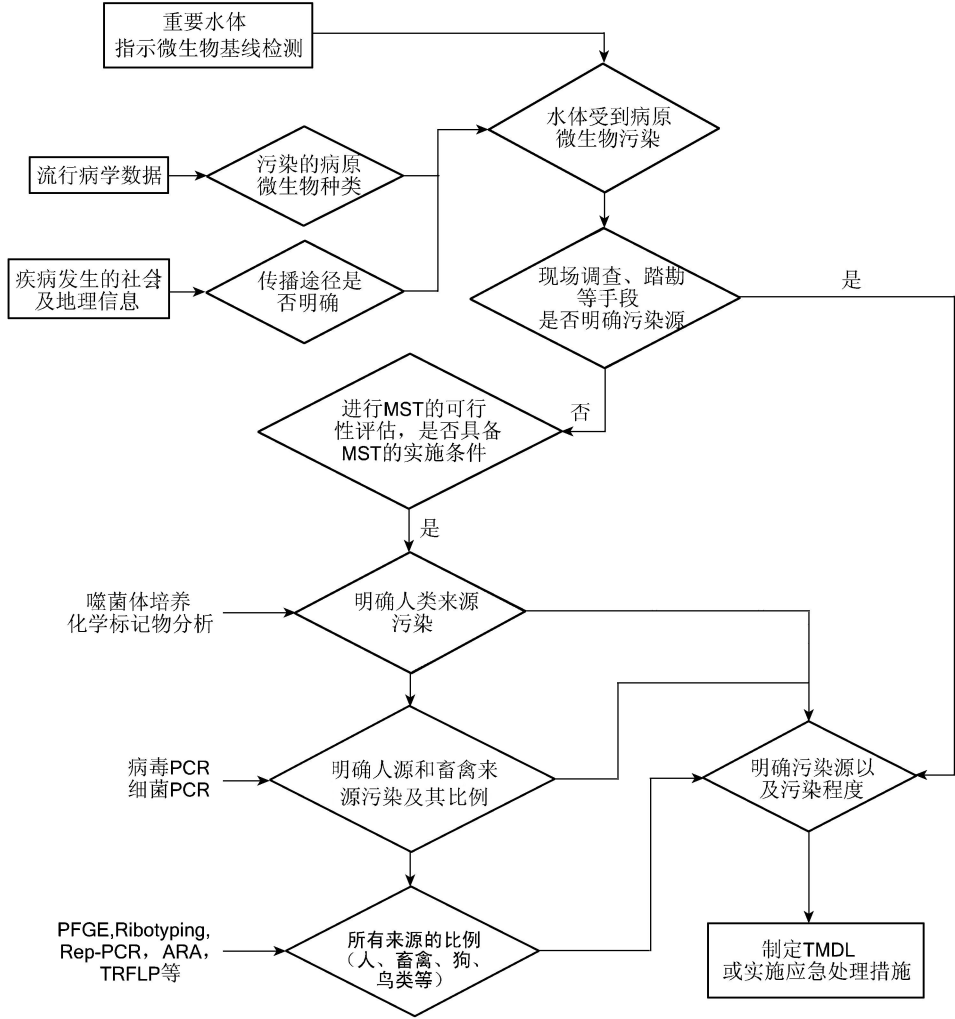


图 1 基于水质保护的病原微生物溯源工作实施流程^[21]

总体而言,MST方法已成为地表水中病原微生物检测的首选,但在TMDL方案制定中需谨慎采用MST方案。弗吉尼亚环保署在Carters溪的TMDL方案中有关病原微生物污染控制部分采用了MST方案^[21],其中MST的溯源结果给出了野生动物、人、牲畜和宠物4种来源的病原微生物相对丰度,该TMDL方案针对每种污染源做了负荷配置,这无疑提高了TMDL方案的精度,但在应用上需要小心谨慎,一方面这种方法假设样本中的病原微生物丰度反映了流域内4种来源的实际贡献,但这种假设不可靠,因为水体中病原微生物的污染程度不仅在空间上分布非常不均匀,而且所采集水样只是部分代表实际情况,检测结果还受采样时间、采样深度等参数的影响^[69];另一方面,Carters溪的MST方案是基于抗生素耐药性的分析,其培养偏差不能忽略。

制定和实施MST方案的最重要原则是从项目的需求出发选择合适的MST方法,不仅需要考虑到方法的用途、质量控制、盲样检测结果的精度,以及是否建实验室适用的样本库,测试周期,样本库大小,检测费用等,还需要综合考虑项目的自然地理、社会经济等因素。如迫切需要确定具体、多样化的粪便来源,可选用建立DNA样本库的方法以提高检测方法的区分度^[25, 70]。如果成本是主要约束因素,则需要在检测内容或者区分度上做出妥协。如果一个TMDL项目只需要识别人类和非人类污染来源的相对比例,就不推荐使用PFGE等可以识别特定种类的MST方法,因为PFGE价格远超过噬菌体等方法。虽然MST方法在探明污染流域的病原微生物来源方面非常有效,但TMDL开发者应谨慎使用其结果。在评估和确定粪便细菌的来源时,MST方法应该用于补充而不是取代现有的方法和工具^[21](现有的传统工具包括检测粪便细菌指标、卫生学调查和现场调查),同时应采用管理部门的数据和流行病学报告等。

2.7 MST 技术开发及应用中的挑战

影响病原微生物源检测推广的障碍是MST结果的可靠性欠佳,不同实验室对同一样品的分析精度和准确性相差较大,其难点主要在于:①PCR检测中出现的假阴性结果^[71],这是最常见问题,因为粪便中含有大量Taq聚合酶的抑制物质,可严重干扰结果的可靠性。②标记物自身的适应性。如,在采用MST技术评估美国各地采集的牛粪便标本时,由于各地喂养方法不同,牛粪便的生物标记物也有很明显的改变^[72]。③因为病原微生物浓度的波动极大,现场取样时必须考虑所取水样的代表性,同时需考虑遗传标记物在体外自然环境中的持久性和衰

减率、各种环境因素对灵敏度的潜在干扰^[71]。如,PCR方法在检测集中排放的城市污水中的病毒时非常有效,但对分散的小规模化粪池等污染源的检测效果较差,这会导致人们错误估算城市污染负荷的贡献值。

基于生物标记物进行病原微生物溯源的缺点是与现行基于FIB的水质管理标准脱节^[1]。目前生物标记物与FIB等粪便污染指示物的相关性知识较为欠缺,如,目前可用的标记物仅针对数量较少的动物物种,来源较窄,还不具备广泛的动物代表性,但这个趋势正在改变,如,加州环保署正在开展基于分子生物学标记物的水质标准研究。

3 结语与展望

经过了20多年的发展,MST技术基本具备了实施病原微生物溯源的功能,较为成熟的MST方法包括宿主特异性病毒、拟杆菌和毒素/毒力基因的PCR检测;在人源病原微生物识别方面,拟杆菌、拟杆菌噬菌体和FC噬菌体是综合表现较好的方法。因此,更加准确、快捷、廉价的检测手段仍然是今后MST方法的主要研发目标。

在我国河流污染治理有所改善的背景下,MST方法在河流TMDL应用领域还需要向标准化和规范化推进,尤其是对于TMDL应用人员而言,MST是个复杂的技术包,在方案编制过程中应从污染源识别的需求出发,在应用中推动MST技术的发展与完善。

参考文献:

[1] 陈亚楠,王亚炜,魏源送,等. 不同功能地表水体中病原微生物指示物的标准比较[J]. 环境科学学报,2015,35 (2): 337-351. (CHEN Yanan, WANG Yawei, WEI Yuansong, et al. Evolution and standard comparision of indicator microorganisms for different surface waters [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35 (2): 3 37-351. (in Chinese))

[2] EPA. National water quality inventory: report to congress, 2004 reporting cycle: findings [R]. Washington D C: United States Environmental Protection Agency, 2009.

[3] HAGEDORN C, BLANCH A R, HARWOOD V J. Microbial source tracking: methods, applications, and case studies [M]. New York: Springer Science Business Media, 2011.

[4] 张艳丽,崔力争. 常见人畜共患疾病状况分析 [J]. 医学动物防治, 2012, 28 (8): 878-879. (ZHANG Yanli, CUI lizhen. Analysis of common zoonotic disease [J]. J Med Pest Control, 2012, 28 (8): 878-879. (in Chinese))

[5] BAMBIC D G, KILDARE-HANN B J, RAJAL V B, et al. Spatial and hydrologic variation of bacteroidales,

- adenovirus and enterovirus in a semi-arid, wastewater effluent-impacted watershed [J]. *Water Research*, 2015, 75:83-94.
- [6] STAPLETON C M, WYER M D, KAY D, et al. Microbial source tracking: a forensic technique for microbial source identification? [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2007, 9(5): 427-439.
- [7] 杨龙, 王晓燕, 孟庆义. 美国 TMDL 计划的研究现状及其发展趋势[J]. *环境科学与技术*, 2008, 31(9): 72-76. (YANG Long, WANG Xiaoyan, MENG Qingyi. Present status and perspective of TMDL program in USA [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 31(9): 72-76. (in Chinese))
- [8] MARA D D, ORAGUI J I. Occurrence of rhodococcus-coprophilus and associated actinomycetes in feces, sewage, and fresh-water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(6): 1037-1042.
- [9] OSAWA S, FURUSE K, WATANABE I. Distribution of ribonucleic-acid coliphages in animals [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(1): 164-168.
- [10] NEBRA Y, BONJOCH X, BLANCH A R. Use of bifidobacterium dentium as an indicator of the origin of fecal water pollution [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2651-2656.
- [11] TARTERA C, LUCENA F, JOFRE J. Human-origin of bacteroides-fragilis bacteriophages present in the environment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(10): 2696-2701.
- [12] BERNHARD A E, FIELD K G. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in bacteroides-prevotella genes encoding 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4571-4574.
- [13] WIGGINS B A, ANDREWS R W, CONWAY R A, et al. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3483-3486.
- [14] HAGEDORN C, ROBINSON S L, FILTZ J R, et al. Determining sources of fecal pollution in a rural virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5522-5531.
- [15] HARWOOD V J, DELAHOYA N C, ULRICH R M, et al. Molecular confirmation of enterococcus faecalis and e-faecium from clinical, faecal and environmental sources [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38(6): 476-482.
- [16] STEWART J R, BOEHM A B, DUBINSKY E A, et al. Recommendations following a multi-laboratory comparison of microbial source tracking methods [J]. *Water Research*, 2013, 47(18): 6829-6838.
- [17] BLANCH A R, BELANCHE-MUNOZ L, BONJOCH X, et al. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 5915-5926.
- [18] GRIFFITH J F, WEISBERG S B, MCGEE C D. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples [J]. *Journal of Water and Health*, 2003, 1(4): 141-51.
- [19] BOEHM A B, VAN DE WERFHORST L C, GRIFFITH J F, et al. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study [J]. *Water Research*, 2013, 47(18): 6812-6828.
- [20] USEPA. Microbial source tracking guide document [R]. Cincinnati: U. S. Environmental Protection Agency, 2005.
- [21] USEPA. Using microbial source tracking to support TMDL development and implementation [R]. Seattle, WA: USEPA, 2011.
- [22] STALEY C, GORDON K V, SCHOEN M E, et al. Performance of two quantitative PCR methods for microbial source tracking of human sewage and implications for microbial risk assessment in recreational waters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(20): 7317-7326.
- [23] 赵宏, 赵化冰, 曲鹏, 等. 大肠杆菌溯源技术研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(11): 123-127. (ZHAO Hong, ZHAO Huabing, QU Peng, et al. A review of escherichia coli traceability technology [J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(11): 123-127. (in Chinese))
- [24] FU L L, LI J R. Microbial source tracking: A tool for identifying sources of microbial contamination in the food chain [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(6): 699-707.
- [25] FIELD K G, SAMADPOUR M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality [J]. *Water Research*, 2007, 41(16): 3517-3538.
- [26] 冯广达, 邓名荣, 朱红惠, 等. 水体粪便污染的微生物溯源方法研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2010, 21(12): 3273-3281. (FENG Guangda, DENG Mingrong, ZHU Honghui, et al. Microbial source tracking of water fecal pollution: A review [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(12): 3273-3281. (in Chinese))
- [27] 敖静, 阮晓红, 万宇. 水环境中粪便污染的微生物溯源技术及研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(7): 658-661. (AO Jing, RUAN Xiaohong, WAN Yu. Development of microbial source tracking of fecal pollution in water [J]. *Journal of Environmental Health*, 2012, 29(7): 658-661. (in Chinese))
- [28] JOFRE J A R, BLANCH F, LUCENA, et al. Bacteriophage infecting bacteroides as a marker for microbial source tracking [J]. *Water Research*, 2014, 55: 1-11.
- [29] FERGUSON R L, BUCKLEY E N, PALUMBO A V. Response of marine bacterioplankton to differential

- filtration and confinement[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(1): 49-55.
- [30] CAO Y P, VAN DE WERFHORST L C, SCOTT E A, et al. Bacteroidales terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) for fecal source differentiation in comparison to and in combination with universal bacteria TRFLP[J]. Water Research, 2013, 47(18): 6944-6955.
- [31] GENTILOMI G A, CRICCA M, DE LUCA G, et al. Rapid and sensitive detection of MS2 coliphages in wastewater samples by quantitative reverse transcriptase PCR [J]. New Microbiologica, 2008, 31(2): 273-280.
- [32] 项明洁, 刘锦燕, 倪培华, 等. 重复序列 PCR (rep-PCR) 指纹分析技术在病原真菌鉴定和分型中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(6): 376-380. (XIANG Mingjie, LIU Jingyan, NI Peihua, et al. Rep-PCR Fingerprint technology in identification and typing of pathogenic fungi [J]. Chinese Journal of Mycology, 2010, 5(6): 376-380. (in Chinese))
- [33] STOECKEL D M, HARWOOD V J. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(8): 2405-2415.
- [34] JOHNSON L K, BROWN M B, CARRUTHERS E A, et al. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of Escherichia coli from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4478-4485.
- [35] ROSLEV P, BUKH A S. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(5): 1341-1355.
- [36] FIELD K G, CHERN E C, DICK L K, et al. A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking [J]. Journal of Water and Health, 2003, 1(4): 181-94.
- [37] HARWOOD V J, WIGGINS B, HAGEDORN C, et al. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study [J]. Journal of Water and Health, 2003, 1(4): 153-66.
- [38] MYODA S P, CARSON C A, FUHRMANN J J, et al. Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database [J]. Journal of Water and Health, 2003, 1(4): 167-80.
- [39] SHANKS O C, ATIKOVIC E, BLACKWOOD A D, et al. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 745-752.
- [40] KILDARE B J, LEUTENEGGER C M, MCSWAIN B S, et al. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal bacteroidales: A bayesian approach [J]. Water Research, 2007, 41(16): 3701-3715.
- [41] REISCHER G H, KASPER D C, STEINBORN R, et al. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5610-5614.
- [42] MIESZKIN S, YALA J F, JOUBREL R, et al. Phylogenetic analysis of bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 974-984.
- [43] LU J R, SANTO DOMINGO J W, LAMENDELLA R, et al. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 3969-3976.
- [44] SHIBATA T, SOLO-GABRIELE H M, SINIGALLIANO C D, et al. Evaluation of conventional and alternative monitoring methods for a recreational marine beach with non-point source of fecal contamination [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(21): 8175-8181.
- [45] LEE C, MARION J W, LEE J. Development and application of a quantitative PCR assay targeting catellicoccus marimammalium for assessing gull-associated fecal contamination at Lake Erie beaches [J]. Science of the Total Environment, 2013, 454: 1-8.
- [46] DICK L K, BERNHARD A E, BRODEUR T J, et al. Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3184-3191.
- [47] MARTELLINI A, PAYMENT P, VILLEMUR R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water [J]. Water Research, 2005, 39(4): 541-548.
- [48] SEURINCK S, DEFOIRDT T, VERSTRAETE W, et al. Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(2): 249-259.
- [49] HAUGLAND R A, VARMA M, SIVAGANESAN M, et al. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33(6): 348-357.
- [50] SHANKS O C, KELTY C A, SIVAGANESAN M, et al. Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5507-5513.
- [51] JOHNSTON C, UFNAR J A, GRIFFITH J F, et al. A real-time qPCR assay for the detection of the nifH gene of

- Methanobrevibacter smithii, a potential indicator of sewage pollution[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109 (6): 1946-1956.
- [52] REISCHER G H, KASPER D C, STEINBORN R, et al. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(4): 351-356.
- [53] LEE C S, LEE J. Evaluation of new gyrB-based real-time PCR system for the detection of B. fragilis as an indicator of human-specific fecal contamination [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 82(3): 311-318.
- [54] YAMPARA-IQUISE H, ZHENG G, JONES J E, et al. Use of a bacteroides thetaiotaomicron-specific alpha-1-6, mannanase quantitative PCR to detect human faecal pollution in water[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(5): 1686-1693.
- [55] EBDON J, MAITE M, TAYLOR H. The application of a recently isolated strain of bacteroides(GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment[J]. Water Research, 2007, 41 (16): 3683-3690.
- [56] VIJAYAVEL K, FUJIOKA R, EBDON J, et al. Isolation and characterization of bacteroides host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii [J]. Water Research, 2010, 44(12): 3714-3724.
- [57] GOURMELON M, CAPRAIS M P, SEGURA R, et al. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in french estuaries [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 4857-4866.
- [58] GREGORY J B, LITAKER R W, NOBLE R T. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3960-3967.
- [59] WALTERS S P, YAMAHARA K M, BOEHM A B. Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: Implications for their use in assessing risk in recreational waters [J]. Water Research, 2009, 43(19): 4929-4939.
- [60] JOTHIKUMAR N, CROMEANS T L, HILL V R, et al. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (6): 3131-3136.
- [61] XU W H, MCDONOUGH M C, ERDMAN D D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11): 4114-4120.
- [62] DA SILVA A K, LE SAUX J C, PARNAUDEAU S, et al. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (24): 7891-7897.
- [63] MCQUAIG S M, SCOTT T M, LUKASIK J O, et al. Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75 (11): 3379-3388.
- [64] Van de WERFHORST L C, MURRAY J L S, REYNOLDS S, et al. Canine scent detection and microbial source tracking of human waste contamination in storm drains [J]. Water Environment Research, 2014, 86 (6): 550-558.
- [65] DUBINSKY E A, ESMAILI L, HULLS J R, et al. Application of phylogenetic microarray analysis to discriminate sources of fecal pollution [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(8): 4340-4347.
- [66] LAYTON B A, CAO Y P, EBENTIER D L, et al. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study [J]. Water Research, 2013, 47(18): 6897-6908.
- [67] HARWOOD V J, BOEHM A B, SASSOUBRE L M, et al. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study [J]. Water Research, 2013, 47(18): 6929-6943.
- [68] 张曦, 朱昌雄, 朱红惠. 利用拟杆菌分子标记物对粪便污染溯源的研究进展 [J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 863-868. (ZHANG Xi, ZHU Changxiong, ZHU Honghui. Research development of fecal source tracking by bacteroides biomarkers [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(7): 863-868. (in Chinese))
- [69] NEVERS M B, WHITMAN R L. Policies and practices of beach monitoring in the Great Lakes, USA: A critical review [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2010, 12 (3): 581-590.
- [70] STOECKEL D M. Selection and application of microbial source tracking tools for water quality investigations [R]. Virginia: U S Geological Survey, 2005.
- [71] GRIFFITH J F, LAYTON B A, BOEHM A B, et al. The California microbial source identification manual: A tiered approach to identifying fecal pollution sources to beaches [R]. Costa Mesa, CA: Southern California Coastal Water Research Project, 2013.
- [72] SHANKS O C, WHITE K, KELTY C A, et al. Performance assessment PCR-based assays targeting bacteroidales genetic markers of bovine fecal pollution [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1359-1366.

(收稿日期: 2015-10-10 编辑: 彭桃英)