

应用肠道微生物示踪地表水粪便污染的研究进展

段传人^{1*} 刘爱喜² 王贵学¹ 高旭³ 郭劲松⁴ 聂磊¹ 暴佳芳¹

(1. 生物流变科学与技术教育部重点实验室 重庆大学 生物工程学院 重庆 400044)

(2. 贵州省六盘水市六枝特区六盘水市第二中学 贵州 六盘水 553401)

(3. 重庆大学 城市建设与环境工程学院 重庆 400045)

(4. 中国科学院重庆绿色智能技术研究院 重庆 401120)

摘要:人和动物的粪便已成为水污染的重要污染源,严重威胁着饮水安全和经济发展。水质污染微生物的传统检测指示菌是总大肠菌群、粪大肠菌群、埃希大肠菌、肠球菌和梭菌属。经过调查发现,上述指示菌由于在体外能存活并繁殖,并且不同宿主之间没有差异性,不能准确用于追踪污染粪便的来源,因此该指标难以直接说明粪便污染源和污染程度。最近的研究表明,*Faecalibacterium*作为水体粪便污染来源追踪的指示微生物具有很多优点。本文综述了粪便污染指示菌及其相关替代方法在水质检测中的研究进展,对各种指示菌进行了优、缺点比较,展望了*Faecalibacterium*的应用前景。

关键词:*Faecalibacterium* 菌, 粪源追踪, 水质监测

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAJ25B06); 国家十二五科技支撑计划项目(No. 2012BAJ25B09)

*通讯作者: ✉: chrduan@cqu.edu.cn

收稿日期: 2013-05-14; 接受日期: 2013-09-29

Research progress of using intestinal microbes to track the sources of fecal pollution in surface water

DUAN Chuan-Ren^{1*} LIU Ai-Xi² WANG Gui-Xue¹ GAO Xu³ GUO Jin-Song⁴ NIE Lei¹
BAO Jia-Fang¹

(1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing Univerity), Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(2. The Second Middle School of City of Liupanshui, Liupanshui, Guizhou 553401, China)

(3. Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

(4. Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 401120, China)

Abstract: Fecal pollution by human and animals has seriously threatened the safety of drinking and recreation water and negatively impacted on economy. Currently, bacteria of total coliform, total fecal coliform, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Clostridium* spp. are used as the standard fecal indicator bacteria (FIB). However, recent studies demonstrate that the density of the FIB correlates only with the degree of a fecal pollution and provides no information about the sources of pollution. To accurately identify the sources of fecal pollution, microbial source tracking (MST) methods have been developed and used in the United States and other developed countries for effective management of water resource and monitoring. MST methods are techniques matching microbe(s) from a polluted site with that (or those) from an animal source to suggest the source of fecal pollution. This paper is to critically review the recent studies on fecal indicator bacteria and techniques used for MST and to discuss the latest developments of using *Faecalibacterium* as an alternative FIB for MST, including its future applications in water management and monitoring.

Keywords: *Faecalibacterium*, Tracking of the source of feces pollution, Water detected

随着经济的快速发展,居民生活水平不断提高,居民生活用水和生产用水常常受到污染,尤其粪便污染更为严重。在水源地找到潜在的污染源并及时采取有效的管理和补救措施,这对人们的饮水健康和生活用水安全是非常重要的。所以区分和鉴别粪便污染来源成了解决问题的关键。只有准确识别污染来源,才能制定有效的管理方案解决污染物的潜在危机。传统的粪便污染指示菌只能反映出环境受粪便污染的程度,却不

能区分粪便污染的来源,是因为他们的检测相对简单。微生物源示踪技术的出现解决了这一难题。微生物源示踪技术(Microbial source tracking, MST)是一种追踪水源中污染物来源的方法,它是指通过比较污染水体样品与可疑污染源中的粪便污染指示微生物的差异或其生物指标的有无来判断污染水体与可疑污染源之间存在的关联,从而确定污染来源^[1-2]。近年来,欧美等发达国家已经开展了利用微生物源示踪技术的研究工作,

并取得了很大进展^[3-5]。本文根据目前开展的研究,对粪便污染源示踪菌的选择,示踪方法的应用进行了归纳和总结,对其优、缺点做了比较,总结了示踪菌 *Faecalibacterium* 的最新研究成果,以期推动这一技术在粪便污染控制中的应用。

1 粪便污染源指示物的发展

粪便指示菌是指利用人和动物粪便中的微生物来准确指示粪便来源的微生物菌种,这些菌种具有很强的源特异性,传统的指示菌选择粪大肠杆菌和肠球菌属,根据其在水体中广泛存在并且和粪便污染具有相关性,被首次应用于微生物源示踪^[6-7]。过去经常使用指示菌有大肠杆菌(*E. coli*)、粪肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、产气荚膜菌(*Clostridium perfringens*)、普雷沃氏菌(*Prevotella*)等。这些指示菌都是细菌,部分指示菌在水体环境中能够自行繁殖,无法指示其污染严重程度,随后出现了一些替代指示菌的病毒,这些病毒主要有:脆弱拟杆菌 HSP40 噬菌体(*Bacterioides fragilis* HSP40 phages)、F+RNA 大肠杆菌噬菌体(F+RNA coli phages)、一些动物体肠道内的特异性病毒等,这些指示物都曾经作为 MST 示踪技术的示踪微生物。

1.1 大肠杆菌

大肠杆菌(*E. coli*)是指存在于人和温血动物肠道内的一些肠道细菌,也称粪大肠杆菌或大肠埃氏杆菌,好氧及兼性厌氧菌,革兰氏阴性,无芽孢杆菌,在 37 °C、24 h 培养能分解乳糖产酸产气,通常可作为水体粪便污染的指示菌。大肠菌群是目前国际上通用的监测水质受粪便污染的指示菌,一般随粪便排出体外,受到粪便污染的水体,均含有大量的此类菌群,大肠菌群数的高低,表明了粪便污染严重程度^[6-8],但因为其很强的存活能力,不能很好示踪粪便污染来源和准确示踪污染程度,通常只作为粪便污染的定性分

析。顾玲等^[9]以大肠埃氏杆菌为指示菌,成功识别江苏省盱眙县桂五水库粪便污染来源,为水质检测提供了新方法。

1.2 肠球菌

肠球菌(*Enterococcus*)属链球菌科,它也是人类和动物肠道正常菌群的一部分,经研究表明肠球菌是无害于人类的共栖菌,并且具有很强的抗性(抗高渗,抗碱,抗高温),粪链球菌已成功用于粪便污染源示踪的指示菌,但其最大的缺陷在于肠球菌为需氧或兼性厌氧菌,在宿主体外可大量繁殖,不能准确说明污染程度^[10-11]。冯雯雯^[12]利用大连地区为试验区域,建成陆上潜在污染源(人、狗、鸡、牛、猪)肠球菌抗生素抗性指纹图谱库,验证了微生物源示踪技术应用于我国水环境非点源污染源示踪是可行的。

1.3 双歧杆菌

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)属于双歧杆菌属,革兰氏阳性菌、厌氧、很少运动、无芽孢,是人肠道菌群的重要组成部分,早已经作为粪便指示菌的应用研究。主要是因为该指示菌在人肠道含量多,动物肠道内含量较少或者几乎没有,常用于区分人和动物的粪便污染。最大的缺陷是示踪范围有限^[13]。

1.4 产气荚膜梭菌

产气荚膜菌(*Clostridium perfringens*)是革兰氏阳性、专性厌氧肠道菌,存在于人和动物粪便中。也存在于热带地区的土壤与河流中,用作检测热带水体的污染。因其对外界环境有着很强的抗性,固可以检测到过去可能发生的污染。

1.5 普雷沃氏菌

普雷沃氏菌属(*Prevotella*)包括了口腔、肠道中的 16 个拟杆菌种,形态多样,无芽孢,不运动,严格厌氧,能分解糖类形成光滑或线状沉淀最终呈现酸性产物。通常从人或者其它动物的粪便中分离出来,检测方便,便于快速检出,近来常作

为粪便污染指示菌用于水质监测。Lisa R.等^[14]通过普雷沃氏菌 16S rRNA 基因标记成功区分了不同动物的粪便。Bernhard 等^[15]根据普雷沃氏菌 16S rRNA 基因成功区分了人和反刍动物的粪便。

1.6 脆弱拟杆菌噬菌体

脆弱拟杆菌噬菌体(Bacteriodes fragilis bacteriophage) HSP40 是唯一在人粪便中发现的,所以就作为人粪便的指示因子来示踪人类粪便污染。该噬菌体最大优势在于脱离宿主后不能增殖,但检测过程很复杂,使用性较差,所以至今很少应用。

1.7 F+RNA 大肠杆菌噬菌体

大肠杆菌噬菌体是肠道内的一种噬菌体,只能在人和动物肠道内寄生于大肠杆菌生存,具有很强的专一性,常作为基因工程的载体,可分为多种血清型,根据血清型不同而存在于人和动物粪便中,已经作为粪便的示踪物进行了相关研究^[16],但其最大的缺陷在于环境温度常常限制其应用,含量较低也是其另一缺陷。

1.8 肠道病毒

肠道病毒包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、致肠细胞病变人孤儿病毒(Enteric cytopatho-genic human orphan virus, ECHO 简称埃可病毒)及新型肠道病毒共 71 个血清型,部分血清型可用于粪便示踪研究,但由于其含量低,不可培养等缺点,很难推广应用^[17]。

上述微生物作为粪便示踪物成功地示踪了多例粪便造成的水质污染,但也出现了很多缺陷:(1) 这些指示菌远非动物肠道或粪便中的优势菌群,不利于粪便污染的准确检出;(2) 这些指示菌本身在自然环境中都能存活,他们的检出不能说明是最近的粪便污染引起还是环境中原来就有的污染引起的;(3) 这些指示菌在自然环境条件合适时能够大量繁殖,他们的检出也不能说明污染程度;(4) 这些指示菌的检出提供不了污染物

的来源。目前我国采用的指示菌主要有:总大肠杆菌、粪大肠杆菌、大肠埃氏菌等。在过去的几十年中,粪便大肠杆菌、大肠埃氏杆菌和肠球菌被全世界很多国家作为水体污染的指示菌,但是,上述微生物作为粪便污染指示菌的缺陷也是显而易见的。随后人们以普雷沃氏菌、双歧杆菌、产气荚膜梭菌、乳杆菌、产甲烷菌作为替代指示菌。随后又利用杆菌噬菌体病毒、腺病毒、多瘤病毒等一些病毒检测指标。总体来说,这些指示菌为水污染的污染物来源追踪提供了强有力的补充和完善。普雷沃氏菌微生物是目前世界上研究最多的粪便污染指示菌。

2 国内外对粪便污染示踪方法的选择

研究人员利用示踪微生物选择了多种方法对水体污染进行了示踪研究,这些方法大多依赖于数据库型示踪,该法是指通过培养可疑污染源中的微生物建立主要污染菌株的数据库,然后提取水样中的指示微生物与数据库中的菌株进行对比,根据指示微生物之间的亲缘关系区分污染来源。根据所获取的指纹来源的不同又可进一步分为表型法和基因型法两种。表型法是利用微生物在不同的宿主环境中产生特异性很强的代谢产物,从而判断宿主来源的方法。主要方法有:抗生素抗性分析法(Antibiotic resistance analysis, ARA),碳源利用法(Carbon source utilization analysis, CSU),化学示踪法。基因型法是根据在不同宿主环境内存在的同一微生物具有相似但有差异的基因指纹,根据其差异反向追踪宿主的方法。目前主要应用的方法可分为:核糖印迹法(Robotizing)、限制性片断长度多态性分析法(Amplified fragment length polymorphism)、脉冲场凝胶电泳法(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、重复序列扩增法(Repetitive estrogenic

palindromic-PCR, Rep-PCR)等^[18]。

2.1 抗生素抗性分析法(Antibiotic resistance analysis, ARA)

Wiggins^[19] (1965年)采用抗生素检测法检测了1435株粪肠球菌之后,建立指纹图谱库。2001年, Wiggins又对 Moore's Creek 水域进行了污染源示踪检测,最终确定该地区的人和野生动物是最主要的污染源。Whitlock 在佛罗里达州的一个乡村水域做了相应研究,追踪到大肠杆菌主要来自于附近的人源化粪池;而另一个 Stevenson Creek 水域的研究表明大肠杆菌主要来自于野生动物源、人源和少部分狗源。

2.2 核糖印迹法(Robotizing)

已有研究表明核糖印迹法能够有效区分人和动物的粪便污染^[20-21],区分率为82%~97%。Nelson 等对海鸥粪便、垃圾场和废水之间污染关系做了相关研究,表明废水中的大肠杆菌主要来自海鸥粪便^[22]。

2.3 重复序列扩增法 (Repetitive sequence-based PCR, Rep-PCR)

该法使用大肠杆菌作为指示微生物, Mclellan 利用 Rep-PCR 分型研究表明相同来源的大肠杆菌基因型不尽相同,但组成菌株的基因型是相同的。根据 BOX-PCR 区分不同来源粪便样品大肠杆菌的成功率为68%~100%^[23-24],利用 Rep-PCR 分析人和动物粪便污染的准确率为88%^[25],分析人、牛和马粪便中的大肠杆菌准确率为68%~94%^[26]。

2.4 16S-23S 基因间隔区分析法

D'Elia 等^[27]研究表明:16S-23S rRNA ISR PCR-DGGE 可以有效区分人和动物粪便污染源。Seurinck 等研究认为:ISR PCR-DGGE 对人、牛、马粪便污染的区分率为48%~68%。宫强^[28]利用 PAGE 构建出不同来源 *E. coli* 的 DNA“指纹”图谱,通过比较 *E. coli* 共性和特异性“指纹”带,找出示

踪微生物在不同来源粪便中的多态性,为进一步粪便污染源示踪研究提供理论基础和科学依据。其他分型方法还包括了限制性酶切片多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)、随机扩增多态性 (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 和多位点序列分析 (MLST) 等。

2.5 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

Tynkkynen 等^[29]利用 PFGE、Ribotyping 和 RAPD 对乳酸菌进行分型,研究表明 PFGE 区分能力最强。Cesaris 等^[30]研究说明,PFGE 能够区分 BOX-PCR 无法区分的大肠杆菌菌株,目前 PFGE 主要应用在流行病学领域^[31-32],而在水体污染示踪中应用较少。

2.6 血清学法 (Stereotyping)

Praveen 测试了100个人类和非人类来源的 O 抗原的埃希大肠杆菌菌落:来源于人类有19个血清型,48%属于7个血清型;来源于动物的有26个血清型,36%也属于7个血清型^[33]。

2.7 线粒体示踪技术 (Mitochondrial MST)

Martellini 等^[34]首次应用线粒体标记研究水体粪便污染来源。研究表明生活污水,农田地表径流和河流,湖泊受到了人和动物粪便的污染,并且能够区分污染来源。Schill 和 Mathes^[35]设计了多种动物的线粒体特异性引物,用于20多个不同粪便污染的水体示踪。结果显示引物特异性高达99.4%,灵敏度为85%。此外,大量研究表明利用线粒体基因设计的引物特异性较高,在污水示踪污染源技术中灵敏度较高。

3 粪便污染指示菌及检测方法的优缺点

到目前为止,传统的指示菌示踪及其相关的

检测方法已经被用于水体污染检测中, 这些方法都能用于区分粪便污染来源。不仅可以找出污染粪便与污染源的关系, 还可以对污染源进行定量分析, 因此可根据定量结果进行污染贡献率分析, 还具有快速、灵敏、特异性强的优点。微生物源示踪技术中指示物的特异性和环境稳定性成为 MST 技术的最重要的问题。传统众多的 MTS 检测方法都有其各自优缺点(表 1)及适用范围。任何一种方法都不能适用于各种环境条件下的粪便示踪, 需要选取合适的方法, 甚至多种不同的方法相结合, 实现优势互补才能达到检测目的。

4 国内外研究现状

国内目前利用粪便源示踪技术进行水质监测主要集中在以下方面^[36-49]: 首先采用的是化学物质示踪粪便污染源, 最先由哈尔滨工业大学的崔崇威等, 他们采用的是甾醇类物质示踪研究。其次是采用生物的方法进行示踪, 是由王耀兵等对我国海域粪便污染的 Microbial source tracking (MST) 技术研究, 他们首次采用 ARA 方法的 MST 技术研究引入国内, 并进行了推广, 可以有效地示踪海域中的粪便污染源。最后一方面的研究

表 1 微生物源示踪技术方法比较
Table 1 Advantages and disadvantages of current methods used for microbial source tracking

| 方法 Method | 优点 Advantage | 缺点 Disadvantage |
|---|---|--|
| 抗生素抗性分析法 ARA Antibiotic resistance analysis ARA | 操作简单, 经济有效 | 稳定性差, 易受耐药性影响 |
| 核糖印迹法 Robotizing | 有较高的分辨能力 | 步骤过于繁杂, 耗时耗力, 建立菌株数据库的成本较高 |
| 重复序列扩增法 Repetitive sequence-based PCR Rep-PCR | 区分能力强、操作简单、经济和不需要特殊仪器等 | 重复性稍差 |
| 16S-23S 基因间隔区分析法 16S-23S rRNA internal transcription space (ITS) sequence analysis | 适合于小样本容量 | 操作过程过于复杂, 耗时耗力, 技术要求严格, 只区分部分基因的差异 |
| 脉冲场凝胶电泳 Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE | 较强的分型能力和稳定性适合于小样本容量 | 操作程序复杂, 技术要求严格, 工作量大, 耗时长, 且成本较高 |
| 血清学法 Stereotyping | 操作简单 | 尚存争议, 应用受限 |
| 大肠杆菌特异性基因的 PCR-DGGE specific gene of <i>E. coli</i> denaturing gradient gel electrophoresis | 适合在非培养示踪中应用 | 只能证明污染样品之间以及与污染源之间是否存在联系 |
| 拟杆菌目生物标记法 Bacteroides biological markers | 有较高的特异性 | 只能证明污染样品是否具有某种动物粪便污染的生物标记并不能区分不同污染粪便来源 |
| <i>Faecalibacterium</i> 生物标记法 <i>Faecalibacterium</i> biological markers | 既能证明污染样品是否具有某种动物粪便污染的生物标记, 又能区分不同污染粪便来源 | 稳定性, 重复性尚需验证 |
| 线粒体示踪技术 Mitochondrial MST | 操作简单、快速、特异性强 | 易受环境影响, 稳定性差 |

是由东南大学、江苏疾控中心和南京医科大学合作完成的微生物源示踪技术的研究^[44-48,50],他们利用大肠埃氏菌 Rep-PCR 指纹图谱库验证了淮河流域水库粪便污染来源。总之,国内众多的粪便源检测方法都有其各自优缺点及适用范围,所有的研究大多集中于传统的粪便污染研究。通过对 *Faecalibacterium* 菌的研究发现,其是人、牛、猪、狗、家禽肠道中的优势菌^[51],我国赵立平等^[52-55] 研究报道了 *Faecalibacterium* 菌的宿主特异性分布和作为人和家禽肠道益生菌群的潜在作用,研究表明: *Faecalibacterium* 菌可通过其代谢产物调节免疫反应,以多种形式抑制肠炎疾病的发生。他还利用 *Faecalibacterium* 菌将微生物基因组技术与代谢组技术相结合,通过分析人体的代谢谱来解析肠道菌群组成和功能的新的研究体系,能够更准确地刻画出细菌与宿主代谢之间互动关系的蓝图,使人们有可能利用这些代谢信息确定一个人肠道微生物的组成和功能。最近国外的研究^[56-60]表明:选用 *Faecalibacterium* 菌作为水体粪便污染来源追踪的指示微生物,可极大地弥补传统粪便污染指示微生物的缺陷。*Faecalibacterium* 菌是一个在微生物分类上新建立的属,在人肠道中含量最高,种群单一,只有一个种,即 *Faecalibacterium prausnitzii*^[61]。与粪大肠杆菌、大肠杆菌和肠球菌相比, *Faecalibacterium* 具有分布广泛(在人和家畜、家禽肠道中都是优势菌)、在肠道含量和品种单一,并且具有宿主特异性分布的优点,更加适合作为检测指示菌。*Faecalibacterium* 菌本身已有很多研究,但是大多数作为人体肠道疾病的分析,将其应用到对水体粪便污染的检测和追踪上是近几年才提出的。首次选用 *Faecalibacterium* 菌作为水体粪便污染来源追踪指示微生物的是美国密苏里林肯大学农业与环境学院的郑国铝等^[56-60]提出的,并进行了深入研究,筛选出了与宿主高度关联的特异性序

列。根据人类肠道的 *Faecalibacterium* 菌特征序列设计了 HFB-F3 和 HFB-R5 一对引物,实验结果显示:选取的 30 例自愿者粪便样品中 60% 的粪便样品扩增出了 399 bp 目的片段。验证了人肠道 *Faecalibacterium* 菌的广泛存在等特异性,随后又选取了多个取水点的污水样品进行了盲法验证,所有污水样品 100% 的出现了 399 bp 目的片段。已经确定利用该技术可以区分人源粪便与狗源粪便造成的水污染,充分说明了利用 *Faecalibacterium* 菌 16S rRNA 为引物的 PCR 技术来鉴别 *Faecalibacterium* 菌的实用性。美国政府已经把 *Faecalibacterium* 菌检测方法纳入饮用水的辅助检测项目之中,本实验室与美国密苏里林肯大学农业与环境学院进行了合作研究,已经验证了人源粪便的污染源的检测和追踪的一些前期工作,还验证了 *Faecalibacterium* 菌 16S rRNA 基因为引物的 PCR 技术来鉴别 *Faecalibacterium* 菌在重庆地区的实用性,也取得了相同的实验结果。形成了切实可行的实验设计方案和试验研究方法,现正在进行的区分家禽类的粪便污染源也取得了阶段性的成果。

5 展望

传统的粪便污染示踪方法已经有着广泛的应用,但是其缺陷也显露无疑,从表 2 所示的缺陷中可以看出仅靠传统的方法已经不能应对当前日益严重的水体污染事件,寻找新的粪便指示菌和检测方法已成为了当务之急, *Faecalibacterium* 菌的发现很好地解决了这个问题。*Faecalibacterium* 菌与普雷沃氏菌(*Prevotella*)有相似的生物学特性,两者都是无孢子的革兰氏阴性厌氧菌,通常从人或者其它动物的粪便中分离出来。与普雷沃氏菌不同的是, *Faecalibacterium* 菌还具有表 2 中所特有的优点,所以更加适合用做粪便污染的特征指标。自从郑国铝提出

表 2 传统指示菌与 *Faecalibacterium* 菌示踪方法的比较Table 2 Advantages of molecular methods using *Faecalibacterium* 16S rRNA gene vs. culture methods based on standard fecal indicator bacteria

| 编号 No. | 传统粪便污染指示菌检测缺陷 Disadvantages of culture methods based on standard fecal indicator bacteria | <i>Faecalibacterium</i> 菌 16S rRNA 基因检测优点 Advantages of molecular methods using <i>Faecalibacterium</i> 16S rRNA gene |
|-----------|---|--|
| 1 | 非优势菌群, 不利于准确检出 | 优势菌群, 利于准确检出 |
| 2 | 自然环境中易存活, 不能区分新旧粪便污染 | 严格厌氧菌不存活, 有利于区分新旧粪便污染 |
| 3 | 自然环境中易大量繁殖, 不能区别污染程度 | 水环境中不易繁殖, 能够示踪污染程度 |
| 4 | 特异性不强, 不能示踪粪便污染源 | 特异性强, 能示踪粪便污染来源 |
| 5 | 检测周期长, 流程复杂 | PCR 检测方便、快速 |

Faecalibacterium 菌可以作为粪便污染的主要替代指示菌, *Faecalibacterium* 菌在粪便污染源示踪中的应用日益受到重视, *Faecalibacterium* 菌虽然已经被美国环保局作为水体监测的最新辅助指标。但不能完全替代传统示踪微生物, *Faecalibacterium* 菌的检测方法目前正在推广应用阶段, 以 16S rRNA 为基础的分子生物学技术和核酸序列分析技术成为 *Faecalibacterium* 菌检测和分析的重要方法, 综合应用各种技术将完善应用 *Faecalibacterium* 菌的示踪作用。因此, 利用 *Faecalibacterium* 作为水体粪便污染的检测指示菌, 并以其 16S rRNA 中存在的宿主特异性片段对粪便污染进行有效追踪, 必将有更大的应用前景, 为水源的保护和治理提供可靠的检测手段和准确的数据依据, 为应对突发水污染事件提供技术支持。

总而言之, 当前众多的微生物源示踪技术 (MTS) 检测方法都有其各自优点, 适用范围。微生物源示踪技术中指示物的特异性和环境稳定性成为 MST 技术的最重要的问题, 以后随着分子生物学技术的不断发展, 传统方法和 *Faecalibacterium* 菌检测方法都将会得到广泛应

用, *Faecalibacterium* 菌检测方法的稳定性验证和推广应用将成为研究热点。到目前为止, 任何一种方法都不能适用于各种环境条件下的粪便示踪, 需要选取合适的方法, 甚至多种不同的方法相结合, 实现优势互补将是 MTS 的发展趋势。

参 考 文 献

- [1] Meays CL, Broersma K, Nordin R, et al. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods[J]. Journal of Environmental Management, 2004, 73(1): 71-79.
- [2] Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, et al. Microbial source tracking: current methodology and future directions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5796-5803.
- [3] Reischer GH, Kavka GG, Kasper DC, et al. Applicability of DNA based quantitative microbial source tracking (QMST) evaluated on a large scale in the Danube River and its important tributaries[J]. Archiv fuer Hydrobiologie Supplement, 2008, 18(1/2): 117-125.
- [4] Ahmed W, Stewart J, Gardner T, et al. Sourcing faecal pollution: A combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-skewered catchments[J]. Water Research, 2007, 41(16): 3770-3779.

- [5] Jiang SC, Wei PC, Olson BH, et al. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4): 927–934.
- [6] Scott TM, Parveen S, Portier KM, et al. Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isoblates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1089–1092.
- [7] Simpson JM, Santodomingo JW, Reasoner DJ. Microbial source tracking: State of the science[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 36(24): 5279–5288.
- [8] 孙达, 段传人, 王贵学, 等. 成功桥饮用水水库污染特征分析及对策探讨[R]. Conference on Environmental Pollution and Public Health (CEPPH2011), 2011: 1106–1109.
- [9] 顾玲, 丁震, 汪华, 等. 应用不同微生物源追踪方法追踪水库中粪便污染来源[J]. 中国卫生检验杂志, 2010(2): 249–252.
- [10] Cho IS, Chu WP, Brown J, et al. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach[J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, 4(6): 748–755.
- [11] Whitman RL, Shively DA, Pawlik H, et al. Occurrence of *Escherichia coli* and *Enterococci* in *Cladophora* (Chlorophyta) in nearshore water and beach sand of lake Michigan[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 69(8): 4714–4719.
- [12] 冯雯雯. 大连近岸海域微生物源示踪技术的应用研究[D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2011.
- [13] Rhodes MW, Kator H. Sorbitol-fermenting bifid bacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(4): 528–535.
- [14] Fogarty LR, Voytek MA. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5999–6007.
- [15] Bernhard AE, Field KG. 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.
- [16] Jofre J, Bosch A, Lucena F, et al. Evaluation of Bacterioides fragile Bacteriophages as indicators of the virological quality of water[J]. Water Science and Technology, 1986, 18(10): 167–173.
- [17] Motes CM, Clemente-Casares P, Hundesa A, et al. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 70(3): 1448–1454.
- [18] USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2005. Microbial source tracking guide document. office of research and development, Washington, DCEPA-600/R-05/064.131PP.
- [19] Wiggins BA. Discriminate analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996(62): 3997–4002.
- [20] Hartel PG, Summer JD, Hill JL, et al. Geographic variability of *Escherichia coli* ribotypes from animals in Idaho and Georgia[J]. Journal of Environmental Quality, 2002(31): 1273–1278.
- [21] Carson CA, Shear BL, Ellersieck MR, et al. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by robotizing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001(67): 1503–1507.
- [22] Nelson M, Jones SH, Edwards C, et al. Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using robotizing[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008(81): 53–63.
- [23] McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Genetic Characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 69(5): 2587–2594.
- [24] Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, et al. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 66(6): 2572–2577.
- [25] Carson CA, Shear BL, Ellersieck MR, et al. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals[J]. Journal

- of Applied Microbiology, 2003, 69(3): 1836–1839.
- [26] Seurinck S, Verstraete W, Siciliano SD. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4942–4950.
- [27] D'Elia TV, Cooper CR, Johnston CG. Source tracking of *Escherichia coli* by 16S-23S interagency spacer region denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the *rrnB* ribosomal person[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 10(53): 1174–1184.
- [28] 宫强. 大肠埃希氏杆菌16S-23S rRNA 基因间隔区片段分析在粪便污染源示踪上的应用[D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2005.
- [29] Tynkkynen S, Satokari R, Saarela M, et al. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lc casein strains*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999(65): 3908–3914.
- [30] Cesaris L, Gillespie BE, Srinivasan V, et al. Discriminating between strains of *Escherichia coli* using pulsed field gel electrophoresis and BOX-PCR[J]. Food Borne Pathogens and Disease, 2007(4): 473–480.
- [31] Wang CP, Jin CG. Salmonella food poisoning homology by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(1): 116–117, 158.
- [32] 庞杏林, 陈守义, 邓志爱, 等. 重症监护病房医院感染铜绿假单胞菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2010, 10(1): 17–20.
- [33] Parveen S, Hodge NC, St all RE, et al. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherishes coli*[J]. Water Research, 2001, 35(2): 3793–3786.
- [34] Martellini A, Payment P, Villemur R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fiscally contaminated surface water[J]. Water Research, 2005(39): 5415–5448.
- [35] Schill WB, Mathes MV. Real-time PCR detection and quantification of mine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome targets[J]. Environmental Science and Technology, 2008(42): 5229–5234.
- [36] 张森. 大肠杆菌 rep-PCR 指纹图谱分析在粪便污染源示踪上的应用[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2010.
- [37] 蒋翰鹏. 不同动物粪便中大肠杆菌和肠球菌分布规律的研究 [D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2009.
- [38] 邱会东, 段传人. 农作物废弃物在工业废水处理方面的研究应用[J]. 工业水处理, 2007, 27(1): 5–7.
- [39] 崔崇威, 张月红. 水体受粪便污染的分子示踪物(粪醇)的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(9): 1187–1190.
- [40] 王耀兵, 苏洁, 杨玉敏. 一种粪便污染源识别新技术 - 微生物源示踪 (Microbial Source Tracking, MST)[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(2): 122–128.
- [41] 李伟伟, 顾玲, 叶珣, 等. rep-PCR 基因指纹图微生物源追踪方法建立的研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(17): 3242–3244.
- [42] 林萍, 胡晓抒. 细菌源追踪技术的选择[J]. 江苏预防医学, 2007, 18(3): 83–86.
- [43] 王耀兵, 杨玉敏. 粪便污染源识别技术及其在禽畜养殖污染监测中的应用[A]//全国畜禽水产养殖污染监测与控制治理技术交流研讨会论文集[C]. 2008.
- [44] 叶珣, 顾玲, 李伟伟, 等. 抗生素敏感性微生物源追踪方法建立[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 495–496.
- [45] 于洋, 顾玲, 张婷婷, 等. 微生物源追踪技术在不同污染水体中的应用评价仁[J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(3): 260–262.
- [46] 汪华, 叶珣. 细菌源追踪技术及进展[J]. 江苏卫生保健, 2008, 10(2): 12–13.
- [47] 杨玉敏. 抗生素抗性分析在粪便污染源示踪技术中的应用研究[D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2009.
- [48] 李伟伟, 陈晓东, 顾玲, 等. 应用 rep-PCR 微生物源方法追踪夏秋季桂五水库粪便污染来源[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(3): 6–9.
- [49] 程亮. 肠球菌抗生素抗性指纹图谱库的建立及其准确性研究[D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2010.
- [50] 顾玲, 李伟伟, 丁震, 等. 水库水非点源粪便污染微生物源追踪法鉴定[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(5): 644–647.

- [51] Shen J, Zhang B, Wei G, et al. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5232–5238.
- [52] 李旻. 人体肠道菌群结构与宿主代谢的相关性研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2009.
- [53] 柳欣源. 应用 T-RFLP 技术分析人肠道中柔嫩梭菌类群组成的研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2009.
- [54] 申剑. 寡果糖对人源菌群仔猪肠道菌群结构和宿主代谢的影响[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2005.
- [55] 王婷婷. 肠道菌群结构变化与结直肠癌发生发展关系的研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2007.
- [56] Zheng GL, Yampara-Iquise H, Jones JE, et al. Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faces[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(2): 634–641.
- [57] Yampara-Iquise H, Zheng GL, Jones JE, et al. Use of a *Bactericides* thetaiotaomicron-specific Alpha-1-6, mannanase quantitative PCR to detect human faecal pollution in water[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(15): 1686–1693.
- [58] Zheng GL, Carson CA, Shen Z. Development of poultry feces-specific PCR assay based on the newly identified insertions with in *Faecalibacterium* 16S rRNA genes[J]. In the Abstracts of 110th General Meeting of American Society for Microbiology, 2010.
- [59] Chao Z, Zheng GL, Shun FX, et al. Computational challenges in characterization of bacteria and bacteria-host interaction based genomic data[J]. Journal of Computer Science and Technology, 2012, 27(2): 225–239.
- [60] Shen ZY, Duan CR, Chao Z, et al. Using an intervening sequence of *Faecalibacterium* 16S rDNA to identify poultry feces[J]. Journal of Water Research. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.013>.
- [61] Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, et al. Growth requirements and fermentation products of *Faecalibacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. Nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(6): 2141–2146.



编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。