

# 微生物污染源解析技术研究进展

郑前兴<sup>1,2</sup>, 张杨<sup>2</sup>, 于晓巍<sup>2</sup>, 韦思业<sup>2</sup>, 黄建洪<sup>1</sup>, 吴仁人<sup>1,2\*</sup> (1.昆明理工大学环境科学与工程学院, 云南 昆明 650500; 2.生态环境部华南环境科学研究所, 广东 广州 510655)

**摘要:** 针对目前新兴的微生物污染源解析技术(MST)研究进展进行了归纳总结.结果表明,标记物的源强特征显著影响水体微生物污染水平的评估,选用标记物时应同时考虑灵敏度和源强特征;与非目标物种样品产生交叉反应导致标记物特异性降低,可通过稀释样品或DNA纯化等手段降低假阳性信号强度;粪便源解析文库(FTL)中应涵盖的宿主种类,以及每类宿主应纳入的个体数量均会影响建库源解析结果的准确性,可通过权重分析来确定源文库中各宿主应囊括的样本量,提高识别污染源的准确性;FTL中的物种与土著微生物分类较为接近时,SourceTracker难以准确区分微生物污染来源,将土著微生物信息纳入FTL并多次运行程序可提高SourceTracker识别污染源的能力.未来应加强对标记物灵敏度和源强特征之间相关关系的研究,同时探讨标记物源强特征产生差异的成因以及交叉反应产生的机理;另一方面,应深入探究粪源微生物种内变异程度和土著微生物的种类对建库源解析法的影响机制,以期建立准确、完善的微生物污染源解析技术.

**关键词:** 微生物污染源解析; 标记物; 粪便源解析文库; SourceTracker

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)07-3333-10

**Advances in microbial source tracking methods.** ZHENG Qian-xing<sup>1,2</sup>, ZHANG Yang<sup>2</sup>, YU Xiao-wei<sup>2</sup>, WEI Si-ye<sup>2</sup>, HUANG Jian-hong<sup>1</sup>, WU Ren-ren<sup>1,2\*</sup> (1.Faculty of Environment Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2.South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou 510655, China). *China Environmental Science*, 2021,41(7): 3333~3342

**Abstract:** This review summarized various detection methods of microbial source tracking (MST) in recent publications and the results showed as follow. Firstly, marker abundance significantly affects the risk assessment of microbial contamination in water. Thus we should consider both of sensitivity and abundance when selecting suitable markers. Meanwhile, the cross-reaction between non-target samples and markers may decrease the specificity of suitable markers and we could dilute the sample or purify the DNA to avoid this issue. Moreover, an important consideration with library-dependent MST assays is to determine the appropriate fecal taxon libraries (FTL) size of samples for each host, which can be accomplished by using power analysis. In addition, SourceTracker is difficult to distinguish the source of microbial contamination accurately when the species in the FTL are closer to the autochthonous taxa. This issue could be improved by incorporating autochthonous taxa in the FTL and increasing the number of model runs. To overcome these barriers and establish accurate and comprehensive MST methods, this study proposed to: 1) explore the relationship between sensitivity and abundance of selected markers and clarify the causes of the differences among marker abundances; 2) enhance the understanding of cross-reaction between non-target samples and markers; 3) verify the influence mechanism of the intragroup variability among fecal microorganisms and the types of autochthonous taxa on library-dependent MST method.

**Key words:** microbial source tracking; marker; fecal taxon libraries; SourceTracker

随着人口的激增和畜牧养殖业的快速发展,我国地表水体受人和动物粪便污染的情况日益严重<sup>[1]</sup>.水体遭受粪便污染后,粪便中携带的致病微生物进入水体,会引起水源性疾病的爆发,对人类健康构成重大威胁<sup>[2-4]</sup>.另一方面,粪便中含有的氮、磷等物质进入水体中,会导致水体的富营养化,造成水质恶化<sup>[5-6]</sup>.

目前,大多数国家采用粪大肠菌群(*Fecal coliform*)或大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)等传统指示微生物(FIB)来反映水体微生物污染状况<sup>[7-9]</sup>,包括我国的《地表水环境质量标准》<sup>[10]</sup>(GB38382002)也一直采用粪大肠菌群作为评价水环境受微生物

污染的指标<sup>[11]</sup>.然而,FIB不能提供微生物污染宿主来源方面的相关信息<sup>[12-14]</sup>,无法帮助研究和管理人员准确识别污染来源以达到“精准治污”的目的<sup>[15]</sup>.此外,来自于不同宿主粪便中的致病微生物对于人体的致病机理和致病程度也有较大差异,因此识别粪便排放来源也有助于准确评估人类接触水体后的患病风险.

收稿日期: 2020-11-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2020A1515011109);广州市科技计划项目(202002030377)

\* 责任作者, 研究员, wurenren@scies.org

微生物污染源解析技术(MST)是一种通过检测水体中特异性生物标记或特定微生物群落结构而识别粪便污染来源的新技术<sup>[16-17]</sup>.相比于 FIB,该方法不仅可以识别水体中的微生物污染来源,还能够有效预测部分潜在致病菌的水环境行为,可对健康风险评估提供更准确的信息<sup>[18]</sup>.目前,常用的 MST 主要有非库依赖法和库依赖法.非库依赖法主要以 PCR 技术为主,通过扩增特异性生物标记基因识别粪便污染的排放源,具有时效强、成本低等特点<sup>[19-20]</sup>.库依赖法则主要以高通量测序技术为基础,通过基于贝叶斯思想开发出的 SourceTracker 源解析程序<sup>[21]</sup>、最大化微生物源跟踪工具<sup>[22]</sup>和随机森林<sup>[23]</sup>等识别特定的微生物群落结构,提供污染源信息,具有通量高、微生物信息全面等优势<sup>[24-25]</sup>.然而,2 种源解析方法均有其特定的适用条件和缺陷.本文通过对前人的研究进行归纳、总结,阐明不同源解析方法存在的不足和使用条件,指出微生物污染源解析研究的最新发展方向,为建立准确、完善的微生物污染源解析技术提供帮助.

## 1 非库依赖法

### 1.1 qPCR-MST 基本原理

由于饮食结构和生存环境的差异,不同宿主肠道中的微生物种类、群落结构存在一定的区别,并且分类相同的指示微生物在不同宿主肠道中基因片段也有所不同.MST 正是利用这一基因上的差异,通过检测受污染水体中是否存在特异性生物标记,可以判断不同粪便污染来源<sup>[26]</sup>.目前,研究人员已针对反刍动物(牛、羊、鹿等)、哺乳动物(人、狗、马、猪、猫等)和禽类(海鸥、鸡、鸭、鸽子、雁等)等开发出了不同特异性标记物,并以 PCR 技术为基础,在世界各地成功识别出环境水样中来自各种动物的粪便污染<sup>[15,26-28]</sup>.例如,Bower 等<sup>[29]</sup>识别出美国密歇根湖地区水体中的粪便污染主要来自于人和牛.张杨等<sup>[11]</sup>在珠江三角洲地区识别出城市地表水中的微生物污染主要来自人、禽类和反刍动物粪便.

### 1.2 标记物检测-实时荧光定量 PCR(qPCR)

聚合酶链式反应(PCR)是一项体外扩增核酸片段的技术,具有简便易行、特异性强、灵敏度高等特点<sup>[30]</sup>.通过使用特异性引物对水样 DNA 进行 PCR 扩增,观察是否出现目标条带,即可判断水样受到何

种动物粪便污染<sup>[3]</sup>.但 PCR 技术只能定性并且易产生非特异性扩增.而实时荧光定量 PCR(qPCR)技术,通过在 PCR 反应中加入荧光基团进行实时监测,比 PCR 具有更高的特异性和灵敏度.还可以通过制备标准品构建标准曲线或加入内参基因的方法,确定每个反应的基因拷贝数,实现对污染物的定量分析<sup>[11]</sup>.并且从采样到分析全过程仅需几小时就能完成,成为标记物检测的首选方法.

### 1.3 特异性生物标记的适用性

特异性生物标记是针对不同宿主肠道微生物中特定的基因序列开发而来,具有宿主遗传性和特异性.然而,受不同地区的气候、饮食习惯及生活方式等差异性的影响,各地区宿主体内的肠道微生物种类和结构也不尽相同.例如,Lu 等在美国俄亥俄州对野鹅的粪便进行生物多样性分析时发现,芽孢杆菌占肠道菌的 30.2%,而在加拿大安大略省则为 46.3%<sup>[1,31]</sup>.不同地区宿主肠道微生物结构的变化也进一步导致了开发出的特异性标记物表现出显著的地区差异性.因此,在目标研究区域验证特异性标记物的特性表现,识别具有地区适用性标记物是开展微生物污染源解析工作的重要前提.

**1.3.1 定性灵敏度** 灵敏度是指标记物在目标粪便样本中的阳性率,计算公式  $R=TP/(TP+FN)$ ,其中 TP 是对目标样本扩增显示阳性的样本数;FN 是对目标样本扩增显示阴性的样本数<sup>[32]</sup>.标记物的灵敏度与其对粪便污染物的检出率息息相关,灵敏度越高,该标记物指示目标宿主粪便污染的性能越好.然而,不同地区标记物的灵敏度表现通常存在较大差异.例如,Schiaffino 等<sup>[33]</sup>在秘鲁识别出人源拟杆菌标记物 BacHum 灵敏度为 80%,具有较好的适用性.在泰国和尼泊尔部分地区 BacHum 灵敏度甚至高达 95%~100%<sup>[34]</sup>.然而在印度<sup>[35]</sup>和肯尼亚<sup>[36]</sup>BacHum 的灵敏度分别仅有 50%和 18%.导致这一现象的主要原因是拟杆菌的遗传变异以及各地区气候和生态压力不同<sup>[33,37]</sup>.

为克服传统 MST 标记物(如拟杆菌、线粒体标记物)存在的灵敏度低或对潜在致病菌指示性较差等缺点,研究人员针对人肠道中丰度较高的噬菌体 crAssphage 开发出了人源特异性标记物 CPQ\_056 和 CPQ\_064<sup>[38]</sup>.由于该类标记物是针对噬菌体的特异性基因开发而来,被认为与致病菌有近似的环境

行为,成为目前标记物验证工作的热点<sup>[39-40]</sup>。Stachler 等<sup>[41]</sup>在美国部分地区识别出 CPQ\_056 和 CPQ\_064 灵敏度高达 100%。然而,本实验室采用 crAssphage 标记物对在我国 28 个城市采集的粪便样品进行检测时,CPQ\_056 和 CPQ\_064 灵敏度表现较差分别为 61%(71/117)和 67%(78/117)<sup>[15]</sup>。Ahmed 等<sup>[26]</sup>在澳大利亚的研究中 CPQ\_056 灵敏度也仅有 38%。导致这一结果的原因可能是 crAssphage 在不同地区人类肠道中的分布特征具有一定的差异性。已有研究报道欧洲和美国地区受粪便污染的水体中 crAssphage 的丰度显著高于亚洲和非洲<sup>[42-43]</sup>。说明尽管 crAssphage 广泛存在于世界各地人类肠道中,但其丰度也具有明显的地区差异性。此外,宿主年龄、健康或其它因素均会改变粪便中 crAssphage 的分布特征<sup>[44-46]</sup>,从而影响 qPCR 检测结果<sup>[15,46]</sup>。因此,在大尺度目标区域内开发出灵敏度表现稳定的标记物仍是目前 MST 技术需要进一步解决的难题。

**1.3.2 源强特征** 如果标记物仅具有较高的定性灵敏度,而源强特征(即标记物在目标物种中的检出浓度分布特征)较差,则当微生物污染源被稀释或是样本处理过程中 DNA 浓度损失时,可能会导致检测的标记物浓度低估水体污染水平,甚至无法检出水样中的粪便污染<sup>[15,26]</sup>。因此,近年来部分研究人员在开展标记物验证时,除识别标记物的定性灵敏度外,进一步探究了标记物的源强特征。

研究表明,不同源指示微生物在目标宿主肠道内的丰度会影响标记物的检出浓度。Zhang 等<sup>[15]</sup>的研究发现人源拟杆菌标记物 HF183、BacHum 和 BacH 在人粪样本中的检出浓度比假定蛋白 BF3236 标记物 Hum163 和 Hum2 以及 crAssphage 标记物 CPQ\_064 和 CPQ\_056 检出浓度高 1~2 个数量级。导致这一现象的原因可能是在大部分哺乳动物肠道中,拟杆菌的相对丰度高于其它种类的肠道微生物<sup>[47-48]</sup>。此外,相同源指示微生物种类在不同宿主之间的分布差异也对标记物的检出浓度有显著影响。例如,Reischer 等<sup>[49]</sup>在世界六大洲针对拟杆菌标记物适用性开展的研究发现,用于指示反刍动物粪便污染的拟杆菌标记物 BoBac、BacR 以及 BacCow 的检出浓度均高出人源拟杆菌标记物 BacH 和 BacHum 1~2 个数量级,且浓度分布的离散程度更低,说明反刍动物标记物具有较好的源强特征,这与

Zhang 等<sup>[15]</sup>在我国调查的拟杆菌标记物源强特征的结果一致。这可能是反刍动物肠道中的拟杆菌丰度要高于人类所致。Hong 等<sup>[50]</sup>在分析哺乳动物肠道菌群时发现,反刍动物和猪肠道内拟杆菌相对丰度普遍高于人类,同时大部分拟杆菌属如 *Bacteroides caccae*、*Bacteroides uniformis*、*Bacteroides vulgatus* 和 *Bacteroides fragilis* 等在牛和猪肠道微生物群落结构中的丰度表现也更为稳定。由此可见,源指示微生物在宿主肠道中的分布特征与特异性标记物的源强特征具有极强的关联性,在标记物的开发、设计阶段,应充分考虑源指示微生物的分布及稳定性等情况,以提高源解析结果的准确性。

**1.3.3 交叉反应(假阳性反应)** 特异性是评价标记物的另一重要指标,是指标记物在非目标粪便样本中的阴性率,计算公式  $S = TN / (TN + FP)$ ,其中 TN 是对非目标样本扩增显示阴性的样品数;FP 是对非目标样本扩增显示阳性的样品数<sup>[32]</sup>。一个高度宿主特异性的标记物可以准确识别粪便污染的来源。迄今为止,尚未发现一种标记物可对其宿主表现出绝对的特异性<sup>[15]</sup>。在非目标样品中发生的交叉反应是导致标记物特异性降低的主要原因<sup>[51]</sup>,例如 Malla 等<sup>[34]</sup>发现人源特异性标记物 crAssphage 与狗、鸭、鸡、猪产生较高比例的假阳性反应,导致其特异性下降至 63%。目前,关于标记物与非目标动物产生交叉反应的机理尚不明确,部分研究推测不同动物在特定环境中存在的共居关系可能会导致含有标记基因的微生物在肠道内短暂定殖,进而使得标记物产生假阳性结果。例如,Nshimiyimana 等<sup>[52]</sup>在新加坡的研究发现人源特异性标记物 HF183 中来自兔子粪便的假阳性信号比例较高,而该地区兔子是常见的宠物。同时,相似的饮食也会引起标记物与非目标宿主产生交叉反应<sup>[33,39,53]</sup>。如在本文前期研究中,马和驴与反刍动物标记物 Rum-2-Bac、Bac708、BacCow 产生较高水平的交叉反应<sup>[15]</sup>,进一步分析可能是因为马、驴和反刍动物饮食均以草料为主,其肠道微生物具有同源性或相似性<sup>[54]</sup>。

尽管标记物均会产生假阳性扩增,但大多数标记物仅与部分非目标动物产生交叉反应,且不同标记物产生的交叉反应动物也不尽相同,这为有效排除假阳性反应,准确识别微生物污染来源提供了可能。已有诸多研究报道,标记物与粪便样品的交叉反

应可以通过同时检测两个或多个标记物来解决<sup>[15,26]</sup>。例如,本文前期研究表明,Hum2 在驴粪样品中存在的交叉反应可以通过使用人源标记物 CPQ\_056 进行识别,并且 CPQ\_056 在狗和鸭粪样本中的假阳性扩增也可用 Hum2 识别<sup>[15]</sup>。Ahmed 等<sup>[26]</sup>也发现 HF183 在鸡、鹌鹑和考拉粪便中的假阳性扩增可以用 crAssphage 标记物 CPQ\_056 来识别。

**1.3.4 假阳性信号强度** 尽管标记物对非目标宿主粪便样品产生的假阳性扩增给微生物污染源解析的应用带来了一个重大挑战,但大多数假阳性信号强度显著低于标记物的源强特征。例如,Reishcer 等在 16 个国家开展评估人和反刍动物拟杆菌标记物表现时,发现 BacH、BacHum、BacCow、BacR 和 BoBac 的源强特征较假阳性信号强度高出 2~4 个数量级<sup>[49]</sup>。Ahmed 等<sup>[26]</sup>的研究也发现标记物 CPQ\_056、HF183 和 Lachno3 的源强特征比假阳性信号强度高 1~5 个数量级。因此,通过稀释样品、纯化 DNA 等方法,可以将标记物的假阳性信号降低至检测限以下,从而准确识别粪便污染源<sup>[55-56]</sup>。例如,Hundesa 等<sup>[7]</sup>和 Li 等<sup>[57]</sup>在进行微生物污染源解析工作时,通过稀释 DNA,降低了假阳性信号水平,准确识别出目标区域的猪源粪便污染。值得注意的是,部分非目标动物与标记物产生的假阳性信号强度可能与目标动物中的检出浓度位于同一数量级。此类假阳性信号可能无法通过实验手段予以排除<sup>[15]</sup>。在开展微生物污染源解析工作时,应注意筛选出对标记物产生假阳性信号强度较高的物种,通过标记物组合的方式对其进行识别,甚至避免使用此类标记物。然而,盲目增加标记物个数,会导致组合中存在冗余的标记物,增加监测成本。因此,建立不同标记物组合的工具箱(toolbox)对于准确识别污染源具有重大意义。基于此,Ballesté 等<sup>[58]</sup>和 Blanch 等<sup>[59]</sup>研究了影响标记物组合的因素。Ballesté 等考虑了标记物衰减对 MST 结果的影响,发现当水样老化和稀释后,标记物的源强特征降低,而难以识别污染源<sup>[58]</sup>。Blanch 等人提出,如果标记物在环境中具有相似的衰减规律,则此类标记物组合能较好地识别环境水体中粪便污染,适合建立“toolbox”,在检测被稀释或混合样品时也具有优势<sup>[59]</sup>。然而根据本文目前正在开展的研究结果,使用具有不同衰减趋势的标记物,建立“toolbox”可以帮助研究人员获得粪便污染的更多

背景信息,包括定性和定量信息。如拟杆菌标记物 BacHum 具有较高的灵敏度,crAssphage 标记物 CPQ\_056 衰减速率较小,同时使用 BacHum 和 CPQ\_056 可以帮助识别不同时期(近期和远期)甚至是远离监测点的污染源。

本文前期研究识别出部分适用于我国的标记物(见表 1)<sup>[15]</sup>,并成功识别出龙江流域人源污染>反刍动物(牛)>猪和禽类。从表 1 可以看出标记物的灵敏度和特异性呈现一定负相关关系,较难同时满足灵敏度、特异性>80%。根据美国国家环境保护局(US EPA)建议,表现好的标记物灵敏度和特异性应大于 80%<sup>[26,60]</sup>。同时,在同一宿主中不同种类标记物的源强特征差异较大,这在以往的研究中容易被忽略,而这为选取何种标记物作为评价污染源贡献率和潜在的健康风险水平提出了重大挑战。例如,在开展微生物定量风险评估以 USEPA 感染胃肠道疾病的风险阈值(30/1000)为标准时,拟杆菌标记物 HF183 浓度为 4100GC/100mL<sup>[61]</sup>,而 crAssphage 标记物 CPQ\_056 浓度为 9100GC/100mL<sup>[62]</sup>。未来应进一步探索致病菌的分布特征和传统水质指标与各类标记物检出浓度的内在关系,以期对相关水质指标的制定以及人类健康风险的评估提供关键信息。

## 2 库依赖法

高通量测序(HTS)又叫下一代测序或深度测序,可一次对几十万到几百万条核酸分子同时进行序列测定。大量序列数据的产生,让研究人员能更深入地挖掘基因组信息,扩展到以前难以深入的领域,极大地促进了人们对肠道微生物多样性的理解,也使得研究人员可通过分析微生物群落的结构特征来识别微生物污染的来源<sup>[63-66]</sup>。库依赖法的基本原理是通过对不同来源动物粪便 16S rRNA 基因进行高通量测序<sup>[67-71]</sup>,然后构建粪便源解析文库(FTL),并通过开发出的机器学习方法与水样中的微生物群落进行对比,最终识别出微生物污染来源及相对贡献量。目前,已开发出的机器学习方法有 SourceTracker、最大化微生物源跟踪工具(FEAST)、随机森林(Random Forest)等<sup>[21-23]</sup>,SourceTracker 因具有准确性好,灵敏度高和特异性强等优势得到了较为广泛的应用<sup>[6]</sup>。因此,本文主要对采用 SourceTracker 开展源解析的方法进行论述。

表 1 不同标记物表现  
Table 1 Different marker performance in China

源指示微生物	标记物	污染源	灵敏度(%)	特异性(%)	浓度(Log <sub>10</sub> GC/g)
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	BacH		98	51	5.19±2.11
<i>Bacteroidales</i>	BacHum		82	55	4.82±1.81
<i>Bacteroides dorei</i>	HF183		74	70	5.07±1.44
Hypothetical protein BF3236	Hum2	人源	59	87	3.61±0.77
	Hum163		66	84	3.49±1.26
crAssphage	CPQ_056		61	86	4.17±1.25
	CPQ_064		67	89	4.15±1.26
Pig-specific <i>Bacteroidales</i>	Pig-1-Bac		100	68	6.29±1.26
	Pig-2-Bac	猪源	95	88	6.58±1.59
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	L.amylovorus		68	72	4.99±1.79
Mitochondrial DNA NADH 5gene	P.ND5		95	90	6.10±0.96
Ruminant-specific <i>Bacteroidales</i>	Rum-2-Bac		96	69	6.38±1.28
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Bac708	反刍动物	100	50	6.19±1.26
<i>Cow Bacteroidales</i>	BacCow		100	77	7.15±0.89
Unclassified <i>Helicobacter spp.</i>	GFD	禽类	68	91	4.09±0.96

注:Log<sub>10</sub>GC/g为标记物在动物样本中的浓度.

## 2.1 SourceTracker

通过对不同宿主粪便以及环境水样 16S rRNA 基因进行高通量测序,SourceTracker 源解析程序将不同粪便来源微生物群落和待分析的水体微生物群落当做一个整体,基于贝叶斯算法,识别水样中不同宿主来源微生物所占比例,解析水样粪便污染来源<sup>[21]</sup>.目前,研究人员已在不同区域应用此方法识别出了水环境中不同粪便污染来源及其贡献率<sup>[71-72]</sup>.例如,Brown 等<sup>[73]</sup>使用 SourceTracker 成功识别出苏必利尔湖河口粪便污染主要来自污水处理厂排放的废水(70%)和海鸥粪便(30%),与 qPCR 方法所得结果一致<sup>[74-75]</sup>.为了进一步评估 SourceTracker 解析污染源的能力,Staley 等<sup>[76]</sup>将 5 种来源粪便以不同比例添加到淡水中,发现其识别粪便污染准确性高达 91%;即使在较低浓度下也未出现假阴性结果,其特异性超过现有大部分 MST 标记物.此外,有研究表明库依赖法源解析结果的准确性与 SourceTracker 运行参数设置存在一定的内在联系<sup>[77-78]</sup>.Brown 等<sup>[73]</sup>在解析苏必利尔湖河口的污染源时,发现多次运行 SourceTracker 所得相对标准偏差(RSD)与预测结果呈负相关关系,污水处理厂排放废水的粪便污染比例为 68.3%,其 RSD 为 2.48%;而鹅粪便污染比例为 6.1%,RSD 达 20.71%.Henry 等<sup>[79]</sup>评估近海岸粪便污染时观察到类似的现象,当人源污染比例为 10%时,RSD 为 8%;而人源污染比例为 0.1%时,RSD 高达 55%,其预测准确性较低.因此,可以通过增加

SourceTracker 的运行次数,利用 RSD 值排除假阳性结果(RSD>100%)<sup>[80]</sup>,以获取更为准确的污染源信息<sup>[81]</sup>.此外,Henry 等<sup>[79]</sup>研究了抽平深度、burn-in 次数、dirichlet 超参数  $\alpha$  和  $\beta$  对 SourceTracker 预测的灵敏度和准确性影响;发现随着 SourceTracker 抽平深度从 1000 增加到 50000,检测灵敏度可以从 90%增加到 100%, $\alpha$  和  $\beta$  值的改变也提高了 SourceTracker 预测的灵敏度和准确性,而 burn-in 次数对结果影响较小.可见,SourceTracker 运行参数显著影响源解析结果,而目前相关研究较少,尚未确定 SourceTracker 运行最优参数.综上所述,SourceTracker 为识别不同污染源提供了便利,但仍需对程序运行参数进行优化,使预测结果更加准确.

## 2.2 粪便源解析文库(FTL)

### 2.2.1 宿主种类对 FTL 的影响

库依赖法解析污染源的准确性与粪便源解析文库息息相关.由于不同区域、不同宿主之间粪源微生物结构的变异性有较大差异,使用 SourceTracker 解析污染源时,必须考虑 FTL 的不同组成.Brown 等<sup>[82]</sup>在使用 SourceTracker 分析已知污染源(牛粪和污水)的水样时,发现当 FTL 中纳入过多的宿主类型(海狸、猫、鸡、牛、鹿、狗、鹅、鸥、马、兔子、猪、火鸡、污水)时,预测结果出现了禽类和马的假阳性结果,而禽类和马粪污染在目标研究区域内实际是不存在的.与此相对,当 FTL 中仅纳入牛、马和污水样本时,虽然禽类污染的假阳性结果消失,但马粪污染的

假阳性结果仍然存在.由此可见,FTL 中涵盖宿主种类过多或过少均会影响 SourceTracker 源解析结果.另一方面,解析目标研究区域的污染源时,能否采用其它地区粪便样本建立 FTL 也是研究者关注的重点.例如,Staley 等<sup>[76]</sup>发现,使用非目标区域采集的粪便样本构建 FTL 时,难以准确识别区域内水环境中的粪便污染来源,转而使用目标区域内的粪便样本构建 FTL 后,运用 SourceTracker 模型则能够准确将不同的污染源准确区分开来.因此在使用 SourceTracker 解析污染源时,对目标区域潜在粪便来源调查以构建合适 FTL 对于准确识别污染源至关重要.此外,还有研究发现不同时期收集的粪便样本构建的 FTL 可能对源解析结果也具有一定影响.O'Dea 等<sup>[6]</sup>在探究 FTL 的变异性时发现,两次收集的粪便样本微生物群落相似性最大仅为 15%,主要原因是宿主肠道微生物群落可能受到气候变化的影响,同种类宿主在不同时期表现出的粪源微生物群落结构差异较大.综上所述,FTL 也具有“地区适用性”,在目标区域解析污染源时,应考虑粪源微生物群落组成的地理以及种间变异性,定期更新 FTL 以保证源解析结果的准确性.

**2.2.2 样本量对 FTL 的影响** FTL 构建使用每个粪便来源共同的 OTU,高种内变异性可能会使

SourceTracker 难以识别污染源,因此每类宿主应纳入的个体数量成为困扰建库源解析法准确性的重要因素.已有部分研究尝试通过权重分析来确定源文库中各宿主应囊括的样本量,以保证源解析结果的准确性<sup>[83]</sup>.例如,Brown 等<sup>[82]</sup>在使用 SourceTracker 解析苏必利尔湖河口的污染源时,用权重分析确定了使 FTL 中具有统计意义的样本数,发现当每类宿主的样本量小于 12 时,权重在 31%以下,而样本量大于 12 时,权重达到了 100%,能够准确识别各污染源.Staley 等<sup>[76]</sup>的研究表明,即使 FTL 中仅包含 10 个样本,采用 SourceTracker 仍然能够准确识别盲样中的粪便污染来源.甚至有研究人员仅采用了 2 个样本即可建立 FTL,并准确识别水体中的污染来源<sup>[84]</sup>.值得注意的是,除了权重分析,部分研究还通过 RSD 来评估宿主样本量大小对源解析结果的影响.当 FTL 中样本量较小时,SourceTracker 解析污染源的准确性相对较低.例如,当蝙蝠、人、牛和兔子样本数量分别为 8、2、3 和 4 时,SourceTracker 预测结果的相对标准偏差高达 68%,运行结果难以真实地反映出水体中污染物的宿主来源<sup>[79]</sup>.由此可见,未来仍需加强对 FTL 最适样本量的研究,在保证源解析结果的同时避免资源的浪费.

### 2.3 土著微生物对库依赖法源解析结果影响

表 2 2 种源解析方法对比

Table 2 Comparison of two MST methods

项目	qPCR-MST	HTS-MST
原理	基于 PCR 技术,通过检测受污染水体中是否存在特异性生物标记,解析不同污染来源.	基于高通量测序技术,通过比较不同粪便来源微生物群落和待分析的水体微生物群落,识别水样中不同粪便来源及其比例.
应用条件	需要针对不同宿主动物开发标记物.	对样本进行高通量测序.
优点	实验操作简单、时效强、成本低;无需建库;能对被测样品进行正确的定性和准确的定量分析.	从微生物群落角度,全面解析污染源,识别各污染源所占比例;可排除由于标记物特异性较差而产生的假阳性结果.
缺点	标记物存在地区适用性问题,开展目标区域源解析工作时需先验证标记物性能;不能成功鉴别出所有动物粪便污染.	测序数据庞大,SourceTracker 分析所需时间较长;FTL 组成影响源解析结果,目前尚无构建 FTL 的规范.

水环境中的土著微生物对维持生态平衡,修复和改善水质状况起到重要作用,但同时也给建库源解析方法的应用带来较多的不确定性.已有研究表明,源文库中与土著微生物分类较为接近的物种可能会导致难以准确区分微生物污染来源<sup>[85]</sup>.例如,在 Brown 等<sup>[73]</sup>的研究中,由于海鸥和鹅的粪源微生物群落与研究区域水体中的部分土著微生物分类较为接近,导致源解析结果中出现了海鸥和鹅等动物

的假阳性信号.Brown 等<sup>[82]</sup>在验证源文库的有效性时也发现由于污水中存在接近 40%的微生物种类与湖水中的土著微生物较为接近,导致源解析结果的准确性显著降低.此外,土著微生物与水体中粪源微生物存在的相互作用也可能显著干扰建库源解析法的准确性.Byappanahalli 等<sup>[86]</sup>在探讨土著微生物与粪源微生物的共存关系时发现,在土著微生物的抑制作用下,粪源微生物繁殖数量减少了 1~2 个

数量级,这显著影响粪源微生物与源文库的对应关系。相反,部分肠道微生物也可能在环境中与土著微生物产生共生效应,进而导致源解析结果中包含部分假阴性结果。目前,关于环境中生物因素对于测序源解析方法的影响研究较少,未来应加强土著微生物与源文库中各类微生物相互作用机制的研究。

近年来,MST 在准确识别和量化环境中的粪便污染来源上取得了较大的进展,2种源解析方法均得到了广泛应用。基于 PCR 技术的库依赖法可以在较短时间内获得粪便污染信息,基于高通量测序的库依赖法可一次识别和量化多个污染源。总体而言,2种源解析方法有其各自的适用条件(表 2),在帮助管理和研究人员识别环境水体中的粪便污染上各有优势。

### 3 结论

非库依赖法识别污染源的性能与标记物表现相关,对地区适用性标记物的识别和评估应基于定性(即灵敏度和特异性)和定量(即源强特征)两方面的研究。在开展微生物溯源工作时,使用具有不同衰减规律的标记物,建立标记物组合“toolbox”有助于排除假阳性信号,提高污染源识别的准确性。库依赖法识别污染源的准确性受 SourceTracker 运行参数和 FTL 组成的影响。FTL 构建仍需考虑“地区适用性”,在通过权重分析确定 FTL 中应涵盖的宿主种类及个体数量的同时增加程序运行次数可显著提高 SourceTracker 识别污染源的能力。

### 4 展望

对于非库依赖法,大多数研究对标记物的适用性评价主要以定性灵敏度和特异性为主,而忽略了标记物的源强特征。此外,对导致标记物特异性下降的交叉反应产生的机理尚不明确,影响源解析结果的准确性。而建立不同标记物组合的“toolbox”可以提高识别污染源的能力,基于此本文课题组已构建模拟反应器探究不同标记物的衰减规律,以期“toolbox”建立提供理论依据。未来应加强对标记物源强特征产生差异的成因以及交叉反应产生机理方面的探索,为标记物的开发提供理论支撑。

对建库源解析方法而言,由于粪源微生物群落结构具有变异性,导致 FTL 表现出时间和空间上的

差异,进而影响源解析结果。因此,未来应加强种内和种间变异程度对建库源解析方法影响的研究,探究构建 FTL 时应涵盖的宿主种类、个体数量及 FTL 更新周期,提高识别粪便污染的能力。

环境中土著微生物的种类对于建库源解析方法影响较为显著,但由于土著微生物群落结构变化及地区差异性较大,使得关于土著微生物对建库源解析方法的影响规律认识还不够深入。基于此,本文课题组已对不同样本进行高通量测序,以期揭示不同粪源微生物群落结构的异同,区分粪源微生物与土著微生物的丰度及分布特征。未来应加强对土著微生物与粪源微生物竞争机制的研究,阐明 FTL 受土著微生物种类的影响机理,提高在土著微生物影响下 SourceTracker 识别污染源的能力。

### 参考文献:

- [1] 张 杨,吴仁人,张一敏,等.禽类特异性引物在珠江三角洲地区的适用性研究 [J]. 生态科学, 2018,37(3):85-90.  
Zhang Y, Wu R R, Zhang Y M, et al. Study on sensitivity and specificity of the poultry-specific primers for microbial source tracking in the Pearl River Delta region [J]. Ecological Science, 2018, 37(3):85-90.
- [2] 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 Y N, Wang Y W, Wei Y S, et al. Evolution and standard comparison of indicator microorganisms for different surface waters [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015,35(2):337-351.
- [3] 梁红霞,余志晟,刘如翎,等.基于拟杆菌 16S rRNA 基因进行微生物溯源的研究进展 [J]. 中国环境科学, 2018,38(11):238-247.  
Liang H X, Yu Z S, Liu R Y, et al. Research progress of microbial source tracking based on *Bacteroidales* 16S rRNA gene [J]. China Environmental Science, 2018,38(11):238-247.
- [4] Ahmed W, O'Dea C, Masters N, et al. Marker genes of fecal indicator bacteria and potential pathogens in animal feces in subtropical catchments [J]. Science of the Total Environment, 2019,656:1427-1435.
- [5] Harwood V J, Christopher S, Badgley B D, et al. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes [J]. Fems Microbiology Reviews, 2014,38(1):1-40.
- [6] O'Dea C, Zhang Q, Staley C, et al. Compositional and temporal stability of fecal taxon libraries for use with SourceTracker in sub-tropical catchments [J]. Water Research, 2019,165:114967.
- [7] Hundesa A, Motes C M D, Albinana-Gimenez N, et al. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment [J]. Journal of Virological Methods, 2009,158(1):130-135.
- [8] 吴仁人,汪 光,陆俊卿,等.美国水体微生物污染防治经验的探析与启示 [J]. 环境保护, 2015,43(9):57-59.

- Wu R R, Wang G, Lu J Q, et al. Analyses and revelations of water microbial pollution control of United States [J]. *Environmental Protection*, 2015,43(9):57-59.
- [9] Meays C L, 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.
- [10] GB 3838-2002 地表水环境质量标准 [S].  
GB 3838-2002 Environmental quality standards for surface water [S].
- [11] 张 杨,吴仁人,张一敏,等.珠三角河网地区粪便污染源解析 [J]. *中国环境科学*, 2017,37(9):3446-3454.  
Zhang Y, Wu R R, Zhang Y M, et al. Microbial source tracking of fecal contamination in the Pearl River Delta region [J]. *China Environmental Science*, 2017,37(9):3446-3454.
- [12] Liang L, Goh S G, Gin K Y H. Decay kinetics of microbial source tracking (MST) markers and human adenovirus under the effects of sunlight and salinity [J]. *Science of the Total Environment*, 2017,574:165-175.
- [13] 郭 萍,李红娜,李 峰.MST 与水环境生物源污染定量溯源 [J]. *农业环境科学学报*, 2016,35(2):205-211.  
Guo P, Li H N, Li F. Microbial source tracking (MST) and quantitative tracking of biological fecal contamination in water environment [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016,35(2):205-211.
- [14] Exum N G, Olorotegui M P, Yori P P, et al. Floors and toilets: association of floors and sanitation practices with fecal contamination in Peruvian Amazon Peri-urban households [J]. *Environmental Science and Technology*, 2016,50(14):7373-7381.
- [15] Zhang Y, Wu R R, Lin K R, et al. Performance of host-associated genetic markers for microbial source tracking in China [J]. *Water Research*, 2020,175:115670.
- [16] Fogarty L R, Voytek M A. 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.
- [17] Nguyen K H, Senay C, Young S, et al. Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions [J]. *Water Research*, 2018,144:424-434.
- [18] 张 杨,贾乐华,吴仁人,等.水体微生物污染指示菌在不同营养水平下的稳定性 [J]. *中国环境科学*, 2017,37(3):1130-1136.  
Zhang Y, Jia L H, Wu R R, et al. Stability analysis of microbial pollution indicators in water under different nutrient levels [J]. *China Environmental Science*, 2017,37(3):1130-1136.
- [19] Shanks O C, White K, Kely 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):1359-66.
- [20] Kongprajug A, Chyerochana N, Mongkolsuk S, et al. The effect of quantitative polymerase chain reaction data analysis using sample amplification efficiency on microbial source tracking assay performance and source attribution [J]. *Environmental Science and Technology*, 2020,54(13):8232-8244.
- [21] Knights D, Kuczynski J, Charlson E S, et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking [J]. *Nature Methods*, 2011,8(9):761-763.
- [22] Shenhav L, Thompson M, Joseph T A, et al. FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking [J]. *Nature Methods*, 2019,16(7):1-6.
- [23] Roguet, Adélaïde, Eren A M, et al. Fecal source identification using random forest [J]. *Microbiome*, 2018,6(1):185.
- [24] Sungwoo B, Juan P M, Kerry A K, et al. An examination of the microbial community and occurrence of potential human pathogens in rainwater harvested from different roofing materials [J]. *Water Research*, 2019,159:406-413.
- [25] Tatsuya U, Christopher S, Claïressa M B, et al. Fecal pollution: new trends and challenges in microbial source tracking using next-generation sequencing [J]. *Environmental Microbiology*, 2018,20(9):3132-3140.
- [26] Ahmed W, Gyawali P, Feng S, et al. Host-specificity and sensitivity of the established and novel sewage-associated marker genes in human and non-human fecal samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019,85(14).
- [27] 梁红霞,余志晟,刘如翎,等.分子标记物在禽类粪便污染溯源中的研究和应用进展 [J]. *生态学报*, 2021,(3):1-9.  
Liang H X, Yu Z S, Liu R Y, et al. Development and application of molecular markers on microbial source tracking for avian [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021,(3):1-9.
- [28] Liang H X, Yu Z S, Fabrice N, et al. A combination of mitochondrial DNA markers Ckmito and ND5-CD is recommended as the most reliable indicator for microbial source tracking to identify faecal pollution from poultry in China [J]. *Ecological Indicators*, 2020,115:106334.
- [29] Bower P A, Scopel C O, Jensen E T, et al. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005,71(12):8305-8313.
- [30] 张惟材,朱 力,王玉飞.实时荧光定量 PCR [M]. 北京:化学工业出版社, 2016.  
Zhang W C, Zhu L, Wang Y F. Real-time quantitative PCR [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016.
- [31] Lu J, Domingo, Santo J W, et al. Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009,75:5919-5926.
- [32] 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.
- [33] Schiaffino F, Pisanic N, Colston J M, et al. Validation of microbial source tracking markers for the attribution of fecal contamination in indoor-household environments of the Peruvian Amazon [J]. *Science of The Total Environment*, 2020,743:140531.
- [34] Somnark P, Chyerochana N, Mongkolsuk S, et al. Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds [J]. *Environmental Pollution*, 2018,236:100-110.
- [35] Odagiri M, Schriewer A, Hanley K, et al. Validation of *Bacteroidales*



- quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India [J]. *Science of the Total Environment*, 2015,502:462–470.
- [36] Jenkins M W, Tiwari S, Lorente M, et al. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays [J]. *Water Research*, 2009,43(19):4956–4966.
- [37] He X, Liu P, Zheng G, et al. Evaluation of five microbial and four mitochondrial DNA markers for tracking human and pig fecal pollution in freshwater [J]. *Scientific Reports*, 2016,6:35311.
- [38] Dutilh B E, Cassman N A, Mcnair K, et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes [J]. *Nature Communications*, 2014,5(1):4498–4498.
- [39] Malla B, Shrestha R G, Tandukar S, et al. Performance evaluation of human-specific viral markers and application of pepper mild mottle virus and crAssphage to environmental water samples as fecal pollution markers in the Kathmandu Valley, Nepal [J]. *Food and Environmental Virology*, 2019,11(3):274–287.
- [40] Stachler E, Akyon B, Carvalho N A, et al. Correlation of crAssphage qPCR markers with culturable and molecular indicators of human fecal pollution in an impacted urban watershed [J]. *Environmental Science and Technology*, 2018,52(13):7505–7512.
- [41] Stachler E, Kelty C A, Sivaganesan M, et al. Quantitative crAssphage PCR assays for human fecal pollution measurement [J]. *Environmental Science and Technology*, 2017,51(16):9146–9154.
- [42] Stachler E, Bibby K. Metagenomic evaluation of the highly abundant human gut bacteriophage crAssphage for source tracking of human fecal pollution [J]. *Environmental Science and Technology Letters*, 2014,1(10):405–409.
- [43] Karkman A, Pärnänen K, Larsson D, et al. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments [J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):80.
- [44] Liang Y Y, Zhang W, Tong Y G, et al. CrAssphage is not associated with diarrhoea and has high genetic diversity [J]. *Epidemiology and Infection*, 2016,144(16):3549–3553.
- [45] Cinek O, Mazankova K, Kramna L, et al. Quantitative crAssphage real-time PCR assay derived from data of multiple geographically distant populations [J]. *Journal of Medical Virology*, 2018,90(4):767–771.
- [46] Ahmed W, Payyappat S, Michele C, et al. Novel crAssphage marker genes ascertain sewage pollution in a recreational lake receiving urban stormwater runoff [J]. *Water Research*, 2018,145:769–778.
- [47] 王海鹰,贾乐华,吴仁人,等.特异性拟杆菌引物在珠江三角洲的适应性研究 [J]. *中国环境科学*, 2014,34(8):2118–2125.  
Wang H Y, Jia L H, Wu R R, et al. Study on sensitivity and specificity of the *Bacteroidales* biomarkers for microbial source tracking in the Pearl River [J]. *China Environmental Science*, 2014,34(8):2118–2125.
- [48] Ahmed W, Stewart J, Powell D, et al. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007,46(2):237–242.
- [49] Reischer G H, Ebdon J E, Bauer J M, et al. Performance characteristics of qPCR assays targeting human- and ruminant-associated *bacteroidetes* for microbial source tracking across sixteen countries on six continents [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013,47(15):8548–8556.
- [50] Hong P Y, Wu J H, Liu W T. A high-throughput and quantitative hierarchical oligonucleotide primer extension (HOPE)-based approach to identify sources of faecal contamination in water bodies [J]. *Environmental Microbiology*, 2009,11(7):1672–1681.
- [51] Elisenda B, Demeter K, Masterson B, et al. Implementation and integration of microbial source tracking in a river watershed monitoring plan [J]. *Science of the Total Environment*, 2020,736:139573.
- [52] Nshimiyimana J P, Cruz M C, Thompson R J, et al. *Bacteroidales* markers for microbial source tracking in Southeast Asia [J]. *Water Research*, 2017,118:239–248.
- [53] 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.
- [54] Stachler E, Akyon B, De Carvalho N A, et al. Correlation of crAssphage qPCR markers with culturable and molecular indicators of human fecal pollution in an impacted urban watershed [J]. *Environmental Science and Technology*, 2018,52(13):7505–7512.
- [55] Mayer R E, Reischer G H, Ixenmaier S K, et al. Global distribution of human-associated fecal genetic markers in reference samples from six continents [J]. *Environmental Science and Technology*, 2018,52(9):5076–5084.
- [56] Boehm A B, Werfhorst L C V D, 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.
- [57] Fan L H, Zhang X F, Zeng R X, et al. Verification of *Bacteroidales* 16S rRNA markers as a complementary tool for detecting swine fecal pollution in the Yangtze Delta [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020,90(4):59–66.
- [58] Elisenda B, Luis A, Belanche A H, et al. Improving the identification of the source of faecal pollution in water using a modelling approach: From multi-source to aged and diluted samples [J]. *Water Research*, 2019,171:115392.
- [59] 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]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006,72(9):5915–5926.
- [60] USEPA. Microbial source tracking guide document EPA/600/R-05/064 [Z]. Washington, DC, 2005.
- [61] Boehm A B, Graham K E, Jennings W C. Can we swim yet? Systematic review, meta-analysis, and risk assessment of aging sewage in surface waters [J]. *Environmental Science and Technology*, 2018,52(17):9634–9645.
- [62] Schoen M E, Boehm A B, Soller J, et al. Contamination scenario matters when using viral and bacterial human-associated genetic markers as indicators of a health risk in untreated sewage-impacted recreational waters [J]. *Environmental Science and Technology*, 2020,54(20):13101–13109.
- [63] Wong K, Fong T T, Bibby K, et al. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters [J]. *Environment International*, 2012,45:151–164.
- [64] Wang F H, Huang X Y, Chen Y Y, et al. Study on the effect of capsaicin on the intestinal flora through high-throughput sequencing

- [J]. ACS Omega, 2020,5(2):1246–1253.
- [65] Valenzano S, De Girolamo A, DeRosa M C, et al. Screening and identification of DNA aptamers to tyramine using in vitro selection and high-throughput sequencing [J]. ACS Combinatorial Science, 2016,18(6):302–313.
- [66] Tan B F, Charmaine N, Pierre N J, et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities [J]. Frontiers in Microbiology, 2015,6:1027.
- [67] Yang B, Wang Y, Qian P Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis [J]. BMC Bioinformatics, 2016,17:135.
- [68] David B, Avinash K, Warish A, et al. A community multi-omics approach towards the assessment of surface water quality in an urban river system [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017,14(3):303.
- [69] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences [J]. Nature Reviews Microbiology, 2014,12(9):635–645.
- [70] Walker A W, Martin J C, Paul S, et al. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice [J]. Microbiome, 2015,3(1).
- [71] Li L G, Huang Q, Yin X, et al. Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment — Challenges, progress, and prospects [J]. Water Research, 2020:116127.
- [72] 张冰, 吴林蔚, 文湘华. 全国城市污水处理厂中微生物群落的溯源分析 [J]. 环境科学, 2019,(8):3699–3705.
- Zhang B, Wu L W, Wen X H. Potential source environments for microbial communities in wastewater treatment plants (WWTPs) in China [J]. Environmental Science, 2019,(8):3699–3705.
- [73] Brown C M, Staley Cr, Wang P, et al. A high-throughput DNA-sequencing approach for determining sources of fecal bacteria in a lake Superior estuary [J]. Environmental Science and Technology, 2017,51(15):8263–8271.
- [74] Lapara T M, Burch T R, Mcnamara P J, et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor [J]. Environmental Science and Technology, 2011,45(22):9543–9549.
- [75] Eichmiller J J, Hicks R E, Sadowsky M J. Distribution of genetic markers of fecal pollution on a freshwater sandy shoreline in proximity to wastewater effluent. [J]. Environmental Science and Technology, 2013,47(7):3395–3402.
- [76] Staley C, Kaiser T, Lobos A, et al. Application of SourceTracker for accurate identification of fecal pollution in recreational freshwater: A double-blinded study [J]. Environmental Science and Technology, 2018,52(7):4207–4217.
- [77] Mathai P P, Staley C, Sadowsky M J. Sequence-enabled community-based microbial source tracking in surface waters using machine learning classification: A review [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020,177:106050.
- [78] Ahmed W, Staley C, Sadowsky M J, et al. Toolbox approaches using molecular markers and 16S rRNA gene amplicon data sets for identification of fecal pollution in surface water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015:7067–7077.
- [79] Henry R, Schang C, Coutts S, et al. Into the deep: Evaluation of SourceTracker for assessment of faecal contamination of coastal waters [J]. Water Research, 2016,93:242–253.
- [80] Mccarthy D T, Jovanovic D, Lintern A, et al. Source tracking using microbial community fingerprints: Method comparison with hydrodynamic modeling [J]. Water Research, 2017,109:253–265.
- [81] Li L G, Yin X, Tong Z. Tracking antibiotic resistance gene pollution from different sources using machine-learning classification [J]. Microbiome, 2018,6(1):93.
- [82] Brown C M, Mathai P P, Loesekann T, et al. Influence of library composition on SourceTracker predictions for community-based microbial source tracking [J]. Environmental Science and Technology, 2019,53(1):60–68.
- [83] La R P S, Paul B J, Elena D, et al. Hypothesis testing and power calculations for taxonomic-based human microbiome data [J]. Plos One, 2012,7(12):1–13.
- [84] Sun H, He X, Ye L, et al. Diversity, abundance, and possible sources of fecal bacteria in the Yangtze River [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017,101(5):2143–2152.
- [85] Unno T, Jang J, Han D, et al. Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watersheds [J]. Environmental Science and Technology, 2010,44(20):7777–7782.
- [86] Byappanahalli M N, Meredith B N, Korajkic A, et al. Enterococci in the environment. [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews Mmbr, 2012,76(4):685–706.

**致谢:** 感谢哈尔滨工业大学汪磊博士对本论文英文摘要以及表的英文表题的审阅和修订。

**作者简介:** 郑前兴(1997-),男,云南昭通人,昆明理工大学与生态环境部华南环境科学研究所联合培养研究生,主要从事环境微生物研究。