

DOI: 10.5846/stxb202003210633

梁红霞, 余志晟, 刘如钢, 张洪勋, 吴钢. 分子标记物在禽类粪便污染溯源中的研究及应用进展. 生态学报, 2021, 41(3): 1006-1014.

Liang H X, Yu Z S, Liu R Y, Zhang H X, Wu G. Development and application of molecular markers on microbial source tracking for avian. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(3): 1006-1014.

分子标记物在禽类粪便污染溯源中的研究及应用进展

梁红霞¹, 余志晟^{1,*}, 刘如钢¹, 张洪勋¹, 吴 钢²

¹ 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049

² 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 排入环境后的禽类粪便不仅会造成水体和土壤环境污染, 且其携带的致病菌对人类健康也存在潜在危害, 因此快速准确地识别并控制粪便污染源对环境保护和人类健康至关重要。微生物溯源 (Microbial source tracking, MST) 技术可以利用分子标记物识别人和不同动物的粪便污染, 从而有助于及时发现并控制粪便污染。鉴于禽类粪便对环境和人类健康的危害, 越来越多的禽类 MST 标记物被开发并用于禽类的粪便污染溯源研究。归纳总结了多种禽类 (如鸡、鸭、鸽子、海鸥、加拿大雁和沙丘鹤等) MST 分子标记物及其敏感性和特异性, 重点综述了禽类分子标记物的基因来源, 包括细菌 16S rRNA 基因、线粒体 DNA 和功能基因等。其中, 细菌 16S rRNA 基因在标记物设计中的应用最为广泛, 源指示菌主要包括厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌目 (*Bacteroidales*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和梭杆菌目 (*Fusobacteria*) 及其家族成员; 以 *cytb* 基因、ND5 基因、16S rRNA 基因和 ND2 基因等线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 为设计来源的禽类 MST 标记物在溯源研究中指示效果最好, 具有很大的应用潜能; 使用功能基因作为设计来源的禽类 MST 标记物种类较少, 且均表现出较低的敏感性, 但是将功能基因作为 MST 标记物的思路具有一定的参考价值。通过对多种禽类标记物指示效果的比较, 能为科研人员快速选择禽类标记物时提供一定的参考。此外, 还对禽类 MST 技术的现存问题进行了分析总结, 并对其在我国的发展进行了展望, 以期促进 MST 技术在我国环境质量监测领域中的发展和应用。

关键词: 微生物溯源; 粪便污染; 禽类标记物; 家禽和野鸟

Development and application of molecular markers on microbial source tracking for avian

LIANG Hongxia¹, YU Zhisheng^{1,*}, LIU Ruyin¹, ZHANG Hongxun¹, WU Gang²

¹ College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

² Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract: Feces from avian make a significant contribution to the contamination of water and soil environment and increase the human health risk due to the presence of various pathogens. Therefore, it is important to identify accurately and control efficiently the sources of fecal pollution for environmental protection and human health. Microbial source tracking (MST) technique based on molecular markers could identify the sources of fecal contamination from human or animals, which is helpful to distinguish and control the sources of fecal pollution in time. Due to the adverse effects of avian feces on the environment as well as human health, much more attention has been paid to develop the MST markers and applied to trace the avian fecal pollution. In this review, the sensitivity and specificity of molecular markers targeting avian such as chicken, duck, pigeon, seagull, Canada goose and sandhill crane were summarized. The gene sources for avian molecular markers, including bacterial 16S rRNA gene, mitochondrial DNA (mtDNA) and functional genes, were emphatically reviewed.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFC0503601)

收稿日期: 2020-03-21; **网络出版日期:** 2020-12-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yuzs@ucas.ac.cn

Among them, bacterial 16S rRNA gene was widely used to design MST markers for avian, and the source indicators mainly included *Firmicutes*, *Bacteroidales*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Fusobacteria*. However, mtDNA, such as *cytb* gene, ND5 gene, 16S rRNA gene and ND2 gene, exhibited the best performance characteristics and was considered as a promising tool to detect fecal contamination from avian. Interestingly, the avian MST markers developed from functional genes showed low sensitivity, but the idea of using functional genes to design MST markers was worthy of reference. The capability of avian MST markers to distinguish fecal contamination was analyzed and compared, which provided theoretical support for researchers with the rapid selection of poultry markers. In addition, the existing problems of MST technology in avian were also analyzed and summarized, and its development in China was prospected, aiming at providing a reference for the development and application of MST technology in the monitoring of environmental quality in China.

Key Words: microbial source tracking; fecal pollution; avian-associated markers; poultry and wild birds

近年来,家禽的出栏量和存栏量在我国所有畜禽中排第一位^[1],这导致了大量禽类粪便的产生。大量的禽类粪便排入环境水体中,造成水质的不断恶化^[2-4]。将家禽粪便作为肥料用于土地中的事件也屡有报道,这也会增加土壤污染的风险^[5]。而且,禽类粪便中携带的各种细菌和病毒也会威胁人类的身体健康^[6-7]。禽类粪便可能会对水体和土壤环境以及人类健康造成的不利影响,因此快速准确的识别粪便污染并及时控制污染源对于环境保护和人类健康至关重要。

传统的粪便污染指示菌,如大肠杆菌、肠球菌等在人和温血动物肠道微生物群落中为优势菌,因此常用于指示水质状况^[8]。但是,它们在水体污染溯源检测方面存在一定的局限性^[9]。比如,对宿主特异性低导致不能准确指示污染来源^[10-11],可以在体外繁殖而无法反映水体近期的污染情况等^[12-13]。为了准确判断粪便污染物的来源,研究人员利用人和动物胃肠道中的微生物设计出具有特异性的标记物以检测粪便污染的来源,并称之为微生物溯源技术(Microbial source tracking, MST)^[14-15]。微生物溯源标记物开发的基本前提为,(1)粪便源指示微生物在特定的宿主肠道内为优势菌且与宿主密切相关;(2)这些微生物存在宿主特异性序列且该序列可以设计为宿主粪便污染的标记物^[16]。另外,指示标记物在排放环境中的赋存周期、行为也是需要考

考虑的因素^[17]。为了快速准确地检测来自禽类粪便的污染以减少其对环境 and 人类健康的影响,针对不同禽类的粪便污染标记物已经被开发,包括家禽(如鸡(*Gallus gallus*)^[18]、鸭(*Aix sponsa*)^[5]和鸽子(*Columba livia*)^[19])和野鸟(如加拿大雁(*Branta canadensis*)^[20]、海鸥(*Larus canus*)^[3]和沙丘鹤(*Grus canadensis*)^[21]等)。但是,随着禽类标记物种类和数目的增加,研究人员难以快速准确地选择出指示效果最好的禽类标记物用于粪便污染的检测。本文在前人研究基础上,对禽类微生物溯源标记物的开发和研究进展进行归纳和总结,为禽类标记物的快速选择提供一定的理论支持,为禽类微生物溯源技术在我国的发展和应用提供参考。

1 禽类微生物溯源标记物的性能评价

目前,多种禽类标记物已经被设计用于检测来自家禽(如鸡、鸭和鸽子等)和野鸟(如海鸥、加拿大雁和沙丘鹤等)的粪便污染(表1)。禽类标记物可分为通用标记物和特异性标记物,通用标记物用于检测所有禽类的粪便污染,而特异性标记物用于特定禽类的检测。一般地,可使用敏感性(Sensitivity)和特异性(Specificity)来衡量标记物的指示效果^[14]。敏感性指标物在目标宿主粪便样品中的阳性率;特异性指标物在非目标宿主粪便样品中的阴性率。敏感性和特异性的数值越大,表明该标记物的指示效果越可信。敏感性和特异性的计算公式如下:

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\% \quad (2)$$

式中, TP (True positive) 指标记物显示阳性的目标宿主粪便样品的数量; FN (False negative) 指标记物显示阴性的目标宿主粪便样品的数量; TN (True negative) 指标记物显示阴性的非目标宿主粪便样品的数量; FP (False positive) 指标记物显示阳性的非目标宿主粪便样品的数量。

表 1 家禽和野鸟的微生物溯源标记物

Table 1 Poultry- and wild birds-associated markers for microbial source tracking

目标宿主 Target host	标记物 Markers	敏感性 Sensitivity	特异性 Specificity	目标序列来源 Source of target sequence
禽类通用标记物 Avian-associated markers	禽类 GFD ^[22] AV4143 ^[23] AV163 ^[23]	57 (238/415) 93 (90/97) 70 (68/97)	100 (218/218) 97 (101/104) 86 (89/104)	<i>Helicobacter</i> spp. <i>Lactobacillus</i> <i>Gallibacterium</i>
家禽标记物 Poultry-associated markers	鸡和鸭 Chicken/Duck-Bac ^[18] ND5-CD ^[24] <i>cytb</i> -CD ^[24] 鸡 Chicken-Bac ^[18] PLprobeBac ^[25] PLprobe ^[26] Ckmito ^[27] CL-TaqMan ^[28] LA35 ^[29] IVS-p ^[30] <i>cytb</i> -Chicken ^[31] CP2-9 ^[32] 鸭子 E2 ^[33] FSD ^[5] Duck-Bac ^[18] 鸽子 CytBmis ^[19]	80 (39/49) 100 (50/50) 100 (50/50) 70 (16/23) 73 (8/11) 100 (5/5) 100 12 (22/186) 73 (32/42) 76 (120/158) 50 (1/2) 40 (28/70) 76 (32/42) 43 (13/30) 85 (22/26) 100 (6/6)	100 (89/89) 85 (104/123) 89 (109/123) 92 (106/115) 100 (33/33) 100 (20/20) 100 100 (483/484) 93 (108/116) 100 (326/326) 94 (17/18) 100 (342/342) 95 (148/155) 100 (138/138) 96 (108/112) 96 (66/69)	<i>Bacteroides-Prevotella</i> Mitochondrial DNA Mitochondrial DNA <i>Bacteroides-Prevotella</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> sp. Mitochondrial DNA <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Faecalibacterium</i> Mitochondrial DNA <i>Bacteroides fragilis</i> An unknown bacterium (E2) <i>Faecalibacterium</i> <i>Bacteroides-Prevotella</i> Mitochondrial DNA
野鸟标记物 Wild birds-associated markers	海鸥 Gull-2 ^[3] Gull3 ^[34] Gull4 ^[34] Sketa ^[2] 加拿大雁 CGOF1-Bac ^[20] CGOF2-Bac ^[20] ND2-Goose ^[35] <i>Cytb</i> -Goose ^[31] 沙丘鹤 Crane1 ^[21]	71 (41/58) 28 (71/255) 87 (221/255) 81 (38/47) 57 (58/101) 51 (51/101) / 100 (2/2) 69 (66/96)	100 (300/300) 76 (326/429) 91 (390/429) 92 (101/110) 100 (291/291) 100 (291/291) 100 100 (18/18) 95 (528/553)	<i>Catellibacterium marimammalium</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Catellibacterium marimammalium</i> <i>Catellibacterium marimammalium</i> <i>Bacteroides</i> <i>Bacteroides</i> Mitochondrial DNA Mitochondrial DNA <i>Catellibacterium-like</i> spp.

2 禽类微生物溯源标记物的发展

禽类微生物溯源标记物的设计来源主要为细菌 16S rRNA 基因、线粒体 DNA 和功能基因等(图 1)。以细菌 16S rRNA 基因为设计来源的分子标记物具有广泛的应用,但有些禽类特别是野鸟会随季节的变化发生迁徙,其肠道微生物组成随宿主地理位置的变化而变化,使得设计出的标记物在不同区域的指示效果存在差别;线粒体 DNA 设计的禽类标记物多表现出高敏感性和高特异性的特征,且受宿主所在地理区域的影响较小,可广泛用于禽类的微生物溯源研究;尽管目前基于功能基因设计出的禽类标记物指示效果较差,但是使用功能基因设计禽类标记物的思路值得参考和借鉴。

2.1 细菌 16S rRNA 基因

在禽类微生物溯源研究中,最常使用的细菌是厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌目(*Bacteroidales*)及其家族成员,其次是放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和梭杆菌门(*Fusobacteria*)及其家族成员。此外,也有一些种属信息尚未确定的源指示菌的 16S rRNA 基因用于禽类分子标记物的开发,如 E2^[33]和 AV216^[23]等。

2.1.1 厚壁菌门及其家族成员

厚壁菌门及其家族成员在禽类的粪便样品中具有较高的相对丰度^[23, 36]。Ohad 等^[23]基于家禽和水鸟粪便样品的 16S rRNA 基因高通量测序数据,针对在门水平上相对丰度为 94%的厚壁菌设计出高特异性(99%)的禽类通用标记物 AV43;针对在科水平上相对丰度为 90%的乳酸杆菌(*Lactobacillus*)设计出敏感性和特异性分别为 93%和 97%的禽类通用标记物 AV4143。

Catellibacoccus marimammalius 属于肠球菌科(*Enterococcaceae*)。有研究表明 *C. marimammalius* 为海鸥粪便微生物群落中的优势菌,且在海鸥粪便中存在特异性序列^[3]。研究人员基于 *C. marimammalius* 16S rRNA 基因开发出的海鸥标记物 Gull2^[3]、Gull4^[34]和 Sketa^[2],其敏感性和特异性均分别在 71%和 91%以上。但是,利用同属于厚壁菌门的链球菌(*Streptococcus* spp.) 16S rRNA 基因设计出的海鸥标记物 Gull3,其敏感性仅为 28%^[34]。Green 等^[22]根据 *C. marimammalius* 16S rRNA 基因开发的禽类通用标记物 GFC,在 64%的海鸥粪便样品中检出,但在其他禽类样品中的阳性率均不足 5%。因此,*C. marimammalius* 16S rRNA 基因设计的标记物对海鸥表现出较高的宿主特异性,能够用于海鸥的微生物溯源研究中。

柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)属于瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)。因其严格厌氧,在体外不能繁殖且存活周期短的特点逐渐用于粪便污染研究中^[37]。Shen 等^[30]通过比较不同动物粪便中的柔嫩梭菌属 16S rRNA 基因,在鸡粪便中发现一段特异性序列,并据此设计出敏感性和特异性分别为 76%和 100%的鸡粪源标记物 IVS-p。另外,柔嫩梭菌属通用标记物和特异性标记物对鸡粪便污染的检测在我国珠江三角洲地区都得到了很好的验证^[37-38]。目前,美国政府机构已经把 *Faecalibacteriu* 检测方法纳入饮用水的辅助检测项目之中^[39],说明柔嫩梭菌属在水质监测中的应用正逐渐受到重视。

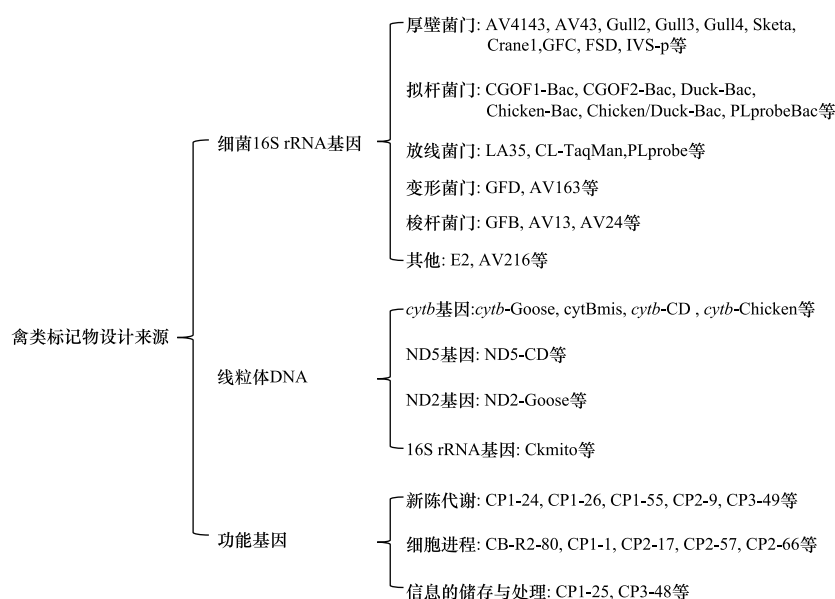


图1 禽类微生物溯源标记物的分类

Fig.1 Classification of avian markers for microbial source tracking

2.1.2 拟杆菌目及其家族成员

拟杆菌(*Bacteroides*)是人和温血动物粪便微生物中的优势菌,其 16S rRNA 基因经常被用于设计人、哺乳

动物和反刍动物的微生物溯源分子标记物^[14],也有研究者将拟杆菌用于鸡^[18]、鸭^[18]和加拿大雁^[20]等禽类微生物溯源研究中。但是,拟杆菌标记物在禽类微生物溯源研究中的指示效果一般,如在加拿大雁粪便样品中的敏感性低于 60%^[20],在鸡粪便中的检出率也低于 75%^[18, 25]。

拟杆菌在禽类粪便污染研究中指示效果差的原因可能如下,(1)拟杆菌在不同种类禽类的粪便微生物相对丰度差异较大,使得拟杆菌禽类通用标记物的设计很困难。Ohad 等^[23]发现拟杆菌在母鸡粪便细菌群落中的相对丰度为 9.56%,但在水鸟中仅为 0.1%;(2)拟杆菌在有些禽类肠道微生物群落并不是优势菌。有研究表明拟杆菌在部分禽类肠道和排泄物样品中几乎不存在,如水鸟^[23]和海鸥^[3]等。Nshimiyimana 等^[40]在新加坡的研究发现,通用拟杆菌标记物 BacUni 在人和哺乳动物粪便样品均有检出,但在鸟类粪便中均表现为阴性。总之,拟杆菌并不能准确地指示来自禽类的粪便污染。

2.1.3 放线菌门、变形菌门和梭杆菌门及其家族成员

短杆菌(*Brevibacterium*)属于放线菌门,短杆菌科(*Brevibacteriaceae*)。Lu 等^[41]发现短杆菌在鸡垫料中为优势菌,且该菌暂未在其他禽类,如海鸥^[41]、雪雁^[21]和沙丘鹤^[21]等粪便样品中发现。研究者利用短杆菌在鸡粪便中的 16S rRNA 特异性基因开发出鸡粪源标记物 CL-TaqMan^[28]和 LA35^[29]。Ryu 等^[28]使用鸡垫料和粪便样品对这两种标记物的指示效果进行测试,发现 LA35 和 CL-TaqMan 的敏感性在鸡粪便样品中均 $\leq 23\%$,但在鸡垫料样品中均 $\geq 98\%$ 。有研究报道鸡粪便和垫料样品的细菌群落结构存在差异^[41-42],短杆菌属在鸡垫料样品是相对丰度最高的菌属之一^[43],但在鸡的粪便和肠道样品中不存在或者少量存在^[44-45],这可能解释了 LA35 和 CL-TaqMan 在鸡垫料和粪便样品中的检出差异。总之,利用短杆菌属 16S rRNA 基因开发出的这两种标记物能够很好地指示鸡垫料的污染。

禽类通用标记物 AV163^[23]和 GFD^[22]分别由变形菌门分类下的卡氏杆菌属(*Gallibacterium*)和幽门螺旋杆菌属(*Helicobacter*) 16S rRNA 基因设计而来。其中,标记物 GFD 在中国、美国、新西兰和澳大利亚等多个国家进行过溯源研究^[22, 46-47],但该标记物在不同国家的指示效果有所不同。比如,在美国的粪便样品中显示 30%的敏感性^[47],而在中国显示 70%的敏感性^[46]。对于在不同区域敏感性表现不同的标记物,使用前应进行预实验以判断其在本地的适用性。

禽类通用标记物 GFB^[22]、AV13^[23]和 AV24^[23]均来自梭杆菌科(*Fusobacteriaceae*) 16S rRNA 基因。在引物设计者的研究中^[22-23],这 3 个标记物的特异性均为 100%,但是它们的敏感性均低于 10%,或许其所对应的基因序列在禽类粪便微生物中相对丰度较低。总之,这些标记物不适用于禽类的微生物溯源研究中。

2.2 线粒体 DNA

人类和动物肠道上皮细胞在肠道内脱落的过程中,肠道上皮细胞中的线粒体 DNA 会随肠道内容物以粪便的形式排出体外,所以人和动物粪便中均含有大量的线粒体 DNA^[48-49]。另外,线粒体 DNA 对宿主具有高度特异性^[50-51],因此其逐渐运用于粪便污染溯源研究中^[52-54]。2005 年, Martellini 等^[55]将线粒体 DNA 首次用于粪便污染微生物溯源中,实现了流域污染源的快速判断。

在禽类微生物溯源研究中,线粒体 DNA 的 *cytb* 基因常用于设计禽类标记物,其次是 ND5 基因、16S rRNA 基因和 ND2 基因(图 2)。Zhuang 等^[24]分别利用线粒体 ND5 和 *cytb* 基因开发出鸡和鸭粪便污染标记物,且设计出的标记物敏感性和特异性分别达到 100%和 $\geq 85\%$,表现出良好的指示效果。Kortbaoui 等^[27]使用巢式 PCR 技术对线粒体 16S rRNA 基因设计的鸡粪源标

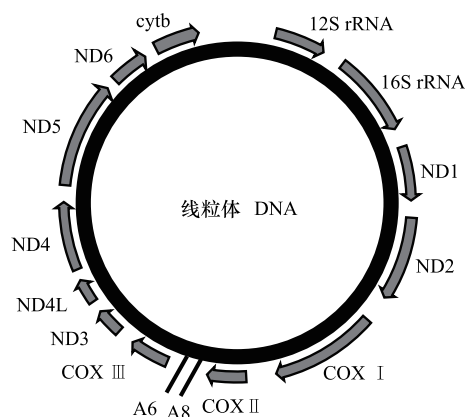


图 2 线粒体 DNA 的基本分子结构^[48]

Fig.2 The basic molecular structure of mitochondrial DNA^[48]

记物进行指示效果评估,结果表明该标记物的特异性和敏感性均达到 100%。

禽类特别是野鸟因季节性迁徙或觅食等因素,不会在同一区域长期停留。有研究表明饮食的改变和地理区域的差异会显著影响动物的肠道微生物群落组成^[56-57],禽类所处的高度多样性的环境可能会影响其肠道微生物组成,使得禽类微生物溯源标记物的发展存在一定困难。但是,许多研究表明线粒体 DNA 不易受宿主的饮食状况和所在地理区域的影响^[35, 50]。Liang 等^[58]使用中国 5 个不同区域的粪便样品对已有鸡源标记物进行系统评估后发现,以线粒体 DNA 为设计来源的鸡源标记物表现出最好的指示效果。本文归纳总结的标记物中(表 1),利用线粒体 DNA 开发出的禽类标记物大多表现出高敏感性和特异性,所以线粒体 DNA 比细菌 16S rRNA 基因更适用于禽类微生物溯源标记物的开发。

2.3 功能基因

有研究表明与细胞有关的功能基因是宿主特异性实验的良好标记物^[59],所以功能基因也能应用到粪便微生物溯源研究中。樊丽华等^[60]发现能够编码某些细菌表面蛋白、膜分泌蛋白及碳水化合物代谢蛋白的相关基因可作为猪特异性分子标记物设计的目标序列。

在禽类微生物溯源中,也有将功能基因作为特异性标记物的相关研究。Lu 等^[32]利用与细胞新陈代谢,细胞进程和信息的储存与处理等有关的基因设计禽类特异性标记物。比如,部分标记物对应的基因与新陈代谢有关,这些基因负责编码的细胞膜功能蛋白参与运输营养物质,包括碳水化合物(CP1-26)、无机离子(CP1-24 和 CP2-9)和氨基酸(CP1-55 和 CP3-49)等。Hamilton 等^[61]基于宏基因组数据开发出加拿大雁特异性标记物 GB2 和 GE11,这些标记物对应的基因负责编码粘附素细菌表面蛋白,该蛋白能够介导细菌对上皮细胞粘附、侵袭、细菌的自动聚集和生物膜的形成^[62],为细菌在宿主肠道内的定殖起关键作用。

已开发的功能基因标记物对宿主的敏感性普遍较低。Lu 等^[32]利用 21 种动物的粪便样品对功能基因标记物的性能进行测试。在测试的鸡粪源标记物中,效果最好的标记物为 CP2-9,其敏感性仅为 40%。Hamilton 等^[61]使用 135 份加拿大雁样品对标记物的敏感性测试,结果表明其敏感性均在 20.7%到 48.1%之间。虽然这些禽类功能基因标记物的敏感性较低,但是将功能基因设计为禽类标记物的研究思路具有很大的参考价值。

3 总结与展望

近年来,禽类微生物溯源的研究已经取得了很大的进展,针对家禽(如鸡、鸭和鸽子)和野鸟(如海鸥、加拿大雁和沙丘鹤)均设计出了相应的标记物。部分细菌 16S rRNA 基因标记物表现良好,如禽类标记物 AV4143^[23]和海鸥标记物 Sketa^[2]等;线粒体 DNA 不受宿主饮食和地理环境的影响,其对应的标记物大都表现出较高的敏感性和特异性,可重点用于禽类标记物的开发;利用功能基因进行标记物的设计也为禽类微生物溯源研究提供了新思路。

但是,禽类微生物溯源仍然面临较大的挑战。(1)许多禽类标记物并不是在我国发展而来,这些标记物在我国的指示效果并不可知,因此需要将现有禽类标记物在我国进行系统的比较以选择指示效果较好的标记物。(2)现有禽类标记物多表现为敏感性较低,所以应设计更多禽类标记物以准确检测禽类粪便污染。(3)现有溯源技术手段多表现为低通量,可将高通量数据溯源分析平台(如 SourceTracker^[63]和 FEAST^[64]等)应用到禽类粪便污染检测中。

致谢:中国科学院大学王波波博士帮助写作,特此致谢。

参考文献(References):

- [1] 中国畜牧兽医年鉴编辑委员会.《中国畜牧兽医年鉴》.北京:中国农业出版社,2016:155-159.
- [2] Lee C, Marion J W, Lee J. Development and application of a quantitative PCR assay targeting *Catellibacoccus marimammali* for assessing gull-associated fecal contamination at Lake Erie beaches. *Science of the Total Environment*, 2013, 454-455: 1-8.
- [3] Lu J R, Santo Domingo J W, Lamendella R, Edge T, Hill S. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Applied and*

- Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 3969-3976.
- [4] 魏源送, 郑嘉嘉, 王光宇, 张玉秀, 王亚伟. 地表水微生物溯源技术的开发和应用进展. 水资源保护, 2016, 32(1): 1-11.
- [5] Sun D, Duan C R, Shang Y N, Ma Y X, Tan L L, Zhai J, Gao X, Guo J S, Wang G X. Application of *Faecalibacterium* 16S rDNA genetic marker for accurate identification of duck faeces. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(8): 7639-7647.
- [6] Sándor A D, Mărcutan D I, D'Amico G, Gherman C M, Dumitrache M O, Mihalca A D. Do the ticks of birds at an important migratory hotspot reflect the seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* at the migration initiation site? A case study in the danube delta. PLoS One, 2014, 9(2): e89378.
- [7] 赵娜, 林威鹏, 蔡昆争, 王建武. 家畜粪便堆肥对番茄青枯病、土壤酶活性及土壤微生物功能多样性的影响. 生态学报, 2010, 30(19): 5327-5337.
- [8] Thoe W, Lee O H K, Leung K F, Lee T, Ashbolt N J, Yang R R, Chui S H K. Twenty five years of beach monitoring in Hong Kong: a re-examination of the beach water quality classification scheme from a comparative and global perspective. Marine Pollution Bulletin, 2018, 131: 793-803.
- [9] Evans A E, Mateo-Sagasta J, Qadir M, Boelee E, Ippolito A. Agricultural water pollution: key knowledge gaps and research needs. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2019, 36: 20-27.
- [10] Gordon D M. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. Microbiology, 2001, 147(Pt 5): 1079-1085.
- [11] Field K G, Bernhard A E, Brodeur T J. Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection. Environmental Monitoring and Assessment, 2003, 81(1/3): 313-326.
- [12] Mathai P P, Dunn H M, Magnone P, Zhang Q, Ishii S, Chun C L, Sadowsky M J. Association between submerged aquatic vegetation and elevated levels of *Escherichia coli* and potential bacterial pathogens in freshwater lakes. Science of the Total Environment, 2019, 657: 319-324.
- [13] Field K G, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Research, 2007, 41(16): 3517-3538.
- [14] Kildare B J, Leutenegger C M, McSwain B S, Bambic D G, Rajal V B, Wuertz S. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach. Water Research, 2007, 41(16): 3701-3715.
- [15] 梁红霞, 余志晟, 刘如钢, 张洪勋, 吴钢. 基于拟杆菌 16S rRNA 基因进行微生物溯源的研究进展. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4236-4245.
- [16] 卢杰, 邢美燕, 马小杰, 邢丽波. 基于现代分子生物学法追溯水体中粪便污染源. 环境科学与技术, 2018, 41(9): 176-182.
- [17] Brooks Y M, Spirito C M, Bae J S, Hong A N, Mosier E M, Sausele D J, Fernandez-Baca C P, Epstein J L, Shapley D J, Goodman L B, Anderson R R, Glaser A L, Richardson R E. Fecal indicator bacteria, fecal source tracking markers, and pathogens detected in two Hudson River tributaries. Water Research, 2020, 171: 115342.
- [18] Kobayashi A, Sano D, Hatori J, Ishii S, Okabe S. Chicken- and duck-associated *Bacteroides-Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(16): 7427-7437.
- [19] Waso M, Khan S, Khan W. Development and small-scale validation of a novel pigeon-associated mitochondrial DNA source tracking marker for the detection of fecal contamination in harvested rainwater. Science of the Total Environment, 2018, 615: 99-106.
- [20] Fremaux B, Boa T, Yost C K. Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4886-4889.
- [21] Ryu H, Lu J R, Vogel J, Elk M, Chávez-Ramírez F, Ashbolt N, Domingo J S. Development and evaluation of a quantitative PCR assay targeting Sandhill Crane (*Grus canadensis*) fecal pollution. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4338-4345.
- [22] Green H C, Dick L K, Gilpin B, Samadpour M, Field K G. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(2): 503-510.
- [23] Ohad S, Ben-Dor S, Prilusky J, Kravitz V, Dassa B, Chalifa-Caspi T, Kashi Y, Rorman E. The development of a novel qPCR assay-set for identifying fecal contamination originating from domestic fowls and waterfowl in Israel. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 145.
- [24] Zhuang F F, Li H, Zhou X Y, Zhu Y G, Su J Q. Quantitative detection of fecal contamination with domestic poultry feces in environments in China. AMB Express, 2017, 7: 80.
- [25] Gómez-Doñate M, Casanovas-Massana A, Muniesa M, Blanch A R. Development of new host-specific *Bacteroides* qPCRs for the identification of fecal contamination sources in water. MicrobiologyOpen, 2016, 5(1): 83-94.
- [26] Gómez-Doñate M, Ballesté E, Muniesa M, Blanch A R. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific *Bifidobacteriaceae* suitable for microbial source tracking. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5788-5795.
- [27] Kortbaoui R, Locas A, Imbeau M, Payment P, Villemur R. Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. Water Research, 2009, 43(7): 2002-2010.

- [28] Ryu H, Elk M, Khan I U H, Harwood V J, Molina M, Edge T A, Domingo J S. Comparison of two poultry litter qPCR assays targeting the 16S rRNA gene of *Brevibacterium* sp. *Water Research*, 2014, 48: 613-621.
- [29] Weidhaas J L, Macbeth T W, Olsen R L, Sadowsky M J, Norat D, Harwood V J. Identification of a *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 334-347.
- [30] Shen Z Y, Duan C R, Zhang C, Carson A, Xu D, Zheng G L. Using an intervening sequence of *Faecalibacterium* 16S rDNA to identify poultry feces. *Water Research*, 2013, 47(16): 6415-6422.
- [31] Schill W B, Mathes M V. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome *b* targets. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(14): 5229-5234.
- [32] Lu J R, Domingo J S, Shanks O C. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. *Water Research*, 2007, 41(16): 3561-3574.
- [33] Devane M L, Robson B, Nourozi F, Scholes P, Gilpin B J. A PCR marker for detection in surface waters of faecal pollution derived from ducks. *Water Research*, 2007, 41(16): 3553-3560.
- [34] Ryu H, Griffith J F, Khan I U H, Hill S, Edge T A, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves J, Domingo J S. Comparison of gull feces-specific assays targeting the 16S rRNA genes of *Catellibacterium marimammalium* and *Streptococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1909-1916.
- [35] Caldwell J M, Levine J F. Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 77(1): 17-22.
- [36] 贾福晨, 秦良云, 李丹丹, 刘江, 罗章. 基于高通量测序分析相同饲养模式下河谷藏鸡与白来航鸡肠道细菌群落分布特征. *高原农业*, 2018, 2(6): 576-584, 628-628.
- [37] 段传人, 刘爱喜, 郑国铝, 王贵学, 高旭, 郭劲松, 孙达, 聂磊. 应用 *Faecalibacterium* 菌示踪水环境粪便污染研究进展. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(6): 1073-1078.
- [38] 张杨, 吴仁人, 张一敏, 贾乐华. 禽类特异性引物在珠江三角洲地区的适用性研究. *生态科学*, 2018, 37(3): 85-90.
- [39] Zheng G, Yampara-Iquise H, Jones J E, Carson C A. Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(2): 634-641.
- [40] Nshimiyimana J P, Cruz M C, Thompson R J, Wuertz S. *Bacteroidales* markers for microbial source tracking in Southeast Asia. *Water Research*, 2017, 118: 239-248.
- [41] Lu J R, Sanchez S, Hofacre C, Maurer J J, Harmon B G, Lee M D. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 901-908.
- [42] Lu J R, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer J J, Lee M D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6816-6824.
- [43] Dumas M D, Polson S W, Ritter D, Ravel J, Gelb Jr J, Morgan R, Wommack K E. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24785.
- [44] Lan P T N, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(6): 371-382.
- [45] Lu J R, Domingo J S. Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(5): 469-477.
- [46] Vadde K K, McCarthy A J, Rong R, Sekar R. Quantification of microbial source tracking and pathogenic bacterial markers in water and sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed). *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 699.
- [47] Ahmed W, Harwood V J, Nguyen K, Young S, Hamilton K, Toze S. Utility of *Helicobacter* spp. associated GFD markers for detecting avian fecal pollution in natural waters of two continents. *Water Research*, 2016, 88: 613-622.
- [48] He X W, Yu M, Chen H M, Zhang X X. Mitochondrial DNA source tracking of water fecal contamination. *Journal of Nanjing University: Natural Sciences*, 2014, 50(4): 388-398.
- [49] 刘艳华, 张明海. 基于线粒体 *Cty b* 基因的西藏马鹿种群遗传多样性研究. *生态学报*, 2011, 31(7): 1976-1981.
- [50] Caldwell J M, Raley M E, Levine J F. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(9): 3277-3283.
- [51] 刘铸, 杨春文, 金建丽, 金志民, 戴鹏. 鸟类线粒体 DNA 结构特点及在鸟类研究中的应用. *生物技术通报*, 2009, (12): 42-47.
- [52] Villemur R, Imbeau M, Vuong M N, Masson L, Payment P. An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water Research*, 2015, 69: 143-153.
- [53] Vuong N M, Villemur R, Payment P, Brousseau R, Topp E, Masson L. Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray.

- Water Research, 2013, 47(1): 16-30.
- [54] Baker-Austin C, Rangdale R, Lowther J, Lees D N. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. Water Science and Technology, 2010, 61(1): 1-7.
- [55] Martellini A, Payment P, Villemur R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. Water Research, 2005, 39(4): 541-548.
- [56] Fernandes K A, Kittelmann S, Rogers C W, Gee E K, Bolwell C F, Bermingham E N, Thomas D G. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. PLoS One, 2014, 9(11): e112846.
- [57] Linnenbrink M, Wang J, Hardouin E A, Künzel S, Metzler D, Baines J F. The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. Molecular Ecology, 2013, 22(7): 1904-1916.
- [58] Liang H X, Yu Z S, Ndayisenga F, Liu R Y, Zhang Y M, Zhang H X, Wu G. 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. Ecological Indicators, 2020, 115: 106334.
- [59] Shanks O C, Santo Domingo J W, Lamendella R, Kelty C A, Graham J E. Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4054-4060.
- [60] 樊丽华, 莫虹斐, 张晓峰, 帅江冰, 陈青. 基于竞争性杂交方法的猪-肠道微生物特异性互作靶点发掘. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2017, 43(2): 163-172.
- [61] Hamilton M J, Yan T, Sadowsky M J. Development of goose- and duck-specific DNA markers to determine sources of *Escherichia coli* in waterways. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4012-4019.
- [62] 张静, 姜中其. aidA-aah 基因及其编码的糖基化黏附素 AIDA-I 的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(12): 1244-1246.
- [63] Knights D, Kuczynski J, Charlson E S, Zaneveld J, Mozer M C, Collman R G, Bushman F D, Knight R, Kelley S T. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. Nature Methods, 2011, 8(9): 761-765.
- [64] Shenhav L, Thompson M, Joseph T A, Briscoe L, Furman O, Bogumil D, Mizrahi I, Pe'er I, Halperin E. FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking. Nature Methods, 2019, 16(7): 627-632.