

利用拟杆菌分子标记物对粪便污染溯源的研究进展

张曦^{1,2}, 朱昌雄², 朱红惠^{1*}

¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

²中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

摘要:拟杆菌(*Bacteroidales*)是粪便污染的主要标志之一,近年来被广泛应用在水体微生物溯源领域,并展现了良好的应用前景。拟杆菌微生物溯源的优势在于不需要纯培养过程,直接根据拟杆菌具有的宿主特异性生物标记引物设计,通过检测水体中拟杆菌生物标记的存在情况来判断粪便污染来源。本文从人、猪、反刍动物等拟杆菌特异性生物标记的发现、引物设计及其应用综述了拟杆菌在微生物溯源中的研究进展,指出了应用过程中的局限性。本文还对拟杆菌在溯源中的应用进行了展望。提出了寻找新的宿主特异性拟杆菌生物标记是研究的主要方向,在应用研究中应注重与其他溯源方法相结合以使溯源结果更加准确。

关键词:拟杆菌, 宿主特异性, 生物标记, 微生物溯源

中图分类号: X5 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 07-0863-06

近年来,随着畜牧业的大力发展,畜禽粪便和生活污水逐渐发展成为水体粪便污染的主要来源,这一污染已严重影响到人们的生存环境和饮水健康。尽管目前采取了很多措施减小粪便污染,但由于缺乏对粪便污染来源的准确掌握和定位,成为污染的治理和控制的主要瓶颈^[1]。如果可以在自然水体中找到潜在的污染源及时采取有效的管理和补救措施,这对人类健康是非常重要的。因此,寻找和区分水体中粪便污染主要来源成为了解决问题的关键,微生物溯源技术在这一过程中发挥了重要的作用。

“微生物溯源(Microbial Source Tracking, MST)”一词最早由 Hagedorn 和 Wiggins 提出,它是指通过比较污染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标记的有无来判断污染样品和可疑污染源之间存在的联系,从而确定污染来

源^[2-3]。目前分子技术的发展为微生物溯源的发展提供了极大的优势,主要包括依赖纯培养溯源技术和非培养溯源技术。纯培养的溯源技术需要建立一个庞大的污染源数据库,要求涵盖尽可能多的典型地理区域,存在耗费高、适用范围小等缺点;而非培养微生物溯源方法免去了建立数据库的麻烦,研究表明不同的宿主具有可以在水中检测到不随时间变化的菌落群体的特异性生物标记^[4],通过检测宿主特异性的标记来区分不同的粪便污染源正是非培养微生物溯源技术的主要依据。近年来,欧美等发达国家纷纷开展了利用拟杆菌进行水体污染溯源的研究工作,并取得了积极的进展^[5-7]。本文根据目前已开展的工作,对拟杆菌在微生物溯源中的应用研究进行归纳总结,以期推动微生物溯源在水体污染控制中的应用。

基金项目:国家科技重大专项“水体污染控制与治理”资助项目(2008ZX07425-002)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87684631; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介:张曦(1987-),女,山东人,硕士,主要从事环境微生物方面的研究。Tel: +86-20-37616112; E-mail: zhangxi19871008@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-11-10;修回日期:2010-12-31

1 拟杆菌概述

拟杆菌 (*Bacteroidales*) 是一类革兰氏阴性、无芽孢、专性厌氧的细菌, 又称类杆菌。正常寄居于人和动物体内^[8]。拟杆菌是肠道厌氧微生物中的主要代表, 比肠道内的大肠杆菌多 100 - 1000 倍, 通常以单个或两端相连形式存在, 它是影响动物代谢的一种重要微生物^[9-12]。在大分子物质的分解, 促进含氮物质的利用, 以及加速胆汁酸和其他类固醇的生物转化等方面有着极其重要的作用。拟杆菌在动物肠道内不仅具有代谢活性, 而且与其他厌氧微生物在宿主内起着抑制病原微生物在肠道内繁殖的作用; 同时能够根据食物来源的变化将自身的基因调节到活跃状态, 向宿主提供营养的同时也使自身和肠道中的其他细菌获得食物, 维持整个肠道菌群的健康。总之, 这类微生物是作为一类益生菌定居在人和动物肠道内^[13-14]。

拟杆菌在有氧条件下存活的状态不尽相同, 大部分拟杆菌在有氧环境中只能存活几个小时。尽管如此, 拟杆菌的 DNA 在水体中存在数天乃至数周仍然可以被检测到, 为其在微生物溯源中的应用提供了可能^[15]。拟杆菌等肠道厌氧微生物作为研究对象进行检测成为粪便污染溯源方法的标志性改变^[16]。

2 利用拟杆菌分子标记物进行溯源的研究进展

拟杆菌自然存在于人和动物肠道内, 具有宿主特异性。因此, 通过检测水体中不同宿主的拟杆菌生物标记存在情况就可以证明水体遭受的主要粪便的污染来源。Fiksdal 等^[17]第一次证明拟杆菌适合作为粪便污染的指示菌。分子生物学技术的迅速发展为拟杆菌在微生物溯源中的应用提供了有利的条件^[4]。拟杆菌中的一些特异性的分子标记要比大肠杆菌的检测更为灵敏; 因此, 在复杂的自然环境中拟杆菌非常适合作为粪便污染指示菌。

2.1 拟杆菌通用引物在微生物溯源中的应用研究

Bernhard 等^[4]在研究美国俄勒冈州提拉木克县附近海湾的水质污染情况时, 针对拟杆菌 16S rRNA 基因设计了拟杆菌群体特异性引物, 以期直接通过 PCR 扩增从样品中获得拟杆菌的基因片段, 运用

LH-PCR 和 T-RFLP 技术进行水质污染情况的分析。作为主要渔业基地, 提拉木克县附近海湾受到的污染日益严重, 普遍认为其主要的污染是奶牛粪便, 但也不排除来自化粪池或生活污水中的人的粪便污染的可能性。Bernhard 等在这一区域采集样品进行了研究, 运用 Bac32F/Bac303R, Bac32F/Bac708R 这 2 种引物进行验证 (引物 Bac303R 的序列在 Manz 等^[18]研究的基础之上稍作了修饰), 研究发现引物 Bac32F/Bac303R 的扩增产物在牛的粪便样品中产生 276bp 的特异性波峰, 但在人的粪便中并未发现特异性波峰, 证明引物 Bac32F/Bac708R 的特异性优于引物 Bac32F/Bac303R。目前, 在利用拟杆菌特异性基因进行非培养的微生物溯源过程中, 引物 Bac32F/Bac708R 被广泛的采用。拟杆菌通用性引物如表 1 所示。

表 1 拟杆菌通用性引物

Table 1 Universal primers of <i>Bacteroidales</i>		
Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temp/°C
Bac32F ^[4]	AACGCTAGCTACAGGCTT	53
Bac303R ^[18]	CCAATGTGGGGACCTTC	
Bac32F ^[4]	AACGCTAGCTACAGGCTT	53
Bac708R ^[4]	CAATCGGAGTTCTTCGTG	

本实验室在广东省惠州市先后于 2009 年 12 月份及 2010 年 5 月份 2 次采集地表水样应用引物

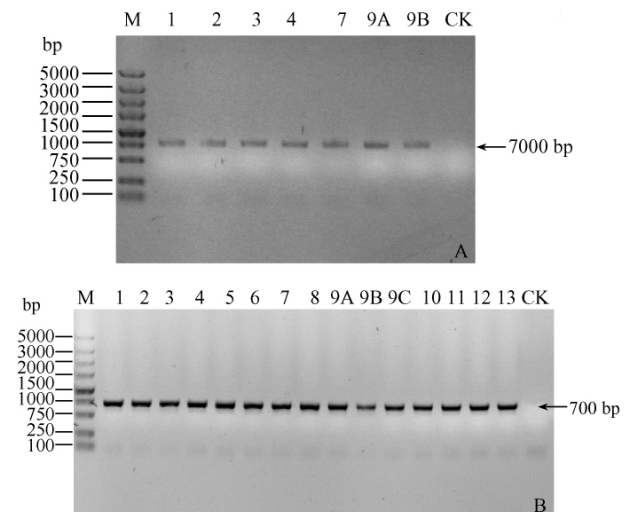


图 1 拟杆菌通用引物扩增结果 A 为 2009 年 12 月份采集的水样, B 为 2010 年 5 月份采集的水样 (M 代表 maker, DS5000; 1 和 2 为饮用水, 3-13 均为池塘水)

Fig. 1 DNA amplified with universal primers of *Bacteroidales*. A: Water collected in December 2009; B: Water collected in May 2010 (M: maker, DS5000; sample 1 and 2 were collected from different drinking water, sample 3-13 were collected from different pond).

Bac32F/Bac708R 进行 PCR 检测,对水样中提取的混合 DNA 进行扩增均得到了目的片段(如图 1-A、图 1-B),可以推断水样中普遍受到了粪便污染。

2.2 利用人体内拟杆菌特异性引物进行微生物溯源

Bernhard 和 Field^[19] 建立拟杆菌的克隆文库,通过进化树的建立发现人的粪便中的拟杆菌主要集中在 HF8、HF10 这两个聚簇,据此设计了人的 2 种特异性引物 HF134F/Bac708R 和 HF183F/Bac708R。HF134F/Bac708R 针对 HF10 聚簇设计, HF183F/Bac708R 针对 HF8 聚簇设计。采集一定数量的人和不同动物粪便样品后进行检测,结果表明针对 HF8 聚簇设计的人的特异性引物 HF183F/Bac708R 与其他的动物之间没有发现交叉反应,且在人的粪便样品中普遍存在。而引物 HF134F/Bac708R 只在不到一半的人粪便样品中有特异性扩增^[19]。Ahmed 等^[20] 采用了这 2 种引物在澳大利亚昆士兰东南部地区进行适用性的研究,采集了来自于 13 个宿主的 207 个粪便样品,其中包括来自于人的样品有 52 个,研究结果表明在人的特异性拟杆菌引物中, HF183F/Bac708R 比 HF134F/Bac708R 在粪便污染检测中具有更强的特异性。此外,针对人设计的拟杆菌特异性引物还包括 BacH、HuBac 和 BacHum 等^[21-23]。目前引物 HF183F/Bac708R 在微生物溯源中应用最为广泛,在美国、澳大利亚、法国、葡萄牙、比利时等国的研究均证明引物 HF183F/Bac708R 的特异性在 90% 以上^[24-26]。其他几种引物仅在最初设计时针对某一特定地点被特异性检测,并没有进行广泛的应用,关于这些引物在其他地区是否适用有待进一步的研究。根据人体内拟杆菌生物标记的特异性引物序列列表 2 所示。

表 2 人的拟杆菌生物标记的特异性引物

Table 2 Primers of Human *Bacteroidales*

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temp/°C
HF134F ^[19]	GCCGTCTACTCTGGCC	61
Bac708R	CAATCGGAGTTCCTCGTG	
HF183F ^[19]	ATCTATGAGTTCACATGTCCG	59
Bac708R	CAATCGGAGTTCCTCGTG	
BacH F ^[21]	CTTGCCAGCCTTCTGAAAG	61
BacH R	CCCATCTCTACCGAAAATAC	
HuBac F ^[22]	GTTGTGAAAGTTTCCGGCTCA	62
HuBac R	CAATCGGAGTTCCTCGTATATCTA	
BacHum F ^[23]	TGAGTTCACATGTCCGCATGA	60
BacHum R	CGTTACCCCGCCTACTATCTAATG	

本实验室采用了 HF183F/Bac708R 引物对采集的粪便和地表水样品进行检测,在实验室已有的人的粪便样品中产生特异性的扩增,其余样品均未有目标条带产生。采集点为养殖业密集地,因此推断人类粪便及生活污水等对这一区域的污染不是主要的因素。

2.3 利用反刍动物体内拟杆菌特异性引物进行微生物溯源

牛的体内的拟杆菌主要为 CF123 和 CF151 这 2 类, Bernhard 和 Field^[19] 针对这 2 类拟杆菌设计特异性引物 CF128F/Bac708R 和 CF193F/Bac708R。结果证明 CF128 F/Bac708R 检测的灵敏度比 CF193 F/Bac708R 的灵敏度要高出 10-100 倍。但这 2 种引物除了在牛的粪便样品中得到特异性扩增,还能在鹿、山羊、绵羊、骆驼等动物中得到特异性扩增。这说明牛体内存在的这一拟杆菌类群为反刍动物中普遍存在^[4]。多项研究^[27-29] 表明 CF128F/Bac708R 针对反刍动物体内的拟杆菌进行检测,其特异性灵敏度均比较高。目前这一特异性引物被广泛采用。反刍动物的拟杆菌生物标记特异性引物序列列表 3 所示。

表 3 反刍动物的拟杆菌生物标记特异性引物

Table 3 Primers of Ruminant *Bacteroidales* biomarker

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temp/°C
CF128F ^[19]	CCAACYTTCCCGWTACTC	58
Bac708R	CAATCGGAGTTCCTCGTG	
CF193F ^[19]	TATGAAAGCTCCGGCC	55
Bac708R	CAATCGGAGTTCCTCGTG	

2.4 利用猪体内拟杆菌特异性引物进行微生物溯源

目前,除了关于人及反刍动物体内拟杆菌的特异性生物标记展开研究,关于猪体内拟杆菌特异性标记也备受关注。到目前为止,只有 1 种猪体内拟杆菌的 16S rRNA 基因标记被识别, Dick 等^[30] 根据这一特异性标记设计了引物 PF163F/Bac708R,并对采集的 80 个不同动物的粪便样品进行验证,证明该引物具有高度的特异性,最低检出限为 100 个拷贝。Okabe 等^[22] 针对猪体内的拟杆菌-普雷沃氏菌的 16S rRNA 基因设计了引物 PS422F/Bac581R 和 Bac41F/PS183R 这 2 种引物,针对在日本的札幌和江别市采集的动物粪便样品进行检测,结果表明引物具有很好的特异性。Mieszkin 等^[31] 设计引物

Bac32F/Bac108R 和 Bac41F/Bac163R 2 种引物,同时也将 Okabe 等设计的引物 Bac41F/PS183R 在法国布列塔尼地区进行验证,结果表明 Bac41F/PS183R 这 1 种引物虽然在猪的粪便样品中完全得到扩增,但是在其他物种的一些样品中也有阳性结果产生;而其所设计的 2 种引物中 Bac41F/Bac163R 的灵敏性更高。由此可见,不同地区各引物的特异性存在很大差异,在实际应用中应根据当地具体情况,通过引物特异性验证后适用。猪的特异性引物序列见表 4。

表 4 猪的拟杆菌生物标记的特异性引物
Table 4 Primers of Swine *Bacteroidales* biomarker

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temp /°C
PF163F ^[30]	GCGGATTAATACCGTATGA	53
Bac708R	CAATCGGAGTTCCTCGTG	
PS422F ^[22]	CGGGTTGTAAACTGCTTTTATGAAG	62
Bac581R	CGCTCCCTTTAAACCCAATAAA	
Bac41F ^[22]	TACAGGCTTAACACATGCAAGTCG	62
PS183R	CTCATACGGTATTAATCCGCCTTT	
Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC	60
Bac108R ^[31]	CGGGCTATTCTGACTATGGG	
Bac41F ^[31]	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	60
Bac163R	ACCTCATACGGTATTAATCCGC	

本实验室应用 PF163F/Bac708R 和 Bac41F/Bac163R 这 2 种引物,但是在实验室现有的粪便样品中 PF163F/Bac708R 并未得到阳性结果,而 Bac41F/Bac163R 特异性较好,同时将这种引物应用于两次水样的检测,结果(如图 2)表明在水样 1、4、9A、9B 中有目标条带的扩增,说明 4 个水样中猪的粪便污染可能为潜在的污染源。但在第二次采集的水样中并没有得到阳性结果,推断原因为当地猪场

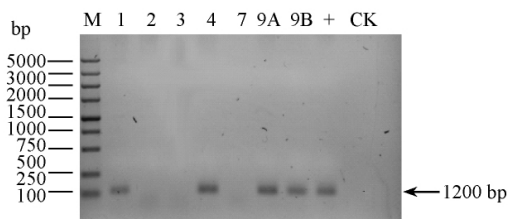


图 2 PF41F/Bac163R 引物扩增结果 (M 为 marker, DS5000; 1, 2 为饮用水, 3 - 9B 为池塘水, “+”为阳性对照, CK 为阴性对照)

Fig. 2 DNA amplified with primer PF41F/Bac163R (M: marker, DS5000; 1 and 2 were sampled from different drinking, 3 - 9B were sampled from different pond water, “+” was positive control, CK was negative control).

拆除,污染源被切断。

2.5 利用其他物种的一些特异性引物进行微生物溯源

Dick 等^[30]建立马的粪便的克隆文库,通过系统进化树的建立发现在马体内的拟杆菌存在特异性的一类,据此设计了马的引物 HoF597F/Bac708R (HoF597F:5' - CCAGCCGTAAAATAGTCGG-3'),在俄勒冈州立大学的动物研究实验室采集样品进行验证,研究证明该引物具有良好的特异性,最低检出限为 100 个拷贝。此外, Kildarea 等^[23]针对狗体内的拟杆菌设计引物,但是在加利福尼亚地区采集的样品结果表明灵敏度和特异性较差。Dick 等^[30]研究表明一些宠物体内的拟杆菌特异性较差,不利于特异性引物的设计,这一结果也同 Kildarea 等针对狗体内的拟杆菌设计的引物特异性较差的现象相吻合。总之,人、猪、反刍动物之外的其他物种的特异性引物的设计有待进一步研究。

3 研究展望

目前水污染事件频发,在水体治理过程中快速、准确定位污染来源显得尤为重要。利用拟杆菌进行粪便污染源溯源具备了这种特点,因此有非常广阔的应用前景。目前利用拟杆菌进行微生物溯源的重点在于特异性引物的设计,而目前研究的引物种类较为单一,仅限于人、猪、反刍动物等,关于鸡、鸭等农业养殖中常见的物种的特异性引物的设计将是今后研究的重点。由于这种方法是针对某一物种进行特异性引物设计,只能证明水体中是否特定物种的污染,不能提供各污染源之间的相互联系。宿主消化道内各种肠道菌群之间的相互作用极为复杂,并且环境的多变性易导致菌群的基因发生变化,其中的演变过程无法通过单个基因完全表现出来,因此应积极开展新的生物标记的研究。同时在溯源方法的应用过程中,还应当注重其他方法之间相结合对水体中粪便污染进行分析,从而进一步保证分析结果的准确可靠。

参考文献

- [1] Stoner N, Dorfman M. Testing the waters: a guide to water quality at vacation beaches. Natural Resources Defense Council [EB/OL]. (2007-08) [2010-11-10] <http://www.nrdc.org/water/oceans/tw/ttw2007.pdf>

- [2] Meays CL , Broersma K , Nordin R , Mazumder A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management* , 2004 , 73 (1) : 71-79.
- [3] Scott TM , Rose JB , Jenkins TM , Farrah SR , Lukasik J. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology* , 2002 , 68 (12) : 5796-5803.
- [4] Bernhard AE , Field KG. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S rDNA genetic Markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66 (4) : 1587-1594.
- [5] Reischer GH , Kavka GG , Kasper DC , Winter C , Mach RL , Farnleitner AH. Applicability of DNA based quantitative microbial source tracking (QMST) evaluated on a large scale in the Danube River and its important tributaries. *Archiv fuer Hydrobiologie Supplement* , 2008 , 18 (1-2) : 117-125.
- [6] Ahmed W , Stewart J , Gardner T , Powell D , Brooks P , Sullivan D , Tindale N. Sourcing faecal pollution: A combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments. *Water Research* , 2007 , 41 (16) : 3771-3779.
- [7] Jiang SC , Chu WP , Olson BH , He JW , Choi S , Zhang J , Le JY , Gedalanga PB. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2007 , 76 (4) : 927-934.
- [8] Buchanan RE , Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所翻译组译. 第八版. 北京: 科学出版社 , 1984 : 535-536.
- [9] 吴彦彬 , 李亚丹 , 李小俊 , 边艳青. 拟杆菌的研究及应用. *生物技术通报 (Biotechnology Bulletin)* , 2007 , 1 : 66-69.
- [10] Cynthia L , Sears A. Dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* , 2005 , 11 (5) : 247-251.
- [11] Degnan BA , Macfarlane GT. Arabinogalactan utilization in continuous cultures of *Bifidobacterium longum*: effect of co-culture with *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe* , 1995 , 1 (2) : 25-33.
- [12] Wang RF , Kim SJ , Robertson LH , Cerniglia CE. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes* , 2002 , 16 (5) : 341-350.
- [13] Hooper LV , Wong MH , Thelin A , Hansson L , Falk PG , Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* , 2001 , 291 (2) : 881-884.
- [14] Fredrik B , Ruth EL , Justin L. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* , 2005 , 307 : 1915-1920.
- [15] Fogarty LR , Voytek MA. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 , 71 (10) : 5999-6007.
- [16] Anne EB , Katharine GF. Identification of non-point sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66 (4) : 1587-1594.
- [17] Fiksdal L , Maki JS , Lacroix SJ , Staley JT. Survival and Detection of *Bacteroides* spp. Prospective Indicator Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 1985 , 49 (1) : 148-150.
- [18] Manz W , Amann R , Ludwig W , Vancanneyt M , Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* , 1996 , 142 : 1097-1106.
- [19] 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. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66 (10) : 4571-4574.
- [20] Ahmed W , Stewart DP , Gardner T. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Applied Microbiology* , 2008 , 46 (2) : 237-242.
- [21] Reischer GH , Kasper DC , Steinborn R , Farnleitner AH , Mach RL. 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. *Applied Microbiology* , 2007 , 44 (4) : 351-356.
- [22] Okabe S , Okayama N , Savichtcheva O , Ito T. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Applied Microbiology Biotechnology* , 2007 , 74 (4) : 890-901.
- [23] Kildare BJ , Leutenegger CM , Mcswain BS , Bambic DG , Rajal VB , 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.

- [24] Ahmed W , Stewart J , Powell D , Gardner T. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Applied Microbiology* , 2008 , 46 (2) :237-242.
- [25] Gawler AH , Beecher JE , Brandao J , Carroll NM , Falcao L , Gourmelon M , Masterson B , Nunes B , Porter J , Rince A , Rodrigues R , Thorp M , Walters JM , Meijer WG. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of fecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Research* , 2007 , 41 (16) :3780-3784.
- [26] Gourmelon M , Caprais MP , Segura R , Menec CL , Lozach S , Piriou JY , Rince A. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (15) :4857-4866.
- [27] Ahmed W , Powell D , Goonetilleke A , Gardner T. Detection and source identification of faecal pollution in non-sewered catchment by means of host-specific molecular markers. *Water Science and Technology* , 2008 , 58 (3) :579-586.
- [28] Jeong JY , Gil KI , Lee Kh , Ka JO. Molecular Identification of Fecal Pollution Sources in Water Supplies by Host-specific Fecal DNA Markers and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiles of 16S rRNA Gene. *The Journal of Microbiology* , 2008 , 46 (6) :599-607.
- [29] Sionbhan DR , Justin OG , Emer C. Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing *Bacteroidales* and *Bifidobacteria*-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland. *Water research* , 2009 , 43 (19) :4980-4988.
- [30] Dick LK , Bernhard AE , Brodeur TJ , Domingo JWS , Simpson JM , Walters SP , Field KG. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 , 71 (6) :3184-3191.
- [31] Mieszkina S , Furet JP , Corthier G , Gourmelon M. Estimation of Pig Fecal Contamination in a River catchment by Real-Time PCR Using Two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA Genetic Markers. *Applied And Environmental Microbiology* , 2009 , 75 (10) :3045-3054.

Uncultivated Host-specific *Bacteroidales* Markers for Identification of Fecal Source Pollution—A review

Xi Zhang^{1,2} , Changxiong Zhu² , Honghui Zhu^{1*}

¹ Guangdong Institute of Microbiology , Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology , Guangzhou 510070 , China

² Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing , 100081 , China

Abstract: *Bacteroidales* has been proposed as a fecal pollution indicator. Microbial Source Tracking (MST) based on *Bacteroidales* host-specific gene markers has recently been applied in the fecal pollution identification , which does not require culturing the fecal pollution indicator organisms. This method needs to design specific primers. The primers are designed based on *Bacteroidales* specific 16S rRNA gene. Once a pair of specific primers was amplified , the fecal pollution can be identified. In this paper , the progress of specific primers of *Bacteroidales* in human , swine , ruminant feces were reviewed and discussed. The advantages and disadvantages were put forward. Future researchers should be focused on the new biological markers and the combination of different MST methods.

Keywords: *Bacteroidales* , host-specific , biological markers , microbial source tracking

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Funded Major Science and Technology Project of "Water Pollution Control and Management" (2008ZX07425-002)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87684631; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 10 November 2010/Revised: 31 December 2010