



肠球菌在海水中的消亡机制研究进展

刘译锴^{1,2} 明红霞¹ 戴峰^{1,3} 王艳涛^{1,3} 樊景凤^{*1}

1 国家海洋环境监测中心 国家环境保护近岸海域生态环境重点实验室 辽宁 大连 116023

2 上海海洋大学海洋生态与环境学院 上海 201306

3 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023

摘要: 肠球菌作为近岸海域粪便污染的指示细菌和条件致病菌, 在海水中的生长与消亡对水质监测以及公众健康具有重要影响。本文简述肠球菌在海水中的生理及分布特征, 综述肠球菌在关键环境因子和生物因子影响下的消亡规律, 并着重介绍肠球菌在细胞和分子水平的消亡机制与消亡动力学模型, 同时对肠球菌的研究方向进行展望。通过构建肠球菌浓度预测模型, 以期实现因公众亲海导致感染病原微生物风险的早期预警, 对海水浴场管理提供有效的参考依据。

关键词: 肠球菌, 消亡机制, 消亡动力学

Enterococcus decay in coastal waters: a review

LIU Yikai^{1,2} MING Hongxia¹ DAI Feng^{1,3} WANG Yantao^{1,3} FAN Jingfeng^{*1}

1 State Environmental Protection Key Laboratory of Coastal Ecosystem, National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian, Liaoning 116023, China

2 College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China

Abstract: As a fecal bacterial indicator of seawater and an opportunistic bacterium, *Enterococcus* is used for water quality monitoring and closely related to the public health. In this paper, the physiological and distribution characteristics of *Enterococcus* in the seawater are described at first. Then, decay mechanism of *Enterococcus* was introduced under the impact of the key environmental factors and biological factors, and decay kinetics model of *Enterococcus* in cellular and molecular level are summarized. Finally, the research direction of *Enterococcus* in seawater is addressed. By establishing the *Enterococcus* concentration prediction model, early warning of the risk of pathogenic microorganism infection in bathing beaches and other recreational waters will be feasible.

Keywords: *Enterococcus*, decay mechanism, decay kinetics

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1404500); Revitalization Talents Program of Liaoning Province (XLYC1807186); Millions of Talent Projects of Liaoning Province

*Corresponding author: E-mail: jffan@nmemc.org.cn

Received: 17-07-2020; Accepted: 22-09-2020; Published online: 30-12-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1404500); 辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC1807186); 辽宁“百千万人才工程”项目

*通信作者: E-mail: jffan@nmemc.org.cn

收稿日期: 2020-07-17; 接受日期: 2020-09-22; 网络首发日期: 2020-12-30

随着滨海旅游业的蓬勃发展,每年海水浴场会迎来大量的游客,因此浴场海水的质量倍受关注。自 20 世纪 50 年代开始,国外研究者便对游泳所带来的健康风险问题进行了研究,在对游泳者进行流行病学调查的同时,开展海水中病原微生物的监测,试图探索病原微生物与游泳者健康风险之间的关系^[1]。但海水中的病原微生物由于具有丰度低、致病性高、存活时间短等特点,导致检测难度大、费用昂贵、结果滞后,因此海水中病原微生物的检测亟需有一种快速且准确的替代方案^[2]。通过流行病学调查发现,监测海水中粪便污染指示细菌(Fecal Indicator Bacteria, FIB)可有效地评估人体由于暴露在海水中而感染肠道疾病的风险。

肠球菌(*Enterococcus*)是海水中主要粪便污染指示细菌及条件致病菌^[3-5],属革兰氏阳性、兼性厌氧菌,广泛分布于鸟类和哺乳动物的肠道中^[6-7]。大多数对氧化酶、过氧化氢酶以及脲酶均表现为阴性,能分解葡萄糖、麦芽糖生成酸,多数菌株可分解甘露醇,耐盐(盐度可达 65 ppt),对 40%的胆汁以及干燥环境具有抗性,并且可在叠氮化钠存在下保持生长;肠球菌在 10–45 °C 之间均可生长,在 35–37 °C 时生长最佳^[8]。相较于传统的粪便污染指示细菌,肠球菌指示疾病相关性更强。美国环保署(Environmental Protection Agency, EPA)针对胃肠炎的发生率和海水中粪便污染指示细菌之间的相关性的研究表明,因暴露于海水而感染肠道疾病的风险与总大肠菌群浓度的改变并无显著相关性,而在相同浓度条件下的肠球菌所带来的患胃肠道疾病的风险是粪大肠菌群的 4–8 倍,并且海水中肠球菌的浓度变化与胃肠炎的发病率具有显著的相关性^[9]。一些研究表明,水体中肠球菌的浓度除了与游泳者患胃肠道疾病的风险有关外,还与患中耳炎的概率呈现显著的正相关性^[10]。因此,肠球菌被公认为是检测海水水质最有效的病原微生物指示细菌指标,已被加拿大、世界卫生组织、欧盟等许多国家和地区列入海水

粪便污染评价指标^[11]。本课题组前期已开展了大量的工作,证明了肠球菌在浴场海水中的指示作用,并将肠球菌的滤膜法和 MPN 检测技术纳入我国海洋行业标准^[12-13]。

目前,国内外关于肠球菌的分子流行病学、生态学特征、定量微生物风险评估(Quantitative Microbial Risk Assessment, QMRA)等的研究已有很多,本课题组在分析肠球菌在海水浴场的时空分布特征、人体健康风险的基础上,充分认识到明晰海水中肠球菌的消亡机制将有助于充分认识其在浴场环境中的归趋,客观评估其潜在风险,实现科学精准的水质监管^[14-18]。然而截至目前,国内外对于肠球菌消亡机制的研究还不够^[3-5,19]。本文在对海水中肠球菌来源、生理学特征以及污染分布特征认知的基础上,主要简述肠球菌在海水中的消亡机制,并从环境因子对肠球菌的消亡影响入手,进一步探究肠球菌在细胞和核酸水平的消亡过程以及消亡动力学模型,为构建肠球菌浓度预测模型、实现对海水浴场等娱乐海域污染的早期预警奠定理论基础,对当前海水浴场是否对公众开放提供有效的参考依据。

1 近岸海水中的肠球菌

1.1 海水中肠球菌的来源

环境水体中肠球菌的主要来源有野生动物粪便、下水道溢流、污水处理厂、化粪池系统故障以及工业废水的排出等^[20]。海水浴场中肠球菌的主要来源是污水排放、地表径流带来的人畜粪便以及野生动物的粪便。据报道,造成“佛罗里达水域海滩关闭事件”的肠球菌污染来源包括野生生物(73%)、雨水径流(67%)、污水泄漏(61%)、其他来源(27%)和未知来源(41%)^[21]。Brown 等的研究表明,近海环境中肠球菌的浓度水平与海鸥数量呈显著的正相关性,并且海鸥粪便携带的肠球菌浓度高达 $10^{8.4}$ – $10^{8.7}$ CFU/g,将少量的海鸥粪便(4 mg)混入 1 L 海水中,即可使该海水中的肠球菌浓度远远高于美国环保署所规定的安全游泳准则中肠球菌

的阈值^[22]。此外, 海滩环境及潮下砂可能是海水中肠球菌的潜在库源。本项目组通过大量研究表明, 由于自然环境中的肠球菌具有很好的粘附性, 使得肠球菌可以在沙砾中大量存在, 并通过降雨、地表径流等途径被转移和运输入海^[23]。

1.2 肠球菌的生理学特征

肠球菌进入自然环境后可附着于生物体与非生物体表面, 通过自身分泌的脂蛋白、表面蛋白、胞外 DNA 以及周围环境中所含的碳水化合物等粘聚成胞外基质, 包裹在其表面形成生物被膜^[24]。生物被膜的形成对肠球菌具有保护作用, 可提高其对物理及生物因素胁迫的抗性, 如温度、离子浓度、干燥、紫外线辐射、掠食和波浪作用的频繁波动等^[25-27]。此外, 在水生生态系统中, 细菌在环境因素胁迫下可能会进入一种活的非可培养状态 (Viable But Non-Culturable, VBNC)^[28]。活的非可培养状态是细菌响应多种环境胁迫而激活的一种生存机制, 处于该状态时, 尽管细菌自身丧失了可培养性, 但仍然保持着其生存能力, 并且再次暴露于最佳条件时可以恢复分裂^[29-30]。就肠球菌而言, 寡营养、光辐射、渗透压和温度已被证明是诱发 VBNC 状态的环境胁迫之一^[31]。

1.3 肠球菌在海水中的污染分布特征

肠球菌在海水中广泛存在, 其环境分布特征受多种因素的影响, 如波浪、潮汐、人体脱落、雨水径流等。本课题组通过对大连星海浴场、大连金石滩等海水浴场水体中肠球菌的时空分布特征研究, 发现肠球菌的浓度会随水深与离海岸线距离的增加而降低; 排污口肠球菌浓度远大于其他采样点^[13], 并向周围海水呈辐射降低的趋势; 游泳人群密集处, 肠球菌浓度也较高^[16]。此外, 在海水中的水生植被与沉积物中通常会存在高浓度的肠球菌。Whitman 等的研究表明, 在沿密歇根湖南部大湖区和北部海岸线收集的藻垫中肠球菌浓度通常超过 1×10^5 CFU/g 干重^[32]。在印度尼西亚的实验中也得到类似的结果, 海草草甸中肠球菌浓度比附

近水体高至少 3 倍^[33]。本课题组研究表明, 在海水浴场中, 沉积物中的肠球菌浓度通常比其上覆水的肠球菌浓度高几个数量级^[16,34]。此外, 与潮汐、波浪有关的湍流会导致沉积物重悬, 从而提高附近水体中肠球菌的浓度^[35]。

天然水生环境中的肠球菌除具有空间分布特征外, 还具有时间分布特征。对于日际变化, Sassoubre 等通过 25 h 内每小时对加利福尼亚州圣佩德罗河的 2 个地点进行采样, 发现肠球菌存在昼夜变化, 并指出白天肠球菌的浓度比夜间的浓度低约 0.5 个 lg CFU/100 mL^[36]。在夏威夷的一项研究中也观察到类似的结果, 肠球菌的浓度在下午降低了大约 0.5 个 lg CFU/100 mL^[37]。在对海水浴场冲浪区的肠球菌浓度变化研究中同样观察到具有昼夜变化, 其浓度在中午下降, 在夜间反弹, 但与淡水中不同, 海水中的肠球菌由于波动作用的运输, 其浓度还表现出较短期的时间分布变化, 在涨潮时最高, 并沿同一条海岸线空间变化^[38-39]。

2 肠球菌在海水中存活的主要影响因素

2.1 光照

肠球菌在水体中的活性受多种因素影响, 包括太阳光照射和水中天然有机物(Natural Organicmatter, NOM)的含量等。Sassoubre 等^[40]通过反复实验, 证明太阳辐射是影响肠球菌在水体中活性的主要原因, 暴露在阳光下的肠球菌通常比黑暗中的肠球菌衰减率高 2 个或更多个数量级; 暴露于光照条件下粪肠球菌的浓度在 6 h 内大约降低了 6-7 个数量级, 随后进入黑暗条件后粪肠球菌的浓度一直保持恒定; 而与低水平的太阳辐射相比, 水体中肠球菌的衰减率在高水平时显得更高。

研究表明, 日光光谱中的紫外线, 包含 UVC (190-290 nm)、UVB (290-320 nm) 和 UVA (320-400 nm), 高度杀菌的 UVC 和 UVB 辐射可灭活水体的肠球菌, 但大多数 UVB 和 UVC 辐射已被大气臭氧吸收, UVA 占到达地球表面紫外线的 95% 以上, 其对肠球菌的固有破坏力虽然不如

UVB, 但暴露于 UVA 同样会导致水体中粪肠球菌的可培养能力随着时间的增加而下降^[41]。然而太阳光中 UVA 进入水体的辐射量不仅受当前太阳高度和天气状况的影响, 还受照射水体浊度水平、水深以及溶解氧等因素的制约, 浊度和水深的增加可以有效防止 UVA 对于肠球菌的灭活作用, 海水中的溶解氧浓度则会通过影响由氧介导的光灭活机制改变肠球菌的活性^[42]。

2.2 盐度

盐度作为水体中重要的环境理化因子之一, 同样会影响肠球菌在水中的活性。Mote 等在水体中浮游生物颗粒大小与肠球菌活性关系的实验中, 发现在较低盐度条件下, 肠球菌的活性与盐度呈显著的正相关性^[43]。Jones 等对比了小溪支流中不同点位水样中的肠球菌衰亡水平, 发现肠球菌在中游盐沼中的衰减率显著大于上游水源部分, 表明较高盐度的环境会对肠球菌在水体中的活性产生负面影响; 同样地, 将肠球菌分别置于盐度为 0.15 ppt 和 24.6 ppt 的水体中培养, 结果发现后者中肠球菌的衰减率显著大于前者, 并且在同一盐度条件下, 肠球菌的活性远大于大肠杆菌^[44-45]。在英格兰开展的模拟实验中, 研究人员观察到盐度(6.00–40.3 ppt)与肠球菌浓度降低至初始的 90%所需时间(T_{90})呈反比关系^[46]。在澳大利亚进行的模拟实验中也记录了类似的结果, 实验研究了淡水(盐度范围为 1.6–3.3 ppt)和海洋(盐度范围为 33.8–35.4 ppt)沉积物中肠球菌的衰减, 发现在 60 d 内, 来自海洋沉积物的肠球菌浓度降低了 2 个数量级, 而淡水沉积物中的浓度在实验期间几乎保持不变^[6]。

2.3 温度

温度作为微生物生长繁殖的理化因子之一, 通常被认为是影响细菌生存的最重要因素^[47]。Noble 等通过室内模拟夏季和冬季海洋平均表面温度, 研究温度对淡水和海水中肠球菌活性的影响, 发现无论在淡水还是海水中, 水体中肠球菌的衰减率均受温度的强烈影响, 在 20 °C 条件下肠球菌的衰亡均

比 14 °C 条件下更快^[47]。Kim 等基于 PMA-qPCR (Propidium Monoazide, PMA)和 qPCR 定量分析方法研究淡水沉积物中肠球菌存活率和持久性时也发现类似规律, 20 °C 条件下培养的肠球菌其 T_{90} 值为 37, 而在 4 °C 下肠球菌浓度在 42 d 的实验期间几乎没有减少^[48]。Brooks 等在研究不同温度下肠球菌衰亡动力学模型的实验中发现, 无论肠球菌处于悬浮态(悬浮于水体中)或固着态(附着于物体表面), 37 °C 时的衰减系数均显著高于 4 °C^[49]。Jones 等的研究进一步证明温度与水体中肠球菌的衰减率呈正相关, 但是 18 °C 或更高的水温会诱导 VBNC 状态的肠球菌再生^[44]。

2.4 营养盐

海水中肠球菌的主要来源是鸟类的粪便, 而鸟类的胃肠道是营养丰富的环境, 营养物质供应充足, 并且在富营养化水体中的大量营养物质可以促进肠球菌的增殖或延长其生长期^[50]。同时一些研究表明, 寡营养是引起水体中肠球菌进入 VBNC 状态的主要原因^[31]。因此, 向寡营养环境的过渡通常不利于肠球菌的生存。

在许多水生环境中, 有机碳是细菌的限制性营养因素, 通常会限制肠球菌在水生环境中的生存。多项研究表明, 向水体中添加粪便物质或富含有机碳的沉积物后, FIB 的活性增加, 并且在沉积物中肠球菌的活性与有机碳的含量具有相关性, 在有机碳含量较高的沉积物中衰减率较低^[26,51-52]。

氮和磷对于细菌的生长和代谢也是必需的, 并且在一些水生环境中同样可能作为限制性营养因素^[50,52-55]。通常向水体中添加有机或无机磷, 肠球菌的活性会随之增加。Kiefer 等通过比较以不同物种的粪便形式(牛、鹿和鹅)添加磷的影响, 观察到只有在加入具有较高磷的鹿粪便水体中 FIB 的衰减率显著降低^[54]。在地表水中进行的原位实验与实验室内的实验结果相似, 肠球菌的浓度通常与磷浓度相关^[50,53]。

2.5 生物因素

水体中微生物的生物学特性、微生物种类之间的关系以及微生物群落之间的相互作用同样会影响水生环境中肠球菌的衰减率。水体中微生物群落之间的相互作用通常以竞争为主导,而竞争可能是通过对稀缺养分的利用或产生拮抗物质实现的^[56]。许多研究均发现存在土著微生物群的情况下 FIB 衰减率增加的趋势,并进一步通过一系列的实验来评估肠球菌存在于未经过滤的水和经过滤水中的衰减趋势,结果表明土著菌群的存在会加快肠球菌活性的衰减^[57]。

此外,将捕食者或养分竞争者进行有选择的排除后,发现捕食同样是海水中 FIB 衰减的主要影响因素^[58]。Wanjugi 等研究发现暴露于阳光下 72 h 后 FIB 的衰减率会继续增加,而这个时间范围与原生动物种群适应猎物并开始捕食所需时间非常吻合^[59-62]。不仅如此,水生环境中的养分水平、捕食和竞争的作用会相互影响,产生更为复杂的相互作用。肠球菌在水体中的活性受溶解有机碳和磷浓度的影响,当浓度低于一定阈值时会观察到衰减,而高于该阈值时水体中肠球菌的浓度会出现增长或处于稳定 2 种状态,后者主要归因于捕食者与被捕食者之间的密度波动^[50]。在水环境中,捕食者对于 FIB 的捕食率受多种因素的影响,包括温度、水质类型、养分利用率、捕食者与被捕食者的密度等^[63]。

3 肠球菌在海水中的消亡机制

3.1 细胞水平

在自然水体中,当肠球菌受到环境胁迫时,一部分细胞会因不能适应而裂解死亡;另一部分则会被诱发进入 VBNC 状态。进入 VBNC 状态后,肠球菌细胞体积相较于正常细胞增大,细胞质受压不规则,染色较浅^[64]。细胞质凝聚不均匀,在细胞质膜与细胞壁之间存在明显的间隙,细胞壁肽聚糖 O 乙酰化水平相较于正常状态增加^[65]。在一些细胞中还可观察到膜卷曲以及液泡变性和疏松的现

象,同时细胞对附着物体的黏附能力下降,但仍具有潜在的致病性,不能在传统的培养基中生长形成菌落,在一定条件下可以复苏^[64]。粪肠球菌作为肠球菌属的常见种,在环境胁迫下 9-12 d 即可丧失可培养性,形成生物膜的效率较对数生长期降低^[66]。此外,粪肠球菌在进入 VBNC 状态后还会丧失本身所具有的分解乳糖、D-甘露醇以及 D-山梨糖醇的能力,但依然保留了可以产生和释放多种类型的代谢产物和酶以及产酸的能力^[64]。

3.2 分子水平

光照是诱导肠球菌进入 VBNC 状态主要的环境因子。细菌暴露于光照条件下表现出的可培养性的丧失,称为光灭活^[67]。光灭活通过直接和间接的机制发生,当细胞成分(例如核酸)吸收光子导致化学键结构发生变化时,就会发生直接的光灭活;当内源性或外源性的敏化剂吸收光子时,就会发生间接的光灭活^[67]。能量或电子从敏化剂转移到细胞成分,对细胞造成损害,或与分子氧反应生成活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),对膜脂质、蛋白质、酶或核酸造成光氧化损伤^[44](图 1)。由氧介导的间接机制对于肠球菌的衰亡尤为重要。Sassoubre 等^[40]开展了对光照条件和黑暗条件下基因表达的对比实验,发现在光照条件下,肠球菌细胞中与膜转运和磷酸转移酶系统(Phosphotransferase System, PTS)、脂肪酸代谢和碳水化合物代谢相关的转录丰度更大,尤其是糖酵解;相对于黑暗条件,光照条件下 RNA 具有更多 ORF 的还包括氧化应激(*sodA*)、DNA 修复(*recA*)、DNA 复制起始(*repE*)、翻译起始(*infA*)、细胞氧化还原稳态(*trx*)、RNA 结合、膜蛋白以及肽聚糖结合/细胞壁降解(LysM 域蛋白),但是负责编码 Toprim 结构域蛋白和位点特异性重组酶的 RNA 转录丰度在黑暗条件下更高,这 2 种 mRNA 都与 DNA 的代谢有关。

此外,盐度的改变可通过影响太阳光照射下自由基的形成水平而改变肠球菌的光灭活水平。Chen

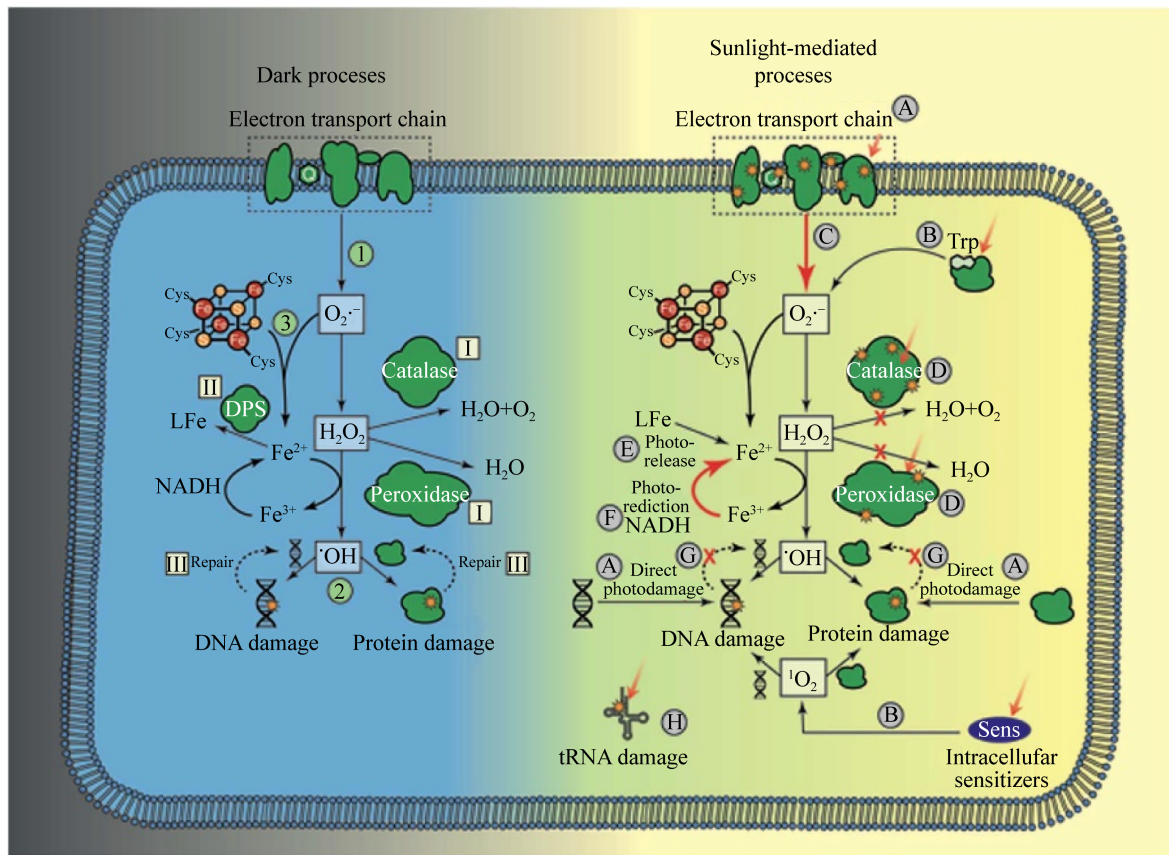


图 1 肠球菌氧化应激及光灭活过程^[67]

Figure 1 Processes related to oxidative stress and photoinactivation of *Enterococcus faecalis*^[67]

等通过研究不同盐度对肠球菌失活的影响,发现暴露于紫外线条件下,盐度的增加可促进肠球菌的光活化和深色修复过程,同时会导致肠球菌中的环丁烷嘧啶二聚体(Cyclobutane Pyrimidine Dimer, CPD)光裂解酶的表达,从而使细胞内 CPDs 修复,即修复由于光照射所造成的 DNA 损伤^[68]。

3.3 肠球菌在环境中的衰亡模型

通过研究海水中肠球菌活性的环境影响因子,确定其主要的影响因子,并由此构建肠球菌的衰亡动力学模型,将有助于了解肠球菌的衰亡过程,实现对浴场海水中肠球菌浓度变化的预测。肠球菌的衰亡动力学通常用一阶线性衰减方程(也称为 Chick-Watson 模型)表示^[69]:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt}$$

式中, N_0 和 N_t 分别代表肠球菌初始与时间为 t 时的浓度(CFU/100 mL, CCE/100 mL 或 copies/100 mL), k 代表衰亡常数, t 代表时间。

Gin 等^[70]在不同盐度和光照条件下诱导肠球菌进入 VBNC 状态,从而构建关于盐度和光照对肠球菌衰亡的动力学模型,得出光照强度与基于平板计数法所得衰减系数 k_c 和基于 PMA-qPCR 方法所得的衰减系数 k_p 具有很强的相关性,而盐度与 k_c 值和 k_p 值呈弱相关,并且盐度与基于 PMA-qPCR 的衰减系数呈负相关;在 0-30 ppt 的盐度范围内,不同的光照条件下 k_c 值均无显著差异, k_p 值在高光照条件下随盐度增加显著下降;此外,他们的研究还发现肠球菌的衰减系数与水深及水体中悬浮固体含量有关,衰减系数随水深及悬浮固体含量的增加而降低。

Maraccini 等^[71]通过对肠球菌不同生长阶段光灭活动力学的实验,发现肠球菌的衰亡率在不同的光照条件下均符合肩对数线性模型,并且处于不同生长阶段肠球菌的衰亡曲线具有显著差异,生长较慢或稳定的细胞比生长的细胞具有更长的肩峰和更小的衰减系数,说明肠球菌的生长阶段或生长速率同样也是影响其在水中衰亡的重要因素。

4 总结与展望

目前许多国家和地区都已经建立了各自的水质病原微生物污染评价标准,肠球菌被公认是近海海域水质粪便污染最科学的指示微生物。在水体中,影响海水中肠球菌衰亡的环境理化因子主要有光照、温度、盐度、营养盐以及其他微生物的化感作用等。目前对生物因素与粪便污染指示细菌衰亡的相关研究较少,并且主要集中于大肠杆菌,对于肠球菌的相关研究还需要进一步加强。此外,肠球菌在受到上述物理及生物因子的多重胁迫时会进入 VBNC 状态。尽管 VBNC 状态这一概念在 20 世纪 80 年代已经被提出,并且目前已探索出不同细菌 VBNC 状态的多种诱导和复苏条件,但是至今肠球菌 VBNC 状态的形成及复苏机制尚不清楚,其 VBNC 状态的具体调控通路也同样需要进一步探究。

我国由于对微生物水质评价标准的制定相对较晚,导致对肠球菌衰亡机制认识不足,并且由于病原微生物在海水中具有显著的空间异质性,国外研究得到的结论并不适用于我国,同时基于平板计数法与 PMA-qPCR 方法监测肠球菌浓度具有一定的时间滞后性,所以对于我国海水中肠球菌衰亡影响因子以及衰亡动力学的探索,加强动力学、微生物学等领域的多学科交叉,可以进一步明晰肠球菌在海水中的消亡机制,有助于构建肠球菌浓度预测模型^[72],实现对海水浴场污染病原微生物的早期预警,为海水浴场的科学管理提供技术支撑。

REFERENCES

[1] Prüss A. Review of epidemiological studies on health

- effects from exposure to recreational water[J]. *International Journal of Epidemiology*, 1998, 27(1): 1-9
- [2] Korajkic A, McMinn BR, Harwood VJ. Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(12): 2842
- [3] Farman M, Yasir M, Al-Hindi RR, Farraj SA, Jiman-Fatani AA, Alawi M, Azhar EI. Genomic analysis of multidrug-resistant clinical *Enterococcus faecalis* isolates for antimicrobial resistance genes and virulence factors from the western region of Saudi Arabia[J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2019, 8: 55
- [4] Arshadi M, Mahmoudi M, Motahar MS, Soltani S, Pourmand MR. Virulence determinants and antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from different sources in southwest Iran[J]. *Iranian Journal of Public Health*, 2018, 47(2): 264-272
- [5] Heaney CD, Sams E, Dufour AP, Brenner KP, Haugland RA, Chern E, Wing S, Marshall S, Love DC, Serre M, et al. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers[J]. *Epidemiology*, 2012, 23(1): 95-106
- [6] Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(4): 685-706
- [7] Martin R, Makino H, Yavuz AC, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, Kubota H, Swinkels S, Sakai T, Oishi K, et al. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158498
- [8] García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00058-18
- [9] US EPA. EPA-820-F-12-061 Environmental protection agency, recreational water quality criteria[S]. Washington DC: US EPA, 2012
- [10] Abdelzاهر AM, Wright ME, Ortega C, Solo-Gabriele HM, Miller G, Elmir S, Newman X, Shih P, Bonilla JA, Bonilla TD, et al. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 724-732
- [11] ISO. BS EN ISO 7899-1:1999, BS 6068-4.3:1999 Water quality. Detection and enumeration of intestinal *Enterococci* in surface and waste water. Miniaturized method (Most probable number) for surface and waste water[S]. BSI, 1999
- [12] State Oceanic Administration. HY/T 147.5-2013 Code of practice for marine monitoring technology. Part 5: Marine ecology[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013 (in Chinese)
国家海洋局. HY/T 147.5-2013 海洋监测技术规程 第 5 部分: 海洋生态[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013

- [13] Fan JF, Ming HX, Li LL, Su J. Evaluating spatial-temporal variations and correlation between fecal indicator bacteria (FIB) in marine bathing beaches[J]. *Journal of Water and Health*, 2015, 13(4): 1029-1038
- [14] Shi Y. Preliminary study of human health risk assessment for typical bacteria on marine bathing beach[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 (in Chinese)
石岩. 海水浴场中典型细菌人体健康风险评估初探[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2016
- [15] Shi Y, Chang YK, Ming HX, Ma YJ, Su J, Gao HT, Li BC, Guan DM, Wang B, Zhao W, et al. Human health risk assessment of Dalian Fujiazhuang marine bathing beach[J]. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(4): 517-522 (in Chinese)
石岩, 常永凯, 明红霞, 马玉娟, 苏洁, 高海涛, 李博超, 关道明, 王斌, 赵文, 等. 大连付家庄海水浴场人体健康风险评估[J]. *海洋环境科学*, 2017, 36(4): 517-522
- [16] Bi HY, Ming HX, Ma YX, Su J, Sun ZH, Wang YT, Jin Y, Fan JF. Screening and distribution of important pathogenic bacteria in different medium of typical recreational beaches in Dalian[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(2): 204-213 (in Chinese)
毕宏宇, 明红霞, 马悦欣, 苏洁, 孙志浩, 王艳涛, 金媛, 樊景凤. 大连典型娱乐海水浴场重要病原细菌筛选及其在不同介质中的分布[J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(2): 204-213
- [17] Zhang WW, Wang JY, Fan JF, Gao DL, Ju HY. Effects of rainfall on microbial water quality on Qingdao No. 1 Bathing Beach, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 66(1/2): 185-190
- [18] Shi Y, Ming HX, Ma YJ, Wang Y, Chang YK, Ji FY, Guo LM, Guan DM, Fan JF. Evaluating human health risk of Dalian marine bathing beaches by *Enterococcus*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(6): 1161-1166 (in Chinese)
石岩, 明红霞, 马玉娟, 王玥, 常永凯, 季风云, 郭立梅, 关道明, 樊景凤. 用肠球菌评价大连海水浴场人体健康风险[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(6): 1161-1166
- [19] Derx J, Schijven J, Sommer R, Zoufal-Hruza CM, Van Drietzum IH, Reischer G, Ixenmaier S, Kirschner A, Frick C, De Roda Husman AM, et al. QMRACatch: human-associated fecal pollution and infection risk modeling for a river/floodplain environment[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2016, 45(4): 1205-1214
- [20] Ahmed W, Gyawali P, Sidhu JPS, Toze S. Relative inactivation of faecal indicator bacteria and sewage markers in freshwater and seawater microcosms[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(3): 348-354
- [21] Piggot AM, Klaus JS, Johnson S, Phillips MC, Solo-Gabriele HM. Relationship between enterococcal levels and sediment biofilms at recreational beaches in South Florida[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(17): 5973-5982
- [22] Brown KI, Boehm AB. Comparative decay of *Catellibacoccus marimalium* and enterococci in beach sand and seawater[J]. *Water Research*, 2015, 83: 377-384
- [23] Ming HX, Su J, Gu YB, Shi Y. Occurrence of fecal and non-fecal sources bacteria during several overlap rainfall events at Fujiazhuang bathing beach in Dalian, China[A]//2018 the 4th International Conference on Water Resource and Environment[C]. Kaohsiung City, China: EES, 2018: 012070
- [24] Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(3): 365-376
- [25] Chahal C, Van Den Akker B, Young F, Franco C, Blackbeard J, Monis P. Pathogen and particle associations in wastewater: significance and implications for treatment and disinfection processes[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2016, 97: 63-119
- [26] Craig DL, Fallowfield HJ, Cromar NJ. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with *in situ* measurements[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(5): 922-930
- [27] Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 522-554
- [28] Zhang S, Ding LX, Su XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms[J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2018, 58(8): 1331-1339 (in Chinese)
张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1331-1339
- [29] Colwell RR. Bacterial death revisited[A]//Colwell RR, Grimes DJ. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*[M]. Boston: Springer, 2000: 325-342
- [30] Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(20): e00249-18
- [31] Del Mar Lleò M, Bonato B, Benedetti D, Canepari P. Survival of enterococcal species in aquatic environments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(2): 189-196
- [32] Whitman RL, Shively DA, Pawlik H, Nevers MB, Byappanahalli MN. Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora* (Chlorophyta) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4714-4719
- [33] Lamb JB, van de Water JAJM, Bourne DG, Altier C, Hein MY, Fiorenza EA, Abu N, Jompa J, Harvell CD. Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates[J]. *Science*, 2017,

- 355(6326): 731-733
- [34] Hassard F, Andrews A, Jones DL, Parsons L, Jones V, Cox BA, Daldorph P, Brett H, McDonald JE, Malham SK. Physicochemical factors influence the abundance and culturability of human enteric pathogens and fecal indicator organisms in estuarine water and sediment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1996
- [35] O'Mullan GD, Juhl AR, Reichert R, Schneider E, Martinez N. Patterns of sediment-associated fecal indicator bacteria in an urban estuary: benthic-pelagic coupling and implications for shoreline water quality[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 656: 1168-1177
- [36] Sassoubre LM, Walters SP, Russell TL, Boehm AB. Sources and fate of *Salmonella* and fecal indicator bacteria in an urban creek[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(8): 2206-2212
- [37] Viau EJ, Goodwin KD, Yamahara KM, Layton BA, Sassoubre LM, Burns SL, Tong HI, Wong SHC, Lu Y, Boehm AB. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams-associations with fecal indicators, land cover, and water quality[J]. *Water Research*, 2011, 45(11): 3279-3290
- [38] Boehm AB, Grant SB, Kim JH, Mowbray SL, McGee CD, Clark CD, Foley DM, Wellman DE. Decadal and shorter period variability of surf zone water quality at Huntington beach, California[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(18): 3885-3892
- [39] Shibata T, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Elmir S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment[J]. *Water Research*, 2004, 38(13): 3119-3131
- [40] Sassoubre LM, Ramsey MM, Gilmore MS, Boehm AB. Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* to sunlight[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, 130: 349-356
- [41] Kumar A, Ng D, Cao B. Fate of *Enterococcus faecalis* in stormwater matrices under ultraviolet-A (365 nm) irradiation[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2018, 4(5): 639-643
- [42] Laureano-Rosario AE, Symonds EM, Rueda-Roa D, Otis D, Muller-Karger FE. Environmental factors correlated with culturable enterococci concentrations in tropical recreational waters: a case study in escambron beach, San Juan, Puerto Rico[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(12): 1602
- [43] Mote BL, Turner JW, Lipp EK. Persistence and growth of the fecal indicator bacteria enterococci in detritus and natural estuarine plankton communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2569-2577
- [44] Jones CE, Maddox A, Hurley D, Barkovskii AL. Persistence of bacterial pathogens, antibiotic resistance genes, and enterococci in tidal creek tributaries[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 240: 875-883
- [45] Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3041-3048
- [46] Kay D, Stapleton CM, Wyer MD, McDonald AT, Crowther J, Paul N, Jones K, Francis C, Watkins J, Wilkinson J, et al. Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T_{90} values for modelling faecal indicators in recreational waters[J]. *Water Research*, 2005, 39(4): 655-667
- [47] Noble RT, Lee IM, Schiff KC. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(3): 464-472
- [48] Kim M, Wuertz S. Survival and persistence of host-associated *Bacteroidales* cells and DNA in comparison with *Escherichia coli* and *Enterococcus* in freshwater sediments as quantified by PMA-qPCR and qPCR[J]. *Water Research*, 2015, 87: 182-192
- [49] Brooks Y, Aslan A, Tamrakar S, Murali B, Mitchell J, Rose JB. Analysis of the persistence of enteric markers in sewage polluted water on a solid matrix and in liquid suspension[J]. *Water Research*, 2015, 76: 201-212
- [50] Surbeck CQ, Jiang SC, Grant SB. Ecological control of fecal indicator bacteria in an urban stream[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(2): 631-637
- [51] Garzio-Hadzick A, Shelton DR, Hill RL, Pachepsky YA, Guber AK, Rowland R. Survival of manure-borne *E. coli* in streambed sediment: effects of temperature and sediment properties[J]. *Water Research*, 2010, 44(9): 2753-2762
- [52] Shelton DR, Pachepsky YA, Kiefer LA, Blaustein RA, McCarty GW, Dao TH. Response of coliform populations in streambed sediment and water column to changes in nutrient concentrations in water[J]. *Water Research*, 2014, 59: 316-324
- [53] McCrary KJ, Case CLH, Gentry TJ, Aitkenhead-Peterson JA. *Escherichia coli* regrowth in disinfected sewage effluent: effect of DOC and nutrients on regrowth in laboratory incubations and urban streams[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, 224(2): 1412
- [54] Kiefer LA, Shelton DR, Pachepsky Y, Blaustein R, Santin-Duran M. Persistence of *Escherichia coli* introduced into streambed sediments with goose, deer and bovine animal waste[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(5): 345-353
- [55] Chudoba EA, Mallin MA, Cahoon LB, Skrabal SA. Stimulation of fecal bacteria in ambient waters by experimental inputs of organic and inorganic phosphorus[J]. *Water Research*, 2013, 47(10): 3455-3466
- [56] Stubbendieck RM, Straight PD. Multifaceted interfaces of bacterial competition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(16): 2145-2155
- [57] Wanjugi P, Fox GA, Harwood VJ. The interplay between predation, competition, and nutrient levels influences the survival of *Escherichia coli* in aquatic environments[J].

- Microbial Ecology, 2016, 72(3): 526-537
- [58] Wanjugi P, Harwood VJ. The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(2): 517-526
- [59] Wanjugi P, Sivaganesan M, Korajkic A, Kelty CA, McMinn B, Ulrich R, Harwood VJ, Shanks OC. Differential decomposition of bacterial and viral fecal indicators in common human pollution types[J]. Water Research, 2016, 105: 591-601
- [60] Pirlot S, Unrein F, Descy JP, Servais P. Fate of heterotrophic bacteria in lake Tanganyika (east Africa)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(3): 354-364
- [61] Servais P, Garcia-Armisen T, George I, Billen G. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modelling[J]. Science of the Total Environment, 2007, 375(1/3): 152-167
- [62] Zingel P, Agasild H, Nõges T, Kisand V. Ciliates are the dominant grazers on pico- and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(1): 134-142
- [63] Ballesté E, Blanch AR. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7608-7616
- [64] E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 14790-14801
- [65] Pfeffer JM, Strating H, Weadge JT, Clarke AJ. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(3): 902-908
- [66] Lleo M, Bonato B, Tafi MC, Caburlotto G, Benedetti D, Canepari P. Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 274(2): 232-237
- [67] Nelson KL, Boehm AB, Davies-Colley RJ, Dodd MC, Kohn T, Linden KG, Liu YY, Maraccini PA, McNeill K, Mitch WA, et al. Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches[J]. Environmental Science: Processes & Impacts, 2018, 20(8): 1089-1122
- [68] Chen PY, Chu XN, Liu L, Hu JY. Effects of salinity and temperature on inactivation and repair potential of *Enterococcus faecalis* following medium- and low-pressure ultraviolet irradiation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(3): 816-825
- [69] Gao GH. Advances of fate and transport model for faecal indicator bacteria in coastal bathing water sites[J]. Advances in Environmental Protection, 2017, 7(4): 309-314 (in Chinese)
高广海. 海水浴场粪便指标菌迁移转化模型研究进展[J]. 环境保护前沿, 2017, 7(4): 309-314
- [70] Gin KYH, Goh SG. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*[J]. Water Research, 2013, 47(10): 3315-3328
- [71] Maraccini PA, Wang D, McClary JS, Boehm AB. Growth-dependent photoinactivation kinetics of *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(5): 1226-1237
- [72] Huang HL, Ming HX, Fan JF, Wang B. Overview on indicator bacterial concentration prediction model of bathing beaches[J]. Marine Environmental Science, 2020(6): 953-959 (in Chinese)
黄慧玲, 明红霞, 樊景凤, 王斌. 海水浴场中粪便污染指示细菌的浓度预测模型研究进展[J]. 海洋环境科学, 2020(6): 953-959