

净水技术前沿与热点综述

张星宇, 周婉婷, 邢方潇, 等. 实时荧光定量 PCR 在水源性致病微生物检测中的应用[J]. 净水技术, 2025, 44(9): 10-20.

ZHANG X Y, ZHOU W T, XING F X, et al. Application of real-time quantitative PCR in determination of water-borne pathogenic microorganisms [J]. Water Purification Technology, 2025, 44(9): 10-20.

实时荧光定量 PCR 在水源性致病微生物检测中的应用

张星宇, 周婉婷, 邢方潇, 张 岚*

(中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 北京 100050)

摘 要 【目的】 水是维持生命活动的关键物质基础, 其质量直接影响生态平衡与人类健康。水源受致病微生物污染引起的水源性疾病严重威胁全球公共卫生安全, 因此, 快速准确检测致病微生物对水质安全至关重要。【方法】 文章综述荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative PCR, qPCR) 在水源性致病微生物检测中的应用, 整合 qPCR 技术在水源性致病微生物检测中的关键案例与试验数据, 探讨其技术优势、现存挑战及未来发展方向, 为水质安全检测提供理论支持。【结果】 qPCR 基于荧光信号动态监测与循环阈值 (C_t) 定量分析, 显著提升水源性致病微生物检测的灵敏度和检测速度。在细菌检测中, qPCR 可以对靶向细菌特异性基因实现快速定量; 对病毒及原虫可以缩短检测周期同时提升通量。并且该方法适用于饮用水、废水及娱乐用水等不同水体的水质检测, 但面临区分活菌、死菌, 应对抑制剂干扰以及优化引物设计等挑战。【结论】 qPCR 凭借高灵敏、检测快速及适应性广的优势, 成为水质安全检测的核心工具。新兴技术进一步提升了检测精度与效率, 数字 PCR (dPCR) 无需标准曲线即可实现绝对定量, 多重 qPCR (mPCR) 通过多靶标同步分析进一步降低检测成本。未来需要推动多技术联用、开发自动化检测平台及制定国际标准化操作流程, 以应对复杂水体环境的大规模检测需求, 为全球水安全提供更高效的技术支撑。

关键词 qPCR 致病微生物 水体 检测 应用

中图分类号: X703 文献标志码: A 文章编号: 1009-0177(2025)09-0010-11

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2025.09.002

Application of Real-Time Quantitative PCR in Determination of Water-Borne Pathogenic Microorganisms

ZHANG Xingyu, ZHOU Wanting, XING Fangxiao, ZHANG Lan*

(National Institute of Environmental Health, China CDC, National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Beijing 100050, China)

Abstract [Objective] Water is essential for sustaining life processes, and its quality directly impacts ecological balance and human health. Contamination of water sources by pathogenic microorganisms poses a significant threat to global public health, making rapid and accurate detection of these microorganisms critical for ensuring water safety. [Methods] This paper reviews the application of quantitative PCR (qPCR) in detecting waterborne pathogenic microorganisms, integrating critical case studies and experimental data. It discusses the technical advantages, current challenges, and future directions of qPCR, providing theoretical support for water quality safety monitoring. [Results] qPCR significantly enhances the sensitivity and speed of waterborne pathogen detection through dynamic fluorescence signal monitoring and cycle threshold (C_t) value quantification. For bacterial determination, qPCR enables rapid quantification by targeting species-specific genes. For viruses and protozoa, it shortens detection cycles while improving throughput.

[收稿日期] 2025-05-09

[基金项目] 国家重点研发计划: 长江黄河流域致病菌分布特征与优控清单 (2022YFC3204702)

[作者简介] 张星宇 (2002—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水环境与健康, E-mail: 570989401@qq.com。

[通信作者] 张岚 (1969—), 研究方向为饮用水健康及水质检测, E-mail: zhanglan@nieh.chinacdc.cn。

The method is applicable to diverse water matrices, including drinking water, wastewater, and recreational water. However, it faces challenges such as differentiating viable from dead bacteria, mitigating inhibitor interference, and optimizing primer design.

[**Conclusion**] qPCR has emerged as a core tool for water quality safety monitoring due to its high sensitivity, rapidity, and broad adaptability. Emerging technologies further enhance precision and efficiency. Digital PCR (dPCR) achieves absolute quantification without standard curves, while multiplex qPCR (mqPCR) reduces costs through multi-target analysis. Future efforts should focus on promoting the integration of complementary technologies, developing automated detection platforms, and establishing international standardized protocols to address large-scale monitoring demands in complex aquatic environments, thereby advancing global water safety with more efficient technological solutions.

Keywords qPCR pathogenic microorganism water body determination application

水是地球上生命得以延续的最重要的自然资源之一,水质安全直接关系到全球公共卫生。水中的微生物如细菌^[1]、病毒^[2]和原虫^[3]等致病微生物是介水传染病传播的重要因素^[4-5],并且水源性致病微生物已在淡水^[6]、生活用水及娱乐用水^[7]等水体中检出。水源性疾病在世界范围内已造成严重的发病率和死亡率,成为重要的公共卫生问题^[8]。在美国,水源性致病微生物(包括 13 种细菌、1 种病毒和 2 种原虫)导致每年约 715 万人患病,11.8 万人住院治疗,6 630 人死亡,直接医疗保健费用为 3.33 亿美元^[8]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计每年约有 443 832 名 5 岁以下儿童以及 50 851 名 5~9 岁儿童死于腹泻,腹泻疾病多数是由粪便污染的水源所导致^[9]。为缓解这一公共卫生事件造成的影响,WHO、美国环保署(EPA)、欧盟、我国以及其他相关国家制定了水源性致病微生物的具体卫生标准限值^[10]。

目前,水源性致病微生物的检测主要以选择性培养和滤膜法、多管发酵法及免疫磁分离荧光抗体法等标准生化方法为主^[11]。在选择性培养过程中可能会出现菌落的缺失,存在进入活的但不可培养(viable but non-cultureable, VBNC)状态的细胞^[12]。传统方法还存在检测到的细胞种类无法精确定位的问题^[13],如滤膜法需借助血清学鉴定和分子生物学鉴定来确定细胞种类,多管发酵法要通过革兰氏染色及镜检和生化鉴定试验明确细胞种类,额外步骤增加了检测的复杂性和工作量。此外,传统方法非常耗时^[13],像大肠埃希氏菌使用传统滤膜过滤培养和生化鉴定需 48~72 h,诸如病毒用细胞培养联合电镜检查需要 2~4 周,贾第鞭毛虫使用免疫荧光染色镜检方法需 24 h 以内的时间。分子检测技术的引入,改善和简化了环境中

微生物的检测和鉴定^[14]。自 1985 年,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)作为应用最广泛的核酸扩增方法,在微生物的鉴定中发挥了重要作用,它克服了传统方法检测速度慢等问题,实现了对特定核酸的快速扩增^[15]。随着技术的不断发展,在 PCR 基础上发展而来的定量聚合酶链式反应(quantitative PCR, qPCR)展现出了更多优势。研究^[16-17]表明,qPCR 不仅检测速度快,还具有灵敏度、准确度、特异性高,动态范围宽和适用范围广等特点,该方法适用于水源性致病微生物特异性遗传标记的定量测定^[18],为水源性致病微生物检测提供了更高效、可靠的手段。文章系统总结了 qPCR 在水源性致病微生物检测中的应用,综述其原理、挑战及未来发展方向。

1 q-PCR 技术原理与检测流程

qPCR 是一种通过实时监测脱氧核糖核酸(DNA)扩增过程中荧光信号积累以实现核酸定量的分子技术,其核心在于荧光标记物与扩增产物的动态关联^[19]。与传统 PCR 相比,qPCR 通过引入荧光染料(如 SYBR Green I)或序列特异性探针(如 TaqMan 探针),可在每个循环中直接捕获 DNA 合成量,从而建立初始模板浓度与扩增曲线循环阈值(C_t)的对数线性关系^[20]。Ferdous 等^[21]通过靶向霍乱弧菌的 *ctxA* 基因构建标准曲线,证实 C_t 值与模板拷贝数的对数呈高度线性相关;Jothikumar 等^[22]基于 18S rDNA 开发了一种 TaqMan qPCR 方法结合测序技术,实现了对贾第鞭毛虫的高灵敏检测和物种精准鉴定。qPCR 的定量能力不仅限于 DNA 目标物,定量逆转录 PCR(reverse-transcription PCR, RT-qPCR)通过整合逆转录步骤,利用逆转录酶将 RNA 病毒转化为互补 DNA(cDNA)后进行 qPCR 扩增,实现对 RNA 病毒的精准检测,被广泛应用于水

体中 RNA 病毒的检测^[23]。

qPCR 检测水源性致病微生物主要包括样本预处理(如滤膜富集低丰度病原体、离心去除颗粒物^[24])、核酸提取与纯化、引物/探针设计^[25]、扩增及数据分析 5 个环节。针对 RNA 病毒,需额外增加

逆转录步骤生成 cDNA,并优化 RNA 保护策略^[23]。扩增曲线分析需关注基线期、指数期与平台期三阶段,阈值通常设定为基线荧光信号标准差的 10 倍,以规避背景噪声对 C_t 值判读的干扰^[26]。图 1 为 qPCR 检测流程图。

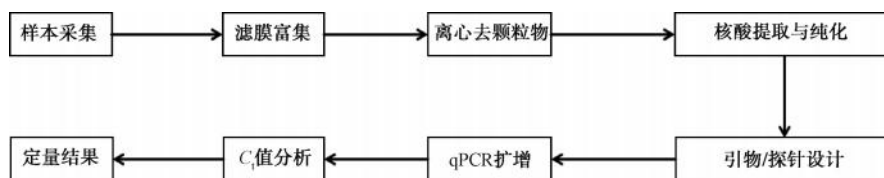


图 1 qPCR 检测流程

Fig. 1 Flowchart of qPCR Determination

2 q-PCR 在水源性致病微生物检测中的应用

2.1 常见水源性致病微生物检测

随着水传播疾病风险的增加,qPCR 技术凭借其高灵敏度和快速检测能力,被广泛应用于检测水体中细菌、病毒和原虫。

2.1.1 细菌

水体中致病细菌是引发腹泻^[27]、霍乱、痢疾^[28]及皮肤和组织感染^[29]等疾病的主要病原体。根据《生活饮用水标准检验方法 第 12 部分:微生物指标》(GB/T 5750.12—2023),生活饮用水中的微生物主要通过培养法检测,《饮用水中军团菌检测》(SN/T 2528—2010)规定,饮用水中军团菌的主要检测方法包括培养法、分子生物学技术及血清学鉴定。传统方法虽可靠性高,但耗时较长^[30],难以满足快速检测需要。qPCR 可以通过靶向种属特异性基因实现快速定量,显著缩短检测时间。Walker 等^[31]开发的 *ybbW* 基因 qPCR 法可在 6 h 内完成检测,对大肠氏埃希菌的特异度和灵敏度达 100%。为提高低丰度菌检出率,超滤或免疫磁珠分离可将检测灵敏度提升 10~100 倍^[32-33];Wu 等^[34]通过超滤 qPCR 联用技术,在 4~8 h 内完成废水中沙门氏菌的检测。

2.1.2 病毒

水传播肠道病毒因其体积小、感染剂量低及环境抗性强,对人类健康构成威胁^[35]。双链 DNA(dsDNA)病毒因 DNA 结构稳定性较强,可在水体中存活数周;单链 DNA(ssRNA)通过频繁的基因重组可以维持高传染性^[36]。无包膜病毒因为缺乏脂质外层,对氯消毒的抗性高于包膜病毒,增加了

处理难度^[37]。现行检测方法 *EPA Method 1615* 使用培养法检测病毒,该方法能特异性识别感染性病毒颗粒,但检测周期长,对病毒载量要求高,难以检测诸如病毒等无法在常规细胞系中增殖的病原体^[38]。分子生物学技术提高了病毒检测效率与灵敏度,对于 dsDNA 病毒,qPCR 对可靶向保守区基因检出环境样本中的低载量病毒^[39];对于 ssRNA 病毒采用 RT-qPCR 结合特异性探针将检测周期缩短至 5 h,突破传统培养法对病毒活性的依赖^[40]。Bennett 等^[41]开发的多重实时荧光定量聚合酶链式反应(multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction,mqPCR)体系可同步分析腺病毒、星状病毒及轮状病毒,在保持与单重 qPCR 相当的灵敏度和特异性的同时,降低了试剂成本并减少了样本消耗量^[42]。但多重检测需优化引物探针组合以避免交叉反应,且设备通道数限制检测维度,超高通量需求仍需依赖数字 PCR(dPCR)或测序技术补充。

2.1.3 原虫

隐孢子虫和贾第鞭毛虫是引发人体腹泻以及水源性疾病暴发的常见病原体^[43-44]。现行检测方法 *EPA Method 1622* 中主要使用免疫磁分离和免疫荧光检测,虽然该方法有较高的灵敏度和特异度,但操作复杂且耗时。Moreno-Mesonero 等^[45]使用 qPCR 结合 18S rRNA 测序检测到废水中极低浓度的原虫 DNA,可以在数小时内完成。Duan 等^[46]开发了一种针对 19 种水源性原虫和 3 种水源性蠕虫的高通量定量聚合酶链反应(high-throughput quantitative PCR,HT-qPCR)测定法,该方法解决了现有诊断方法通量低的局限性,同时提高了准确性,3 h 内可对

多达 192 个样本中的 22 个目标进行分析,这种快速的数据生成对于大规模检测和初步筛查具有优势,有助于后续的风险评估。

2. 1. 4 小结

使用 qPCR 检测水源性致病微生物的优点是检

测的灵敏度与检测效率高,检测周期短,使用联用技术可实现高通量检测。该方法的局限性在于无法有效区分活菌、死菌,易受复杂基质中抑制剂干扰以及引物设计冗余或脱靶风险等。表 1 为常见水源性致病微生物检测方法的比较。

表 1 常见水源性致病微生物检测方法比较

Tab. 1 Comparison of Determination Methods for Common Waterborne Pathogenic Microorganisms					
微生物类别	致病微生物	传统检测方法	分子检测技术	优点	局限性
细菌 ^[47-49]	空肠弯曲菌	菌落总数;营养琼脂平板计数法(48 h)	靶向基因	检测周期短;	需优化抑制剂
	肠道沙门氏菌	总大肠菌群和耐热大肠菌群;多管发酵法	qPCR 结合超滤/	高灵敏度和特异性;	去除
	志贺氏菌属	大肠埃希氏菌;4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖	免疫磁珠富集	定量快速	
	霍乱弧菌	醛酸苷(MUG)酶底物法(24 h)			
	分枝杆菌属	军团菌;培养法、血清学鉴定(3~12 d)			
	军团菌属				
	钩端螺旋体属				
	大肠埃希氏菌				
	幽门螺杆菌				
病毒 ^[36-42]	甲型肝炎病毒	电正性过滤器富集病毒,结合非洲绿猴肾	dsDNA 病毒;qPCR	突破病毒增殖依赖;	引物探针交叉
	诺如病毒	细胞培养 7~14 d,通过细胞病变效应及最	靶向保守区基因	灵敏度高	反应;
	轮状病毒	可能数法(MPN)法计算感染性病毒浓度	ssRNA 病毒;RT-		设备通道限制
	腺病毒		qPCR		
	肠道病毒		多种病毒;mqPCR		
	星状病毒				
原虫 ^[47]	结肠小袋纤毛虫	免疫磁分离和免疫荧光检测	qPCR 结合 18S	高通量;	低浓度样本需
	隐孢子虫属		rRNA 测序	筛查快速	富集
	卡耶塔环孢子虫		HT-qPCR		
	溶组织内阿米巴				
	贾第鞭毛虫属				
	福氏耐格里阿米巴				

2. 2 不同水体环境中的应用

2. 2. 1 饮用水

饮用水中存在的致病微生物可能是通过水源污染、水厂消毒不彻底或管网二次污染等途径进入供水系统引发水源性疾病^[50]。qPCR 通过特异性引物或探针,可在 4~6 h 内实现病原体绝对定量,灵敏度较传统方法提升 1~2 个数量级^[51]。Wang 等^[52]证实 qPCR 对铜绿假单胞菌检出限低至 2 CFU/L。使用 RT-qPCR 或 qPCR 结合免疫磁珠富集可将轮状病毒和贾第鞭毛虫检测周期从数周缩短至 5 h^[40]。在实际应用中,饮用水中的杂质,如腐植酸^[53]、金属离子^[54]等,可能会抑制 PCR 反应;饮用水余氯消毒可能降解病原体 DNA,导致 qPCR 假阴性^[55]。研究人员需要采用合适的核酸提取方法^[56],去除杂质的干扰,同时优化 PCR 反应体系,

提高反应的稳定性。

2. 2. 2 废水与污水处理厂

废水与污水处理厂是水源性致病微生物检测的关键节点,其进水主要来源于生活污水、医疗废水、农业径流及工业排放,携带细菌、病毒、原虫等多类病原体^[57]。Wang 等^[58]使用 qPCR 检测瑞典哥德堡 Rya 污水处理厂检出水中诺如病毒 G II 型高达 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,而传统细胞培养法因病毒失活无法检出。针对隐孢子虫等原虫,qPCR 结合免疫磁珠富集将检测限降至 1 oocysts/(10 L),较传统显微镜法灵敏度提升 100 倍^[51]。腐植酸、重金属及多酚类物质^[59]等污水复杂基质可抑制 qPCR 扩增效率,需通过硅胶膜纯化或添加聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,PVP)改善^[24];病毒基因组重组可能导致引物脱靶,需定期更新靶标设计^[60]。Maestre-Carballe

等^[61]比较了 dPCR 和 qPCR 发现, dPCR 可以估计拷贝基因的绝对丰度, 通过微滴分区实现绝对定量, 有更高的灵敏度和精密度, 以及更好的抗抑制剂能力, 并且无需校准曲线。

2.2.3 其他水体

除饮用水与废水外, 海水^[62]及娱乐用水^[63]同样是水源性致病微生物传播的重要媒介。Saleem 等^[64]使用 qPCR 检测娱乐用水中的肠球菌, 检测时间缩短至 3.5~4.0 h, 并且降低检测结果为假阳性的概率。An 等^[65]开发并验证了一种高灵敏度和高特异性 HT-qPCR 方法, 能够同时对 33 种人类病原体的 68 个标记基因以及 10 种宿主的 23 种粪

便标记物进行定量分析并成功应用于我国厦门海洋娱乐用水样本中病原体 and 粪便污染情况的调查。

2.2.4 小结

qPCR 在检测不同水体环境时, 具有高灵敏度和高特异性, 显著提升水源性致病微生物的检测效率。其局限性在于易受复杂基质干扰、需定期更换引物等。改进方向可以结合 dPCR 提升抗干扰能力与绝对定量精度, 优化核酸提取流程, 如硅胶膜纯化, 以及推动标准化操作以增强不同实验室的检测可比性与可靠性。表 2 为不同水体中水源性致病微生物检测技术的比较。

表 2 不同水体中水源性致病微生物检测技术比较

Tab. 2 Comparison of Determination Technologies for Waterborne Pathogenic Microorganisms in Different Water Bodies

水体类型	检测时间/h	优点	局限性
饮用水	4~6	灵敏度提升 1~2 个数量级 [铜绿假单胞菌检出限 (2 CFU/L) 与传统法 (100 CFU/L)] 快速定量 (如隐孢子虫检测缩短至 5 h)	抑制剂 (腐植酸、余氯) 干扰; 优化核酸提取 (硅胶膜纯化) 假阴性风险; 添加 DNA 保护剂
废水与污水处理厂	5	高灵敏度 [隐孢子虫检测限为 1 oocyst/(10 L)] dPCR 抗干扰性强 (无需校准曲线)	复杂基质抑制 (重金属、多酚); 硅胶膜/PVP 处理 病毒重组风险; 定期更新引物设计
海水及娱乐用水	3.5~4.0	高通量 (单次检测 33 种病原体+10 种宿主标记) 降低假阳性率 (如肠球菌检测)	高盐环境抑制; 优化裂解缓冲液 多靶标交叉干扰; 自动化数据分析

3 技术挑战与优化策略

3.1 活菌与死菌的区分

已证明单叠氮化丙啶 (propidium monoazide bromide, PMA) 和 qPCR 的组合可有效定量各种微生物中的活细菌^[66]。PMA 基于膜完整性的选择性染色来检测活细胞, 可以从死细胞的 DNA 扩增中排除假阳性^[67]。Deshmukh 等^[68]评估了 PMA-qPCR 从死细胞中区分活的大肠杆菌 O157:H7 和大肠杆菌 MTCC 3221 菌株的潜力, 结果表明死细胞的 DNA 扩增几乎完全被抑制, 并且 PMA-qPCR 测定能够检测低至 7 fg 大肠杆菌 DNA。

3.2 抑制剂干扰与灵敏度提升

环境样品中存在的腐植酸、黄腐酸、酚类化合物、重金属和螯合剂等抑制剂会对 qPCR 产生干扰并降低检测的灵敏度^[69]。解决抑制问题是防止定量水平降低和减少假阴性的关键。评估目标基质中是否存在抑制剂, 可以进行内部或外部扩增对照或稀释曲线。EPA 推荐的常用外源 DNA 对照是鲑鱼睾丸 DNA, 它需要加标已知浓度的外源 DNA 靶标量化丰度^[70], 确定抑制对检测和定量的影响程度。

Cao 等^[71]使用 qPCR 检测环境水样中的肠球菌时没有准确量化抑制因素, 导致目标报告不准确。根据 DNA 提取物中靶基因拷贝的预期变异性和丰度, 可针对样品的一个子集或者全部样品来开展稀释曲线的绘制工作。如果抑制起作用, 可以选择最佳稀释度, 也可以在 qPCR 反应中添加蛋白酶抑制剂、甲酰胺或牛血清白蛋白等补充剂增强扩增^[72]。

3.3 引物设计与假阳性控制

确保 qPCR 检测成功需验证引物以及标准品的准确性, 还要依据参考文献^[73]对检测性能进行优化。参数没有得到足够优化可能导致靶标的非特异性扩增或定量不足, 从而导致结果不准确^[74]。为了在 qPCR 分析过程中获得特定靶基因, 提高测量的准确性, 正确设计相应引物是重要因素^[75]。Perez-Bou 等^[76]用计算机模拟方式设计了 1 对靶向 *aadA*、*aadB*、*ampC*、*bla_{SHV}*、*bla_{TEM}*、*dfrA1*、*ermB*、*fosA*、*mecA*、*qnrS* 和 *tetA* (A) 基因的新引物组, 满足开发针对 qPCR 引物的严格要求, 新引物对和 qPCR 方案的验证表明, 这些引物具备好的靶标特异性, 较高的 PCR 效率以及宽的线性动态范围。在灵敏度方面,

新引物具有较低的检测限与定量限值,检测过程中体现出良好的重现性,能够确保检测结果的可靠性与一致性,在极低靶标 DNA 浓度的样品中也有很好的稳定性。

4 未来发展方向

4.1 技术创新

4.1.1 dPCR

dPCR 是一种对靶核酸进行绝对定量的新型方法。dPCR 的定量原理基于分子在大量分区内的随机分布,这种分布遵循泊松分布规律。在 dPCR 检测过程中,每个分区都可被视作一个独立的 PCR 微反应器。通过荧光检测技术,能够精准识别包含扩增靶序列的分区。依据泊松分布的特性,确定 PCR 阳性分区在总分区中的占比,精确测定靶序列的浓度,无需依赖传统的校准步骤^[77]。学者^[72]将 dPCR 作为第三代 PCR 工具,量化水生和陆地生态系统中的微生物。

与 qPCR 相比,dPCR 精度更高、对低拷贝数检测的灵敏度更高,不需要标准曲线^[78]以及对抑制剂耐受性高^[77]。在定量检测废水中微生物时,许多研究^[13]对于检测痕量水平存在的病原体建议使用 dPCR,通过 dPCR 获得定量限,效果显著,表明其在废水检测中的潜在有用性。缺点是使用 dPCR 可能会延长处理时间和增加成本。dPCR 因制备与处理流程耗时较长、分区不均,导致假阳性或假阴性风险升高,受限于仪器成本高昂及单个样本需分割为高密度反应单元,致使总体应用成本高于常规 qPCR 技术。使用 dPCR 进行常规微生物水质检测可能会受成本的限制,在现阶段可能不切实际^[79]。

4.1.2 微滴式数字聚合酶链式反应(droplet digital PCR, ddPCR)

ddPCR 是 dPCR 的子类别,具有更高的检测精度和高通量分析能力,对标准曲线或内参基因的依赖度低,适用于低丰度目标物检测^[80]。ddPCR 在 PCR 扩增之前将 DNA 模板分成许多水油乳液液滴,最终的信号读取在 PCR 到达扩增终点时进行。ddPCR 可定量检测水样中人畜共患细菌病原体,如沙门氏菌属、空肠弯曲菌和单核细胞增生李斯特菌^[81];检测河流沉积物中低浓度的沙门氏菌^[82]。Falzone 等^[83]使用 ddPCR 在实验室环境中模拟水热处理过程快速检测嗜肺军团菌,结果表明,ddPCR

能够准确检测低浓度的嗜肺军团菌,与 RT-qPCR 相比,具有更高的准确性和灵敏度,可以快速检测并避免可能的军团病暴发。

ddPCR 在灵敏度、精度和可重复性方面优于传统定量 PCR,不容易受到 PCR 抑制剂的影响,并且无需标准曲线即可进行绝对定量。一旦整个操作系统和化学试剂的成本大幅降低,样品的处理能力或检测通量和动态范围得到极大提升,这项技术就可以更广泛地应用于环境研究。

4.1.3 mqPCR

mqPCR 在同一反应体系中设计多组荧光标记探针,单次反应可同步检测 4~6 种靶标^[84]。Zhang 等^[85]结合 3 个 qPCR 引物探针组开发优化三重 qPCR 检测,该方法同时检测废水中空肠弯曲杆菌、大肠弯曲杆菌和拉氏弯曲菌。Li 等^[86]将 mqPCR 技术与 PMA 相结合,在一个反应中同时检测水样中活的嗜肺军团菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,应用月桂酰肌氨酸钠增强 PMA 对死菌通透性,结果表明,具有相当的特异性和灵敏度并且缩短了检测时间。

mqPCR 通过在一次运行中结合多个 qPCR 反应,显著提高检测通量,节省检测时间和减少成本。但采用此方法时需要注意引物相互作用的可能性高,对引物特异性和所有引物对的兼容性要求高^[87]。严格的检测设计和充分的优化对于 mqPCR 应用于环境调查至关重要。

4.1.4 小结

dPCR 与 ddPCR 通过绝对定量、高精度及抗抑制剂能力,突破了 qPCR 依赖标准曲线的局限,但高成本与耗时处理限制其广泛应用;mqPCR 通过多靶标同步检测显著提升通量,但引物设计复杂度高,易引发交叉反应。未来需结合技术优势,以 ddPCR 提升低丰度目标检测可靠性,mqPCR 优化高通量筛查效率,同时推动设备微型化与成本降低,构建多技术联用体系,并制定标准化流程,以平衡精准性、效率与经济性,满足复杂水体的动态监测需求。表 3 比较了不同 PCR 的作用机制及优缺点。

4.2 标准化与政策推动

不同实验室在 qPCR 试验操作、引物探针设计、结果分析等环节存在差异,导致数据可比性差。国内外相关组织正积极推动标准化进程。国际标准化组织制定了《分子生物标志物分析 农业和食品生产

表 3 不同 PCR 方法作用机制及应用特性比较

Tab. 3 Comparison of Effect Mechanisms and Application Characteristics of Different PCR Methods

方法	作用机制	优点	局限性
PCR ^[15]	使用引物扩增特定的 DNA 序列,扩增结束后将结果可视化	引物设计的特异性可靠 可以扩增微量的 DNA 应用广泛	只提供最终结果,不进行实时监测 污染可能导致假阴性 需要 PCR 后处理进行可视化 定量能力有限
qPCR ^[16]	利用荧光探针对 DNA 进行实时扩增和定量	快速分析,结果实时可用 灵敏度、准确度、特异性高 动态范围宽,适用范围广	区分近缘序列的能力有限 仪器、分析软件和耗材的成本高 对 PCR 抑制剂敏感 需专业知识
dPCR ^[78]	将样品分成许多单独的反应,实现绝对定量	无需校准曲线的绝对定量 提高低丰度靶标的精密度和准确度 增强稀有靶标的灵敏度 增强对 PCR 抑制剂的稳定性 减少对标准曲线或内参基因的依赖	有限的动态范围,通常低于 qPCR 成本较高 分割错误导致的假阳性/假阴性的易感性较高
ddPCR ^[80]	将样品分割成许多液滴,放大发生在单个液滴中	提高精密度和准确度,比 qPCR 具有更好的重复性 适用于低丰度目标物的检测 降低对 PCR 抑制剂的敏感性 减少对标准曲线或内参基因的依赖	动态范围有限,低于 qPCR 比 qPCR 处理时间长 仪器和试剂成本高 应用复杂
mqPCR ^[84]	在同一体系用多对引物 and 不同荧光探针,经热循环扩增目标核酸,靠实时监测不同荧光信号同步定量多个靶标	同时检测多个靶序列提高检测通量 使用更少的材料 节约时间 降低成本	分析设计的高要求 不同靶标之间的扩增效率不均匀 易发生引物相互作用和试剂竞争

中分子生物标志物分析方法的词汇表》(ISO 16577: 2022),规定了 qPCR 术语、试验流程、性能指标等;《水质 用定量聚合酶链反应(qPCR)浓缩和基因扩增法检测和定量军团菌和/或嗜肺军团菌 第 2 部分:现场方法》(ISO/TS 12869—2: 2024)中规定了使用 qPCR 对军团菌属和嗜肺军团菌进行现场检测和定量的技术要求。我国也依据国情,出台了针对水源性微生物检测的国家标准,如《实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则》(GB/T 42753—2023);《循环冷却水中军团菌的检测》(GB/T 40392—2021)规定了循环冷却水中军团菌 qPCR 检测方法,包括水样采集、保存、运输,核酸提取,qPCR 扩增及结果判定等流程。这些标准化侧重于使用 qPCR 检测军团菌,缺少使用 qPCR 检测其余水源性致病微生物的标准,需要相关组织和机构加快制定针对其余水源性致病微生物的 qPCR 检测标准,进一步完善水体微生物检测的标准体系,提升检测结果的准确性、可靠性和一致性。

5 结论

qPCR 在检测水源性致病微生物领域具有重要价值。它基于荧光信号与 DNA 扩增动态关联原理,

通过精准测定 C_t 值实现对初始模板的定量分析,依据荧光标记物作用方式的差异,在水源性致病微生物检测中发挥不同作用。在常见水源性致病微生物检测方面,qPCR 展现出显著优势。针对细菌,能靶向特异性基因快速定量,克服传统培养法的弊端;检测病毒时,对双链 DNA 病毒和单链 RNA 病毒都有高灵敏度和特异性,mqPCR 技术的出现提升了检测通量。对于原虫,可检测到极低浓度的原虫 DNA,HT-qPCR 技术提高了检测效率,缩短检测时间。在不同水体环境中,qPCR 检测饮用水时实现高灵敏度,在废水与污水处理厂以及娱乐用水的检测中也发挥关键作用。对于区分活菌、死菌,应对抑制剂干扰以及优化引物设计等挑战,研究人员积极探索优化策略,PMA-qPCR 技术有效解决了活菌与死菌区分的难题;通过内部或外部扩增对照、稀释曲线评估抑制剂影响,并采取添加补充剂等措施提升检测灵敏度;设计特异性引物则有效控制了假阳性问题。

dPCR、ddPCR 以及 mqPCR 等新兴技术展现出巨大潜力。dPCR 精度高、对低拷贝数检测灵敏且无需标准曲线;ddPCR 检测精度更高,适用于低丰度目标物检测;mqPCR 提高了检测通量,节省时间

和成本。尽管这些新技术目前存在成本高、引物设计要求严格等局限,但随着技术的不断发展和完善,有望在水源性致病微生物检测领域得到更广泛应用,为保障水体安全和公共卫生提供更强大的技术支撑。

参考文献

- [1] M A, SEBASTIAN D. Evaluation of sensitivity and cost-effectiveness of molecular methods for the co-detection of waterborne pathogens in India[J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(6): 955–963.
- [2] ARTIKA I M, WIYATNO A, MA'ROEF C N. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2020, 81: 104215. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104215.
- [3] PLUTZER J. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water[J]. *Water Research*, 2016, 101: 318–332. DOI: 10.1016/j.watres.2016.05.085.
- [4] RAMÍREZ-CASTILLO F Y, LOERA-MURO A, JACQUES M, et al. Waterborne pathogens: Detection methods and challenges[J]. *Pathogens*, 2015, 4(2): 307–334. DOI: 10.3390/pathogens4020307.
- [5] KUMAR S, NEHRA M, MEHTA J, et al. Point-of-care strategies for detection of waterborne pathogens[J]. *Sensors*, 2019, 19(20): 4476. DOI: 10.3390/s19204476.
- [6] CUI Q, HUANG Y, WANG H, et al. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 24–35. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.02.094.
- [7] DURESSA G, ASSEFA F, JIDA M. Assessment of bacteriological and physicochemical quality of drinking water from source to household tap connection in Nekemte, Oromia, Ethiopia[J]. *Journal of Environmental and Public Health*, 2019: 2129792. DOI: 10.1155/2019/2129792.
- [8] COLLIER S A, DENG L, ADAM E A, et al. Estimate of burden and direct healthcare cost of infectious waterborne disease in the United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, 27(1): 140–149.
- [9] World Health Organization. Diarrhoeal disease [EB/OL]. (2024-03-07) [2025-05-09]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- [10] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first addendum[EB/OL]. (2022-03-21) [2025-05-09]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064>.
- [11] TANG M L Y, LAU S C K. Strategy to evaluate changes in bacterial community profiles and bacterial pathogen load reduction after sewage disinfection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 919207. DOI: 10.3389/fmicb.2022.919207.
- [12] GUO L, WAN K, ZHU J, et al. Detection and distribution of VBNC/viable pathogenic bacteria in full-scale drinking water treatment plants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124335. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124335.
- [13] OON Y L, OON Y S, AYAZ M, et al. Waterborne pathogens detection technologies: Advances, challenges, and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1286923. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1286923.
- [14] ALBINANA-GIMENEZ N. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 158(1/2): 104–109. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.02.004.
- [15] CANENE-ADAMS K. General PCR[J]. *Methods Enzymol*, 2013, 529: 291–298. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0.
- [16] PATEL C B, SHANKER R, GUPTA V K, et al. Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of enterobacter: An emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable water[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00172.
- [17] ZHANG Q, ISHII S. Improved simultaneous quantification of multiple waterborne pathogens and fecal indicator bacteria with the use of a sample process control[J]. *Water Research*, 2018, 137: 193–200. DOI: 10.1016/j.watres.2018.03.023.
- [18] COLLINS S, JORGENSEN F, WILLIS C, et al. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(4): 1158–1169. DOI: 10.1111/jam.12911.
- [19] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986–994. DOI: 10.1101/gr.6.10.986.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [21] FERDOUS J, HOSSAIN Z Z, TULSIANI S, et al. Optimization and validation of real time PCR assays for absolute quantification of toxigenic *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*[J]. *Tropical Biomedicine*, 2016, 33(4): 641–651.
- [22] JOTHIKUMAR N, MURPHY J L, HILL V R. Detection and identification of *Giardia* species using real-time PCR and sequencing[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 189: 106279. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106279.
- [23] BACHMAN J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR)[J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 530: 67–74. DOI: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.
- [24] 吴妍, 张晓, 张良, 等. 水体中致病菌富集和核酸提取方法

- 及优化[J]. 中国公共卫生, 2023, 39(11): 1496–1500.
- WU Y, ZHANG X, ZHANG L, et al. Membrane filtration enrichment and optimization of nucleic acid extraction for qPCR detection of pathogenic bacteria in water-an experiment with *Mycobacterium abscessus* tester strain [J]. Chinese Journal of Public Health, 2023, 39(11): 1496–1500.
- [25] NASREEN T, HUSSAIN N A S, HO J Y, et al. Assay for evaluating the abundance of vibrio cholerae and its O₁ serogroup subpopulation from water without DNA extraction [J]. Pathogens, 2022, 11 (3): 363. DOI: 10.3390/pathogens11030363.
- [26] BOTES M, DE KWAADSTENIET M, CLOETE T E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(1): 91–108. DOI: 10.1007/s00216-012-6399-3.
- [27] SHRESTHA S, MALLA B, HARAMOTO E. High-throughput microfluidic quantitative PCR system for the simultaneous detection of antibiotic resistance genes and bacterial and viral pathogens in wastewater [J]. Environment Research, 2024, 255: 119156. DOI: 10.1016/j.envres.2024.119156.
- [28] SHAHIN K, BAO H, KOMIJANI M, et al. Isolation, characterization, and PCR-based molecular identification of a siphoviridae phage infecting *Shigella dysenteriae* [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 131: 175–180. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.03.037.
- [29] HENNESSY T W, RITTER T, HOLMAN R C, et al. The relationship between in-home water service and the risk of respiratory tract, skin, and gastrointestinal tract infections among rural Alaska natives[J]. Public Health, 2008, 98(11): 2072–2078.
- [30] DONG K, PAN H, YANG D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(1): 149–183.
- [31] WALKER D I, MCQUILLAN J, TAIWO M, et al. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters [J]. Water Research, 2017, 126: 101–110. DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.032.
- [32] RICCHI M, BERTASIO C, BONIOTTI M B, et al. Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01174.
- [33] LIU P, ZENG J, JIANG C, et al. Poly (vinylpyrrolidone)-enhanced CRISPR-cas system for robust nucleic acid diagnostics [J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(39): 15797–15807.
- [34] WU H, JUEL M A I, EYTCHESON S, et al. Temporal and spatial relationships of CrAssphage and enteric viral and bacterial pathogens in wastewater in North Carolina [J]. Water Research, 2023, 239: 120008. DOI: 10.1016/j.watres.2023.120008.
- [35] XIAO H, GUAN D, CHEN R, et al. Molecular characterization of echovirus 30 – associated outbreak of aseptic meningitis in Guangdong in 2012 [J]. Virology Journal, 2013, 10: 263. DOI: 10.1186/1743-422X-10-263.
- [36] MENA K D, GERBA C P. Waterborne adenovirus [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 198: 133–167. DOI: 10.1007/978-0-387-09647-6_4.
- [37] BOEHM A B, SILVERMAN A I, et al. Systematic review and meta-analysis of decay rates of waterborne mammalian viruses and coliphages in surface waters [J]. Water Research, 2019, 164: 114898. DOI: 10.1016/j.watres.2019.114898.
- [38] Office of Research and Development National Exposure Research Laboratory. EPA method 1615: Enteroviruses and noroviruses in water by cell culture and RT-PCR [R]. Washington D. C.: United States Environmental Protection Agency, 2018.
- [39] FONG T T, LIPP E K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005, 69: 357–371. DOI: 10.1128/mmbr.69.2.357-371.2005.
- [40] COSTAFREDA M I, BOSCH A, PINTÓ R M. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3846–3855.
- [41] BENNETT S, GUNSON R N. The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 242: 30–34. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.016.
- [42] LIU Q, JIN X, CHENG J, et al. Advances in the application of molecular diagnostic techniques for the detection of infectious disease pathogens [J]. Molecular Medicine Reports, 2023, 27(5): 104–104.
- [43] AUGENDRE L, COSTA D, ESCOTTE-BINET S, et al. Surrogates of foodborne and waterborne protozoan parasites: A review [J]. Food and Waterborne Parasitology, 2023, 33: e00212. DOI: 10.1016/j.fawpar.2023.e00212.
- [44] RYAN UM, FENG Y, FAYER R, et al. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021) [J]. International Journal for Parasitology, 2021, 51(13/14): 1099–1119. DOI: 10.1016/j.ijpara.2021.08.007.
- [45] MORENO-MESONERO L, AMORÓS I, MORENO Y, et al. Simultaneous detection of less frequent waterborne parasitic protozoa in reused wastewater using amplicon sequencing and qPCR techniques [J]. Journal of Environmental Management, 2022, 314: 115029. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115029.
- [46] DUAN F, HAN Z, TIAN T, et al. Development of a high-

- throughput qPCR assay for detecting waterborne protozoa and helminths across different environmental media in China [J]. China CDC Weekly, 2025, 7(3): 101–106. DOI: 10.46234/ccdcw2025.016.
- [47] World Health Organization. Introduction to water-related infectious diseases[EB/OL]. (2023-06-13) [2025-05-06]. https://www.who.int/docs/librariesprovider2/default-document-library/module_1.1_introduction-wrid_ds_220831.pdf.
- [48] 中华人民共和国国家市场监督管理总局, 中华人民共和国国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法 第12部分:微生物指标; GB/T 5750.12—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
State Administration for Market Regulation of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Standards examination methods for drinking water—Part 12: Microbiological indices; GB/T 5750.12—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [49] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局, 中华人民共和国山西出入境检验检疫局. 饮用水中军团菌检测; SN/T 2528—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China. Detection of legionella in drinking water; SN/T 2528—2010[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [50] LECLERC H, SCHWARTZBROD L, DEI-CAS E. Microbial agents associated with waterborne diseases[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2002, 28(4): 371–409. DOI: 10.1080/1040-840291046768.
- [51] LUKA G, SAMIEI E, TASNIM N, et al. Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of Cryptosporidium[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 421: 126714. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126714.
- [52] WANG C F, YE Q H, JIANG A M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* detection using conventional PCR and quantitative real-time PCR based on species-specific novel gene targets identified by pangenome analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 820431. DOI: 10.3389/fmicb.2022.820431.
- [53] SIDSTEDT M, JANSSON L, NILSSON E, et al. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction[J]. Analytical Biochemistry, 2015, 487: 30–37. DOI: 10.1016/j.ab.2015.07.002.
- [54] CHEN N T, CHANG C W. Quantification of *Legionella pneumophila* by real-time quantitative PCR from samples with humic acid and ferric ion[J]. Science of the Total Environment, 2012, 414: 608–613. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.005.
- [55] 王若玮. 淋浴软管滞留水微生物再生长影响因素及其溯源研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2019.
- WANG R W. Research on the influencing factors and source tracing of microbial regrowth in standing water of shower hoses [D]. Changsha: Hunan University, 2019.
- [56] VIDARSDOTTIR L, GOROSHCHUK O, KOLOSENKO I, et al. Designing siRNA and evaluating its effect on RNA targets using qPCR and western blot [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2036: 53–72. DOI: 10.1007/978-1-4939-9670-4_3.
- [57] AJONINA C, BUZIE C, RUBIANDINI R H, et al. Microbial pathogens in wastewater treatment plants (WWTP) in Hamburg [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A, 2015, 78(6): 381–387. DOI: 10.1080/15287394.2014.989626.
- [58] WANG H, NEYVALDT J, ENACHE L, et al. Variations among viruses in influent water and effluent water at a wastewater plant over one year as assessed by quantitative PCR and metagenomics [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(24): e02073–20. DOI: 10.1128/AEM.02073–20.
- [59] ERAMO A, MORALES W R, FAHRENFELD N L. Viability-based quantification of antibiotic resistance genes and human fecal markers in wastewater effluent and receiving waters [J]. Science of the Total Environment, 2019, 656: 495–502. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.325.
- [60] SLIPKO K, MARANO R B, CYTRYN E, et al. Effects of subinhibitory quinolone concentrations on functionality, microbial community composition, and abundance of antibiotic resistant bacteria and *qnrS* in activated sludge [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(1): 104783. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104783.
- [61] MAESTRE-CARBALLA L, NAVARRO-LÓPEZ V, MARTINEZ-GARCIA M. City-scale monitoring of antibiotic resistance genes by digital PCR and metagenomics [J]. Environmental Microbiome, 2024, 19(1): 16. DOI: 10.1186/s40793-024-00557-6.
- [62] NORESE C, NICOSIA E, CORTESE K, et al. SARS-CoV-2 presence in recreational seawater and evaluation of intestine permeability: Experimental evidence of low impact on public health[J]. Frontiers in Public Health, 2024, 12: 1326453. DOI: 10.3389/fpubh.2024.
- [63] HASSANEIN F, MASOUD I M, FEKRY M M, et al. Environmental health aspects and microbial infections of the recreational water: Microbial infections and swimming pools[J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 302. DOI: 10.1186/s12889-023-15183-z.
- [64] SALEEM F, SCHELLHORN HE, SIMHON A, et al. Same-day *Enterococcus* qPCR results of recreational water quality at two Toronto beaches provide added public health protection and reduced beach days lost[J]. Canadian Journal of Public Health-revue Canadienne de Sante Publique, 2023, 114(4): 676–687. DOI: 10.17269/s41997-023-00763-8.

- [65] AN X L, WANG J Y, PU Q, et al. High-throughput diagnosis of human pathogens and fecal contamination in marine recreational water[J]. *Environmental Research*, 2020, 190: 109982. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109982.
- [66] GUO J, FAN F, WANG W, et al. Development of PMA-qPCR assay to accurately and reproducibly quantify viable bacteria of *Paenibacillus polymyxa* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2023, 76(11): 109127. DOI: 10.1093/lambio/ovad127.
- [67] CHIAO T H, CLANCY T M, PINTO A, et al. Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(7): 4038–4047. DOI: 10.1021/es4055725.
- [68] DESHMUKH R, BHAND S, ROY U. BCIG-SMAC medium and PMA-qPCR for differential detection of viable *Escherichia coli* in potable water [J]. *Iranian Journal of Microbiology*, 2021, 13(5): 624–631. DOI: 10.18502/ijm.v13i5.7427.
- [69] WILSON I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 3741–3751. DOI: 10.1128/aem.63.10.3741–3751.1997.
- [70] US Environmental Protection Agency. Method 1611: Enterococci in water by TaqMan[®] quantitative polymerase chain reaction (qPCR) [R]. Washington D. C.: United States Environmental Protection Agency Office of Water, 2012.
- [71] CAO Y, GRIFFITH J F, DOREVITCH S, et al. Effectiveness of qPCR permutations, internal controls and dilution as means for minimizing the impact of inhibition while measuring Enterococcus in environmental waters [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(1): 66–75. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05305.
- [72] BORCHARDT M A, BOEHM A B, SALIT M, et al. The environmental microbiology minimum information (EMMI) guidelines: qPCR and dPCR quality and reporting for environmental microbiology [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(15): 10210–10223.
- [73] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611–622.
- [74] BUSTIN S, HUGGETT J. qPCR primer design revisited [J]. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2017, 14: 19–28. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001.
- [75] BUSTIN S, NOLAN T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2017, 47(10): 756–774.
- [76] PEREZ-BOU L, GONZALEZ-MARTINEZ A, CABRERA J J, et al. Design and validation of primer sets for the detection and quantification of antibiotic resistance genes in environmental samples by quantitative PCR [J]. *Microbial Ecology*, 2024, 87(1): 71. DOI: 10.1007/s00248-024-02385-0.
- [77] QUAN P L, SAUZADE M. dPCR: A technology review [J]. *Sensors*, 2018, 18(4): 1271. DOI: 10.3390/s18041271.
- [78] TAN L L, LOGANATHAN N, AGARWALLA S, et al. Current commercial dPCR platforms: Technology and market review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(3): 433–464. DOI: 10.1080/07388551.2022.2037503.
- [79] SHI X J, LIU G, SHI L L, et al. The detection efficiency of digital PCR for the virulence genes of waterborne pathogenic bacteria [J]. *Water Supply*, 2021, 21: 2285–2297. DOI: 10.2166/ws.2021.056.
- [80] LEI S W, CHEN S, ZHONG Q P. Digital PCR for accurate quantification of pathogens: Principles, applications, challenges and future prospects [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 750–759. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.132.
- [81] ROTHROCK M J, HIETT K L, KIEPPER B H, et al. Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2013, 3: 403–411. DOI: 10.4236/aim.2013.35055.
- [82] SINGH G, SITHEBE A, ENITAN A M, et al. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection of *Salmonella* and its application for river sediments [J]. *Journal of Water and Health*, 2017, 15(4): 505–508. DOI: 10.2166/wh.2017.259.
- [83] FAZZONE L, GATTUSO G, LOMBARDO C, et al. Droplet digital PCR for the detection and monitoring of *Legionella pneumophila* [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46(5): 1777–1782. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4724.
- [84] HAWKINS S F C, GUEST P C. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1546: 125–133. DOI: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- [85] ZHANG S X, SHI J H, LI X, et al. Triplex qPCR assay for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* monitoring in wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 892: 164574. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164574.
- [86] LI H, XIN H, LI S F. Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(24): 14249–14256.
- [87] PARUCH L. Molecular diagnostic tools applied for assessing microbial water quality [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(9): 5128. DOI: 10.3390/ijerph19095128.