

· 特约来稿 ·

DOI:10.3969/j.issn.1674-6732.2021.03.001

水环境中病毒检测技术研究进展

刘鹏, 车子凡, 张徐祥*

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 综述了水环境病毒检测技术的研究进展。介绍了过滤法、吸附法、离心法、混凝法等水环境病毒富集方法的原理和优缺点;总结了基于聚合酶链式反应(PCR),包括巢式PCR、多重PCR、实时荧光定量PCR、细胞联合培养PCR和数字PCR,以及高通量测序等分子生物学技术在水环境病毒检测中的应用;指出了水环境中病毒检测技术当前存在的问题和未来发展方向,为水环境中病毒的检测与管控提供技术支撑。

关键词: 水环境;病毒检测;富集;分子生物学技术

中图分类号: X831;R123.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6732(2021)03-0001-07

Progress in Detection Technologies of Viruses in Water Environment

LIU Peng, CHE Zi-fan, ZHANG Xu-xiang*

(The State Key Lab of Pollution Control and Resource Reuse Research of China, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: This study briefly reviewed detection technologies of viruses in water environment. In this study, we introduced several methods for the enrichment of viruses in water environment and analyzed their principles, advantages and disadvantages. Besides, we also summarized the application of molecular biotechnologies in viruses detection in water environment, such technologies includes PCR-based molecular methods like nested PCR, multiplex PCR, quantitative real-time PCR, integrated cell culture PCR, digital PCR and high-throughput sequencing. Furthermore, the review provides references for future research on detection technologies of viruses in water environment, which can contribute positively to the monitoring and control of viruses in water environment.

Key words: Water environment; Viruses detection; Enrichment; Molecular biotechnology

近年来,全球范围内介水传染病的暴发已严重危害到各国人民生命健康,据世界卫生组织报道,每年因介水传染病而死亡的人数超过200万人,其中58%的死亡病例与安全饮用水的缺乏、恶劣的环境卫生和个人卫生状况有关^[1]。介水传染病的病原体主要包括细菌、病毒、原生动物和寄生虫等,其中病毒具有更强的传染性,对常规水处理工艺的耐受性更强,对人体健康的威胁更大。因此,加强对水环境中病毒的监测,对于控制病毒的环境传播,降低疾病暴发风险,保障人体健康,具有重要意义。

长期以来,我国对水环境中病原微生物的监测一直依赖于粪便指示菌的检测。但是,以粪大肠菌群、大肠埃希氏杆菌等为代表的粪便指示菌很难准确反映水环境中病原微生物尤其是病毒的污染水平^[2-4]。为保证水环境的生物安全,必须建立高效、稳定和经济的病毒检测方法,从而实现对病毒的直接检测。近年来,针对水环境中病毒的检测已有大量文献报道,不同研究之间采用的检测方法存在较大差异。现重点总结了水环境中病毒富集方法和分子生物学检测方法,以期为水环境中病毒检测与控制提供方法学支撑。

收稿日期:2020-03-01;修订日期:2021-03-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(52025102);江苏省研究生科研与实践创新计划基金资助项目(KYCX18_0034);南京大学优秀博士研究生创新能力提升计划B资助项目(202002B079)

作者简介:刘鹏(1991—),男,博士研究生,主要从事环境病原微生物分析检测与风险控制研究。

*通讯作者:张徐祥 E-mail:zhangxx@nju.edu.cn

1 病毒富集方法

与临床样品相比,水环境中病毒含量较低,因此,对其检测必须依赖高效的前处理方法,通过富集浓缩提高待测样品中病毒的浓度,从而提高病毒的检测能力。相比于细菌,水环境中病毒的尺寸更小,其平均尺寸一般不超过 100 nm。因此,水环境中细菌富集常用的微孔滤膜过滤法,对病毒的富集效果不佳。目前,常用于水环境中病毒的富集方法主要包括过滤法、吸附法、离心法和混凝法等。

1.1 过滤法

过滤法的原理是利用孔径小于病毒颗粒尺寸的滤膜对病毒颗粒进行截留,类似于使用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜富集水体中的细菌。Wang 等^[5]利用孔径分别为 0.45, 0.2 和 0.1 μm 的微孔滤膜对污水处理厂污水进行分级过滤,仅保留 0.1 μm 的微孔滤膜用于病毒分析。该方法原理清晰,所需实验器材较少,但由于微孔滤膜过水面积和孔径均较小,极易出现滤膜堵塞现象。此外,该方法仅获得尺寸介于 0.1 ~ 0.2 μm 的病毒颗粒,对于尺寸 > 0.2 μm (如埃博拉病毒^[6]、烟草花叶病毒^[7]等)或尺寸 < 0.1 μm (如轮状病毒^[8]、甲肝病毒^[9]和寨卡病毒^[10]等)的病毒颗粒无法有效富集。

切向流过滤技术能有效克服垂直过滤法过水面积小、滤膜易堵塞的缺点,用于处理较大体积的水环境样品^[11]。使用 0.2 μm 和 99.97 ku 孔径的两级滤膜,分别实现水样中细菌等大尺寸颗粒物的去除和病毒颗粒的富集,滤膜过水面积达 1 m^2 ,一次性可处理 100 L 水样。目前,该方法已用于海水^[12]和回用水^[13]等样品的处理,能较好地富集病毒颗粒。但切向流过滤系统较为复杂,使用成本高,样品处理耗时较长,单个样品处理时间需 10 h 以上,且过滤处理后的水样体积仍超过 50 mL,需依赖密度梯度离心等浓缩方法进行后续处理^[11]。

1.2 吸附法

吸附法是利用水中病毒颗粒携带一定的电荷,能吸附于荷电滤膜表面的特点,对水样中病毒颗粒进行富集的方法。吸附于滤膜表面的病毒颗粒可通过较小体积缓冲液洗脱,从而达到富集的目的。根据滤膜表面携带电荷的差异,滤膜主要包括正电荷滤膜和负电荷滤膜。

病毒颗粒的等电点一般介于 3.5 ~ 7^[14],因此,在弱酸、中性或者碱性水样中,病毒颗粒携带负电,能直接吸附于正电荷滤膜表面。常用的正电荷

滤膜包括 NanoCeram 滤膜和 1MDS 滤膜。1MDS 滤膜最早用于水样中病毒颗粒的富集,在河水和饮用水中均得到广泛应用^[15],对饮用水中埃可病毒 1 型的平均回收率为 33%^[16],而对河水和饮用水中脊髓灰质炎病毒的加标回收率分别为 36% 和 67%^[17]。1MDS 滤膜使用方便,不需要对水样进行预处理,处理水样体积大(超过 1 000 L),且不易堵塞。但是,该滤膜价格高昂,单个滤膜价格超过 200 美元,日常监测使用成本过高。

NanoCeram 滤膜是一种材质为氧化铝纤维的正电荷滤膜,价格低于 1MDS 滤膜,并且能取得不亚于 1MDS 滤膜的病毒回收效果。通过向污水处理厂出水中添加脊髓灰质炎病毒,分别使用 1MDS 滤膜和 NanoCeram 滤膜对病毒进行富集,2 种滤膜对病毒的截留效率分别超过 97% 和 89%,而 NanoCeram 滤膜的洗脱效率和洗脱液二次浓缩回收率要高于 1MDS 滤膜,1MDS 滤膜和 NanoCeram 滤膜的整体回收率为 23% 和 57%^[18]。Karim 等^[17]比较了 2 种滤膜对饮用水和河水中脊髓灰质炎病毒和诺瓦克病毒的回收效率,同样发现 NanoCeram 滤膜对病毒的回收率不低于 1MDS 滤膜。NanoCeram 滤膜对不同病毒的回收率也存在一定差异。Pang 等^[19]发现对柯萨奇病毒、埃可病毒、诺如病毒、轮状病毒和腺病毒 41 型的回收率分别为 41% ~ 67%, 22% ~ 90%, 23% ~ 44%, 24% ~ 46% 和 24% ~ 35%。Gibbons 等^[20]对 40 L 海水中病毒进行富集,发现 NanoCeram 滤膜对诺如病毒和腺病毒的截留效率均高于 98%,但是对腺病毒的洗脱效率较差,导致腺病毒的回收率不超过 3%,远远低于诺如病毒 96% 的回收率。

正电荷滤膜可直接用于吸附病毒颗粒,而负电荷滤膜用于吸附病毒颗粒时需对水样进行一定的处理。一般情况下,病毒颗粒携带负电荷,可以通过向水中添加一定浓度的 Mg^{2+} 或 Al^{3+} 等多价阳离子,通过阳离子架桥作用使病毒颗粒吸附于负电荷滤膜表面^[21]。当病毒颗粒吸附于滤膜表面后,使用一定浓度的稀硫酸淋洗滤膜去除阳离子,同时将 pH 值降低至病毒颗粒等电点以下,此时病毒颗粒携带正电荷,从而直接吸附于滤膜表面。最后,通过较小体积的 NaOH 溶液洗脱病毒颗粒完成富集过程。或者直接将水样 pH 值调节至 3.5 左右,低于病毒颗粒等电点,使得病毒颗粒携带正电荷,从而直接吸附于滤膜表面^[22],再直接使用 NaOH 溶液洗脱病毒

颗粒。通过使用添加 Mg^{2+} 的方法处理水样,负电荷滤膜对病毒加标后的 250 ~ 500 mL 超纯水、自来水、瓶装水、河水以及池塘水中的诺如病毒回收率分别为 186%、80%、167%、15% 和 39%,高于对脊髓灰质炎病毒的回收率^[21]。与正电荷滤膜相比,负电荷滤膜对大部分病毒的回收率更高,使用更为便捷,价格更为便宜,而其最大的劣势在于很难处理大体积水样,其处理能力一般不超过 10 L^[15]。近年来,Hata 等^[23]设计了一种筒式混合纤维酯材质的负电荷滤膜,其处理体积可达 1 000 L,对河水和自来水中病毒的回收率为 10% ~ 54%。

除滤膜外,一些特殊材质的填料也可被用于病毒的吸附,比如硅胶^[24]、硅藻土^[25]、玻璃纤维^[26]和活性炭^[27]等。Lambertini 等^[26]使用玻璃纤维对饮用水中病毒进行富集,对脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒 18 型、腺病毒 41 型和诺如病毒的回收分别为 70%、14%、19%、21% 和 29%。

1.3 离心法

使用过滤法和吸附法对病毒进行富集,可得到体积在 10 ~ 500 mL 的病毒浓缩液,但需进一步浓缩。对于体积较小的样品,可以直接使用超高速离心法进行处理^[27-30]。Kapoor 等^[28]与 Victoria 等^[29]分别使用 35 000 g 离心 3 h 和 22 000 g 离心 2 h 进行病毒有效分离。超高速离心法富集适用于体积较小的样品,且依赖于超高速冷冻离心机。

1.4 混凝法

混凝法是通过添加混凝剂,使水中的胶体粒子与病毒颗粒结合,再通过离心沉降富集病毒颗粒的方法。常见的混凝剂可分为有机混凝剂和无机混凝剂,有机混凝剂如 PEG8000^[31]、脱脂奶粉^[32]、牛肉膏^[33-34]等,无机混凝剂如氯化铁^[35-36]、氯化铝^[37]。通过添加混凝剂,可以在较低离心转速下实现病毒颗粒的沉降和分离,摆脱对超高速冷冻离心机的依赖。

2 基于聚合酶链式反应的病毒检测方法

环境病毒学肇始于 20 世纪对污水和饮用水中脊髓灰质炎病毒的检测,其研究目的是为评估脊髓灰质炎病毒的环境行为以及公共安全风险^[38]。由于病毒本身没有繁殖能力,严格依赖宿主细胞,因此早期病毒检测多依赖传统的细胞培养法,实验中需通过观测细胞病变来判断。然而,由于多数病毒难以培养,如肝炎病毒和诺瓦克病毒等,部分病毒培养过程中宿主细胞很难出现明显的病变反应,且

病毒侵染细胞的过程较长,难以实现病毒快速、敏感和便捷的检测。分子生物学技术,尤其是聚合酶链式反应(PCR)技术的发展,为实现病毒快速、灵敏和特异的检测提供了可能。

针对不同的病毒设计特异性引物和探针序列,采用普通 PCR 或逆转录 PCR(RT-PCR)可直接对病毒进行定性检测。Verheyen 等^[39]利用 PCR 和 RT-PCR 技术对 287 处水源水中腺病毒和轮状病毒进行了检测,发现 2 种病毒的阳性率分别为 12.9% 和 2.9%。除了普通 PCR 和 RT-PCR,病毒检测还包括巢式 PCR(Nested PCR)、多重 PCR(Multiplex PCR)、实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qPCR)、细胞联合培养 PCR(Integrated cell culture PCR, ICC-PCR)和数字 PCR(Digital PCR, dPCR)等。

2.1 巢式 PCR

为提高检测的灵敏度和特异性,在普通 PCR 的基础上开发出了巢式 PCR 技术。通过 2 轮 PCR 反应,使用 2 套引物扩增特异性 DNA 片断,其中第 2 对引物能特异性地扩增位于首轮 PCR 产物中的一段 DNA 片断。Lam 等^[40]通过巢式 PCR 检测了包括甲型流感病毒在内的 21 种呼吸道病毒,结果表明其灵敏度是普通 PCR 的 100 ~ 1 000 倍。

2.2 多重 PCR

针对普通 PCR 仅能检测单个病毒的缺点,多重 PCR 技术通过在单个 PCR 反应中设计多个引物,能同时实现对多种病毒的检测^[41]。Hao 等^[42]开发出 2 套引物体系,实现了犬类 4 种呼吸道病毒和 4 种肠道病毒的同时检测。然而,不同引物退火温度的差异导致多重 PCR 很难达到最佳反应条件。某些情况下,仍需依赖寡核苷酸杂交技术对实验结果的特异性进行验证^[43]。

2.3 实时荧光定量 PCR

普通 PCR 只能实现对病毒的定性检测,而 qPCR 通过收集 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号对起始模板进行定量分析。根据使用荧光物质的不同,可以分为染料法和探针法 2 类^[44]。与染料法相比,探针法需额外使用探针序列对目的基因片段进行扩增,特异性更强,目前在环境病毒检测中的应用最为广泛^[36]。

2.4 细胞联合培养 PCR

将细胞培养和 PCR 相结合,用于环境中具有实际感染能力病毒的检测。原理是通过 PCR 方法

快速检测病毒感染宿主后在细胞内复制时产生的病毒核酸来检测具有感染性的病毒,比单纯的细胞培养法和 PCR 方法更灵敏。Ryu 等^[45]利用绿猴肾细胞系(buffalo green monkey kidney, BGMK)对柯萨奇病毒 A10 型、埃可病毒 10 型、脊髓灰质炎病毒和肠病毒 70 型进行培养至出现细胞病变,再提取病毒核酸利用 PCR 技术进行检测。与细胞培养法相比,ICC-PCR 能够大大缩短检测时间,但仍存在无法精确定量的问题。

2.5 数字 PCR

近年来,dPCR 在病原微生物的检测中得到越来越多的应用。dPCR 是一种基于单分子 PCR 进行计数的核酸定量方法,采用当前分析化学热门研究领域的微流控或微滴化方法,将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中,每个反应器的核酸模板数少于或者等于 1 个。经过 PCR 循环后,有 1 个核酸分子模板的反应器会给出荧光信号,而没有模板的反应器则无荧光信号。根据荧光信号的相对比例和反应器体积推算原始溶液的核酸浓度^[50]。与 qPCR 技术相比,该方法对目的基因片段的定量不依赖于标准曲线,并且具有更低的检测限和灵敏度。在生菜和饮用水甲型肝炎病毒和诺如病毒的检测中,dPCR 对病毒的灵敏度不低于 qPCR,并且在 PCR 抑制剂存在的情况下仍可获得稳定的定量结果^[51]。

采用基于 PCR 的方法检测实际环境样品病毒含量时,除 dPCR 外,其余几种方法检测灵敏度极易受 PCR 抑制剂的影响^[46]。病毒检测前的富集过程致使大量 PCR 抑制剂同时被富集。PCR 抑制剂可能造成样品裂解,目标核酸片段降解,并干扰目的基因扩增^[47]。例如,在进行大体积水样病毒检测时,天然有机物的存在会降低 PCR 扩增效率,导致 95% 加标水样中鼠诺如病毒的回收率不足 10%^[48]。因此,需要在实验过程中添加特定的病毒株设置实验对照,从而对实验的各个流程进行质量控制,包括病毒富集、核酸提取和 PCR 过程^[49]。根据内标病毒株添加阶段不同,实验对照包括全流程对照(样品富集前加入内标)、分子过程对照(核酸提取前加入内标)和 PCR 对照(PCR 前加入内标)^[49]。

3 基于高通量测序技术的病毒检测方法

PCR 检测法局限于对单个或数个病毒的检

测,难以实现对整个病毒群落组成或病毒遗传多样性的全面检测。近年来,迅猛发展的高通量测序技术和宏基因组技术,逐步取代以克隆文库为代表的研究病毒遗传多样性的传统方法^[52],为环境中病毒的高通量检测和新型病毒的挖掘打开了一扇崭新的大门^[49,53]。

与细菌不同,病毒中不存在类似于 16S rRNA 基因片段的分子进化标志,无法使用特定的引物扩增保守区域来研究病毒遗传多样性,必须对病毒全部基因片段进行测序^[54]。病毒宏基因组学,也被称为宏病毒组学,是通过提取环境样品中病毒的核酸(DNA 或 RNA),结合高通量测序技术对全部核酸片段进行测序的技术,主要包括病毒颗粒分离、核酸提取(DNA 或 RNA)、RNA 反转录为 cDNA、核酸片段化和测序等流程^[55]。在完成高通量测序后,如何从海量数据中识别病毒序列成为制约宏病毒组学技术发展和应用的关键问题。近年来,通过对高通量测序的生物信息学分析,研究者们开发出了一系列免费的生物信息学软件。但各软件在病毒序列识别的原理、准确性和对计算机性能的依赖存在较大的差异。目前常用的宏病毒组学中病毒序列识别生物信息学软件见表 1。

表 1 宏病毒组学中病毒序列识别生物信息学软件

软件名	主要功能	参考文献
VirMAP	同时利用核酸和蛋白序列信息,实现对序列的物种注释	[56]
ViromeScan	通过将短序列直接与病毒基因组比对,得到病毒群落的物种组成	[57]
VirFinder	利用病毒序列与其他序列的 k-mer 特征差异,通过机器学习的方法识别重叠群中的病毒序列	[58]
VirSorter	将重叠群中预测到的开放阅读框与多种蛋白数据库比对,从而识别病毒序列	[59]
CheckV	评估组装后病毒基因组的质量和完整性	[60]

宏病毒组学技术已经在医疗诊断、传染病暴发和环境病毒的检测中得到了广泛的应用。临床诊断是目前宏病毒组应用最为广泛的领域。病毒的临床诊断通常依赖于严格的培养和诊断测试,而宏病毒组学技术可用于罕见病毒或新型病毒的快速鉴别。如 2009 年甲型流感(H1N1)暴发期间,高通量测序技术在新型流感病毒的鉴别和分型中发挥了重大作用^[61]。在 2019 年底出现的新型冠状病毒肺炎疫情中,中国科学家于 2020 年 1 月 11 日即

在NCBI数据库公布新型冠状病毒基因组序列,为后期疫情防控提供了重要依据^[62]。

复杂环境中病毒的多样性由于研究手段的限制一直被严重低估,基于高通量测序技术的宏病毒组学技术在病毒检测中的应用,揭示了不同环境病毒丰富的多样性。近年来,宏病毒组学技术被广泛应用于水环境、土壤环境^[63-66]、大气环境^[67]中病毒的检测。其中,包括市政污水^[68-69]、养殖废水^[70]、医疗废水^[71]、娱乐水体^[72]、海水^[73]在内的水环境中均发现了多种已知和未知的病毒。

4 结语

准确检测水环境中病毒,是水环境生物安全保障的关键。目前,在病毒样品制备的实际操作中,常采用多种富集方法相结合的策略,极大提高了富集效率。同时,PCR及其衍生技术和高通量测序技术则为水环境中病毒快速、准确和全面检测提供了基础。但是,目前水环境病毒检测方法仍存在问题,主要包括:(1)缺乏统一标准的病毒富集方法。不同研究者之间采用的富集方法各异,病毒的回收率存在较大差异,导致不同研究之间缺乏可比性;(2)由于病毒存在较高的基因突变,而基于PCR技术的病毒检测方法依赖于准确高效的引物和探针序列设计,导致参考已有研究的引物及探针序列可能会低估环境中病毒的丰度;(3)目前采用基于宏病毒组学技术检测水环境病毒时,不同分析软件结果之间存在较大差异,缺少统一的分析流程。针对以上问题,亟须建立水环境中病毒富集的标准方法,这也有赖于相关部门出台指导手册或相关标准。此外,针对病毒的分子生物学检测方法,则应进一步完善并实时更新已知病毒的核酸序列信息,构建更为全面、准确的病毒数据库,从而为水环境病毒检测技术标准化提供支撑。

【参考文献】

- [1] RAMÍREZ - CASTILLO F Y, LOERA - MURO A, JACQUES M, et al. Waterborne pathogens: detection methods and challenges[J]. *Pathogens*, 2015, 4(2): 307 - 334.
- [2] WEN Q X, TUTUKA C, KEEGAN A, et al. Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants[J]. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90(3): 1442 - 1447.
- [3] FARKAS K, WALKER D I, ADRIAENSSENS E M, et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment[J]. *Water Research*, 2020, 181: 115926.
- [4] HATA A, KITAJIMA M, KATAYAMA H. Occurrence and reduction of human viruses, F - specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full - scale wastewater treatment plant in Japan[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(2): 545 - 554.
- [5] WANG Y, JIANG X, LIU L, et al. High - resolution temporal and spatial patterns of virome in wastewater treatment systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(18): 10337 - 10346.
- [6] FELDMANN H, JONES S, KLENK H - D, et al. Ebola virus: from discovery to vaccine[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(8): 677 - 685.
- [7] HARRISON B D, WILSON T M A, KLUG A. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly[J]. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 1999, 354(1383): 531 - 535.
- [8] ESTES M K, COHEN J. Rotavirus gene structure and function[J]. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 1989, 53(4): 410 - 449.
- [9] FEINSTONE S M, KAPIKIAN A Z, PURCELL R H. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness[J]. *Science*, 1973, 182(4116): 1026 - 1028.
- [10] BOIGARD H, ALIMOVA A, MARTIN G R, et al. Zika virus - like particle (VLP) based vaccine[J]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(5): e0005608.
- [11] THURBER R V, HAYNES M, BREITBART M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes[J]. *Nature Protocol*, 2009, 4(4): 470 - 483.
- [12] HURWITZ B L, SULLIVAN M B. The Pacific Ocean virome (POV): a marine viral metagenomic dataset and associated protein clusters for quantitative viral ecology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57355.
- [13] ROSARIO K, NILSSON C, LIM Y W, et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(11): 2806 - 2820.
- [14] MICHEN B, GRAULE T. Isoelectric points of viruses[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 388 - 397.
- [15] CASHDOLLAR J L, WYMER L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta - analysis of recent studies[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(1): 1 - 11.
- [16] HILL V R, POLACZYK A L, KAHLER A M, et al. Comparison of hollow - fiber ultrafiltration to the USEPA VIRADEL technique and USEPA method 1623[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(2): 822 - 825.
- [17] KARIM M R, RHODES E R, BRINKMAN N, et al. New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(12): 3888 - 3895.

- crobiology, 2009, 75(8): 2393–2399.
- [18] SOTO – BELTRAN M, IKNER L A, BRIGHT K R. Effectiveness of poliovirus concentration and recovery from treated wastewater by two electropositive filter methods[J]. Food and Environmental Virology, 2013, 5(2): 91–96.
- [19] PANG X L, LEE B E, PABBARAJU K, et al. Pre – analytical and analytical procedures for the detection of enteric viruses and enterovirus in water samples[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 184(1–2): 77–83.
- [20] GIBBONS C D, RODRIGUEZ R A, TALLON L, et al. Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male – specific coliphages from seawater[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(2): 635–641.
- [21] HARAMOTO E, KATAYAMA H, UTAGAWA E, et al. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 160(1–2): 206–209.
- [22] AHMED W, HARWOOD V J, GYAWALI P, et al. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage – associated viral markers in environmental waters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 2042–2049.
- [23] HATA A, MATSUMORI K, KITAJIMA M, et al. Concentration of enteric viruses in large volumes of water using a cartridge – type mixed cellulose ester membrane[J]. Food and Environmental Virology, 2015, 7(1): 7–13.
- [24] ZERDA K S, GERBA C P, HOU K C, et al. Adsorption of viruses to charge – modified silica[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1): 91–95.
- [25] WEGMANN M, MICHEN B, GRAULE T. Nanostructured surface modification of microporous ceramics for efficient virus filtration[J]. Journal of the European Ceramic Society, 2008, 28(8): 1603–1612.
- [26] LAMBERTINI E, SPENCER S K, BERTZ P D, et al. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 2990–2996.
- [27] MATSUSHITA T, SUZUKI H, SHIRASAKI N, et al. Adsorptive virus removal with super – powdered activated carbon[J]. Separation and Purification Technology, 2013, 107: 79–84.
- [28] KAPOOR A, VICTORIA J, SIMMONDS P, et al. A highly divergent picornavirus in a marine mammal[J]. Journal of Virology, 2008, 82(1): 311–320.
- [29] VICTORIA J G, KAPOOR A, DUPUIS K, et al. Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(9): e1000163.
- [30] DJIKENG A, HALPIN R, KUZMICKAS R, et al. Viral genome sequencing by random priming methods[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 5.
- [31] GU X, TAY Q X M, TE S H, et al. Geospatial distribution of viromes in tropical freshwater ecosystems[J]. Water Research, 2018, 137: 220–232.
- [32] PURNELL S, EBDON J, BUCK A, et al. Removal of phages and viral pathogens in a full – scale MBR: Implications for wastewater reuse and potable water[J]. Water Research, 2016, 100: 20–27.
- [33] FOUT G S, CASHDOLLAR J L, VARUGHESE E A, et al. EPA Method 1615. Measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT – qPCR. I. Collection of virus samples[J]. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2015(97): 52067.
- [34] KATZENELSON E, FATTAL B, HOSTOVESKY T. Organic flocculation: an efficient second – step concentration method for the detection of viruses in tap water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1976, 32(4): 638–639.
- [35] JOHN S G, MENDEZ C B, DENG L, et al. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation[J]. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(2): 195–202.
- [36] PANG X, QIU Y, GAO T, et al. Prevalence, levels and seasonal variations of human enteric viruses in six major rivers in Alberta, Canada[J]. Water Research, 2019, 153: 349–356.
- [37] LI D, GU A Z, ZENG S Y, et al. Monitoring and evaluation of infectious rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of occurrences[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(5): 1129–1137.
- [38] METCALF T G, MELNICK J L, ESTES M K. Environmental virology – from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular – biology – a trip of over 50 years[J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49: 461–487.
- [39] VERHEYEN J, TIMMEN – WEGO M, LAUDIEN R, et al. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2798–2801.
- [40] LAM W Y, YEUNG A C M, TANG J W, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(11): 3631–3640.
- [41] MAHONY J B, BLACKHOUSE G, BABWAH J, et al. Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(9): 2812–2817.
- [42] HAO X, LIU R, HE Y, et al. Multiplex PCR methods for detection of several viruses associated with canine respiratory and enteric diseases[J]. PLoS ONE, 2019, 14(3): e0213295.
- [43] RODRIGUEZ R A, PEPPER I L, GERBA C P. Application of PCR – based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 297–307.
- [44] MACKAY I M, ARDEN K E, NITSCHKE A. Real – time PCR in virology[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): 1292–1305.
- [45] RYU H, SCHRANTZ K A, BRINKMAN N E, et al. Applicabil-

- ity of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC - RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies[J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 258: 35 - 40.
- [46] HUGGETT J F, NOVAK T, GARSON J A, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon[J]. *BMC Research Notes*, 2008, 1 (1): 70.
- [47] JULIAN T R, SCHWAB K J. Challenges in environmental detection of human viral pathogens[J]. *Current Opinion in Virology*, 2012, 2(1): 78 - 83.
- [48] HATA A, INABA M, KATAYAMA H, et al. Characterization of natural organic substances potentially hindering RT - PCR - based virus detection in large volumes of environmental water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51 (23): 13568 - 13579.
- [49] HARAMOTO E, KITAJIMA M, HATA A, et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water[J]. *Water Research*, 2018, 135: 168 - 186.
- [50] SCHWARTZ S L, LOWEN A C. Droplet digital PCR: A novel method for detection of influenza virus defective interfering particles [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 237: 159 - 165.
- [51] COUDRAY - MEUNIER C, FRAISSE A, MARTIN - LATIL S, et al. A comparative study of digital RT - PCR and RT - qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 201: 17 - 26.
- [52] AW T G, ROSE J B. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 422 - 430.
- [53] MICHNIEWSKI S, REDGWELL T, GRIGONYTE A, et al. Riding the wave of genomics to investigate aquatic coliphage diversity and activity[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21 (6): 2112 - 2128.
- [54] ROHWER F, EDWARDS R. The phage proteomic tree: a genome - based taxonomy for phage[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(16): 4529 - 4535.
- [55] BIBBY K. Metagenomic identification of viral pathogens[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(5): 275 - 279.
- [56] AJAMI N J, WONG M C, ROSS M C, et al. Maximal viral information recovery from sequence data using VirMAP[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3205.
- [57] RAMPELLI S, SOVERINI M, TURRONI S, et al. ViromeScan: a new tool for metagenomic viral community profiling[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 165.
- [58] REN J, AHLGREN N A, LU Y Y, et al. VirFinder: a novel k - mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 1 - 20.
- [59] ROUX S, ENAULT F, HURWITZ B L, et al. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data[J]. *PeerJ*, 2015, 3 (348): e985.
- [60] NAYFACH S, CAMARGO A P, SCHULZ F, et al. CheckV assesses the quality and completeness of metagenome - assembled viral genomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39: 578 - 585.
- [61] YONGFENG H, FAN Y, JIE D, et al. Direct pathogen detection from swab samples using a new high - throughput sequencing technology[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011, 17 (2): 241 - 244.
- [62] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270 - 273.
- [63] WILLIAMSON K E, FUHRMANN J J, WOMMACK K E, et al. Viruses in soil ecosystems: an unknown quantity within an unexplored territory[J]. *Annual Review of Virology*, 2017, 4(1): 201 - 219.
- [64] LIANG X, WAGNER R E, ZHUANG J, et al. Viral abundance and diversity vary with depth in a southeastern United States agricultural ultisol [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 137: 107546.
- [65] LIANG X, ZHUANG J, LOFFLER F E, et al. Viral and bacterial community responses to stimulated Fe (III) - bioreduction during simulated subsurface bioremediation[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(6): 2043 - 2055.
- [66] EMERSON J B. Soil Viruses: A New Hope [J]. *mSystems*, 2019, 4(3): e00120 - 19.
- [67] ROSARIO K, FIERER N, MILLER S, et al. Diversity of DNA and RNA viruses in indoor air as assessed via metagenomic sequencing[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (3): 1014 - 1027.
- [68] CANTALUPO P G, CALGUA B, ZHAO G, et al. Raw sewage harbors diverse viral populations [J]. *mBio*, 2011, 2(5): e00180 - 1.
- [69] AW T G, HOWE A, ROSE J B. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 210: 15 - 21.
- [70] ALHAMLAN F S, EDERER M M, BROWN C J, et al. Metagenomics - based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92 (2): 183 - 188.
- [71] SVRAKA S, ROSARIO K, DUISER E, et al. Metagenomic sequencing for virus identification in a public - health setting[J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91 (Pt 11): 2846 - 2856.
- [72] GUERRERO - LATORRE L, ROMERO B, BONIFAZ E, et al. Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity in urban streams of Ecuador's capital city[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1334 - 1343.
- [73] WANG H, WU S, LI K, et al. Metagenomic analysis of ssDNA viruses in surface seawater of Yangshan Deep - Water Harbor, Shanghai, China[J]. *Marine Genomics*, 2018, 41: 50 - 53.