

现代分子生物学技术在抗生素污水处理应用中的研究进展

陈 静,陆敏燕,苏静静,闫 宏,蒋亚梅,温洪宇
(江苏师范大学 生命科学学院,江苏 徐州 221000)

摘要:为进一步优化抗生素污水中微生物的检测,介绍了实时荧光定量 PCR 技术、DGGE/TGGE 技术、16 S rRNA 基因序列比较、T-RFLP 技术、高通量测序技术在抗生素污水处理中的应用。分析了这些技术在研究抗生素污水处理发展中的优点及不足,并讨论了一些技术未来的发展前景。

关键词:实时荧光定量 PCR;DGGE/TGGE;16 S rRNA 基因序列;T-RFLP;高通量测序

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)12-0141-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.12.0141

抗生素主要用于治疗各种细菌、致病微生物等引起的感染性疾病,在人类与家畜疾病治疗方面应用十分广泛。但大多数的抗生素并不会被吸收,而是会被排出体外,进入环境中。抗生素进入水环境的污染途径主要是医疗废水的排放,城市污水处理厂的污水排放,养殖废水的排放,抗生素生产废水的排放以及施用人畜粪肥^[1]。抗生素的大量使用及排放,大大增加了抗生素在环境中的残留量。同时抗生素本身易生物富集,具有持久性、生物反应活性及难生物降解性等特点,使人畜共患病发病率增加^[2],引起慢性中毒以及“三致”作用^[3]。人类长期大量饮用受到污染的饮用水也会最终影响人体免疫系统,降低机体免疫力^[4]。

因此抗生素污水中微生物的检测就显得尤为重要。本文介绍了 5 种技术在抗生素污水中的检测应用。探讨了各种技术的优缺点,为抗生素污水中微生物的检测提供了参考。

1 分子生物学技术及其在抗生素污水检测中的应用

1.1 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 技术指在 PCR 反应中加入荧光基团,通过荧光积累,监测整个 PCR 过程,然后用标准曲线对未知模板进行定量分析。常用机制包括荧光染料(SYBR Green)和水解探针

检测^[5]。

1.1.1 SYBR Green 检测 一种具有绿色波长的荧光染料,该染料只与双链 DNA 小沟结合。SYBR Green 与 DNA 结合发出绿色荧光;DNA 解链为单链时荧光信号会急剧减弱。

1.1.2 Taqman 探针检测 Taqman 水解探针利用 Taqman 5'端外切酶活性,在 PCR 反应中加入一个荧光标记探针,其 5'端标记报告基因 FAM(6-羧基荧光素),3'端标记淬灭基因 TAM-RA(6-羧基四甲基丹诺明)。探针结构完整时 3'端淬灭基因被抑制,5'端荧光基因的荧光发射随着 PCR 反应进行。由于 Taq 酶 5'端至 3'端外切酶活性,已合成新链移动到探针结合位置,探针被 Taq 酶切断,完整性遭到破坏,5'端 FAM 荧光报告基团荧光信号被释放。模板复制一次,一个探针就会被切断,并且释放一个荧光信号。产物与荧光信号产生一对一的关系,所以随着产物的增加,荧光信号就会不断增强。

对哈尔滨工业污水^[6]的研究中,利用实时荧光定量 PCR 技术,对污水处理厂中水样与污泥样品中四环素类抗性基因(*tetW*、*tetA*、*tetO*)、磺胺类抗性基因(*sul I*、*sul II*)以及 β -内酰胺类抗性基因(*blaCTX-M*)和 I 类整合子(*int I 1*)进行检测。发现在污水处理厂进水中,6 种 ARGs(抗生素抗性基因,antibiotic resistance genes)检出率为 100%。在 4 个污水厂的样品中,四环素类抗性基因中 *tetW* 的浓度总体上较高,磺胺类抗性基因中 *sul II* 浓度比 *sul I* 的高,磺胺类抗性基因浓度略高于四环素类抗性基因, β -内酰胺类抗性基因在 4 个污水处理厂中浓度却较低。6 种抗生素抗性基因总浓度与 16SrDNA 浓度呈正相关,

收稿日期:2016-10-20

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划资助项目(XSJ CX7093)

第一作者简介:陈静(1995-),女,江苏省徐州市人,在读学士,从事环境微生物研究。E-mail:chenjing167@167.com。

通讯作者:温洪宇(1973-),男,山西省定襄县人,博士,副教授,从事环境微生物研究。E-mail:wenhy2007@126.com。

tetW、*tetO*、*sul I*、*blaCTX-M* 浓度与 16 S rDNA 浓度也呈正相关。实时荧光定量 PCR 由于其高效性、特异性、精确性的优点,在实际应用中有很大的帮助。尤其是实时性,可以随时观测整个 PCR 过程,且结果是荧光显示,更容易观察。

1.2 变性/温度梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE)

DGGE 技术是当序列不同的 DNA 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳时,用不同浓度的变性剂使其分离的一种技术。这个技术主要是当 DNA 分子在发生热变性时,分子结构变得杂乱无序,双链 DNA 分子经聚丙烯酰胺凝胶电泳,运动到能使自身 DNA 片段发生解链的位置时,解链变成单链 DNA 分子^[7],碱基不同的双链 DNA 分子变性成为单链的过程中所对应的变性剂浓度不同。根据 DNA 片段解链时的这个现象,碱基不同的 DNA 分子在凝胶电泳中停留的位置不同,从而使序列不同的 DNA 分离。通常还根据变性剂梯度方向的不同,将 DGGE 大致分为:垂直 DGGE 和平行 DGGE^[8]。

DGGE 技术是 Fischer 和 Lerman^[9] 在 1979 年提出的用于检测 DNA 突变的电泳技术。后来 Mulyzer^[10] 等首次在 DGGE 引物中使用“GC 夹子”技术,这个技术进一步完善了 DGGE 技术。1993 年, Mulyzer^[10] 等将 DGGE 技术应用于微生物的生态学研究中,后来因 DGGE 技术方便快捷重现性好等优点被广泛应用于微生物群落遗传多样性研究^[11]。此后又衍生出温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术^[8]。TGGE 技术利用温度对碱基分子间作用力形成的影响而设置不同的温度梯度使 DNA 分离的技术。DNA 降解时使双链发生断裂的温度就是 DNA 的解链温度即 T_m 值。 T_m 值常受到 DNA 分子的长度、变性剂、pH 等因素的影响且 G+C 比例越高,核酸分子越长,解链的温度越高。

随着 DGGE/TGGE 技术的不断完善, DGGE/TGGE 技术已经被人们广泛地应用于微生物群落结构的研究。刘飞^[12] 等使用 PCR-DGGE 技术对红霉素生产废水中微生物菌落结构变化进行测定分析并发现:处理时间增加,微生物种类也增加;不同处理阶段的微生物菌落结构相似性差异较大。环境变化导致好氧阶段和厌氧阶段的优势菌也有所差异,脱氮硫杆菌属细菌仅在好氧阶段数量较多。该试验利用 DGGE 技术能同时分析群落中多个优势菌的特点测定出不同

时期的优势菌属,设计巧妙、结果清晰,使试验精确度更高。

1.3 16 S rRNA 基因检测技术

随着 PCR 技术的出现及核酸研究技术的不断完善,16 S rRNA 基因检测技术已成为抗生素污水中微生物检测和鉴定的一种强有力工具。席劲璞等^[13] 正是利用这一技术,把从城市污水处理厂二级处理出水中分离得到的 21 株四环素抗性菌株进行分离培养,并将所分离的菌落进行 16 S rRNA 的 PCR 扩增与序列分析,与基因库进行比对后,将四环素抗性菌株分布于 6 个属,分别为气单胞菌属(9 株)、埃希氏菌属(5 株)、肠杆菌属(3 株)、克雷伯氏菌属(2 株)、柠檬酸杆菌属(1 株)和哈夫尼菌属(1 株)。从菌株数来看,气单胞菌属、埃希氏菌属和肠杆菌属细菌较多,与另外 3 种菌属相比,具有生长优势。查阅文献得知这六种菌都是革兰氏阴性菌且大都属于条件致病菌。利用 16 S rRNA 基因鉴定技术不仅将抗性菌株具体到属、株数,还分别对其致病性进行了简单分析,得出这些携带有抗生素抗性的菌将增加污水处理厂二级出水的风险的结论。

16 S rRNA 基因存在于所有细菌的基因组中,具有极高的保守性和特异性。刘苗苗等^[14] 在研究制药废水的排放对微生物四环素抗性基因以及微生物群落结构的影响时,分别在河流上游、污水排放口、河流下游对夏季河水、冬季河水和沉积物中 3 种 *tet(X)*、*tet(L)*、*tet(W)* 四环素抗药基因与 16 S rRNA 基因的比值进行了比较。结果表明,河流上游 3 种抗药基因相对于 16 S rRNA 基因的丰度都显著低于排放口和下游河流,与上游相比,排放口和下游的抗药性基因增加 10~1 000 倍,表明河水中抗药性基因数量的增加很可能是抗生素废水排放的结果。此方法设计巧妙,在不同地点不同时期利用 16 S rRNA 基因比较其 3 种抗药基因的相对丰度,使得结果清晰,可信度高。

1.4 T-RFLP 末端限制性片段多肽性法

T-RFLP 末端限制性片段多肽性法结合了 RFLP、PCR 以及凝胶电泳技术,又称 16 S rRNA 基因的末端限制性片段,是继 DGGE/TGGE、SS-CP、FISH 技术、克隆文库之后发展起来的一种高效可重复的研究微生物多态性的分子生物学技术。T-RFLP 的原理在于:首先进行基因组学的研究比较,选取一段具有系统进化标记特征的

DNA 序列作为目的分析序列,根据的保守区设计通用引物。然后使用通用引物,对其中一个引物的 5' 末端用荧光物质标记并进行 PCR 扩增,对扩增产物进行限制性内切酶消化。最后进行琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳,用溴化乙锭或硝酸银染色。对于不同微生物种群,扩增片段中核苷酸片段存在差异,其酶切片段的数量或大小不同,于是电泳图谱呈现多态性。T-RFLP 在技术上与 RFLP 相似,只是其中的一个引物的 5' 端用荧光物质标记。对 PCR 产物进行特异性酶切后就产生了许多长度不等的限制性片段,其中带有荧光标记的目标片段就可以被 DNA 自动测序仪检测到^[15]。陆素颖等^[16]基于 16 S rRNA 基因的末端限制性酶切片段长度多态性(T-RFLP)技术,分析分别在 0、6.4、64 和 320 mg 的头孢噻肟(抗生素)作用下,城市河流底泥细菌群落结构变化;并使用巢式 PCR 分析其耐药基因 blaCTX-M 的多样性变化。结果 T-RF 特征峰统计分析表明:不同抗生素浓度处理,与底泥细菌群落结构多样性变化之间无显著相关性;但是实验室处理时间会导致群落结构产生显著变化。实验表明较严重污染的河流沉积物对抗生素作用不敏感。由于 T-RFLP 能产生大量重复且分辨率高的结果,数据具体化,更易实现自动化检测,操作简便,灵敏度高,因此,T-RFLP 被应用到探究抗生素对活性污泥群落结构的影响是十分可靠的。

1.5 高通量测序技术

高通量测序技术是用于抗生素污水研究的常用技术,被称为下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)^[17]。因其高通量的测序使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能,因此也称其为深度测序(deep sequencing)^[18]。现在提到的高通量测序技术主要是指 454 焦磷酸测序技术、SOLiD 技术、以 Solexa 技术为代表的第二代测序技术、单分子测序技术、SMRT 技术和 Oxford Nanopore Technologies 公司亟待研发的纳米孔单分子技术^[19]。

Sanger 测序法被称为第一代测序技术^[20],由于测序方法复杂、测序成本昂贵、通量信息较小,在大规模测序中的应用逐渐减少。随着技术不断发展,下一代测序技术相继出现并发展成熟,被称为高通量测序。454 Life Sciences 公司在 2005 年推出了具有革命性意义的超高通量基因组测序系统。454 焦磷酸测序可以达到实时测定 DNA

序列的目的,即边合成边测序^[21]。在此之后,Illumina 公司和 ABI 公司相继推出了 Solexa^[22]和 SOLiD (supported oligo ligation detection)^[23] 测序技术。它们的测序原理与焦磷酸测序法的原理类似。占爱瑶等^[21]对几种高通量测序技术进行了详细的说明。在第二代测序平台不断完善的同时,第三代测序技术也逐步发展。单分子测序技术也被称作第三代测序技术,包括单分子 DNA 实时测序(SMRT)、真正单分子测序、单分子纳米孔测序等技术^[24]。

高通量测序有其显著的优点。第一,操作十分简便,不用进行电泳。这不仅可以节省成本和时间,还可以在芯片上进行高通量分析。第二,极高的测序通量。可以迅速对一个物种进行转录组测序或基因组深度测序。

基于以上的优点,高通量测序被大范围的应用在基因组研究中,包括测序和表观基因组学以及功能基因组学研究的许多方面^[25]。黄圣琳^[26]在对活性污泥系统中降解四环素的微生物抗性及其群落结构的研究过程中,利用高通量测序技术测得微生物群落的多样性,并由此分析认为活性污泥中微生物群落组成发生了改变,即降低了微生物群落结构的相似程度。为污水处理厂对四环素类抗生素及其活性污泥群落中的抗性基因污染的处理提供方向和依据。而汤迎^[27]利用 454 高通量测序技术了解活性污泥系统中微生物群落结构,并深入探究活性污泥对典型药物和个人护理品(PPCPs)的去除规律与机理^[27]。可以指导污水处理厂有针对性的添加微生物制剂,从而提高污水处理效率。这些应用都充分体现了高通量测序快捷、精确、全面的测序特点^[27]。

2 现代分子生物学技术在抗生素污水处理应用中的不足

随着抗生素的使用量不断增加,排入环境中的抗生素量呈现不断递增的趋势,在自然界的水体、土壤中均检测到抗生素残留,严重威胁到生态环境平衡和人体健康^[1],所以利用现代分子生物学技术解决抗生素污水处理问题是很有必要的。目前,各项技术应用已趋于成熟,技术的改进摆脱了原来的复杂繁琐,结果也更加精确清晰。但每种技术也都存在着无法避免的弊端。

实时荧光 PCR 技术具有实时性、精确性、高效性等优点,但是有时会出现假阳性,影响实验结

果。DGGE 技术因其重现性强,可靠性高^[11],可以同时测定多个微生物优势菌等优点被大规模应用于微生物群落的遗传多样性和种群差异性研究中^[28]。然而 DGGE 技术仍然存在着一些局限性,如:实验时需要先进行预实验;实验需要的“GC 夹子”技术价格昂贵;在 PCR 的过程中,对 DNA 的长度有一定限制且含量较少的 DNA 难以检测,精确度不高等。

随着数据库的不断更新完善,16 S rRNA 基因检测技术可以实现对微生物进行快速、微量、准确简便地分类鉴定和检测。16 S rRNA 序列比较技术相对繁琐,主要步骤包括回收片段与载体的连接、克隆序列分析对比,具有准确度高、鉴定到种等优势^[29],但在 16 S rRNA 的数据分析方面仍存在误差。T-RFLP 技术操作简单易行、稳定,结果可数据化具体化,也能保证结果重复出现,从而更加科学和准确。与其它分析方法相比,更容易实现自动化监测,操作简捷。但其也存在较明显的缺点:耗时较长,费用较高且不适用于大规模分子育种。

高通量测序技术在使用时不用进行电泳,操作简便快捷,并且还有极高的测序通量。但是也存在明显的缺点:测序速度提高,后续的海量测序数据难以分析;新一代测序仪价格昂贵,一般的小型实验室难以承受;高通量测序技术不适合小规模测序。随着测序费用降低,微生物物种数据库的不断完善,高通量测序技术将成为抗生素污水处理过程实时监控的最重要的手段之一。

3 展望

将以上这些现代分子生物学技术组合可以弥补单一技术的不足,对于更好的优化污水处理系统具有理论意义与指导价值。虽然目前在技术,费用方面仍存在缺点,但随着技术不断发展,实验成本的降低,这些技术必将在抗生素污水处理方面得到广泛的应用。

参考文献:

[1] 王冰,孙成,胡冠九.环境中抗生素残留潜在风险及其研究进展[J].环境科学与技术,2007,30(3):108-112.

[2] 罗玉,黄斌,金玉,等.污水中抗生素的处理方法研究进展[J].化工进展.2014(9):2471-2477.

[3] Crane M,Watts C,Boudard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals[J]. Sci. Total. Environ,2006,367(1):23-41.

[4] 王朋华,袁涛,谭佑铭.水环境药物污染对水生物和人体健康的影响[J].环境与健康杂志,2008,27(2):407-413.

[5] 张晶,张惠文,张成刚.实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用[J].生态学报,2005,25(6):1446-1450.

[6] 段然,哈尔滨市污水厂中抗生素抗性基因分布及强化去除研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2014.

[7] 李怀,关卫省,欧阳二明,等. DGGE 技术及其在环境微生物中的应用[J].环境工程与管理,2008(10):93-96.

[8] 刘上峰,傅俊江.变性梯度凝胶电泳的原理、应用及其进展[J].国外医学遗传学分册,2002(2):74-76.

[9] Fischer S G, Lerman L S. DNA Fragments differing by single base-pairs substitutions are separated in denaturing gradient gels; Correspondence with melting theory[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1983,80:1579-1583.

[10] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s RNA [J]. Applied and Environmental Microbiology,1993,59(3):695-700.

[11] 官曼丽,任南琪,邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J].微生物学报,2004,44(6):854-848.

[12] 刘飞,何小妮,张毅.红霉素生产废水中微生物群落结构分析[J].环境工程学报,2011(12):2809-2812.

[13] 席劲瑛,黄晶晶,胡洪营,等.污水处理厂二级出水中四环素抗性菌的生长特性与耐药性[J].环境科学学报,2014,34(7):1724-1729.

[14] 刘苗苗,张昱,李栋,等.制药废水受纳河流中四环素抗药基因及微生物群落结构变化研究[J].环境科学学报,2010,30(8):1551-1557.

[15] 代金平,陈竞,余雄,等.分子生物学技术在产甲烷古菌多样性研究中的应用[J].黑龙江畜牧兽医,2016(3):43-46.

[16] 陆素颖,李天宇,周宏伟.头孢噻肟处理的城市河流沉积物微生物群落结构及 bla-(CTX-M)多样性的研究[J].南方医科大学学报,2010(3):463-467.

[17] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nat Methods,2008,5(1):16-18.

[18] Sultan M, Schulz M H, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. Science,2008,321(5891):956-960.

[19] 陈蕾,周小理,周一鸣,等.高通量测序技术在肠道菌群研究中的应用[J].食品工业,2016(3):269-273.

[20] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1977,74:5463-5467.

[21] 占爱瑶,罗培高. DNA 测序技术概述[J].生物技术通讯,2011(4):584-588.

[22] Porreca G J, Zhang K, Li J B, et al. Multiplex amplification of large sets of human exons[J]. Nat Methods,2007,4(11):931-936.

机器视觉技术在蚕业中的应用研究进展

王 娜¹,胡常红¹,彭国庆²,霍锡敏¹,王晓丽¹,王欣玉¹,陈尊鹏¹

(1. 内蒙古呼伦贝尔市蚕业科学研究所,内蒙古 扎兰屯 162650; 2. 阿荣旗珍珠蚕种场,内蒙古 阿荣旗 162750)

摘要:机器视觉技术在蚕业方面的研究和应用发展迅速,为蚕茧质量无损检测,蚕蛹性别自动识别,蚕病的自动诊断提供了可能,通过综述机器视技术在蚕业中应用的研究进展,分析了机器视觉技术在蚕茧无损检测,蚕蛹性别自动识别,蚕病的自动诊断的应用现状及存在的问题,对研究前景进行了展望。

关键词:机器视觉;蚕茧;无损检测;性别识别;微粒子病

中图分类号:S88 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)12-0145-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.12.0145

我国是世界蚕业的发源地,养蚕业及丝绸业一直占据世界市场的重要地位。蚕业和茧丝绸业对我国出口创汇和国民经济建设做出了极其重要的贡献,在增加农民收入、扩大就业,促进农村经济和地区经济发展,尤其是中西地区经济发展中发挥着重要的作用^[1]。

收稿日期:2016-11-06
第一作者简介:王娜(1984-),女,山东省武城县人,硕士,农艺师,从事农业信息化和蚕业研究。E-mail:haolema09 @ 163.com。

1 基于机器视觉的蚕茧质量无损检测

一直以来,我国普遍采用剖茧检测的评茧方法,这种方法检测周期过长,且破坏受检样品造成浪费,无法适应市场经济的需要。落后的蚕茧质量检测技术影响了蚕农提高茧质的积极性,损害了蚕茧收购部门的经济利益,制约了我国蚕丝行业的产品质量和效益的提高。蚕茧无损检测可快速准确无损的检测蚕茧的质量和评定等级,减少因切割蚕茧检测质量带来的经济和原料损失,实现简单易行、客观的评茧方法,满足蚕业现代化要求^[2-3]。

[23] Ondov B D, Varadarajan A, Passalacqua K D, et al. Efficient mapping of Applied BiosystemsSOLiD sequence data to a reference genome for functional genomic applications[J]. Bioinformatics, 2008, 24(23): 2776-2777.

[24] 解增言,林俊华,谭军,等. DNA 测序技术的发展历史与最新进展[J]. 生物技术通报, 2010(8): 64-70.

[25] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387-402.

[26] 黄圣琳. 活性污泥系统中四环素对其降解微生物抗性及群落结构的作用影响[D]. 上海: 东华大学, 2015.

[27] 汤迎. 城市污水处理厂内药品及个人护理品的赋存特征与去除机理[D]. 长沙: 湖南大学, 2014.

[28] 于洁,冯妍,解玉红,等. PCR-DGGE 技术及其在环境微生物领域中的应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010(6): 227-234.

[29] 邱浩然,赵霞,王晓春,等. 现代分子生物学技术在活性污泥微生物菌群多样性研究中的应用[J]. 四川环境, 2013(6): 129-132.

Research Progress in Modern Molecular Biology Techniques for Antibiotic Contaminated Water Treatment

CHEN Jing, LU Min-yan, SU Jing-jing, YAN Hong, JIANG Ya-mei, WEN Hong-yu
(School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221000)

Abstract: In order to further optimize the antibiotic wastewater of microbial detection, the real-time fluorescent quantitative PCR technique, DGGE/TGGE, 16 S rRNA gene sequence comparison, T-RFLP and high-throughput sequencing technologies were introduced. The application, development and shortage of these techniques of antibiotic wastewater were analyzed, and the future development prospects of these techniques were discussed.

Keywords: real-time fluorescent quantitative PCR; DGGE/TGGE; 16 S rRNA gene sequence; T-RFLP; high-throughput sequencing