

李 晓,李 冰,朱 健. 变性梯度凝胶电泳技术及其在人工湿地及养殖水体中应用的研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):7-12.

# 变性梯度凝胶电泳技术及其在人工湿地及养殖水体中应用的研究进展

李 晓<sup>1,2</sup>, 李 冰<sup>1,2</sup>, 朱 健<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:**简要介绍了 DGGE 技术的基本原理及技术路线,概述了该技术在检测中存在的主要优缺点并对其存在的主要缺点进行了技术优化,重点综述了 DGGE 技术在人工湿地及养殖水体微生物群落多样性和动态性研究中的最新进展及应用前景。

**关键词:**DGGE;人工湿地;养殖水体;微生物群落多样性

**中图分类号:**S969 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0007-06

变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)是目前研究微生物群落的组成、多样性及动态性最重要的研究手段之一。传统的研究方法仅限于对有限的微生物进行培养,然后研究其各种特性。近年来随着分子生物学技术的发展,越来越多的科研工作者将目光集中在开发微生物资源上,并且采用 DGGE 技术分析各种环境的微生物群落结构,以期研究发现对环境有用的微生物群落,然后开发微生物制剂。研究发现,微生物群落对有机物质的矿化和氮、硫、磷等物质的移除至关重要<sup>[1]</sup>。一个稳定的微生物群落对维持生态系统的稳定性至关重要,同样对营养物质循环效率及生态系统长期的可循环性的恢复也是不容忽视的。利用 DGGE 技术探讨人工湿地及养殖池塘中微生物群落的各种指标,对湿地技术和环境科学的发展有着重要的现实意义。人工湿地是利用植物、微生物、基质三者的相互作用达到去除污染物净化水质的目的。研究显示,人工湿地系统能够减少工业和农业废水中 60%~90% 的化学需氧量(COD),并且能减少生活废水中 90%~99% 的 COD<sup>[2-3]</sup>。在湿地生态系统中,无机物包括硫、磷、氮的转化,为污染物的移除提供了重要的机制<sup>[1]</sup>。另外,人工湿地已经被用来处理和纯化各种污染废水包括生活、工业、农业废水<sup>[4]</sup>。水是池塘养殖的关键性因素,因此净化水质对养殖池塘至关重要,将人工湿地和池塘养殖复合构建的池塘循环水养殖系统作为一种新的养殖模式,在改善池塘养殖生态环境、提高养殖产品质量、节约水资源及有效解决废水排放等方面均具有明显的实践意义。鉴于湿地及池塘生态系统中存在着大量不可培养的微生物,选择将微生物作为研究对象,研究池塘和湿地中微生物的多样性及在不同层次的结构变化,这对

形成一个良性的人工湿地池塘循环系统有重要意义。

目前,关于湿地科学的研究主要集中在湿地资源的开发和利用上,通过建立人工湿地生态系统处理生活、工业、农业废水也已有很多研究报道,而利用分子生物学的方法如 DGGE 技术分析人工湿地系统和养殖池塘不同层次的微生物群落结构及微生物种群的时空变化却研究的很少,而研究人工湿地系统中的微生物种群空间分布状况,能为处理效果的稳定和提高提供理论基础,而此是一个值得研究的课题。本文简要概述了 DGGE 相关的原理及技术路线,重点介绍了 DGGE 技术在人工湿地和养殖池塘中应用的最新研究进展。

## 1 DGGE 技术的原理与优缺点

### 1.1 DGGE 技术的原理

DGGE 技术是所有可以不依赖培养指纹技术中应用最广泛的技术之一,它经常被用来评估环境样品中的微生物群落结构,并且随着相应的环境变化来决定微生物群落的动态性<sup>[5]</sup>。所采用的 DGGE 技术与以往的电泳技术不同,它不是将分子量不同的 DNA 分子分开,而是将序列不同的 DNA 分子分开,该 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶电泳中根据变性剂浓度梯度的不同彼此之间相互分离。该技术的主要原理如下:当双链 DNA 分子在含梯度变性剂(尿素、甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时,其解链的速度和程度与其序列密切相关<sup>[6]</sup>,由于序列间的碱基对的组成不同,则具有相同碱基数目的双链 DNA 分子解链所需要的变性剂浓度也不同,当某序列泳动到与 DNA 变性时所需变性剂浓度一致的凝胶位置时,相应的双链 DNA 分子则发生解链,由此导致该变性 DNA 分子电泳迁移速率降低,因此具有不同序列的 DNA 片段则停留在凝胶的不同位置,形成相互分开的条带图谱。理论上只要选择的电泳条件足够精细,最低可检测到只有 1 个碱基差异的 DNA 片段。为了提高 DGGE 对序列差异的分辨率,通常在引物的一端加上 30~50 个碱基的 G-C 夹板,采用“GC 板”(clamp)技术以后,富含 GC 的 DNA 附加到双链的一端形成 1 个人工高温解链区<sup>[7]</sup>。这个高温解链区可以解决双链 DNA 完全解链的问题,经验表明任何随机的 GC 序列都

收稿日期:2013-01-16

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD25B07);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2013JBFC08)。

作者简介:李 晓(1986—),女,山东日照人,硕士研究生,主要从事水产健康养殖工作。E-mail:lixiao861986@163.com。

通信作者:朱 健(1968—),男,研究员,从事水产动物遗传育种与水产养殖。E-mail:zhuj@ffrc.cn。

能达到试验目的,当加入了 GC 夹子后,DNA 片段中相差不大的碱基序列都能被区分开。用 DGGE 分析微生物群落的 PCR 扩增产物时,一般先用垂直电泳确定一个大概的变性剂梯度范围,然后在这个变性剂梯度下,利用水平电泳把仅有 1 个碱基差异的 DNA 分子分开。DNA 双链分子在特定的温度下会分离,但是这个温度主要取决于互补链的氢键含量和相邻碱基的引力。如果用化学变性剂对双链 DNA 分子处理,DNA 的 2 条链首先在温度较低的碱基区域(A. T 碱基区域)开始解链,而 G. C 含量较高的碱基区域需要较高的解链温度。同时相邻碱基间的吸引力也对解链温度有一定的影响,因此解链区域通常分为低温解链区和高温解链区,如果变性剂的浓度或温度继续升高,2 条链则完全分开。

## 1.2 现阶段 DGGE 技术存在的优缺点

目前 DGGE 技术已经广泛应用于分析自然环境中的细菌、真菌、真核生物和病毒群落的生物多样性,该技术在提供群落中优势种群信息的同时还能同时分析多个样品,具有操作简便和可重复性的优点,适合调查种群的时空变化,并可以通过对测定的条带进行序列分析与特异性的探针杂交分析鉴定群落组成。在 DGGE 技术具有各种优点的同时,由于现阶段研究手段的局限性,使得 DGGE 技术也存在许多无法解决的问题,虽然理论上 DGGE 技术可以检测出仅有 1 个碱基差异的 DNA 序列,但是 Vallaey 等发现 DGGE 并不能分离样品中所有的 DNA 片段<sup>[8]</sup>。

1.2.1 主要优点 (1)操作的简便性。从环境中取来的样品可以不经培养,直接提取样品中的总 DNA,然后用细菌特定引物对其 16S rDNA 的可变区进行 PCR 扩增,扩增产物直接进行 DGGE 分析,然后对其条带进行切割测序,通过序列分析可以检测到一些不能培养或难培养的微生物,甚至能发现一些新的微生物种类<sup>[9]</sup>。(2)能快速同时对分析大量样品。它既可以对比分析同一微生物群落随时间和外界环境条件的变化过程,权春善等应用 DGGE 技术探讨了不同外界刺激(酸、碱、超声波、漩涡震荡、高温及过氧化氢酶)对不同退化程度的内蒙古草原土壤微生物多样性的影响,经 DGGE 分离获得微生物群落多样性的 DGGE 指纹图谱,研究结果表明经过强酸、超声波和高温处理后的土壤,其微生物群落多样性显著降低,而经过强碱和漩涡震荡处理后的土壤其丰富度显著提高,而过氧化氢酶的刺激显著提高了其丰富度<sup>[10]</sup>。也可以对比分析不同微生物群落之间的差异,陈美军等用 DGGE 技术分析了太湖不同湖区真核微型浮游生物的多样性,研究发现不同湖区的浮游生物的 DGGE 指纹图谱存在显著差异,营养水平低的湖区的条带数多于营养水平高的湖区,表明营养水平低的湖区的浮游生物种类较多,丰富度高<sup>[11]</sup>。(3)能跟其他分子生物学技术相结合。近年来,DGGE 技术结合 FISH 技术研究环境样品中的微生物群落结构和多样性是一种非常普遍和有用的手段,它能获得微生物的质量和数量信息,并能同时分析其空间分布特征<sup>[12]</sup>。DGGE 技术与传统方法结合,如克隆测序、杂交测序、RT-PCR 等,从而为人们认识更多的未知微生物资源提供有力途径。

1.2.2 主要缺点 (1)受影响的因素较多,要想获得清楚的 DGGE 图谱,就要优化多种条件,如无菌操作,样品的预处理,引物的选择,PCR 扩增的条件等。(2)无法准确给出微生物

的形态结构、基因表达水平、代谢活性、细菌数量以及相互之间关系的信息<sup>[13]</sup>。(3)由于现有分子生物学技术的局限性,DGGE 不能保证将所有的具有一定差异的 DNA 片段完全分开,序列不同的 DNA 分子可能会迁移到凝胶的同一位置。

## 2 DGGE 的技术路线及技术优化

### 2.1 技术路线

DGGE 技术是一种快速有效的研究微生物群落多样性的动态变化跟静态组成的方法之一,其主要技术路线如下:(1)从环境中提取基因组总 DNA;(2)用细菌特异性的引物对 16S rDNA 的可变区进行特异性扩增;(3)将其 PCR 扩增产物加入到有变性剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,双链 DNA 分子就会解链,不同的单链分子就会停留在使其发生变性的变性剂浓度相同的位置,从而形成不同的条带;(4)对其条带的亮度和数目进行观察分析,并对细菌群落多样性进行 UPGMA 聚类分析;(5)对其 DGGE 图谱中的主要条带进行割胶扩增测序,并进行 BLAST 比对,通过与已知序列比对观察其相似性。

### 2.2 技术优化

首先,DGGE 技术的优化主要集中在样品的预处理和基因组 DNA 的提取方法上;在样品的预处理方面,向少能等利用 PCR-DGGE 技术分析了水体中微生物的多样性并对此进行了技术优化,试验表明用过滤法收集样品要比离心法更能保持样品的完整性,使 PCR-DGGE 的灵敏度更好,可信度更高<sup>[14]</sup>。在基因组 DNA 的处理方面,李鹏等研究了 DNA 不同的提取方法对活性污泥微生物多样性 PCR-DGGE 检测的影响,研究发现,基于 SDS 的裂解法是研究活性污泥微生物多样性 PCR-DGGE 的一种价格低廉、可靠、快捷的总 DNA 提取方法<sup>[15]</sup>。万晶晶等研究发现用超声波破碎法可以快速提取活性污泥中的 DNA 然后用于 DGGE 分析,并能克服 PCR 扩增困难的问题<sup>[16]</sup>。Luo 等研究发现不同的 DNA 提取方法会导致 DGGE 指纹图谱产生不同的条带数目和光密度,并且指出应用 DGGE 技术研究环境中的微生物群落时一定要认真选择合适的 DNA 提取方法<sup>[17]</sup>。

其次,DGGE 技术的优化还体现在 PCR 扩增反应和 DGGE 电泳条件上;提高分辨率和灵敏性是 DGGE 技术面临的问题之一,因此在进行 DGGE 分析时必须进行系统优化才能取得可信的结果。第一,PCR 扩增的条件对 PCR-DGGE 有很大的影响<sup>[18]</sup>。Margit 等在用 PCR-DGGE 技术分析复杂微生物群落时使用了 3 种不同的 DNA 聚合酶,结果显示,使用不同的 DNA 聚合酶确实对 DGGE 分析有影响,而使用 KOD DNA 聚合酶能提高分析的灵敏度,并能抑制腐植酸对试验的影响<sup>[19]</sup>。张敏等发现不同的 DNA 聚合酶对 PCR-DGGE 技术的影响很大,选择合适的 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增是至关重要的<sup>[20]</sup>。第二,在 DGGE 电泳条件中,向少能等通过试验表明,长时间电泳优于短时间电泳,主要是消除了假阳性和提高了分离度<sup>[14]</sup>。而染色中,银染不论在灵敏性还是环保性上都要优于 EB 法。另外,Muyzer 等用含有 *D. desulfuricans* 和 *E. coli* 的混合物为样品探讨了平行 DGGE 最佳电泳时间,研究结果显示:电泳 10 min 后 *D. desulfuricans* 样品还没有发生变性,电泳 40 min 后,开始有部分变性,并且条带呈“Y”字形迁移。随时间延长其迁移速率越来越小,直至电泳

2 h 时迁移基本停止; *E. coli* 在电泳约 1.5 h 时开始有部分变性, 随时间延长至 2.5 h 时迁移基本停止<sup>[21]</sup>。因此 *D. desulfurans* 和 *E. coli* 混合物的最佳电泳时间为 2.5 h。

### 3 DGGE 技术在环境微生物多样性中的应用

自 1993 年 Muyzer 等首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究<sup>[22]</sup>以来, 该技术已被广泛应用于食品<sup>[23]</sup>、土壤<sup>[24]</sup>、水环境<sup>[25]</sup>及动物粪便<sup>[26]</sup>等不同环境微生物群落多样性的研究中, 从而显示出该技术在分析微生物群落多样性方面具有明显的优势。传统的微生物生态学研究方法只限于环境样品中极少部分(0.1%~1%)可培养的微生物类群, 这种局限性严重影响了绝大多数微生物的分类地位和系统发育关系的深入研究<sup>[27]</sup>。近年来, 对于研究微生物多样性的技术发展迅速, 已经突破了传统的微生物生态学的研究方法, 例如 PCR-DGGE、RELP 等多种分子生物学技术的出现, 对于研究环境中各种微生物群落的结构和多样性具有重要的意义。

#### 3.1 DGGE 在水体微生物多样性中的应用

在自然环境中, 微生物种群和环境存在着相互依存的关系, 微生物种群在很大程度上决定着水体中营养物质的循环和能量流动, 从而维持了养殖水体中的正常生态系统。淡水生境中存在大量不可培养的细菌, 使得传统的培养技术无法对细菌群落结构的多样性进行深入而全面的研究, 而近年来分子生物学技术的发展则为此方面研究开辟了新的路径。现在可以利用 DGGE 技术直接将水体中进行收集的微生物作为样品来进行分析研究, 克服了只能将水体沉积物作为研究对象的弊端。Tu 等对松花江干流部分地区的细菌多样性进行了研究, 直接从水样中提取细菌总 DNA, 然后用细菌的特定引物扩增细菌的 16S rDNA V3 区片段, 然后用 DGGE 技术对扩增的片段进行分离, 对其条带进行测序分析, 从而分析出水样中细菌群落的结构和种群的多样性<sup>[28]</sup>。Yan 等直接对水体进行收集处理, 通过 DGGE 技术对东湖 5 个地区中的浮游生物群落的基因多样性进行了调查研究, 并探讨了浮游生物在多变季节如何应对环境因素, DGGE 指纹图谱结果显示了 100 条条带, 其中 38% 的条带分属于 5 个地区, 仅有 11% 的条带是 5 个地区所共有的<sup>[29]</sup>。如同以往的研究一样, 现阶段的研究结果显示, PCR-DGGE 指纹图谱技术比传统的微生物检测方法更具灵敏性, 另外, 由于 DGGE 技术的系统性、有效性和快捷性的优点, 使其更适合研究浮游生物群落的多样性特征, 因此, DGGE 指纹图谱技术为研究水生生态系统中的未知物种提供了一个可行性生物监测途径。

养殖水体的水质是养殖的关键因素, 利用生物处理系统对养殖水体进行水质净化, 然后通过 DGGE 技术来研究水质净化前和水质净化后微生物类群的变化, 由此发现对水质净化有益的微生物菌群, 为养殖业的健康发展奠定基础。通过分析生物处理系统中微生物群落的种群结构和动态性, 对研究生物降解过程和污染物转化途径具有重要意义, 同时还能优化处理工艺条件和提高处理效率提供可靠的理论依据<sup>[30]</sup>。Yang 等用 DGGE 技术分析了大规模的印染废水二级生物处理系统中的细菌、真菌、古细菌的动态性, 研究结果显示, 细菌是系统中的优势种群, 尤其从二步生物处理系统过程中采集的水样, 其真菌和细菌的比例在所有的处理单元中均

下降, 然而古细菌和细菌的比例却显著增加<sup>[31]</sup>。尽管微生物群落和支流组成成分多变, 一些细菌种类比如陶厄氏菌属(*Thauera* sp.) 和黄色单胞菌属(*Xanthomonadaceae*) 在所有采集的样品中同时存在, 并且发现在二级生物处理系统中大量存在的古细菌对一些难降解的污染物的降解起着重要的作用。姜昕等应用 DGGE 技术分析了采用人工快速渗透系统来处理污水后微生物种群分布, 发现在此系统中微生物种群随着深度的增加而减少, 并且优势菌是 *Acidovorax* sp.、*Nitrospira* sp.、*Clostridium* sp. 等, 表明快渗池下部存在较强的硝化作用和厌氧的微环境, 快渗池上、下层之间呈现出不同的多样性, 从而为处理效果的稳定和提高提供了理论基础<sup>[32]</sup>。张翔等采用 DGGE 技术揭示了污水处理厂中浮游生物群落 DNA 指纹与水质指标密切相关, 并且发现污水中浮游生物群落多样性丰富, DNA 指纹在空间距离较短的污水处理过程中发生了改变<sup>[33]</sup>。

另外, 利用生物絮团技术同样能达到净化水质的目的, 夏耕等采用 PCR-DGGE 技术分析了在草鱼养殖池塘中生物絮团形成后的第 5、10、15 天的细菌群落结构, DGGE 指纹图谱显示, 第 5 天和第 10 天的相似性系数最高, 达 67.4%; 第 5 天和第 15 天相似性系数最低仅为 40.5%<sup>[34]</sup>。第 10 天时微生物多样性最高, 第 15 天时多样性最低。并且通过软件分析 24 个序列所代表的菌类种系发生树, 其隶属于  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)及拟杆菌纲(Bacteroidetes)等 6 个纲, 通过分析这些微生物的功能特点, 为生物絮团技术在水产养殖业的进一步发展奠定了基础, 由本研究发现应用生物絮团技术可以达到净化养殖池塘和饵料供应的目的。

DGGE 技术不仅在淡水养殖水体中, 在海水养殖水体中也得到了广泛的应用。杨彩霞等应用 DGGE 技术分析了流清河湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化, 发现 1 月水样细菌群落条带数目最丰富, 3 月水样细菌群落条带数目最少<sup>[35]</sup>。另外, 对 DGGE 图谱的主要条带进行切胶测序, 发现 20 条序列所代表的细菌分属于  $\alpha$ -变形菌亚门( $\alpha$ -Proteobacteria)、 $\beta$ -变形菌亚门( $\beta$ -Proteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌亚门( $\gamma$ -Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。

#### 3.2 DGGE 技术在人工湿地微生物多样性中的应用

##### 3.2.1 人工湿地

被誉为“地球之肾”的人工湿地作为一个重要的生态系统, 是一种经济高效的污水处理工艺, 其蕴含的大量植物、动物、微生物等生物资源的相互作用对环境的净化发挥重要作用, 而微生物是湿地生态系统的重要组成部分。因此研究湿地生态系统中微生物的数量、多样性、群落结构对于揭示湿地的运行机制和污染物净化机理具有重要理论意义和实践价值。人工湿地有着独特的净化机制, 在水体处理过程中, 湿地通过植物、微生物、基质三者的协同作用来处理污染物; 通过微生物的降解, 有机物通过好氧菌分解为二氧化碳和水, 通过厌氧菌分解成二氧化碳和甲烷; 氨盐经硝化细菌转化为硝态氮后由反硝化细菌还原为氮气。通过一系列的分解转化, 污水中的污染物一部分被降解同化为微生物自身组成,

另一部分变成无害的无机物回到自然界中。人工湿地通过各种微生物的联合作用,加速了水体有机物的物质循环,从而避免了养殖水体有机物过剩的污染。微生物多样性目前被认为是最具潜力的检测指标之一,通过研究湿地微生物多样性,可以更准确及时的监测湿地发生的各种变化,从而使湿地系统得到合理的利用和保护。

### 3.2.2 DGGE 技术应用于人工湿地微生物多样性的研究

人工湿地中微生物的多样性及结构是湿地净化污水中的一个重要因素,人工湿地系统组成了一个重要的污水处理系统,其低功耗、低成本、低碳排放的优点,现已得到广泛的应用<sup>[36]</sup>。已有研究结果显示微生物的数量越多其污染物的去除率也就越高。针对人工湿地的特点,采用 PCR-DGGE 技术研究湿地内不同生境内包括湿地植物根际土壤、底泥、水样等微生物群落的结构特征、湿地微生物群落结构的时空差异和季节变化特点以及该湿地内微生物的功能响应,为湿地的合理利用以及生态系统的恢复提供一定的科学依据,另外,利用人工湿地与池塘系统共建的复合人工湿地-池塘养殖系统来净化池塘水质,这对以后水产养殖业的发展有重要的意义。姚延丹等利用 PCR-DGGE 技术探讨了复合池塘养殖系统中微生物的群落结构,与传统的养殖系统相比,复合池塘系统更能提高细菌的多样性,更能保持微生物群落结构的稳定<sup>[37]</sup>。目前对于 DGGE 技术在人工湿地微生物多样性中的应用已经被多数学者所研究。

Jean 等利用 DGGE 技术获得了微生物群落的指纹图谱,利用此微生物图谱来评估湿地生态系统在时间尺度方面的平衡,另外,湿地系统的渗透系数在决定时间尺度的平衡的起始方面同样是一个重要的参数<sup>[38]</sup>。研究发现,在营养物质供应的第 89 天后,人工湿地生态系统达到平衡,一个既定的微生物群落在表层和深层的沉积物中的指纹图谱呈现高度的相似性。

武钰坤等应用平板计数与 PCR-DGGE 技术相结合的方法对人工湿地不同植物(芦苇、香蒲、黑麦草)根际微生物群落多样性进行了比较研究,发现 3 种植物根际的微生物数量和群落结构存在显著差异,并且芦苇根际具有数目最多的常见物种和最大的物种多样性,因此在人工湿地上栽种芦苇能更好的影响土壤微生物的富集与分布,并能更好地提高微生物的群落多样性<sup>[39]</sup>。因此,通过此研究,可以在人工湿地中选择种植合适的植株,更好地利用人工湿地达到去除污染物的目的。

司永明等应用 PCR-DGGE 技术对湿地 5 种运行工艺的微生物群落结构进行了研究,结果表明,不同工艺组合细菌多样性指数(H)、丰度(S)和均匀度(EH)均有所不同,单一的潜流或表流运行工艺的微生物多样性要远小于组合工艺的微生物多样性<sup>[40]</sup>。另外,湿地中的不同工艺不同位置既存在着共同的微生物种类,也存在着各自独特的微生物种类。

朱建林等采用 DGGE 技术对梯田式人工湿地(TTCW)和复合垂直流式人工湿地(IVCW)内的微生物群落结构的动态变化及其对生活污水处理效果的影响进行了对比研究<sup>[41]</sup>。研究结果显示 TTCW 和 IVCW 对污水都有较好的处理效果,但是 TTCW 具有较高的去除污染物的能力,这种能力可能是 TTCW 中微生物群落结构变化所致。

黄德峰等采用 DGGE 技术分析了复合垂直流人工湿地系统中微生物群落结构垂直分布及组成的多样性,结果表明下行池中表层微生物多样性指数最高,上行池各样品间的相似性较好<sup>[42]</sup>。从下行池到上行池,微生物群落的多样性降低,各群落间的相似性逐渐增大,而根际效应有助于提高湿地表层微生物的多样性。

为了了解人工湿地运行初期植物根际土壤细菌群落的结构多样性,汪仲琼等利用 DGGE 技术,比较了嘉兴石臼漾人工构筑生态湿地和白洋淀天然湿地府河河口区域芦苇根际土壤的细菌群落结构多样性,结果表明,嘉兴石臼漾湿地在运行初期(1~1.5 年),根际土壤细菌的物种丰富度已与白洋淀湿地相近,但香农指数和均匀度指数均显著低于白洋淀湿地;随着污染物浓度的降低,土壤细菌群落基因型多样性指数增大<sup>[43]</sup>。

Xi 等采用 DGGE 技术调查了海拔 3 400 m 的青藏高原上湿地水体中的细菌群落多样性,研究结果显示,取自同一环境的样品有着相似的群落组成,另外通过利用 16S rDNA 克隆文库分析细菌群落和优势种群的组成,发现变形菌门占 51.6%,为优势菌群;另外拟杆菌门占 17.7%;疣微菌门占 4.8%。多于 24.2% 的克隆文库和未被培养的细菌序列有着极高的相似性<sup>[44]</sup>。

植物的根际中存在着内生菌,这些内生菌在土壤、湿地水体中对重金属和降解的污染物有一定的抵抗力,并且在污染物的防治和植物修复中发挥着重要作用<sup>[45]</sup>,为此 Li 等调查了北京翠湖湿地中香蒲根际内生菌的群落结构,系统发育树显示,87.5% 的序列属于变形菌门,3.8% 的序列属于梭杆菌门,3.3% 的序列属于类杆菌门,另外还有大约 5% 属于未培养的细菌<sup>[46]</sup>。一些内生菌能固氮并能促进植物的生长,另外一些内生菌却能移除水体中的氮、磷、有机物,因此能增强富营养化水体中植物的修复能力。

Calheiros 等利用 2 个连续的垂直地表流人工湿地(CW)来处理制革厂的废水,研究了细菌群落多样性的变化,通过 DGGE 技术从 CW 中获得了 50 多种细菌,分属于厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -变形菌门;每 1 个 CW 中植物从根到表面的细菌群落变化都跟所栽种的植物种类、水力负荷有关;CW 中的植物类型对 1 个确定的细菌群落有一定的影响,栽种不同类型植物的 CW 对有机物的移除有一定作用,这些主要是因为该系统中存在较高的多样性指数<sup>[47]</sup>。

为了更好地了解盐度对脱氮群落组成的影响,Zhe 等利用分离培养和未分离培养(DGGE 方法)2 种方法研究了江苏省黄海岸线人工湿地中沿着盐度梯度的变化脱氮群落组成的连续变化,研究结果表明,在 3 个盐度梯度(低、中、高)的湿地中,优势种群都为  $\alpha$ -变形菌门,并且表明盐度是影响脱氮环境中微生物群落的重要因素<sup>[48]</sup>。

随着水产养殖业的不断发展,养殖规模不断扩大,养殖收益不断增加,但是养殖后产生的废水也越来越多,通过人工湿地来净化废水已被多数学者所研究。Dong 等利用 DGGE 技术分析通过人工湿地处理后养殖废水中的微生物群落结构,结果显示,从人工湿地中废水的进水口到出水口,总氮、总磷等各种指标不断减少,多样性指数和丰富度也在不断减少,因此,在湿地中微生物的活性对营养物质的移除具有一定的作

用<sup>[49]</sup>。Calheiros 等在二级人工湿地中栽种不同植物来处理工业废水,并利用 DGGE 技术分析湿地中的微生物群落结构变化,在两个连续的湿地系统的黏土基质中分别种植香蒲和芦苇,运行 31 个月,结果显示,在每一个系统单元中都发现了几个明显不同的细菌群落,细菌群落的不同和所种植植物的种类有一定的相关性,通过分离人工湿地中植物根际与基质中的微生物,发现存在  $\gamma$ -变形菌门、 $\alpha$ -变形菌门、鞘脂杆菌门、放线菌门和拟杆菌门微生物,这些微生物在降解污染物方面有一定的作用<sup>[50]</sup>。Zhang 等在一个完整的人工湿地中探讨了所栽种的植物种类对微生物生物量和群落结构变化的影响,通过线性回归分析发现,植物生物量与植物种类的丰富度有很大关系,增加植物种类的丰富度能够增加微生物的种类<sup>[51]</sup>。

#### 4 DGGE 技术在人工湿地及养殖池塘中的前景展望

池塘养殖是水产养殖的基础工作,近年来随着养殖规模的不断扩大、养殖品种的不断增多、养殖集约化程度的不断加深,相应的养殖负面效应也越来越大,包括养殖水体环境的不断恶化,导致疾病的频繁爆发,给养殖业带来巨大困扰。对于小规模的水产养殖可以通过定期换水等基础工作来改善养殖环境,但是对于大规模的水产养殖,通过基础工作不足以解决这些关键性的问题,而目前在养殖池塘中添加微生物生态制剂被认为是最简便有效的方法,对养殖池塘包括水、池塘底泥等在内的不同生境的微生物群落进行调查研究,则是筛选原位微生物生态制剂的工作基础<sup>[52]</sup>。人工湿地是一种天然的、低成本的污水处理系统<sup>[1]</sup>,在这个系统中主要依靠植物和微生物来达到净化水质的目的<sup>[53]</sup>,而微生物是维持湿地系统正常生态功能的关键因子,对人工湿地中包括水、底泥、植物根际土壤等在内的不同生境的微生物进行分析研究,这为水体中污染物的净化提供一定的理论基础。鉴于人工湿地及养殖池塘 2 种不同生态系统中存在大量微生物菌群,可借助 DGGE 技术了解这些微生物的多样性及结构并通过与湿地的净水效果进行并行分析,确定净水效果最佳时期的菌谱,从而为发现对水质净化有益的微生物菌群奠定基础,建成一种以湿地作为主体的养殖用水前处理及废水循环利用的模式。

DGGE 技术是目前研究环境中微生物群落静态性和动态性最有利的工具之一,此技术的出现使人们对环境中各种微生物有了更深一步的认识。比如,通过了解环境污水中的微生物群落结构和存在于其中的细菌种类的特征,人们可以从微生物角度出发来治理环境污水,从而为人们的生存提供优质水源;此外,DGGE 技术在湿地、动物微生物群落中的研究也很多。当前 DGGE 技术有操作简单、分辨率高、重复性好、技术所需成本低等多方面的优点,但是由于其自身的局限性,目前还不能全面真实的反映某一个生境的微生物群落结构特征,也不能确定其代谢特性、数量及基因表达水平等多方面的信息,这些都是 DGGE 技术需要不断完善和发展的地方。DGGE 技术在水产养殖中的发展也不容忽视,例如,利用通过 DGGE 技术分析养殖池塘中微生物种类来探讨对水产生物有利的有益菌。此外,随着研究手段的多样化,人们对环境中微生物群落结构的多样性也有了越来越深刻的认识,但是到目前为止,还没有发现能够充分描述微生物全部群落结构的单

一技术。因此,以后的研究方向应该集中在使用多种与分子生物学技术相结合的方法来全面充分地了解微生物群落垂直和水平的全部结构,并且在了解结构的基础上来分析群落垂直和水平的时空变化。

#### 参考文献:

- [1] Faulwetter J L, Gagnon V, Sundberg C, et al. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review [J]. Ecological Engineering, 2009, 35 (6): 987 - 1004.
- [2] Verhoeven J T A, Meuleman A F M. Wetlands for waste water treatment: opportunities and limitations [J]. Ecological Engineering, 1999, 12 (1): 5 - 12.
- [3] Vrhšek D, Kukanja V, Bulc T. Constructed wetlands (CW) for industrial waste water treatment [J]. Ecological Engineering, 1996, 30 (10): 2287 - 2292.
- [4] Vymazal J. The use constructed wetlands with horizontal subsurface flow for various types of wastewaters [J]. Ecological Engineering, 2009, 35 (1): 1 - 17.
- [5] Ercolini D D. PCR - DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food [J]. Microbiol Methods. 2004, 56 (3): 297 - 314.
- [6] 吴高锋, 李文刚, 高卫科, 等. PCR - DGGE 的原理及在动物肠道菌群分析中的应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (6): 37 - 39.
- [7] 高启禹, 徐光翠, 李小英. 变形梯度凝胶电泳 (DGGE) 在微生物多样性中的应用 [J]. 生物学杂志 2009, 26 (5): 80 - 82.
- [8] Vallaes T, Topp E, Muyzer G, et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobial and methanotrophs [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24 (3): 279 - 285.
- [9] 熊毅, 赵璟, 赵鑫. PCR - DGGE 在废水生物处理技术中的应用 [J]. 重庆三峡学院学报, 2010, 3 (26): 97 - 101.
- [10] 权春善, 范圣第. 利用 DGGE 技术研究不同外界刺激对土壤微生物群落的影响 [C]. 大连: 中国生态学会微生物生态专业委员会 2007 年会暨国际研讨会, 2007.
- [11] 陈美军, 孔繁翔, 陈非洲. 太湖不同湖区真核微型浮游生物基因多样性的研究 [J]. 环境科学, 2008, 29 (3): 769 - 775.
- [12] Zhang Y, Chang F, Wang A J. The key procedures and advancement in microbial communities analysis of DGGE [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 14 (3): 245 - 249.
- [13] 鲍新宇, 杨剑, 高新艳, 等. DGGE 技术的原理及其在动物胃肠道微生态系统研究中的应用 [J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32 (11): 25 - 26.
- [14] 向少能, 陈琳, 何晓丽, 等. 水体微生物多样性 PCR - DGGE 分析方法的比较研究 [J]. 重庆工学院学报, 2007, 21 (7): 74 - 78.
- [15] 李鹏, 毕学军, 汝少国. DNA 提取方法对活性污泥微生物多样性 PCR - DGGE 检测的影响 [J]. 安全与环境学报, 2007, 7 (2): 53 - 57.
- [16] 万晶晶, 张汝嘉, 邢德峰, 等. 超声波破碎法提取活性污泥 DNA 及其 DGGE 分析 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40 (4): 559 - 562.
- [17] Luo P, Hu C Q. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene - based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2007, 25 (3): 310 - 316.
- [18] Lahr D J, Katz L A. Reducing the impact of PCR - mediated recom-

- bination in molecular evolution and environmental studies using a new - generation high - fidelity DNA polymerase [J]. *Biotechniques*, 2009, 47(4): 857 - 866.
- [19] Balázs M, Rónavári A, Németh A, et al. Effect of DNA polymerases on PCR - DGGE patterns[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 5(11): 1 - 6.
- [20] 张敏, 蔡俊鹏. 不同 DNA 聚合酶对 PCR - DGGE 技术的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(14): 8231 - 8233.
- [21] Muyzer G, Ehen D E, Ander G U. 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*, 1992, 59(3): 656 - 697.
- [22] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction - amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695 - 700.
- [23] 付琳琳, 曹郁生, 李海星, 等. 应用 PCR - DGGE 技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(12): 103 - 105.
- [24] 王洋清, 杨红军, 李勇, 等. DGGE 技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2011(5): 75 - 79.
- [25] Wu Q, Zhao X H, Zhao S Y. Application of PCR - DGGE in research of bacterial diversity in drinking water[J]. *Biomedical And Environmental Sciences*, 2006, 19(5): 371 - 374.
- [26] 郭艳, 张进良, 邓昌彦, 等. 利用 PCR - DGGE 技术分析猪粪堆肥细菌群落结构[J]. *河南师范大学学报*, 2010, 38(5): 159 - 162.
- [27] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143 - 169.
- [28] Tu T, Li L, Mao G N, Wang Y Y. Analysis of bacterial diversity in the Songhua River based on nested PCR and DGGE[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(11): 3505 - 3515.
- [29] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, et al. Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR - DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(2): 290 - 297.
- [30] 卢永, 陈秉娟, 申世峰, 等. PCR - DGGE 在水处理微生物群落多样性分析中的应用[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(5): 55 - 59.
- [31] Yang Q X, Wang J, Wang H, et al. Evolution of the microbial community in a full - scale printing and dyeing wastewater treatment system[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 155 - 163.
- [32] 姜昕, 马鸣超, 李俊, 等. 用 DGGE 技术分析污水人工快速渗滤系统中微生物种群分布[J]. *微生物通报*, 2007, 34(6): 1179 - 1183.
- [33] 张翔, 余育和, 冯伟松, 等. 污水处理厂中浮游生物群落 DNA 指纹及其与水质指标关系[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1526 - 1533.
- [34] 夏耕, 郁二蒙, 谢俊, 等. 基于 PCR - DGGE 技术分析生物絮团的细菌群落结构[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1563 - 1571.
- [35] 杨彩霞, 王崇明, 李赞, 等. 应用 DGGE 技术分析流清河湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 407 - 413.
- [36] Chen G Q, Shao L, Chen Z M, et al. Low - carbon assessment for ecological wastewater treatment by a constructed wetland in Beijing[J]. *Ecological Engineering*, 2011, 37(4): 622 - 628.
- [37] 姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合人工湿地 - 池塘养殖生态系统细菌多样性研究[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(7): 51 - 55.
- [38] Ramond J B, Welz P J, Cowan D A, et al. Microbial community structure stability, a key parameter in monitoring the development of constructed wetland mesocosms during start - up[J]. *Research in Microbiology*, 2012, 163(1): 28 - 35.
- [39] 武钰坤, 刘永军, 司英明, 等. 人工湿地不同植物根际微生物群落多样性比较研究[J]. *生态科学*, 2012, 31(3): 318 - 323.
- [40] 司永明, 刘永军, 武钰坤, 等. 人工湿地不同工艺的污染物去除及微生物群落结构分析[J]. *西南大学学报*, 2012, 8(34): 122 - 130.
- [41] 朱建林, 詹鹏, 吕文洲. 聚合酶链反应 - 变性梯度凝胶电泳技术研究梯田式人工湿地微生物群落动态变化[J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(2): 46 - 50.
- [42] 黄德峰, 李田, 陆斌. 复合垂直流人工湿地污染物去除及微生物群落结构的 PCR - DGGE 分析[J]. *环境科学研究*, 2007, 20(6): 137 - 141.
- [43] 汪仲琼, 王为东, 祝贵兵, 等. 人工和天然湿地芦苇根际土壤细菌群落结构多样性的比较[J]. *生态学报*, 2011, 31(16): 4489 - 4498.
- [44] Chen X, Feng S G, Zhang H X, et al. Investigation of bacterial community diversity in water of Zoige Alpine Wetland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(4): 205 - 211.
- [45] Germaine K J, Liu X, Cabellos G G, et al. Bacterial endophyte - enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 57(2): 302 - 310.
- [46] Yan H L, Qun F L, Yin Liu, et al. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland[J]. *Research in Microbiology*, 2011, 162: 124 - 131.
- [47] Calheiros C S C, Teixeira A, Pires C, et al. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 5032 - 5038.
- [48] Piao Z, Zhang W W, Ma S, et al. Succession of denitrifying community composition in coastal wetland soils along a salinity gradient[J]. *Pedosphere*, 2012, 22(3): 367 - 374.
- [49] Dong X, Reddy G B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR - DGGE technique[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1175 - 1182.
- [50] Calheiros C S, Duque A F, Moura A, et al. Changes in the bacterial community structure in two - stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13): 3228 - 3235.
- [51] Zhang C B, Wang J, Liu W L, et al. Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full - scale constructed wetland[J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(1): 26 - 28.
- [52] 何凤旭, 周志刚, 姚斌, 等. 3 种 DNA 提取方法对养殖池塘不同生境菌群 PCR - DGGE 分析的影响[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(1): 73 - 79.
- [53] Krasnits E, Friedler E, Sabbah I, et al. Spatial distribution of major microbial groups in a well established constructed wetland treating municipal wastewater[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(7): 1085 - 1089.