变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用

马悦欣[1,2], Carola Holmström[2], Jeremy Webb[2], Staffan Kjelleberg[2]
(1. 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023; 2. School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney 2052, Australia)

摘要:由于从环境样品中分离和培养细菌的困难,分子生物学方法已发展用来描述和鉴定微生物群落。近年来基于 DNA 方法的群落分析得到了迅速的发展,如 PCR 扩增技术,克隆文库法,荧光原位杂交法,限制性酶切片段长度多态性法,变性和温度梯度凝胶电泳法。

DGGE 已广泛用于分析自然环境中细菌、蓝细菌,古菌、微微型真核生物、真核生物和病毒群落的生物多样性。这一技术能够提供群落中优势种类信息和同时分析多个样品。具有可重复和容易操作等特点,适合于调查种群的时空变化,并且可通过对切下的带进行序列分析或与特异性探针杂交分析鉴定群落成员。

DGGE 分析微生物群落的一般步骤如下:一是核酸的提取,二是 16S rRNA, 18S rRNA 或功能基因如可容性甲烷加单氧酶羟化酶基因(mmoX)和氨加单氧酶 α-亚单位基因(amoA)片段的扩增,三是通过 DGGE 分析 PCR 产物。DGGE 使用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶,该凝胶能够有区别的解链 PCR 扩增产物。由 PCR 产生的不同的 DNA 片段长度相同但核苷酸序列不同。因此不同的双链 DNA 片段由于沿着化学梯度的不同解链行为将在凝胶的不同位置上停止迁移[5]。DNA 解链行为的不同导致一个凝胶带图案,该图案是微生物群落中主要种类的一个轮廓。DGGE 使用所有生物中保守的基因片段如细菌中的 16S rRNA 基因片段和真菌中的 18S rRNA 基因片段。

然而同其他分子生物学方法一样,DGGE 也有缺陷,其中之一是只能分离较小的片段,使用于系统发育分析比较和探针设计的序列信息量受到了限制。在某些情况下,由于所用基因的多拷贝导致一个种类多于一条带,因此不易鉴定群落结构到种的水平。此外,该技术具有内在的如单一细菌种类 16S rDNA 拷贝之间的异质性问题,可导致自然群落中微生物数量的过多估计。

DGGE 是分析微生物群落的一种有力的工具。不过为了减少 DGGE 和其它技术的缺陷,建议研究者结合 DGGE 和其它分子及微生物学方法以便更详细的观察微生物的群落结构和功能。

关键词:DGGE; 微生物生态学; PCR; rRNA

Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology

MA Yue-Xin[1,2], Carola Holmström[2], Jeremy Webb[2], Staffan Kjelleberg[2] (1. *School of Life*

基金项目:国家留学生基金委员会海洋生物污损和生物创新中心资助项目;澳大利亚国家自然科学基金资助项目(DP0211584)

收稿日期:2002-08-17;**修订日期**:2003-04-20

作者简介:马悦欣(1963~),女,山东人,副教授,主要从事海洋微生物生态学研究。E-mail: mayuexin@dlfu.edu.cn

Foundation item: China Scholarship Council, the Centre for Marine Biofouling and Bio-innovation and the Australian Research Council grant (No. DP0211584)

Received date: 2002-08-17; **Accepted date**: 2003-04-20

Biography: MA Yue-Xin, Associate professor, mainly engaged in marine microbial ecology.

万方数据

Science and Technology, *Dalian Fishery University* 116023, *China*; 2. *School of Biotechnology and Biomolecular Sciences*, *The University of New South Wales*, *Sydney* 2052, *Australia*). ***Acta Ecologica Sinica***, **2003**, **23**(**8**): **1561**～**1569**.

Abstract: Because of the difficulty associated with isolating and culturing bacteria from environmental samples, alternative methods based on molecular techniques have been developed to describe and identify microbial communities. Recent years have witnessed a rapid development of DNA-based methods for community analysis such as PCR amplification, clone libraries, fluorescent *in-situ* hybridisation, restriction fragment length polymorphism, denaturing and temperature gradient gel electrophoresis.

DGGE has been widely used in analyzing the biodiversity of bacterial, cyanobacterial, archaeal, picoeukaryotic, eukaryotic and viral communities in natural habitats. This technique can provide information on the predominant species in a community and analyze multiple samples simultaneously. The reproducibility and ease-of use of this technique permit investigation of the spatial and temporal variability of the population and identification of community members by sequencing of excised bands or by hybridization analysis with specific probes.

The general procedure for DGGE analysis of communities of microorganisms is as follows: First, nucleic acid extraction; Second, amplification of genes encoding the 16S rRNA, 18S rRNA or functional genes such as mmoX, amoA; Third, analyze PCR products by DGGE. DGGE employs a polyacrylamide gel with a chemical denaturing gradient that differentially melts the PCR amplified products. The different DNA fragments generated by PCR are of the same length but differ in the nucleotide sequence. Therefore, the different double stranded DNA fragments will stop migrating at different position in the DGGE gel due to their different melting behavior along the chemical gradient. The differences in the melting behavior of the DNA lead to a banding pattern, which is a profile of the predominant species present in the community. DGGE utilizes a gene fragment conserved among all organisms for example 16S rRNA gene fragment for bacteria and 18S rRNA for fungi.

It must be emphasized that, as with other molecular methods, DGGE is not free of biases. One of these biases is that DGGE allows separation only of small fragments, which limits the amount of sequence information for phylogenetic comparison as well as probe design. In some circumstances, identification of community structure to the species level is problematic due to multiple copies of the gene of interest resulting in more than one band in a single species. In addition, this technique carries the inherent problem of heterogeneity between copies of, for example, the 16S rDNA in a single bacterial species, which leads to an overestimation of the number of microbes within natural communities.

DGGE is a powerful tool for the analysis of microbial communities. However, in order to reduce potential biases and limitations of DGGE and other techniques, it is suggested that researchers combine DGGE with other molecular and microbiological techniques to obtain a more detailed view of microbial community structure and function.

Key words: DGGE; microbial ecology; PCR; rRNA

文章编号: 1000-0933(2003)08-1561-09 **中图分类号**: Q938 **文献标识码**: A

对于微生物多样性及其在自然生态系统中作用的了解仅依靠传统的微生物学方法如显微镜、培养方法等是不够的，因为微生物形态简单，缺乏明显的外部特征；而依据生理生化特征对微生物进行分类鉴定也几乎是不可能的，因为大多数自然环境中的微生物由于难于模拟其生长繁殖的真实条件而不能获得纯培养[1]。因此，为了更好的了解微生物多样性及其在自然生态系统中的作用，需要其他的补充技术。

分子生物学方法的应用使我们能够在遗传水平上研究微生物的多样性。原核生物的 16S rDNA 序列可被用于推断系统发育关系，并通过与数据库比较，鉴定未知的微生物[2]。因此，对 16S rRNA 基因进行克

万方数据

隆和序列分析成为探索自然环境样品中微生物多样性的有利方法[3]。使用该方法使人们了解到用传统方法不足以得到的更加丰富的微生物多样性。但是微生物多样性的研究只是微生物生态学的一个方面;研究较长一段时期内或环境被其他因素干扰后微生物群落中种群的变化又是另一方面,为此克隆方法因费时和劳动强度大而不适用,用特定的寡核苷酸探针的杂交技术研究种群的动态较为适当。然而,探针往往只针对某一特定的种群,所以研究自然生态系统中不同微生物的多样性和监视微生物群落的动态需要其他的分子生物学方法。

遗传指纹技术依据独特核酸物质的分离提供微生物群落多样性的图案或轮廓[4]。通常微生物群落的遗传指纹技术包括 3 个步骤,一是核酸的提取,二是基因扩增,三是通过遗传指纹技术如 DGGE 分析 PCR 产物。DGGE 使用具有化学变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)梯度的聚丙烯酰胺凝胶,该凝胶能够有区别的解链 PCR 扩增产物。由 PCR 产生的不同的 DNA 片段长度相同但核苷酸序列不同。因此不同的双链 DNA 片段由于沿着化学梯度的不同解链行为将在凝胶的不同位置上停止迁移[5]。DNA 解链行为的不同导致一个凝胶带图案,该图案是微生物群落中主要种类的一个轮廓。DGGE 使用所有生物中保守的基因片段如细菌中的 16S rRNA 基因片段和真菌中的 18S rRNA 基因片段。

自从 1993 年 DGGE 被引入微生物生态学以来[6],该技术被广泛地用作分子工具比较微生物群落的多样性和监视种群动态[7]。本文综述 DGGE 在微生物生态学中的应用,讨论该技术的限制因素,并展望其应用前景。

1　分析群落多样性

DGGE 用于确定总的细菌群落或独特种群的遗传多样性。Kawai 等用 PCR 扩增的 16S rDNA 片段的 DGGE 分析制药过程中使用的从自来水通过离子交换制备的纯净水中细菌的多样性[8]。群特异性 PCR 和 DGGE 用于分析不同土壤中放线菌群落,通过先用放线菌特异性引物扩增随后用细菌引物进行二次 PCR 作者能估计细菌群落中放线菌的代表[9]。Nübel 等设计了一对专门扩增蓝细菌 16S rDNA 片段的引物,结合 DGGE 分析这些片段可测定非无菌培养物、地衣和复合微生物群落中蓝细菌的多样性[10]。Salles 等用设计的伯克氏菌属(*Burkholderik*)特异性引物进行的 PCR-DGGE 检测和分析两块草地样地中 *Burkholderik* 属群落的多样性揭示主体和根际土壤样品中生物多样性的不同[11]。

DGGE 分析扩增的 16S rDNA 片段被用于研究丹麦 Mariager Fjord 的分层水柱中硫酸盐还原细菌的存在与活力[12],其原理是从环境 DNA 获得的 PCR 产物将证明不同细菌种群的存在,而扩增 rRNA 的产物将表明这些细菌种群中哪些是有活性的。DGGE 比较不同深度核酸的 PCR 和 RT-PCR 产物表明对 rRNA 的 DGGE 图案中有两条带不存在于对 DNA 的 DGGE 图案中,从这一结果作者得出结论,或许两种有活性的细菌种群数量低。类似的方法用于调查发育的菊根对根际中细菌种群与活力的影响[13]。

通过 DGGE 图案与分类单元特定的寡核苷酸探针的杂交分析,或对切下 DGGE 带的序列分析可进一步鉴定群落成员。PCR-DGGE 图案与属和群特异性寡核苷酸探针杂交用于分析研究土壤 pH 对氨氧化菌组成的影响[14]。DGGE 用于研究变质的生物磷去除反应器中微生物的多样性,通过序列分析切下的 DGGE 带,发现与已知种类无密切关系的一新群 γ-变形杆菌[15]。

使用 PCR-DGGE 及克隆和序列分析可获得更多有关微生物群落成员特性的信息。Vybiral 等[16]用 DGGE 研究地中海西部 3 种过滤海水部分(总的细菌种群,大于 0.2 μm 的细菌部分和 0.2 μm 滤液)中每一部分的细菌群落结构,结果表明,0.2 μm 过滤性和总的细菌种群的主要区带的 DGGE 图案是不同的。DGGE 图案中代表 0.2 μm 过滤性细菌的片段主要是海洋细菌的饥饿形式而不是超微型细菌。序列分析切下的和克隆的 DGGE 轮廓中的 DNA 带显示 0.2 μm 过滤性细菌的系统发育起源,主要与已知的、典型的 α-和 β-变形杆菌中的海洋分离菌和噬纤维菌属-黄杆菌属-拟杆菌属(CFB)聚成群。用 DGGE 结合克隆和序列分析研究厌氧条件下降解稻草的细菌群落的结果表明,稻草在水稻田土壤中培育 15d 后定居和降解稻草的细菌群落形成,其优势种群为不同的梭菌群,尤其是Ⅰ,Ⅲ,ⅪVa 群[17]。

更为综合的方法包括分子生物学和微生物学等多种方法的应用,能更实际地揭示微生物群落的结构和功能。DGGE 与平板培养结合分析土豆内生细菌群落的多样性,DGGE 图案揭示有限复杂性群落的存

在,土豆茎部与茎皮和根部的典型群落不同,出现的内生有机体属于 α-,β-和 γ-变形杆菌及厚壁菌门(*Firmicutes*),几种序列与分离菌相一致,而一部分序列与分离菌不同。此结果表明分子方法能检测可培养有机体和不可培养或尚未培养的内生有机体[18]。Hold 等用菌落形态、RFLP、PCR 扩增 16S rRNA 的 DGGE 和最大限度的分析 16S rRNA 基因序列比较有毒和无毒甲藻 *Alexandrium* spp. 和 *Scrippsiella trochoider* 培养物中细菌的多样性,结果认为,许多不同的细菌种类与甲藻有关,其中有些种类是调查藻共有的,而另一些种类对特定的藻是专一的[19]。通过依赖和不依赖培养方法评价田间生长植物种类的叶际微生物群落,PCR-DGGE 表明,同一植物种类不同个体上的微生物群落结构是相似的,但不同植物种类的是独特的。通过克隆和序列分析优势 DGGE 带鉴定 *Citrus sinesis* 的叶际细菌发现一些序列是从前未描述的种类[20]。

∅vre ås 等[21]首次进行了古菌 rDNA 的 DGGE,他们用域特异性引物研究在挪威 meromictic 湖中细菌和古菌的分布,对两域的成员发现了相反的结果,细菌的多样性随深度降低,而古菌的多样性则增加。DGGE 图案与群专一性寡核苷酸探针杂交分析表明,硫酸盐还原细菌和甲烷微生物的存在。PCR-DGGE 和克隆文库的构建结合分析两种不同的变质的古代壁画中古菌群落,序列分析证明特征明确的嗜盐性和嗜碱性古生菌的存在[22]。

至今只有少数报道用 PCR-DGGE 研究真核生物的多样性。PCR 扩增 18S rDNA 片段的 DGGE 被用来研究海岸沙丘区固沙植物 *Ammophila arenaria* 的真菌感染,切下 DGGE 带与真菌分离物的 DNA 序列比较揭示了当时未知的多样性[23]。用 18S rDNA 片段的 DGGE 比较荷兰浅淡水湖系统不同水体真核生物的多样性,特有的群落轮廓与一定的环境条件,如有机质和藻类色素的含量呈良好的相关性[24]。DGGE 分析真菌特异性引物 PCR 扩增真菌 18SrDNA 研究挪威枞树残干样品木材栖居真菌的多样性并与相同腐烂柱菌丝培养物调查研究进行比较,认为两种根本不同的技术显示出不同的真菌多样性,表明用 DGGE 分析环境样品得到的真菌种类轮廓的研究可改进难于培养真菌的检测[25]。同样的方法用于研究森林系统中真菌的多样性[26]。

Díez 等[27]首次用 DGGE 研究海洋中微微型真核生物群落的多样性,真核生物特异性引物 PCR 扩增 18S rDNA 片段的 DGGE 指纹用于比较不同时间从地中海西南部一观测站采集不同深度样品的微微型真核生物的多样性,结果垂直的轮廓有很大不同,而同一深度时间上的差异不显著。通过切下 DGGE 带的序列分析研究一表面样品中微微型真核生物的系统发育组成,将其结果与相同样品的克隆文库和末端限制性片段长度多态性指纹分析进行比较,用 3 对不同的引物进行的 3 种基于 PCR 的方法揭示了非常相似的群落组成。

Short 等[28]用藻类病毒特异性 PCR 引物扩增 DNA 多聚酶(pol)基因片段的 DGGE 研究了不同地理位置病毒群落的多样性。

2 研究群落动态

使用 DGGE 可同时分析多个样品,使该技术成为监测微生物群落动态的一种强有力的工具。Schauer 等[29]用 PCR-DGGE 评价沿 Catalan 海岸(NW Mediterranean)浮游细菌组成空间上的不同,依据 DGGE 带的存在和其相对强度,与 Barcelona 港内样品比较,沿岸样品具有明显不同的细菌群落。通过 PCR-DGGE 监视两种拮抗菌接种物在转基因土豆根际定居后对土著微生物群落的影响,接种和未接种土豆的根际和块茎表面群落的 DGGE 图案在任何采样时间都没有呈现差异,两接种菌也没有成为细菌群落的主要成员[30]。PCR-DGGE 用于分析铁缺乏和铁充足条件下大麦根不同部位的细菌群落,结果根际的细菌群落在不同部位有很大不同,并且根际群落可因植物铁营养状况变化引起的根渗出物组成的变化而改变[31]。Duarte 等[32]研究了土壤中含硫烃对细菌群落结构变化的选择性效果。PCR-DGGE 分析取自沿含硫油浓度梯度污染的土壤和用含二苯噻吩(DBT)石油处理的土壤小生态系的样品表明,随着土壤中油含量的增加,分子群落轮廓中所检测带的数目减少,并且用含 DBT 石油处理后的分子群落随时间逐渐变化,而未处理土壤的分子群落轮廓随时间多半是稳定的。PCR-DGGE 用于研究长期汞污染对土壤微生物群落的影响,以带的数目和丰度表示的群落结构和多样性沿汞梯度发生改变和降低[33]。Lapara 等[34]研究了升高温度

对好氧生物废水处理过程中细菌群落结构和功能的影响,DGGE 分析细菌群落揭示每一温度支持独特的细菌群落。PCR-DGGE 用于分析华盛顿州东部 4 种土壤中细菌群落结构和多样性。结果表明,管理和农学实践对细菌群落结构的影响比年降水量更大[35]。Norris 等[36]使用 PCR-DGGE 研究了用滤光器排除紫外(UV)对温泉微生物丛中微生物组成和光合作用能力的影响,结果在 40～47 C 于 1～3 个月期间内有或无,高或低辐射对微生物群落组成没有明显影响,但免受紫外辐射影响的表层蓝细菌的光合作用能力与保持在紫外辐射下的相比降低。

Schafer 等[37]用 PCR-DGGE 研究中等生态系统实验中营养对地中海细菌群落活力和多样性的影响,细菌群落的来源于 DNA 和 RNA 的 DGGE 指纹随时间的变化表明不同培养期细菌群落组成和最有活力细菌种群的变化,来源于 RNA 图案中的主要 DGGE 带的序列与 α-,β-,γ-变形杆菌和 CFB 的成员的 16S rRNA 基因序列类似。

Bano 和 Hollibaugh[38]通过用群特异性引物对 PCR 扩增 16S rRNA 基因和二次 PCR-DGGE 研究了北冰洋中 β-变形杆菌亚门的氨氧化菌的空间分布和多样性,结果认为,该群菌多样性低,海洋有 *Nitrosospora* 特征的有机体占优势,北冰洋西部区域多样性似乎较高,该区受经 Bering 和 Chukchi 海太平洋流入物的影响。在连续 pH 降低的稍酸性、泥炭的牧场土壤的贫瘠营养经营期间应用独特的 PCR,DGGE,克隆及序列分析和探针杂交分析直接从土壤获得的 rDNA 序列监测 β-变形杆菌中的氨氧化菌的群落变化[39]。Simek 等[40]使用 DGGE 、克隆和序列分析 16S rDNA ,荧光原位杂交(FISH)研究一中等营养水库中减少(< 0.8μm 处理)或增强(<5μm 处理)原生动物吞食后浮游细菌群落的变化,两处理样品的细菌群落组成明显不同,其变化与原生动物吞食有关。克隆文库和 DGGE 的 16S rDNA 片段的序列分析用于研究 3 个不同季节北冰洋样品的浮游细菌群落的系统发育组成[41]。

Juck 等[42]通过多种方法分析加拿大北方两种环境-Kuujjugg,Quc. 和 Alert,Nuavut 石油烃污染和非污染土壤中冷适应细菌群落,DGGE 分离土壤总群落 16S r DNA 的 PCR 片段,依据所观察带的总数目揭示了高水平的细菌多样性,树状图分析以地理位置为基础聚成群,污染对总的微生物的多样性产生负影响。通过聚类分析用 Biolog GN 平板产生的群落水平上的生理轮廓样品依据底物氧化率聚成的群与 DGGE 树状图相似,用依赖和不依赖培养分析恰好一致的结果加强了冷适应细菌群落的多样性主要决定于样品的地理来源而不是石油污染水平的结论。Casamayor 等[43]通过显微镜、PCR-DGGE 和 16S rRNA 基因片段的序列分析,从时空上分析 Ciso 和 Vilar 湖中的微生物群落。这两个湖的湖沼参数不同,从冬季到春季种类组成变化明显,且优势群落成员不同,系统发育分析表明,新的细菌和古菌谱系的存在。在小生态系统中用非培养方法(DGGE 和 PLFA)和培养方法(BIOLOG)研究了使用熏蒸剂溴代甲烷(MeBr)、甲基异硫氰酸盐、1,3-二氯丙烯(1,3-D)和三氯硝基甲烷处理后微生物群落结构的变化。结果表明,MeBr 对土壤微生物群落影响最大,1,3-D 影响最小[44]。Heuer 等[45]连续三年通过 DGGE 和多种培养方法,与野生型植物、不带有溶菌酶基因的转基因对照比较,分析了两株产生 T4 溶菌酶保护其免受细菌感染的转基因土豆系的根际细菌群落。所有方法揭示,与季节、试验地点或年但不是与转基因植物 T4 溶菌酶表达相关的环境因素影响根际群落。

分子微生物生态学中一个新的研究方向是分析编码酶的基因,通常这些基因比相对保守的 16S rRNA 的基因具有更多的序列变化,因此或许是更好的区分密切相关但生态上不同的种群的分子标记[46]。Iwamoto 等[47]用 PCR 扩增 16S rDNA 的 DGGE 监视地下水经生物刺激处理细菌群落的变化。结果揭示,开始处理后细菌群落被干扰,连续变化 45d 或 60d 后形成不同于原始的相对稳定的群落结构。在野外试验期间,DGGE 分析可溶性甲烷加单氧酶(sMMO)羟化酶(mmoX)基因片段以监视数量上占优势的含 sMMO 的甲烷营养型,DGGE 带的 mmoX 基因序列分析揭示生物刺激处理引起潜在优势的含 sMMO 的甲烷营养型从 Ⅰ 型转变成 Ⅱ 型。PCR 扩增氨加单氧酶 α-亚单位的基因(amoA)片段的 DGGE 及相关带的序列分析用来研究废水灌溉对氨氧化菌(AOB)群落组成和功能的影响,与肥料改良水(FAW)比较,用废水灌溉的土壤中 AOB 的种群组成发生一致的改变,灌溉期末用 FAW 灌溉的土壤中具有 *Nitrosospira* 特征的种群为优势种群,而废水灌溉土壤中具有 *Nitrosomonas* 特征的种群为优势种群[48]。

万方数据

Sandaa 等[49]研究了土壤中不同程度污染的重金属对古菌群落的影响，通过 DGGE 比较不同样地的古菌群落揭示随重金属污染的增加土壤中古菌群落的结构不同。克隆的 16S rDNA 分析表明，与独特的和全球分布的泉古生菌界的谱系有高度的相似性，从系统发育上与已知泉古生菌界的种类是不同的。

Van Elsas 等[50]用 DGGE 分析依据真菌特异性引物 PCR 扩增的 18S rDNA 片段来研究土壤小生态系中真菌群落的动态，真菌 *Trichoderma harzianum* 的孢子和少孢节丛孢(*Arthrobotrys oligospora*)的菌丝片段引入土壤后分别能存留 14 d 和 2 个月，淤泥肥土用含 DBT 石油处理后可观察到随时间专一性真菌带的逐渐选择，而未处理的土壤生态系则没有这种作用。

3 监测细菌的富集和分离

DGGE 适合监测微生物的混合培养物。Jackson 等[51]用 DGGE 揭示不同接种稀释物富集培养物中细菌种类的变化，接种物稀释富集培养方法能使大量细菌种类的检测和分离比常规富集培养技术容易。Friedrich 等[52]研究模拟吸着相对菲降解的影响。作者建立了用固体有机相降低菲的生物有效性到不同程度的富集培养物，在此条件下从污染土壤富集和分离的细菌通过 DGGE 和 16S rDNA 片段序列分析，与含沙或不含吸着固相的富集培养物的 DGGE 图案比较，从含不同吸着菲的固相的富集培养物中得到了不同的 DGGE 图案，不同的固相富集选择不同的细菌，结果与假设栖居在相同土壤中不同的菲利用细菌或许是适应不同的菲的生物有效性的结果相一致。El-Fantioussi[53]发现，用利谷隆处理 10a 以上的土壤呈现出很高的降解甲氧-甲基尿素除草剂的活性，而未处理的对照土壤则没有降解活力。因此认为，田间微生物群的出现与土壤的长期处理有关，分离自处理土壤的富集培养物呈现独特的降解甲氧-甲基除草剂的活力。通过 RT-PCR 的 DGGE 监测富集过程表明，需要多种细菌在合适的生理状态下完全转化利谷隆，对于利谷隆的降解，几年的适应导致能完全转化利谷隆细菌群落的选择。多相的方法包括表型和系统发育分析研究原型体微鞘蓝细菌(*Microcoleus chthonoplastes*)的相距遥远的田间种群和培养菌株的多样性。田间种群和培养物的相等的 16S rDNA 片段的 DGGE 图案及相似的形态证明，*M. chthonoplastes* 代表无处不在的单一的定义清晰的分类单元[54]。

4 DGGE 的缺点

DGGE 和其它方法一样也有它的缺点，除了微生物生态学中大多数分子生物学技术所面临的一般性可能的偏见外[55]，DGGE 也有它特殊的限制性[5]，其中之一是只能分离较小的片段(达 500bp)[56]，较长的片段分离率下降，限制了用于系统发育分析和探针的序列信息量。不过 Vainio 和 Hantula[25]发现，扩增不同真菌的 1650bp 18S rDNA 片段可通过 DGGE 获得较好的分离，作者解释为可能是较长分子中发生另外的变化补偿分辨能力的降低。关于分辨率问题，DGGE 通常显示群落中优势种类的 rDNA 片段。1%左右的细菌种群可通过 PCR-DGGE 检测到[6]。Yang 和 Crowley[31]在研究与根不同部位相关的根际微生物群落结构中发现，产生于根的所有部位得到的单条 16S rDNA 带的克隆的序列分析揭示同一条带中有不同的种类，表明 DGGE 在种水平上鉴定细菌群落结构是有限的。Van Elsas[50]发现，依据 NS2f/Fung5r-C 引物对的 PCR-DGGE 方法适合评价真菌接种菌株的命运，但评价土壤中总的真菌多样性明显限制在对有限数量迁移类型的分辨。而具有不同序列 DNA 片段的共迁移[57]对从单条带中得到清晰的序列是一个问题。再一个问题就是依据 16S rDNA 的 DGGE 研究群落多样性，由于某些种类 16S rDNA 的拷贝之间的异质性问题[58]及异源核酸双链分子的检出[59]可能会导致自然群落中细菌数量的过多估计。

5 *DGGE* 在微生物生态学中的应用前景

目前 DGGE 在环境微生物学中是一种被普遍接受的进行微生物群落复杂性和行为研究的分子生物学工具。该技术具有可靠、可重复、快速和容易操作等特点。结合 PCR 扩增标记基因或其转录物(rRNA 和 mRNA)的 DGGE 能直接显示微生物群落中优势组成成分。由于它可同时对多个样品进行分析使之非常适合调查微生物群落的时空变化，而且可能通过序列分析切下的带或通过与独特的探针杂交鉴定群落成员。加之对这种技术作用的理论背景有很好的了解，如双链 DNA 在溶液中的解链行为的热动力学原理。使用 DGGE 可以了解环境被干扰后微生物群落或某种指示微生物的命运。功能基因作为分子标记的常规使用能够用来鉴别密切相关但生态上不同的种群[46]。末端标记的荧光 PCR 产物和区内(intra-lane)标准可用于

万方数据

检测稀少群落成员和便于样品与样品之间的精确比较。双梯度(结合聚丙烯酰胺梯度与变性剂梯度)DGGE分析能获得更好的分辨率[60]。为减少各种不同技术的偏见和限制性,结合 PCR-DGGE 和其它分子生物学技术及微生物学方法[19,45,61,62]将更实际地揭示微生物群落的结构和功能。

References:

[1] Amann R I, Ludwig W, Schlefier K-H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rew.*, 1995, **59**: 143～169.

[2] Olsen G J, Lane D J, Giovannoni S J, *et al*. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1986, **40**: 337～365.

[3] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**(18):4765～4774.

[4] Stahl D A, Capman W C. Application of molecular genetics to the study of microbial communities. *NATO ASI Series G*, 1994, **35**: 193～206.

[5] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antoni van Leeuwenhoek*, 1998,**73**: 127～141.

[6] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**(3):695～700.

[7] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Microbiol.*, 1999,**2**: 317～322.

[8] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, *et al*. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002,**68**(2):699～704.

[9] Heuer H, Krsek M, Baker P, *et al*. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(8):3233～3241.

[10] Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(8): 3327～3332.

[11] Salles J F, De Souza F A, Van Elsas J D. Molecular method to assess the diversity of *Burkolderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**(4):1595～1603.

[12] Teske A, Wawer C, Muyzer G, *et al*. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**(4):1405～1415.

[13] Duineveld B M, Kowalchuk G A, Keijzer A, *et al*. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR\|amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001,**67**(1): 172～178.

[14] Stephen J R, Kowalchuk G A, Bruns M-A V, *et al*. Analysis of γ-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer population in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(8):2958～2965.

[15] Nielsen A T, Liu W T, Filipe C, *et al*. Identification of a novel group of bacteria phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**(3):1251～1258.

[16] Vybiral D, Witte A, and Velimirov B. Investigation of 0.2 μm filterable bacteria from the Western Mediteranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **31**(2): 153～161.

[17] Weber S, Stubner S, Conrad R. Bacterial population colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(3):1318～1327.

[18] Garbeva P, Van Overbeek L S, Van Vuurde J W L, *et al*. Analysis of endophytic communities of potato and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.*,2001, **41** (4): 369～383.

[19] Hold G L, Smith E A, Rappé M S, *et al*. Characterization of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, **37**(2):161 ～173.

万方数据

[20] Yang C H, Crowley D E, Borneman J, *et al*. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(7): 3889～3994.

[21] Øvre ås L, Forney L, Daae F L, *et al*. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(9):3367～3373.

[22] Pioar G, Saiz-Jimenez C, Schabereiter-Gurtner C, *et al*. Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, **37**(1): 45～54.

[23] Kowalchuk G A, Gerards S, Woldendrop J W. Detection and characterization fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(10):3858～3865.

[24] Van Hannen E J, Van Agterveld M P, Gons H J, *et al*. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Phycol.*, 1998, **34**:206～213.

[25] Vaino E J, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.*, 2000, **104**(8):927～936.

[26] Pennanen T, Paavolainen L, Hantula J. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**:697～699.

[27] Diez B, Pedrós-Alió C, Marsh T L, *et al*. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(7): 2942～2951.

[28] Short S M, Suttle C A. Sequence analysis of marine virus communities reveals that groups of related algal viruses are widely distributed in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**(3):1290～1296.

[29] Schauer M, Massana R, Pedrôs-Alió C. Spatial differences in bacterioplankton composition along Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **33**(1): 51～59.

[30] Lottmann J, Heuer H, De Vries J, *et al*. Establishment of introduced antagonistic bacteria in rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **33**(1):41～49.

[31] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(1): 345～351.

[32] Duarte G F, Rosado A S, Seldin L, *et al*. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(3):1052～1062.

[33] Müller A K, Westergaard K. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, **36**(1): 11～19.

[34] LaPara T M, Konopka A A, Nakastu C H, *et al*. Effects of elevated temperature on bacterial community structure and function in bioreactors treating a synthetic wastewater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **24**(2): 140～145.

[35] Ibekwe A M, Kennedy A C, Frohne P S, *et al*. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, **39**(3): 183～191.

[36] Norris T B, McDermott T R, Castenholz R W. The long-term of UV exclusion on the microbial composition and photosynthetic competence of bacteria in hot spring microbial mats. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, **39**(3): 193～209.

[37] Schafer H, Bernard L, Courties C, *et al*. Microbial dynamics in Mediterranean nutrient enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, **33**(3): 243～253.

[38] Bano N, Hollibaugh J T. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the β-subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(5): 1960～1969.

[39] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Hans G, *et al*. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **31**(3): 207～215.

[40] Simek K, Pernthaler J, Weinbauer M G, *et al*. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67** (6):2723～2733.

万方数据

[41] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**(2): 505～518.

[42] Juck D, Charles T, Whyte L G, *et al*. Polyphasic microbial communities analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **33**(3): 241～249.

[43] Casamayor E O, Schäfer H, Bañeras L, *et al*. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscope and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(2): 499～508.

[44] Ibekwe A M, Papiernik S K, Gan J, *et al*. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(7): 3245～3257.

[45] Heuer H, Kroppenstedt R M, Lottmann J, *et al*. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities is negligible relative to natural factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**(3): 1325～1335.

[46] Plays T, Nakamura L K, Cohan F M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**(4): 1145～1156.

[47] Iwamoto T, Tani K, Nakamura K, *et al*. Monitoring impact of *in situ* biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **32**(2): 129～141.

[48] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, *et al*. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(8): 3426～3433.

[49] Sandaa R A, Enger Ø, Torsvik V. Abundance and diversity of *Archaea* in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**(8): 3293～3297.

[50] Van Elsas J D, Duarte G F, Keijzer-Wolters A, *et al*. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, 2000, **43**: 133～151.

[51] Jackson C R, Roden E E, Churchill P F. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with various dilutions of inoculum as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(12): 5046～5048.

[52] Friedrich M, Grosser R J, Kern E A, *et al*. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(7): 2703～2710.

[53] El-Fantioussi S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(12): 5110～5115.

[54] Garcia-Pichel F, Prufert-Bebout L, Muyzer G. Phenotypic and phylogenetic analysis show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**(9): 3284～3291.

[55] Von Wintzingerode F, Goebel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, **21**(3): 213～229.

[56] Myers R M, Fisher S G, Lerman L S, *et al*. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**(9): 3131～3145.

[57] Vallaeys T, Topp E, Muyzer G, *et al*. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, **24**(3): 279～285.

[58] Dahllö F I, Baillie H and Kjelleberg S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(8): 3376～3380.

[59] Ferris M J, Ward D M. Seasonal distributions of dominant 16S rDNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(4): 1375～1381.

[60] Petri R, Imhoff J F. Genetics analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method. *Polar Biol.*, 2001, **24**(4): 252～257.

[61] Straub K L, Buchholz-Cleven B E E. Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate reducing bacteria from diverse European sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(12): 4846～4856.

[62] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, *et al*. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(12): 5410～5418.

万方数据