

# Application in Activated Sludge Microbial Community Diversity Used Molecular Biological Technology\*

——Study of Sludge Microbial Community Diversity

Lianpeng Sun<sup>1,2</sup>, Yuhan Cui<sup>1</sup>, Jianming Huang<sup>3</sup>, Tingjin Ye<sup>3</sup>, Yi Cheng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou

<sup>2</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou

<sup>3</sup>Foshan Water Group, Foshan

Email: eesslp@mail.sysu.edu.cn

Received: Dec. 2nd, 2011; revised: Dec. 21st, 2011; accepted: Jan. 7th, 2012

**Abstract:** Biochemical aerobic treatment technique based on activated sludge process is the most widely applied biological wastewater treatment technique. With the development of modern molecular biological technology, it enhances our knowledge about the complexity and the biodiversity of activated sludge microbial communities. Numerous key microorganisms in activated sludge which were not detected by traditional cultivation methods, were disclosed by modern biological techniques. These modern molecular biological techniques are represented by FISH, DGGE/TGGE, T-RFLP, RAPD, AFLP, PCR-SSCP and so on. It reveals the characteristics and development of the modern techniques, and it provides guidance for study of activated sludge microbial community diversity.

**Keywords:** Activated Sludge; Molecular Biological Technology; Biodiversity of Microbial Communities

# 分子生物技术在污泥微生物群落多样性研究中的应用\*

——污泥微生物群落研究

孙连鹏<sup>1,2</sup>, 崔语涵<sup>1</sup>, 黄剑明<sup>3</sup>, 叶挺进<sup>3</sup>, 程毅<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中山大学, 环境科学与工程学院, 广州

<sup>2</sup>广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广州

<sup>3</sup>佛山市水业集团有限公司, 佛山

Email: eesslp@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2011年12月2日; 修回日期: 2011年12月21日; 录用日期: 2012年1月7日

**摘要:** 以活性污泥法为主体的生化好氧处理工艺是目前应用最广泛的污水生物处理技术。随着分子生物学技术的发展, 人们对活性污泥微生物菌群的复杂性和多样性的认识逐步深入, 大量依靠传统方法未能检测出, 但在活性污泥中起关键作用的微生物逐渐被发现。这些现代分子生物技术以 FISH 技术、DGGE/TGGE 技术、T-RFLP 技术、RAPD 技术、AFLP 技术、PCR-SSCP 技术等为代表。通过对这些技术的综述分析, 揭示其技术特点和应用发展方向, 为探索研究活性污泥的微生物群落多样性提供指导意义。

**关键词:** 活性污泥; 分子生物技术; 微生物群落多样性

\*基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801194, 2010B020413003), 中央高校基本科研业务费专项资金(2010380003161543), 佛山市禅城区科技计划项目(2010A1004)。

## 1. 引言

以活性污泥为主体的生化处理工艺已经成为污水处理中的最主要工艺,该工艺主要依靠污泥中大量的微生物氧化分解水中的污染物质,从而达到水质净化的目的。微生物的种类、数量等直接影响到工艺的处理效率。深入了解活性污泥微生物多样性,有助于进一步揭示工艺的运行机理,从而提高处理效果和降低处理费用。人们对活性污泥微生物菌群的认识随着微生物研究方法的不断改进而日益深入。利用先进的检测手段,对活性污泥微生物多样性进行研究,已成为当今研究的热点问题。本文将重点描述目前微生物多样性的主要研究方法与技术,包括 FISH 技术、DGGE/TGGE 技术、T-RFLP 技术、RAPD 技术、AFLP 技术、PCR-SSCP 技术等。

## 2. 荧光原位杂交技术(FISH)

FISH(fluorescence *in situ* hybridization)技术是 20 世纪 80 年代末在放射性原位杂交技术基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传技术。它是以荧光标记取代同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法。其原理是基于碱基互补的原则,将一小段(通常 15~30 个碱基)用荧光物质标记过的 DNA 或 RNA 序列作为探针,与载玻片上的组织切片、细胞涂片、染色体制片等杂交,与待测核酸的靶序列专一性结合,利用显微镜和流式细胞术等荧光检测技术进行观察和分析,通过检测杂交位点荧光来显示特定核苷酸序列的存在、数目和定位。这一技术也可同时对不同类群的细菌在细胞水平上进行原位的定性定量分析和空间位置标示。1988 年, Giovannoni 等首次将 FISH 技术引入细菌学的研究<sup>[1]</sup>。1989 年, Delong 首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞<sup>[2]</sup>。

### 2.1. FISH 技术的特点

FISH 技术具有操作简单、测定灵敏迅速、实验周期短、原位、安全等特点,可同时检测几种微生物,避免了由于核酸抽提和 PCR(聚合酶链式反应)扩增产生的偏差。以 rRNA 为基础的 FISH 技术可以得到特定微生物在环境中的存在、空间分布和丰度以及整个微生物群落的组成、结构及其多样性等全面信息。该技术在微生物系统发育、微生物诊断和环境微生物

生态学研究中的应用较多<sup>[3]</sup>。近年来,研究人员已对超过 2500 种细菌的 16 SrRNA 进行了测序,在系统发育水平上得到了大量的有用信息。

然而,FISH 技术在环境微生物研究中的应用尚处在起步阶段,还存在许多不足:如检测的精确性和可靠性依赖于寡核苷酸探针的特异性,探针特异性不足或灵敏度偏低都会影响测量结果;细菌普遍存在的自发荧光现象以及营养饥饿状态下荧光杂交信号减弱等都会导致假阳性结果<sup>[4]</sup>;另外,杂交液渗透不充分、杂交后荧光标记见光褪色等也会导致假阴性结果。

### 2.2. FISH 技术的应用和发展

FISH 技术既可以在保持活性污泥原始状态的情况下研究其构造,又可以直接观察到目标微生物在活性污泥中的实际分布状况,因此在污泥微生物群落的研究中应用广泛。Man-Tak Wong 等应用 FISH 技术对来自 9 个污水处理厂的 13 种活性污泥样品中的微生物群落进行分析,说明了大规模污水处理厂与实验室反应器中的微生物种群结构相差甚远<sup>[5]</sup>。在 Adrian Oehmena 等的研究中运用了三色杂交,提供了更多微生物群落形态和它们之间结构关系的信息,增强了 FISH 技术的考察能力<sup>[6]</sup>。

如今,随着标记技术和信号检测设备的不断改进及相关的细胞遗传学和分子生物学的发展,FISH 技术正逐渐形成从单色到多色、从中期染色体到粗线期染色体再向 DNA 纤维的发展趋势,灵敏度和分辨率正在由 mb 向 kb、百分距离向碱基对、多拷贝向单拷贝、大片段向小片段再向 BAC/YAC 等方向不断提高<sup>[7]</sup>。目前,FISH 技术已衍生出原位杂交显带(ISHB)<sup>[8]</sup>、反向染色体涂色(reverse chromosome painting)<sup>[9]</sup>、多色荧光原位杂交(mFISH)<sup>[10]</sup>、DNA 纤维-FISH(DNA fiber-FISH)<sup>[11]</sup>、酪胺信号放大-FISH(TSA-FISH)<sup>[12]</sup>、ring-FISH<sup>[13]</sup>、MAR-FISH<sup>[14]</sup>等一系列技术。FISH 技术的优势在于能了解微生物在污泥中的数量、形态、分布状态等,其与流式细胞术、PCR、DGGE/TGGE、SSCP、RFLP 染色等研究方法相结合,可突破 FISH 技术不能提供活性污泥内部种群多样性、检测“未知”微生物的研究局限,增加研究的准确性,可以从宏观到微观更全面地了解活性污泥的内部信息。Joh wan Ahn 等结合 FISH 与 PCR-DGGE 技术对反应器中的活性污泥

微生物群落结构与分布进行了研究, FISH 技术弥补了 DGGE 未能给出此菌种在活性污泥中分布状态和形态结构信息的缺陷<sup>[15]</sup>。

### 3. 变性/温度梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE)

DGGE(denatured gradient gel electrophoresis)技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术<sup>[16]</sup>。Myers 等(1985)首次在 DGGE 中使用“GC 夹板”和异源双链技术, 使该技术日趋完善<sup>[17]</sup>。Muzyer 等(1993)首次将 DGGE 技术应用于分子微生物学研究领域, 并证实了这种技术在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和种群差异方面具有独特的优越性<sup>[18]</sup>。后来发展的用温度梯度代替化学变性剂的温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)是其衍生技术。该技术被广泛用于微生物分子生态学研究的各个领域, 目前已经发展成为研究微生物群落结构的最主要分子生物学方法之一。

DGGE/TGGE 是依据双链 DNA 片断熔解行为的不同, 分离 PCR 产物中长度相同但序列不同的 DNA 标记片断(rRNA 或 rDNA)。从理论上讲, DGGE/TGGE 指纹图上的一个条带就代表一个微生物类群, 分类水平可达种。因此, 指纹图谱不但直观反映了微生物群落的结构和多样性, 还可方便判断出优势菌或功能菌。

#### 3.1. DGGE/TGGE 技术的特点

DGGE/TGGE 技术可直接对提取的样品总 DNA 进行微生物多样性分析, 其重现性强、可靠性高、速度快、无须对引物标记, 能够弥补传统方法分析微生物群落的不足。

但 DGGE 法只能对微生物群落中数量大于 1% 的优势种群进行分析<sup>[19]</sup>, 且不能对样品中所有的 DNA 片段进行分离<sup>[20]</sup>; 一个条带并非只代表一种细菌种群, 不同的实验条件很可能导致不同的带型谱图<sup>[21]</sup>。

#### 3.2. DGGE/TGGE 技术的应用和发展

基于 DGGE/TGGE 衍生出了多项新技术, 使其在污泥中微生物群落的检测更加客观可靠: 1) DGGE/TGGE 与 PCR 结合: 可用于不同微生物群落之间的差

异分析, 也可进行同一种微生物群落随时间和环境变化演替规律的研究, 是微生物群落遗传多样性和动态分析的有力工具。刘新春等应用 PCR-DGGE 技术, 追踪了分别用低温菌和常温菌接种的两套活性污泥系统中的微生物群落结构的动态变化情况, 研究结果表明, 在相同的操作条件下, 两系统的微生物群落结构的相似性随着运行时间的增加而增加, PCR-DGGE 技术在评价活性污泥系统中微生物群落结构的变化方面方便快捷, 具有良好的应用前景<sup>[22]</sup>; 2) 巢式 PCR-DGGE/TGGE 技术: 利用两套 PCR 引物进行两轮 PCR 扩增反应, 以第一轮扩增的 DNA 序列内部的一对引物进行第二轮扩增, 降低了扩增多个靶位点的可能性, 增加了检测的敏感性和可靠性, 有利于对微生物特异种属的研究。李黎等选取 MBR 工艺和 Orbal 氧化沟的生物池进行活性污泥样品的采集, 结合巢式 PCR 技术和 DGGE 技术, 研究了两种不同工艺中活性污泥中细菌种群结构及其多样性<sup>[23]</sup>; 3) DGGE/TGGE 与标记技术结合: 在对 PCR 扩增产物进行梯度凝胶电泳后, 以 DGGE/TGGE 图谱上的条带为原始模板, 制备带有标记的核苷酸探针, 与来自自己知纯培养物的相应基因扩增产物进行杂交, 来确定 DGGE/TGGE 图谱上特定条带的微生物种类。Samantha 等采用稳定同位素探针(SIP)-PCR-DGGE 技术研究了有机污染土壤中微生物群落功能和遗传结构的演变过程, 并对甲烷细菌群落生态多样性进行了分析<sup>[24]</sup>; 4) DGGE/TGGE 与克隆技术结合: 对环境样品高可变区 DGGE 分析得到群落特征的同时, 从克隆 16SrDNA 长片段获得更多的序列信息, 克服了 PCR-DGGE 检测片段携带信息量有限的缺点, 还可对多克隆集合 DGGE 分析, 反映生态系统中的优势群落。曾薇等针对 4 种实际污水短程生物脱氮系统中硝化菌群 AOB 和 NOB 进行定性与定量分析, 其中对 SBR 大型中试反应器中污泥样品的 PCR-Cloning-Sequencing 结果显示, 所有的克隆相似于 Nitrosomonas, 与 DGGE 分析结果完全一致, 其中 60% 以上的克隆相似于 Nitrosomonas europaea<sup>[25]</sup>; 5) 双梯度 - 变性梯度凝胶电泳 DG-DGGE: 在原有单一化学变性剂梯度的基础上引入凝胶浓度梯度, 提高 DGGE 的灵敏度。邢德峰等用 DG-DGGE 技术分离和鉴定 PCR 扩增产物, 获得了连续流生物制氢反应器活性污泥中微生物群落多样性信息<sup>[26]</sup>。

#### 4. 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)

T-RFLP(Terminal-Restriction fragment length polymorphism)技术是由 RFLP 发展而来。1997 年 Liu 等首先将 T-RFLP 技术用于微生物群落分析, 现已应用于菌种鉴定、群落对比分析、群落中系统发育种群多样性的评估等领域<sup>[27]</sup>。T-RFLP 技术的原理是将 PCR 引物中的一条加以荧光标记, 将 PCR 扩增产物用合适的限制性内切酶消化, 酶切后会产生许多不同长度的限制性片段, 只有末端带荧光标记的片段才能被监测到。通过对这些荧光信号以及由此生成的 T-RFLP 图谱的分析, 就可以揭示样品中微生物的种类、数量和种群大小等, 从而解析微生物群落的结构、功能及其动态变化。

##### 4.1. T-RFLP 技术特点

T-RFLP 技术是一种全面的、分辨率高、重现性良好的分子指纹图谱技术。相对于其它分子生物学分析技术如 RFLP、DGGE/TGGE 等, T-RFLP 具有较明显优势<sup>[28]</sup>: 1) 能够迅速产生大量重复、精确的数据, 用于微生物群落结构的时空演替研究; 2) 重现性好, 自动化高, 可对大量信息进行快速分析, 数字化输出可以直接用于标准统计分析; 3) 消化产物中获得的所有末端片段, 可以与已有序列数据库对比, 有可能直接鉴定出群落图谱中的单个菌种。

T-RFLP 也存在一定的局限性<sup>[29]</sup>: 1) 是基于 PCR 扩增的技术, 具有这类技术共同的缺陷; 2) 只检测带荧光标记的末端限制性片段, 且 500 bp 以上的末端片段精度不够, 易造成对群落多样性的低估; 3) 步骤繁琐, 对实验操作和条件要求非常高, 影响因素多, DNA 提取方法、PCR 中的参数设置及限制性内切酶等的选择都可能使 T-RFLP 图谱的解析存在一定的不确定性; 4) 最终获得的大量信息的处理和统计学分析技术仍不完善。

##### 4.2. T-RFLP 技术的应用和发展

尽管 T-RFLP 技术存在不少缺陷, 该技术已成为分析复杂环境微生物群落多样性的最强有力工具之一。Eschenhagen 等研究了强化生物除磷工艺中活性污泥微生物群落结构, T-RFLP 技术表明两种运行方式下活性污泥中的微生物群落结构有明显差异, 而用

FISH 技术却未发现差异, 说明 T-RFLP 技术的分辨率较高<sup>[30]</sup>。而今越来越多的研究者证明 T-RFLP 技术具有比 DGGE 等指纹图谱技术更强的优势, 已广泛应用于研究活性污泥的微生物菌群结构和监测因环境改变而引起的菌群变化<sup>[31,32]</sup>。

#### 5. 随机扩增多态 DNA(RAPD)

RAPD 是由 Williams<sup>[33]</sup>和 Welsh<sup>[34]</sup>两个研究团队于 1990 年各自独立发现的一种 DNA 多态监测技术, 通过 PCR 扩增, 并将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离、溴化乙锭染色后, 来检测 DNA 片段多态性。是基于 PCR 的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子生物学技术。

##### 5.1. RAPD 技术的特点

RAPD 技术继承了 PCR 技术效率高等优点。但 RAPD 技术又不同于 PCR 技术, 有其独特之处<sup>[35,36]</sup>:

1) 模板 DNA 的需量极少, 且纯度要求低, 采用随机引物, 不需预先知道待扩增基因的核苷酸顺序即对各种生物进行 DNA 片段多态性分析; 2) 操作简便快速, 不需要分子杂交、克隆制备等复杂步骤, 可直接对 DNA 多态性进行分析; 3) 所需引物短, 整个基因组内的结合位点多, 覆盖率高, 引物可以混用, 可综合运用上百种的引物对基因组进行地毯式的多态分析, 检测基因组间的微小差异; 4) 较低的退火温度, 增大了引物在基因组 DNA 中配对的随机性, 检出率高。

尽管 RAPD 具有如上优点, 但模板质量、浓度、引物选择、循环次数、凝胶质量等经常造成 RAPD 重现性差等问题<sup>[37]</sup>。

##### 5.2. RAPD 技术的应用与发展

基于 RAPD 的重现性差的问题, 在 RAPD 基础上发展起来的新的分子标记技术正逐渐完善该系列技术, 如 SCAR(sequence characterized amplified regions, 系列特征放大区)<sup>[38]</sup>、DAF(DNA Amplification Fingerprinting, DNA 扩增指纹印迹)<sup>[39]</sup>、FRAPD(fluorescent RAPD, 荧光随机扩增多态性)<sup>[40]</sup>、RAMPO(random amplified microsatellite polymorphism, 随机扩增微卫星多态性)<sup>[41]</sup>等衍生技术得到了快速发展, 有望成为未来污泥微生物群落多样性研究的重要工具。

## 6. 扩增片段长度多态性(AFLP)

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)技术是1993年由荷兰Zabeau和Vos创建的结合RFLP和RAPD技术特点的一种DNA指纹技术<sup>[42]</sup>。该方法克服了RFLP技术复杂、有放射性危害和RAPD技术稳定性差、标记呈现隐性遗传的缺点,同时又兼有RAPD的高效性和RFLP的稳定性、可重复性的特点。由于该技术产生的多态性远远超过了RFLP、RAPD等技术,已被认为是目前DNA指纹图谱技术中多态性最为丰富的一项技术。

### 6.1. AFLP 技术的特点

AFLP技术的优点主要表现在:分析所需DNA量少、可重复性好、多态性强、分辨率高、不需要Southern杂交、无放射性危害、样品适用性广、信息量大、结果稳定可靠且呈典型的孟德尔遗传、可在全基因组产生标记、理论上可产生的标记数目是无限的、对模板浓度的变化不敏感、可作为物理图谱和遗传图谱的位标等<sup>[43]</sup>。

但同时也存在着一些缺点,如:费用昂贵、必须具有放射性同位素操作过程中特殊的防护措施以及配套的仪器设备、对DNA纯度和内切酶的质量要求高、难以鉴别等位基因、对模板反应迟钝和谱带可能发生错配与缺失等问题。

### 6.2. AFLP 技术的应用和发展

虽然该技术发展的时间较短,在许多领域的研究尚处于起步阶段,但它所具有的诸多特点已显示出其在众多领域的广阔应用前景<sup>[44]</sup>。

该项技术自产生以来在限制性内切酶组合、引物设计、检测方法等方面有了较大改进,并发展衍生了许多相关技术。其中限制性内切酶组合改进包括单限制性酶切AFLP(SADF-AFLP)<sup>[45]</sup>、三限制性酶切AFLP(TE-AFLP)<sup>[46]</sup>等。多态性的检测已经由最初采用对环境及人体有危害性的放射自显影技术发展到现在银染<sup>[47]</sup>以及荧光检测技术<sup>[48]</sup>。

Bachem等将AFLP技术应用于mRNA表达差异分析,发展了一种mRNA指纹图谱技术,即cDNA-AFLP技术,该法不需要知道基因或EST的序列信息,一次能够分析大量差异表达的基因,并能够检测出低

丰度表达的转录本,检测灵敏,主要用于基因家族等高度同源性或相似性的基因片段的分离分析<sup>[49]</sup>。

## 7. 聚合酶链式反应 - 单链构象多态性 (PCR-SSCP)

SSCP(Single-Strand Conformation Polymorphism)技术是一种DNA标记技术。1989年,日本科学家Orita将DNA单链凝胶电泳技术成功的用于检测复杂基因组中单拷贝DNA的多态现象并提出了SSCP的概念,即利用DNA单链构象具有多态性,在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时迁移率的不同来分析DNA单链中的基因突变<sup>[50]</sup>。Lee等首先将SSCP技术应用于微生物群落组成的分析<sup>[51]</sup>。但该项技术在微生物群落结构解析研究方面仍有待完善,不同研究者报道的试验条件和结果有较大差异<sup>[52,53]</sup>。1989年,Orita等作了大胆改进,用敏感的银染法直接对电泳后的凝胶进行染色,从而建立了PCR-SSCP分析法,使检测突变方法的简便性和灵敏性进一步提高<sup>[54]</sup>。

### 7.1. PCR-SSCP 技术的特点

作为一种检测DNA序列变异的手段,PCR-SSCP法具有以下优点<sup>[55]</sup>: 1) 可用非同位素方法检测,原理和操作简单,PCR产物变性后无需处理就可直接电泳; 2) 实验步骤少、周期短、对DNA原始材料纯度要求不高,需量少、成本较低; 3) 适于大样本筛查,无需事先知道待测DNA片段的序列,在测序之前可采用该法筛选出需测序的DNA样本,避免盲目测序带来的浪费; 4) 可检测任何DNA位点上的多态性和突变,灵敏性高。

但此项技术也有许多不足之处<sup>[56]</sup>: 1) 只能作为一种突变检测方法,不能对DNA序列变异进行精确的定位,且随着DNA片段长度的增加,检测的敏感性降低,而且应用中可能会遇到一定比例的假阴性结果,因而该技术不能明确证明有没有突变; 2) 分析结果受电泳温度、离子强度等多种因素的影响,不同的实验条件甚至可能导致完全不同的结果。

### 7.2. PCR-SSCP 技术的应用和发展

PCR-SSCP技术在废水生物治理、微生物多样性检测和群落结构分析等方面都得到了广泛的应用。

该技术用于分析复杂环境微生物如活性污泥的

群落结构时需要有针对性地优化操作条件。鲍立新等针对厌氧活性污泥微生物群落结构复杂、群落中相似基因序列较多等特点,对影响 SSCP 图谱分辨率的电泳温度、甘油、交联度和影响 PCR 扩增的 BSA 等因素进行了实验研究,通过条件优化,提高了 SSCP 图谱的分辨率和可读性,为解析厌氧活性污泥细菌群落的结构提供了快速、重复性强、灵敏度高的手段<sup>[57]</sup>。王爱杰等人也通过 SSCP 技术,分析了活性污泥微生物群落结构的条件优化,以获得较理想的 SSCP 图谱<sup>[58]</sup>。

近年来,SSCP 技术在方法上得到了重大改进,解决了检测稳定性差等缺陷,使操作简便性和检测灵敏度大幅提高。此外,该项技术与 DGGE、DNA 指纹技术、RFLPs 技术等相结合,也可解决 PCR-SSCP 本身存在的缺点,提高检出率。

## 8. 应用展望

以活性污泥法为基础的污水处理工艺日益受到人们的重视,越来越多的研究者开始把活性污泥作为研究的热点问题。活性污泥中的微生物菌群随着现代研究技术的发展逐渐被人们所认知。但是,我们目前了解到的微生物菌群还远远不够,一些重要的菌群还有待发现。近几年,随着分子生物学技术的发展,人们开始应用基于 PCR 技术等各种先进手段对活性污泥中微生物菌群多样性进行探索。除了本文论述的 FISH 技术、DGGE/TGGE 技术、T-RFLP 技术、RAPD 技术、AFLP 技术、PCR-SSCP 技术外,生物标记物法、SSR 技术、LH-PCR 技术、实时定量 PCR、ARDRA 技术、宏基因组学等先进手段也在微生物菌群的研究中发挥着重要作用。

目前来说,单一的研究方法已经基本趋于成熟,但是每种技术都有其局限性,一些实验误差是不可避免的。而综合运用多种层次上的组合技术可以在一定程度上解决单一方法所带来的局限性,使实验结果更加准确真实可靠。在研究污泥微生物菌群时,可以将各种方法有机结合,这也是近年的新趋势,可以从不同角度、不同层次上揭示污泥中微生物菌群的多样性,为研究提供更为全面的信息。如 DGGE/TGGE、SSCP 等技术可以探测到未知微生物的存在,通过切胶、电泳等步骤可以获取未知微生物的染色体组 DNA 库,应用 RFLP 技术进一步筛选主要的基因,根据这

些基因设计出针对未知微生物的特异性探针,就可以通过 FISH 技术获知未知菌在污泥中的数量、形态、分布状态等相关信息。

另一方面,研究者也可以针对各种技术的优缺点,进行传统方法的改进和先进技术的探索,新的技术手段将在环境微生物的研究中有更为广阔的应用前景。

随着现代生物学技术的发展,越来越多的新技术将被运用于微生物菌群多样性的研究中,这对于将来更好地利用活性污泥法具有十分重要的科学指导意义。

## 9. 致谢

本研究受广东省科技计划项目(2009B030801194, 2010B020413003),中央高校基本科研业务费专项资金(2010380003161543),佛山市禅城区科技计划项目(2010A1004)资助,在此表示感谢!

## 参考文献 (References)

- [1] S. J. Giovannoni, E. F. Delong, G. J. Olsen, et al. Phylogenetic group specific oligodeoxy nucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170: 720-726.
- [2] E. F. Delong, G. S. Wickham and N. R. Pace. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, 1989, 65: 5554-5563.
- [3] G. J. Olsen, D. J. Lane, S. J. Giovannoni, et al. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annual Review Microbiology*, 1986, 40(1): 337-365.
- [4] 李冰冰,肖波,李蓓. FISH 技术及其在环境微生物监测中的应用[J]. *生物技术*, 2007, 18(5): 94-97.
- [5] M. T. Wong, T. Mino, R. J. Seviour, et al. *In situ* identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. *Water Research*, 2005, 39(13): 2901-2914.
- [6] A. Oehmena, M. T. Vivesa, H. B. Lu, et al. The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research*, 2005, 39(15): 3727-3737.
- [7] 呼庆,齐鸿雁,张洪勋. 荧光原位杂交技术及其在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2004, 24(5): 1048-1054.
- [8] A. Cuadrado, P. Rubio, E. Ferrer, et al. Sequential combinations of C-banding and *in situ* hybridization and their use in the detection of interspecific introgressions into wheat. *Euphytica*, 1996, 89(1): 107-112.
- [9] N. P. Carter, M. A. Ferguson-Smith, M. T. Perryman, et al. Reverse chromosome painting: A method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *Journal of Medical Genetics*, 1992, 29(5): 299-307.
- [10] N. P. Carter. Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry*, 1994, 18(1): 2-10.
- [11] H. Q. Heng, J. Squire and L.-C. Tsui. High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1992, 89(20): 9509-9513.
- [12] P. Komminoth, M. Werner. Target and signal amplification: Ap-

- proaches to increase the sensitivity of *in situ* hybridization. *Histochemistry and Cell Biology*, 1997, 108(4-5): 325-333.
- [13] K. Zwrglmaier, W. Ludwig and K. H. Schleifer. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence *in situ* hybridization-RING-FISH. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(1): 89-96.
- [14] P. H. Nielsen, K. Andreasen, M. Wagner, et al. Variability of type 021N in activated sludge as determined by *in situ* substrate uptake pattern and *in situ* hybridization with fluorescent rRNA targeted probes. *Water Science and Technology*, 1998, 37(4-5): 423-440.
- [15] J. Ahn, T. Daidou, S. Tsuneda, et al. Characterization of denitrifying phosphate accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Research*, 2002, 36(2): 403-412.
- [16] S. G. Fischer, L. S. Lerman. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1983, 80(6): 1579-1583.
- [17] R. M. Myers, S. G. Fischer, L. S. Lerman, 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 Research*, 1985, 13: 3131-3145.
- [18] G. Muyzer, E. C. Waal and A. G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [19] M. J. Ferris, G. Muyzer and D. M. Ward. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defines populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 62: 340-346.
- [20] T. Vallaeys, E. Topp, G. Muyzer, et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24: 279-285.
- [21] H. Sekiguchi, N. Tomioka, T. Nakahara, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1205-1208.
- [22] 刘新春等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落变化的解析[J]. *生态学报*, 2005, 25(4): 842-847.
- [23] 李黎, 张松贺, 王超. 污水处理厂活性污泥细菌多样性研究 [URL], 2011. <http://www.paper.edu.cn/index.php/default/releasepaper/content/2011101-1046>
- [24] A. Samantha, L. Morris and S. Radajewski. Identification of the function ally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1446-1453.
- [25] 曾薇等. 采用 FISH、DGGE 和 Cloning 对短程脱氮系统中硝化菌群的比较分析[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(5): 734-739.
- [26] 邢德峰, 任南琪, 宋业颖等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性[J]. *生态学报*, 2005, 25(7): 1818-1823.
- [27] W. T. Liu, T. L. Marsh, G. H. Cheng, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [28] 罗剑飞等. T-RFLP 技术及其在硝化细菌群落分析中的应用[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(3): 456-461.
- [29] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(6): 861-868.
- [30] M. Eschenhagen, M. Schuppler. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research*, 2003, 37(13): 3224-3232.
- [31] 王晓慧, 文湘华, 丁鹏, 张辉, 周军. T-RFLP 方法分析城市污水处理厂中细菌群落的动态变化[J]. *环境科学*, 2010, 31(5): 1307-1312.
- [32] H. L. Ayala-del-Río, S. J. Callister, C. S. Criddle, et al. Correspondence between community structure and function during succession in phenol and phenol-plus-trichloroethene-fed sequencing batch reactors. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4950-4960.
- [33] J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6534.
- [34] J. Welsh, M. McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [35] 白生文, 范惠玲. RAPD 标记技术及其应用进展[J]. *河西学院学报*, 2008, 24(2): 52-54.
- [36] 刘晓宇. RAPD 分子标记技术概述及应用[J]. *科技创新与生产力*, 2010, 9: 98-99.
- [37] 姜自锋, 林乃铨, 徐梅. RAPD 技术及其应用中的一些问题[J]. *福建农林大学学报*, 2002, 31(3): 356-360.
- [38] 张志永, 张劲松, 巩学千等. 抗 SMV 栽培大豆种质资源的 SCAR 标记指纹图谱分析[J]. *高技术通讯*, 1998, 8(10): 49-53.
- [39] J. Basam, P. M. Gresshoff. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technology*, 1991, 9: 553-557.
- [40] S. G. Copley. Efficient detection of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis. *Biotechniques*, 1999, 22(4): 690-692, 694, 696.
- [41] J. Ramser, K. Weising, C. Viktor, et al. Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. *Biotechniques*, 1997, 23(2): 285-290.
- [42] M. Zabeau, P. Vos. European Patent Application 92402629. (Publication number: 0534858 A), 1992.
- [43] 李珊, 赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(5): 830-836.
- [44] 王世伟等. AFLP 技术在微生物分类鉴定、基因标定及遗传多样性方面的应用[J]. *生物技术*, 2003, 13(5): 42-43.
- [45] K. S. Boumedine, A. Rodolakis. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Research in Microbiology*, 1998, 149(10): 735-744.
- [46] A. W. G. Wurff, Y. L. Chan, N. M. Straalen, et al. TE-AFLP: Combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(24): 105.
- [47] 万春玲, 谭远德. AFLP 的一种改进方法[J]. *南京师大学报*, 1999, 22(2): 88-91.
- [48] M. T. Cervera, J. C. Cabezas, J. C. Sancha, et al. Application of AFLPs to the characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic resources. *Theoretic and Applied Genetics*, 1998, 97(1-2): 51-59.
- [49] C. W. Bachem, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 1996, 9(5): 745-753.
- [50] M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1989, 86(8): 2766-2770.
- [51] D. H. Lee, Y. G. Zo and S. J. Kim. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(9): 3112-3120.
- [52] C. L. Zhang, Y. H. Wang, H. Chen, et al. Enhance the efficiency of single-strand conformation polymorphism analysis by short polyacrylamide gel and modified silver staining. *Analytical Biochemistry*, 2007, 365(2): 86-287.
- [53] 杨志惠, 周斌, 贾静等. PCR-SSCP 分析参数的研究[J]. *泸州医学院学报*, 2005, 28(5): 391-393.

- [54] M. Orita, H. Iwahana. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1989, 86: 2766-2770.
- [55] 汤贤春, 路健, 李学英. PCR-SSCP 技术在基因多态分析中的应用[J]. *中国西部科技*, 2010, 9(6): 55-56.
- [56] 王岩, 沈锡权, 吴祖芳等. PCR-SSCP 技术在微生物群落多态性分析中的应用进展[J]. *生物技术*, 2009, 13(9): 84-87.
- [57] 鲍立新, 李建政, 赵焱, 郑国臣. 厌氧活性污泥微生物群落的 SSCP 分析条件优化[J]. *科技导报*, 2008, 26(2): 28-32.
- [58] 王爱杰, 阚洪晶, 于振国等. SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1164-1169.