生态环境学报 2010, 19(4): 974-978
Ecology and Environmental Sciences
http://www.jeesci.com
E-mail: editor@jeesci.com

分子技术在湿地微生物群落解析中的应用

梁威[1]，吴苏青[1,2]，吴振斌[1]

1. 中国科学院水生生物所//淡水生态与生物技术国家重点实验室，湖北 武汉 430072；2. 中国科学院研究生院，北京 100049

摘要：人工湿地的研究和应用近年来受到了广泛重视。微生物是人工湿地系统的重要组成部分，其群落结构对于湿地的净化功能的发挥具有重要影响。与传统的微生物分析技术相比，分子生物学技术在解析人工湿地微生物群落结构时无需纯培养，具有高效、快速、简便的特点，使其广泛应用于环境微生物的研究。文章综述了近年来在聚合酶链反应技术（Polymerase Chain Reaction，PCR）基础上发展起来的几种新的分子生物技术，包括 PCR-DGGE、LH-PCR、T-RFLP、PCR-SSCP 和 ARDRA，以及其在人工湿地微生物研究中的应用现状。通过这些分子技术，可以分析湿地处理特定废水过程中微生物的数量、丰度、多样性及优势种；鉴定湿地中特定功能菌群（如氨氧化细菌、反硝化细菌、除硫菌等）的数量、活动分布、空间变更及与污染物去除的关系；判断各种系统条件(如不同基质、植物、水力负荷等)的设置对微生物多样性和稳定性的影响。最后，对分子技术在湿地领域的未来发展进行了展望。

关键词：分子技术；微生物群落；人工湿地；现状；展望

中图分类号：X172　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-5906（2010）04-0974-05

人工湿地在过去的几十年中得到迅速发展。许多研究表明，湿地微生物的作用是影响该系统去除污染物效率的重要因素之一，然而由于其复杂性及分析方法的局限性使得人们在研究和设计湿地系统时只能将其作为一个黑箱而忽视。近代分子生物学技术的发展克服了传统研究微生物时的培养需求，为人工湿地微生物的多样性及其功能的深入分析提供了一个崭新的途径[1-3]。

目前用于湿地微生物群落结构分析的技术主要有平板计数法、荧光染色法、Biolog微平板分析、微生物醌指纹法、磷脂脂肪酸(PLFA)谱图、荧光原位杂交(FISH)技术等[4-5]。近年来，变性梯度凝胶电泳、随机扩增多态性DNA标记、单链构象多态性等方法在湿地研究中也开始应用，对湿地中微生物的研究起到显著的推动作用[6-7]。本文针对当前应用于人工湿地研究中的主要分子技术进行综述，以期为利用现代分子技术研究人工湿地的净化机理提供参考。

1　PCR–DGGE(Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

1.1　DGGE 原理

DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术是由Fischer和Lerman于1979年最先提出的，主要是用于检测DNA突变的一种电泳技术。1993年Muzyers等首次将DGGE技术应用于分子微生物学研究领域。DGGE利用序列不同的DNA片段在聚丙烯酰胺凝胶中解链温度不同的原理，通过梯度变性胶将DNA分开。与其它电泳系统相比，它不是基于核酸分子量的不同将DNA片段分开，而是根据序列的不同将片段大小相同的DNA序列分开。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，相同碱基对数目的双链DNA分子由于碱基对组成的不同，解链所需要的变性剂浓度也不同，当某一双链DNA序列迁移到变性凝胶的一定位置，并达到其解链温度时,即开始部分解链，解链程度越大，迁移阻力大，DNA分子的迁移速度随之减小，产生的迁移阻力与电场力相平衡时，具有不同序列的DNA片段则停留于凝胶的不同位置，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[8-10]。

1.2　PCR–DGGE 在人工湿地研究中的应用

1.2.1　微生物数量、丰度及多样性

Dong等[11]用PCR-DGGE技术鉴别分析用来处理猪圈废水的湿地基质中微生物的情况，得出菌种的分布与总磷、硝酸盐、磷酸盐的浓度显著相关，从进水到出水中微生物的多样性及丰度显著降低，其优势种为*Pseudomonas* sp.(假单胞菌), *Arthrobacter* sp.(节细菌属), *Bacillus* sp.(杆状菌)。通过系统发育分析表明一部分16S rRNA的基因序列与不可培植的反硝化细菌具有极大的相关性，而这些反硝化细菌的活动对湿地中氮的去除起着重要的作用。Yin等[12]利用DGGE技术分析处理受污染景观湖水

基金项目：国家重大科技专项（2008ZX07106-003, 2008ZX07316-004）；江苏省科技惠民项目（BE2008651）；中科院天津专项（TJZX2-YW-07）
作者简介：梁威（1971 年生），男，副研究员，博士，主要研究方向为人工湿地、环境微生物学、水体生态修复等。E-mail: wliang@ihb.ac.cn
收稿日期：2010-03-02

的三个水平潜流湿地中微生物的多样性、总的微生物群落的改变以及氨氧化细菌的组成。通过PCR对携带单加氧酶的基因序列进行扩增，得出季节的变化对微生物群落的多样性和组成具有影响；序列分析说明湿地中氨氧化细菌是不可培养的，其菌群中含有大量的亚硝化单胞菌类似序列。Guo等[13]利用PCR-DGGE技术分析人工湿地处理二级废水后混合水中的微生物群落的结构，得出微生物菌群的多样性。Gorra等[14]利用PCR-DGGE技术鉴别处理污水的湿地基质对氨氧化细菌群落多样性和稳定性的影响，结果表明不同基质上群落的组成没有很大的区别，其中沸石最有利于氨氧化细菌的活动。

1.2.2 *特定微生物功能群*

Drewe等[15]通过嵌套的PCR对芦苇湿地进出水、基质及植物根区等15个位点上的*Mycobacterium avium*(鸟分支杆菌)进行监测，得出芦苇湿地对鸟分支杆菌具有良好的去除作用，因而对鸟类肺结核具有有效的控制作用。Park等[16](2009)通过利用实时PCR技术鉴别和定量测定分别种植菖蒲、黄睡莲、香蒲的表面流人工湿地中脱氮菌和除硫菌的活动状况。Ruiz-Rueda等[17]通过PCR-DGGE技术鉴别了湿地中阔叶香蒲和芦苇根际的硝化反硝化菌的活动及其群落结构，并判断它与湿地中的植物种类的相关性。Huang等[18]应用PCR-DGGE技术调查处理富营养观赏水的复合垂直流人工湿地中氨氧化细菌的多样性及活动分布的空间变更，并测定氨氧化细菌在湿地的不同层对富营养水的净化。Sundberg等[19]将氨氧化和反硝化菌群分别用目标16S rDNA基因探针和功能基因*nosZ*进行PCR扩增，结果由DGGE及核苷酸序列分析，以检测用来处理高氮浓度的垃圾掩埋浸析液的人工湿地中硝化和反硝化作用及其相应的菌群。

2 LH–PCR (Length Heterogeneity PCR)

LH-PCR是于1998年在国外发展起来的一项新技术[20]。在LH-PCR中，荧光标记探针被用来决定来源于不同微生物扩增序列的相对数量,带标记的片段在电泳胶上被分离出来,而后被一个带有荧光性激光的自动基因顺序分析仪所监测到。Nancy等[21] (2000)利用LH-PCR技术评估土壤微生物群的组成，并发现LH-PCR的结果具有可重复性。

Ahn等[22]利用LH-PCR在不同湿地植物和磷负荷下采集人工湿地基质中微生物的指纹，通过对群落菌群克隆和排序来确定其微生物的多样性；并应用主坐标分析及相似性分析得出高磷负荷会使基质微生物群落结构发生显著改变且能降低其多样性，克隆排序表明不同的磷含量产生不同的微生物群落。

3 T–RFLP (Terminal–Restriction Fragment Length Polymorphism)

T-RFLP（末端限制性酶切片段长度多态性）分析是在PCR技术和RFLP技术基础上发展起来的微生物群落分析技术，所不同的是在PCR扩增16S rRNA基因的过程中，其中一个引物用荧光标记，在计算机程序自动分析时仅分析带荧光标记的末端限制片段，这样使得限制片段长度多态性图谱更为简化，且每个可见的条带都代表一个“核型”或一个分类单元。相对于其它分子生物学分析技术如RFLP、DGGE等，它具有分辨率高、易于实现自动化[23-24]等特点。

Nicorarat等[25]利用T-RFLP技术对处理酸化煤矿水的人工湿地系统中微生物的多样性进行分析。将RFLP的结果与先前的有机体培养PCR-DGGE和FISH研究结合起来，说明了相对低的微生物多样性及嗜温硫杆菌在好氧湿地基质中具有优势。Ishida等[26]通过T-RFLP方法测定不同的水力负荷及水位波动对湿地底泥中微生物结构的影响，并根据营养物的去除情况确定湿地的性能。Searcy等[27]利用PCR扩增每个生物菌膜样本上真核细菌的16S rDNA及亚硝酸还原酶基因，用T-RFLP技术分析扩增产物判断整个菌群及反硝化细菌群落的多样性。Sleytr等[28]利用T-RFLP技术分析比较芦苇湿地和芒竹湿地植物根区的微生物群落结构，发现不同的湿地在相似的条件下运行具有相似的菌群结构。

4 PCR–SSCP（Single Strand Conformational Polymorphism）

4.1 PCR–SSCP 基本原理

单链构象多态性技术(简写为SSCP)是随着人类基因组的研究而发展起来用于检测碱基突变的技术。通过与PCR方法相结合，PCR扩增产物经变性后，将得到具有二级构象的单链DNA置于非变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，空间构象不同的单链DNA会因其迁移率不同而得到分离，最后根据电泳条带所显示的亮度、丰度、条带位置和清晰度等基本信息进行SSCP图谱分析，确定不同菌株类型及其相对数量关系等从而检测相应的遗传变异。PCR-SSCP技术被认为是环境微生物分子生态学研究中，继变性梯度凝胶电泳(DGGE)和末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)之后的又一技术[29]。

4.2 PCR–SSCP 在人工湿地中的应用

谢冰等[30] (2007)采用PCR-SSCP技术对上海梦清园芦苇人工湿地的底泥微生物群落结构进行了研究,发现湿地中微生物优势种主要是七种芽孢杆菌。XIE B等[31](2009)再次利用PCR-SSCP图谱分析上海梦清园芦苇人工湿地进出口微生物的多样

性,得出异养菌、硝化细菌和反硝化细菌各个季节的分布不一,微生物功能群的分布与湿地中不同营养水平有关。Vacca等[32](2005)利用PCR-SSCP图谱分析六个处理生活污水的实验型人工湿地进出口、植物根区及基质不同深度的微生物群落的多样性,以判断湿地中填料类型、植物种植与否对菌群的影响,结果发现不同的微生物群落的存在与基质类型有关。

5 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

扩增rDNA限制性酶切片段分析法(简写为ARDRA)的技术原理是基于PCR技术选择性扩增rDNA片段(如16S rDNA、23S rDNA、16S-23S rDNA片段),再对扩增的rDNA片段进行限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP)。该方法的步骤是:1)提取总DNA;2)以总DNA为模板,引物为rRNA基因的保守序列,采用PCR技术将特定的rDNA片段扩增出来;3)选择多种有四对碱基识别位点的限制性内切酶,对扩增产物进行限制性酶切;4)用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离酶切的DNA片段;5)对ARDRA诊断谱带进行认定、特性的系统分析及计算机聚类[33]。ARDRA技术一般都需要同其它的分子技术如DGGE、T-RFLP等相结合使用。

Ibekwe等[34]在变化植物密度和组成的湿地中研究微生物群落的组成与水质之间的关系,六个月中每星期对湿地的不同位点的水化学指标、硝酸盐、正磷酸盐、悬浮固体进行检测。发现50%的植物覆盖率能将96.3%的硝酸盐去除。采用DGGE获得总的DNA的群落图谱以测定湿地基质中、植物根区及水中主要的微生物组成,并建立菌克隆文库,其中300多个克隆体用ARDRA分析并整合到运算分类单位中,得出湿地基质中、植物根区及水中分别有35、31、36个不同的分类单位,根据香农威尔指数的计算说明50%植物覆盖率的微生物多样性比100%的要高。

6 展望

随着研究手段的多样化,人们对人工湿地微生物群落结构的了解越来越深入;但尚未发现单一的技术能够充分描述微生物的全部群落结构及其代谢过程。为此,为进一步研究揭示湿地微生物群落结构及其净化机理,建议加强以下方向的研究:

(1)利用分子技术研究人工湿地脱氮除磷的机理,揭示湿地处理特定废水(低碳高氮废水、微污染地表水、面源污染等)及其特定生物代谢过程(如短程脱氮、反硝化除磷、同步硝化反硝化及厌氧氨氧化)中微生物种群及其代谢状况;

(2)研究去除特殊污染物(如持久性有机污染物POPs)过程中,湿地微生物菌群的变化状况,探寻净化机理;

(3)多种分子技术协同作用,利用各种技术的优势,针对处理污水的性质不同,对比研究湿地中微生物菌群结构、活性的变化,微生物种与种之间的相互关系,深入研究与湿地系统条件的相互关系;

(4)引进利用稳定同位素探测(SIP)、基因芯片等新技术应用研究湿地中微生物群落的变化与生态学功能之间的关系,提高其对湿地中微生物定量、定性的准确性和检测的特异性。

参考文献:

[1] JENNIFER L, VINCENT G, CARINA S, et al. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review[J]. Ecological Engineering, 2009, 35: 987-1004.

[2] 魏成, 刘平. 人工湿地污水净化效率与根际微生物群落多样性的相关性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(6): 2401-2406.
WEI Cheng, LIU Ping. Relationship between wastewater purification and diversity of Rhizosphere Microorganism in the constructed wetland[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(6): 2401-2406.

[3] MALIK S, BEER M, MEGHARAJ M, et al. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water[J]. Environment International, 2008, 34: 265-276.

[4] 车玉伶, 王慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14(1): 127-133.
CHE Yuling, WANG Hui, HU Hongying, et al. Research progresses on analytical technologies used in microbial community structure and diversity[J]. Ecology and Environment, 2005, 14(1): 127-133.

[5] 许文涛, 郭星, 罗云波, 等. 微生物菌群多样性分析方法的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 258-265.
XU Wentao, GUO Xing, LUO Yunbo, et al. Research progress on analysis methods of diversity of microbial flora[J]. Food Science, 2009, 30(7): 258-265.

[6] TRUU M, JUHANSON J, TRUU J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2009,407: 3958-3971.

[7] KARIN S T. Molecular and microbial advances in wetland science[J]. Ecological Engineering, 2009, 35: 959-960.

[8] 宫曼丽, 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, 2006, 44(6): 485-488.
GONG Manli, REN Nanqqi, XING Defeng. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 44(6): 485-488.

[9] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactionamplified genesencodingfor16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 695-700.

[10] 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.
WU Gaofeng,LI Wengang,GAO Weike,et al.Principle of PCR-DGGE and its application in the research of intestinal bacterial colony[J].China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2008,35(6): 37-39.

[11] DONG X L, 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.

[12] YIN J, JIANG L Y, WEN Y, et al. Treatment of polluted landscape lake water and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in constructed wetland[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2009, 44(7): 722-731.

[13] GUO J F, LU Y J. Secondary effluent treatment by pilot-scale constructed wetland and the character of its microbial communities[R]. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE 2009), 2009.

[14] GORRA R, COCI M, AMBROSOLI R, et al. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1442-1452.

[15] DREWE J A, MWANGI D, DONOGHUE H D, et al. PCR analysis of the presence and location of Mycobacterium avium in a constructed reed bed, with implications for avian tuberculosis control[J]. Fems Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 320-328.

[16] PARK N, LEE J, CHON K, et al. Investigating microbial activities of constructed wetlands with respect to nitrate and sulfate reduction[J]. Desalination and Water Treatment, 2009, 1(1-3): 172-179.

[17] RUIZ-RUEDA O, HALLIN S, BANERAS L. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland[J]. Fems Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 308-319.

[18] HUANG D F, LI T. Variation of diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria community in the Integrated vertical-flow constructed wetlands[J]. Huanjing Kexue, 2008, 29(8): 2160-2165.

[19] SUNDBERG C, TONDERSKI K, LINDGREN P E. Potential nitrification and denitrification and the corresponding composition of the bacterial communities in a compact constructed wetland treating landfill leachates[J]. Water Science and Technology, 2007, 56(3): 159-166.

[20] SUZUKI M, RAPPE M S, GIOVANNONI S J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4522-4529.

[21] NANCY J, MARY E, RICHARD P, et al. Use of Length Heterogeneity PCR and Fatty Acid Methyl Ester Profiles to characterize microbial communities in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1668-1675.

[22] AHN C, GILLEVET P M, SIKAROODI M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading[J]. Ecological Indicators, 2007, 7(4): 852-863.

[23] 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.
YU Sulin, WU Xiaolei, QIAN Yi. Application and optimization of T-RFLP method for microbial community analysis[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(6): 861-868.

[24] 李献梅, 王小芬, 崔宗均. 末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)在微生物群体分析上的应用与技术优化[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(4): 1-9.
LI Xianmei, WANG Xiaofen, CUI Zongjun. Applications and optimizations of T-RFLP in fingerprinting environmental microbial populations[J]. Journal of China Agricultural University, 2009, 14(4): 1-9.

[25] NICORARAT D, DICK W A, DOPSON M, et al. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(2): 312-321.

[26] ISHIDA C K, KELLY J J, GRAY K A. Effects of variable hydroperiods and water level fluctuations on denitrification capacity, nitrate removal, and benthic-microbial community structure in constructed wetlands[J]. Ecological Engineering, 2006, 28(4): 363-373.

[27] SEARCY K E, PARSEK M R. Denitrification potential of wetland biofilm communities[R]. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 2002, 102: 424.

[28] SLEYTR K, TIETZ A, LANGERGRABER G, et al. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands[J]. Ecological Engineering, 2009, 35(6): 1021-1025.

[29] 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.
WANG Yan , SHEN Xiquan, WU Zufang, et al. Application of PCR-SSCP technology in diversity analysis of microbial communities[J]. Biotechnology, 2009, 13(9): 84-87.

[30] 谢冰, 董亮. 芦苇人工湿地底泥微生物群落结构的PCR-SSCP技术研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 2007, 23(2): 205-211.
XIE Bing, DONG Liang. Study on microbial community structure of reed constructed wetland using PCR-SSCP[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2007, 23(2): 205-211.

[31] XIE B, CUI Y X, YUAN Q, et al. Pollutants removal and distribution of microorganisms in a reed wetland of Shanghai Mengqing Park[J]. Environmental Progress & Sustainable Energy, 2009, 28(2): 240-248.

[32] VACCA G, WAND H, NIKOLAUSZ M, et al. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands[J]. Water Research, 2005, 39(7): 1361-1373.

[33] 陈晓蕾, 张忠译. 微生物的ARDRA检测[J]. 微生物学杂志, 1999, 19(4): 40-43.
CHEN Xiaolei, ZHANG Zhongyi. Identification of microorganisms by ARDRA technology[J].Journal of Microbiology,1999,19(4): 40-43.

[34] IBEKWE A M, LYON S R, LEDDY M, et al. Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4): 921-936.

The application of molecular techniques to characterize the microbial communities in constructed wetland

LIANG Wei[1], WU Suqing[1,2], WU Zhenbin[1]

1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology//Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China.

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The studies and applications of constructed wetland have become a hot topic in recent years. Microorganism is one of the most important factors in constructed wetland system. The structure of microbial communities have great influence on the purifying capacity of constructed wetland. Compared with traditional microbial analysis technologies, molecular biological techniques have many advantages, such as cultivation-independent, efficient, fast and simple, which have been widely used to identify environmental microorganisms. In the paper, the molecular biological techniques based on polymerase chain reaction (PCR), such as PCR-DGGE, LH-PCR, T-RFLP, PCR-SSCP and ARDRA, were introduced. The mechanisms and research advances of the molecular techniques were also summarized. By using these techniques, the microbial number, density, diversity and dominant species in the constructed wetland systems treating with specific wastewater (such as swine wastewater, landfill leachates, etc.) can be analyzed; the relationship between the number, activity distribution, space shifting of specific microbial functional group (such as ammonia-oxidizing bacteria, denitrifiers, sulfate reducers, etc.) and the removal rates of main pollutants can be identified; the influence on microbial diversity and stability under different conditions (such as different substrate, wetland plants, hydraulic loading, etc.) can be estimated. Finally, the research prospects for the molecular techniques in the constructed wetland were also proposed.

Key words: Molecular techniques; microbial communities; Constructed wetland, research advances; prospects