國立中山大學生物科學系碩士論文

變性梯度膠電泳（DGGE）技術在環境微生物多樣性與污染整治上的研究與應用

研究生：徐伯安 撰

指導教授：劉仲康 教授

中華民國 九十五 年 九月

國立中山大學研究生學位論文審定書

本校生物科學系碩士班

研究生徐伯安（學號：M922010022）所提論文

變性梯度膠電泳(DGGE)技術在環境微生物多樣性與污染整治上的研究與應用

經本委員會審查並舉行口試，符合碩士學位論文標準。

學位考試委員簽章：

劉仲康 _____ _____

高志明 _____ _____

陳郁夏 _____ _____

_____ _____

_____ _____

指導教授(可免) _____

系主任/所長(可免) _____

中文摘要……..…….…… Ⅰ

英文摘要……..…..……Ⅲ

第一章 DGGE的原理與沿革……...…….....1

1. DGGE的原理…….…….1

2.DGGE的沿革……..…...3

2.1 鑑定基因的突變…….…….....3

2.2 鑑定特定細胞及研究基因的多形性……..……..……...5

2.3 微生物菌相的觀察研究……..……...……..6

3. 實施DGGE電泳的條件……..…...11

第二章 DGGE 在環境微生物菌相分析的應用方法……....13

1. 土壤微生物genomic DNA萃取…….....…....13

2. DNA 萃取物的純化……..15

3. PCR for DGGE……....15

4. Gel elution…….……..18

5. DGGE……..19

5.1 製膠…….19

5.2 電泳…….19

6. 螢光染色……..…....19

7. DGGE 的Fingerprinting pattern 統計分析……..……..20

8. DNA定序……..……...21

9. 繪製親緣演化樹……..……21

第三章 石油污染的介紹及整治過程中 DGGE 在監測上的運用

……26

1. 石油污染物的介紹…….……26

1.1 關於 BTEX……..27

1.2 關於 MTBE……...……...29

1.3 關於 TMB……..……..30

1.4 關於 TPH……..…...30

1.5 石油降解的因子……...33

2. 應用 DGGE 監測石油污染整治的過程……33

2.1 使用DGGE監測受石油污染的海洋環境的整治工作……..…34

2.2 使用DGGE觀察真菌對石油污染整治的影響……...……36

第四章 DGGE在毒物污染整治過程監測上的運用……..…38

1. 除草劑的污染……....38

2. 掩埋場的滲漏液污染…….…39

3. 氨的污染……....41

4. 氯化物的污染……43

5. 重金屬的污染……....46

第五章 DGGE在其他領域進行的微生物菌相分析……..48

1. 在農業上的運用……..48

1.1 不同處理方式對微生物菌相的影響……....48

1.2 使用不同肥料所造成的影響……..…..…....50

2. 環境生態上的研究……..…54

2.1 出海口及河流的生態研究……....…54

2.2 陸地生態研究……....57

3. 腸道生態……61

4. 食品的研究……63

第六章 DGGE方法之改進與未來發展…….……64

1. 改進其前置作業……..……65

1.1 DNA萃取方法…….....65

1.2 PCR 引子的設計……..……68

2. 研發 DGGE 相關工具……...…73

2.1 DGGEGE……..……..73

2.2 分析方式……..……74

3. 與不同技術的整合運用……..……...……77

3.1 與 TTGE 及 CDGE 的整合運用……...77

3.2與培養基方法的整合運用……79

3.3 與蛋白質分析技術的整合運用……80

4. 結論……82

圖表目錄

圖一：DNA 分子的 Tm 值受到不同序列的影響……1

圖二：不同 Tm 值的 DNA 在變性電泳膠體中的變性程度也不同……2

圖三：兩種不同的電泳方式……2

圖四：TCR beta 易變基因（1-24 家族）的 DGGE 電泳圖……5

圖五：16S rRNA 的圖譜……9~10

圖六：在相同的 V h 下，不同電泳時間的比較……12

圖七：有無外加外加 40 bp的 GC clamp的差別……16

圖八：製作演化樹的流程圖……22

圖九：污染區針對 16SrDNA 的 V3region 的 DGGE 電泳圖……23

圖十：污染區 DGGE 電泳圖的 UPGMA 歸群分析結果……24

圖十一：TA-21 的親緣演化樹……25

圖十二：BTEX 的結構式……26

圖十三：MTBE及TMB的結構式……27

圖十四：定點 mesocosm 系統的設置……28

圖十五：受石油污染的海洋環境的DGGE電泳圖……35

圖十六：受石油污染的真菌菌相的DGGE電泳圖的歸群分析樹狀……37

圖十七：垃圾掩埋場的的 DGGE 電泳圖的歸群分析樹狀圖.....40

圖十八：DGGE 分析及定序結果顯示四個新的序列.....42

圖十九：KMS 土壤在不同溫度的菌相結構的 DGGE 電泳圖.....43

圖二十：受 PCDD/Fs 污染環境的復育過程 DGGE 電泳圖.....45

圖二十一：受重金屬污染的海洋沈積物不同樣點的 DGGE 電泳圖.....47

圖二十二：種植不同穀物所顯示 *Burkholderia* 菌相結構的 DGGE 電泳圖

.....49

圖二十三：使用不同肥料的土壤的 DGGE 電泳圖.....51

圖二十四：使用不同引子的玉米根部菌相 DGGE 電泳圖及其歸群分析...53

圖二十五：不同地點的同性質樣品進行歸群分析顯似高相似性.....56

圖二十六：黃石公園的彩虹溫泉的細菌序列.....59

圖二十七：大腸中的*Bifidobacterium*菌相的DGGE電泳圖.....62

圖二十八：不同 DNA 萃取方法的 DGGE 電泳圖.....66

圖二十九：DGGE 電泳圖的 MMD 問題.....69

圖三十：MMD 問題的 Tm 值.....70

圖三十一：Cross-taxas similarities in Tm.....70

圖三十二：改善 DGGE 的敏感度.....71

圖三十三：SuPER 的作用機制.....72

圖三十四：七個樣品的 DGGE 電泳圖.....73

圖三十五：單一條帶經過短變性梯度膠體呈現數個條帶……74

圖三十六：使用兩個正控制項的電泳圖……75

圖三十七：邏輯回歸判斷其可能性……77

圖三十八：高 GC 片段的突變分析……78

圖三十九：分別使用 TTGE 及 DGGE 觀察乳製品的菌相結構……79

表一：針對細菌設計的引子……10

表二：石油碳氫化合物的降解菌株……27

表三：降解芳香族碳氫化合物基因……31~32

表四：不同處理方式的電泳圖的相似度比較……36

表五：使用針對真菌的引子偵測真菌的多寡……37

表六：A 至 L 條帶的定序結果……45

表七：各個採樣點的重金屬含量……47

表八：與其他方法在分類程度上的比較……64

表九：不同DNA萃取方法的介紹……66

表十：邏輯回歸判斷其可能性……77

表十一：鑑定出來的三種蛋白質……81

中文摘要

本論文首先介紹 PCR-變性梯度膠電泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis，PCR-DGGE)的原理及沿革，其次詳細描述 PCR-DGGE 在石油污染整治過程監測的運用、在毒物污染整治過程監測上的運用、以及在其他領域進行的微生物菌相分析，最後並對其未來發展提出一綜合性的評論。PCR-DGGE 技術最初被使用來研究 DNA 突變。由於它是一個非常有力的工具，能夠偵測在被 PCR 放大的 DNA 片段上的微小差異，因此經過正確的設計，對 DNA 序列上的變化偵測效果能夠達到百分之百。DGGE 的分離原理是根據 DNA 序列的不同，使 DNA 樣品在變性膠體中產生不同程度的變性，而影響其在變性梯度膠體中的移動速度，而加以分離。PCR-DGGE 技術能有效偵測環境中微生物種類的分佈，包括還不能被培養的微生物菌種，因此已成為研究微生物菌相結構上應用最廣的分子技術之一。微生物學家們能利用此技術更深入了解環境中的微生物生態分佈，以及污染整治過程中微生物菌相的變化，如石油污染及其他毒物污染的整治等。此外，PCR-DGGE 也能應用在食品工業、農業及生物腸道等等的微生物生態研究上。當我們對於菌相分佈及優勢菌種有非常深度的瞭解後，便能對特定菌種進行分離、純化與培養，並且能夠充分利用這些菌種。關於 PCR-DGGE 技術未來的發展，主要可分為三個方向，分別是前置作業的改善、DGGE 相關工具的研發以及與不同技術的整合運用。改善

前置作業能使 DGGE 對菌相的分析更加完善及準確，並且能增加 DGGE 對 DNA 的敏感度及幫助其膠體的正常化等等。研發 DGGE 相關工具可以提升其監測菌相的能力，並且能幫助我們更了解 DGGE 電泳圖所代表的意義。而透過 DGGE 與不同技術的整合運用，能夠使我們對微生物菌相的分佈、變動及功能等等有更深層的了解。

eThesys 博碩論文

Abstract

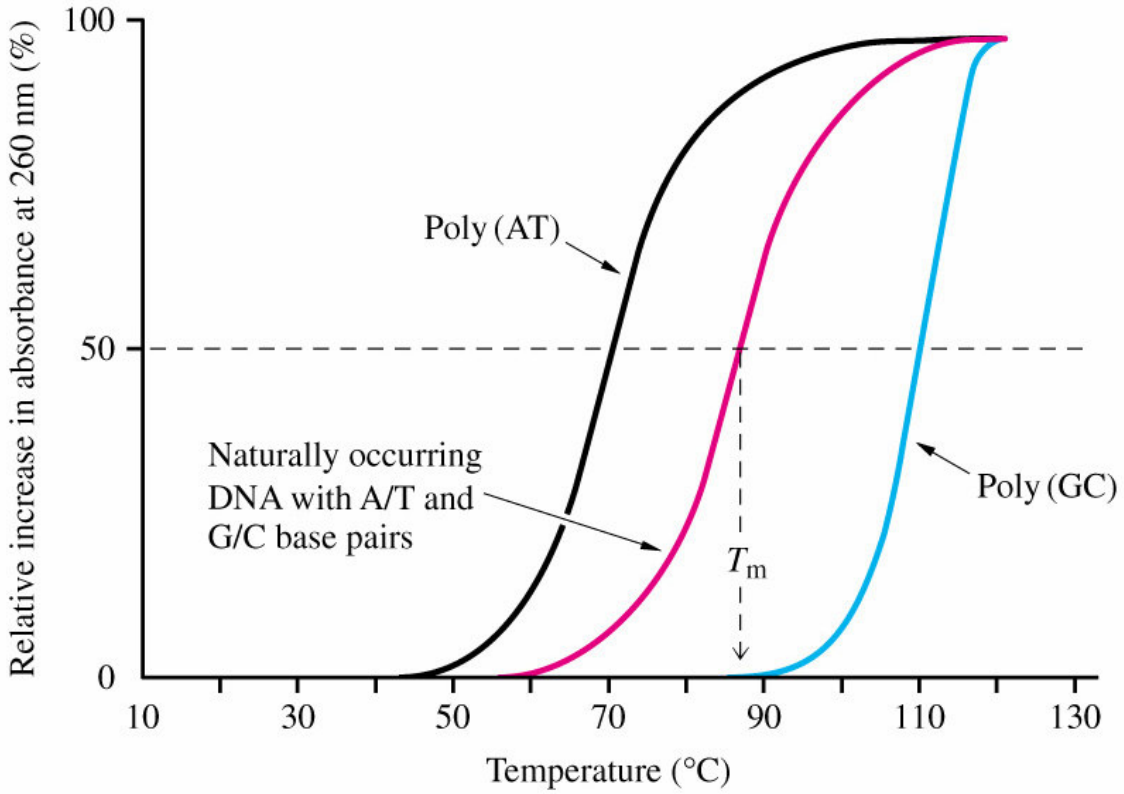
This thesis introduced the principle and the evolution of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), described its usage in monitoring the remediation process for oil and other chemical pollution as well as analyzing the nature microbial community, and finally made a comprehensive comment to its future development. PCR- DGGE was initially developed to study DNA mutations because it is a powerful tool to detect DNA base mutations in a PCR-amplified DNA fragment. Its accuracy can be as high as 100%. The principal of DGGE is based on the differences in DNA sequence that affect the melting points of each amplicons, and caused a decrease in the electrophoretic mobility of a partially melted DNA molecule in a polyacrylamide gel containing a linearly increasing gradient of DNA denaturants. PCR-DGGE can effectively detect the community structure of microorganisms in the environments, including the unculturable microorganisms. Nowadays, it has become one of the most frequently applied techniques to study the community structure of microorganisms. Microbiologists can use this technique to understand the microbial ecology, the shift of the microbial community structure during a bioremediation process, such as the oil pollution and other toxic chemical pollution. In addition, PCR-DGGE can also be used for the fermentation studies in food industry and agricultural industries. We can even identify unculturable microorganism by analyzing the DNA fragment sequences. This can help us to design a suitable medium to culture and isolate these 'unculturable organisms'. There are three directions for the further development of PCR-DGGE technique: 1. Improvement of material preparation processes; 2. development of new

DGGE-related tools; and 3. combination of other technology with DGGE. The improvement of preparation processes can make DGGE more accuracy to analyze the community structure of microorganisms, improve the sensitivity of DGGE fingerprint detection, and help the DGGE normalization. The development of DGGE-related tools can overcome the limitations imposed on DGGE by co-migration and help us to have a better understanding of the meanings for a DGGE pattern. The combination of other technology with DGGE can help us to have a clear understanding of the microbial ecology, the shift of the microbial community structure, and the function of microorganisms.

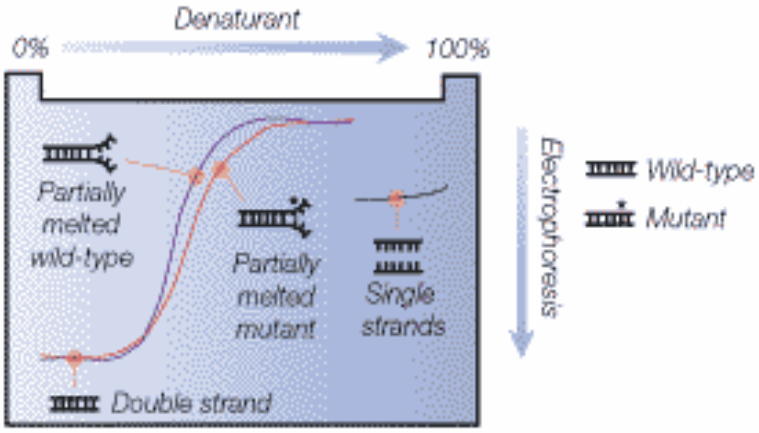
第一章 DGGE的原理與沿革

1. DGGE的原理

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis，變性梯度膠電泳) 的電泳膠是利用 urea 及 formamide 兩種變性物質，製成濃度由低至高的變性梯度膠體，可進行生物分子的分離。DNA分子因爲鹼基對序列的不同，而有不同的Tm值。DNA序列變性程度與其melting temperature (Tm) 有關。當DNA在膠體上進行電泳時會產生部分變性，形成部分單股 (partial single strand)，而影響分子的形狀。由於Tm的不同，所以DNA變性程度有所不同（圖一、二），因而影響其在膠體的移動速度，尚未變性的雙股DNA片段移動速度較快，部分變性的DNA片段移動速度較慢，因此利用此原理便可將不同序列的DNA分子予以分離。

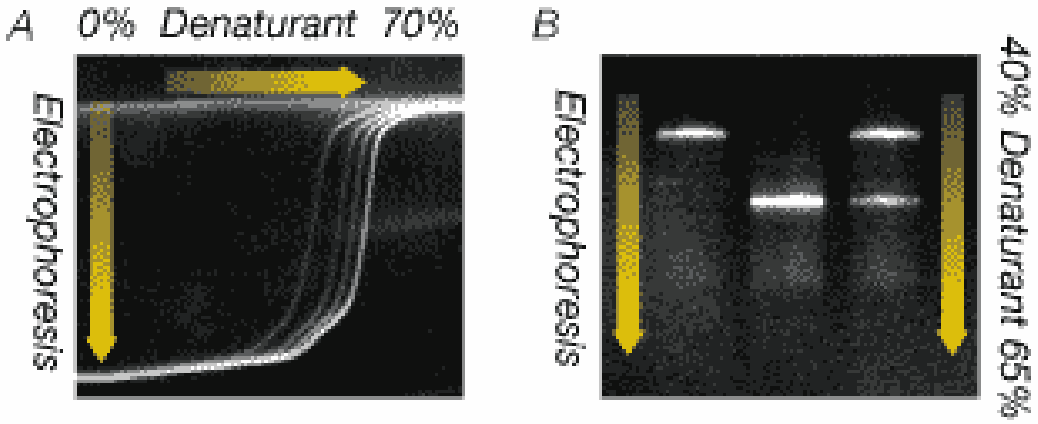


圖一：DNA分子的Tm值受到不同序列的影響
（取材自：cwx.prenhall.com/.../ media_portfolio/19.html）



圖二：不同Tm值的DNA分子在變性電泳膠體中的變性程度也不同
（取材自：molbiol.edu.ru/ review/04_03b.html）

電泳膠的變性梯度爲連續性的，比如說可以從30%的變性梯度到70%的變性梯度，也可以從40%的變性梯度到60%的變性梯度，可以視樣品情況作調整。爲了幫助膠體凝固，膠體內添加0.09%(v/v)的 ammonium persulfate (APS) 及 N , N , N ' , N ' - tetramethyl - ethylenediamine (TEMED)，在凝固前約有5-7分鐘可供操作。當變性梯度凝膠製備完成後，加入經過定量及固定體積的純化後DNA樣品，即可進行變性梯度膠電泳。電泳方法可分爲兩種：(1)電泳方向與變性梯度垂直。(2)電泳方向與變性梯度平行（圖三）。兩者皆可用於突變的鑑定，前者使用的膠體變性範圍較大，如0-100%、20-70%，可以詳細觀察野生株 (wild type) 與突變株 (mutant type) 的細微差異，而後者使用的膠體變性範圍較小，以便讓野生株與突變株分離得較爲完全。至於偵測微生物菌相使用的電泳方法爲電泳方向與變性梯度平行，因爲微生物菌相包含許多菌種，唯有如此才能清楚呈現其菌相，並且容易觀察菌相的變化。



圖三：兩種不同的變性電泳方式（取材自：molbiol.edu.ru/ review/04_03b.html）
A爲電泳方向與變性梯度垂直。B爲電泳方向與變性梯度平行。

2. DGGE的沿革

DGGE最初使用時是用在醫學上，主要是來鑑定基因的突變，對於研究因突變所造成的疾病有很大的幫助(Fischer SG and Lerman LS, 1979)。後來，DGGE才用在微生物菌相的觀察，其效果遠勝過需要使用培養基的技術(Rollins et al., 1986)。此外，DGGE也可以用來鑑定及分類特定細胞並對基因的多形性進行研究。

2.1-鑑定基因的突變

DGGE電泳方法的準確度及敏感性 (sensitive) 是非常高的，其準確度可以高達95%～99% 。就500個核苷酸序列而言，即使只有單一鹼基對 (base pair) 的組成不同也能夠加以鑑別。DGGE電泳方法對於鑑別突變株的能力遠比直接定序法來的高且敏銳(Barbara et al., 1999)，是鑑定DNA突變的有力工具。

因爲DGGE是鑑別突變的有力工具，所以DGGE經常使用在醫學相關的研究上，以周邊血液幹細胞(Peripheral blood progenitor cell，PBPC) 移植的研究(Dang et al., 2002.)爲例，加以說明。一些研究報告指出異體PBPC移植比骨髓移植效果更爲迅速，有幾種可能原因，其一是因爲注入了大量幹細胞，另外根據愈來愈多的證據顯示，PBPC和骨髓移植的幹細胞間有生物因素上的差異。幾個研究顯示PBPC不是屬於非循環(non-cycling)就是細胞循環中的G1相，相反的，骨髓中的骨幹細胞有很高比例是在DNA合成相中。雖然PBPC不是正在合成的DNA，但這些細胞在植入後可以快速地再進入細胞循環中，已有證據指出，非循環的幹細胞有較佳的植入能力。因此，PBPC的移植頻繁地使用在惡性腫瘤的治療上，但是殘餘的腫瘤細胞也許會導致疾病的復發，因此便可以使用DGGE來偵測這些殘餘的突變細胞。研究人員使用p53 基因和乳癌作爲模型，將單一基因的突變當做是腫瘤的具體記號，以便查出存在於PBPC的殘餘病變細胞。一項研究報告中指出，從五十一名PBPC病人取出腫瘤組織所進行的測試，其中三十八名患者具有突變造成的病變或是有腫瘤轉移的高風險，另外十三名是屬於高風險階段II/III的病患。於是研究人員針對腫瘤DNA進行篩

選，使用DGGE選出p53在exons 5 到9的突變，並且接著進行定序，以確認突變基因的存在。研究人員根據序列提供的資訊，爲各個突變設計對偶基因專一性引子(allele specific primers)，使用amplification refractory mutation system (ARMS) 從PBPC中篩選DNA，以便鑑定出殘餘的病變細胞。ARMS是一種利用PCR反應來偵測突變的技術，基本上，這項技術能夠使用引子來放大突變基因，但不會放大野生株(wild type)的DNA 序列；或只是放大 wild type 的 DNA，但不會放大突變基因。根據DGGE的研究結果，發現十二個不同的突變，其中兩個因爲與 wild type 的 DNA有共同遷移（co-migrated）的現象所以不能被定序，剩下的都屬於點突變，而使用ARMS系統只能發現十二個病變樣品中的八個，以及五個病患當中的三個。顯示ARMS對病變的偵測效果並不完善。根據這些結果，我們知道使用DGGE系統對於殘餘病變細胞的偵察相對地較爲靈敏，優於ARMS。

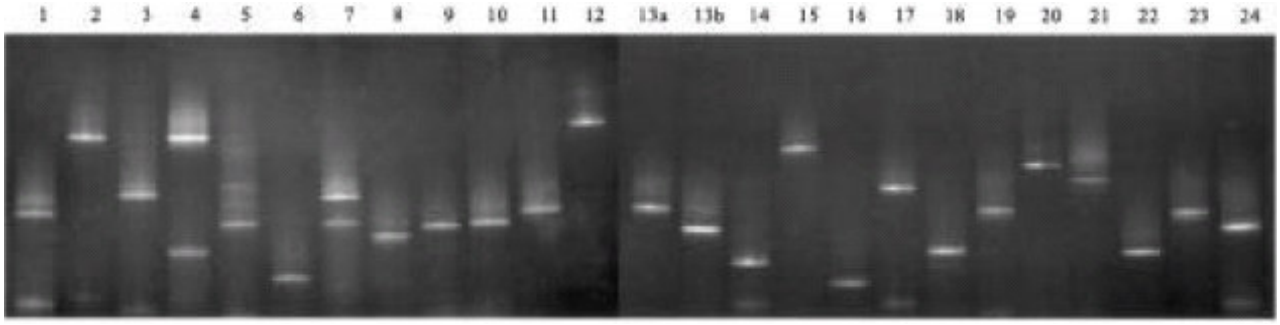
同樣是因爲鑑定突變的能力，DGGE也應用在結核病患者因 pncA 基因突變對 PZA (pyrazinamide)產生抗藥性的研究上(McCammon et al., 2005)。經由對181個結核病病患所進行的研究，研究人員發現 pncA 的某一區域具有大量的GC鹼基對，其Tm值接近90°C，接著研究人員使用DGGE觀察這個區域的突變情形。根據研究結果，DGGE在83個具有PZA抗藥性的病患中，偵測出82個具有pncA的突變。相反地，98個可以用PZA治療的病患，只有1個發現DNA突變。研究人員針對41個病患的pncA基因加以定序，並且在32個具有PZA抗藥性的病患中，檢測出32個DNA突變，包括11個新型的突變。然而經由DGGE的檢測，發現其中的9個病患對PZA的反應結果與藥物感受性的測試結果不同，經由DNA定序證實藥物感受性的測試結果是錯誤的，DGGE的測試結果才是正確的。根據這些結果，我們知道DGGE能準確測試出結核病患是否會對PZA產生抗藥性。

由於DGGE鑑定突變的能力十分優異，所以對於醫學研究是個十分有力的工具。除了上述研究，還有許多研究都使用DGGE來進行鑑定突變，所獲得的結果不但快速而且正確，並且能夠進一步加以定序，幫助我們了解其運作的機制。

2.2-鑑定特定細胞及研究基因的多形性

在醫學研究上，DGGE除了能鑑定DNA突變外，還能偵測α β-T-cell 的同源叢生性(clonality) 並且描述其特性（Thor et al.,1998.），以及來研究人類的L-ficolin (FCN)的多形性 (Herpers et al., 2006.)。L-ficolin 屬於血清凝集素 (lectin)，能夠活化補體的凝集素路徑。

在免疫系統中，每個T細胞的細胞膜上都會表現屬於自己的 T 細胞感受器 (T-cell receptor，TCR)，透過TCR來偵測身體內體細胞之細胞膜上所帶有的訊息。TCR具有 α chian 及 βchian，α chian 可分爲V、J及C區，βchian可分爲V、J、C及D區。T-cell大致上可分爲兩類，一種是 clonally expanded T cells，一種則是 polyclonal T cell，兩者的同源叢生性的特性並不相同，同源叢生性是指由同一種細胞增生成一叢特別的細胞。clonally expanded T cells 是由同一種細胞增生而成，polyclonal T cell 是由數種類似的細胞增生而成，這數種細胞不同的地方在於 T 細胞感受器的 V/J 和 V/D 基因片段的接合處。當使用DGGE來分析 clonally expanded T cells時，因爲其接合處沒有差異，所以只會由他們的裂解(melting)特性來決定在膠體停留的位置，因而會停留在相同的位置，其電泳圖只會顯現單一條帶。相反的，polyclonal populations伴隨著接合處有高度差異，不同的DNA分子會停留在不同的膠體位置，所以此種T-cell的電泳圖會呈現抹片(smear)痕跡，其電泳圖會顯現數條條帶。對於每個TCR beta易變基因(β-variable gene，BV)(1-24 家族)，使用轉殖放大的大多數基因複本會在DGGE膠體上形成單一條帶(圖四)，但是polyclonal T-cell populations則會在膠體形成抹片痕跡。這項發現有助於我們對 T細胞進行各種病理性和生理性的測試，並且有助於監測診斷時和治療時的T細胞反應。



圖四：TCR beta易變基因（1-24 家族）的DGGE電泳圖（取材自：Thor et al.,1998.）

DGGE也能用來研究人類L-ficolin (FCN)的單一核苷酸多形性(single nucleotide polymorphisms，SNPs)。單一核苷酸多型性是研究各種遺傳疾病的重要基礎。人類的L-ficolin (FCN)屬於血清凝集素 (lectin)，包含似膠原蛋白區域和似纖維蛋白區域，L-ficolin的功能是活化補體的凝集素路徑。參與先天免疫的 L-ficolin 其結構和功能相似於mannose-binding lectin (MBL)，已知MBL2的結構多形性會使MBL的功能產生缺陷，但是對於FCN2基因多形性的了解卻很少。研究人員使用DGGE分析188個荷蘭白種人的FCN2多形性，全部基因顯示了10種單一核苷酸多形性。值得注意的是，研究人員經由定序發現兩個單一核苷酸多形性發生在exon 8的恆定密碼上，這兩個密碼所代表的胺基酸位在似纖維蛋白區域的內部，這些纖維蛋白區域代表L-ficolin的結合能力，並且這些纖維蛋白區域高度保存在許多物種的某些蛋白質上。這些最近發現的多形性能夠修改蛋白質的親合力，並且可能會改變L-ficolin辨認侵略微生物的能力。

2.3-微生物菌相的觀察研究

到目前爲止超過90% 的細菌無法被培養和分離出來，而這些細菌多是需要特別的生長環境，但這是現有培養方法所無法提供的，所以需要分子生物學的協助。除此之外，許多菌種因爲有著複雜的共生關係，更是不能用傳統方式培養。除了無法培養的原因外，還有些微生物因爲是附著在沉澱微粒上，所以不能用顯微鏡加以觀察。現今的分子生物技術提供了新的方法，可以對微生物的菌相結構進行分析。尤其值得注意的是，在分生技術中，16S rRNA序列的差異性被用來推斷微生物的種系關係，這是因爲16S rRNA在細菌分類及鑑定上具有獨特性，是生物演化的「分子時鐘」(Woese, 1987)，所以我們可以根據16SrDNA序列設計探針（probe），來偵測自然環境中的微生物。

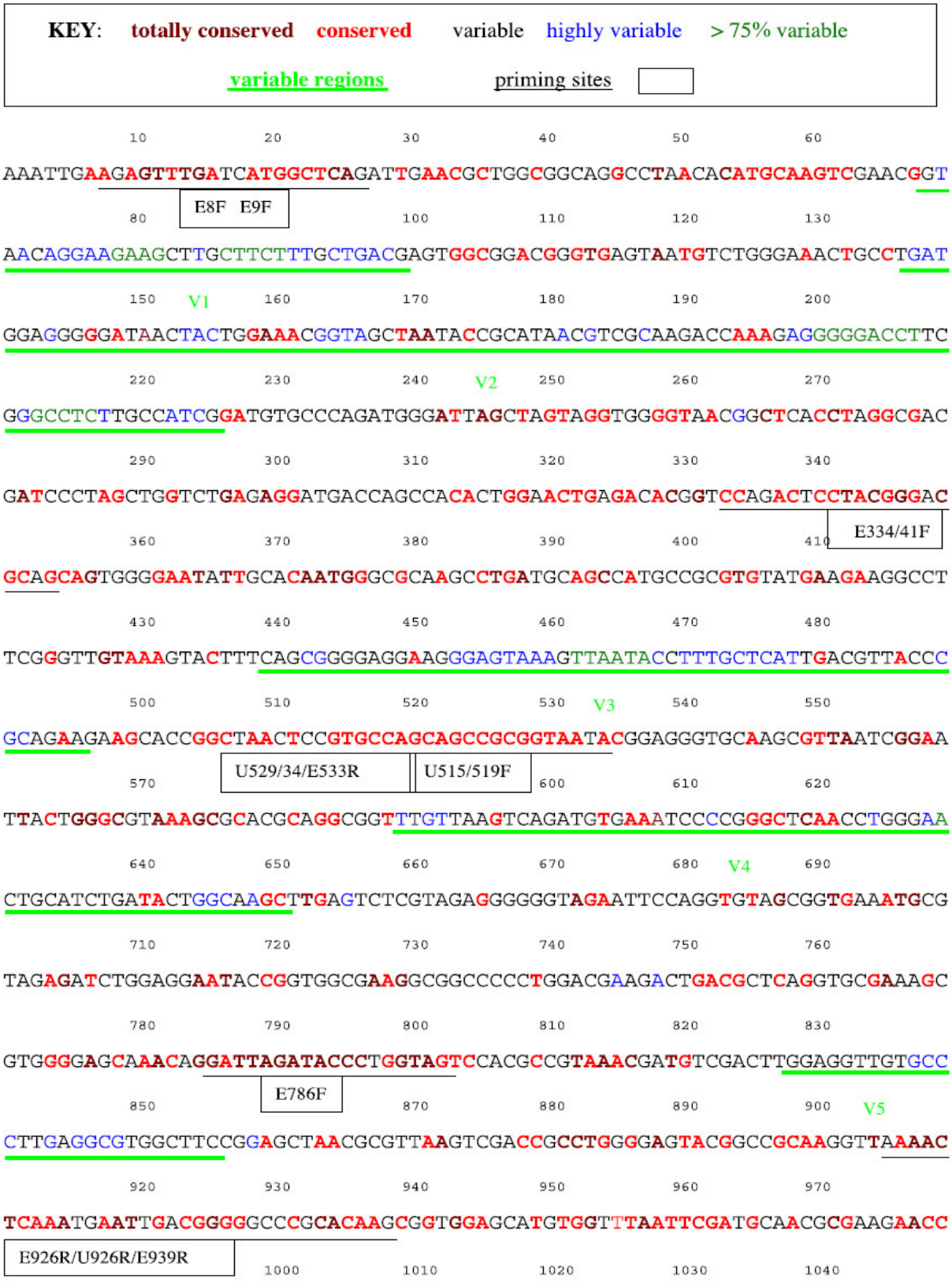
DGGE是一種分子生物技術，可以分離經 polymerase chain reaction（PCR）放大的個別物種的16S rDNA片段，顯示複雜微生物菌相的DNA圖譜，圖譜上的條帶代表許多個別菌種的基因片段，且由各條帶的粗細可判斷菌種含量之多寡，因此DGGE能夠作

爲評估微生物的菌相組成的方法。此外，即使微生物菌量佔所有檢測菌量總數的百分之一，DGGE依然可以偵測出此種微生物((Muyzer et al., 1993)，而且進行過DGGE電泳後，可以切下膠體上的16S rDNA 片段進行定序，然後可以跟基因資料庫進行比對，鑑定出可能的菌種，因而能進一步了解菌種的特性，例如是屬於革蘭氏陰性或是陽性、好氧或是厭氧等，有助於設計培養條件，加以分離。

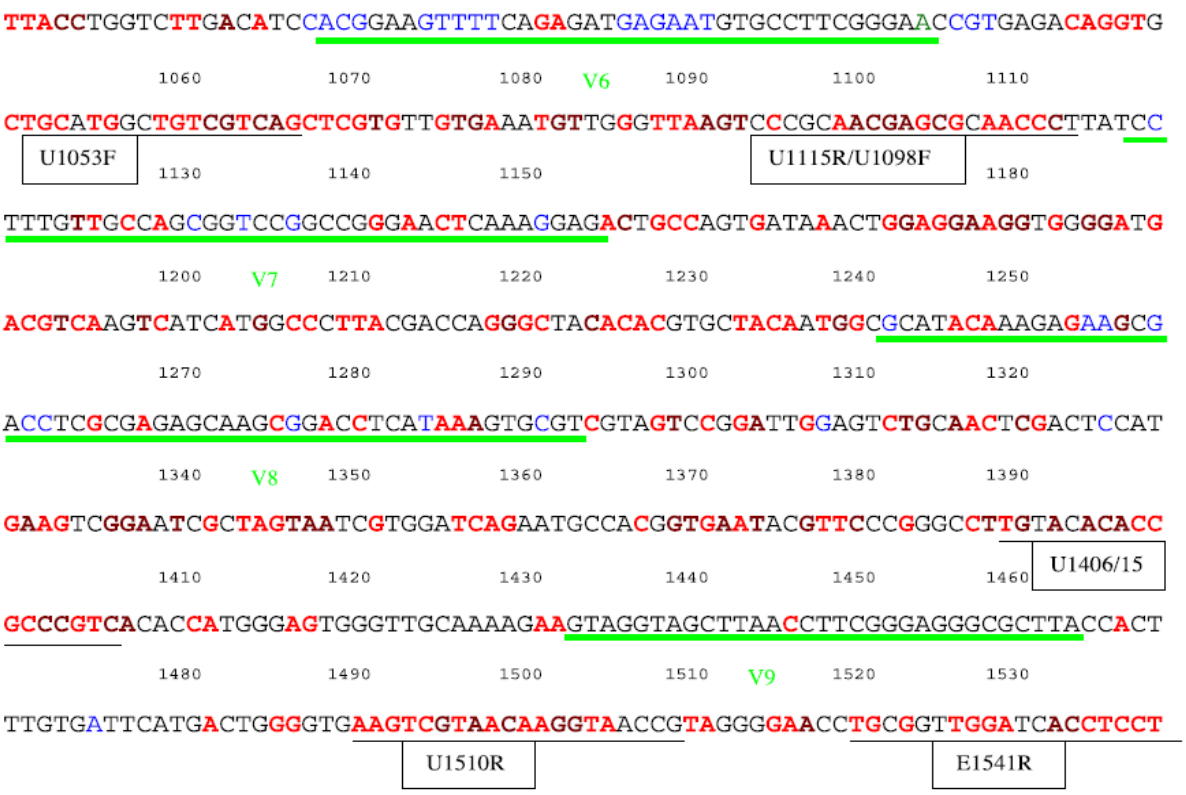
在進行 DGGE 之前，需先進行 PCR 反應，這是爲了增加目標 DNA 的含量。一開始將這項技術用來研究微生物菌相所使用的 PCR 引子（primer），是針對 16S rDNA 的 V3 區域((Muyzer et al., 1993)。在 PCR 反應中使用不同的引子，會影響 DGGE 所呈現的菌相，這是因爲不同的 PCR 引子放大不同的 DNA 片段，所以我們可以針對不同的需要，使用不同的引子，以便達到最佳的效果。不同的引子會放大不同區域的 16S rDNA，用來鑑定不同的菌種，例如：放大 16S rDNA 的 V6 至 V8 區域來鑑定土壤的細菌與古細菌(Snaider et al., 1999；Chang et al., 2000)，或利用 V2 與 V3 區域來鑑定乳酸菌 （ Satokari et al., 2001；Danilo et al., 2001)。這些結果是根據前人實驗所得的經驗，可能是因爲不同的變異區域對不同細菌有不同的效果。

圖五是16S rRNA的圖譜，不同顏色表示不同意義： 完全保留的位置以棕色表示，高度被保留的位置以紅色表示，易變異的位置以黑色表示，高度易變異的位置以藍色表示，在大腸桿菌中存在但不存在於其他75% 的細菌序列以綠色表示。有些引子是針對特定物種，有些則是針對大部分的物種，後者稱爲普遍性引子。普遍性引子會與保留位置結合，前後兩個引子夾住變異的序列，顯示出大部分的菌種。根據16S rRNA的圖譜，10%的16S rRNA 基因的完全被保留，然而多數這些被保留的區域不是在彼此附近而形成連續的，因此增加了普遍性引子設計的難度。最長的完全被保存區域是位在第788鹼基和第798鹼基之間， 但多數區域完全被保存的序列少於四個鹼基(Baker et al., 2003.)。因此，我們無法設計單一引子來顯示所有細菌，更別說要將所有原核生物的16S rRNA 加以定序。普遍性引子的設計是其與序列的互補性(complementarity)與其它引子特性的妥協，其他引子特性包含了引子間的互補性，黏合的溫度(annealing temperature)和 G/C的比率。普遍性引子的設計常常爲了顯示大

部分的菌種，經常犧牲了理想的黏合溫度和避免引子間的互補。在表一中，引子的特異性(specificity)依據引子對模板的模版的互補性加以判斷。實際上，在從培養基取得細菌的放大作用情況下，普遍性引子對序列有70%的相似度是成功黏合和放大作用的主要因素。但是普遍性引子粗劣的互補性，特別是在V3區域尾端，將會使得特殊環境樣品的物種的基因型的代表性不足。包括多個在退化(degenerate)位置的核苷酸的引子具有"普遍特異性"，但這樣的引子有報告指出可能導致非目標基因的放大。另外，具有肌核苷(inosine)的細菌引子對於不同環境的偵查是有幫助的，肌核苷是腺苷(Adenosine)之退化產物，研究指出，包含肌核苷的引子有更寬廣的特異性，但過份使用可能導致非目標基因的放大(Baker et al.,2003.)。



圖五：16S rRNA 的圖譜(取材自：Baker et al.,2003.)



圖五：16S rRNA的圖譜(續) (取材自：Baker et al.,2003.)

完全被保存的位置以棕色表示，高度被保存的位置以紅色表示，易變異的位置以黑色表示，高度易變異的位置以藍色表示，在大腸桿菌中存在但不存在於其他75% 的細菌序列以綠色表示。綠色底線表變異區，黑色底線及框框表引子及其黏合區域。

Code	Sequence 5′–3′	B	A	E
E8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	+++	+	–
E9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	+++	+	++
E334F	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC	+++	–	–
E341F	CCTACGGGIGGCIGCA	+++	+	–
E786F	GATTAGATACCCTGGTAG	+++	+	–
E533R	TIACCGIIICTICTGGCAC	+++	+	++
E926R	CCGICIATTIITTTIAGTTT	+++	+ ++	++
E939R	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC	+++	–	–
E1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG	+++	–	–
E1541R	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	+++	+	–

表一：針對細菌設計的引子(取材自：Baker et al.,2003.)

(B)表細菌，Bacteria。(A)表古生菌，Archaea。(E)表真菌，Eukarya。－，表沒有任何序列符合。+，25個以下序列符合。++，25到100個序列符合。+++，100個以上序列符合。.

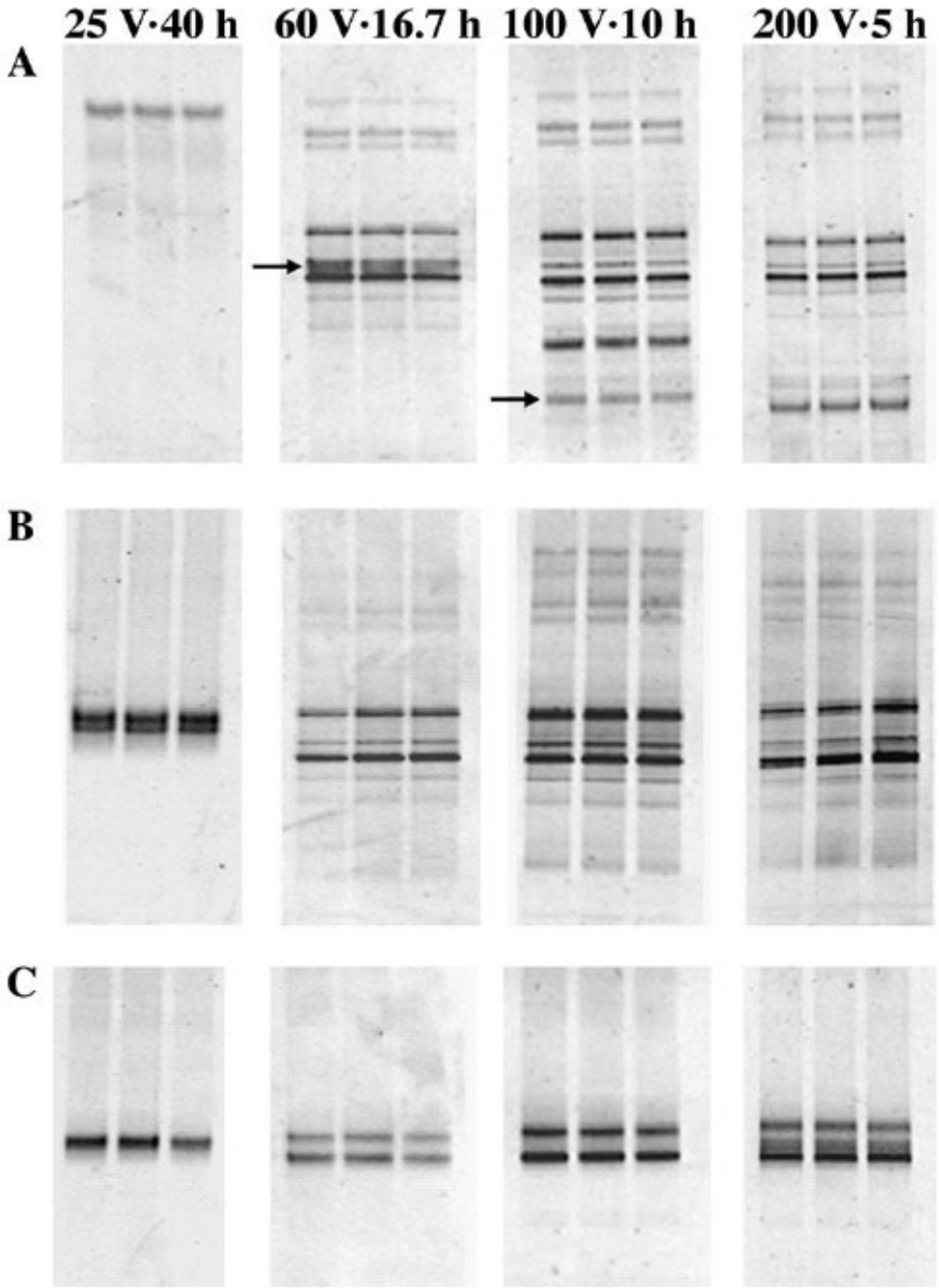
原核的核糖體RNA(ribosomal RNA, rRNA)有三種：5S rRNA、 16S rRNA、23S rRNA。 真核的 rRNA 有四種：5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA。除了針對16S rDNA設計引子外，PCR-DGGE還可以針對其他 rDNA 設計引子，舉例來說，像是對真菌所進行的研究就必須針對18S rDNA設計引子，並且針對不同18S rDNA的區域所設計的引子有不同的效果。雖然我們知道真菌在生態系的重要性，但是對於他們的生態、遺傳和演化卻了解不多，部分原因是來自於偵測和鑑定物種的困難度。透過DGGE的幫助，我們能夠對真菌做進一步的了解。在真菌研究領域中，我們根據*Gigaspora* 的18S rDNA 的變異情形，將*Gigaspora*加以分類。經由PCR-DGGE分離48株Gigaspora的結果顯示，18S rDNA的V3-V4 區不能分辨所有的*Gigaspora*。相反的，18S rDNA的V9 區能分辨所有的*Gigaspora*(Francisco et al., 2004.)，所以我們知道要針對V9 區設計引子，才能使DGGE能夠監測到完整的真菌菌相。

3. 實施DGGE電泳的條件

和別的分子方法相比，DGGE沒有統一的規範，並且不同實驗室的分析步驟差異極大。一般而言，進行分析的PCR產物的序列長度是在200 base pairs (bp)和600 bp之間。膠體的 acrylamide 的濃度範圍爲 6% 至 12% (Haynes et al., 2003.)，常用的濃度爲 6% 和 8%，多數跑膠的溫度爲60℃，變性梯度最低爲20%，最高則爲70%以上。(100%的變性梯度的定義是40%(v/v) formamide和 7M 尿素)。值得注意的是，所選擇的電泳電壓與電泳時間的乘積 (V h)並不相同，範圍從455 V h 到2100 V h。

根據研究結果顯示，在恆定的V h下，更短的電泳時間也許能降低結果的不穩定性，使得條帶分離的更加完全(圖五)(Sigler et al.,2004)。我們知道膠體間可以比較的前提是：所有膠體必須使用相同的電壓及時間，研究結果說明了雖然電泳的 Vh 是一樣的，但是改變電泳時間可能對條帶分析產生很大的影響。研究也顯示，增加電泳時間所得的結果並不良

好，可能會使變性梯度膠體產生不穩定。DGGE 電泳時間需減少到能夠提供最佳的解析度，並且解析度的優劣會影響後來根據條帶所進行的分析，所以電泳時間縮短至適當程度可以得到更精準的菌相分析。



圖六：在相同的 V h 下，不同電泳時間的比較(取材自：Sigler et al.,2004)
(A) 200 bp 的 PCR 產物(B) 440 bp 的 PCR 產物(C) 600 bp 的 PCR 產物

第二章 DGGE 在環境微生物菌相分析的應用方法

使用DGGE分析環境微生物菌相的步驟如下：

1.微生物DNA的萃取 2.DNA萃取物的純化 3.PCR反應 4.Gel elution 5.DGGE 6.螢光染色 7.Fingerprinting pattern 統計分析 8.DNA定序 9.繪製親緣演化樹

以下將分別詳述。

1.土壤微生物genomic DNA的萃取

DNA的萃取方法有許多種。玻璃珠撞擊法與冷解凍法（Freeze-Thaw）屬於物理萃取方法，酵素法與Phenol-Chloroform法則屬於化學方法。

玻璃珠撞擊法主要是利用玻璃珠撞擊破壞微生物細胞來萃取DNA。雖然較爲節省時間，但也較爲劇烈，有可能導致DNA的斷裂，所以需對撞擊時間及速度加以控制，根據DGGE圖譜顯示此種方法所得的菌相最爲豐富。冷解凍法主要利用約245℃的溫度差異來打破土壤中的微生物細胞，以萃取細胞，可是只對環境中某些微生物有較佳的萃取效果，對多數微生物的萃取效果不佳，但使用冷解凍法能打破gram-positive 的細菌細胞。且根據前人的研究結果，只使用玻璃珠撞擊法的萃取效果優於只使用冷解凍方法，但是兩者合用的萃取效果更好（Miller D. N.et al.1999.)。酵素法利用酵素水解微生物細胞來萃取DNA，與玻璃珠撞擊法和冷解凍法比較，酵素法可以萃取出高濃度及高純度的DNA，是最有效的萃取法。但是，根據DGGE圖譜顯示，其菌相並沒有比玻璃珠撞擊法來得豐富（林靜宜，2003）。

本實驗室爲了達到最佳的DNA萃取效果，所使用的萃取方法結合了玻璃珠撞擊(Bürgmann et al., 2001)、冷解凍法 (Tsai1 et al.,1991; Gich et al., 2001)、酵素法 (Bano et al., 2002)，並且以Phenol-Chloroform法進行 DNA 的萃取與分離(Watanabe et al., 2000)。

微生物genomic DNA的萃取過程如下：

（1）玻璃珠撞擊法：

取1.0g土壤及0.5g半徑爲0.1mm的玻璃珠，置入2 ml的eppendorf，加入0.8 ml DNA extraction buffer後，置於Bead Beater上，以最低速震盪50秒，使玻璃珠能充分打破細胞。

（2）酵素法（上）:

加入100µl lysozyme(100mg/ml)，於37 ℃水浴槽，反應1小時，目的在以酵素水解破壞細胞壁。加入100µl 20％ SDS和80µl proteinase K(20 mg/ml)，於37 ℃反應2小時，其間需不定時搖晃。目的在破壞細胞膜，使細胞內涵物釋放。

（3）冷解凍法：

將eppendorf以液態氮（-180℃）及65℃水浴槽進行Freeze-Thaw，重複冷凍、解凍三次。

（4）酵素法（下）:

將eppendorf以10000 rpm 離心1分鐘，收取上清液。加入200µl NaCl-CTAB，置於65℃水浴槽反應20分鐘，目的在使多醣類與殘留蛋白質沈澱。

（5）Phenol-Chloroform法：

加入等體積約800µl 的phenol-chloroform-IAA(25:24:1)，輕微搖晃後，以14000 rpm 離心5分鐘，收取上清液，目的在去除蛋白質和多醣類。於上清液內，加入等體積的chloroform-IAA(24:1)，輕微搖晃，以14000 rpm 離心5分鐘，收取上清液，目的在去除phenol。於上清液內，加入2倍體積的isopropanol，置於-20℃使DNA沈澱，反應時間以過夜爲佳。取出eppendorf 以14000 rpm 離心5分鐘，收取沈澱物。加入400µl 70％凍乙醇清洗DNA沈澱物，以14000 rpm 離心3分鐘，目的在去除鹽類。棄上清液，將DNA沈澱物用冷凍乾燥機乾燥。加入20µl Elution Buffer溶解DNA沈澱物，置於-20℃保存。

2. DNA 萃取物的純化

DNA萃取物(DNA extracts)的純化，主要是因爲如果其中所含的蛋白質、腐質酸、富啡酸、金屬離子及其他干擾物含量太高時，會妨礙聚合酶連鎖反應的進行。使用Wizard DNA

Clean-Up system (Promega cat#A7280)來純化DNA，清除其中的蛋白質、腐質酸、富啡酸、金屬離子及其他干擾物(Duineveld et al., 2001)。

使用步驟如下：

先將Wizard DNA Clean-up resin 放置在37℃水浴槽加熱10分鐘，取1 ml Wizard DNA Clean-up resin 置入1.5 ml microcentrifuge tube 中，加入 DNA 萃取液(50~500ul) 混和均勻，將resin與DNA混和液取出置入 Syringe Barrel 注射針筒，使用針筒活塞將 resin 與 DNA 混和液慢慢地打過minicolumn 的膜上，使 DNA 和其他大分子物質殘留在 minicolumn 的膜上，再來將 2 ml 80% isoproranol 溶液加入Syringe Barrel 注射筒，利用相同方法將 isoproranol 溶液慢慢打過 minicolumn，最後將minicolumn 以 10,000 rpm 離心 2 分鐘，去除殘留在膜上的 resin 及isoproranol，取出 minicolumn 置於另一個新的1.5 ml 微離心管，加入 30 ul 80℃ TE Buffer 於 minicolumn 中，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘溶解出膜上的 DNA，將純化的 DNA 置於-20℃保存。

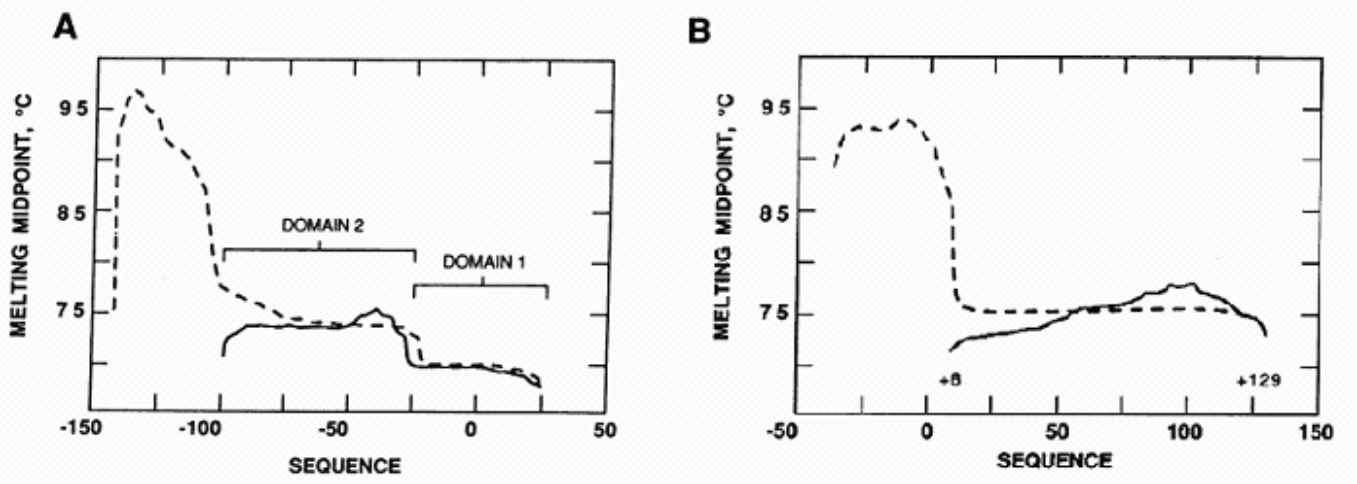
3. PCR for DGGE

實驗所用的PCR反應器是PCR Express Thermal CyclerThermoHybaid，UK。PCR反應所添加的各種試劑用量採行Takara（日本）的標準，在100 µl 的PCR反應試劑體積中，包含12 µl的Template DNA、10 µl的 10xPCR buffer (包含100 mM Tris-HCl，500 mM KCl，15 mM MgCl2，pH =8.3)、各1 µM的1 µl forward-primer 及 reverse-primer、8ul dNTP mixture (2.5 mM each deoxynucleoside triphosphates)，使用ddH_2O將體積定量至100 µl。

實驗所使用的引子（primer）是針對細菌的16S rDNA中的變異區段序列所設計的V3 region的引子：341fgc、534r與V6-V8 region的 primer：968fgc、1392r。341fgc爲欲放大的16SrDNA片段的 forward 端引子並且外加40 bp的 GC clamp，534r 爲 Reverse 端的引子。968fgc爲欲放大的16SrDNA片段的 forward 端引子並且外加40 bp的 GC clamp，1392r 爲 Reverse 端的引子。這兩組primer是依據*Escherichia coli* numbering system的V3 region

(Muyzer et al., 1993)及V6-V8 region (Chang et al., 2000)所設計的。*E. coli*的V3變異區是細菌分類研究中較爲深入的16S rDNA區域，這些片段在同一物種內具有高度保留性，在不同物種間則具有足以區別物種差異的遺傳訊息，V3 region的primer稱爲universal primer。由於V3變異區可能無法分離出所有的菌種，所以需要另一組universal primer來補強菌相的完整性，因此選擇了 V6-V8 region的primer（謝昶毅，2004）。此外，有研究指出V6-V8 region適合用來偵測土壤微生物(Chang et al., 2000)。

我們會在進行實驗所用的primer的forward 端外加 40 bp的 GC clamp(Sheffield et al., 1989.)，增加可供區別的裂解區域(melting domain)(圖七A)，或是簡化裂解曲線(melting profile)爲一個裂解區域(圖七B)，因而提高DNA在DGGE時分離的效果。



圖七：有無外加外加 40 bp的 GC clamp的差別
當溫度在線條之下，該段DNA不會裂解。當溫度在線條之上，該段DNA則會裂解。實線皆爲沒添加GC clamp，虛線皆爲添加GC clamp。
(A) 爲老鼠的β^{major} globin promoter region.。原DNA序列只能分辨位在Domain1的序列變異，不能分辨位在Domain2的序列變異。因爲到達該溫度(在DGGE中爲變性濃度)，DNA序列即裂解爲單股。外加外加 40 bp的 GC clamp的DNA序列則可分辨位在Domain2的序列變異。(B)爲人類的β-globin gene region。外加 40 bp的 GC clamp使DNA序列成爲一簡單的單一Domain，增加DGGE的敏感度。

V3 region primer的反應溫度條件如下：

先升溫至95℃維持5分鐘，將雙股DNA模版變性爲單股。接著進行35個循環的升降溫反應，95℃反應1分鐘使DNA變性，55℃反應1分鐘使引子黏合目標DNA，72℃反應2分鐘延長DNA片段的長度。最後72℃反應5分鐘修補DNA片段的長度，使所有DNA片段的長度爲一致。

V6-V8 region primer的溫度條件如下：

先升溫至95℃維持3分鐘，將雙股DNA模版變性爲單股。接著進行30個循環的升降溫反應，95℃反應45秒使DNA變性，54℃反應45秒使引子黏合目標DNA，72℃反應1分鐘延長DNA片段的長度。最後72℃反應10分鐘修補DNA片段的長度，使所有DNA片段的長度爲一致。

如果PCR反應並沒有成功放大DNA片段的含量，可能是因爲經過純化的DNA萃取物仍殘留少許的干擾物質，可以在PCR反應試劑中加入bovine serum albumin (BSA)，BSA可以降低腐質酸(humic acid)和富啡酸(hulvic acid)等干擾物對PCR反應的干擾(Sieveert et al., 1999)，增加PCR反應中*Taq* polymerase酵素合成DNA的效率。此外，如果PCR反應中，產物的數量與專一性未達到期望的目標，可以增加*Taq* polymerase 的含量，或是改變DNA template、PCR buffer與primer的用量比例，或是改變annealing的溫度條件等方式來加以改善。

V3 region primer

Forward --- 341fgc序列：5’-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG

GCG GGG GCA CGG GGG G

CCTACGGGAGGCAGCAG-3’

（with GC clamp）

Reverse ---534r序列：5’**-ATTACCGCGGCTGCTGG-**3’

V6-V8 region primer

Forward --- 968fgc序列：5’-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG

GCG GGG GCA CGG GGG G

AACGCGAAGAACCTTAC-3’

（with GC clamp）

Reverse ---1392r序列：5**’-ACG GGC GGT GTG TAC-**3’

4. Gel elution

此步驟目的是純化PCR產物，去除不完整的片段與反應爲完全所殘留的enzyme、primer、dNTP 反應試劑等，進而減少DGGE電泳膠片上背景顏色的干擾，增加電泳膠片上條帶的解析度。

步驟如下：

將PCR產物與loading dye混合後，注入瓊脂膠體的凹槽中，進行電泳，切下含有所需DNA片段的膠體，依照□QlAquick Spin Handbook—QlAquick Gel Extraction Kit的指示進行純化。切取約500 mg的膠體置入1.5 ml的微離心管後，加入500 ul的QG buffer置於Heatingblock上加熱，50℃加熱10分鐘，直到膠體完全溶解於QG buffer裡。將QlAquick Spin column放置在2 ml的收集管裡，將溶解的QG buffer逐次倒入QlAquick Spin column中，以14,000 rpm離心1分鐘。倒掉管內的溶液後裝回，添加500 µl QGbuffer，以14,000 rpm離心1分鐘。再用750 µl的wash buffer以14,000 rpm離心1分鐘清洗DNA片段，最後以14,000 rpm離心1分鐘去除殘留液體。將QlAquick Spin column置於乾淨的1.5 ml微離心管，加入50 µl的Elution buffer，以14,000 rpm離心1分鐘，就可得到純化後的16S rDNA片段。

5. DGGE

DGGE是採用Bio-Rad公司生產的「The DcodeTM Universal Mutation Detection System」系統進行。變性梯度的條件爲10%的polyacrylamide凝膠(base pair separation：300-1000 bp)，變性梯度爲30%到70% (urea/formamide)。實驗所製備膠片的設備來自Bio-Rad公司的「Model 475 Gradient Delivery System」。變性梯度凝膠製備完成後，加入經過定量及固定體積的純化後PCR產物，進行變性梯度膠電泳。

5.1 製膠

配製30%與70%的Denaturing solution，各爲16ml。30%的Denaturing solution配製比例爲3200μl 40%Acrylamide/Bis， 320 μl 50xTAE buffer，1920 μl Formamide (deionized)，2.016g Urea，最後加入ddH_2O 定量至16ml。70%的Denaturing solution配製比例爲3200μl 40%Acrylamide/Bis，320 μl 50xTAE buffer，4480 μl Formamide (deionized)，4.704g Urea，最後加入ddH_2O 定量至16ml。

配製好的30%與70%的Denaturing solution分別加入160μl Ammonium persulfate，6.4μl TEMED，再分別置於Model 745 Gradient Delivery System 的注射筒內，使用Model 745 Gradient Delivery System將30%與70%的Denaturing solution注入16 x16 cm尺寸玻璃組成的製膠台，靜置一小時，形成厚度爲1mm的變性梯度膠體。

5.2 電泳

開啓電泳槽的加熱系統，使電泳槽中的running buffer (1xTAE buffer)預熱到60℃，這是爲了使DNA在電泳進行過程中達到穩定溫度的梯度變性效應，再來將液體循環系統(perist)啓動，將變性梯度膠組放入電泳槽中，注入DNA與loading dye的混和

物，本實驗將DNA定量至2,500 ng。所使用的電泳條件爲電壓70 volt，溫度60℃，進行電泳時間爲14小時。

6. 螢光染色

在DNA染劑的靈敏度上，SYBR green I > Silver staining > Ethidium bromide。因此實驗使用SYBR green I 進行染色 (Bano and Hollibaugh, 2002; Seghers et al., 2004)。

步驟如下：小心將變性梯度膠從電泳槽中取出，放置在平底盤上，以ddH2O清洗三次以上，將變性膠體放入200 ml 1X TAE buffer solution 中，加入20 µl SYBR green I (amresco)，以150 rpm 搖晃反應1個小時。整個染色反應必須避光處理。完成染色後，使用LAS-3000 Luminescent image analyzer (FUJIFILM)螢光偵測系統，進行螢光激發與影像攝取，即可得到DGGE電泳圖（如圖九）。

7. DGGE 的 Fingerprinting pattern 統計分析

使用MultiGauge Ver.1.01 (FUJIFILM)影像分析軟體，對DGGE電泳圖做初步的影像處理。使用Quantity One Version 4.5 (Bio-Rad)套裝軟體進行DGGE電泳圖上的條帶影像的定位與統計分析。完成條帶影像的定位與數目判讀後，以DICE(Duineveld et al., 1998; Crump et al., 2003)相似度的演算公式計算兩兩樣本間的相似度S_{AB}，建立相似度的矩陣S_{DAB}。

DICE 相似度公式如下： :

$S_{AB}=2N_{AB}/(2N_{AB}+N_A+ N_B)$

S_{AB}：每兩個樣本間的相似度

N_A：只在樣本A出現的條帶數(即樣本B不出現)

N_B : 只在樣本B出現的條帶數(即樣本A不出現)

N_{AB}：在樣本A與樣本B皆出現的條帶數

接著再以UPGMA (unweighted pair-group mean analysis)進行歸群分析，並且繪製成樹狀圖(dendrogram) (Röing,et al., 2001) （如圖十）。

8. DNA定序

將位在DGGE電泳膠上，欲定序的的16SrDNA片段切下，經由polyacrylamide gel extraction的方式回收16SrDNA(Ferris et al., 1996; Duineveld et al., 2001)，進行PCR反應，增加16SrDNA的含量。所得的16S rDNA經由QlAquick Spin Handbook—QlAquick Gel Extraction Kit進行純化，純化後的DNA利用核酸自動序列定序儀進行定序工作。定序完成後，利用NCBI中的BLAST軟體(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)，將16SrDNA片段序列與GenBank資料庫中已發表的16S rDNA序列進行比對分析。

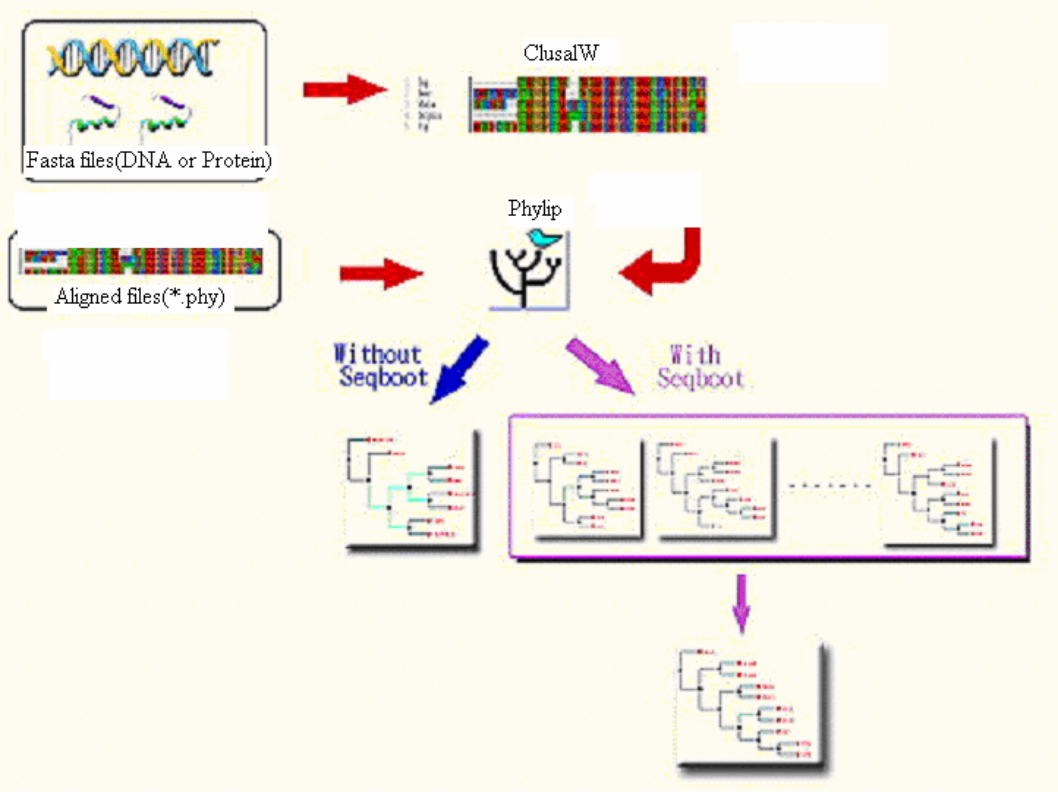
9. 繪製親緣演化樹(Phylogeny tree)

生物巨分子的親緣性分析是一個經常使用的演化分類方法，此方法的主要優點是藉由計算保守性序列的變異程度，而推衍序列之間的相對演變歷史，進一步可推衍爲個體間或物種間的族系發生史（phylogenesis）。序列親緣性分析可補強型態測量分類方法的不足，特別是應用在某些未必具有明顯特徵可資分類的病原菌或病毒株。傳統之血清型分類方法，無法有效鑑別病原體變異株之間的些微差異，病源鑑定與疾病控制上亦受限於此；透過代表性基因型或分子標記的定序與後續的序列親緣性分析，我們可瞭解不同時間與地點的採檢樣品之間的演變關係，進以掌握致病原變異與傳布的途徑。

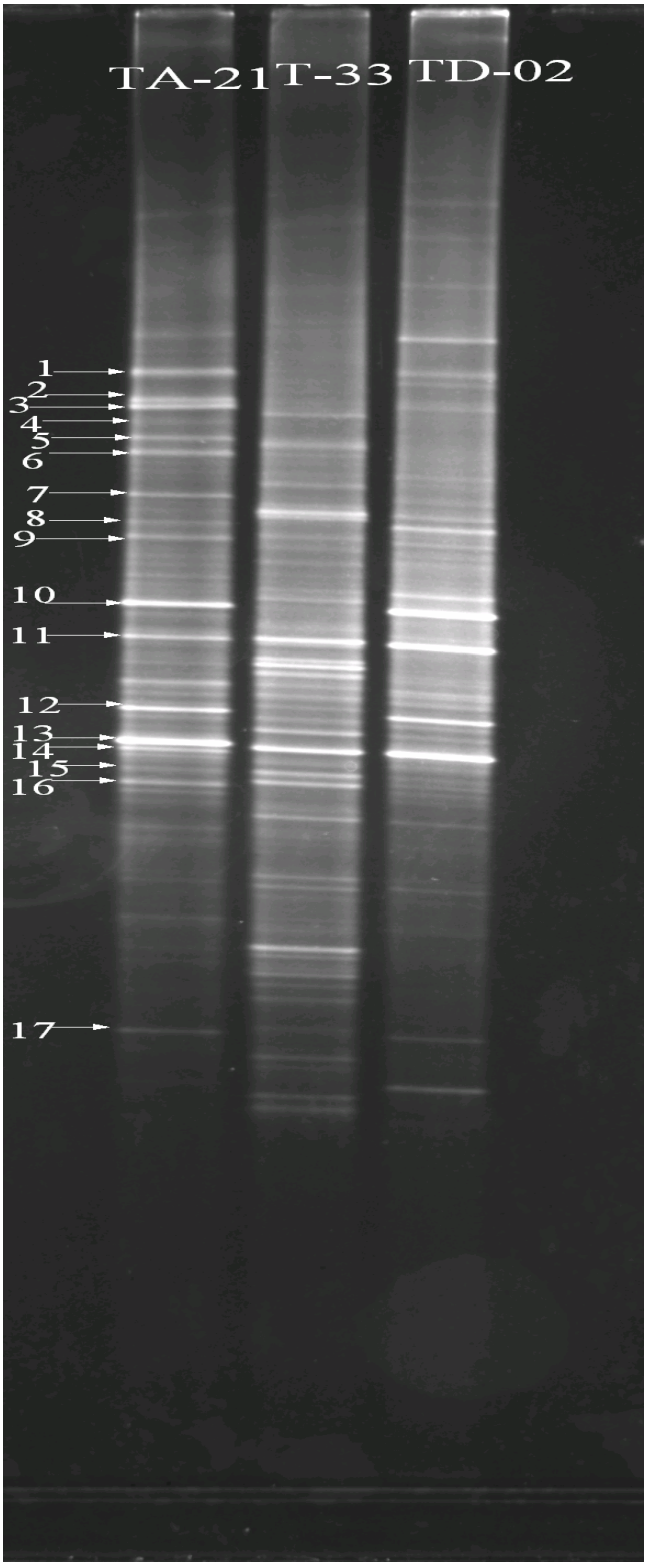
序列分析在生物資訊的研究領域中已爲相當成熟的技術，而分子演化（molecular evolution）學者們也成功地引入這些計算理論至生物巨分子序列分析上，發展出利用序列分析估算物種演化的理論。一個標準的親緣性分析包括一連串的操作階段：(1) 多序列

排比（multiple sequence alignment, MSA），(2) 親緣關係推衍（inferring on phylogenetic relationship） (3) 樹形繪製（tree building）(圖八)。每個步驟都可由個別的程式完成。

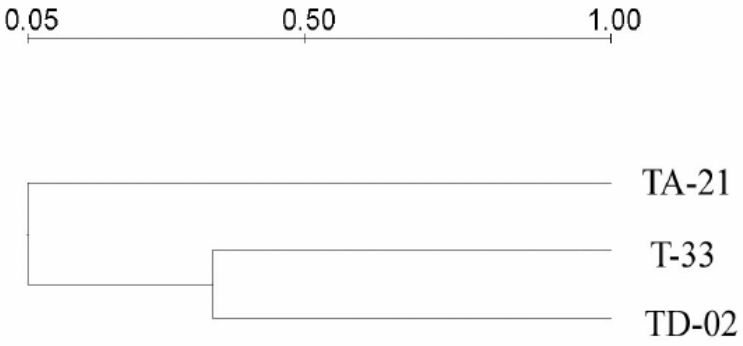
經由BLAST結果找出16S rDNA序列相似度極高的微生物，接著使用Clustal W分析軟體做多序列的資料處理，Clustal W是一個能進行DNA與蛋白質多條序列比對程式， 它可以從不同序列的比對中找出具有意義的序列，提供使用者分別以一般序列(Fasta)與比對序列(Aligned sequences) 二種方法來進行核酸或蛋白質序列親緣關係分析，.Clustal W可從多條序列中計算出最適當的比對方式，並且排列出來。使用Clustal W處理完序列後，再將多處理結果用Jukes&Cantor distances 進行物種演化距離運算模式，進行演化距離的比較，最後用PHYLIP軟體中的neighbor-joining method 進行分類，以此種生物類緣分析方式繪製演化樹(如圖十一)。



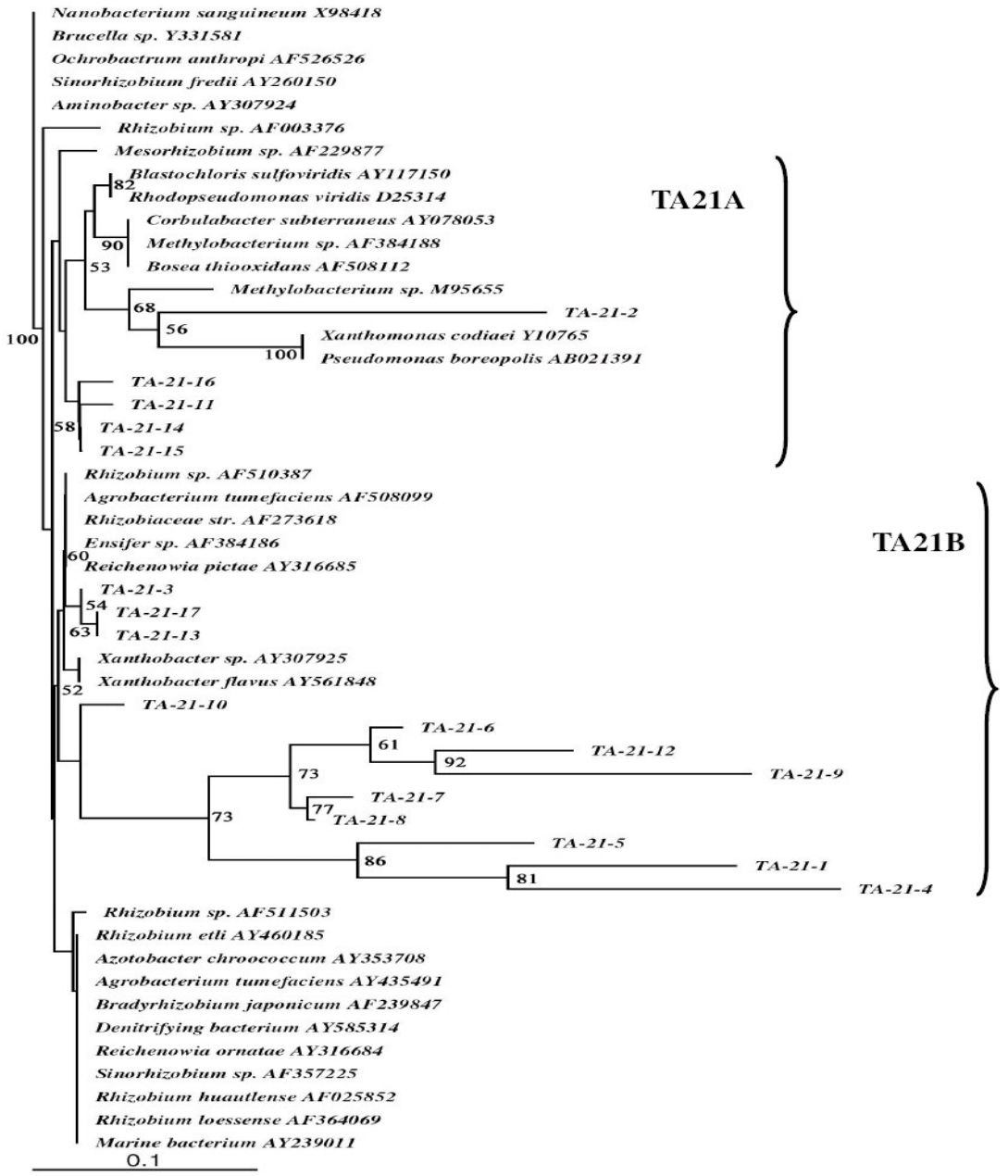
圖八：製作演化樹的流程圖（取材自：sars.nhri.org.tw/enews/enews_list_new2.php?volume_indx=119&showx=showarticle&article_indx=2938&enews_dt=2005-10-05）



圖九：污染區針對16SrDNA的V3region的DGGE電泳圖（取材自：謝昶毅，2004）
TA-21 高污染區 T-33 低污染區 TD-02 無污染背景。相隔不遠的條帶用細針加以分離，若仍是無法確實分離，可以重跑更短變性梯度的電泳，如50%至55%。



圖十：污染區DGGE電泳圖的UPGMA歸群分析結果（取材自：謝昶毅，2004）
顯示 TD-02 與 T-33 相似度較高，並且皆與 TA-21 有較大的差異。



圖十一：污染場址的 TA-21 的親緣演化樹（取材自：謝昶毅，2004）

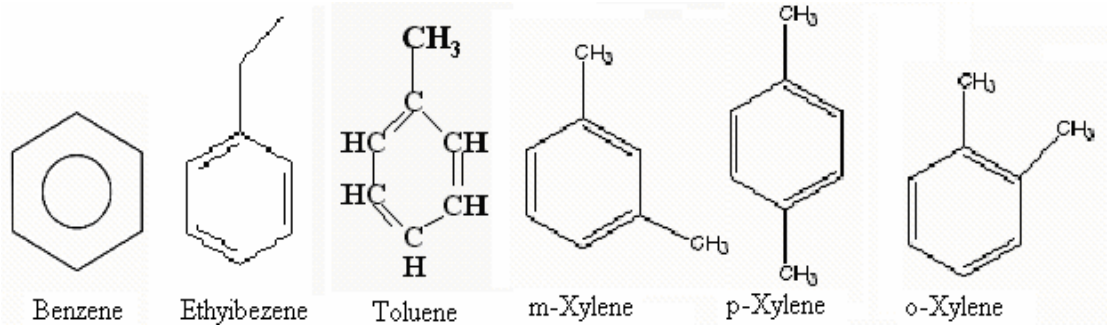
在高度污染的 TA-21的親緣演化樹，其序列代號由 TA-21-1到 TA-21-17，可觀察到所有序列與可以分解石油碳氫化合物污染物的菌屬 *Methylobacterium, Xanthobacter, Xanthomonas*與*Pseudomonas*，在演化上關係非常相近，藉TA-21親緣演化樹中所定序的序列，作爲主軸而進行分析，可以將序列與類緣微生物區分爲兩個群體，以TA-21-2、TA-21-11、TA-21-14、TA-21-15、TA-21-16爲主體的一大類群，將之稱爲TA21A類群。另外其餘序列爲主體的類群，將之稱爲TA21B類群。

第三章 石油污染的介紹及整治過程中DGGE在監測上的運用

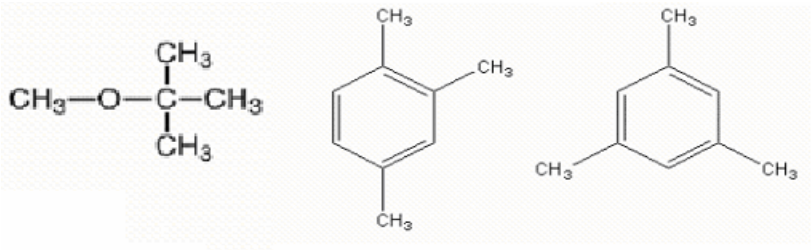
石油是現今最重要的能源，但是石油的儲存、運輸及開採的意外事件皆會造成環境的污染。在石油的儲存方面，台灣即曾發生過因油品貯存槽滲漏或地面操作不慎所產生的污染問題，如1997年4月桃園縣蘆竹鄉的漏油事件。在石油開採及運輸方面，雖然近海石油的開採和頻繁的海上石油運輸帶來了巨大的經濟效益，但是也對海洋環境造成極大的威脅，海洋石油洩漏事件每年都有發生，僅從1970到1990年，發生的油輪事故就多達1000起，每年排入海洋的石油有1000萬到1500萬噸。(http:// www.people.com.cn/BIG5 /huanbao/ 41909/42116/3135748.html)因爲石油是由碳氫化合物所組成，並且微生物可以分解利用碳氫化合物，所以石油污染的整治經常使用生物復育，但是隨著環境組成的不同，生物復育的效果亦會有所不同。DGGE是一套良好的監測及追蹤系統，可以觀察污染場址的微生物菌相的變化，所以經常用來評估生物復育的效果。

1. 石油污染物的介紹

石油中的有毒物質包含了BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene) （圖十二）、MTBE(methyl *tert*-butyl ether)、TMB(1,2,4-trimethylbenzene及1,3,5-trimethybenzene) （圖十三），這些均爲爲油品添加劑，並且都會對人體造成嚴重的傷害。此外，石油污染物還包括了總碳氫化合物（TPH, total petroleumhydrocarbon)。



圖十二：BTEX的結構式



圖十三：MTBE及TMB的結構式

1.1 關於BTEX

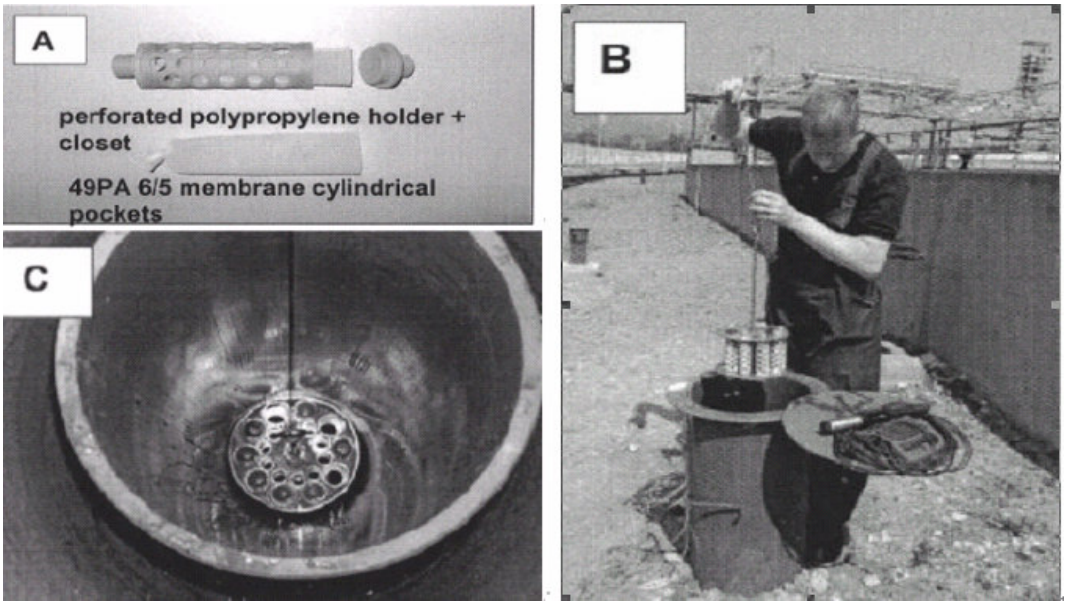
BTEX在各種燃油及民生用油中占有相當的比例，當油品洩漏時，因爲BTEX有較高的溶解性及移動性，容易藉由吸附及毛細作用而長時間滯留在油管或油槽附近的淺層土壤中。長時間洩漏時，污染物會橫向擴散及往下擴散，吸附於土壤中或進入地下水層，威脅到地下水的品質與安全性，直接威脅人體健康。通常受到污染的區域會使用自然衰減法，讓BTEX自然降解，或是添加菌種幫助BTEX的降解。

Organism	Hydrocarbon(s) used	Reference
Anoxygenic photoheterotrophic bacterium		
Blastochloris sulfoviridis ToP1	Toluene	685
Denitrifying bacteria		
Azoarcus sp. strain EB1	Ethylbenzene	38
Azoarcus sp. strain T	Toluene, *m*-xylene	152
Azoarcus tolulyticus Td15	Toluene, *m*-xylene	204
Azoarcus tolulyticus To14	Toluene	690
Dechloromonas sp. strain JJ	Benzene, toluene	125
Dechloromonas sp. strain RCB	Benzene, toluene	125
Pseudomonas sp. strain NAP-3	Naphthalene	517
Strain EbN1	Ethylbenzene, toluene	495
Strain HdN1	C_{14}–C_{20} alkanes	168
Strain HxN1	C_6–C_8 alkanes	168
Strain M3	Toluene, *m*-xylene	256
Strain mXyN1	Toluene, *m*-xylene	495
Strain OcN1	C_8–C_{12} alkanes	168
Strain PbN1	Ethylbenzene, propylbenzene	495
Strain pCyN1	*p*-Cymene, toluene, *p*-ethyltoluene	238
Strain pCyN2	*p*-Cymene	239
Strain T3	Toluene	256
Strain ToN1	Toluene	495
Thauera aromatica K172	Toluene	16
Thauera aromatica T1	Toluene	181
Vibrio sp. strain NAP-4	Naphthalene	517
Fe(III)-reducing bacteria		
Geobacter grbiciae TACP-2^T	Toluene	123
Geobacter grbiciae TACP-5	Toluene	123
Geobacter metallireducens GS15	Toluene	391
Sulfate-reducing bacteria		
Desulfobacula toluolica To12	Toluene	497
Desulfobacterium cetonicum	Toluene	238
Strain AK-01	C_{13}–C_{18} alkanes	574
Strain Hxd3	C_{12}–C_{20} alkanes, 1-hexadecene	4
Strain mXyS1	Toluene, *m*-xylene, *m*-ethyltoluene, *m*-cymene	238
Strain NaphS2	Naphthalene	208
Strain oXyS1	Toluene *o*-xylene, *o*-ethyltoluene	238
Strain Pnd3	C_{14}–C_{17} alkanes, 1-hexadecene	4
Strain PRTOL1	Toluene	54
Strain TD3	C_6–C_{16} alkanes	531

表二：石油碳氫化合物的降解菌株（取材自：Jonathan et al., 2003）

表二包含了降解BTEX的菌株。已知可以分解BTEX的菌種包括 *Microbacterium*、*Azoarcus*、*Mycobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Pseudomonas*、*Geobacter*、*Thauera*、*Dechloromonas*、*Acinetobacter*、*Methylosinus*、*Nocardia* 、*Methanogens*、*Bacillus*、*Cunninghamella*、*Achromobacter* 等(Cavalca et al., 2004，Wiedemeier et al., 1999，Jonathan et al., 2003)。

BTEX通常是地下水的主要污染源，在原處進行生物降解的處理方式，越來越被認定是處理BTEX汙染源的方法。微生物無論在有氧或厭氧的情況都可以降解BTEX，並且這種技術已被公認是可行的(Gallego et al., 2001.)。在污染處使用的生物降解包括自然衰減及活化的生物降解。自然衰減沒有使用人爲方法去減少汙染物的毒性，和干預其生物過程。活化的生物降解，包括添加營養素刺激原有的微生物。這兩種處理方法的比較，有助於我們瞭解原有微生物菌相在自然環境和人爲處理下的變化。我們可以使用定點 mesocosm 系統及DGGE分析方法，來監測蓄水層的微生物在被汙染蓄水層的菌相變化(Hendrickx et al., 2005)。mesocosm系統包括裝滿未污染蓄水層物質的通透膜袋(membrane pocket)，通透膜袋則放置在聚丙烯管柱(polypropylene holder)內。接著將mesocosms系統放入地下井中，以便進行監測(圖十四)。



圖十四：定點 mesocosm 系統的設置。(A). membrane pocke放入聚丙烯管柱內。(B).將mesocosms系統放入地下井。(C).進行監測。

定點mesocosm 系統主要是爲了監測蓄水層的細菌菌相在接觸到受BTEX汙染的地下水所產生的反應。研究人員觀察到在汙染區域裡，細菌菌相迅速變成一個穩定的菌相，與相鄰蓄水層的菌相相同，但不同於未汙染的區域。在汙染地點，細菌以tmoA- 和 *xylM/xylE1*-like BTEX分解的基因型在蓄水層生長，但在未汙染的地點只有偵測到類似tmoA基因型的存在。在汙染區域的mesocosms 和在地下井附近的蓄水層菌相主要包括了 *Proteobacteria* 。在未汙染地點，則發現了*Actinobacteria*和*Proteobacteria*。研究結果顯示：（1）細菌菌相以長期穩定的結構隨著污染源迅速地生長在污染的下遊區域。（2）新的菌相結構在增長時期維持穩定。（3）*Pseudomonas*是生長族群的主要族群。（4）絕對厭氧菌並不是優勢菌種，如硫還原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)。（5）BTEX catabolic 基因型的變動反應了菌相結構的變動。

1.2 關於MTBE

與MTBE相關的地下水、表層水和飲用水的污染問題，在過去十年逐漸嚴重。MTBE被廣泛使用作燃料添加劑，主要是爲了符合1990年的空氣清潔法案的要求。美國的MTBE產量在1994年估計了有六十二億公斤，在1995年爲二十一億公斤，是生產量第二大的有機化學製品。由於汽油的溢出，MTBE成爲在地下水裡的主要汙染物之一，這樣普遍污染的原因是由於MTBE是極性分子，是汽油中最極性的組成成分，因此非常容易溶於水中。美國環境保護處(EPA)建議在今後幾年逐步淘汰MTBE，但是MTBE仍會在環境裡存在一段時間。

從上述的情況看來，有效的復育方法及其開發是十分重要的。如果生物復育能被開發成有效的降解技術，會是一個能夠保證效果的方法，將可以從地下水中將MTBE移除。已知可能降解MTBE的微生物有下列幾屬：*Rubrivivax, Mesphilicum, Rhodococcus, Graphium, Alcaligenes, Xanthobacter, Xanothomas, Pseudomonas, Mycobacterium, Hydrogenophage, Methylobacterium, Austroafricanum*，這些微生物能將MTBE完全代謝分解或轉換成無毒物質(Deeb et al., 2000; Prince et al., 2000; Fiorenza et al., 2003)。

MTBE是普遍的地下水汙染物，一般的技術並不能有效處理。雖然已有文獻指出微生物能降解或共代謝MTBE，但是對於微生物降解MTBE的現場研究卻不多。有文獻指出，在污染場址取得能降解MTBE的DNA序列，與已知的菌株PM1幾乎相同(99% 同源)，菌株PM1來自南加利福尼亞的生物濾床(biofilter)，是在被MTBE汙染的某空軍基地的蓄水層所自然產生的。研究結果證明，原始的微生物菌相在有氧和厭氧情況下皆能降解地下水中的MTBE(Hristova et al., 2003)。另外，有研究對降解MTBE的反應器中的菌相進行定序，發現大多數菌種屬於 Cytophaga Flexibacter Bacterioides (C-F-B) 門(Pruden et al., 2001.)。MTBE的降解還有許多待研究的地方，如何快速又有效的降解MTBE是未來研究的主要目標，以便使受污染的地下水恢復原有面貌，讓我們可以安心的使用水資源。

1.3 關於TMB

.TMB是指1,2,4-trimethylbenzene及1,3,5-trimethybenzene，是油品的添加劑。在TMB的生物降解方面，已知 *Pseudomonas putida putida*及類*P. putida mt-2* (PaWl)，都有能力降解1,2,4 -TMB（Bestetti G and Galli E. 1987.）。根據文獻指出在還原N_2.O的情況下，從柴油燃料汙染的蓄水層取得的微生物能在有1,3,5-TMB及1,2,4-TMB的情況下生長（Haner et al., 1997）。1,3,5-TMB氧化成二氧化碳的反應伴隨著N_2O的還原。N_2O被用來避免在生長期間以NO_3^-作爲電子接受者，因而造成NO_2^-儲積產生毒性作用。

1.4 關於TPH

總碳氫化合物(total petroleumhydrocarbon)簡稱TPH。可以降解TPH的微生物，稱爲hydrocarbon degrading bacteria，根據前人研究，可能有下列幾屬能降解TPH：(1)分解長碳氫鏈的菌屬：*Candida, Brevibacterium, Flavobacterium, Pseudomonas*(Cavalca et al., 2000; Cassidy et al., 2001)。(2)降解芳香族碳氫化合物：*Pseudomonas, Burkholderia, Nocardiodes, Rhodococcus,Mycobacterium, Sphingomonas* (Jonathan et al., 2003)。表二列出能降解芳香族碳氫化合物的微生物基因型及其蛋白質功用。

表二：降解芳香族碳氢化合物基因及其蛋白質功用（取材自：Jonathan et al., 2003）

Strain	Location	Substrate	Gene	Encoded protein or function	Reference
Pseudomonas putida strains	Plasmid	Naphthalene (upper pathway)	*nahAa*	Reductase	568
			nahAb	Ferredoxin	679
			nahAc	Iron sulfur protein large subunit	485
			nahAd	Iron sulfur protein small subunit	
			nahB	*cis*-Naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	
			nahF	Salicyaldehyde dehydrogenase	
			nahC	1,2-Dihydroxynaphthalene oxygenase	
			nahE	2-Hydroxybenzalpyruvate aldolase	
			nahD	2-Hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	
		Salicylate (lower pathway)	*nahG*	Salicylate hydroxylase	
			nahT	Chloroplast-type ferredoxin	
			nahH	Catechol oxygenase	
			nahI	2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	
			nahN	2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	
			nahL	2-Oxo-4-pentenoate hydratase	
			nahO	4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase	
			nahM	Acetaldehyde dehydrogenase	
			nahK	4-Oxalocrotonate decarboxylase	
			nahJ	2-Hydroxymuconate tautomerase	
		Regulator for both operons	*nahR*	Induced by salicylate	547
Pseudomonas putida NCIB9816	Plasmid	Naphthalene	*ndoA*	Naphthalene-dioxygenase genes (these 3 genes correspond to NahAb,-c, and-d listed above)	355
			ndoB		
			ndoC		
Pseudomonas sp. strain C18	Plasmid	Dibenzothiophene Naphthalene phenanthrene	*doxA*	Naphthalene dioxygenase	148
			doxB	DoxA, -B, -D correspond to NahAb, -c, and-d listed above	
			doxD		
			doxE	*cis*-Naphthalene dihydrodiol dioxygenase	
			doxF	Salicylaldehyde dehydrogenase	
			doxG	1,2-Dihydroxynaphthalene dioxygenase	
			doxH	Isomerase (interchangeable with *doxJ*?)	
			doxI	Hydratase-aldolase	
			doxJ	Isomerase	
Pseudomonas sp. strain U2	Plasmid	Naphthalene	*nagAa*	Ferredoxin reductase	205
			nagG	Subunit of salicylate 5-hydroxylase with Rieske-type iron-sulfur centre	
			nagH	Subunit of salicylate 5-hydroxylase	
			nagAb	Ferredoxin	
			nagAc	Large dioxygenase subunit	
			nagAd	Small dioxygenase subunit	
			nagB	Naphthalene *cis*-dihydrodiol dehydrogenase	
			nagF	Salicylaldehyde dehydrogenase	
Burkholderia sp. strain RP007	Plasmid	Naphthalene phenanthrene	*phnR*	Regulatory	364
			phnS	Regulatory	
			phnF	Aldehyde dehydrogenase	
			phnE	Hydratase-aldolase	
			phnC	Extradiol dioxygenase	
			phnD	Isomerase	

			phnAc	Large dioxygenase subunit (Rieske-type [2Fe-2S]	
			phnAd	Small dioxygenase subunit	
			phnB	Dihydrodiol dehydrogenase	
Pseudomonas putida OUS82	Chromosome	Naphthalene Phenanthrene A variety of homo-hetero-, and monocyclics converted to phenols	*pahAa*	Ferredoxin reductase	333
			pahAb	Ferridoxin	601
			pahAc	Large subunit of iron-sulfur protein	
			pahAd	Small subunit of iron-sulfur protein	
			pahB	*cis*-Dihydrodiol dehydrogenase	
			pahC	Dioxygenase	
			pahD	Isomerase	
			pahE	Hydratase-aldolase	
			pahF	Dehydrogenase	
Pseudomonas stutzeri AN10	Chromosome	Naphthalene 2-Methylnaphthalene	*nahG*	Salicylate 1-hydroxylase	63
			nahW	Salicylate 1-hydroxylase (outside *meta*-cleavage transcriptional unit)	
Nocardiodes sp. strain KP7	Chromosome	Phenanthrene	*phdA*	Alpha subunit of dioxygenase	533
			phdB	Beta subunit of dioxygenase	
			phdC	Ferredoxin	
			phdD	Ferredoxin reductase	
			phdK	2-Carboxybenzaldehyde dehydrogenase	
Rhodococcus sp. strain 124	Chromosome	Naphthalene Toluene Indene	*nidA*	Naphthalene-inducible dioxygenase system	615
			nidB	Dioxygenase small subunit	
			nidC	*cis*-Dihydrodiol dehydrogenase	
			nidD	Putative aldolase	
Mycobacterium sp. strain PYR-1	Chromosome	Anthracene, Phenanthrene Fluoranthene Pyrene, benzo [a]pyrene, 1-nitropyrene	*nidD*	Aldehyde dehydrogenase	318
			nidB	Small subunit of dioxygenase	
			nidA	Large subunit of dioxygenase	
Sphingomonas paucimobilis var. EPA505		Phenanthrene Anthracene, benzo[b]fluoranthene Naphthalene Fluroanthene, pyrene Intermediate catabolites	*pbhA*	Ring fission dioxygenase	587
			pbhB	Rieske-type ferridoxin subunit of multicomponent dioxygenase	
			pbhC	Hydratase-aldolase	
			pbhD	Pyruvate phosphate dikinase	

1.5 石油降解的相關因子

石油是複雜的混合物，由碳氫化合物和其它有機化合物所形成，這些基質提供微生物成長所需的營養，碳氫化合物則是微生物代謝的標的及產物。已知影響生物降解石油的因子，包括有營養素、油的物理狀態、氧氣、溫度、鹽分和壓力等等。

在營養素方面，氮的來源是很重要的。在開放式系統下，如湖、海洋、和荒原等，石油污染物的生物降解受限於氮的來源，這個限制條件可能可以使用尿酸加以克服(Omry et al., 2003.)。因爲石油中包含極少量的氮，所需要的氮必須來自周圍的環境。在實驗室裡，碳氫化合物的氧化需要氮的幫助，氮的來源來自氨鹽基或硝酸鹽離子的尿素或鹽。但是，這些氮源具有高水溶性，所以會迅速稀釋，因而降低他們在開放式系統的效率。因此，目前對於發生在海洋的石油汙染問題並沒有實際可用的微生物加以降解。根據研究顯示，在仿造的開放式系統中，尿酸可附著於原油，並且尿酸對細菌成長和石油生物降解有所幫助，尿酸或許能作爲微生物在開放式系統中所使用的氮源。

在油的物理狀態方面，微生物所要求的環境包含水，及一個油水兩相系統，來聯繫微生物和碳氫化合物，但這樣的乳化狀態不容易在具有黏性的原油中產生。這個問題也許能經由技術加以克服，對於精煉的汽油和柴油進行改造，使得這些含水碳氫化合物更容易形成乳化狀態 (Jonathan et al., 2003.) 。

2. 應用DGGE監測石油污染整治的過程

DGGE經常使用來監測石油污染的整治過程，主要原因是這項技術快速又有效率，能夠迅速偵測菌相的變化，並且能針對特定菌種加以定序鑑定。根據樣品的不同，可分爲土壤污染及水污染，，兩者在實驗步驟上的差異，只在於DNA萃取方法的不同。我們可利用DICE相似度演算公式計算兩兩樣本間的相似度S_{AB}，建立相似度的矩陣S_{DAB}。接著再以UPGMA (unweighted pair-group mean analysis)進行歸群分析，並且繪製成樹狀圖，判斷

樣品之間的相似性。如果是採用同地點但不同時間的土壤或水，則可監測菌相的變化及復育的效果，也可切下特定條帶加以定序，繪製出演化樹狀圖。

以下是文獻中使用DGGE監測石油污染的實例。一個是使用DGGE監測受石油污染的海洋環境的整治工作，一個則是使用DGGE觀察真菌對石油污染整治的影響。

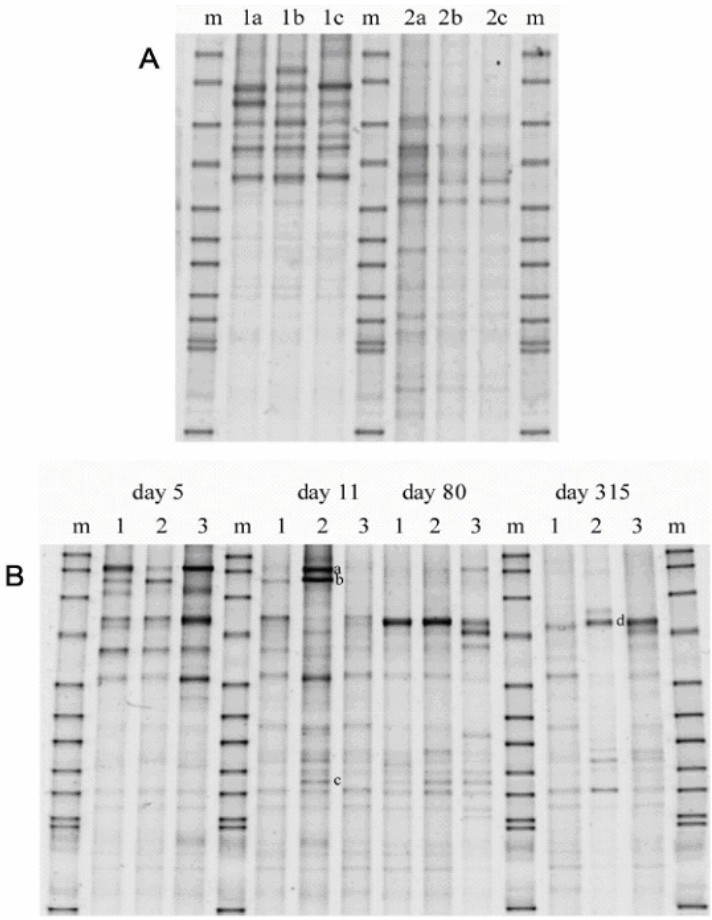
2.1.使用DGGE監測受石油污染的海洋環境的整治工作

由於海洋細菌普遍能降解原油中的碳氫化合物，並且生物復育被證明能有效清除各種沿海環境裡的殘餘油品，如發生在岩岸或沙灘等的污染。由於原油含有豐富的碳源和其它營養素，微生物可以利用污染海岸的原油加以生長。一般處理方法是增加能降解碳氫化合物的細菌，並且刺激細菌去降解原油。許多實驗在不同的環境下觀察石油污染整治的過程，觀察的規模也有大小上的區別。

研究人員以現場試驗階段規模(field-scale)的標準來進行實驗，研究受原油污染的海岸線在將近一年中的生物降解情形(Wilfred et al., 2004.)。針對三個不同的區域使用以下四種處理方式，其中包含了兩個控制組，處理方式如下：(1)每週供應液態肥料。(2)使用緩慢釋放的肥料。(3)不添加原油及肥料。(4)添加原油但不添加肥料。使用化學方法和觀察二氧化碳產量的變化，來監測原油污染的降解情形。在添加肥料的油品中有顯著的生物降解情形，但化學分析並不能顯示二種使用不同肥料的差異，雖然使用緩慢釋放肥料的油品，在實驗的第一個14天中有明顯較高的二氧化碳產量。

研究人員除了使用上述方法來進行監測外，同時使用了DGGE技術來分析原油降解實驗中的微生物菌相(圖十五)，並且計算不同樣品間的相似性，以及對相似性矩陣進行統計分析，相似性的計算是使用條帶存在與否的數據 (Dice coefficient)，或是依據樣品所有條帶的密度 (Pearson coefficient)，當相似性越高即表示其變化並不明顯，相反的，樣品相似性越低即表示其變化較爲明顯（表四）。這些分析顯示，不論具有原油的樣品是否添加

肥料，樣品均有降解碳氫化合物的情形，而且他們的細菌菌相與未使用原油的對照組沒有顯著的不同，但是這些對照組的菌相沒有隨著時間而改變，相反的，使用緩慢釋放肥料的細菌菌相則隨著時間而有所變化。這大概是因爲緩慢釋放肥料在細胞間的水中具有高營養素濃度。研究結果顯示，細菌的16S rRNA 序列主要與 *Alcanivorax borkumensis* 和 *Pseudomonas stutzeri* 序列相關(99.7%)，他們控制了以緩慢釋放肥料處理的油品的降解初期階段。



圖十五：受石油污染的海洋環境的DGGE電泳圖(取材自：Wilfred et al., 2004.)
電泳圖依據 Dice coefficient 或是Pearson coefficient加以分析，顯示菌相的相似程度，相似程度越低表示其變化越大，相似程度越高表示其變化越小。(A) Lanes 1a to 1c 表示使用液態肥料的菌相變化，由於相似程度極低，顯示其變化明顯。Lanes 2a to 2c 則沒有使用肥料，任其自然衰減，相似程度極高，顯示其菌相變化並不明顯。m代表marker。由此可推測液態肥料的添加有助於生物復育。(B) 對使用緩釋肥料的樣品進行比較。上面的數字表示污染物的來源，並且顯示處理的天數。由此可推測緩釋肥料的添加有助於生物復育。

Time (days)[b]	Similarity coefficient	UC	OC	LF, block 1	LF, block 2	LF, block 3	SR, block 1	SR, block 2	SR, block 3
−5	Dice	a	ND[d]	ND	ND	ND	a	a	a
	Pearson	a	ND	ND	ND	ND	a	a	a
−3	Dice	a	ND	ND	ND	ND	a	a	a
	Pearson	a	ND	ND	ND	ND	a	a	a
1	Dice	a	a	a	a	b[e]	c	d	d[e]
	Pearson	a	a	a[e]	a	b[e]	c	bc[e]	d[e]
5	Dice	a	a	a	a	b[e]	c	d[e]	e
	Pearson	a	a	b	b	c/d/e[f]	f[e]	g	f
11	Dice	a	a	a	a	a[e]	a	b	a
	Pearson	a	a	a	a	a	a[e]	b	a
80	Dice	a	a	a	a	a	b/c/d[f]	e[e]	f/g/h[f]
	Pearson	a	a	a	a	a	b	b[e]	b/c/d[f]
315[c]	Dice	a	a	a	a	a	a	b	c
	Pearson	a	a	a	a	a	a	b	c

表四：不同處理方式的電泳圖的相似度比較(取材自：Wilfred et al., 2004.)
UC表示沒有添加石油，OC表示只添加石油，LF表示添加液體肥料及石油，SR表示添加緩釋肥料及石油。依據 Dice coefficient 或是Pearson coefficient顯示其相似程度，相似程度越低表示其變化越大，相似程度越高表示其變化越小。將菌相依相似程度分爲a、b、c、d、e、f、g、h數組。顯示未添加石油及只添加石油的菌相相似程度極高，即表示其菌相變化極小。添加液體肥料及緩釋肥料菌相相似程度較低，即表示其菌相變化較大。

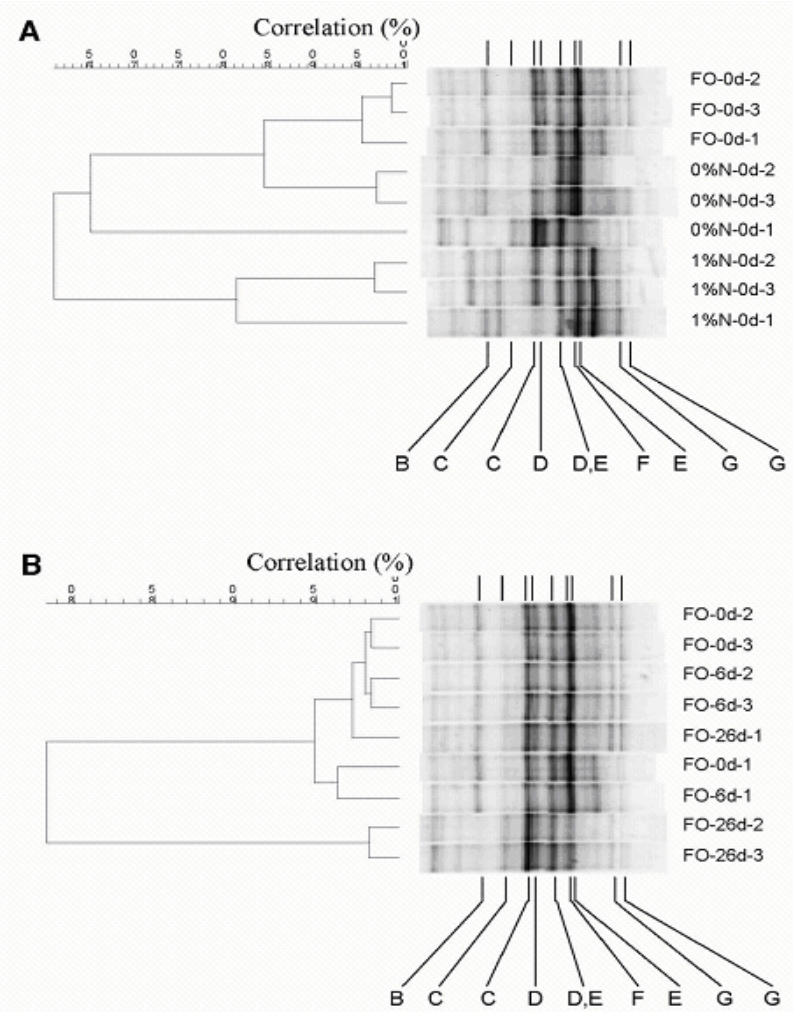
2.2. 使用DGGE觀察真菌對石油污染整治的影響

DGGE除了能對石油污染中的細菌菌相進行監測外，也有能針對石油污染整治過程中的真菌菌相進行監測(Wilfred et al., 2004.)。細菌在石油污染環境中的生物復育扮演重要的角色，然而關於真菌對石油污染所產生的反應則所知甚少。研究人員在實驗室中觀查微生物菌相與生物復育間的關係，並且觀察現址的生物復育情形。使用針對真菌的引子觀察真菌數量的變化(表五)，並且使用DGGE分析真菌菌相，接著使用UPGMA進行歸群分析，然後將之繪製成樹狀圖(圖十六)。結果顯示細菌菌相在石油污染的條件下，前26天是穩定的，相反的，在石油污染的條件下，真菌卻劇烈的減少，並且不論是否有添加營養素，想要從油品樣品中放大真菌的16S rRNA 的基因片段是不容易的，這是因爲環境中包含有能迅速降解石油的微生物，真菌無法與之競爭，所以真菌不太可能負責降解油品。

Treatment[b]	Amt of oil added (kg/m^2)	Amt of $NaNO_3^-$ added (% N [wt/wt])	Amt of $KH_2PO_4^-$ added (% P [wt/wt])	% of biodegraded oil after 26 days	Amt of CO_2 produced in 26 days (mmol)	No. of *Archaea*-positive PCRs/ no. of samples analyzed		
						Zero time	6 days	26 days
FO	0	2	0.2		26.0	3/3	3/3	3/3
0%N	3.7	0	0	5.2	25.7	3/3	0/3	1/3
1%N	3.7	1	0.1	52.8	290.0	3/3	0/3	0/3

表五：使用針對真菌的引子偵測真菌的多寡。

顯示真菌在石油存在下迅速減少，少到不容易使用PCR加以放大。表中顯示FO、0%N、1%N的成分。FO表示只添加肥料，0%N表示只添加石油，1%N表示添加石油及肥料。



圖十六： 受石油污染的真菌菌相的DGGE電泳圖的歸群分析樹狀圖(取材自：Wilfred et al., 2004.)FO表只添加肥料，0%N表只添加石油，1%N表添加石油及肥料。0d表實驗開始階段，6d表實驗進行六天，26d表進行二十六天。.圖中只顯示剛添加石油的結果，沒有顯示添加石油數天後的結果，主要原因是添加石油後真菌大量減少，無法使用PCR加以放大其基因。實驗剛開始階段，只添加肥料的組別相似度高，其次是添加石油及肥料的組別，只添加石油的組別相似度最低。實驗開始進行後，添加肥料的組別相似度仍然很高。

第四章 DGGE在毒物污染整治過程監測上的運用

隨著人類文明不斷的進展，環境污染的問題日益增多，除了前面章節提過的石油污染，還有除草劑的污染、掩埋場滲漏液的污染、氨的污染、氯化物的污染、重金屬的污染等等。爲了人類永續的發展，近年來環保議題越來越受到重視。在污染環境的生物復育上，DGGE是十分有力的工具，能夠有效監測污染整治的過程，並且能夠得到優勢菌種的相關資訊。

1. 除草劑的污染

除草劑會對環境造成重大影響，他們經常造成土壤和水源的污染。在農業領域上，所使用的 phenyl-urea 類型的除草劑爲 isoproturon (IPU)，此除草劑的化學式爲 [3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea]，它的自然降解速度非常緩慢，顯示這種化合物會在土壤中殘留極長的時間，並且會影響除草劑所涵蓋的地面和水面。依據研究結果，IPU 的快速降解與能降解 IPU 的微生物的增生有關，而 IPU 的緩慢降解若不是與降解 IPU 的微生物的生長遲緩有關，就是與微生物的共代謝有關。

在農業領域的 IPU 研究中，主要在比較不同的土壤類型中的微生物降解效果(Gary et al., 2003.)。運用培養的技術，從快速降解 IPU 的土壤中，分離出能降解 IPU 的細菌(稱做 F35)，根據部分16S rRNA的定序，此菌株屬於*Sphingomonas*。根據DGGE的分析，顯示兩個條帶在 IPU 代謝期間的強度增強，將切下的條帶加以定序，其序列高度相似於 *Sphingomonas* 的序列。當沒有 F35 存在的時候，DGGE的優勢的條帶爲 *Sphingomonas* 中的一株(稱做SRS2)，但是SRS2並不容易分離培養。實驗顯示，SRS2 和 F35 能在土壤和流體環境下降解 IPU，兩者都要求精確的酸鹼度(pH 7到7.5)。對酸鹼度的要求說明了 IPU 降解速率在不同地區的差異，正是因爲不同的土壤酸鹼度造成不同的降解速率。

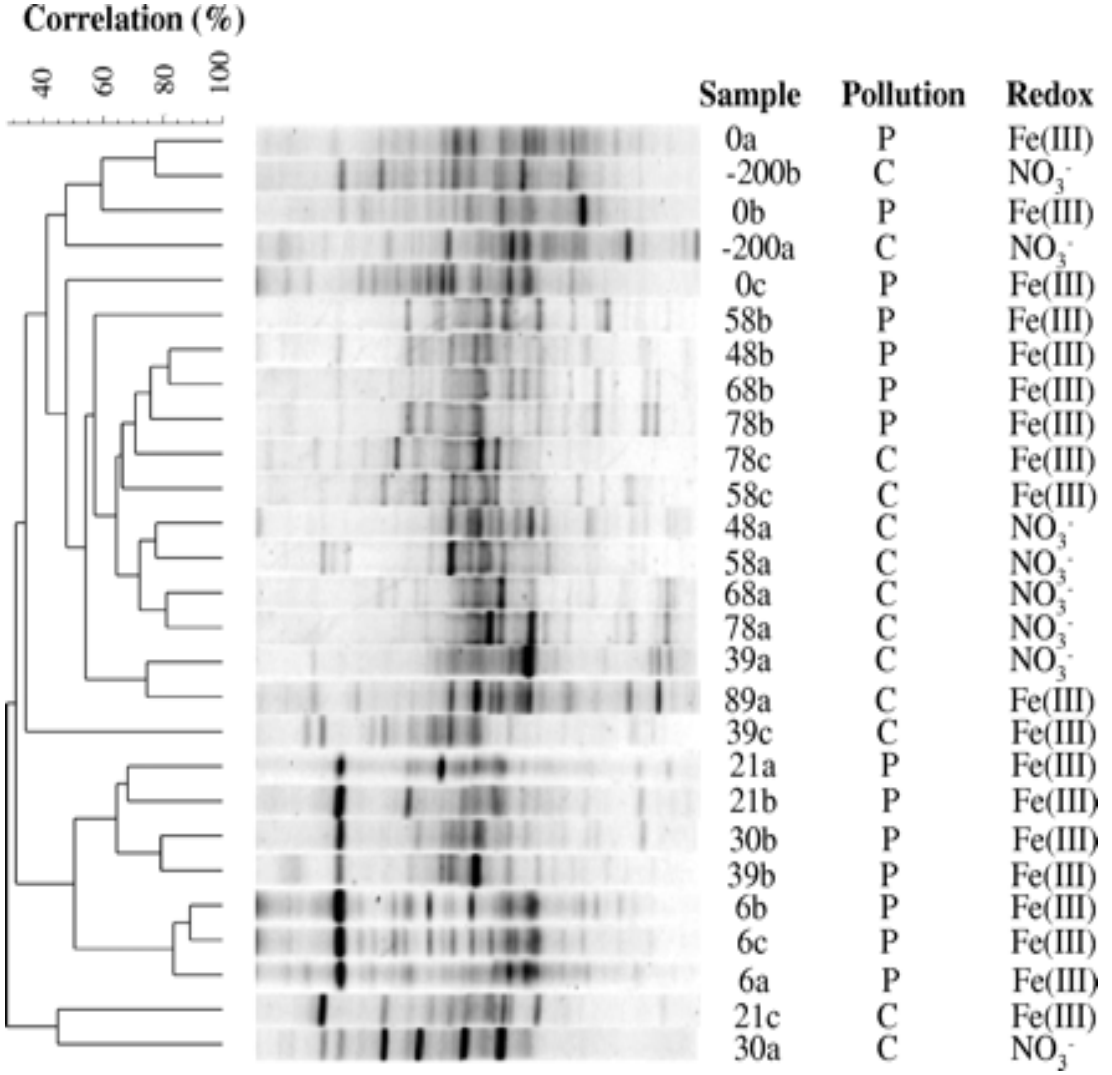
2. 掩埋場的滲漏液污染

垃圾處理有許多方式，掩埋場則是其中的一種，但是所產生的滲漏液卻可能對環境造成污染。研究人員檢視了被垃圾掩埋場滲漏液所污染的蓄水層，研究其中的微生物菌相與滲漏液降解過程的關係，以便發展做爲預測和監測自然降解的工具。有些研究是使用DGGE調查污染源及其上下游的優勢菌種，有些則是針對與污染物降解相關的特定菌種的分佈進行調查，有些則使用DGGE來判斷對於掩埋場滲漏液的處理是否得當。

研究人員使用DGGE分析了垃圾掩埋場及其附近的地下水樣品，所得結果顯示，污染區的微生物菌相與非污染區的微生物菌相有明顯的差異。掩埋場上游的優勢菌種屬於β-proteobacteria，掩埋場中的地下水的優勢菌種主要是革蘭氏陽性菌，更下游的地方，革蘭氏陽性菌減少，並且 δ-proteobacteria顯著增加，而且再次發現屬於β-proteobacteria的菌種，但是在下游發現的 β- proteobacteria (*Acidovorax, Rhodoferax*)不同於在上游發現的菌種 (*Gallionella, Azoarcus*) (Wilfred et al., 2001.)。

污染地區會因爲有機物的降解，導致氧氣和硝酸鹽迅速減少，最後鐵還原反應會成爲主要的反應。在被掩埋場滲漏液污染的蓄水層，有機污染物的降解往往伴隨著鐵還原反應。*Geobacteraceae*在垃圾掩埋場的滲漏液的微生物菌相佔有相當的比例，在可計數的細菌中佔有25%，並且*Geobacteraceae*與苯的降解有關。尤其值得注意的是，*Geobacteraceae* 是唯一已知能夠降解芳香族碳氫化合物，並且進行鐵還原反應的細菌，*Geobacteraceae*透過這些作用改變細菌生長的環境，進而對細菌菌相產生影響。根據以上的因素，研究人員認爲*Geobacteraceae*能對垃圾掩埋場掩埋場的滲漏液的許多有機化合物進行生物降解，並且進一步調查在掩埋場的 *Geobacteraceae* 的菌相結構、污染程度和生物降解之間的關係。經由DGGE分析及定序後，顯示*Geobacteraceae*的高多樣性，並且在污染地區的菌相

結構，與未受汙染的菌相顯著不同。這顯示經過汙染後，存在具有優勢的特定*Geobacteraceae*菌株（Lin et al., 2005.）。經由DGGE電泳圖的歸群分析（圖十七）顯示，同樣來自垃圾掩埋場附近的地下水有相似的族群，並且被污染的地下水與下游的低污染區的菌相不同。有幾條DGGE條帶能夠代表污染的程度，其中包括了能表示受到污染的條帶，這些條帶在垃圾掩埋場附近的地下水樣品中佔有優勢地位。



圖十七：垃圾掩埋場的的DGGE電泳圖的歸群分析樹狀圖（取材自：Lin et al., 2005.）
P表示受到污染，C表示未受污染，redox欄表示佔優勢的氧化還原反應。根據DGGE外形的整體密度曲線和使用Pearson相關系數加以分析。結果顯示來自相似的氧化還原狀態及污染程度的地點的樣品具有低相似性，只有來自掩埋場附近(在掩埋場下流 6 到 39公尺處)的污染地點的鐵還原反應樣品的相似性接近50%。

除了對現址的微生物菌相分析，DGGE也可以用來檢測處理污染物的設備。研究人員爲

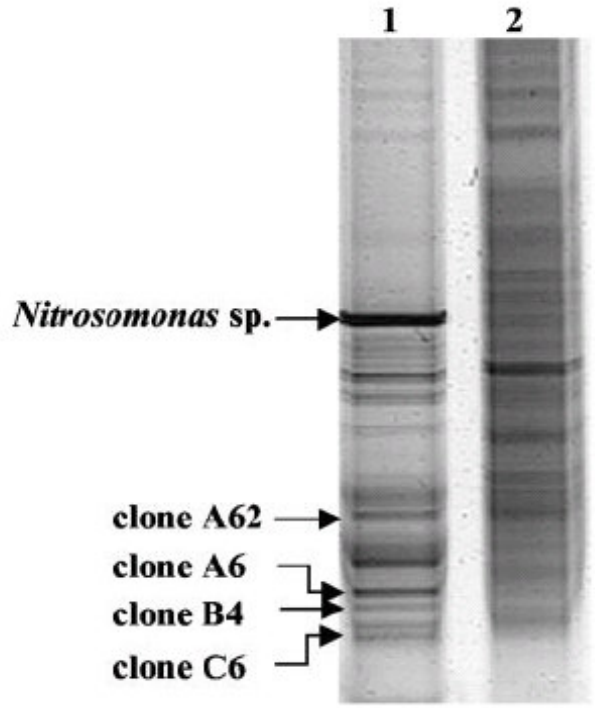
了判斷對於高氨垃圾掩埋場滲漏液的處理是否得適當，使用DGGE來分析和比較在實驗進行過程中反應器的微生物圖譜。滲漏液的處理過程中使用了厭氧過濾器、污泥處理器和雜交反應器。經由DGGE分析顯示，所有反應器裡都包含乙酸分解甲烷生成菌(acetoclastic Methanosaeta)，並且就長期來看處理流程並不會對微生物的多樣性造成太大的影響（Calli et al., 2006）。

由以上研究我們可以知道，DGGE大大幫助我們了解滲漏液與微生物菌相的關係，並且能用來監測復育的效果以及評估處理方法的優劣。

3. 氨的污染

氨氧化作用可分爲在有氧情況下及在厭氧情況下進行，厭氧氨氧化作用（anaerobic ammonia oxidation，anammox）是一個最近發現的微生物氮循環路徑，此作用能在缺氧情況下，將銨離子(NH_4^+)用亞硝酸根(NO_2^-)氧化爲氮氣，在過程中以羥胺和肼作爲代謝過程的中間體。某些細菌能進行厭氧氨氧化作用，但至今未能成功分離出純化菌株，因此尚未獲得正式的命名和分類，它們對全球氮循環具有重要意義，也是污水處理過程中重要的細菌，了解這些細菌在環境裡的活動、變化和分佈，有助於我們解決氨污染的問題。

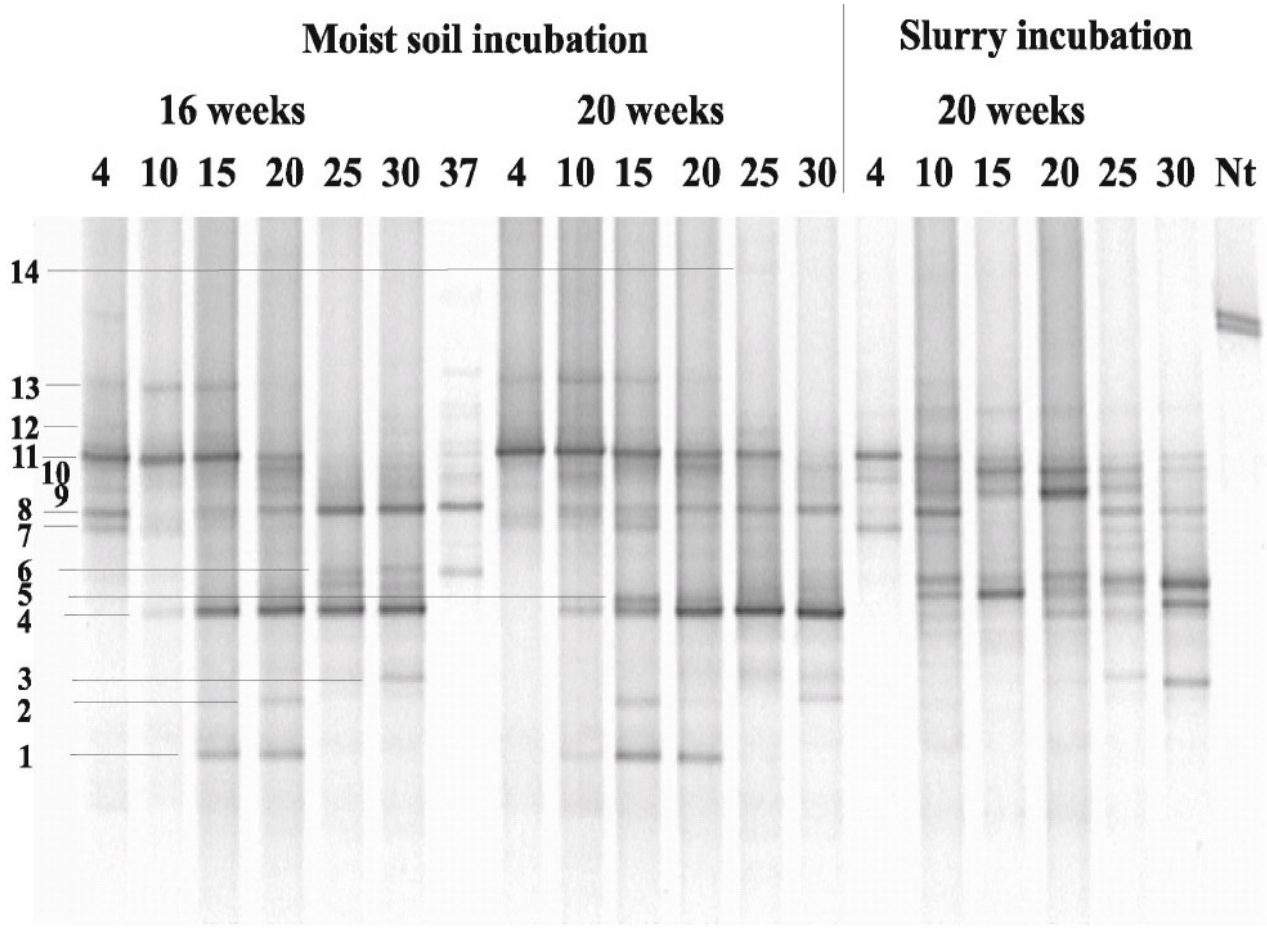
研究人員在某港口內沉積樣品中測得厭氧氨氧化作用的活動，經由^{15}N加以進行追蹤及分析，並且使用針對厭氧氨氧化菌所設計的特定引子，進行DGGE及定序分析，研究結果發現四個新的能進行厭氧氨氧化的細菌序列(圖十八)，這些序列的其中三個形成新的分支（Yossi et al., 2005.）。使用針對厭氧氨氧化菌設計的探針，並進行螢光定位雜交(FISH)，證明港口沉積物中具有能行厭氧氨氧化作用細菌。根據結果顯示，這些微生物在這個港灣環境的氮氣循環中扮演重要的角色。



圖十八：DGGE分析及定序結果顯示四個新的序列（取材自：Yossi et al., 2005.）
Lane 1 表示從添加氨和亞硝酸鹽後的沈積樣品所萃取的 DNA，Lane 2 表示從尚未添加氨和亞硝酸鹽的沈積樣品所萃取的 DNA。可以觀察到添加氨和亞硝酸鹽對菌相產生的影響。Lane 1 顯示四個新的能行厭氧氨氧化序列。

除了針對厭氧氨氧化作用進行研究外，不少研究則是針對一般氨氧化作用進行調查。有文獻調查了在三種不同土壤的條件下，氨氧化細菌菌相與溫度的關係 (Sharon et al., 2003) 。三種土壤分別是OMS土壤、GMS土壤和KMS土壤。OMS土壤和GMS土壤來自於低年均溫的德國某地，其酸鹼度是酸性的。KMS土壤來自於高年均溫的以色列某地，屬於輕微鹼性。OMS土壤、GMS土壤和KMS土壤又可分爲潮濕土壤及泥漿，並且以不同的溫度處理。爲了調查氨氧化菌種的菌相，研究人員針對amoA 基因設計引子，因爲amoA 基因帶有氨單加氧酶(ammonia monooxygenase) 的 α subunit 的密碼，接著進行PCR-DGGE分析，並且加以定序。研究結果顯示，所有帶有amoA 基因序列的菌種都屬於 *Nitrosospira*，並且無論是在潮濕的土壤或是在泥漿上，溫度都會影響細菌菌相(圖十九)。菌相的改變有兩種情形，一種是在不同的*Nitrosospira* 群組之間變動，發生在潮濕土壤和GMS 和OMS 的泥漿中，*Nitrosospira AmoA* 群1 主要是發現在30℃ 之下，*Nitrosospira*

群4主要發現在25℃的時候，*Nitrosospira* 群3a、3b和9主要發現在30℃的時候。第二種菌相改變的情形在發生KMS土壤，其菌相變化只發生在唯一的*Nitrosospira* 群組內，雖然KMS土壤的以不同的溫度處理，但所顯示的序列卻幾乎完全屬於*Nitrosospira*群3.a 。



圖十九：KMS土壤在不同溫度的菌相結構的DGGE電泳圖(取材自：Sharon et al., 2003)
用不同的溫度處理，包含4℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、37℃。

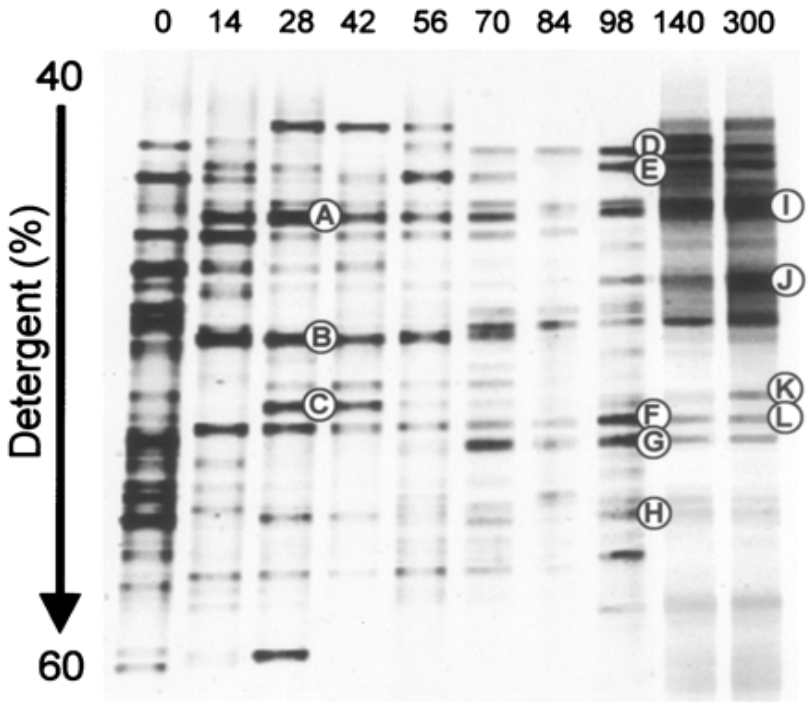
4. 氯化物的污染

造成污染的氯化物有許多種類，包含殺蟲劑DDT所含的成分、漂白水、氟氯碳化物、PCDD/Fs(polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans)以及高氯酸鹽等等。我們關心高氯酸鹽的污染是由於它在土壤和地下水裡發現的頻率增加，以及它被假設會抑制人體甲

狀腺激素的生產，但我們卻不太了解污染土壤中的微生物降解高氯酸鹽的能力。

研究人員發現電子提供者(醋酸鹽和氫)所造成的效應，醋酸鹽和氫的添加會提高微生物降解高氯酸鹽的效率，並且觀察到添加氫的細菌的延滯期（lag period）(41 天) 比醋酸鹽(14天)更長。在添加硝酸鹽方面，研究人員發現在剛開始的時候，硝酸鹽會抑制過氯酸鹽的降解速率，但是一旦過氯酸鹽開始降解，硝酸鹽便會刺激其降解過程。當我們使用過氯酸鹽和醋酸鹽或氫培養細菌，可以觀察到細菌菌相組成的變化，經由DGGE的分析及對部分16S rRNA 基因定序，顯示土壤中存在能降解過氯酸鹽的細菌(Nozawa-Inoue et al., 2005.)，並且其微生物菌相不同於添加醋酸鹽和氫所產生的菌相。這些結果顯示，受污染土壤當中的微生物能降解過氯酸鹽。

有害人體健康的氯化物有許多種，微生物除了能降解過氯酸鹽，還能對有毒的氯化物PCDD/Fs進行還原性除氯，我們已經可以在玻璃瓶裡，用被汙染的河底沉積物培養這些微生物。研究人員發現PCDD/Fs 的除氯反應和除氯過後的產物的氧化降解似乎同時發生。根據PCR-DGGE及定序，再與基因資料庫進行比對後，研究結果顯示*Firmicutes*、*Proteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 幾屬是其中的優勢菌種。同時，偵測出一定數量的*Chloroflex*(圖二十及表六) (Naoko et al., 2005)。接著使用特定引子進行即時定量PCR，發現研究人員假想的dechlorinator（Dehalococcoides及其旁支）的16S rRNA 基因數量佔總 rRNA 基因的0.1%。大多數菌種因而形成獨特的一群，有別於典型的"Dehalococcoides" 小組。研究結果顯示微生物能對PCDD/Fs 進行完全除氯，這是由於類"Dehalococcoides"菌種和具有降解有芳香碳氫化合物dioxygenases的好氧細菌的合作，前者降解氯化物，後者將除氯過的產物進行氧化降解 。



圖二十：受PCDD/Fs污染環境的復育過程DGGE電泳圖(取材自：Naoko et al., 2005)
顯示復育過程中不同天數的細菌菌相，顯示細菌菌相有劇烈的改變，並且研究人員切下A至L的條帶加以定序，再與基因資料庫進行比對後，顯示*Firmicutes*、*Proteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 幾屬是其中的優勢菌種。同時，偵測出一定數量的*Chloroflex*。

DGGE band(s)[a]	Phylum/class assigned	Closest relative[b]	Accession no.	Similarity (%)
A	*Deltaproteobacteria*	Uncultured clone WCHB1-67 from a polluted aquifer	AF050536	99.0
B, J	*Firmicutes*	*Trichococcus collinsiium* strain 37AN3	AJ306612	100
		Uncultured clone IIA-2 from a chlorobenzene-dechlorinating consortium	AJ488083	100
C	*Firmicutes*	Uncultured clone TANB01 from a TCE-dechlorinating ground water	AY667266	95.2
D	*Bacteroidetes*	Uncultured clone 1A-16 from a chlorobenzene-dechlorinating consortium	AJ488070	94.7
E	Unidentified	Uncultured clone SHA-4 from a 1,2-DCP-dechlorinating consortium	AJ306785	95.9
F, L	*Bacteroidetes*	Uncultured clone SHA-94 from a 1,2-DCP-dechlorinating consortium	AJ306738	99.5
G	*Spirochaetes*	Uncultured clone WCHB1-40 from a polluted aquifer	AF050549	96.9
H	*Firmicutes*	Uncultured clone A41 from a tetrachloroethylene-dechlorinating consortium	AF158719	100
I	*Gammaproteobacteria*	*Pseudomonas putida* strain DSM 3601	AF509330	97.9
K	*Alphaproteobacteria*	*Methylosinus trichosporium* strain OB3b	Y18947	100

表六：A至L條帶的定序結果(取材自：Naoko et al., 2005)
定序結果顯示有六種菌種的存在及一個未能鑑定的菌種，六個菌種分別爲 *Deltaproteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Spirochaetes*、*Gammaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*。

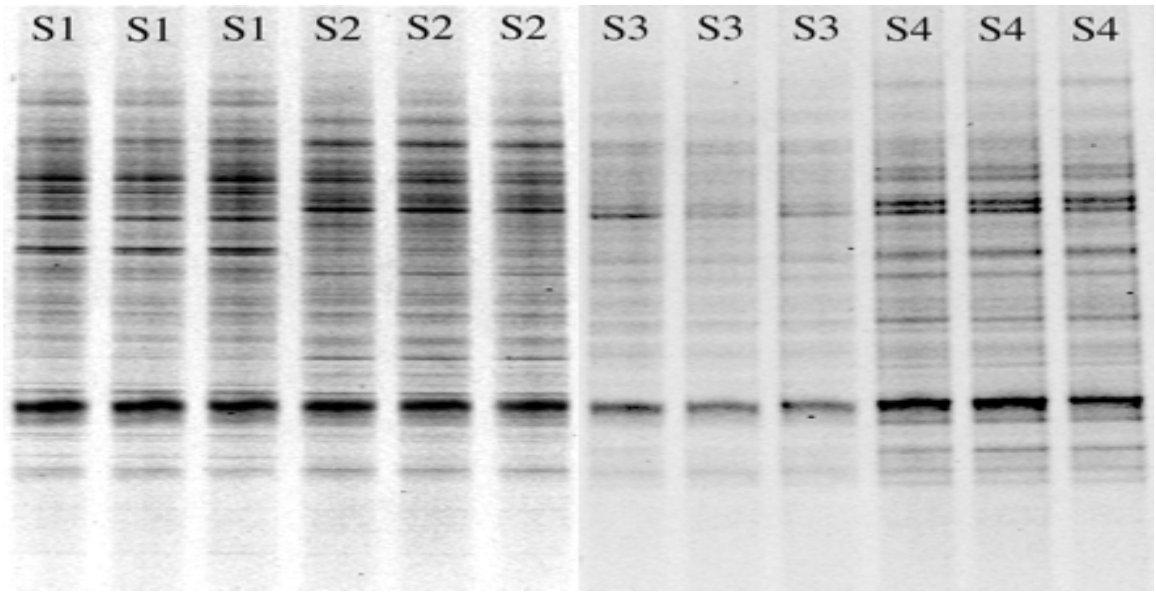
5. 重金屬的污染

沿海水域的汙染主要來自重金屬，譬如鎘、鉛、汞和鎳，重金屬污染在世界各地都是主要的環境問題。在海洋環境裡，這些有問題的汙染物會累積在沉積物當中。細菌在這些污染物的降解中的角色十分重要，細菌也許可以將這些重金屬加以揮發或沉澱，或者將他們轉變成毒性物質的有機衍生物。

關於重金屬的研究有很多，其中包括了對受到銅污染後環境的復育能力。爲了調查經過銅污染後，在生物膜(biofilm)的細菌對於受污染環境的復原能力，研究人員將生長在淺水中的生物膜放在玻璃盤上，在實驗室的所控制的條件下，暴露於銅濃度分別爲 0.6、2.1 及 6.8 μmol/l 的水樣中，和一個並未添加銅的參考水樣。細菌菌相的轉變經由DGGE加以分析，分析結果顯示，暴露於6.8mumol/l 銅濃度的在DGGE圖譜產生明顯的變化，而且並沒有在移除銅後回復 (Boivin . et al., 2006.)。此外，暴露在銅污染下會導致銅耐性的產生，部份銅耐性在銅移除後消失。結論是細菌菌相暴露在銅污染的水中26天後，再放置在未污染的水中28天依舊能夠恢復他們的代謝能力。

除了在實驗室進行研究外，也有對污染現址的研究。研究人員針對受污染的海洋沉積泥進行研究。四個海洋沉積泥的抽樣點包含了大量的沉積金屬，從汙染的研究地點 S1 到控制組的研究地點 S4，可用 HCl 萃取的金屬和有機物一直在減少。每克沈績物(乾重)所包含的微生物數量的範圍從 4.3×10^8 個到 13.4×10^8 細胞，並且與受金屬污染的程度沒有關聯。依照 DGGE 分析顯示，比較在 S1 和 S2 的細菌多樣性與未汙染地點 S4 的細菌多樣性，顯示污染地點的微生物菌相最初可能因爲重金屬的增加而改變，但在經過長達八十年的重金屬污染後，受污染的微生物菌相多樣性如 S1，可媲美未汙染的地方如 S4 (圖二十一)，接著將 DGGE 的電泳圖依據 Dice 公式作相似性分析，並切下條帶加以定序。根據序列分析顯示，優勢菌種爲 γ- 和 δ-*Proteobacteria* 和

Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) 細菌(Gillan. et al., 2005.)，其中一些序列與其它從被汙染的海洋沉積所得的序列呈現緊密的相關。研究人員經由螢光定位雜交(FISH)確認了七個種系群的含量。從 S2 到 S4 的結果，可以知道可用 HCl 萃取的金屬與 γ-*Proteobacteria* 和 CFB 細菌的關係爲負相關。δ- *Proteobacteria* 與可用 HCl 萃取的金屬並沒有相關性。在每個採樣點都能偵測到 *Desulfosarcina-Desulfococcus* 群組的細菌。以上所得到的資訊，也許能幫助預測重金屬在海洋環境裡的汙染的長期作用。



圖二十一：受重金屬污染的海洋沈積物不同樣點的DGGE電泳圖(取材自：Gillan. et al.,2005.)
從汙染地點S1到控制組S4，可用HCl萃取的金屬和有機物一直在減少，即S1含最多重金屬，S2次之，S3再次之，S4含最少量重金屬。根據電泳圖顯示，污染物會改變細菌菌相，但沒有影響其多樣性。

Site	Cd	Cu	Pb	Zn
S1	3.76 ± 2.22α	43.83 ± 7.43α	259.71 ± 17.45α	333.37 ± 87.1α
S2	0.23 ± 0.02β	20.98 ± 1.11β	158.32 ± 3.56β	124.0 ± 5.89β
S3	0.22 ± 0.02β	3.90 ± 0.13γ	12.18 ± 1.75γ	24.39 ± 5.25γ
S4	0.40 ± 0.06β	1.32 ± 0.49γ	19.19 ± 2.14γ	18.72 ± 1.92γ

表七：各個採樣點的重金屬含量(取材自：Gillan. et al.,2005.)
Cd，鎘。Cu，銅。Pb，鉛。Zn，鋅。其含量爲平均值，單位爲($\mu g\ g^{-1}$ 乾重)。
α 、 β 、 γ 代表不同程度的含量， α 最多， β 次之， γ 最少。

第五章 DGGE在其他領域進行的微生物菌相分析

DGGE除了可以監測污染外，也可以應用在許多項目上的微生物研究，如農業研究、環境生態研究、腸道生態的研究、食品微生物的生態研究等等。經由DGGE的幫助，使我們能觀察在這些環境下的微生物菌相的變化，並且能做更進一步的探討，幫助我們對這些了解這些微生物與環境的關係。

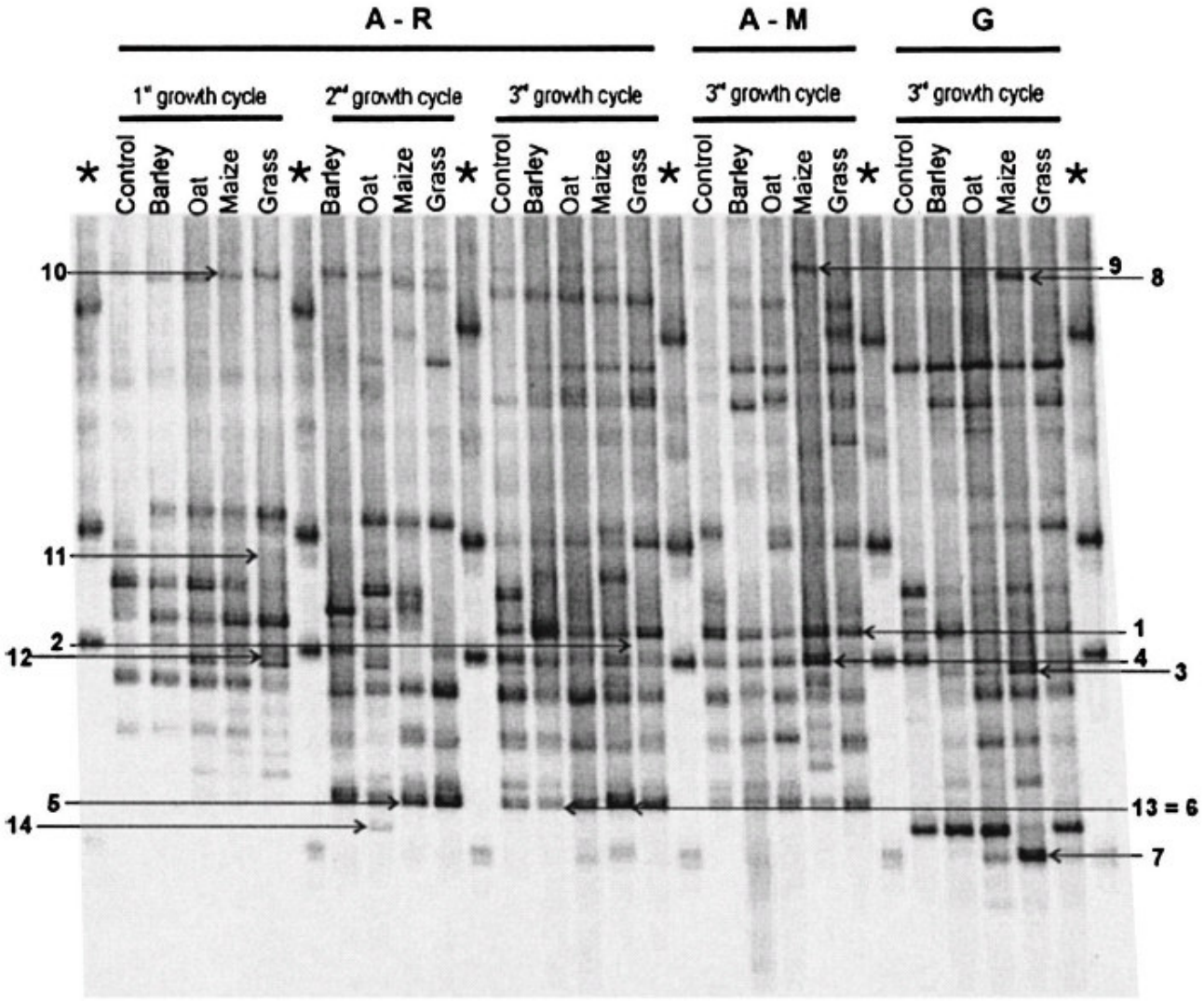
1. 在農業上的運用

1.1 不同處理方式對微生物菌相的影響

農業上有許多種對土地的利用方式，可以依據耕種的次數來作區分，或是依據農藥的使用與否等等來做區別。有許多研究在探討不同處理方式對菌相所產生的影響，有些研究是在實驗室進行，有些則是在現址進行。這些研究有助於我們了解農業操作與菌相之間的關係，並且能夠判斷土地利用方式的優劣，以及幫助我們在農業上有效利用這些微生物。

在實驗室所進行的實驗中，研究人員分別在罐裡種植不同的農作物，如玉米、燕麥、大麥和草皮，罐裡則是分別裝填使用不同土地利用方法的土壤，如玉米單一耕種、輪替耕種和永久草原。這項研究的目的是調查 *Burkholderia*的多樣性與種植的植物種類和土地使用方法之間的關係，因爲對農業地區的 *Burkholderia* 多樣性進行評估，對於這類微生物在農業上和環境上的應用很是重要的。使用 PCR-DGGE 來分析在根際土壤的 *Burkholderia* 的多樣性，研究結果顯示，土地的利用方法是影響 *Burkholderia*菌相的主要因素，研究人員觀察到永久草原和農業地區的 *Burkholderia* 菌相有明顯的差異，同時觀

察到輪替耕種作的 *Burkholderia* 菌相與玉米單一耕種的菌相有所區別(圖二十二)。至於種植的植物種類對*Burkholderia* 菌相的影響則較不明顯，研究人員發現玉米與草皮間所顯示的*Burkholderia*種類具有相似性，大麥則是和燕麥具有相似的*Burkholderia*種類 (Salles et al., 2004)。



圖二十二：種植不同穀物所顯示*Burkholderia*菌相結構的DGGE電泳圖(取材自：Salles et al., 2004) A-R，表示土壤以輪替耕種的方式處理。A-M，以玉米單一耕種的方式處理。G，以永久草原的方式處理。星號代表所使用的*Burkholderia* marker，包含的菌種(從上而下)依序爲*B. andropogonis* LMG6872， *B. multivorans* LMG13010， *B. cepacia* ATCC 25416, *B. dolosa* LMG18941。結果顯示土地利用方法是影響 *Burkholderia*菌相的主要因素，永久草原和農業地區的菌相有明顯差異，輪替耕種作的菌相與玉米單一耕種的菌相有所區別。種植的植物種類對菌相的影響則較不明顯。

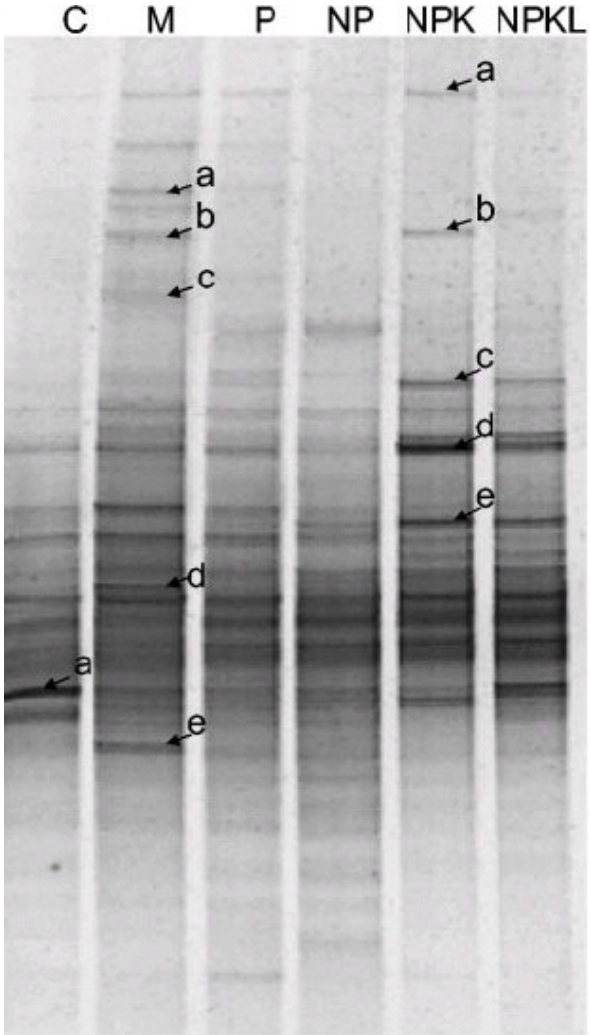
另外有研究人員在現址進行觀察良好農業操作(good agricultural practice，GAP)對菌相結構的影響，觀察麥田在實施不同的管理下所產生的影響，研究人員在一年中檢視了五次活躍的土壤微生物(細菌和黴菌)菌相的組成。良好農業操作等級或在較差等級(0.5×GAP)的施肥區域，又可區分爲使用農藥及不使用農藥。根據DGGE的結果顯示，微生物菌相結構主要由季節決定，並且黴菌和細菌的季節性傾向是相似的。雖然二個微生物組別的整體趨向是相似的，但樣品中的黴菌菌相比細菌菌相有較大的變異性。良好農業操作的耕種方法對菌相的影響最大，此種處理方法會導致細菌數目的增加，並且良好農業操作會導致菌相結構的改變。至於農藥的添加與否並沒有明顯影響細菌數目，但會導致細菌菌相的改變。 (Girvan et al., 2004.)

1.2 使用不同肥料所造成的影響

肥料有許多種類，依照肥料來源及組成成份可區分爲化學肥料、有機肥料、生物肥料等等；依照營養元素的不同可區分爲氮肥、磷肥、鉀肥、硼肥等等；按營養成分比例的不同可區分爲單質肥料、複合肥料、混合肥料。化學肥料成分較爲單純，其含量相對較高，施入土壤後，能在一定程度上調控土壤中該營養元素的濃度及土壤的某些化學性質。有機肥料含有大量的有機物質，一般要經過微生物的分解才能被植物吸收，效果緩慢而持久，營養元素種類齊全，但濃度較低，並且含有一定的生物活性物質。經由DGGE的幫助，我們能夠對肥料與菌相結構的關係有進一步的了解。

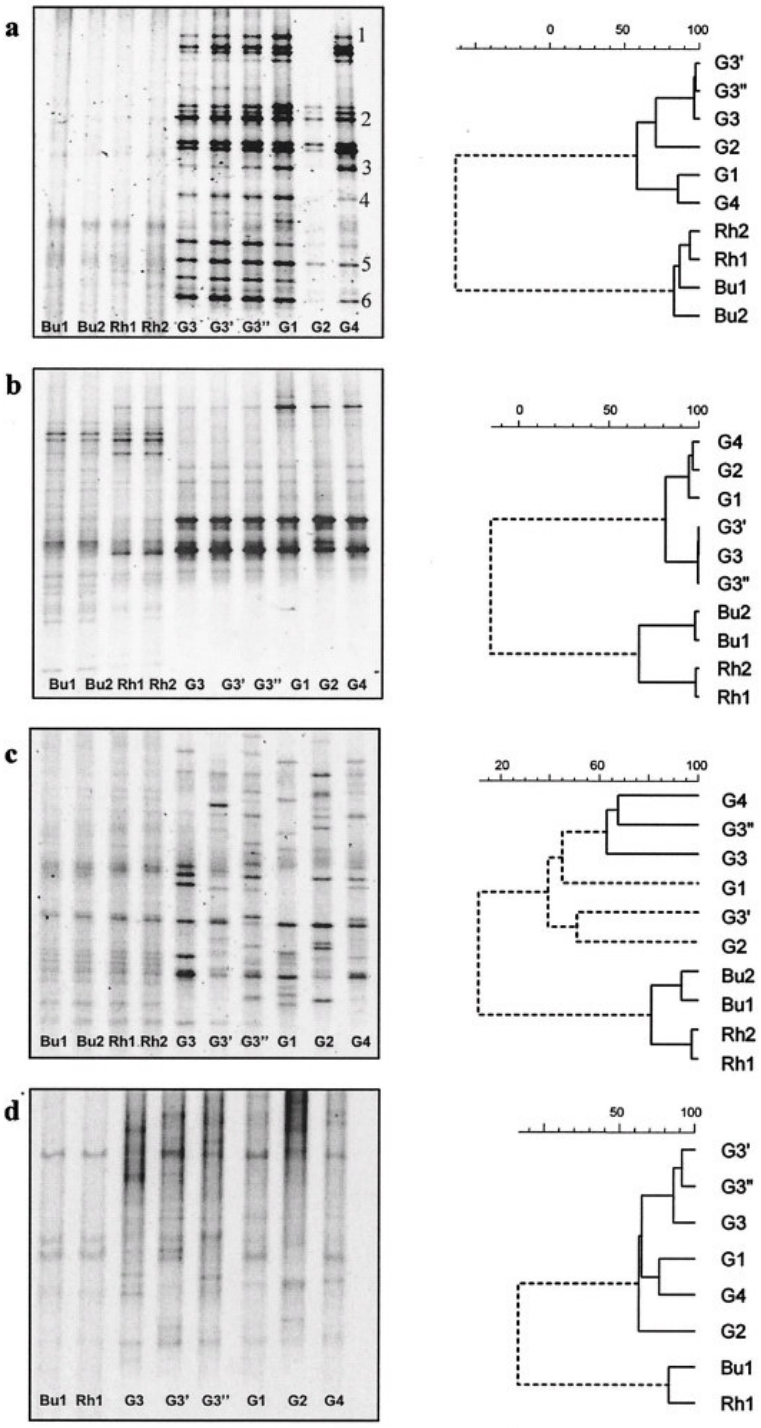
研究人員使用DGGE技術檢視六種農業環境的細菌菌相，並且加以分離定序。這些土壤有些使用有機肥料超過一個世紀，有些使用無機肥料達七十年之久。我們根據PCR-DGGE的結果得知，細菌菌相結構和多樣性受到不同土壤處理方式的影響。研究顯示，使用有機肥料的土壤的細菌菌相與未經處理的土壤的相關性較高，但使用有機肥料的土壤的細菌菌相與使用無機肥料的土壤相關性較低，並且發現使用石灰處理多少會對細菌菌相造成影響。依照肥料成分的不同來做比較，研究結果顯示添加磷的土壤與添加氮-磷的土

壤，在細菌菌相結構上較緊密相關，並且都與使用別種肥料的土壤較無相關。研究人員在土壤中進行測試，施以有機肥料的土壤的細菌數目較高 ，並且細菌菌相更加均勻的分佈(圖二十三)。在使用有機肥料土壤中取得99個基因，其中兩個基因(都是屬於 *Pseudomonas*)與在GenBank 資料庫的序列有100%的相似性。根據與在GenBank 資料庫的序列所做的相似性比對，剩下的 97 個基因可分爲六個群組，其中56個分別屬於五個主要的分類單位： *α-, β-, γ- Proteobacteria* (36 個), *Acidobacteria* (16個), *Bacteroidetes* (2個), *Nitrospirae* (1個)以及*Firmicutes* (1個)，其餘41個基因則不能進行分類(Sun et al.,. 2004.)。



圖二十三：使用不同肥料的土壤的DGGE電泳圖 (取材自：Sun et al.,. 2004.)
M，表示添加有機肥料。C，表示控制組。P，添加磷肥。NP，添加氮肥及磷肥。NPK，添加氮肥、磷肥及鉀肥。NPKL，添加氮肥、磷肥、鉀肥及石灰。

我們知道農業施肥能夠改變大面積土壤的微生物菌相，但是並不了解農業施肥對植物內生性菌相結構所造成的影響。研究人員調查了不同肥料對玉米植物的內生性菌相所造成的影響。我們知道 type I or II methanotrophs、actinomycetes和一般真菌被使用當作是玉米植物根部的內生性菌相組成的指標。研究人員針對植物內生性菌相設計不同PCR引子，經PCR放大後，接著使用DGGE加以分析，使用針對 type I methanotroph及fungal設計的引子，顯示在同一植物內的type I methanotroph及fungal的菌相差異較小(圖二十四b)，使用針對actinomycete設計的引子則顯示actinomycete的菌相差異較大(圖二十四c)，至於使用針對type II methanotrophs設計的引子則沒有顯示type II methanotrophs菌種的存在。對於使用 type I methanotroph的引子所產生的結果進行群組分析，結果顯示使用無機肥料的植物與使用有機肥料的植物差異極大。另外，觀察到使用無機肥料的植物比使用有機肥料的植物具有更低的 methanotroph 含量 (Seghers et al., 2004.) 。研究結果指出，農業化學的作用不限定於對大面積土壤的微生物菌相，並且還包括根部的內生性菌相，但是我們不能確定這個作用是來自肥料於對根部內生性菌相的直接作用，或是因爲大面積土壤的微生物菌相變化對根部的內生性菌相造成影響。



圖二十四：使用不同引子的玉米根部菌相DGGE電泳圖及其歸群分析 (取材自：Seghers et al., 2004.)a,使用針對細菌的引子。b. 使用針對 type I methanotroph, fungal 的引子。c. 使用針對 actinomycete的引子。d. 使用針對真菌的引子。Bu,表bulk soil samples。Rh表rhizosphere samples。G3、G3’、G3’’表intraplant variability，及同一植物內的差異性。G1、G2、G4,表interplant variability，即不同植物的差異性。

2. 環境生態上的研究

由於人口快速成長以及大面積土地開發與資源的使用，環境污染以及生態破壞問題日趨嚴重，不但影響人類的生活品質，並威脅到地球的永續生存，因此環境保護與生態保育已成爲世界各國重要的國家發展目標。近年來環境與生態議題逐漸受到重視，環境意識亦普遍覺醒，成爲政府施政的重要方針之一。DGGE可以應用在微生物生態的探討，是一項非常有力的工具，可以幫助我們更了解環境的生態。所採行的研究方法有很多種類，有些是針對特定地區進行生態研究，有些是針對不同環境進行菌相的比較，有些則是針對特定菌種進行各個地區的分佈進行研究等等。

2.1 出海口及河流的生態研究

海洋及河流的生態研究有許多不同類型，有些研究是針對出海口進行生態調查，有些是針對極地生態進行調查，有些則是針對海底火山的特殊生態進行研究。

2.1.1 出海口的生態調查

出海口是最複雜和最有生產力的生態系當中的一個，注入出海口的淡水和海洋群組代表了所有季節的大部分浮游生物。研究人員沿著在東北馬薩諸塞的 Parker 河出海口和李子海島的鹽分梯度進行調查，經由DGGE及定序加以分析，顯示多數河流和海洋的微生物是屬於 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria* (Crump et al.,.2004.)。

同樣是出海口的研究，有文獻研究切塞皮克灣的生態，切塞皮克灣是美國最大的出海口，由於其範圍廣大和所具有的經濟意義，因而受到了很多注意。切塞皮克灣伴隨著巨大的環境梯度，它爲調查微生物菌相的構成和作用提供一個理想的系統。研究人員經由DGGE

及定序加以分析，得知切塞皮克灣的優勢菌種屬於*Bacteroides*及*α–proteobacteria*（Kan et al.,.2005.）。

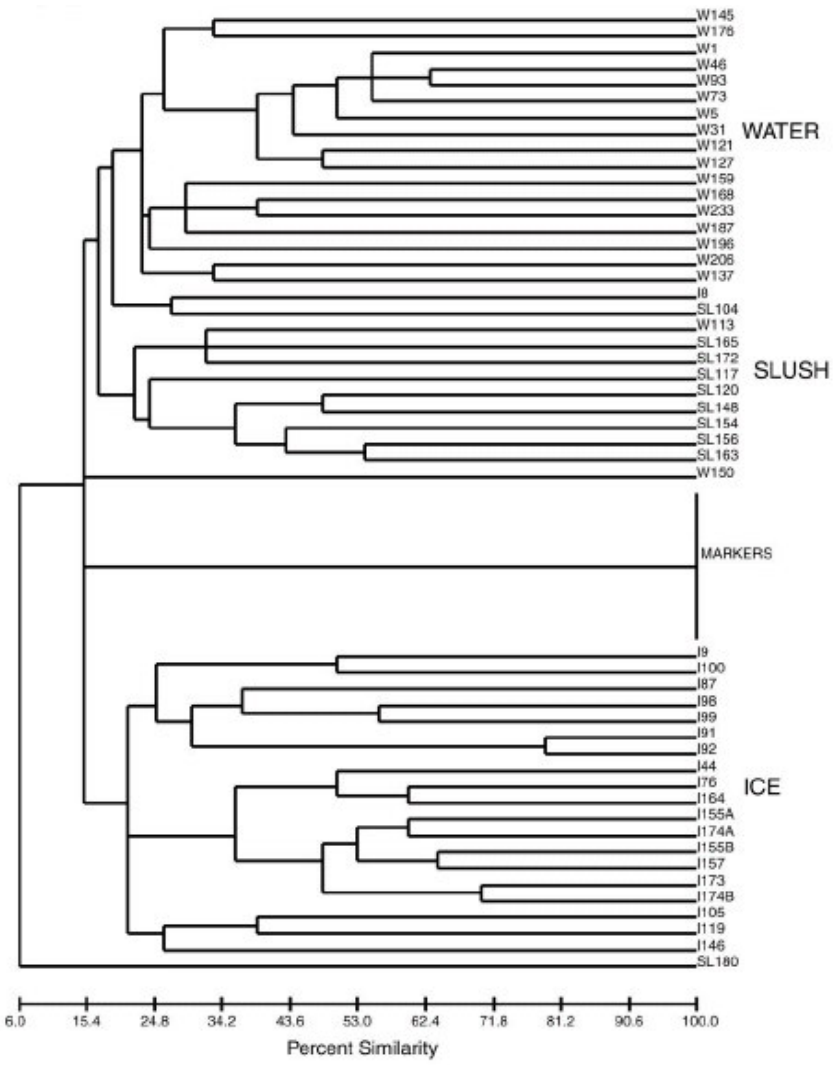
2.1.2 極地環境生態調查

研究人員從北極海和南極水域收集古生菌(Archaea)，使用針對古生菌的引子(primer 344f和517r)，透過PCR放大16S rRNA 基因，接著使用DGGE加以分析。從北極海取得33個樣品，以及7個南極樣品經由DGGE加以分析，顯示古生菌的數量在深水的樣品比在上層水樣的豐富，無論在北極或南極都是這樣。古生菌以下可分爲三個界(kingdoms)，Korarchaeota、Crenarchaeota與 Euryarchaeota。經由DGGE分析結果，我們得知無論是北極海和南極海，大多數古生菌的 ribotypes 是相同的，但是不同樣品的 Euryarchaeota 的 ribotypes 差異性極大。經由DGGE的群組分析顯示，古生菌的構成不受季節的變化的影響，而是與其所在的海水深度相關(Bano et al., 2004.)。

除了針對極地海洋的調查，也有針對極地淡水湖的調查。位於南極州的乾燥山谷的永凍淡水湖 Fryxell，具有硫還原菌生長的理想條件，研究人員從 Fryxell 湖的水和沉積物中取得樣品。爲了調查硫還原菌在 Fryxell 湖的數目，研究人員針對其16S rRNA 基因中的 dsrA 基因設計引子， dsrA 基因代表此菌的代謝功能。另外，在 4°C 培養大量從 Fryxell 湖水取得的硫還原菌，並且了使用 dsrA 引子進行篩選。根據DGGE所獲得的序列顯示，Fryxell湖包含一個獨特的硫還原菌小組 (McMurdo et al.,2005)。

DGGE除了用在極地特定環境的生態調查，也有研究人員對來自極地不同地帶的微生物菌相進行比較，如Ross海(包含海水、融化水或海上浮冰和冰)以及南極州。研究顯示，同樣類型的樣品比不同類型(如冰的樣品對水樣)有更多相同的條帶，不論樣品是否從不同採樣點收集而來(圖二十五)。傳統上使用顯微鏡和形態描述來研究 原生生物(protistan)的多樣性，但這些方法很難應用在這些菌相的生態研究上，因爲多數原生生物缺乏充分的分

類特徵來鑑定他們的種類，並且許多原生生物並不容易保存，有了DGGE這項技術就能克服這個難題。研究結果顯示，從同性質環境取得的樣品有相似的原生生物種類構成，並且環境的性質大大影響這些南極群組的原生生物種類結構。值得注意的是，在各個微生物生存環境樣品中的含量豐富的條帶是不同於其他環境的，顯示在不同地點但相同性質的樣品可能存在明顯的基因差異。研究人員針對特定DGGE條帶進行定序，得到代表 *diatom*、*dinoflagellates*、*ciliates*、*flagellates*,和幾個未能鑑定的原生生物的序列 (Gast et al.,2004.) 。



圖二十五：不同地點的同性質樣品進行歸群分析顯似高相似性(取材自：Gast et al.,2004.)
WATER，海水、融化水。SLUSH，浮冰。ICE，冰。

2.1.3 海底火山的生態調查

由於海底火山具有顯著不同的物理和化學梯度，深海熱液出氣孔採樣點表現出微生物的劇烈變化，他們包含有高溫菌、嗜溫細菌、嗜冷性細菌、化學異營菌、嫌氣性細菌和需氧生物等等。這些微生物並不容易培養，利用DGGE這項技術，研究人員可以調查深海熱液出氣孔的生態變化。

有研究調查日本西太平洋的 Suiyo 海底火山，從深度1,380公尺的深海熱液出氣孔中取得樣品，針對 dissimilatory sulfite reductase (DSR) 基因設計引子，並且使用PCR-DGGE加以分析，所顯示的細菌種類包含有 *Aquificae*、γ-和 ε- *Proteobacteria*，而古生菌包含有 *Thermococcales* 與一個獨特的古生菌序列 "*Nanoarchaeota*"。自操作的洞孔中取得的樣品，包含從7°C到300°C的自然流出的氣孔流體，經 DGGE 分析顯示，微生物種類包含有δ-*Proteobacteria*、類*Thiomicrospira*和 *Pelodictyon*。研究結果發現具有獨特的 DSR 基因的微生物，之前沒有在其它地熱環境中發現過這種微生物(Nakagawa et al., 2004.)。

2.2 陸地生態研究

陸地生態的研究有許多種類，包含沿海地區的生態研究、在不同氣候下的生態調查、地熱區的生態調查、特定菌種的全球分佈或是調查土壤微生物與全球生態變化的關係等等。

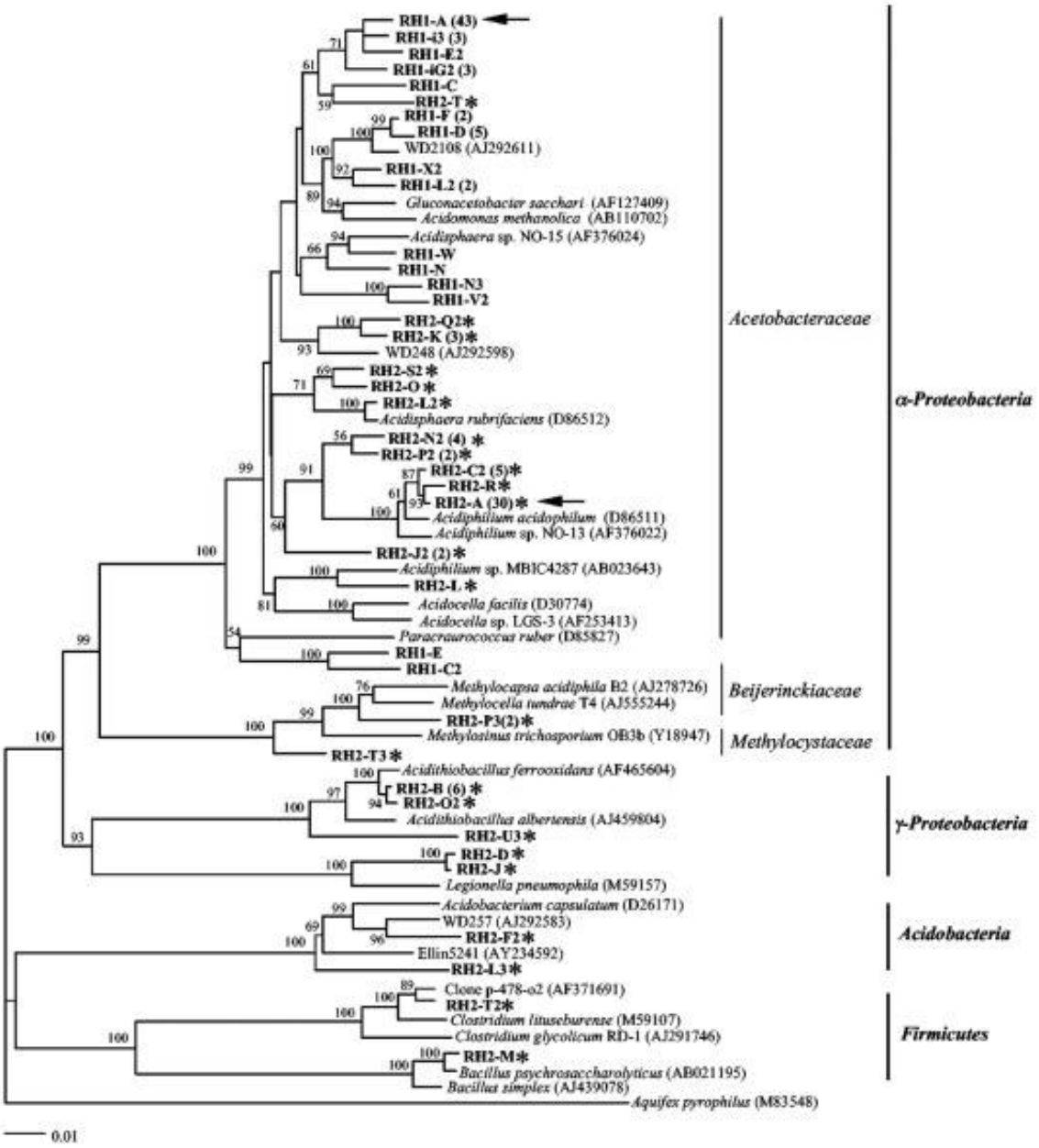
2.2.1 沿海地區的生態調查

在沿海地區有許多青苔種類，有許多文獻對此展開研究，但是很少人知道關於這些青苔種類(bryophytes)與細菌的交互作用。所以，有學者分析了細菌與三種苔蘚植物(bryophyte)（*Tortula ruralis* 、*Aulacomnium palustre*、*Sphagnum rubellum*）的相關性，這三種苔蘚植物代表了波羅的海沿海的三個典型種類。利用DGGE進行分析，在相關的細菌菌相隨著

苔蘚植物的不同而有明顯差異(Opelt et al.,2004.)，這種差異能進一步由培養方法加以證實。苔蘚植物代表一種生存環境，這個環境包含不同的菌種和不能描述的微生物菌相，而這個菌相至今仍包含未知的和未利用的潛在的生物技術，如對植物病原生物的生物控制等等。

2.2.2 地熱區的生態調查

文獻調查在黃石公園的彩虹溫泉的細菌菌相，探討細菌菌相與在土壤裡滲出的自然碳氫化合物的相關性。土壤滲出的碳氫化合物結構幾乎全部是飽和的，非環狀性烷(即C15到C30鏈長的正烷，以及有分支的烷等等)。經由DGGE加以分離，並將條帶切下加以定序，與16S rRNA 基因資料庫進行比對，結果顯示大多數發現的序列都與異營嗜酸細菌序列相關，包括 *Acidisphaera*、*Acidiphilium*、α-*Proteobacteria*(圖二十六)(Hamamura et al., 2005.)。同樣是在黃石公園的地熱溫泉，學者分離出能氧化亞砷酸鹽的Hydrogenobaculum菌株，早先研究顯示微生物菌相會參與亞砷酸鹽的氧化作用。這株細菌使用氫氣作爲唯一能量來源，屬於化學自營性細菌，最佳生長溫度爲55°C到60°C，最適合生長的酸鹼度爲pH 3.0 (Donahoe -Christiansen et al.,. 2004.)。



圖二十六：黃石公園的彩虹溫泉的細菌序列(取材自：Hamamura et al., 2005.)

2.2.3 熱帶山地土壤的生態調查

研究人員調查了熱帶山地土壤在在不同的土地利用下的細菌菌相變化。對來自泰國的三種山地土壤，一個是自然森林，一個是16 年的再造林，和一個農業區域，進行甲烷利用菌(methanotrophic bacteria)的菌相研究。在農業土壤的採樣點的甲烷利用率比在原始森林和再造林較低。研究人員使用針對 pmoA（爲methane monooxygenase亞單位的標記）所

設計引子，接著使用PCR放大 pmoA 基因，再使用DGGE加以分析，結果顯示不同採樣點的甲烷利用菌的菌相是不同的。根據DGGE 條帶樣式進行群組分析，顯示在樹林和再造林的甲烷利用菌的菌相是相似的，但不同於農業區域的菌相。對DGGE條帶進行序列分析，顯示 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 的存在 (Knief et al., 2005.)。

2.2.4 特定菌種的全球分佈

研究人員使用PCR-DGGE技術，分析及調查*Bacillus benzoevorans*在全世界的分佈。由於*Bacillus benzoevorans*的豐富含量和可培養的特性，使他們適合作爲研究目標，研究他們的散佈範圍和差異性。但是即使是相近的菌株，培養條件仍可能差異極大，容易造成研究上的困難，使用PCR-DGGE技術即可克服這個問題，可以分析及調查從土壤樣品取得的細菌菌相。根據荷蘭、保加利亞、俄國、巴基斯坦, 和葡萄牙的土壤樣品中與*B. benzoevorans*相關的菌相，顯示出在不同國家的菌相有明顯的區別
。爲了補強分子方法的不足，我們另外使用所有土壤樣品來培養*B. benzoevorans*相關菌株，發現在荷蘭的北部的土壤*B. benzoevorans*相關菌株的含量最高(Tzeneva et al.,. 2004.)。這項研究幫助我們了解這些土壤微生物在世界各地的的差異性和含量。

2.2.5 研究土壤微生物與全球生態變化的關係

土壤微生物會與全球生態變化產生交互影響，例如能進行氨氧化的細菌能將氨鹽基變成亞硝酸鹽，因而可以刺激在大氣中二氧化碳含量、降雪量、和氮氣沈澱量的增加和溫度的升高，這些活動可以在加利福尼亞草原的生態系發現。能進行氨氧化的細菌菌相結構和數量，反應了全球性的變動。研究顯示，氮沈澱量的增加明顯改變能進行氨氧化的細菌的菌相，使得與*Nitrosospira* sp. 2.相關的菌種成爲優勢菌種，這個轉變最常發生降雪量還未增加的時候。但是當大氣中二氧化碳增加時，會使得能進行氨氧化的細菌的含量明

顯減少，這種情況最常發生在降雪量增加的時候。並且研究人員還發現菌相的改變與氮的硝化作用的增加有關，但硝化作用與菌數的改變則不相關(Horz et al.,. 2004.)。根據這些結果，我們可以知道微生物的菌相可能經由全球性變動而產生變化，並且這些變動可能對生態系產生作用。

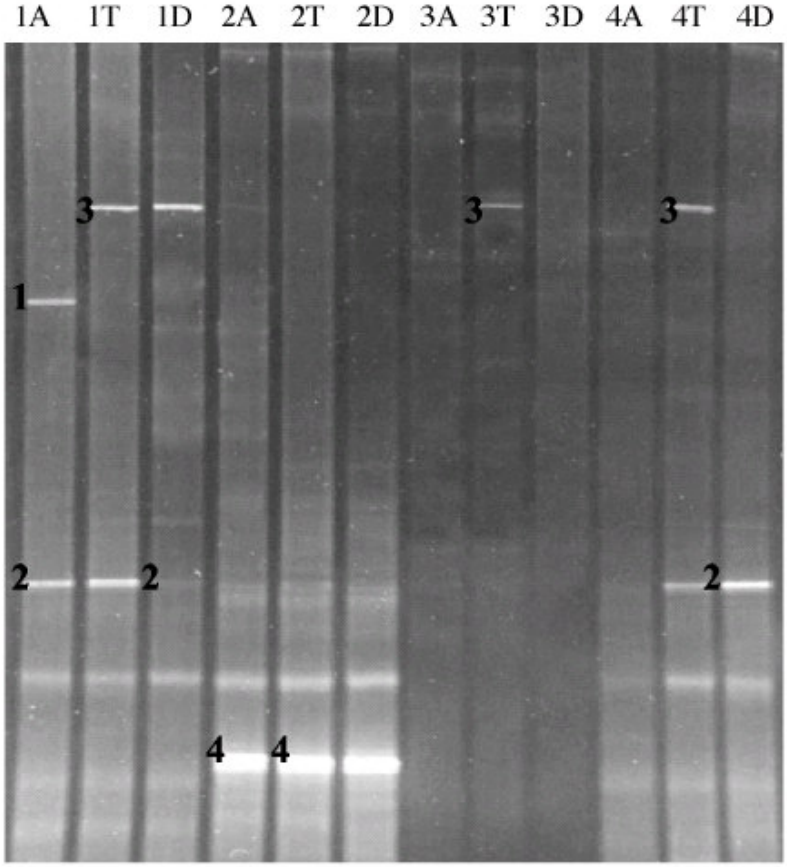
此外，人類的活動使大氣中二氧化碳和臭氧濃度的增加，而且這兩個微量氣體有修改森林生態系碳循環的能力。由於土壤微生物依靠植物產生的廢棄物作爲代謝的能源，在二氧化碳及臭氧濃度增加的影響下，植物產生的廢棄物在數量上產生了變化，進而改變微生物菌相的組成。研究人員觀察到二氧化碳濃度的增加，導致微生物代謝纖維素和甲殼質反應的增加，但是臭氧濃度的增加反而減少了這些反應。他們假設在豐富二氧化碳和臭氧下導致代謝上的變化，會伴隨黴菌菌相組成上的變化，並且測試了這個假說。研究人員使用細胞外酵素分析來檢驗微生物的代謝，並且使用PCR-DGGE分析黴菌菌相。在二氧化碳濃度很高的情況下，顯示1,4 beta glucosidase (+37% 的) 及1,4, beta N acetylglucosaminidase (+84%)的活性顯著增加，但是高濃度的臭氧則會壓抑 1,4 beta glucosidase (-25%)的活性。根據DGGE分析土壤樣品，發現豐富的臭氧會明顯改變黴菌菌相 (Chung et al.,.2006.) 。

3. 腸道生態

人類腸道包含有一高度複雜的微生物菌叢(microbiota)。在這微生物菌叢和宿主之間的交互作用，以許多方式影響宿主的健康。與分子技術相比，使用培養基的研究方法可能嚴重低估細菌在多數環境裡所產生的變化，所以需要分子技術來研究微生物生態，DGGE是一個不使用培養基的方法，能將使用PCR技術放大獲得的rDNA序列加以分離。*Bifidobacterium*以及乳酸細菌(*lactic acid bacteria* , LAB)，特別是乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)，已經被認爲是胃腸裡的正常菌種。傳統上用培養基方法檢視腸道的微生

物菌叢，但分子生物技術可以表現 60 到80%在人體腸道未被研究的細菌菌相，顯示分子生物技術的重要性。我們的當前對微生物菌叢與人體大腸的關係的了解，是來自於對糞便樣品的分析，並且只有一定數目的研究描述微生物菌叢與人體大腸壁的關係。

在最近的研究中，經由PCR-DGGE分析，調查了在人體大腸的菌相變化。研究人員針對四個人體的大腸進行調查，並且將大腸分爲三個採樣區域，分別使用針對Bifidobacteria 屬的引子、針對*Lactobacillus*的引子和普遍性的細菌引子進行研究。研究顯示， Bifidobacteria 菌相的DGGE圖譜相對較爲簡單(圖二十七)，只有呈現一兩個條帶。*Lactobacillus* 的菌相則明顯與宿主及採樣區域有關。至於細菌菌相只明顯與宿主有關，但與採樣區域無明顯相關性(Nielsen et al.,.2003)。



圖二十七：大腸中的*Bifidobacterium*菌相的DGGE電泳圖(取材自：Nielsen et al., 2003)
A、T、D表不同的採樣區域。1、2、3、4表示不同宿主；1A、1T、1D來自同一宿主。2A、2T、2D來自同一宿主。3A、3T、3D來自同一宿主。4A、4T、4D來自同一宿主。

另外，有研究是針對糞便微生物菌叢進行調查。研究人員同時使用 propidium iodide (PI) 及 SYTO BC進行染色，可以清楚分辨完整細胞(49%)，受傷害或損壞的細胞(19%)，和死的細胞(32%)，接著使用DGGE加以分析。研究分析顯示，不同個體具有不同的菌相，並且對DGGE的優勢條帶進行定序，顯示從活的、被傷害的和死的細胞取得的菌種大多數基因分別屬於 *Clostridium coccoides*、 *Clostridium leptum* 和 *Bacteroides*.。根據活的、死的和被傷害的細胞的種系分析顯示， *B. longum* 和 *B. infantis* 分佈在所有細胞， *B. adolescentis* 主要存在於死亡細胞 (Ben-Amor et al.,. 2005.) 。

至於藥物對腸道菌相的影響，研究人員則使用老鼠進行實驗，根據DGGE的分析，發現使用 vancomycin 和 linezolid 的治療會打亂了腸道厭氧的微生物群落。但是使用 Daptomycin 的治療沒有改變厭氧微生物的菌相。(Pultz et al.,.2005)

4.食品的研究

眾多的微生物，包括細菌、酵母和霉菌，構成現今牛奶和被發酵的乳製品的複雜生態系。有研究針對不同生產技術，和因他們的細菌內容產生的各種各樣的乳酪的細菌生態系進行調查。細菌在未知的生態系的鑑定依靠與全面細菌參考資料庫做比較，資料庫涵蓋150個種類，其中包括了有用的奶酪微生物(如乳酸細菌，lactic acid bacteria)、腐敗細菌(如 *Pseudomonas*、*Enterobacteriaceae*)、致病性細菌(如 *Listeria monocytogenes*、*Staphylococcus aureus*)。DGGE能提供良好的細菌分析結果，包括不同商業乳酪生態系的研究，和不能由一般方法查出的微生物種類。至少有二個種類第一次在奶酪生態系被辨認，分別屬於 *Halomonas* 和*Pseudoalteromonas*屬。根據分析顯示，在乳酪表面的生態系對那些內部上的一個驚人的區別：有氧表面的細菌一般是高GC含量並且種類繁多，乳酪內部細菌一般是低GC含量，並且種類稀少(Ogier et al.,. 2004.)。

第六章 DGGE方法之改進與未來發展

經由 DGGE 的幫助，使我們能夠更容易和更快速的了解複雜的微生物菌相。DGGE 比其他分生技術容易執行，並且能夠同時進行許多樣品，特別適合用來檢視時間與菌相間的關係，並且能觀察由於季節變異或環境擾動產生的微生物菌相變化。DGGE 技術屬於放大 rDNA 的限制分析（Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)， 與其他方法比較，是針對種（species）、亞種（subspecies）及亞種以下的單位。(表七)

Source of information	Method[a]	Use for taxonomic rank:		
		Genus or above	Species	Subspecies or below
Genotypic data				
Chromosomal DNA	Base composition (mol% G+C)	√	√	
	DNA-DNA hybridization		√	√
	Restriction patterns (PFGE, RFLP, AFLP)		√	√
	Whole-genome sequences	√	√	√
DNA segments	DNA probes	√	√	√
	DNA sequencing (e.g., *gyrB* and *recA* genes, MLST)	√	√	√
	PCR-based DNA fingerprinting (e.g., PCR-RFLP, RAPD, REP-PCR)		√	√
Ribosomal RNA	DNA-rRNA hybridization	√	√	
	Nucleotide sequences	√	√	
	Ribotyping, ARDRA		√	√
Phenotypic data				
Proteins	Amino acid sequences	√	√	
	Electrophoretic patterns		√	√
	Multilocus enzyme electrophoresis			√
	Serological comparisons	√	√	√
Chemical markers	Fatty acids	√	√	
	Isoprenoid quinones	√	√	
	Lipoglycans	√	√	
	Mycolic acids	√	√	
	Peptidoglycan	√		
	Polar lipids	√	√	
	Polyamines	√	√	
	Polysaccharides	√	√	
	Teichoic acids	√	√	
Whole-organism chemical fingerprinting	Dispersive Raman spectroscopy		√	√
	FT-IR		√	√
	PyMS		√	√
Whole-organism expressed features	Morphology	√	√	
	Physiology	√	√	
	Rapid enzyme tests		√	√

表七：與其他方法在分類程度上的比較 (取材自：Bull et al.,. 2000.)

關於DGGE技術的發展大致上可分爲三大重點：（1）改進其前置作業，如環境中DNA的萃取以及PCR反應，這些前置作業都會影響DGGE的結果。（2）研發DGGE的相關工具。（3）與其他技術加以整合運用。

1. 改進其前置作業

1.1 DNA萃取方法

DNA萃取方法的優劣會直接影響DGGE的結果，選擇優良的萃取方法是必須的。DNA萃取方法有許多種，例如我們熟知的玻璃珠撞擊法（bead beating）、酵素法、冷解凍法（freeze–thaw cycles）等等，還有使用廠商製造的KIT套組來萃取DNA。由於DGGE可以使用的範圍極廣，因此採樣地點就有所不同，比如從食道及腸道、食物當中以及天然環境等等。當採取樣品的環境不同，萃取方法就會有所差異，比如採取自土壤環境的樣品可能具有干擾萃取效果的物質，如何加以去除這些干擾物質就成了重點所在。

DGGE能夠偵測土壤中的細菌菌相，包括那些不能培養的細菌，但與其他樣品環境相比，從土壤樣品提取DNA和純化DNA相對較爲困難的。研究人員比較了五個從土壤萃取DNA的方法(表八)。純化的DNA萃取物使用普遍性引子經由 PCR 加以放大，並且使用DGGE加以分析，其中的DNA條帶代表細菌的種類，我們可以觀察到分離和純化方法明顯影響樣品的細菌菌相（圖二十八）。

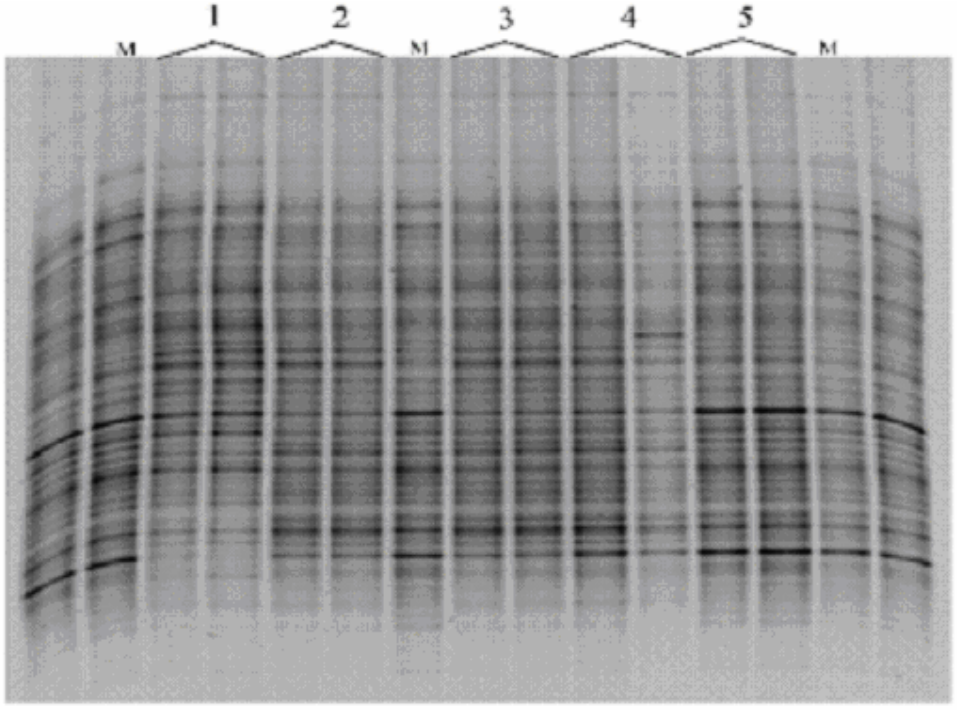
不同類別的細菌，其細菌細胞外膜（envelopes）的結構則會有所不同，一些細胞比其他細胞更容易破裂，這個差異對正確萃取細胞的組成部分是個難題，DNA的萃取正是如此。此外，土壤環境中的干擾物質更一步使DNA的萃取更爲複雜，這些干擾物質包括腐殖物質和重金屬。根據研究的結果，玻璃珠撞擊法在DNA萃取上具有高效率，並且使用化學方法和冷解凍法不能破壞 *Bacillus* 和 *Fusarium* 的孢子。包含玻璃珠撞擊法的工具與其他方法的主要區別是能夠在DGGE膠體底部顯示高GC片段，這個優點對於革蘭氏陽性（Gram-positive）菌的偵查，譬如放射線菌類，是有幫助的。雖然我們使用普遍性 primer 所進行的PCR-DGGE，能夠顯示佔有優勢的種類，並且查出優勢菌種在土壤樣品的細菌

的研究中是很重要的，但是研究罕見菌種所需要的DNA萃取方法與一般方法有所差異，或許根據細胞的外膜結構選擇所需的萃取方式是最佳的選擇 (Niemi et al.,. 2001)。

Treatments for cell lysis in different methods

Method	Cell lysis treatment		
	Chemical	Enzymatic	Mechanical
1	SDS (0.5%)	Proteinase K (100 μg/ml)	–
2	SDS (1%)	Lysozyme (5 mg/ml) Proteinase K (200 μg/ml)	–
3	SDS (1%) Guanidine isothiocyanate	Lysozyme (5 mg/ml) Proteinase K (200 μg/ml)	–
4	SDS (1%) Guanidine isothiocyanate	Lysozyme (5 mg/ml) Proteinase K (200 μg/ml)	Bead beating Freezing and thawing
5	Detergent (Mo Bio Laboratories)	–	Bead beating (Mo Bio Laboratories)

表八：不同DNA萃取方法的介紹(取材自：Niemi et al.,. 2001)



圖二十八：不同DNA萃取方法的DGGE電泳圖(取材自：Niemi et al.,. 2001)

對於DNA萃取方法的要求，除了能更有效的萃取出目標物的DNA外，如何更快速的達到萃取目的也是研究的重點。研究人員運用高壓高熱器加速促進細胞溶解和蛋白質變性，以便迅速取得細菌DNA當作模板。現今許多方法可以取得DNA作爲PCR的模版，多數方

法使用洗滌劑溶解細菌，但是多數洗滌劑會干擾 DNA polymerase，進而影響DNA的合成，所以必須在PCR反應前去除這些洗滌劑。使用高壓高熱的方法萃取出細菌的DNA，用來當作PCR的模板，它減少了洗滌劑及有機溶液和機械性細胞破壞方法的使用，因而在增加產率的同時能大量縮短處理時間，並且減少處理的費用。細菌的DNA在高壓高熱反應器經由迅速熱化和洩壓的過程被溶解出來。高壓高熱器能夠迅速使溫度攀升和更迅速的減壓，可以實現下面三個目標：(1) 有效萃取不易溶解的Gram-positive球菌，像 *Enterococcus*。根據研究人員的觀察，在1% SDS煮沸 15 分鐘並沒有導致 *Enterococcus* 細胞溶解。比較起來，高壓高熱器能夠使所有球菌溶解。(2) 細胞蛋白質的熱變性會去除那些會抑制PCR反應的物質，這些物質會損壞DNA 或干擾聚合的過程。(3) 熱變性的材料(包括蛋白質) 會是可溶解，因此容易經由離心法加以去除，或者像大分子量聚合物(像小牛血清蛋白) 被使用在 PCR 中所扮演的主要角色，因爲他們的非特異性(non-specifically)能吸附抑制物質，並且有效地增加反應劑的濃度。這種方法與其他七種方法進行比較，包括煮沸的Triton X-100 SDS、lysozyme/proteinase K、玻璃珠撞擊和CTAB溶解方法。受檢測的細菌來源有四種：*Enterococcus* 和 *Escherichia coli*，及一個自然海洋細菌菌相和一個南極細菌菌相。經由DGGE分析，測試其產物是否適合當做PCR模板。結果顯示，不同方法所產生的DGGE圖譜是相似的，但是以高壓高熱產生的PCR模板有更好的生產率，更短的處理時間，和更低的成本（Simmona et al.,. 2004）。

同樣是爲了更快速的達到萃取目的，在食道微生物菌叢的生態研究中，研究人員比較兩種DNA萃取方法，QIAampR DNA Stool Mini Kit與玻璃珠撞擊法，針對豬食道微生物菌叢的萃取效果進行比較。QIAampR DNA Stool Mini Kit與玻璃珠撞擊法皆能溶解大約95%的細菌細胞。根據迴腸和盲腸的PCR-DGGE分析顯示，兩種萃取方法對小腸食糜（digesta）和黏液（mucosa）萃取DNA的效果幾乎是相同的，並且經由轉殖和序列分析顯示這兩種萃取方法效率都很高。雖然玻璃珠撞擊法是一個在分子生態學研究中廣泛被應用的技術，溶解的細菌細胞經由phenol/chloroform 提取及分離出DNA，但是處理數量眾多的樣品，速度和效率都是必需的。使用玻璃珠撞擊法和QIAamp kit從同一樣品萃取DNA，結

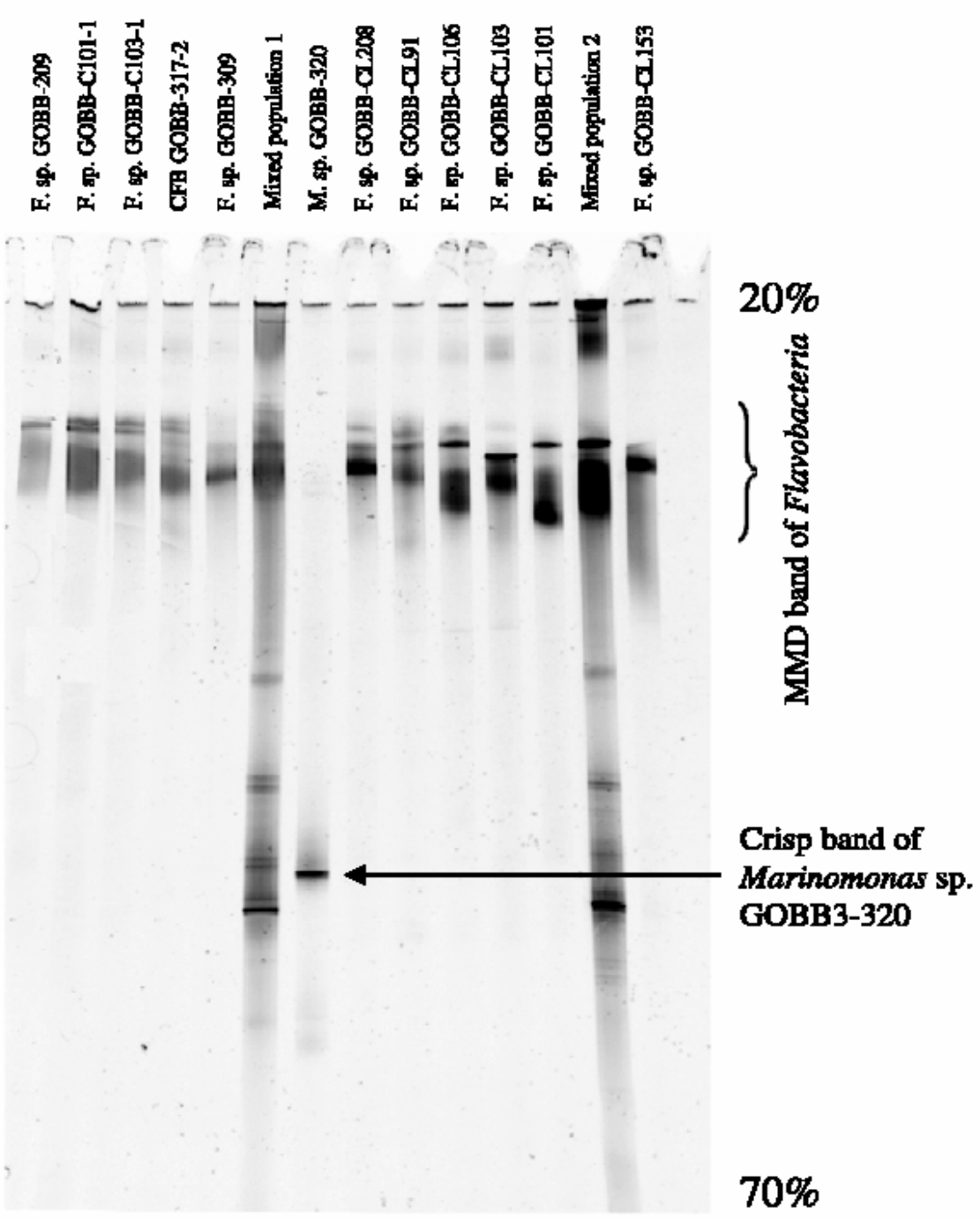
果得到相似的PCR-DGGE DNA，外形相似性更高達99%，但是QIAamp kit的處理速度快上許多。經由這些結果，學者建議將QIAampR DNA kit應用於食道微生物生態的研究，QIAamp 成套工具能夠同時處理多個樣品，並且在溶解細胞和 DNA 萃取上具有高效率(Li Mei et al.,.2003.)。

1.2 PCR引子的設計

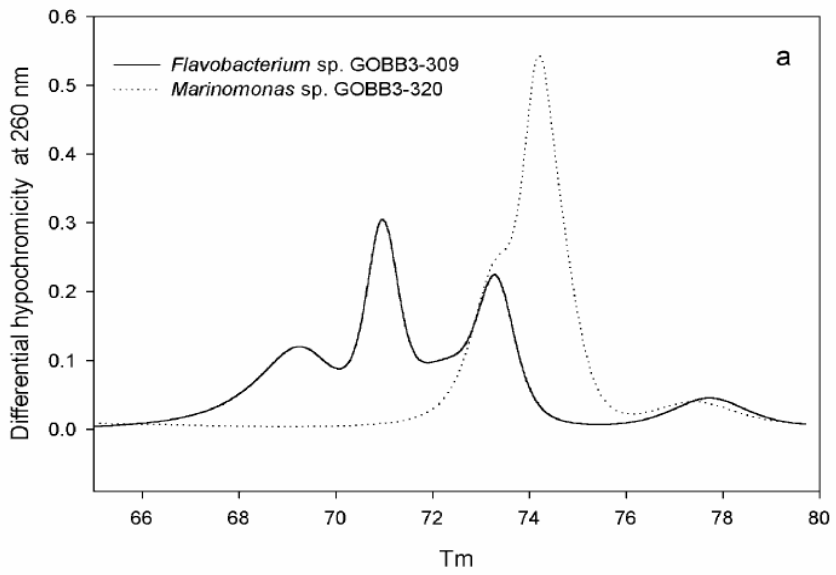
PCR反應機制是透過倍增的方式，增加少量DNA的含量。影響PCR合成的精確性的有幾個因素，如欲合成的DNA引子本身的長度、核甘酸濃度控制、合成循環數以及聚合酶的種類等。其中最重要的就是引子的設計，因爲一對引子要有效且具特異性(specificity)的去配對(annealing)到目標DNA模版(templet)或欲合成的片段，所以引子設計必須要考慮幾個重要因子，包含了引子的長度與組成（G+C composition)、配對的溫度(Tm)、引子之間交互雜交(cross-hybridization)到非特異性區域或是因爲引子的二級結構(secondary structure)所造成的影響等等。由於使用不同的PCR引子會影響DGGE的結果，如何使用適當的引子，使DGGE的結果更加完善是未來可以改進加強的地方。

我們知道DGGE對點突變的鑑別能力十分優異，但是對於環境微生物的解析能力的問題卻了解不多。爲了了解DGGE對各種微生物鑑別的解析度，研究人員從三個水樣環境中任意取樣，使用二個PCR方法和一個培養方法研究91個分類單位。某些菌種進行DGGE時可能會產生問題，如*Flavobacterium*有多個熔化的領域（multiple melting domains, MMD）（圖二十九、三十）的問題而產生Fuzzy bands，及條帶模糊不清，研究人員設法改善後，則產生與其他菌種有相似Tm值的問題（Cross-taxas similarities in Tm）（圖三十一）。研究人員認爲也許是因爲使用普遍性的引子，使得DGGE 分析產生的條帶樣式產生誤差，爲了改善DGGE解析度的方法與效果，學者建議可以嘗試改用不同的primer，或是減少片段的長度，或是使用16ＳrDNA的不同片段來解決這個問題。因此，引子的設計對使用

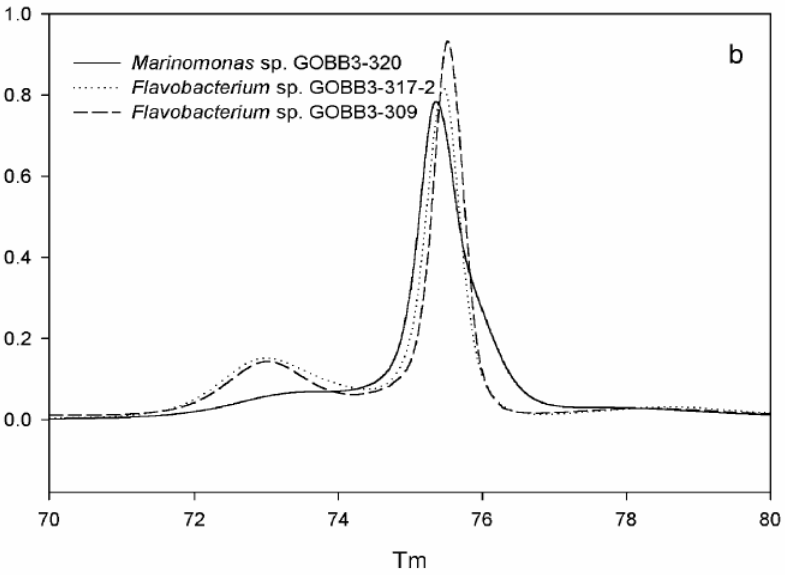
DGGE進行研究的我們，相對來說更是重要 (Kisand Veljo and Winker Johan.2003.)。



圖二十九：DGGE電泳圖的MMD問題(取材自：Kisand Veljo and Winker Johan..2003.)



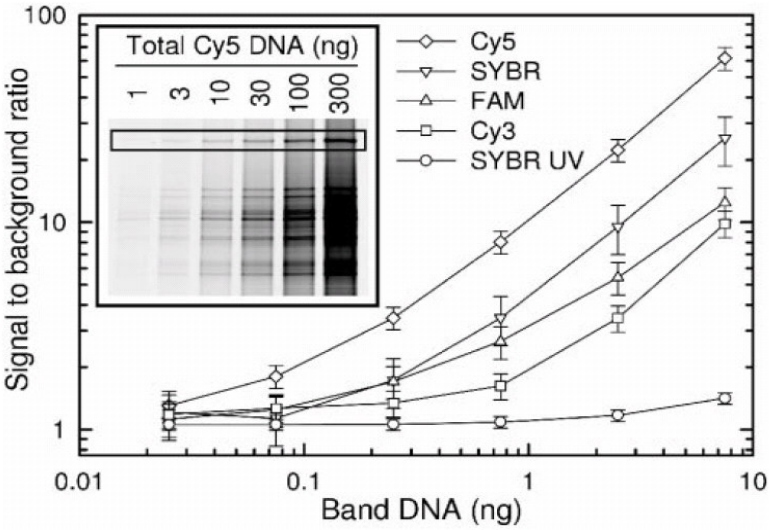
圖三十：MMD問題的Tm值(取材自：Kisand Veljo and Winker Johan.2003.)



圖三十一：Cross-taxas similarities in Tm(取材自：Kisand Veljo and Winker Johan..2003.)

除了因爲要增加DGGE解析度的原因，有時爲了能夠了解特定菌種的菌相構成或變化，我們也必須設計特定的引子。例如研究人員爲了解屬於嗜中溫菌，並且能夠降解甲苯的微生物小組(toluene-degrading consortium，TDC)和能夠降解乙苯的微生物小組(ethylbenzene-degrading consortium，EDC)，設計了特定的引子來達到目的（Koizumi et al.,. 2002）。

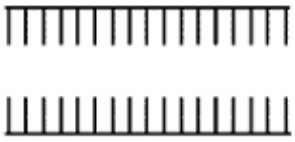
DGGE廣泛被應用在微生物生態方面，其敏感度的增加能使所得到的DGGE電泳圖的菌相更爲完整，不同膠體取得的樣品的正常化可以使不同膠體能夠進行比較。經由對引子的特殊設計可以增加其敏感度及使其正常化。研究人員使用以不同螢光標記的引子，測試對DGGE條帶移動、敏感性和正常化所造成的影響。根據研究結果，fluorophores Cy5 和Cy3沒有明顯改變DGGE的樣式，但是，6-carboxyfluorescein (FAM)減緩了條帶的移動。DGGE經由螢光標記的引子的幫助，改善了偵查的敏感性（圖三十二）以及使得從不同膠體取得的樣品的能夠正常化(Neufeld et al.,. 2005)。



圖三十二：改善DGGE的敏感度(取材自：Neufeld et al.,2005)。

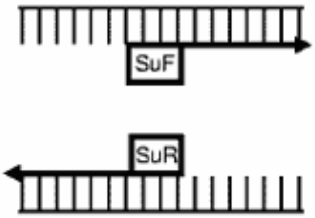
有時PCR不能放大我們想要的DNA，這是因爲不需要的DNA模版或強勢的DNA模板的影響，使得供選擇的模板減少或消滅，進而影響反應的結果。這些妨礙反應的模板可能可以經由endonuclease的作用而完全消化。應用endonuclease的作用，並且使用DGGE確認要移除的DNA的模板已經被移除了，隨後進行改進的放大作用，就能夠放大真正想要放大的DNA，這個方法稱爲自殺性聚合酶內切酶限制作用（suicide polymerase endonuclease restriction，SuPER）。SuPER的機制如圖三十三。根據實際研究結果，從植物根部提取的環境 DNA 中的 plastid 16S rRNA 基因完全被消化了。另外，純培養基和環境 DNA 萃取物受到從 *Streptomyces* 提取的各種 genomic DNA 的抑制，使用 SuPER 能有效移除這些 DNA (Green et al., 2005) 。

① Double-stranded DNA is denatured.



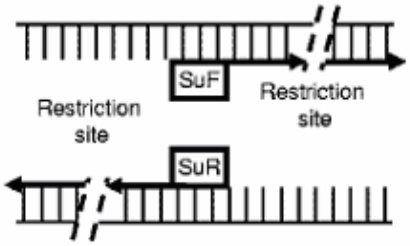
雙股DNA變性爲單股。

② SuPER PCR primers (SuF and SuR) anneal to target DNA, and polymerase begins elongation. Primers do not anneal to non-target DNA; therefore, non-target DNA remains single-stranded.



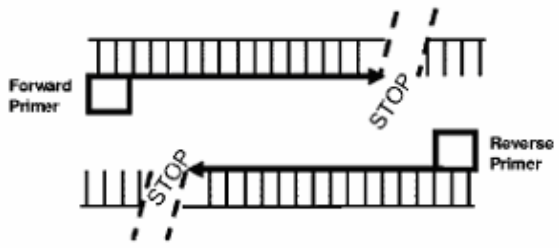
SuPER PCR引子黏合目標DNA，聚合酶開始延長DNA片段。引子不會黏合非目標DNA，所以非目標DNA仍爲單股。

③ Restriction endonuclease digests double-stranded DNAs. A short recognition sequence is advantageous to increase the likelihood of restriction.



限制內切酶消化雙股DNA。一小段辨識序列有助於增加限制反應的可能性。

④ DNA digested by SuPER method can no longer be PCR amplified.



DNA經由SuPER方法消化，並且不再會被PCR放大。

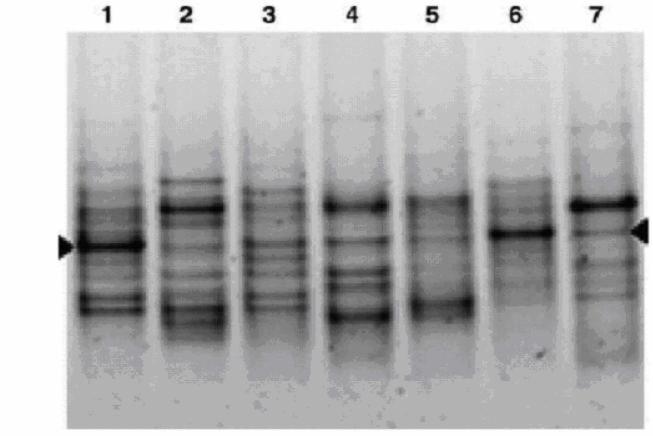
圖三十三：SuPER 的作用機制(取材自：Green et al., 2005).

2. 研發DGGE相關工具

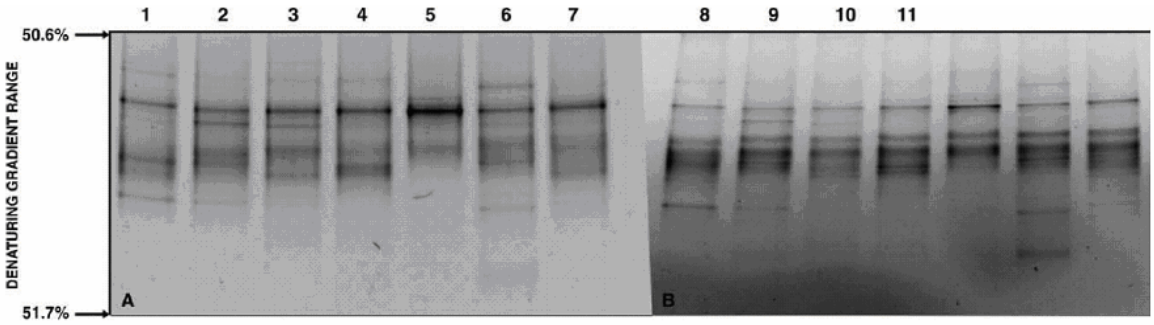
2.1 DGGEGE

DGGE能偵查和鑑定不能培養的種類，有更多的證據顯示，當複雜l菌相進行DGGE時，也許不同菌種的序列會移動至相同位置。在這項研究中，研究人員試圖解決這個問題，經由切除個別的條帶，讓他們通過一個更短的變性劑梯度，稱之爲"變性梯度膠體電泳法膠體擴展"(denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion, DGGEGE) (Gafan et al., 2005.) 。

研究人員觀察七個樣品的 DGGE 電泳圖(圖三十四)，各個樣品呈現不同的樣式。箭頭表示選擇的條帶，這些條帶證實全部位在相同位置，接著從膠體切除這些條帶。具體觀察這些條帶，顯示大約集中在變性劑濃度爲 52-53%時停止移動。這些被切除的條帶在第二個相同變性梯度的 DGGE 膠體上，顯示停留在同樣的位置，這樣可以保證沒有切到其他條帶。將被切除並經過純化的條帶使用 PCR 加以放大，接著進行一個非常短的變性劑梯度(50-55%)的電泳。所選擇的單一條帶擴展成複雜雜的外形(圖三十五)，每條平均有 5.4 個條帶(DGGEGE 條帶的範圍爲 4 到 8 個條帶)。這顯示不同的序列的共同遷移到同樣的電泳位置。透過這項研究，研究人員可以開發新的技術，這個技術可以克服因爲不同菌種停留至相同位置所帶給 DGGE 的限制。



圖三十四：七個樣品的DGGE 電泳圖(取材自：Gafan et al., 2005.)

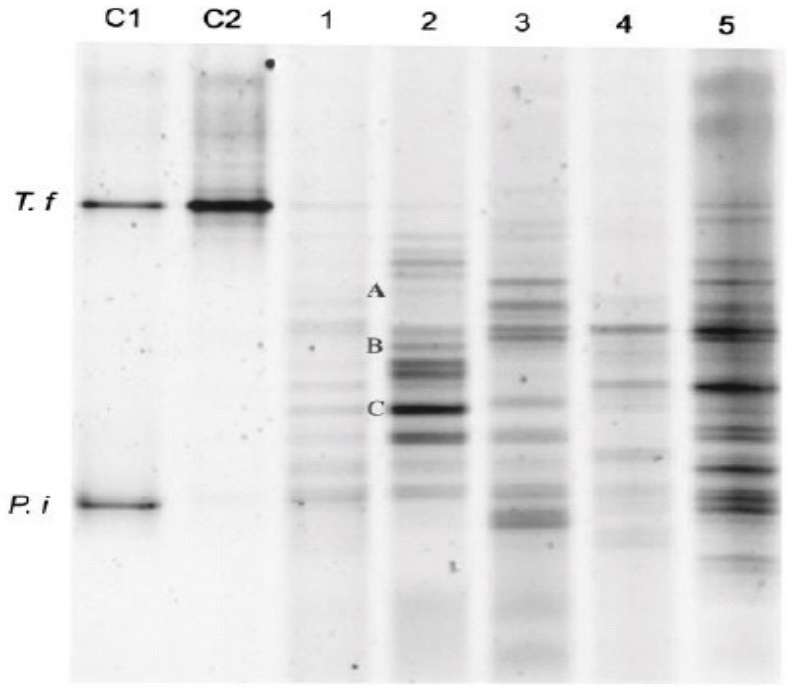


圖三十五：單一條帶經過短變性梯度膠體呈現數個條帶(取材自：Gafan et al., 2005.)

2.2 分析方式

分析DGGE電泳圖有許多方式，比如在完成條帶影像的定位與數目判讀後，接著以DICE(Duineveld et al., 1998; Crump et al., 2003)相似度的演算公式計算兩兩樣本間的相似度S_{AB}，建立相似度的矩陣S_{DAB}，然後接著再以UPGMA (unweighted pair-group mean analysis)進行歸群分析，並且根據結果繪製成樹狀圖(dendrogram) (Röing et al., 2001)。

另外還有對DGGE條帶樣式進行統計分析，根據研究結果，顯示邏輯回歸是一個分析和描述DGGE 外形的良好統計方法（Gafan et al., 2005）。舉例來說，研究人員針對齒齦炎進行分析，所有膠體都使用二個正控制項，*T. forsythensis* (*T. f*)和 *P.intermedia* (*P. i*)（圖三十六）。在各個膠體移動至相同位置的DNA 條帶使用數字表示。條帶的強度根據視覺上的估計，將微弱的條帶以1表示，中間強度的以2表示，和強的條帶以3表示，圖中分別以A、B、C爲代表。



圖三十六：使用兩個正控制項的電泳圖(取材自：Gafan et al. 2005)

接著使用odds ratio加以分析，odds ratio是指有這條條帶的有病與沒病的勝算（odds）相對於沒有這條條帶的有病與沒病的勝算之比值。有這條條帶的有病與沒病的勝算是指，有這條條帶的有病機率除以有這條條帶的沒病機率。沒有這條條帶的有病與沒病的勝算是指，沒有這條條帶的有病機率除以沒有這條條帶的沒病機率。

如果odds ratio是1，則表示具有齒齦炎的勝算相同於沒有齒齦炎的勝算。如果某個條帶的odds ratio是大於1，表示有齒齦炎的勝算大於沒有齒齦炎的勝算，當這條條帶強度增加的時候代表很可能有齒齦炎。同樣的，如果估計某個條帶的odds ratio是少於1，那麼沒有齒齦炎的勝算大於有齒齦炎的勝算，當這條條帶強度增加的時候代表很可能沒有齒齦炎。然後將資料運用以下三個方法加以分析。(i) Shannon-Wiener diversity index. (ii) Cluster analysis. (iii) Logistic regression.

(i) Shannon-Wiener diversity index：

利用下列公式求出Shannon-Wiene index的值。

$$\text{Shannon-Wiener index } (H') = \sum_{i=1}^{s} (P_i)(\log_e P_i)$$

s 表示樣品種類的數目，Pi 表示種類 i 在樣品的比例。透過 Shannon-Wiener diversity index.，我們可以比較樣品的多樣性。比較有齒齦炎與沒有齒齦炎的 Shannon-Wiener index，結果顯示在沒有齒齦炎的樣品小組有更顯著的生物多樣性。

(ii) Cluster analysis(族群分析)：

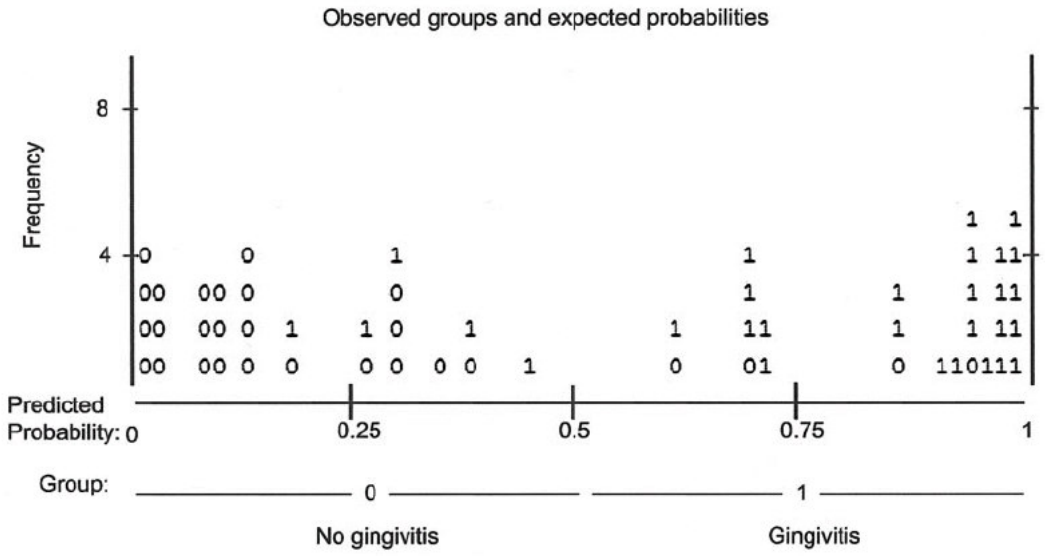
使用 Pearson 相關係數(Pearson correlation coefficient)比較 PCR-DGGE 的條帶樣式之間的相似性。將相似性以樹狀圖表示。透過族群分析，我們可以知道樣品與來源的相關性。族群群分析的結果顯示，七個群組（clades）只與有齒齦炎的小組有關，五個 clades 只與沒有齒齦炎的小組有關。

(iii) Logistic regression.(邏輯回歸)：

經由邏輯回歸，可以判斷有齒齦炎或沒有齒齦炎的可能性(表九、圖三十七)。邏輯回歸分析並且能確定，某一條帶是否顯著與齒齦炎相關。經由回歸分析，任一條帶估計的 odds ratio，可以被解釋作爲有這條條帶的齒齦炎個體的 odds ratio 與沒有這條條帶的齒齦炎個體的 odds ratio 的比值。邏輯回歸可以應用在環境污染復育的研究上，可以用來判斷特定菌種與污染源的關係。

Observed disease status	Predicted no. of individuals		% Correct
	With gingivitis	With no gingivitis	
Gingivitis	24	4	85.7
No gingivitis	5	24	82.8
Overall % correct			84.2

表九：邏輯回歸判斷其罹患疾病的可能性（取材自：Gafan et al., 2005）



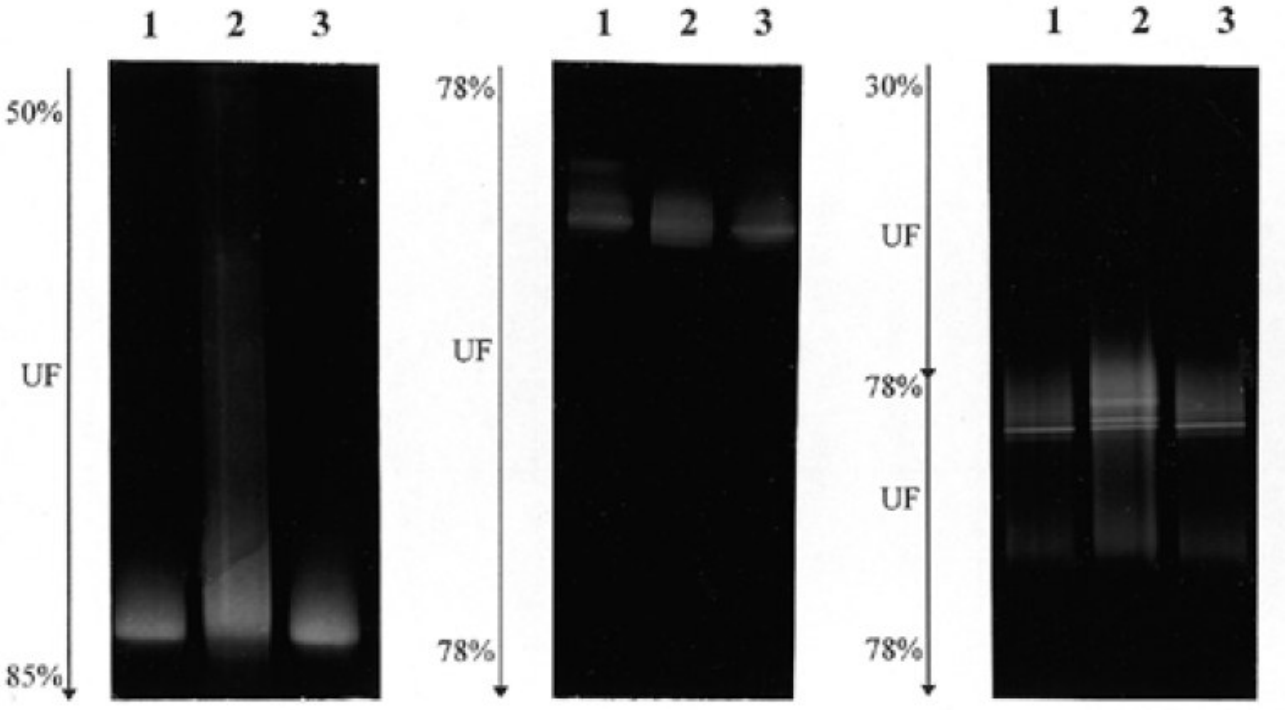
圖三十七：邏輯回歸判斷其罹患疾病可能性的分佈圖（取材自：Gafan et al.,. 2005）
0 代表沒有齒齦炎，1 代表有齒齦炎。

3. 與不同技術的整合運用

3.1 與TTGE及CDGE的整合運用

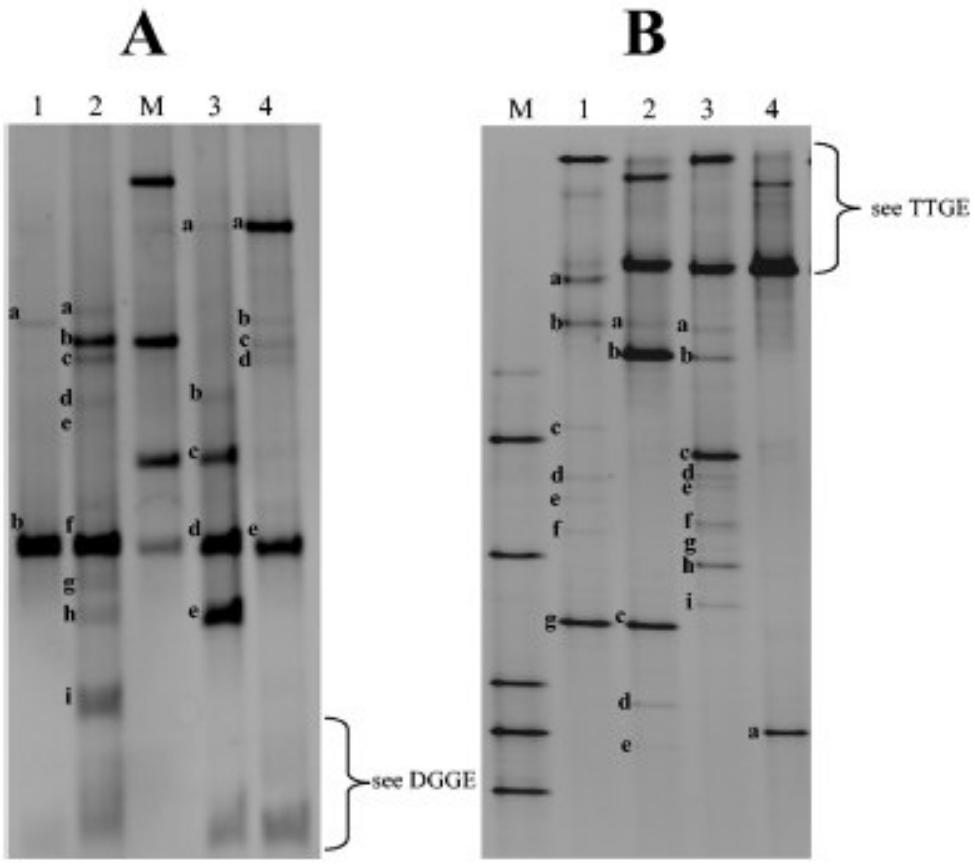
DGGE被證明是一個強而有力的工具，可以偵測出大部分DNA的突變，但是對於高GC 序列的DNA 片段的突變，有時難以偵測。難以偵測的原因可能是因爲高GC DNA 片段的裂解溫度(Tm)和接合位置的溫度差異很小，所以可以看見突變存在的變性梯度極爲狹

窄，另外由於裂解溫度極高，所以欲觀察的DNA片段位在膠體的底部，有DNA片段跑出膠體的風險。我們知道實驗用的PCR引子forward 端外加 40 bp的 GC clamp，在某些情況下，我們可以藉由調整GC clamp的長度，減少部份片段的移動能力來避免序列的完全分開。極端高GC 的序列(Tm值高於 80℃)，更長的GC clamp仍然不足以避免序列分開總。有幾種方法可以解決這個問題。其中一種是使用以化學clamp代替GC clamp的引子，化學clamp應該能防止序列完全分開，然而，仍然有些高 GC 序列的突變無法偵測。爲了克服這個問題，研究人員測試結合DGGE 和恆定變性劑膠體電泳(constant denaturant gel electrophoresis, CDGE)，因此兼具兩種方法的優點，並且成功偵測到高GC 片段的突變（如圖三十八）（Wu et al., 1999）。



圖三十八：高GC片段的突變分析（Wu et al., 1999）
A：使用DGGE進行分析，1、3是控制組爲野生株，2是實驗組包含野生株及突變株。
B：使用CDGE進行分析，1、3是控制組爲野生株，2是實驗組包含野生株及突變株。DGGE及CDGE皆未能分離突變株及野生株。
C：上半部使用DGGE，下半部使用CDGE進行分析。1、2、3是來自與圖A、B相同的樣品，1、3是控制組爲野生株，2是實驗組包含野生株及突變株。成功分離突變株及野生株。

另外，有研究指出可以使用暫時性溫度梯度膠電泳（temporal temperature gradient electrophoresis，TTGE)描述低GC含量的細菌，如許多乳酸桿菌（Latic Acid Bacillus，LAB）及一些葡萄球菌屬（*Staphylococcus*）等等，並且以DGGE描述那些高度及中度GC含量基因，如 *Kluyvera cryocrescens*，*Streptococcus thermophilus*等等。實驗證明，TTGE 和DGGE能迅速辨認在乳製品內的細菌種類（圖三十九） (Ogier et al.,. 2004.) 。



圖三十九：分別使用TTGE及DGGE觀察乳製品的菌相結構
A：使用TTGE觀察菌相結構。B：使用DGGE觀察菌相結構。兩者可以互補，如樣品一，TTGE只能觀察到兩個條帶，DGGE補足其未能觀察的部分。如樣品四，DGGE只能觀察到三個條帶，TTGE將原先只觀察到兩個條帶的部分增加至五個條帶。

3.2 與培養基方法的整合運用

PCR-DGGE 能有效查出具有優勢的種類，但是使用培養基的方法監測這些微生物菌相在污水中的成長期間的變化是更準確的。舉例來說，綜合性啤酒廠所產生的污水含豐富營

養物質，其成分包括葡萄糖、麥芽糖和乙醇，研究人員使用PCR-DGGE辨認佔優勢的微生物，使用培養基的方法監測混雜的培養菌相變化，和確定其降解基質的行爲。這些結果和方法隨後被使用在浮游及附著的菌相變化，三個微生物族群包括了二個細菌和一個黴菌種類，辨認爲 *Acinetobacter* 、 *Enterobacter* 和 *Candida*。PCR-DGGE和選擇性培養基使用來追蹤微生物在不同基質降解期間的變化。研究結果顯示，*Enterobacter* 能降解葡萄糖和麥芽糖但不能降解乙醇，但是 *Acinetobacter* 和 *Candida* 能降解乙醇。在混合的培養實驗中，*Enterobacter* 是主要的細菌，直到糖含量減少到會使 *Acinetobacter* 和 *Candida* 降解乙醇的程度（Tam et al., 2005）。

此外，DGGE能鑑定在污染中的優勢菌種，我們經由定序可以得知該物種的相關資訊，進而使用特殊培養基來培養該優勢菌種，以便將該優勢菌種運用於整治的過程中，所以培養基的使用是不可或缺的。

3.3 與蛋白質分析技術的整合運用

我們知道分子生物的中心原則是DNA產生RNA，然後RNA產生蛋白質，並且實際參與反應的通常是蛋白質，所以除了知道微生物的DNA資訊，我們也必須知道蛋白質的相關資訊。

有一種研究蛋白質體 (proteomic)方法，稱爲 metaproteomics，可以應用於觀察自然微生物菌相的蛋白質圖譜(metaproteomes)。metaproteomics 可以直接觀察具功能性的基因的表現、其相對含量和蛋白質的修飾狀態。metaproteomics 是依靠二維膠體電泳(2D-PAGE) 結合介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜分析(MALDI-TOF MS) 或電噴霧串聯質譜分析(LC-ESI-MS/MS)，MALDI-TOF MS 是利用質量的不同來鑑定蛋白質，LC-ESI-MS/MS 是利用序列的不同來鑑定蛋白質。這項技術被使用來分析某海灣的微生物菌相的的蛋白質圖譜。海灣包含的的蛋白質圖譜包含的蛋白質爲 pI 4-8，以及明顯的大分子量（在 10-80

之間 kDa），對中間海灣的蛋白質圖譜進行雙重複檢測，兩者之間具有將近 92% 的相同蛋白質斑點，顯示 metaproteomic 適合應用於這項研究中，並且中間海灣的蛋白質圖譜和上部和底層的海灣的蛋白質圖譜只分別具有 30% 和 70% 相同的蛋白質斑點。其中高度表現的蛋白質經由 MALDI-TOF 分析，並不是已知的蛋白質。另外有三種蛋白質由 LC-MS/MS 定序，並結合 MS-BLAST 搜尋加以辨認了，並且這些蛋白質和豐富的海灣微生物（*Bacteroides*、*α–proteobacteria*）有所相關，三種蛋白質分別標示爲 CB1、CB3、CB6。CB1 不能確定是何種蛋白質，並且由於期望值（E-value）太高，即可能誤差極大，所以不能確信其所屬物種，只是屬於 *Plasmodium berghei* 可能性較大。E-value 是期望值，表示在給定的序列長度下作排序時，隨機發生吻合的機率。E-value 值越小，表示序列間越相似，因而可能具有生物上的意義。CB3 爲 NADH:UQ oxidoreductase，來自 *Cytophaga hutchinsonii*，屬於 *Bacteroidetes* 的一種。CB6 爲 Predicted aminopeptidase，來自 *Novosphingobium aromaticivorans*，屬於 α-proteobacteria 的一種。（Kan et al.,.2005.）。這項研究是首次利用 metaproteomic 來調查水中的微生物，並且證明在自然環境中，metaproteomic 結合基因體學、分類學等等的研究等具有很大的潛力。我們可以經由 metaproteomics 可以幫助我們了解環境中微生物所具有的功能性蛋白質，並進而對微生物有更深入的了解。

Sample	Accession	Best hit	E-value	Organism	Accession
CB1	EAH98995.1	Hypothetical protein	0.47	*Plasmodium berghei*	CAI00437
CB3	EAH45127.1	NADH:UQ oxidoreductase (49 kDa, subunit 7)	1×10^{-63}	*Cytophaga hutchinsonii*	ZP_00309190
CB6	EAC65279.1	Predicted aminopeptidase	2×10^{-16}	*Novosphingobium aromaticivorans*	ZP_00305215

表十：鑑定出來的三種蛋白質（取材自：Kan et al.,.2005.）

CB1不能確定是何種蛋白質，並且由於期望值（E-value）值太高，所以不能確信其所屬物種，只是屬於 *Plasmodium berghei* 可能性較大。CB3爲NADH:UQ oxidoreductase，來自 *Cytophaga hutchinsonii*，屬於*Bacteroidetes*的一種。CB6爲Predicted aminopeptidase，來自 *Novosphingobium aromaticivorans*，屬於 α-proteobacteria 的一種。

（4）結論

DGGE對研究微生物菌相來說是一項非常有利的工具，未來還有許多發展的空間。可以藉著改進其前置作業，增加電泳圖譜的準確性，並且增加對DNA的敏感度等等。使用不同方法分析電泳圖，可以使我們更了解電泳圖所蘊含的資訊。同時DGGE可以藉著與其他技術配合，使我們的研究能更準確，並且更爲深入。

Reference

1. **謝昶毅，**2004，以PCR-DGGE技術分析石油探清化合物污染地下水之微生物相。
2. **林靜宜，**2004，菑濃溪流域之土壤微生物相調查
3. **Baker GC, Smith JJ, Cowan DA.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods. 55:541-55
4. **Bano N., Hollibaugh J. T.,** 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankt on assemblages from the arctic ocean. Appl. Environ. Microbiol. 68: 505-518.
5. **Bano Nasreen, Ruffin Shomari, Ransom Briana, Hollibaugh James T..** 2004. Phylogenetic composition of arctic ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. Appl. Environ. Microbiol. 70: 781–789
6. **Barbara T., Wonerow K., Paschke K.,** 1999. DGGE is more sensitive for the detection of somatic point mutations than direct sequencing. BioTech. 27: 266-268.
7. **Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, Vaughan EE, Abee T, de Vos WM.** 2005. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. Appl Environ Microbio*l.* 71: 4679-4689.
8. **Bestetti G, Galli E.** 1987. Characterization of a novel TOL-like plasmid from Pseudomonas putida involved in 1,2,4-trimethylbenzene degradation. J Bacteriol. 169: 1780-1783.
9. **Boivin ME, Massieux B, Breure AM, Greve GD, Rutgers M, Admiraal W.** 2005. Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. Environ Pollut. 140:239-46.
10. **Bull AT, Ward AC, Goodfellow M.** 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.Microbiol Mol Biol Rev. 64: 573-606.
11. **Bürgmann H., Pesaro M., Widmer F., Zeyer J.,** 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. J. Microbiol Methods. 45: 7-20.
12. **Calli B, Mertoglu B, Roest K, Inanc B.** 2006. Comparison of long-term performances and final microbial

compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. Bioresour Technol. 97: 641-647.

13. **Cassidy D. P., Hudak A. J.,** 2001. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. J Hazard Mater. 84: 253-64.
14. **Cavalca L., Dell'Amico E., Andreoni V.,** 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater : diversity of bacterial population and toluene monoxygenase genes. Appl Microbiol Biotechnol 64: 576-587.
15. **Cavalca L., Di Gennaro P., Colombo M., Andreoni A., Bernasconi S., Bestetti G.,** 2000. Distribution of catabolic pathways in some degrading bacteria of a subsurface polluted soil. Res. Microbiol 151: 877-887.
16. **Chang Y. J., Stephen J. R., Richter A. P., Venosa A. D., Bruggemann J.,Macnaughton S. J., Kowalchuk G. A., Haines J. R., Kline E., White D. C.,** 2000. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation : effect of profiling method. J. Microbiol. Methods. 40: 19-31.
17. **Chen R, Lapara TM.** 2006. Aerobic biological treatment of low-strength synthetic wastewater in membrane-coupled bioreactors: the structure and function of bacterial enrichment cultures as the Net growth rate approaches zero.Microb Ecol. 51:99-108
18. **Chung H, Zak DR, Lilleskov EA.** 2006. Fungal community composition and metabolism under elevated CO(2) and O(3).Oecologia. 147:143-54.
19. **Crump BC, Bahr GW, Michele B, Hobbie JE,** 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2253-2268.
20. **Crump BC, Hopkinson CS, Sogin ML, Hobbie JE.** 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time.Appl Environ Microbiol. 70: 1494-1505.
21. **Dang R K B, Anthony R S, Craig J I O, Leonard R C F, Parker A C.** 2002.Limitations of the use of single base changes in the p53gene to detect minimal residual disease of breast cancer. J Clin Pathol: Mol Pathol 55 : 177–181
22. **Danilo E., Giancarlo M., Giuseppe B., Salvatore C..** 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA

of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. Current Microbiol. 42:199-202

23. **Deeb R. A., Scow K. M., Lisa A. C.,** 2000. Aerobic MTBE biodegradation: an examination of past studies, current challenges and future research directions. Biodegradation 11:171-186.

24. **Donahoe-Christiansen J, D'Imperio S, Jackson CR, Inskeep WP, McDermott TR.** 2004. Arsenite-oxidizing hydrogenobaculum strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone national park. Appl Environ Microbiol. 70: 1865-1868.

25. **Duineveld B. M., Kowalchuk G. A., Keijzer A., van Elsas J. D., van Veen J. A.,** 2001.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 67: 172-178.

26. **Duineveld B. M., Rosado A. S., van Elsas J. D., van Veen J. A.,** 1998**.** Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. Appl. Environ. Microbio 64: 4950-4957.

27. **Ferris M. J. , Muyzer G., Ward D. M.,** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. 62: 340-346.

28. **Fiorenza S., Rifai H. S.,** 2003. Rewiew of MTBE Biodegradation and Bioremediation. Bioremediation J. 7: 1-35.

29. **Fischer SG, Lerman LS.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. Cell. 16:191–200

30. **Francisco A. de Souza, George A. Kowalchuk, Paula Leeflang, Johannes A. van Veen, Eric Smit**, 2004. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genu*s Gigaspora.* Appl. Environ. Microbiol. 70:1413–1424

31. **Gallego J. L. R., Loredo J., Llamas J. F., Vazquez F., Sanchez J..** 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation.

Biodegradation 12**:**325–335.

32. **Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA.** 2005. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. J Clin Microbiol. 43: 3971-3978.
33. **Gafan GP, Spratt DA.** 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGEGE) - An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities.FEMS Microbiol Lett. 253:303-307.
34. **Gary D. Bending, Suzanne D. Lincoln, Sebastian R. Sørensen, J. Alun W. Morgan, Jens Aamand, Allan Walker.** 2003. In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH. Appl. Environ. Microbiol. 69:827–834
35. **Gast RJ, Dennett MR, Caron DA**. 2004. Characterization of protistan assemblages in the Ross sea, antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis.Appl Environ Microbiol. 70: 2028-2037.
36. **Gich, F., Garcia, G. J., Overmann, J.,** 2001. Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. Arch Microbiol 177(1): 1-10.
37. **Gillan D, Danis B, Pernet P, Joly G., Dubois P.** 2005. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 71: 679–690
38. **Girvan MS, Bullimore J, Ball AS, Pretty JN, Osborn AM.** 2004. Responses of active bcterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. Appl Environ Microbiol. 70: 2692-2701.
39. **Green Stefan J., Minz Dror**, 2005. Suicide polymerase endonuclease restriction, a novel technique for enhancing PCR amplification of minor DNA templates. Appl Environ Microbiol. 71: 4721–4727.
40. **Haner A, Hohener P, Zeyer J.** 1997. Degradation of trimethylbenzene isomers by an enrichment culture under N_2O-reducing conditions. Appl Environ Microbiol. 63: 1171-1174.
41. **Hamamura N, Olson SH, Ward DM, Inskeep WP.** 2005. Diversity and functional analysis of bacterial communities associated with natural hydrocarbon seeps in acidic soils at Rainbow springs, Yellowstone

national park. Appl Environ Microbiol. 71: 5943-5950.

42. **Haynes S., Darby A. C., Daniell T. J., Webster G., Van Veen F. J., Godfray H. C., Prosser J. I., Douglas A. E..** 2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7216-7223

43. **Hendrickx B, Dejonghe W, Boënne W, Brennerova M.** 2005. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. Appl Environ Microbiol. 71: 3815–38251

44. **Hendrickx B, Dejonghe W, Faber F, Boenne W, Bastiaens L, Verstraete W, Top EM, Springael D.** 2006. PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites.FEMS Microbiol Ecol. 55:262-73.

45. **Herpers BL, Immink MM, de Jong BA, van Velzen-Blad H, de Jongh BM, van Hannen EJ.** 2006. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. Mol Immunol. 43:851-5.

46. **Horz HP, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJ.** 2004. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 15136-15141

47. **Hristova Krassimira, Gebreyesus Binyam, Douglas Mackay, Scow Kate M..** 2003. Naturally occurring bacteria similar to the methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2616–2623

48. **Jonathan D. Van Hamme, Ajay Singh, Owen P. Ward.** 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Review. 67: 503–549

49. **Kan J, Hanson TE, Ginter JM, Wang K, Chen F**. 2005. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities.Saline Systems. 1: 7.

50. **Kisand Veljo, Winker Johan.**2003.Limited resolution of 16S rDNA caused by melting properties and closely related DNA sequences. J. Microbiol. Methods 54: 183-191

51. **Kawai T., Yang CH, Matsumoto R., Crowley E., Sheppard D.** 2005. Comparison of PCR-DGGE and selective plating methods for monitoring the dynamics of a mixed culture population in synthetic brewery

wastewater.Biotechnol. Prog. 21: 712-719

52. **Knief C, Vanitchung S, Harvey NW, Conrad R, Dunfield PF, Chidthaisong A.** 2005. Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land uses. Appl Environ Microbiol. 71: 3826-3831.

53. **Koizumi Yoshikazu, Kelly John J., Nakagawa Tatsunori, Urakawa Hidetoshi, antroussi Saïd El-F, Al-Muzaini Saleh, Fukui4 Manabu, Urushigawa Yoshikuni, Stahl David A.**. 2002. Parallel characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization, and DNA microarray technology. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3215–3225

54. **Li Mei, Gong Jianhua, Cottrill Michael, Yu Hai, Lange Cornelis de, Burton Jeremy, Topp Edward**.2003. Evaluation of QIAampR DNA stool mini kit for ecological studies of gut microbiota. J. Microbiol. Methods 54: 13– 20

55. **Lin B**, **Braster M**, **van Breukelen BM**, **van Verseveld HW**, **Westerhoff HV**, **Roling WF.** 2005 Geobacteraceae community composition is related to hydrochemistry and biodegradation in an iron-reducing aquifer polluted by a neighboring landfill. Appl Environ Microbiol.71:5983-91

56. **McCammon Mark T., Gillette John S., Thomas Derek P., Ramaswamy Srinivas V., Rosas Ishmael I., Graviss Edward A., Vijg Jan, Quitugua Teresa N.**. 2005. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. Antimicrob Agents Chemother. 49(6): 2210–2217.

57. **McMurdo Dry Valleys, Antarctica.Karr EA, Sattley WM, Rice MR, Jung DO, Madigan MT, Achenbach LA.**. 2005. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in permanently frozen lake Fryxell. Appl Environ Microbiol. 71: 6353-6359.

58. **Miller D. N., Bryant J. E.,. Madsen E. L, Ghiorse W. C.**. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification. Appl Environ Microbiol. 65: 4715–4724

59. **Muyzer G, Ellen C. De Waal, Andre G. Uitierlinden**. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S

rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700

60. **Nakagawa T, Ishibashi JI, Maruyama A, Yamanaka T, Morimoto Y, Kimura H, Urabe T, Fukui M.** 2004. Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Western Pacific. Appl Environ Microbiol. 70: 393-403.

61. **Naoko Yoshida, Nobutaka Takahashi, and Akira Hiraishi.** 2005. Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin- dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. Appl Environ Microbiol. 71: 4325–4334

62. **Neufeld JD, Mohn WW.** 2005. Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 71: 4893-4896.

63. **Niemi R. Maarit, Heiskanen Ilse, Wallenius Kaisa, Lindstrom Kristina**. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. J. Microbiol. Methods 45: 155–165

64. **Nielsen D. S., Mølle P. L.r, Rosenfeldt V., Pærregaard A., Michaelsen K. F., Jakobsen M..** 2003. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7545–7548

65. **Nozawa-Inoue M, Scow KM, Rolston DE.** 2005. Reduction of perchlorate and nitrate by microbial communities in vadose soil. Appl Environ Microbiol. 71: 3928-3934.

66. **Ogier J.-C., Lafarge V., Girard V., Rault A., Maladen V., Gruss A., Leveau J.-Y., A. Delacroix-Buchet1.** 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis Appl. Environ. Microbiol. 70: 5628–5643

67. **Omry Koren, Vishnia Knezevic, Eliora Z. Ron, Eugene Rosenberg.** 2003. Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6337–6339

68. **Opelt K, Berg G**. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the baltic sea coast. Appl Environ Microbiol. 70: 6569-6579

69. **Prince R.C.,** 2000. Biodegradation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and other fuel oxygenares. Critical

Reviews Microbiolog. 26: 163-178.

70. **Pruden A. , Makram T. Suidan , Albert D. Venosa , Gregory J . Wilson**, 2001. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether under various substrate conditions. Environ. Sci. Technol. 35: 4235-424

71. **Pultz NJ, Stiefel U, Donskey CJ**. 2005. Effects of Daptomycin, Linezolid, and Vancomycin on establishment of intestinal colonization with Vancomycin-resistant Enterococci and extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in mice. Antimicrob Agents Chemother. 49: 3513-3516.

72. **Röing W. F. M., van Breukelen B. M., Braster M., Lin B., van Verseveld H. W.,** 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4619-4629.

73. **Rollins, B. D., Colwell, R. R.,** 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. 52: 531-538.

74. **Salles JF, van Veen JA, van Elsas JD**. 2004. Multivariate analyses of burkholderia species in soil: effect of crop and land use history. Appl Environ Microbiol. 70: 4012-4020

75. **Satokari R. M., Vaughan E. E., Akkermans A. L., Saarela M., DE Vos W. M..** 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl.Envirm. Microbiol. 67: 504-513.

76. **Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W., Siciliano S. D.,** 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1475-1482.

77. **Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM.** 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 232-236.

78. **Sharon Avrahami , Ralf Conrad,** 2003.Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6152–6164

79. **Sievert S. M., Brinkhoff T., Muyzer G., Ziebis W., Kuever J.,** 1999. Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island. Appl. Environ. Microbiol. 5(9):3834-3842.

80. **Sigler W.V., Miniaci C., Zeyer J.**, 2004. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. J of Microbiol Methods 57: 17– 22

81. **Simmona K.E., Steadmana D.D., Durkina Sarah, Baldwina Amy, Jeffreya W.H., Sheridanb Peter, Hortonb Rene, Shieldsb M.S..** 2004. Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. J. Microbiol. Methods 56: 143– 149.

82. **Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G..** 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Appl. Environ. Microbiol. 67**:**4742-4751.

83. **Snaider J., Fuchs B., Wallner G., Wagner M., Schleifer M., Amann K.H..** 1999. Phylogeny and in situ identification of a morphologically conspicuous bacterium, Candidatus Magnospira bakii, present at very low frequency in activated sludge. Environ.Microbiol. 1: 125-135

84. **Sun HY, Deng SP, Raun WR.** 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. Appl Environ Microbiol. 70: 5868-5874.

85. **Thor Straten P, Barfoed A, Seremet T, Saeterdal I, Zeuthen J, Guldberg P**, 1998.Detection and characterization of alpha-beta-T-cell clonality by denaturing gradient gel electrophoresis. Biotechniques. 25:244-50

86. **Tsai, Y. L., Olson, B. H.,** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1070-1074.

87. **Tzeneva VA, Li Y, Felske AD, de Vos WM, Akkermans AD, Vaughan EE, Smidt H**. 2004. Development and application of a selective PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to detect a recently cultivated bacillus group predominant in soil. Appl Environ Microbiol. 70: 5801-5809.

88. **Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K., Harayma S.,** 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4803-4809.

89. **Wiedemeier T. H., Rifai H. S., Newell C. J., Wilson J. T.,** 1999. Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface.

90. **Wilfred F. M. RO¨ Ling, Boris M. Van Breukelen, Braster Martin, Lin Bin, Van Verseveld Henk W.**, 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. Appl. Environ. Microbiol.67: 4619–4629

91. **Wilfred F. M. Ro¨ling, Couto de Brito Ivana R., Swannell Richard P. J., Head Ian M.,** 2004.Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. Appl. Environ. Microbiol.70: 2614–2620

92. **Wilfred F. M. Ro¨ling, Milner Michael G., Jone D. Martin s, Fratepietro Francesco, Swannell Richard P. J., Danie Fabien, Ian M.**, 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2603–2613

93. **Woese C. R.,** 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.

94. **Wu Ying, Stulp Rein P., Elfferich Peter, Osinga Jan, H. C. M. Buys. Charles, M. W. Hofstra Robert.** 1999, Improved mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. Nucleic Acids Research. 27: 15 e9

95. **Yossi Tal, Joy E. M. Watts, Harold J. Schreier**. 2005. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1816–1821

參考網址：

1. cwx.prenhall.com/.../ media_portfolio/19.html

2. molbiol.edu.ru/ review/04_03b.html

3. sars.nhri.org.tw/enews/enews_list_new2.php?volume_indx=119&showx=showarticle&article_indx=2938&enews_dt=2005-10-05

4. www.people.com.cn/BIG5/huanbao/41909/42116/3135748.html