

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用 DGGE-PCR 放大 DNA 技術分析掩埋場土壤中甲烷氧化菌  
之多樣性

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-041-004-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫主持人：劉瑞美

共同主持人：陳世雄，許菁珊，洪睦雅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 利用 DGGE-PCR 放大 DNA 技術分析掩埋場土壤中甲烷氧化菌之多樣性

計畫編號：94-2313-B-041-004

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：劉瑞美 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

### 摘要

甲烷為重要溫室效應氣體之一，大氣中每年約以 0.5-0.8 % 的速率在增加中，甲烷是極端厭氧之甲烷生成菌於還原環境下分解簡單有機分子所產生，掩埋場是大氣甲烷的重要來源，甲烷的分解主要依賴甲烷氧化菌。本研究選擇台南地區南沙崙掩埋場及城西里掩埋場之不同掩埋齡區進行研究，利用分子生物方法建立掩埋場土壤甲烷氧化菌的社會結構，針對甲烷氧化菌的功能性基因 *pmoA* 與 16S rDNA 設計專一性的引子，以聚合酶連鎖反應放大 DNA，分析不同掩埋齡土壤之甲烷氧化菌社會結構，利用聚合酶連鎖反應進行擴增基因片段，可知在南沙崙掩埋場以 *Methylocystis* sp. 菌屬最多。在城西里掩埋場以 *Methylocaldum* sp. 為主。恆溫孵育試驗中甲烷之削減速率以南沙崙掩埋齡 0-2 年掩埋場最高，該區域之甲烷氧化菌種類較多，群落結構較為複雜，其甲烷削減率最高。而城西里掩埋場之甲烷削減率較低，且甲烷氧化菌以 *Methylocaldum* sp. 為主，推測此菌屬適合在低甲烷濃度環境下生長。

**關鍵字：**掩埋場、掩埋齡、甲烷、甲烷氧化菌

### Abstract

Methane is an important greenhouse gas, and the concentrations of methane increase at the rate of 0.5-0.8 % year<sup>-1</sup> recently. Most of methane is produced biologically by a group of strictly anaerobic bacteria in highly reduced environments. Landfill is one of the important biogenic methane sources. Methanotrophs are important regulators of methane fluxes from the landfill to atmosphere. To investigate the methane emission from landfill, soil samples were taken from Nan-Sa-Lun and Cheng-Chi-Li landfills located in Tainan. To establish the community structure of methanotrophs in

landfills, the investigation was revealed by molecular method. The methanotrophic population will be analyzed by the sequence of DNA fragment amplified by PCR using particulate methane monooxygenase A (*pmoA*) gene and 16S rDNA from the total soil population. *Methylocystis* sp. and *Methylocaldum* sp. were found to be dominated members of methanotroph community in Nan-Sa-Lun and Cheng-Chi-Li landfills, respectively. The highest oxidation efficiency of methane and the higher methanotrophic diversity were found in the 0-2 year-old Nan-Sa-Lun landfill. *Methylocaldum* sp. revealed from Cheng-Chi-Li landfill soil could grow in the lower CH<sub>4</sub> concentration condition.

**Keywords :** landfill, cover age, methane, methanotroph

### 前言

甲烷 (CH<sub>4</sub>) 為一重要溫室氣體，其對溫室效應的貢獻量僅次於二氧化碳 (約佔 15%)<sup>(1)</sup>，然而其溫室效應潛勢約為二氧化碳的 26 倍<sup>(2)</sup>，且甲烷在大氣中的生命週期約 9 年<sup>(3)</sup>。因此，消滅甲烷以降低全球溫室效應的衝擊極為重要。

甲烷為大氣中主要的有機性碳氫化合物氣體，其產生源主要來自於水稻田、反芻動物、濕地、工廠排放、掩埋場等，就全球而言，每年約有 653 Tg 的廢棄物是經由掩埋法來處理<sup>(4)</sup>，1999 年台灣地區以掩埋法(包括：一般掩埋場與衛生掩埋法)處理者佔總垃圾量之 70~90 %，以 1998 年的垃圾量來估算，台灣地區甲烷總排放量為 913 千公噸，其中甲烷排放源以垃圾衛生掩埋場為最大宗(佔 73 %)。若沒有任何減量措施，垃圾掩埋所導致的甲烷釋出將成為大氣甲烷之第三來源。在垃圾掩埋的過程中約有 50~90 % 的甲烷釋出可被減量，若能在 2050 年時作好所有

的減量措施(包括：氣體回收，覆土時之甲烷氧化及資源回收再利用等)，則全球經由垃圾掩埋所釋出的甲烷量到了 2100 年時預估將僅為 13 Tg yr<sup>-1</sup>。

本人負責的 93 年國科會/環保署計劃中測定台南地區二處垃圾掩埋場之溫室氣體排放，其中南沙崙掩埋場之甲烷濃度介於 2.39~1074.3 ppmv，城西掩埋場之甲烷濃度介於 2.23~1958.2ppmv。南沙崙掩埋場掩埋生垃圾的區域(0-2 年)的甲烷釋出率為所有處理中最高者，為掩埋灰渣(城西 0-2 年)區域的 8.3 倍。城西掩埋場內自 87 年已正式使用焚化爐進行垃圾處理，致垃圾焚化量逐年提昇，同時垃圾掩埋多以灰渣為主，該場區內使用中的區域之溫室氣體隨垃圾掩埋量消長，且隨焚化設備的增加，溫室氣體排放總量有下降之趨勢<sup>(5)</sup>。

垃圾衛生掩埋時，覆土可防止蚊蠅滋生之衛生問題，並可提供土壤微生物，加速垃圾分解，亦可提供甲烷氧化菌降低掩埋場之甲烷排放，覆土厚度、垃圾之水份含量、基質成分及掩埋時間皆會對甲烷排放量產生影響甚大<sup>(6,7)</sup>。甲烷氧化現象是由 *Methylocystis* sp. 等微生物所造成<sup>(8)</sup>。甲烷氧化菌(methanotroph)為革蘭氏陰性菌、可利用甲烷做為其生長時所需之碳源與能量來源<sup>(9)</sup>，在溼地與淡水系統中一年約可生物性氧化 700 Tg 的甲烷<sup>(10)</sup>。甲烷氧化菌在有氧的狀態下，利用甲烷單氧氧化酵素(Methane monooxygenase, MMO)將甲烷代謝成甲醇，再利用其他的酵素將甲醇代謝為甲醛、甲酸，最後成為二氧化碳<sup>(11,12,13)</sup>。在所有的代謝酵素中，以甲烷單氧氧化酵素最為重要，因為這是利用甲烷的第一個關鍵酵素。

由於分子生物技術的發展，已廣泛應用於偵測環境中的微生物，利用分子生物技術可不需經過長時間的培養和分離過程，而能快速檢測環境中的微生物。近年來，許多研究利用甲烷氧化菌 16S rRNA 基因序列設計核酸探針和引子，應用於環境中甲烷氧化菌的分析<sup>(14,15,16,17)</sup>或利用甲烷氧化菌的功能基因(*sMMO*, *pMMO*)設計核酸探針或引子來分析不同環境的甲烷氧化菌社會結構<sup>(8,17,18,19)</sup>。

甲烷氧化菌因生長緩慢，所以有關甲烷

氧化菌的生理和生態研究一直受到限制。早期甲烷氧化菌的研究主要是針對甲烷氧化菌的 *sMMO* 基因序列，這是因為 *pMMO* 酵素分離後具有不穩定性所致，但只有少數的甲烷氧化菌具有 *sMMO* 基因，所以並不能完全的表現出環境中的甲烷氧化菌族群結構。*pmoA* 基因普遍存在於每種甲烷氧化菌中，同時它已被研究出在甲烷氧化菌親緣關係分析上是一很具有可信度的基因標記。台灣目前有關掩埋場甲烷氧化菌生態的研究仍相當缺乏，本研究之主要目的在探討不同掩埋齡區甲烷氧化菌之族群結構分析及進行恆溫孵育研究，藉此評估不同掩埋齡區覆土對甲烷氧化作用之影響，並將甲烷氧化菌的 16S rRNA 與功能基因 (*pmoA*) 序列作為研究，並進行親緣關係的比對和甲烷氧化菌社會結構的研究，以建立台灣本土掩埋場甲烷氧化菌的資料庫。

## 材料與方法

### 1. 採樣區之選擇

本研究以台南地區南沙崙與城西里掩埋場作為研究試區。各樣區之背景概述如下：

#### 1. 南沙崙掩埋場

南沙崙垃圾掩埋場屬於二仁溪流域，於民國 64 年進行垃圾掩埋，大部分場區為低窪地，以掩埋生垃圾為主。因掩埋場規模小，故掩埋覆土之作業亦較為簡單，並無妥善規劃土地之再利用。其場區目前現況示於表 1。

表 1. 南沙崙垃圾掩埋場現況

樣區	掩埋齡	使用狀況
A 區	0~2 年	現使用中
B 區	3 年	已完成封閉覆土
C 區	5 年	已完成封閉覆土

#### 2. 台南城西里掩埋場

南沙崙垃圾掩埋場佔地面積 14.5 公頃，於 87 年完成興建垃圾焚化爐，日處理量約為 900 噸，目前該場區以掩埋灰渣為主，使用情形示於表 2。依不同掩埋齡之採樣區可分為：A 區 0-3 年為現使用中的區塊、B 區 3-5 年為封閉覆土之區域，目前白天以風扇進行吹散部份甲烷及 C 區 5-10 年為掩埋封閉覆土之再利用，並綠化植栽及美化環境，設置成慢速壘球場及休閒公園。

表 2. 城西里垃圾衛生掩埋場現況

採樣區	掩埋齡	使用狀況
A 區	0-3 年	現使用中
B 區	3-5 年	已完成封閉覆土
C 區	5-10 年	已完成封閉覆土

## 2. 採集土樣之前處理

採集掩埋場覆土，土樣採集回研究室之後，先去除小草、石頭等雜物後，攤平、風乾，並避免陽光直射。將風乾後的土壤充分碾碎，再以篩網(2mm)過篩後，裝入夾鏈袋於 4°C 下妥善保存。

## 3. 土壤基本性質分析

土壤之基本理化性質參考土壤分析手冊進行之。

## 4. 土壤 DNA 萃取

本研究選取南沙崙掩埋場及城西里掩埋場之土壤，並利用萃取土壤核酸專用的試劑組為 Ultraclean Extraction of Soil DNA (MOBIO Laboraories Inc., Solana Beach, Cal., USA) 進行土壤總 DNA 萃取。

## 5. 聚合酶連鎖反應(PCR)

本研究使用聚合酶連鎖反應器為 Applied Biosystems 2720，應用的引子對示於

表 3，利用 16S rRNA 保守片段及 *pmoA* 功能片段來設計。利用升溫至 94°C 維持 5 分鐘，使雙股 DNA 模板變性成單股，接著進行 35 個循環的升降溫反應：94°C 使 DNA 變性 45 秒，61°C 引子黏合 1 分鐘，72°C 延長 DNA 45 秒，最後 72°C 合成 DNA 5 分鐘。

表 3. 本研究所使用之甲烷氧化菌基因序列引子對

Primer	Target gene for PCR	Sequence
189CF	<i>pmoA</i>	GGCGACTGGGACTT C
Mb661R	<i>pmoA</i>	CCGGAGCAACGTC CTTACC
Un27F	16S rRNA	AGAGTTTGATCCTG GCTCAG
Type2b	16S rRNA	ATACCGGTCATGT CAAAGC
Mm835	16S rRNA	GCTCCACTACTAA GTTC
Ms1020 r	16S rRNA	CCCTTGCGGAA GGAAGTC
Mc1005 r	16S rRNA	CCGCATCTCTG CAGGAT

## 6. 瓊脂膠體電泳

使用 0.8% Agarose gel 進行電泳來確認萃取的基因組 DNA 含量及純度。利用 2% 瓊脂膠片分析聚合酶連鎖反應後之產物，以 100 伏特進行電泳後，將膠片放置 EtBr 溶液，染色 15 分鐘，再以二段水清洗數次後，放置於紫外光箱觀察，亮帶出現的位置與同時進行電泳的 DNA 標準品比對即可知道產物之純度與分子量大小。

## 7. DNA 定序分析

將 PCR 產物送至「明欣生物科技公司」代為定序，再將所得序列結果送至 NCBI 所建立之基因庫序列比對分析，以進行菌種鑑定。

## 8. 變性梯度膠體電泳(DGGE)

利用 DNA 序列之不同所產生之不同開鏈程度來區分，為確保 DNA 片段是以部份解鏈游離形式進行電泳，在聚合酶連鎖反應時

會在其中一端的引子加上一段大約 30~50 個鹼基由 GC 組成片段 ( 稱 GC clamp ) , 利用變性梯度膠片將 DNA 變性分離。

本研究利用 The D-Code TM Universal Mutation Detection System ( Bio-Rad ) 系統進行 DGGE 試驗, 變性梯度膠片之配製示於表 4。將 PCR 產物進行 DGGE 鑑定, 片段 189CF-GC 與 Mb661R 為 10% 膠體變性梯度為 35~80%, 電泳操作條件為 200V, 60°C, 5 小時, 再進行銀染 15 分鐘, 於 UV 箱內觀看結果, 並以拍照。

表 4. 引子 189CF-GC~Mb661R PCR 產物之 DGGE 膠片配置條件(10% gel)

Denature	35%	80%
40% acrylamide/bis (37 : 5 : 1)	3.75mL	3.75mL
50X TAE Buffer	0.5mL	0.5mL
Formamide (deionized)	3.5mL	8 mL
Urea	3.675g	8.4g
To distilled water	To 25mL	To 25mL
10% APS	250µl	250µl
TEMED	10µl	10µl

## 結果與討論

本研究選定台南地區南沙崙及城西里垃圾掩埋場之不同掩埋齡區, 收集覆土, 運用分子生物技術, 配合各樣本區覆土 DNA 之抽取, 探討各樣區甲烷氧化菌族群之差異。

### 一、掩埋場土壤之性質

掩埋場之覆土性質為影響甲烷釋放之重要變因, 故本研究採集不同掩埋齡區之表土, 並進行土壤理化性質分析。

#### 1.南沙崙掩埋場之土壤性質

南沙崙掩埋場不同掩埋齡土壤性質分析結果, 該場區質地土壤為砂質壤土。各採

樣區之 EC 值大約在 0.05-0.67ds/m 之間, 以 B 區之 EC 值較高。土壤 pH 值約為 7.4-8.4 之間, 呈現偏鹼性。在樣區中有機質含量約在 0.66-9.9 % 之間, 其中以 B 區土壤之有機質含量較高。有效磷含量約為 8-18mg/kg 之間, 各樣區差異不大。而有效性鉀之含量約在 35-379 mg/kg 之間, 則 B 區之有效鉀略高於其他樣區。總氮含量約為 0.39-0.87g/kg 之間, 吹氣口之總氮含量較低於其他樣區, 其次以 A 區之總氮含量較多。微量元素方面, 包括: Cu、Fe、Mn 及 Zn, 均以 A 區之微量元素含量較高於其他樣區, 針對 Fe、Mn 含量來說均以 A 區 (0-2 年) 樣區最高。

### 2.城西里掩埋場之土壤性質分析

城西里掩埋場之土壤為砂質壤土。各採樣區之 EC 值約在 0.239-1.93ds/m 之間, 其中以 B 區 EC 值高於其他樣區。土壤中 pH 值約為 7.8-8.49 之間, 皆為偏鹼性。有機質含量約為 0.38-3.38%, 以 C 區有機質含量較低, A 區有機質含量較高。有效磷含量約為 8-12 mg/kg, 其差異不大。有效性鉀含量約為 124-208 mg/kg 之間, A 區之有效鉀高於其他樣區。有效鈣含量約為 4734-5590 mg/kg 之間, 差異不大。總氮含量約為 0.25-0.79 g/kg 之間, 以 A 區總氮含量較高於其他樣區。在 Fe、Mn 方面, A 區含量最低, 可能因掩埋灰渣物質有關。

### 二、不同掩埋之土壤 DNA 萃取

#### 1.南沙崙掩埋場之土壤 DNA 萃取

本研究以土壤 DNA 試劑組萃取 DNA, 針對南沙崙掩埋場及城西里掩埋場之不同樣區進行萃取試驗, 南沙崙掩埋場於不同樣區之萃取土壤 DNA 結果示於圖 1。由於萃取過程中, 每個樣區土壤性質不同, 所萃取 DNA 濃度不盡相同。A 區目前正在使用中且掩埋垃圾性質較複雜, 故其在萃取 DNA 過程中較困難。B 區有機質含量較多, 在萃取過程中

也是一大挑戰，C區及吹氣口之土壤，DNA容易萃取，故其進行聚合酶連鎖反應時只需要更微量的DNA量即可進行反應。

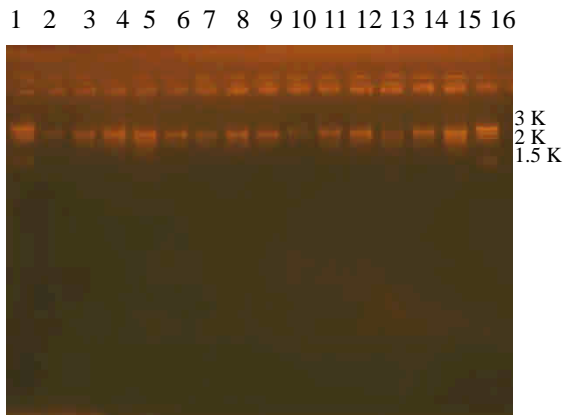


圖 1. 南沙崙掩埋場土壤之DNA經MOBIO試劑組抽取結果

Land 1,16: Marker (3 K DNA ladder); Land 2-5: A區 1-4; Land 6, 7: 吹氣口 1,2; Land 8-11: B區 1-4; Land 12-15: C區 1-4

## 2. 城西里掩埋場之土壤DNA萃取

城西里掩埋場之不同掩埋齡其土樣DNA萃取結果示於圖 2。城西里掩埋場因掩埋性質較單純化，土壤中有機質含量少，故在萃取土壤中，較為容易。由圖 2 可看出，DNA片段長度大約在 23230~9416bp 左右。

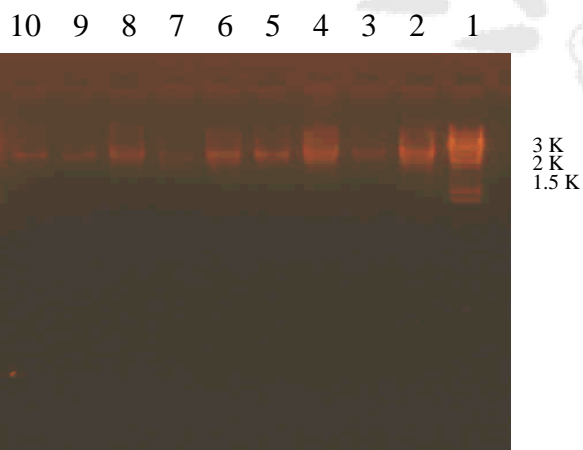


圖 2. 城西里掩埋場土壤之DNA經MOBIO試劑組抽取結果

Land 1: Marker (3K DNA ladder); Land 2-4: A區 1-3; Land 5-7: B區 1-3; Land 8-10: C區 1-3

## 三、掩埋場覆土之甲烷氧化菌族群結構

本研究利用不同的引子進行聚合酶連鎖反應來放大 16S rRNA 或 *pmoA* 片段，以進行比較。

## 1. 南沙崙掩埋場之聚合酶連鎖反應

本研究中採用不同引子來針對甲烷氧化菌進行 16S rRNA 之保守片段與 *pmoA* 片段之聚合酶連鎖反應。

利用不同 16S rRNA 引子，分析南沙崙掩埋場不同樣區之甲烷氧化菌族群分佈，以 Mb835 & Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，在掩埋齡 5 年樣區中含有甲烷氧化菌群為 *Methylocystis* sp.。利用 Type2b & Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，發現掩埋齡 0-2 年樣區中甲烷氧化菌群為 *Methylocystis* sp., *Methylobacter* sp., *Methylobacterium* sp.，在掩埋齡 3 年樣區中僅有 *Methylocystis* sp.，而 5 年樣區甲烷氧化菌群有 *Methylocystis* sp., *Methylobacterium* sp.。利用 Mb661R & 189CF 引子進行聚合酶連鎖反應後，比對出在掩埋齡 0-2 年甲烷氧化菌群含有 *Methylocaldum* sp., *Methylococcus capsulatus*，在 3 年樣區中有 *Methylocystis* sp.; *Methylocaldum* sp.，在吹氣口樣區中有 *Methylocystis* sp., *Methylocaldum* sp.。利用 M20 & Un27F 引子進行聚合酶反應，發現在吹氣口附近甲烷氧化菌族群有 *Methylosinus sporium*, *Methylocystis* sp.。利用 M5 & Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，在掩埋 0-2 年樣區中甲烷氧化菌有 *Methylococcus capsulatus*。

針對 *pmoA* 功能性基因對不同掩埋齡之樣區進行聚合酶連鎖反應後，以 100 伏特 30 分鐘進行電泳分析，結果示於圖 3，其產物結果在各樣區聚合酶連鎖反應產物片段長大約為 500 bp，結果可知在這些樣區中都具有甲烷氧化菌功能性基因，亦可確定在萃取土壤 DNA 中，含有甲烷氧化菌群。將產物送至定序公司進行比對，並將序列結果送至 NCBI 基因資料庫比對，可知掩埋齡 0-2 年甲烷氧

化菌族群有 *Methylocaldum* sp.; *Methylococcus capsulatus*，在掩埋齡 2-3 年樣區中甲烷氧化菌有 *Methylocystis* sp.; *Methylocaldum* sp.，掩埋齡 5 年之樣區甲烷氧化菌有 *Methylocaldum* sp.; *Methylocystis* sp.; 在吹氣口附近甲烷氧化菌族群有 *Methylocaldum* sp.; *Methylocystis* sp.。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

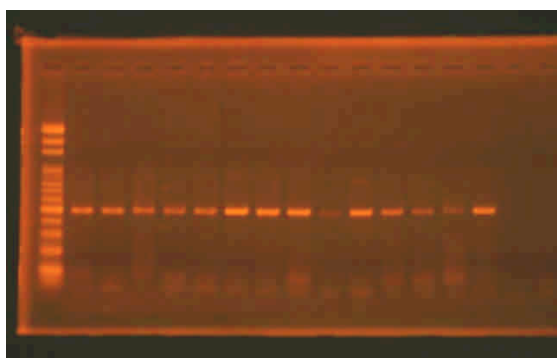


圖 3. 南沙崙掩埋場利用 A189CF&Mb661R 引子進行聚合酶連鎖反應結果

Land 1 : Marker ( 100bp ladder ); Land 2, 3, 4, 5 : A 區 1-4; Land 6-9 : B 區 1-4; Land 10-13 : C 區 1-4; Land 14, 15 : 吹氣口 1, 2

利用含有 GC-clamp 引子進行聚合酶連鎖反應後，以變性梯度電泳做進一步分析其菌屬之間之差異性，其結果如圖 4 所示，在掩埋齡 0-2 年樣區中，有其它片段存在，可能在此樣區含有其他菌屬存在，未來可進一步深入分析。掩埋齡 3-5 年區之聚合酶連鎖反應之產物片段較濃厚，可能因 DNA 濃度太高而造成的，在進行變性梯度電泳時可在嘗試改變膠片之變性濃度，尋求最適當的操作相關條件，可能結果會較佳。在吹氣口附近經由吹氣方式，將甲烷排放於大氣中，故土壤中甲烷量少，則甲烷氧化菌沒有甲烷作為碳源及能源，相對甲烷氧化菌群在親緣關性上比較接近。

15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

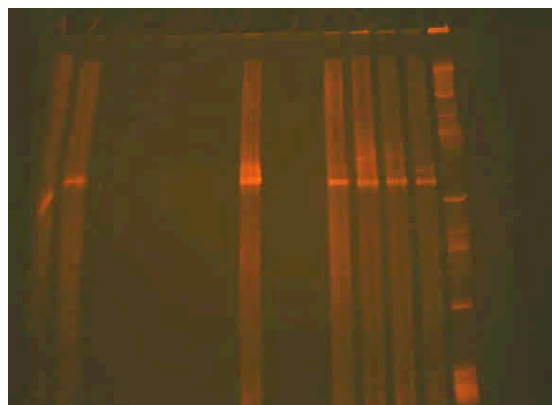


圖 4. 南沙崙掩埋場各區域之 DGGE 指紋圖譜  
Land 1 : Marker ( 100bp ladder ); Land 2-5 : A 區 1-4; Land 6-9 : B 區 1-4; Land 10-13 : C 區 1-4; Land 14, 15 : 吹氣口 1, 2

## 2. 城西里掩埋場之聚合酶連鎖反應

利用以 16S rRNA 及 *pmoA* 引子進行聚合酶連鎖反應，在城西里掩埋場甲烷氧化菌之分佈較單純。將 Mb835&Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，在掩埋場 0-3 年甲烷氧化菌有 *Methylobacterium* sp.，掩埋 3-5 年甲烷氧化菌有 *Methylocystis* sp.，在掩埋 5-10 年樣區之甲烷氧化菌有 *Methylobacterium* sp.。以引子 Type2b&Un27F 進行聚合酶連鎖反應分析試驗，結果顯示在掩埋齡 0-2 年之甲烷氧化菌屬為 *Methylobacterium* sp.; *Myxococcales* str.。而 3-5 年掩埋樣區中甲烷氧化菌族群有 *Methylobacterium* sp.，掩埋齡 5-10 年甲烷氧化菌屬為 *Methylobacterium* sp.; *Methylobacter* sp.。利用 Mb661R&189CF 引子來進行反應，掩埋齡 0-2 年甲烷氧化菌屬均為 *Methylocaldum* sp.。而掩埋齡為 2-3 年區甲烷氧化菌屬僅有 *Methylocaldum* sp.。在掩埋齡為 5 年甲烷氧化菌為 *Methylocaldum* sp.，故利用 *pmoA* 功能性基因菌屬幾乎為 *Methylocaldum* sp.。利用 M20&Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，在掩埋齡 0-2 年之甲烷氧化菌有 *Methylocystis parvus*。而在掩埋齡 3-5 年之甲烷氧化菌族群有 *Methylocystis*

*parvus*。在掩埋齡 5-10 年之樣區並無結果。另一組 M5 & Un27F 引子進行聚合酶連鎖反應，在掩埋齡 0-2 年、3-5 年及 5-10 年樣區並無結果，可能這對引子比較專一性不大，故其在城西里掩埋場各掩埋齡樣區中無結果。

城西里掩埋場利用 189CF&Mb661R 引子進行聚合酶連鎖反應後，以 100 伏特 30 分鐘進行電泳分析，結果如圖 5 所示，在掩埋齡 0-3 年之菌屬具有 *pmoA* 功能性基因，序列片段大約在 500bp 左右，代表此樣區含有甲烷氧化菌族群，可在進一步分析菌屬種類。掩埋齡 3-5 年樣區亦有甲烷功能性 *pmoA* 基因片段，其片段大小約為 500bp，故其樣區中含有甲烷氧化菌群。在掩埋 5-10 年樣區中，聚合酶連鎖反應後進行電泳分析，可由膠片圖中看出基因片段大約在 500bp 左右，可知在掩埋樣區中亦有甲烷氧化菌族群。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

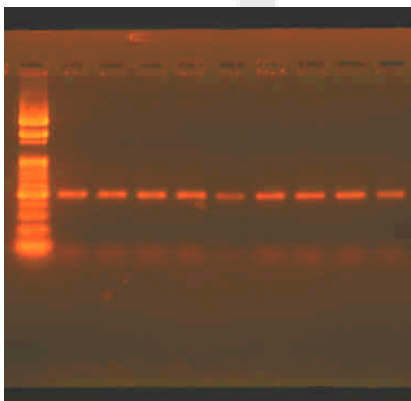


圖 5. 城西里掩埋場利用 189CF&Mb661R 引子進行聚合酶連鎖反應結果  
Land 1 : Marker (100bp ladder) ; Land 2-4 : A 區 1-3 ; Land 5-7 : B 區 1-3 ; Land 8-10 : C 區 1-3

城西里掩埋場各區域利用 189CF 含有 GC-clamp & Mb661R 進行聚合酶連鎖反應後，在以變性梯度電泳 (DGGE) 分析，條件為 200 伏特 300 分鐘，其結果指紋圖譜亮帶如圖 6 所示。在 0-3 年掩埋樣區中，甲烷

氧化菌可能不只有一種甲烷氧化菌，並利用變性梯度電泳容易判別甲烷氧化菌之多樣性。在掩埋齡 3-5 年之樣區中，由圖譜可判別出，在樣區中甲烷氧化菌族群之分佈可能含有三種以上之甲烷氧化菌族群，未來可利用馴養方式將甲烷氧化菌純化，再加以分析其功能性或蛋白質功能，可進一步探討其他甲烷氧化菌之多樣性。在掩埋 5-10 年之樣區中，進行變性梯度電泳分析時，故可在深入探討，或者可將片段分別切下，並送至定序公司，將序列結果上 NCBI 基因庫比對，可能有不同的甲烷氧化菌族群存在於該樣區中。

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

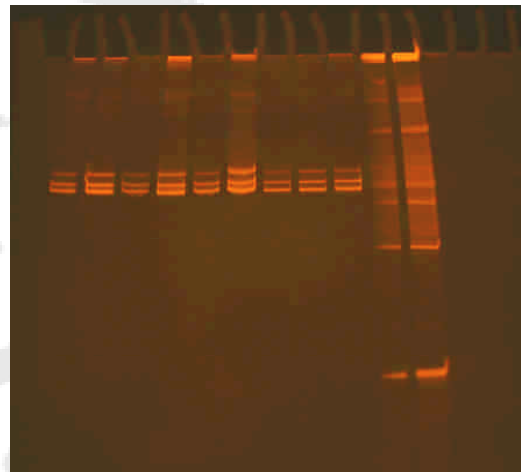


圖 6. 城西里掩埋場各區域之 DGGE 指紋圖譜  
Land 1 : Marker (100bp ladder) ; Land 2-4 : A 區 1-3 ; Land 5-7 : B 區 1-3 ; Land 8-10 : C 區 1-3

### 參考文獻

1. 陳永和，八十七年版環境白皮書。行政院環保署。台北，1998。
2. Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41 : 23-51.
3. Shipham, M., K. Bartlett, P. Crill, R. Harris, and D. Blaha. 1998. Atmospheric methane measurements in central New England: an analysis of the long term trend and the



- seasonal and diurnal cycles. *J. Geophysical Research* 103 : 10621-10630.
4. Thorneloe, S. A., M. A. Baralaz, R. Peer, L. C. Huff, L. Devis and J. Mangino. 1993. Waste management. *In Atmospheric Methane Sources, Sinks and Role in Global Change*, Khalil M.A.K. (ed.), NATO, ASI series, 13, 360-398, Springer-Verlag, Berlin, Heildeberg, Germany.
  5. 劉瑞美。2004。農(工)業生產及廢棄物處理溫室氣體排放現況、減量潛力及減量成本分析評估--台灣南部二處垃圾掩埋場之溫室氣體排放現況。國科會/環保署研究計畫成果報告。嘉南藥理科技大學，台南，台灣。
  6. Whalen, S. C., W. S. Reeburgh and K. A. Sandbeck. 1990. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3405-3411.
  7. Hegde, U., T. C., Chang and S. S. Yang. 2003. Methane and acrbon dioxide emissions from Shan-Chu-Ku landfill site in northern Taiwan, *Chemosphere*, 52,1275-1285.
  8. Horz, H.P., A.S. Raghubanshi, , J. Heyer, C. Kammann and R. Conrad. 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:247-257.
  9. Hanson, R.S., and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews.* 60: 439-455.
  10. Watanabe, I., T., Hashimoto, and A. Shimoyama. 1997. Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Biology and Fertility of Soil* 24: 261-265.
  11. Brusseau, G. A., H. C. Tsien, R. S. Hanson, and L. P. Wackett. 1990. Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and use of an ecolormetric assay to detect solube methane monooxygenase activity. *Biodegradation.* 1:19-29.
  12. Richard, S. H. and T. E. Hanson. 1996. Methyloctrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-471.
  13. Semrau, J. D., A. Chistoserdov, J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino, E. Kenna, A. J. Holmes, R. Finch, J. C. Murrell, and M. E. Lidstorm. 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* 177: 3071-3079.
  14. Brusseau, G. A., E. S. Bulygina, and R. S. Hanson. 1994. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 626-636.
  15. Cheng, Y. S., J. L. Halsey, K. A. Fode, C. C. Remsen, and M. L. P. Collins. 1999. Detection of methanotroph in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 648-651.
  16. Costello, A. M., and M. E. Lidstrom. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 5066-5074.
  17. Henckel, T., M. Friedrich, and R. Conrad. 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase . *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1980-1990.
  18. McDonald, I. R., and J. C. Murrell. 1997. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a function gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3218-3224.
  19. Miguez, C. B., D. Bourque, J. A. Sealy, C. W. Greer, and D. Groleau. 1997. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Microb. Ecol.* 33: 21-31.