

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

以 PCR 技術探討人工溼地的微生物生態

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH-91-10

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：王姿文

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：藥學系

中華民國 92 年 2 月 20 日

摘要

人工溼地具有天然溼地淨水及生態保育的功能，對於進流廢污水的處理效果亦相當不錯，包括氮、磷、有機物等，都有一定的去除率。溼地去除這些物質的過程中，微生物所扮演的角色相當重要，故計劃探討人工溼地中的微生物社會結構，了解溼地中微生物的種類，及其分布，本年度首先針對去除銨氮的銨氧化菌做探討，建立銨氧化菌的社會結構，了解其生態分布，與在溼地中所扮演的角色。我們首先由 DNA 資料庫中，找出所有相關的銨氧化菌之 16S rRNA 的基因序列，再參考相關文獻，設計出適當的引子 (primers)，然後進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)，變性梯度凝膠電泳分析法 (DGGE)、與 16S rRNA 的 DNA 片段選殖，核甘酸序列分析等，找出所有實驗過程的最適當條件，建立銨氧化菌的分析技術。

前言

人工溼地(constructed wetland system)為近年來國內開始發展的技術，是將生態工程技術應用於水或廢水管理的一種天然淨化系統，具有節省能源、降低處理成本、沒有二次污染、且不破壞自然生態環境等優點【1】，故能符合處理各類污染水源的技術要求。應用在廢污水的淨化，不論在研究上或實際應用上都已經有相當的成果：在已開發國家（美國、英國、澳大利亞）或開發中國家（南非、印度、中國大陸）均有許多學者參與人工溼地計劃之研究，並有超過 1000 個人工溼地的系統被實際應用，例如都市污水之處理【2,3】、農業或工業廢水之處理【4-7】、垃圾掩埋場或礦場滲出水之處理【8,9】等，人工溼地對於其中的污染物質如懸浮固體【9,10】、有機物質【10-12】、重金屬【13,14】及微生物【15】等，都有良好的去除效果。而美國 EPA 也在近幾年整合國內人工溼地的成果，完成有關人工溼地的設計準則與手冊【16,17】，以 Vermontville, Michigan 的系統為例，1972 年以 395,000 美金建造此一面積為 9 公頃的溼地，至 1990 年的整年操作費用僅需 4200 美金，且系統二十年後仍可持續操作，同時也為當地提供一個自然的野生生物棲息地，的確具有淨水、低維護成本及提供野生生物棲息之功能。然台灣之氣候、環境、地形、生物物種等與這些國家相距甚遠，因此，人工溼地系統於國內的應用則需要相關於本土型的設計與物種考量，並對於設立人工濕地後，生態之變遷與物種波動有一完整之研究紀錄，對於淨水及生態變化與復育的關係做一探討，建立人工溼地之本土資料庫，實際應用於本土環境之改善，使山林、河川、生物物種、水資源能永續利用。

微生物在環境中無所不在，微生物的污染也是環境污染中重要的課題之一。環境中包括空氣、水（飲用水、地下水或排放廢水）或土壤，均可能存在一些有害的微生物，造成人體或動物體的危害，例如以水為媒介的霍亂弧菌，會引起霍亂；痢疾桿菌所引起的痢疾。而傳統對於環境微生物的研究，大多限於公共衛生及勞工安全作業環境上的調查，以培養、收集或顯微鏡觀察為主，這些方法

對於一些難以在實驗室中培養的菌種，尤其是有害菌種，靈敏度太低，常無法真正偵測到環境中之微生物分布相，並了解各種微生物在生態中所扮演的角色。近年來由於分子生物學技術的發展，了解到物種間具有許多高度保留性（conservation）的基因，藉由這些基因序列的比較分析，可以做為物種間的親源鑑定依據【18-31】，因此而發展出許多相關的新技術。

菌種的鑑定技術除了傳統培養及顯微鏡觀察外，利用生化層次鑑定，亦即蛋白質或同功異構酵素的氨基酸序列與三度空間結構分析，也可判別菌種間親源關係；另外，分子層次的鑑定，即利用 DNA 序列之差異來判別，包括 RAPD、原位螢光雜交試驗（fluorescence in situ hybridization, FISH）、變性梯度電泳（denature gradient gel electrophoresis, DGGE）等，其中具有高度保留性的 16S rRNA 基因最常用來作為指標（marker）基因【18-31】，用來探討微生物間的親源關係及分類。16S rRNA 的作用是在細菌細胞合成蛋白質時，組成核糖體的主要成分之一，在物種的演化中由於穩定度高，變異小，故與物種的演化親源關係，具有相當高的關聯性。所有的原核類微生物均具有 16S rRNA 基因，而且含量與成長狀態成正比，當細胞處於優勢或生長旺盛期，蛋白質的需求即增加，而 16S rRNA 的量就相對較多，利用這個特性，我們可由已知的 DNA 資料庫中找出各物種之 16S rRNA 基因的核苷酸序列，經分析後設計出具有不同獨特性的引子（一段約數十個核苷酸的小片段單股 DNA，primers），可作為 DNA 探針（probe）以追蹤或定量；另外，也可結合聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）的技術，快速偵測出環境中的微生物種類【18-31】。對於無法於實驗室中培養的菌種鑑定相當有效，可進一步確實了解環境中的微生物相，探討微生物於環境種所扮演之生態角色。

實驗步驟

1. 人工溼地之設置與維護

本溼地系統為 FWS 系統，種植水生植物（蘆葦與香蒲）的實驗組及未種植水生植物的對照組，水生植物密度約 9 株/平方公尺，水力停留時間（HRT）控制約 2 天操作。

2. 樣本採集

當操作系統穩定後，開始進流並每週取水面與土壤交界處之土樣 1 次，隨後進行 DNA 抽取。

3. 樣品進行 DNA 抽取【19】

DNA 抽取方式優先嘗試：(1) Ogram et al.【28】的方法，以玻璃珠（bead beater）混合樣品及 SDS（sodium dodecyl sulfate），在 70°C 處理，將細菌細胞打破，然後進行 phenol-chloroform 去除蛋白質，再以 CsCl-ethidium bromide 做超高速離心，純化 DNA。(2) Tsai and Olser 的方法【29】，將樣品以 lysozyme 處理，細菌細胞破裂後立即冷凍，隨後解凍，然後再以 phenol-chloroform 去除蛋白質，以 isopropanol 將 DNA 沉澱，最後再以 Sephadex G-100 過濾純化。(3)

Jacobsen and Rasmussen 的方法【30】，乃藉由陽離子交換樹脂（cation exchange resin）將細菌細胞收集，然後再將細胞以 lysozyme 與 pronase 處理，細胞破裂後抽取 DNA。

4. PCR 【21,22,25,26,31】

將抽取純化之後的 DNA 溶解在最後反應濃度為 1 X PCR buffer 中，加入 $200 \mu\text{M}$ 的 dNTP，再與設計的引子混合，引子濃度為 $0.1 \mu\text{M}$ ，然後加入 2.5U 的 Taq DNA polymerase，最後調整體積為 $100 \mu\text{l}$ 。反應的流程則隨反應成果再做調整，大致上如下： $94^\circ\text{C}, 3 \text{ min}$ ； 35 cycles 的 $94^\circ\text{C}, 30 \text{ s denaturation}$ ， $56^\circ\text{C}, 45 \text{ s annealing}$ ，反應時為各 $72^\circ\text{C}, 2 \text{ min}$ ；最後一次反應調整為 $72^\circ\text{C}, 3 \text{ min}$ 。反應後取 $2 \mu\text{l}$ 於 1.0% 的 TAE agarose gel 中分析【22】。

結果與討論

1. 人工溼地的設立與穩定

人工溼地的設立與穩定大約需要 3-4 個月的時間，然後開始加入人工污染水，本計劃溼地之人工污染水為含農藥 2,4-D 的廢水，於加入污染水之前與加入後均定期採土樣，抽取土壤中之 total DNA，再進行 PCR 分析。

2. PCR 結果

將抽出的土壤之 total DNA，分別進行 PCR 反應，初步結果顯示抽出的 DNA 可以經由 PCR 反應後，得到大量的 DNA 產物，表示所設立的分析條件適當，預計於收集一部分 PCR 的 DNA 產物後，更進一步進行 DGGE 反應，以利其初步分類。目前所分離的 total DNA 樣本，溼地加入 2,4-D 前的有 12 組，加入 2,4-D 後的有 3 組，將持續抽取不同階段的 total DNA，以進一步比較分析。

參考資料

1. Bavor, H.J., Roser, D.J. and Adcock, P.W.(1995) "Challenges for the development of advanced wetlands technology", *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 32, No. 3, pp. 13-20.
2. Thomas, P. R., Glover, P. and Kalaroopan, T. 1995. An evaluation of pollutant removal from secondary treated sewage effluent using a constructed wetland. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 32, No. 3, pp. 87-93.
3. Juwarkar, S., Oke, B., Juwarkar, A. and Patnaik, S. M. 1995. Domestic wastewater treatment through constructed wetland in India. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 32, No. 3, pp. 291-294.
4. Vrhovsek, D., Kukanja, V. and Bulk, T. 1996. Constructed wetland for industrial waste water treatment. *Wat. Res.* Vol. 30, No. 10, pp. 2287-2292.
5. Yin, H. and Shen, W. 1995. Using reed beds for witer operation of wetland treatment system for wastewater. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 32, No. 3, pp. 111-118.
6. Comin, F.A., Romero, J.A., Astorga, V. and Garcia, C. (1997) "Nitrogen removal and cycling in restored wetlands used as filters of nutrients for agricultural runoff" *Wat. Sci. Tech.* Vol. 35, No. 5, pp. 255-261.
7. Kadlec, R.H., Burgoon, P.S. and Henderson, M.E. (1997) "Integrated natural systems for treating potato processing wastewater" *Wat. Sci. Tech.* Vol. 35, No. 5, pp. 263-270.

8. De Maeseneer, J.L. (1997) "Constructed wetlands for sludge dewatering" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 279-285.
9. Bulc, T., Vrhovsek, D. and Kukanja, V. (1997) "The use of constructed wetland for landfill leachate treatment" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 301-306.
10. Worall, P., Peberdy, K.J. and Millett, M.C. (1997) "Constructed wetlands and natural conservation" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 205-213.
11. Green, M.B., Griffin, P., Seabridge, J.K. and Dhobie, D. (1997) "Removal of bacteria in subsurface flow wetlands" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 109-116.
12. :aber, J., Perfler, R. and Haberl, R. (1997) "Two strategies for advanced nitrogen elimination in vertical flow constructed wetlands" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 71-77.
13. von Felde, K. and Kunst, S. (1997) "N-and COD-removal in vertical-flow systems" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 79-85.
14. Mungur, A.S., Shutes, R.B.E., Revitt, D.M. and House, M.A. (1997) "An assessment of metal removal by a laboratory scale wetlands" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 125-133.
15. Lakatos, G., Kiss, M.K., Kiss, M. and Juhasz, P. (1997) "Application of constructed wetlands for wastewater treatment in Hungary" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 331-336.
16. Ottova, V., Balcarova, J. and Vymazal, J. (1997) "Microbial characteristics of constructed wetlands" Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 5, pp. 117-123.
17. USEPA,"A handbook of constructed wetlands", a guide to creating wetlands for : agricultural wastewater, domestic wastewater, coal mine drainage, and stormwater, Volume 1, General consideration.
18. Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiology reviews. 15, 155-173.
19. Wintzingerode, F.v., Gobel, U.B.,and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology reviews. 21, 213-229.
20. Palys, T., Nakamura, L.K., amd Cohan, F.M. (1997) Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. Int. J. of systematic bacteriology, Oct. 1997, p.1145-1156.
21. Allen, A.E., Booth, M.G., Frischer, M.E., Verity, P.G., Zehr, J.P., and Zani, S. (2001) Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5343-5348.
22. Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol.63, 4516-4522.
23. Higgins, J.A., Jenkins, M.C., Shelton, D.R., Fayer, R., and Karns, J.S.(2001)Rapid extraction of DNA from Escherichia coli and Cryptosporidium parvum for use in PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5321-5324.
24. Alvarez, A.J., Buttner, M.P., Toranzos, G.A., Dvorsky, E.A., Tpro, A., Heikes, T.B., Mertikas-Pifer, L.E., and Stetzenbach, L.D. (1994) Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 60, 374-376.
25. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki K. and Komagata K. (1996) Proposal for two genera, Brevibacillus gen. Nov. and Aneurinibacillus gen. Nov. Int. J. of systematic bacteriology, Oct.. p. 939-946.
26. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. (2001) Denaturing dradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5113-5121.
27. Carol ash, J.A.E.Farrow, Sally Wallbanks and M.D. Collins. (1991) Phylogenetic heterogeneity

- of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology, 13, 202-206.
- 28. Ogram, A., Sayler, G.S. and Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Methods 7, 57-66.
 - 29. Tsai, Y.L. and Olsen, B.H. (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1070-1074.
 - 30. Jacobsen, C.S. and Rasmussen, O.F. (1992) Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2458-2462.
 - 31. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.

